

DOI: 10.13376/j.cbls/2019021

文章编号: 1004-0374(2019)02-0143-10

Angiomotin在肿瘤形成及Hippo 信号通路中调控研究进展

黄浩

(华中科技大学生命科学与技术学院, 分子生物物理学教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘要: Angiomotin (AMOT) 是一种血管抑制素结合蛋白, AMOT 在血管内皮细胞的迁移、紧密连接和管状形成等方面起着重要调控作用。AMOT 及其同源家族蛋白 AMOTL1 和 AMOTL2 可能与 Hippo 信号通路的下游效应分子 YAP 相互作用来参与调控肿瘤细胞的生长。在乳腺癌、前列腺癌等癌症中, AMOT 能够增加 YAP 进入细胞核的水平从而促进癌细胞的增殖和迁移;但在胶质母细胞瘤、肺癌等癌细胞中, AMOT 将 YAP 滞留在细胞质或紧密连接处,从而抑制 YAP 的活性。另外, AMOT 也可以促进 Hippo 信号通路中核心激酶 LATS 来发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用。AMOT 在肿瘤细胞生长中发挥的不同作用还需要更深入的研究,现对 AMOT 在癌症中的调控作用及在 Hippo 信号通路中的调控机制等方面的研究进展进行综述。

关键词: angiomotin; Hippo 信号通路; YAP; NF2; 肿瘤

中图分类号: Q257; R730.22 **文献标志码:** A

The role of angiomotin in tumorigenesis and Hippo pathway

HUANG Hao

(Key Laboratory of Molecular Biophysics of the Ministry of Education, College of Life Science & Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Angiomotin (AMOT) identified as angiostatin binding protein, and it plays an important role in the regulation of endothelial cell migration, tight junction and blood vessel formation. AMOT and its homologues AMOTL1 and AMOTL2 may interact with YAP, a downstream effector of Hippo pathway, to regulate the growth of tumor cells. AMOT could increase the level of YAP into the nucleus to promote the proliferation and progression of cancer cells such as breast cancer, prostate cancer. On the other hands, AMOT could delay YAP into the cytoplasm which could inhibits the growth of tumor cells such as glioblastoma and lung cancer. In addition, AMOT can also promote the core kinase LATS in Hippo pathway to inhibit the proliferation of tumor cells. The different roles of AMOT in the growth of tumor cells need to be further studied. This article mainly reviews the research progress in the regulation of AMOT in cancer and the regulation mechanism of Hippo pathway in cancer.

Key words: angiomotin; Hippo pathway; YAP; NF2; cancer

诱导血管生成是肿瘤的重要标志,大部分肿瘤的生长、侵袭和转移都依赖血管形成。特异性生长因子和抑制因子的相对浓度构成血管形成的平衡开关。一些血管生成抑制因子或以血管内皮细胞为靶点的抗血管生成治疗方法为肿瘤治疗提供了新的希望,近些年,一些血管生成抑制剂也进行了肿瘤治疗的临床试验。血管生成抑制素(angiotatin, AS)能

够抑制血管生成和内皮细胞的增殖和迁移^[1],不过作为药物还存在半衰期短,剂量水平难控制,治疗成本高等缺点。与 AS 的作用相反,血管肌动蛋

收稿日期: 2018-10-12; 修回日期: 2018-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31500629)

通信作者: E-mail: huanghaozy@hust.edu.cn

白 angiominin (AMOT) 能够促进新血管生成, 在内皮细胞的迁移、细胞极性和趋化等过程中起着很重要的作用, 这也使 AMOT 成为抗血管生成治疗的一种新药物靶点。研究发现, AMOT 在一些肿瘤中高表达; 而在另外一些肿瘤中, AMOT 能通过 Hippo 信号通路来抑制肿瘤的生长。对于 AMOT 在肿瘤形成中具体作用和机制目前还存在争议, 因此, 本文将综述目前 AMOT 在肿瘤形成机制和作为药物靶点在临床应用等方面的研究进展。

1 AMOT结构特点

AMOT 是 2001 年通过酵母双杂交筛选到的一种与血管抑制素相互作用的蛋白质, AMOT 由 675 个氨基酸组成, 相对分子质量约 80×10^3 , 称为 AMOT-p80^[1]。Ernkqvist 等^[2]鉴定出 AMOT 的另一种同源异构体, 它比 AMOT-p80 的 N 端多 409 个氨基酸, 相对分子质量约 130×10^3 , 称为 AMOT-p130。对紧密连接相关蛋白进行荧光定位筛选时鉴定出一种与 AMOT 高度同源的蛋白质 JEAP (junction enriched and associated protein), 也称为 AMOT 样蛋白 1 (AMOTL1), AMOTL1 有 956 个氨基酸, 相对分子质量约 106×10^3 ^[3]。还有一种与 MAGI-1 共定位在内皮细胞的紧密连接处 (tight junction, TJ) 的 MAGI-1 相关紧密连接相关蛋白 MASCOT (MAGI-1-associated coiled-coil tight junction protein) 也与 AMOT 同源, 称为 AMOT 样蛋白 2 (AMOTL2), AMOTL2 有 780 个氨基酸, 相对分子质量约 86×10^3 ^[4]。AMOT-p80、AMOT-p130、AMOTL1 和 AMOTL2 组成 AMOT 家族, 家族各成员都有可变的一长一短两个剪接位点, 形成具有不同功能的亚型蛋白质^[2,5-6]。

AMOT 家族蛋白结构 (图 1) 上有几个特点: AMOT-p130、AMOTL1 和 AMOTL2 的 N 端都有一段富含谷氨酰胺的 L/PPxY 基序^[7], 而 AMOT-p80 则缺少这些 N 端结构。N 端基序介导 AMOT-p130 与细胞紧密连接处微丝的结合^[8], 另外也可能参与 AMOT-p130 与含有 WW 结构域的蛋白质相互作用, 如类泛素连接酶 Nedd4 通过其 WW 结构域与 AMOT-p130 和 AMOTL1 的 P/LPXV 基序结合, 导致 AMOT-p130 和 AMOTL1 通过泛素化途径降解, 其中第三个基序对于 AMOT-p130 和 AMOTL1 的降解很重要, 而 AMOTL2 由于第三个基序的特异性而不能被 Nedd4 介导降解^[9]。AMOT-p130、AMOTL1、AMOTL2 也通过 PPxY 基序与 Hippo 信号通路的下游转录激活因子 YAP/TAZ 的 WW 结构域结合, 进而调控 YAP/TAZ 的转录活性^[10-11]。而 AMOT-p80 则缺少这些基序, 不能与 YAP 或 Nedd4 等具有 WW 结构域的蛋白质结合, 这种结构上的差异提示, AMOT-p80 与 AMOT-p130 在功能上的不同。

AMOT-p130、AMOTL1、AMOTL2 的中间和 AMOT-p80 的 N 端是由 230 个氨基酸组成的高度保守的卷曲螺旋 (coiled-coil, CC) 结构域。CC 结构域是由几条右旋 α 螺旋缠绕形成的一个超螺旋结构^[12]。序列比对显示 AMOT 的 N 端的 CC 结构域与双载蛋白 (amphiphysin) 带正电荷的 BAR (Bin/amphiphysin/Rvs) 结构域高度保守, 推测 CC 结构域与 BAR 具有相似功能^[13-14]。晶体结构显示, 果蝇双载蛋白 BAR 结构域是一个新月状二聚体, 单体由 3 条 α 螺旋形成卷曲螺旋, 单体交叉螺旋造成二聚体的弯曲。BAR 结构域能与细胞膜脂质体中的磷脂酰肌醇 PI(4)P、PI(3)P 和胆固醇结合^[15], 再通过寡聚化

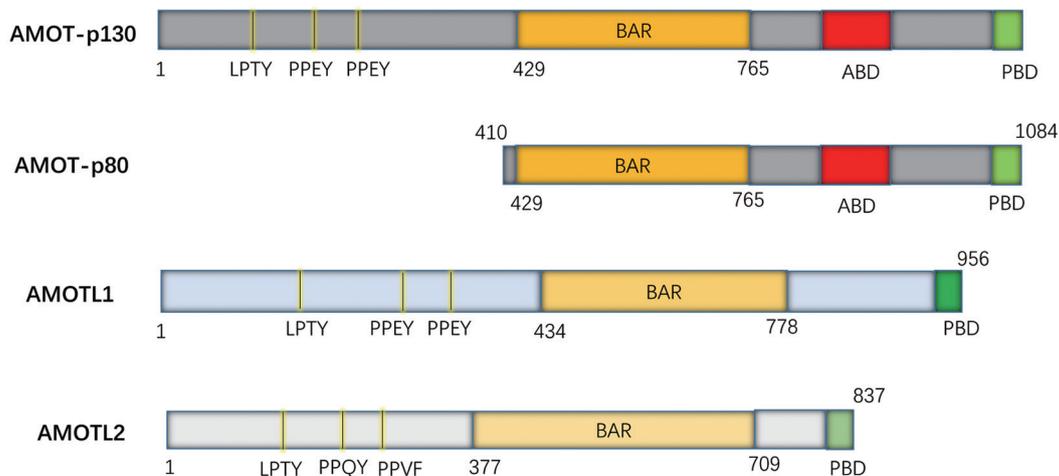


图1 AMOT家族蛋白结构域图示

来介导膜的弯曲,另外,也作为膜弯曲传感器通过与弯曲的膜结合来感受正确的膜弯曲^[16],这提示AMOT的CC结构域(BAR结构域)可能介导血管形成过程中的管状塑形。AMOT家族蛋白还可以通过BAR结构域进行同源或异源寡聚化调节^[5,6,8],AMOT-p80能够自身或与AMOT-p130形成同源或异源二聚体,AMOT-p130则不能形成自身同源二聚体^[8]。

AMOT家族蛋白的C末端是PDZ结合基序(PDZ binding motif, PBM),PDZ(PSD-95/Disc large/Zonula occludens-1)结构域主要介导形成大分子复合物和膜蛋白的精确定位^[17-18],PBM介导AMOT与其他PDZ结构蛋白的特异性相互作用。研究发现PBM突变体能够造成血管形成过程中趋化反应的缺失和管状结构形成障碍,抑制斑马鱼胚胎发育过程中内皮细胞迁移,从而导致胚胎死亡,而且体外血管生成实验中,PBM突变体也不能形成血管^[19-21]。这些研究提示,PBM是AMOT的重要功能结构域,在血管生成过程中发挥重要作用。

在AMOT-p80和p130的BAR结构域和C端PBM之间是疏水的AS结合结构域(angiotatin binding domain, ABD),AMOTL1和AMOTL2缺少这段结合结构域^[1,4]。分别用抗AMOT-p130的N端、ABD和C端的荧光抗体染色MAE细胞,抗ABD的抗体与ABD在细胞膜上结合,AMOT-p130的N端和C端在去垢剂处理细胞后才能检测到,结构预测分析认为,AMOT的疏水ABD含有跨膜结构域(AMOT-p80为479-503,AMOT-p130为541-559)^[6],抗AMOT的鼠源DNA疫苗产生抗体与AMOT-p80在内皮细胞表面结合^[22-23],推测AMOT构象可能是与AS结合的ABD暴露在细胞表面,N端BAR结构域和C端位于细胞膜内侧^[6,22]。但是也有报道,不用去垢剂处理小鼠肝脏胆小管的内皮细胞,收集液中也能得到AMOT-p80、p130和AMOTL2,提示AMOT家族蛋白不一定是膜蛋白^[1,24],后续的很多研究都倾向于认为AMOT是一种在细胞质和细胞核内发挥作用的蛋白质,关于AMOT是否是膜蛋白还有待进一步研究。

2 AMOT促血管生成机制

AMOT家族蛋白主要在血管内皮细胞、上皮细胞和一些肿瘤细胞中表达,早期的研究发现,AMOT家族蛋白在内皮细胞迁移、细胞趋化和极性、管状结构形成和稳定等方面发挥重要作用^[1,19]。

在观察小鼠胚胎视网膜血管生成阶段时,发现在血管形成早期主要表达的是AMOT-p80,此时内皮细胞主要行为是细胞迁移,而AMOT-p130主要在血管的稳定和成熟阶段表达^[8]。这提示AMOT-p80和AMOT-p130的相对表达水平可能是控制细胞迁移的一个开关。在MAE细胞中,AMOT-p130主要定位在紧密连接处,通过N端调节细胞骨架形成和细胞形状^[2,8]。在HEK293细胞中,磷酸化的AMOT-p130从紧密连接处的F-肌动蛋白上解离,并抑制应力纤维和黏着斑的形成,从而抑制细胞迁移^[25]。MDCK细胞中,AMOT-p80通过BAR的异源二聚化使AMOT-p130从细胞膜紧密连接处转移到细胞质中,从而抑制AMOT-p130对血管的稳定作用^[26]。在斑马鱼胚胎形成阶段,定位在紧密连接处F-肌动蛋白上的AMOTL1负责调控细胞极化和细胞旁通透性^[3,27],敲除AMOTL1导致斑马鱼胚胎血管生成障碍^[28]。MAE细胞中,敲除AMOTL2会抑制细胞的增殖和迁移^[29-30],但Agarwala等^[31]研究发现,敲除AMOTL2导致细胞的过度增殖和影响感受器官的大小。

AMOT家族蛋白通过C端的PBM与紧密连接相关蛋白Patj和Pals定位在紧密连接处^[13,24,32],RhoA GTPase交换因子(Rho-GEF)Syx与Patj相互作用形成AMOT/Patj/Syx三元复合物,AMOT的BAR结构域介导复合物与内吞囊泡的结合,内吞囊泡将Syx从内皮细胞连接处运送到细胞前端的片状伪足处,激活GTP酶CDC42,影响细胞骨架的极性分布,从而调控胚胎毛细血管的定向迁移^[24,32-33]。AMOT还可与GTP酶激活蛋白(GTPase activating protein)Rich1通过两者之间的BAR结构域相互作用,AMOT与Patj和Rich1形成复合物,将Rich1锚定到紧密连接处,抑制Rich1对CDC42的调控活性,从而维持细胞紧密连接并影响细胞极性^[13]。

3 AMOT在Hippo信号通路中的调控作用

Hippo信号通路是一条保守的抑制性信号通路,主要参与调控细胞生长、分化、组织再生等,通过促进细胞凋亡和抑制细胞增殖来调控器官大小的发育。其组成核心由几种激酶组成,哺乳动物细胞中Mst1/2激酶(果蝇同源蛋白Hippo)与脚手架蛋白WW45(果蝇同源蛋白Salvador)形成激酶复合物,磷酸化LATS1/2(果蝇同源蛋白Warts)和Mob1(果蝇同源蛋白Mats)。磷酸化的LATS1/2和Mob1相互作用增强,进而磷酸化下游的YAP(果

蝇同源蛋白 Yorkie), 阻止 YAP 进入细胞核与 TEAD (果蝇同源蛋白 Scalloped) 形成转录激活复合物, YAP-TEAD 转录激活复合物能够激活下游促进肿瘤生长和抗细胞凋亡等相关基因的表达, 如 *ApoE*、*AREG*、*BIRC5-2*、*CTGF*、*cyclin E*、*FGF*、*GLI-2* 等^[34,35]。磷酸化的 YAP 与 14-3-3 结合, 被滞留在细胞质中并被 β -TrCP 介导的蛋白酶降解, 不能进入细胞核发挥转录激活作用。

3.1 AMOT与YAP

2009年, Sowa等^[36]在研究哺乳动物细胞系统中与去泛素化酶结合的蛋白质时首次发现 AMOT 能与 YAP 结合。随后研究发现, AMOT-p130、AMOTL1 和 AMOTL2 通过 N 端的第一个 PPXY 基序直接与 YAP 的 WW 结构域结合, 将 YAP/TAZ 锚定在细胞紧密连接处, 促进 YAP/TAZ 的磷酸化, 阻止 YAP 入核发挥转录活性, 从而抑制肿瘤的生长^[10-11]。Bratt等^[6]研究发现, YAP 被磷酸化的 5 个 HxRxxS 保守基序中, Ser127 和 Ser381 的磷酸化对抑制 YAP 活性至关重要, YAP 和 TAZ 被 LATS 磷酸化后与 14-3-3 蛋白结合, 从而被滞留在细胞质中。Hippo 信号通路在果蝇中没有 AMOT 家族的同源蛋白, Expanded (Ex) 与 AMOT-p130 具有同源的序列, 可能在果蝇中提供类似的作用^[37-39]。Ex 的 PPXY 基序能直接与 Yorkie (Yki) 的 WW 结构域结合形成复

合物并定位在细胞顶端连接^[38]。

在很多细胞中, AMOT 发挥抑制 YAP 活性的作用。AMOT 可能通过两种方式抑制 YAP 活性, 一种是直接与 YAP 结合, 与 YAP 共定位在细胞紧密连接处, 或滞留在细胞质中, 阻止 YAP 的入核, 这种方式不依赖 YAP 的磷酸化, 如在 MDCK 和 MCF10A 细胞中, AMOT-p130 募集 YAP 共定位在紧密连接处的肌动蛋白骨架上, 抑制 YAP 进入细胞核^[10,40]。敲除 AMOT-p130 或 AMOTL2 则破坏细胞紧密连接, YAP 入核水平增加, 进而促进 YAP 调控的目标基因 *CTGF* 和 *Cyr61* 的表达, 不过敲除 AMOTL1 则没有出现这些表型^[11,41]。DeRan等^[42]研究发现, AMOT 的磷酸化能够增长 AMOT 的半衰期, 而稳定的 AMOT 有利于维持对 YAP 的抑制作用。另外一种方式是 AMOT 通过激活 Hippo 信号通路来抑制 YAP 活性, AMOT 可能促进 Hippo 信号通路的上游正调控蛋白 NF2 结合更多 LATS, 进而激活 Hippo 信号通路, 下调 YAP 活性 (图 2)^[43]。

不同于 AMOT 对 YAP 的抑制作用, 有研究发现 YAP 入核促进转录激活的功能可能也需要 AMOT 的参与^[7,44-45]。在一些细胞中, AMOT-p130 能直接与 YAP 结合, 抑制 YAP 与 LATS 的相互作用并促进 YAP 的入核, 从而正调控 YAP 活性^[7]。Moleirinho等^[46]研究发现, AMOT 的磷酸化修饰会影响 AMOT

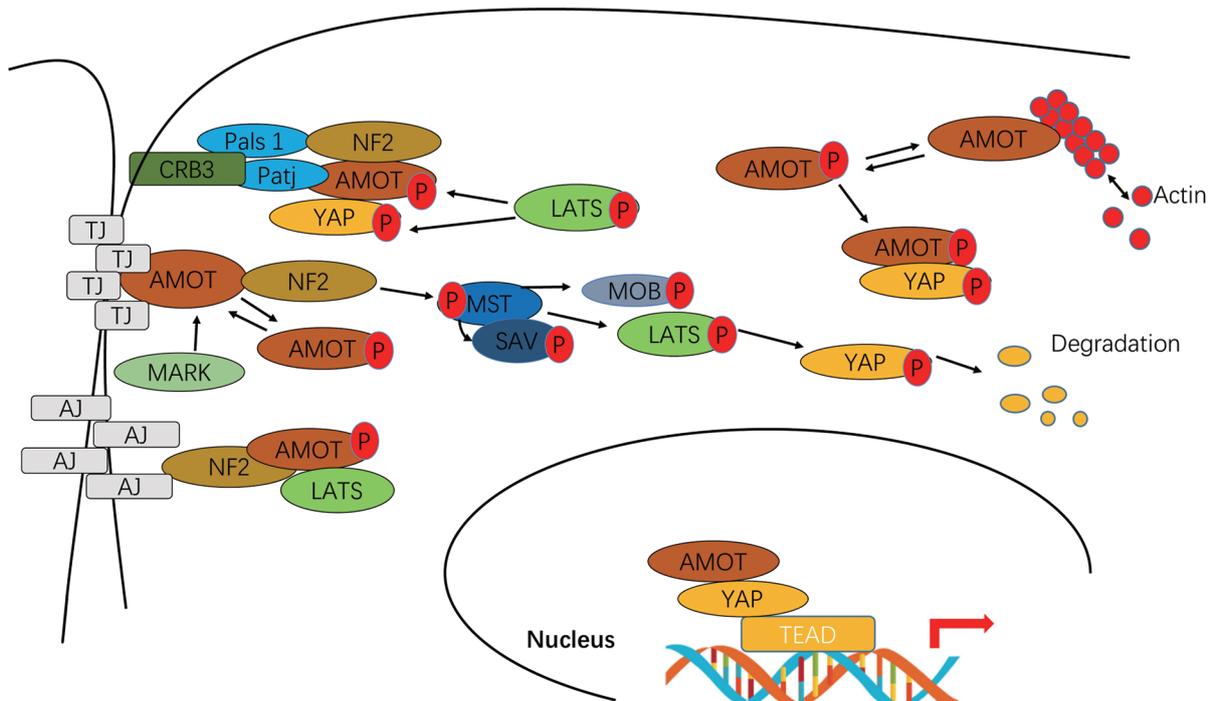


图2 AMOT在Hippo信号通路中的调控作用

在细胞内的定位,同时这不影响AMOT与YAP的结合,去磷酸化的AMOT进核促进YAP/TEAD转录复合物活性,磷酸化AMOT与YAP定位在细胞连接处。在细胞核里AMOT-p130与YAP和转录因子TEAD形成复合物,表明AMOT-p130和YAP在功能上可能有协同关系。芯片分析和基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)显示,在AMOT-p130和YAP共调控基因里有99.5%的基因调控趋势是一致的^[45]。在HEK293细胞里,敲除AMOT-p130能抑制YAP^{S127A}结合APOE基因启动因子,而CTGF基因的启动因子则不受影响^[47]。另外有研究报道,在细胞质和细胞膜上仍可检测到YAP^{S127A},提示AMOT家族蛋白介导YAP的细胞质和细胞膜定位可能不依赖YAP的磷酸化^[11,48]。

目前,关于AMOT在YAP活性调控中的角色还不明确,一方面AMOT直接与YAP结合,将YAP固定在细胞连接处或滞留在细胞质中介导YAP的降解,或者作为脚手架连接Hippo信号通路中的激酶和YAP;而另外一方面,AMOT也可以帮助YAP进入细胞核,促使YAP和TEAD形成转录复合物,发挥转录活性。两种不同的调控结果都依赖于AMOT和YAP的直接相互作用,而AMOT的磷酸化修饰则影响AMOT在细胞内的定位,这种定位通过AMOT-YAP复合物来影响YAP活性。

3.2 AMOT与NF2

NF2(果蝇中同源蛋白为Merlin)是一种肿瘤抑制蛋白,其抑制肿瘤生长的作用依赖于NF2定位在细胞紧密连接处^[49]。NF2作为Hippo信号通路核心激酶LATS1/2和MST1/2的上游调控蛋白来参与肿瘤抑制作用^[50]。质谱检测时发现,NF2与AMOT、PATJ/PALS1复合物存在相互作用,NF2主要通过C端结构域(C-terminal tail domain, CTD)与AMOT的BAR结构域相互作用^[51],AMOT参与维持NF2在紧密连接处的定位,而NF2介导AMOT和E-钙黏着蛋白在黏着连接处(adhesion junction, AJ)共定位。NF2与Rich1竞争性结合AMOT,使Rich1从紧密连接处的抑制状态解离,活化的Rich1下调Rac1和Ras-MAPK信号通路活性,抑制细胞的增殖^[51]。NF2活性依赖其N端FERM结构域和C端结构域之间的开合状态^[52-53],AMOT与NF2的CTD结合,可能帮助NF2打开构象,使NF2能募集更多LATS1/2,从而激活Hippo信号通路^[43]。

Moleirinho等^[46]研究还发现,AMOT、NF2和YAP可能在细胞质和细胞核中形成三元复合物,

AMOT的翻译后修饰会影响AMOT对YAP的调控。LATS磷酸化AMOT的S176,导致AMOT与NF2和YAP复合物从细胞核转移到细胞连接处与Pals1/PATJ和E-钙黏着蛋白相互作用,从而抑制YAP调控下游基因的表达,非磷酸化的AMOT与NF2和YAP复合物定位到细胞核,促进YAP与TEAD的结合。

3.3 AMOT与LATS

LATS是Hippo信号通路中的核心调控激酶。AMOT-p130、AMOTL1和AMOTL2通过N端和BAR结构域与LATS直接相互作用^[54-55],LATS结合并磷酸化AMOT的Ser175,磷酸化修饰能抑制AMOT与F-肌动蛋白的结合^[25,40],使AMOT与肌动蛋白解离,磷酸化的AMOT与YAP结合,增加YAP在细胞质中的滞留水平^[56]。这种磷酸化修饰不影响AMOT与YAP结合,磷酸化的AMOT将YAP滞留在细胞质中,而且比非磷酸化的AMOT更稳定。F-肌动蛋白与非磷酸化的AMOT结合,抑制AMOT与YAP形成复合物,YAP在细胞核中的定位水平增加。

3.4 AMOT与其他Hippo信号通路调控分子相互作用

AMOT与NF2、KIBRA、FRMD6和CRB3形成复合物定位在紧密连接处^[13,57]。KIBRA是Hippo信号通路的一个上游调控元件,通过N端与AMOT-p130的第二个PPEY基序结合^[54]。KIBRA参与调控内皮细胞的极化,但还不清楚是否通过介导AMOT来调节的^[58-60]。Crumbs(Crb)是重要的顶端决定因子并作为Hippo信号通路的上游调控因子参与调控细胞接触抑制^[57],Crb能促进AMOT与YAP的结合,Crb与紧密连接相关蛋白Patj和Pals形成Crb极化复合物^[61],Patj/Pals/Crb复合物与AMOT相互作用,影响AMOT在细胞内的定位并促进AMOT与YAP的结合,将YAP锚定在细胞连接处,从而调控YAP的活性^[13,24,62]。另外,在MCF10A细胞中,低氧胁迫下细胞增强依赖c-Fos的AMOTL2的转录表达,AMOTL2与极化复合物Crb/Patj/Pals结合并促使复合物解聚,破坏细胞的顶端-基底极性,从而促进肿瘤的侵袭^[63]。AMOTL2也能直接结合MST2,但结合位点目前还不清楚^[55]。

4 AMOT与癌症

4.1 AMOT抑制肿瘤机制

在一些癌症中,AMOT有肿瘤抑制作用,这

可能是通过 Hippo 信号通路或直接与 YAP 结合调控 YAP 的活性来实现,在不同的肿瘤细胞中其调控机制也是不同的。临床肺癌组织样品和体外培养的肺癌细胞中,AMOT 表达水平是明显降低的,敲除 AMOT,细胞质中 YAP/TAZ 水平降低,并促进 YAP/TAZ 入核,增加肺癌细胞的增殖和侵袭^[64]。在卵巢癌中,过表达 AMOT-p130 抑制卵巢癌细胞生长。Malat1 在很多恶性肿瘤中高表达,在肝癌细胞中,YAP 能够上调 Malat1 的表达水平,而 SRSF1 能抑制 Malat1 的表达,YAP 的过表达促进 AMOT 与 SRSF1 的结合,AMOT 减少 SRSF1 在细胞核中的定位,同时也抑制 YAP 在细胞核内的转录活性^[65]。Tankyrases 能够促进 AMOT 的泛素化降解,而 Tankyrases 抑制因子通过稳定 AMOT 来抑制 YAP 活性^[66-67]。

4.2 AMOT的致癌作用

虽然 AMOT 能够抑制某些肿瘤的增殖,在很多癌症中 AMOT 却是高表达的,而且 AMOT 在血管形成中也发挥重要作用,因此其致癌作用更引人关注。

在血管内皮瘤细胞中,过表达 AMOT-p80 导致肿瘤细胞快速增殖和浸润。而敲除 AMOT 能够抑制细胞的迁移,降低肿瘤细胞的侵袭能力,肿瘤细胞也处于高水平的凋亡状态^[19]。

在乳腺肿瘤细胞中,AMOT 的表达水平明显高于正常组织^[68]。AMOT 的表达下调能减少 MCF-7 细胞的生长和侵袭,细胞核中 YAP 水平下降明显^[44,69]。AMOT-p80 还可以通过 ERK1/2 促进 MCF7 细胞的增殖^[70]。AMOTL1 在乳腺癌细胞发生过程中是上调的,AMOTL1 的表达促进乳腺癌细胞的增殖和迁移^[71]。体内和体外的实验表明,AMOTL1 可能是通过促进 Src 酪氨酸激酶的活性促进乳腺癌细胞的增殖,Src 通过其他信号通路促进肿瘤细胞的发生^[71]。

AMOTL2 在 50% 结肠癌细胞中表达水平是升高的。AMOTL2 能促进结肠瘤的形成,并通过干扰 Par3 和 Crb3 的定位来破坏膜蛋白在基底端的排序从而促进肿瘤的浸润^[63]。

NF2 缺陷型肝脏细胞中,敲除 AMOT 能阻止胆管上皮细胞的增殖。AMOT-p130 促进 YAP 进入细胞核,并阻止 YAP 和 LATS 的相互作用从而使细胞增殖^[7]。在肾癌细胞中,AMOT 主要表达在细胞核中,在肾外皮细胞中则主要在细胞质和细胞核中表达。敲除 AMOT 能抑制非正常肾外皮细胞 HK-2

和 RCC786-O 的增殖,而上调 AMOT 的表达则促进 ACHN 细胞的增殖^[72]。在肝癌和肾癌细胞中,AMOT-p130 的表达增加 YAP 入核的水平,进而促进 CTGF 和 Cyr61 的表达。AMOT-p130 也可能作为 YAP 的辅助因子,阻止 YAP 的磷酸化,促进 YAP 对肿瘤产生相关基因的表达调控^[7,72]。

骨细胞瘤中,AMOT 表达是上调的。下调 AMOT 能抑制细胞的增殖迁移和侵入^[34]。前列腺癌的侵袭依赖钙黏着蛋白-11 (Cad11) 的上调,AMOT-p80 与 Cad11 相互作用并参与细胞迁移等过程^[73]。AMOT-p80 也促进 HNSCC 细胞的生长和迁移^[74]。在 HeLa 和 C33A 细胞中,敲除 AMOTL1 能抑制细胞的迁移,而过表达 AMOTL1 则促进细胞的迁移^[75]。

恶性胶质瘤细胞 U87 细胞中,AMOTL2 过表达能够抑制集落形成,细胞生长和转移。另外 AMOTL2 结合 YAP,抑制 YAP 进核发挥转录活性,从而抑制肿瘤细胞的增殖^[76]。

综上所述,AMOT 在肿瘤的形成和生长等过程中扮演着重要角色(表 1),这也提示 AMOT 可以作为一种潜在的候选药物靶点。

5 AMOT在临床治疗中的应用

以 AMOT 为靶点的癌症治疗方法已经有一些研究进展。在小鼠乳腺癌模型中注射能表达抗人源 AMOT-p80 抗体的 DNA 疫苗后,血管生成受到抑制,在 150 d 内有 80% 的小鼠肿瘤形成受到抑制^[22]。在 Her-2 转基因小鼠中,联合使用表达 AMOT-p80 和人 EGF 受体 (Her-2) 的跨膜和胞外片段的 DNA 疫苗能够抑制乳腺癌的侵袭,干扰肿瘤细胞血管生成,同时也没有检测到这种疫苗对正常血管的影响^[22]。在植入性肿瘤细胞中,注射 AMOT-p80 的 DNA 疫苗能够抑制血管生成,从里面分离得到的 AMOT-p80 抗体能够抑制小鼠大动脉内皮细胞的迁移^[82]。抗 AMOT-p80 抗体与内皮细胞的 AMOT 结合,抑制 VEGF 等刺激因子诱导的内皮细胞迁移,减少内皮细胞片状伪足数量,抑制视网膜新生血管形成^[23]。在基质胶塞实验 (matrigel plug assay) 中,与对照组相比,加入 AMOT 抗体的血管基底膜类似物没有任何血管的生成^[23]。这些抗 AMOT 的 DNA 疫苗效果与血管生成抑制素类似,也间接证明 AMOT-p80 可能具有促进肿瘤生长的作用。

以上研究说明以 AMOT 为靶点抑制血管生成对于肿瘤治疗具有重要价值。虽然已经有抗血管生成药物进入临床治疗肿瘤,但这些药物不仅抑制肿

表1 AMOT家族蛋白在肿瘤中的作用

	功能	癌症类型	机制	参考文献
AMOT	癌基因	乳腺癌	AMOT高表达, 增加YAP入核水平, 增强ERK信号通路	[44]
	癌基因	乳头瘤	AMOT高表达, 促进血管生成	[77]
	癌基因	骨细胞瘤	lncRNA SNH12激活AMOT表达, 促进细胞增殖和迁移	[79-80]
AMOT-p80	癌基因	头颈部鳞状细胞癌	AMOT高表达, 促进细胞增殖	[74]
	癌基因	前列腺癌	AMOT-p80促进细胞迁移	[73]
AMOT-p130	癌基因	肝癌	增加YAP活性	[7]
	癌基因	肾细胞瘤	增加YAP-TEAD转录活性	[72]
	肿瘤抑制基因	卵巢癌	抑制YAP活性	[80]
	肿瘤抑制基因	肺癌	抑制YAP活性, 降低Cry61表达	[64]
AMOTL1	癌基因	乳腺癌	AMOTL1高表达	[68,71,81]
	癌基因	宫颈癌	MiR-124下调AMOTL1, 抑制增殖和血管形成	[75]
AMOTL2	癌基因	乳腺癌	AMOTL2高表达; 破坏顶端基底极性	[63,68]
	癌基因	结肠癌	破坏顶端基底极性	[63]
	肿瘤抑制基因	胶质母细胞瘤	抑制YAP活性	[76]

瘤血管的生成, 对正常机体血管也有影响。而AMOT的表达具有特异性, 在很多肿瘤细胞中高表达, 研究也发现AMOT抗体在肿瘤中的作用与血管生成抑制素类似, 没有毒副作用。与血管抑制素相比, AMOT抗体给药剂量更低而且半衰期更长, 因此以AMOT为靶点的新药在肿瘤等疾病的治疗中具有很好前景。

6 结论与展望

AMOT通过调控血管内皮细胞迁移、管状结构形成和稳定、细胞极性和趋化等作用来促进血管生成。以AMOT抗体或疫苗作为抗肿瘤等依赖血管生成的疾病是备受人们关注的一个方向, 不过AMOT在肿瘤中的具体调控机制还不明确, 本文综述了AMOT家族蛋白在血管生成中的调控机制并重点介绍AMOT在肿瘤生长和形成过程中扮演不同角色。一方面, 在一些癌症中AMOT是高表达的, 敲除AMOT肿瘤细胞的增殖受到抑制, 这提示AMOT能够促进肿瘤的形成, 其机制可能是通过激活并促进YAP入核来完成; 另一方面, AMOT可能通过与YAP结合, 将YAP锚定在细胞紧密连接处或滞留在细胞质中, 抑制YAP入核。AMOT也作为Hippo信号通路上游调控蛋白, 介导通路中核心激酶来抑制YAP活性, 从而发挥抑制肿瘤生长的作用。两种不同的机制可能是由AMOT的磷酸化修饰来决定的。目前的观点是, AMOT既可以直接与YAP结合, 通过影响YAP的定位来调控YAP的活性, 也可以通过Hippo信号通路来抑制YAP活性。另外, AMOT家族蛋白在不同组织细胞和细

胞周期等条件下表达情况存在差异, 功能也有所不同, 它们可能通过不同机制来调节血管生成、细胞增殖等生命活动。因此, 对于AMOT家族蛋白调控肿瘤生长的机制还需要做更深入细致的研究, 对AMOT疫苗或抗体的评估也还需要更严谨的临床试验来支持。

[参 考 文 献]

- [1] Troyanovsky B, Levchenko T, Månsson G, et al. Angiominin. *J Cell Biol*, 2001, 152: 1247-54
- [2] Ernkvist M, Aase K, Ukomadu C, et al. p130-angiominin associates to actin and controls endothelial cell shape. *FEBS J*, 2006, 273: 2000-11
- [3] Nishimura M, Kakizaki M, Ono Y, et al. JEAP, a novel component of tight junctions in exocrine cells. *J Biol Chem*, 2002, 277: 5583-7
- [4] Bratt A, Wilson WJ, Troyanovsky B, et al. Angiominin belongs to a novel protein family with conserved coiled-coil and PDZ binding domains. *Gene*, 2002, 298: 69-77
- [5] Patrie KM. Identification and characterization of a novel tight junction-associated family of proteins that interacts with a WW domain of MAGI-1. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1745: 131-44
- [6] Bratt A, Birot O, Sinha I, et al. Angiominin regulates endothelial cell-cell junctions and cell motility. *J Biol Chem*, 2005, 280: 34859-69
- [7] Yi C, Shen Z, Stemmer-Rachamimov A, et al. The p130 isoform of angiominin is required for yap-mediated hepatic epithelial cell proliferation and umorigenesis. *Sci Signal*, 2013, 6: ra77
- [8] Ernkvist M, Birot O, Sinha I, et al. Differential roles of p80- and p130-angiominin in the switch between migration and stabilization of endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783: 429-37
- [9] Wang C, An J, Zhang P, et al. The Nedd4-like ubiquitin E3

- ligases target angiomin/p130 to ubiquitin-dependent degradation. *Biochem J*, 2012, 444: 279-89
- [10] Zhao B, Li L, Lu Q, et al. Angiomin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev*, 2011, 25: 51-63
- [11] Chan SW, Lim CJ, Chong YF, et al. Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomin. *J Biol Chem*, 2011, 286: 7018-26
- [12] Mason JM, Arndt KM. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem*, 2004, 5: 170-6
- [13] Wells CD, Fawcett JP, Traweger A, et al. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell*, 2006, 125: 535-48
- [14] Mim C, Unger VM. Membrane curvature and its generation by BAR proteins. *Trends Biochem Sci*, 2012, 37: 526-33
- [15] Heller B, Adu-Gyamfi E, Smith-Kinnaman W, et al. Amot recognizes a juxtannuclear endocytic recycling compartment via a novel lipid binding domain. *J Biol Chem*, 2010, 285: 12308-20
- [16] Peter BJ, Kent HM, Mills IG, et al. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*, 2004, 303: 495-9
- [17] Fanning AS, Anderson JM. PDZ domains: fundamental building blocks in the organization of protein complexes at the plasma membrane. *J Clin Invest*, 1999, 103: 767-72
- [18] Brône B, Eggermont J. PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cell membranes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288: C20-9
- [19] Levchenko T, Bratt A, Arbiser JL, et al. Angiomin expression promotes hemangioendothelioma invasion. *Oncogene*, 2004, 23: 1469-73
- [20] Levchenko T, Aase K, Troyanovsky B, et al. Loss of responsiveness to chemotactic factors by deletion of the C-terminal protein interaction site of angiomin. *J Cell Sci*, 2003, 116: 3803-10
- [21] Aase K, Ernkqvist M, Ebarasi L, et al. Angiomin regulates endothelial cell migration during embryonic angiogenesis. *Genes Dev*, 2007, 21: 2055-68
- [22] Holmgren L, Ambrosino E, Birot O, et al. A DNA vaccine targeting angiomin inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 9208-13
- [23] Levchenko T, Veitonmäki N, Lundkvist A, et al. Therapeutic antibodies targeting angiomin inhibit angiogenesis *in vivo*. *FASEB J*, 2008, 22: 880-9
- [24] Sugihara-Mizuno Y, Adachi M, Kobayashi Y, et al. Molecular characterization of angiomin/JPAP family proteins: interaction with MUPP1/Patj and their endogenous properties. *Genes Cells*, 2007, 12: 473-86
- [25] Dai X, She P, Chi F, et al. Phosphorylation of angiomin by lats1/2 kinases inhibits F-actin binding, cell migration, and angiogenesis. *J Biol Chem*, 2013, 288: 34041-51
- [26] Ernkqvist M, Birot O, Sinha I, et al. Differential roles of p80- and p130-angiomin in the switch between migration and stabilization of endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783: 429-37
- [27] Gagné V, Moreau J, Plourde M, et al. Human angiomin-like 1 associates with an angiomin protein complex through its coiled-coil domain and induces the remodeling of the actin cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2009, 66: 754-68
- [28] Zheng Y, Vertuani S, Nystrom S, et al. Angiomin-like protein 1 controls endothelial polarity and junction stability during sprouting angiogenesis. *Circ Res*, 2009, 105: 260-70
- [29] Huang H, Lu FI, Jia S, et al. Amotl2 is essential for cell movements in zebrafish embryo and regulates c-Src translocation. *Development*, 2007, 134: 979-88
- [30] Wang Y, Li Z, Xu P, et al. Angiomin-like2 gene (*amotl2*) is required for migration and proliferation of endothelial cells during angiogenesis. *J Biol Chem*, 2011, 286: 41095-104
- [31] Agarwala S, Duquesne S, Liu K, et al. Amotl2a interacts with the Hippo effector Yap1 and the Wnt/ β -catenin effector Lef1 to control tissue size in zebrafish. *eLife*, 2015, 4: e08201
- [32] Ernkqvist M, Luna Persson N, Audebert S, et al. The Amot/Patj/Syx signaling complex spatially controls RhoA GTPase activity in migrating endothelial cells. *Blood*, 2009, 113: 244-53
- [33] Garnaas MK, Moodie KL, Liu M, et al. Syx, a RhoA guanine exchange factor, is essential for angiogenesis *in vivo*. *Circ Res*, 2008, 103: 710-6
- [34] Huang J, Wu S, Barrera J, et al. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell*, 2005, 122: 421-34
- [35] Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev*, 2016, 30: 1-17
- [36] Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, et al. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*, 2009, 138: 389-403
- [37] Moleirinho S, Chang N, Sims AH, et al. KIBRA exhibits MST-independent functional regulation of the Hippo signaling pathway in mammals. *Oncogene*, 2013, 32: 1821-30
- [38] Angus L, Moleirinho S, Herron L, et al. Willin/FRMD6 expression activates the Hippo signaling pathway kinases in mammals and antagonizes oncogenic YAP. *Oncogene*, 2012, 31: 238-50
- [39] Gunn-Moore FJ, Welsh GI, Herron LR, et al. A novel 4.1 ezrin radixin moesin (FERM)-containing protein, 'Willin'. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5089-94
- [40] Chan SW, Lim CJ, Guo F, et al. Actin-binding and cell proliferation activities of angiomin family members are regulated by Hippo pathway-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, 2013, 288: 37296-307
- [41] Cox CM, Mandell EK, Stewart L, et al. Endosomal regulation of contact inhibition through the AMOT: YAP pathway. *Mol Biol Cell*, 2015, 26: 2673-84
- [42] DeRan M, Yang J, Shen CH, et al. Energy stress regulates Hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated

- regulation of angiominin like-1 protein. *Cell Rep*, 2014, 9: 495-503
- [43] Li Y, Zhou H, Li F, et al. Angiominin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Res*, 2015, 25: 801-17
- [44] Lv M, Lv ML, Chen L, et al. Angiominin promotes breast cancer cell proliferation and invasion. *Oncol Rep*, 2015, 33: 1938-46
- [45] Moleirinho S, Guarrant W, Kissil JL. The angiominins—from discovery to function. *FEBS Lett*, 588: 2693-703
- [46] Moleirinho S, Hoxha S, Mandati V, et al. Regulation of localization and function of the transcriptional co-activator YAP by angiominin. *eLife*, 2017, 6: e23966
- [47] Hong W. Angiominin's YAP into the nucleus for cell proliferation and cancer development. *Sci Signal*, 2013, 6: pe27
- [48] Wang W, Huang J, Chen J. Angiominin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *J Biol Chem*, 2011, 286: 4364-70
- [49] Lallemand D, Curto M, Saotome I, et al. NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev*, 2003, 17: 1090-100
- [50] Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, et al. The tumour-suppressor genes *NF2/Merlin* and *Expanded* act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 27-36
- [51] Yi C, Troutman S, Fera D, et al. A tight junction-associated Merlin-angiominin complex mediates Merlin's regulation of mitogenic signaling and tumor suppressive functions. *Cancer Cell*, 2011, 19: 527-40
- [52] Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, et al. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell*, 2000, 101: 259-70
- [53] Miyoshi J, Takai Y. Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778: 670-91
- [54] Hirate Y, Hirahara S, Inoue K, et al. Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr Biol*, 2013, 23: 1181-94
- [55] Paramasivam M, Sarkeshik A, Yates JR, et al. Angiominin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor. *Mol Biol Cell*, 2011, 22: 3725-33
- [56] Mana-Capelli S, Paramasivam M, Dutta S, et al. Angiominins link F-actin architecture to Hippo pathway signaling. *Mol Biol Cell*, 2014, 25: 1676-85
- [57] Mao X, Li P, Wang Y, et al. CRB3 regulates contact inhibition by activating the Hippo pathway in mammary epithelial cells. *Cell Death Dis*, 2017, 8: e2546
- [58] Yu J, Zheng Y, Dong J, et al. Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev Cell*, 2010, 18: 288-99
- [59] Xiao L, Chen Y, Ji M, et al. KIBRA regulates Hippo signaling activity via interactions with large tumor suppressor kinases. *J Biol Chem*, 2011, 286: 7788-96
- [60] Yoshihama Y, Sasaki K, Horikoshi Y, et al. KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of a PKC kinase activity in epithelial cells. *Curr Biol*, 2011, 21: 705-11
- [61] Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2011, 12: 23-38
- [62] Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, et al. The crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. *Dev Cell*, 2010, 19: 831-44
- [63] Mojallal M, Zheng Y, Hultin S, et al. AmotL2 disrupts apical-basal cell polarity and promotes tumour invasion. *Nat Commun*, 2014, 5: 4557
- [64] Hsu YL, Hung JY, Chou SH, et al. Angiominin decreases lung cancer progression by sequestering oncogenic YAP/TAZ and decreasing Cyr61 expression. *Oncogene*, 2015, 34: 4056-68
- [65] Wang J, Wang H, Zhang Y, et al. Mutual inhibition between YAP and SRSF1 maintains long non-coding RNA, malat1-induced tumorigenesis in liver cancer. *Cell Signal*, 2014, 26: 1048-59
- [66] Troilo A, Benson EK, Esposito D, et al. Angiominin stabilization by tankyrase inhibitors antagonizes constitutive TEAD-dependent transcription and proliferation of human tumor cells with Hippo pathway core component mutations. *Oncotarget*, 2016, 7: 28765
- [67] Wang W, Li N, Li X, et al. Tankyrase inhibitors target YAP by stabilizing angiominin family proteins. *Cell Rep*, 2015, 13: 524-32
- [68] Jiang WG, Watkins G, Douglas-Jones A, et al. Angiominin and angiominin like proteins, their expression and correlation with angiogenesis and clinical outcome in human breast cancer. *BMC Cancer*, 2006, 6: 16
- [69] Zhang H, Fan Q. MicroRNA-205 inhibits the proliferation and invasion of breast cancer by regulating AMOT expression. *Oncol Rep*, 2015, 34: 2163-70
- [70] Ranahan WP, Han Z, Smith-Kinnaman W, et al. The adaptor protein AMOT promotes the proliferation of mammary epithelial cells via the prolonged activation of the extracellular signal-regulated kinases. *Cancer Res*, 2011, 71: 2203-11
- [71] Couderc C, Boin A, Fuhrmann L, et al. AMOTL1 promotes breast cancer progression and is antagonized by Merlin. *Neoplasia*, 2016, 18: 10-24
- [72] Lv M, Li S, Luo C, et al. Angiominin promotes renal epithelial and carcinoma cell proliferation by retaining the nuclear YAP. *Oncotarget*, 2016, 7: 12393-403
- [73] Ortiz A, Lee YC, Yu G, et al. Angiominin is a novel component of cadherin-11/ β -catenin/p120 complex and is critical for cadherin-11-mediated cell migration. *FASEB J*, 2015, 29: 1080-91
- [74] Hakami F, Darda L, Stafford P, et al. The roles of HOXD10 in the development and progression of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Br J Cancer*, 2014, 111: 807-16
- [75] Wan HY, Li QQ, Zhang Y, et al. MiR-124 represses vasculogenic mimicry and cell motility by targeting

- amotL1 in cervical cancer cells. *Cancer Lett*, 2014, 355: 148-58
- [76] Artinian N, Cloninger C, Holmes B, et al. Phosphorylation of the Hippo pathway component AMOTL2 by the mTORC2 kinase promotes YAP signaling, resulting in enhanced glioblastoma growth and invasiveness. *J Biol Chem*, 2015, 290: 19387-401
- [77] Byun JY, Lee SH, Shin JM, et al. Overexpression of angiominin in sinonasal inverted papilloma. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2014, 4: 512-6
- [78] Ruan W, Wang P, Feng S, et al. Long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 12 (SNHG12) promotes cell proliferation and migration by upregulating angiominin gene expression in human osteosarcoma cells. *Tumour Biol*, 2016, 37: 4065-73
- [79] Ruan WD, Wang P, Feng S, et al. MicroRNA-497 inhibits cell proliferation, migration, and invasion by targeting AMOT in human osteosarcoma cells. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 303-13
- [80] Wang Y, Justilien V, Brennan KI, et al. PKC ζ regulates nuclear YAP1 localization and ovarian cancer tumorigenesis. *Oncogene*, 2017, 36: 534-45
- [81] Zheng Y, Zhang Y, Barutello G, et al. Angiominin like-1 is a novel component of the N-cadherin complex affecting endothelial/pericyte interaction in normal and tumor angiogenesis. *Sci Rep*, 2016, 6: 30622
- [82] Arigoni M, Barutello G, Lanzardo S, et al. A vaccine targeting angiominin induces an antibody response which alters tumor vessel permeability and hampers the growth of established tumors. *Angiogenesis*, 2012, 15: 305-16