

节律基因在结直肠癌中的研究进展

杜胜奇, 蒋海涛, 钟江利 综述 王红 审校

遵义医学院附属医院消化内科, 贵州 遵义 563099

【摘要】 结直肠癌(CRC)在我国及世界范围内其发病率高居恶性肿瘤第三位,并呈逐渐上升趋势。近年来大量研究表明,节律基因异常表达与CRC的发生发展、治疗与预后有重要的联系。节律基因是生物钟的分子决定因素,其通过调节钟控基因(CCGs)参与多个生理过程。本文就节律基因在CRC中的表达、影响及相关机制进行综述。

【关键词】 生物钟;节律基因;结直肠癌;相关性;机制;

【中图分类号】 R735 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2019)19—2548—04

Research progress of rhythm genes in colorectal cancer. DU Sheng-qi, JIANG Hai-tao, ZHONG Jiang-li, WANG Hong. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563099, Guizhou, CHINA

【Abstract】 The incidence of colorectal cancer (CRC) is the third highest in malignant tumors in China and the world, and it is gradually increasing. In recent years, a large number of studies have shown that abnormal expression of rhythm genes is closely related to the occurrence, development, treatment and prognosis of CRC. Rhythm genes are molecular determinants of the biological clock and are involved in several physiological processes by regulating the clock-controlled genes (CCGs). This review summarizes the expression, influence and mechanism of rhythm genes in CRC.

【Key words】 Biological clock; Rhythm genes; Colorectal cancer; Correlation; Mechanism

生物钟是一个 24 h 的分子振荡器,推动日常生物节律,用于适应昼夜环境的改变。哺乳动物的生物钟是由位于下丘脑的视交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)的中央起搏器和包括肠道在内的各种组织的外围时钟组成。SCN 主要通过眼睛对光的强度感知来与地球物理时间同步,使超过 40%的基因组有节奏地表达^[1]。生理节奏与昼夜变化的同步紊乱可导致一系列的生理和行为障碍,最明显的同步崩溃的例子是时差效应,穿越时区会导致疲劳、失眠、肠道功能紊乱等一系列症状,目前已有大量研究证实生物钟紊乱增加结直肠癌(CRC)患病风险^[2]。节律基因在分子水平调控生物钟,其与 CRC 相关性的进一步阐明,可能对 CRC 的预防及治疗提供新的思路,并为 CRC 诊疗开创新的模式提供理论依据。

1 生物钟的分子决定因素

目前发现的节律基因有 CLOCK、BMAL1、NPAS2、Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、CKI ϵ 、Tim、NR1D1 (又称 Rev-Erb α)、NR1D2 (又称 Rev-Erb β)、ROR α 、ROR β 、ROR γ 等^[3],哺乳动物的昼夜节律形成依赖于转录翻译正负反馈回路,在白天 CLOCK/BMAL1 或 BMAL1/NPAS2 二聚体与启动子内的 E-box 结合,编码 CCGs、Pers 基因和 Crys 基因的振荡表达, Pers 蛋白和 Crys 蛋白形成 Crys/Pers 复合物聚集在细胞质中,夜间达到临界值水平后,从细胞质转移至细胞核,并抑制 CLOCK/ BMAL1 或 BMAL1/NPAS2 二聚体介导

的转录,随后 Pers 和 Crys 蛋白的降解促进了一个新的昼夜节律周期^[4]。CLOCK/BMAL1 二聚体同样也激活了 Rev-Erbs (α/β)/RORs ($\alpha/\beta/\gamma$) 基因的转录,通过 REV-ERBs 和 RORs 基因辅助反馈回路来稳定昼夜节律。除了转录调控外,转录后修饰也参与其中,CKI ϵ 介导的磷酸化也可以破坏 Pers 蛋白,通过时钟蛋白质的转录后调控实现昼夜节律周期的精确运行^[5]。由于从细胞核到细胞质的基因转录、翻译和蛋白质运输积累均需要一定的时间,节律基因的自我振荡产生的周期长度约为 24 h,节律基因通过下游的 CCGs 输出昼夜节律的时钟信号,因此细胞内的分子活动也表现出节律性。

2 生物钟紊乱影响 CRC 的发生发展

只有一小部分 CRC 是由已知的遗传综合征引起,而大多数的 CRC 病例是散发的,流行病学的研究为 CRC 的发病率与现代生活方式之间的联系提供了令人信服的证据^[6]。各种因素,如倒班工作、晚睡等不合理的光暴露可以干扰褪黑素的表达,导致内源性昼夜节律紊乱并影响癌症的发生发展^[7]。晚餐后距离睡觉时间短(<3 h)、餐后不散步和长时间的睡眠(≥ 9 h)都可能增加 CRC 的患病风险,证明不合理的生物钟与 CRC 发生相关^[8]。由于节律基因调节过程(细胞周期控制、DNA 损伤修复、细胞凋亡)被认为具有致癌作用的特征,它们的失调可能作为一个潜在的生物机制,连接 CRC 与昼夜节律的改变。

基金项目:贵州省科技计划课题(编号:黔科合 SY 字[2013]3006 号)

通讯作者:王红,教授,硕士生导师, E-mail: wanghong89zy@163.com

3 节律基因在CRC中的表达及影响

3.1 节律基因对CRC发生发展的影响 近期的研究提出了生物钟调节肠上皮细胞再生的可能模型, BMAL1在病理状态下调控肿瘤坏死因子(TNF), 通过TNF调控p21和激活JNK应激反应途径, 增加肠上皮细胞再生来取代受损的上皮细胞^[9], 而CRC肿瘤组织中BMAL1表达相比于癌旁明显降低, 其低表达导致的肠上皮细胞再生异常, 可能是促进CRC进展的机制之一^[10]。体外实验表明, 同样作为生物钟正调控基因的CLOCK的低表达却减缓了结直肠癌细胞的增殖, 加速了细胞凋亡, 上调促进了细胞增殖并抑制凋亡^[11]。使用了针对hCLOCK的shRNA, 有效抑制了SW620细胞在裸鼠的转移能力, 证实结直肠癌中CLOCK高表达具有更高的转移潜力^[12]。然而, BMAL1与CLOCK在CRC发生发展中作用截然相反, 需要进一步的探索来明确机制, 同时也为CRC诊治提供了可能的方向。

同样令人费解的是, 负反馈调节基因Pers和Crys对CRC的影响也不尽相同。有研究发现ApcMin/+Per2(m/m)小鼠产生的肠息肉是ApcMin/+小鼠的两倍, 表明Per2可能在CRC发生中起到抑制作用, 进一步的研究下调Per2在HCT116和SW480细胞系中表达, 结果增加了 β -catenin、Cyclin D表达并促进了细胞增殖, 说明Per2基因产物可能通过下调 β -catenin靶基因抑制CRC发生^[13]。然而, Per2基因在CRC的发展中却又扮演了相反的角色, 在人CRC组织中, Per2的阳性表达与更深的肿瘤浸润和更大的肿瘤组织相关^[10]。50例CRC肿瘤与其癌旁正常组织对比实验显示, 肿瘤组织中Cry1和Cry2 mRNA水平显著降低。而高水平Cry1和Cry2均于远端结肠段的肿瘤中观察到(降结肠及乙状结肠、直肠), 相反, 较低的Cry1和Cry2表达在位于横结肠肿瘤组织中发现, 与流行病学研究CRC好发部位一致, 表明Crys的高表达可能与CRC发生有关^[14]。进一步的实验证实了该观点, 高Cry1表达促进了HCT116细胞的增殖和迁移, 而Cry1的下调, 抑制了SW480细胞集落的形成和迁移^[15]。以上研究表明, BMAL1和Pers可能起到抑制CRC发生的作用, 而CLOCK、Crys则相反。

3.2 节律基因对CRC治疗与预后的影响 节律基因对化疗疗效的影响也可能是造成CRC患者不同预后的原因, ZENG等^[16]发现BMAL1高表达抑制结肠癌细胞增殖, 并增加了3个结肠癌细胞系细胞模型对奥沙利铂的敏感性, 此外, 回顾分析82例经FOLFOX或XELOX方案化疗后CRC患者, 其中BMAL1表达水平较高的显示更好的临床获益, 其总生存期是BMAL1低表达患者的1.4倍(27个月 vs 19个月, $P=0.043$), 无进展生存期为2.2倍(11个月 vs 5个月, $P=0.015$)。除BMAL1基因外, CLOCK、Cry2、Per2等基

因也可能对化疗疗效产生影响, 有研究随机选择经新辅助放化疗达病理完全缓解及未达病理完全缓解的患者癌组织各20例, 测定6种节律基因及3种CCGs表达情况, 发现3种核心节律基因(CLOCK、Cry2、Per2)和1种下游基因(c-Myc)表达水平在病理完全缓解患者中明显较高, 表明这些节律基因有作为诊断性生物标志物的潜力, 以前瞻性地确定CRC患者是否会受益于新辅助放化疗^[17]。尽管高Cry2表达可能有益于新辅助放化疗, 同样也可能降低患者生存率, Cry1和Cry2表达水平超过中位数对应Kaplan-Meier生存曲线中较低的生存率^[14]。可见, 节律基因在CRC患者治疗与预后中起到重要作用, 但对CRC影响很复杂, 需要更多的研究为其机制做进一步的阐明, 以便在临床上对CRC治疗方案的选择提供依据。

4 节律基因在CRC发生发展中的可能机制

4.1 节律基因与细胞周期 HUISMAN等^[18]发现小鼠结肠癌肝转移细胞中, 除BMAL1、Rev-Erb α 和Cry1等节律基因外, 细胞周期调控基因之一的Wee1基因同样出现了表达显著减少且节律紊乱的规律, 而Wee1表达减少将导致其对有丝分裂控制降低, 从而加快细胞周期。SAKAMOTO等^[19]研究证实了CRC中节律基因与细胞周期改变相关, CLOCK和BMAL1过表达的SW480/T-REx/CLOCK/BMAL1细胞系与未处理的SW480细胞系相比, 其增殖比明显减少(2.57 ± 0.49 vs 5.32 ± 0.82 , $P=0.038$), 培养48 h后流式细胞计数发现处于G1期的细胞比例增加[(73.15 ± 1.62)% vs (58.73 ± 1.19)%, $P=0.001$]。进一步通过RT-PCR测定两组细胞系中CyclinD1表达水平, 48 h后实验组cyclinD1显著减少, 这说明CLOCK和BMAL1的过表达可能直接或间接的通过抑制cyclinD1阻止细胞进入S期。另一方面, BMAL1-/-小鼠p21表达显著增加, p21是细胞周期蛋白激酶抑制剂Cip/Kip的家族成员, 在细胞分裂G期中抑制Cyclin E-cdk2复合物的活性, 从而负调控细胞周期的进展, 因此BMAL1敲除将促进细胞周期^[20]。有学者通过复杂的3D肠道细胞培养技术, 发现潘氏细胞分泌的Wnt蛋白可以作为关关节律基因和细胞分裂周期的关键因素, 结合上述研究可以推测节律基因对细胞周期调控参与了CRC演变^[21]。

4.2 节律基因与DNA损伤、细胞凋亡 近期研究表明, 高水平的氧化应激诱导的DNA损伤增加CRC的发病风险^[22]。因此, 节律基因对DNA损伤调控的改变是CRC发病的重要环节之一。为研究其调控机制, KAWAMURA等^[23]建立了紫外线导致的细胞基因损伤模型, 发现热休克因子1(heat shock factor 1, HSF1)和p53以时间依赖性的方式调控时钟基因Per2的表达, 而BMAL1通过BMAL1-HSF1相互作用同时调节HSF1和p53, 使细胞时钟同步, 通过昼夜节律、热

休克反应和肿瘤抑制机制之间的顺序和层次的相互作用保护细胞免受紫外线导致的 DNA 损伤。另一方面,节律基因参与了 DNA 损伤后的修复,在正常的 DNA 复制过程中, Tim 帮助稳定复制叉和姐妹染色单体建立中发挥关键作用,激光诱导的 DNA 损伤位点修复依赖于 Tim 与多聚 ADP 核糖聚合酶 1 [Poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP1] 的结合,而 Tim 的沉默显著影响了 DNA 双链断裂修复^[24]。Per2 对 p53 激活状态的影响也参与了 DNA 修复调控,在 HCT116 和 H1299 细胞系中研究表明,Per2 蛋白、p53 蛋白和 MDM2 蛋白可以形成稳定的三聚体,控制 p53 泛素化的程度,正常表达的 Per2 蛋白使 p53 蛋白处于功能不活跃但稳定的状态,确保 hp53 的基础水平。面对 DNA 损伤应激时,该三聚体通过未知的机制分解,游离的 p53 蛋白激活下游基因参与细胞周期阻滞和 DNA 修复,Per2 的下调将直接影响 p53 水平^[25]。p53 在 DNA 损伤引发的内在凋亡通路中起着重要的作用,同时 p21 也是 p53 在 DNA 损伤后激活的一个主要目标,与细胞周期调控产生联系。

4.3 节律基因与信号通路

4.3.1 Wnt/ β -catenin 信号通路 Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活在 CRC 的早期发生和进展中起重要作用, β -catenin 有助于干细胞的自我更新和癌症的化疗。近期研究发现,在结肠癌细胞株中,磷酸化 ROR α 与 β -catenin 结合增强,并且可以与 β -catenin 的启动子区域结合,防止其转录并且减少 Wnt/ β -catenin 通路的活性。SHIN 等^[26]研究佐证了该结论,ROR α 通过 PGE2/PKCa 介导的磷酸化可以减弱 Wnt 靶基因的表达。他们还发现 ROR α 以剂量-双相开关的形式嵌入 Wnt 信号通路的调控网络,Cyclin D1 对 PGE2 呈剂量依赖的双相反应,Cyclin D1 水平最初随着 PGE2 浓度的增加而增加,随后又降低,但 ROR α 敲除导致了这种双相反应的消失。另一方面,ROR β 转录减少上调了 Wnt 信号的活性,同时 ROR β 通过与 HMG 盒转录因子 1 (HMG box-transcription factor 1, HBP1) 启动子区域结合减弱结肠癌起始细胞的自我更新,ROR β /HBP1 作为 Wnt 通路的有益补充维持和调节 CRC 细胞增殖^[27]。

4.3.2 RAS/MAPK 信号通路 在哺乳动物的 SCN 中,MAPK 通路可以作为允许内源性时钟进入 24 h 环境时钟的输入信号,MAPK 还可以与分子节律振荡器的组成部分进行物理和/或基因交互,这意味着 MAPK 通路可以影响生物钟的循环^[28]。RAS 基因突变在 CRC 中发生率高,体外实验表明 MAPK 可以在多个位点磷酸化 BMAL1,调节昼夜节律振荡器的自动反馈回路以降低 BMAL1/CLOCK 的反馈激活能力。RELOGIO 等^[29]使用了计算模型预测并实验证实了 RAS/MAPK 通路对生物钟的潜在影响,证明 RAS 的过度表

达破坏了昼夜节律,导致昼夜节律周期的增加,而 RAS 抑制导致周期长度的缩短。经 RAS 诱导的结肠癌细胞昼夜节律中断并具有较高的转移潜能。

4.3.3 Notch 信号通路 Notch 信号通路广泛存在于脊椎和无脊椎动物中,在遗传进化的过程中高度保守,对细胞的发育、生长、分化和凋亡起着重要作用。大量研究表明,Notch 信号通路的异常表达和激活在 CRC 的发生、发展及转移等过程中发挥了重要作用。在结肠直肠癌干细胞中,Per3 过度表达降低了 Notch1、Jagged1 的水平,表明 Per3 可能通过抑制 Notch 信号,减少结肠直肠癌干细胞样细胞的抗药性和自我更新能力^[30]。

5 展望

节律基因的异常可以引起正常细胞的周期、凋亡及信号传导发生改变,于分子水平为结肠细胞癌变提供条件,并影响 CRC 侵袭、迁移、放化疗疗效及预后。临床上可通过检测相关节律基因水平,预测 CRC 发生风险;区分 CRC 患者是否受益于新辅助放化疗,而选择手术时机并判断生存预后情况。生物钟与自然环境的同步可以提高癌症患者的生存质量,通过合理的作息安排可能会对癌症患者紊乱的昼夜节律基因产生协同效应^[31]。已有研究发现大量小分子调节剂可影响节律基因,显示出预防和治疗生物钟紊乱相关疾病的潜力^[32]。调节昼夜节律治疗可能是未来防治 CRC 以及提高 CRC 患者生存质量的研究方向。

参考文献

- [1] ZHANG R, LAHENS NF, BALLANCE HI, et al. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(45): 16219-16224.
- [2] PAPANTONIOU K, CASTANO-VINYALS G, ESPINOSA A, et al. Shift work and colorectal cancer risk in the MCC-Spain case-control study [J]. Scand J Work Environ Health, 2017, 43(3): 250-259.
- [3] TAKAHASHI JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock [J]. Nat Rev Genet, 2017, 18(3): 164-179.
- [4] CHIOU YY, YANG Y, RASHID N, et al. Mammalian period represses and de-represses transcription by displacing CLOCK-BMAL1 from promoters in a Cryptochrome-dependent manner [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(41): E6072-E6079.
- [5] NARASIMAMURTHY R, HUNT SR, LU Y, et al. CK1delta/epsilon protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(23): 5986-5991.
- [6] ARNOLD M, SIERRA MS, LAVERSANNE M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality [J]. Gut, 2017, 66(4): 683-691.
- [7] GIUDICE A, CRISPO A, GRIMALDI M, et al. The effect of light exposure at night (LAN) on carcinogenesis via decreased nocturnal melatonin synthesis [J]. Molecules, 2018, 23(6): 1308-1322.
- [8] LIN Y, PENG Y, LIANG B, et al. Associations of dinner-to-bed time, post-dinner walk and sleep duration with colorectal cancer: A case-control study [J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(34): e12038.

- [9] STOKES K, COOKE A, CHANG H, et al. The circadian clock gene BMAL1 coordinates intestinal regeneration [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 4(1): 95-114.
- [10] MOMMA T, OKAYAMA H, SAITOU M, et al. Expression of circadian clock genes in human colorectal adenoma and carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5319-5325.
- [11] WANG Y, QIAN R, SUN N, et al. Circadian gene hClock enhances proliferation and inhibits apoptosis of human colorectal carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4204-4210.
- [12] WANG Y, SUN N, LU C, et al. Upregulation of circadian gene 'hClock' contribution to metastasis of colorectal cancer [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(6): 2191-2199.
- [13] WOOD PA, YANG X, TABER A, et al. Period 2 mutation accelerates ApcMin/+ tumorigenesis [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(11): 1786-1793.
- [14] MAZZOCOLI G, COLANGELO T, PANZA A, et al. Deregulated expression of cryptochrome genes in human colorectal cancer [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15: 6-26.
- [15] YU H, MENG X, WU J, et al. Cryptochrome 1 overexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in patients with colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61679.
- [16] ZENG ZL, LUO HY, YANG J, et al. Overexpression of the circadian clock gene Bmal1 increases sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(4): 1042-1052.
- [17] LU H, CHU Q, XIE G, et al. Circadian gene expression predicts patient response to neoadjuvant chemoradiation therapy for rectal cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10985-10994.
- [18] HUISMAN SA, OKLEJEWICZ M, AHMADI AR, et al. Colorectal liver metastases with a disrupted circadian rhythm phase shift the peripheral clock in liver and kidney [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): 1024-1032.
- [19] SAKAMOTO W, TAKENOSHITA S. Overexpression of both CLOCK and BMAL1 inhibits entry to S phase in human colon cancer cells [J]. *Fukushima J Med Sci*, 2015, 61(2): 111-124.
- [20] GRECHEZ-CASSIAU A, RAYET B, GUILLAUMOND F, et al. The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(8): 4535-4542.
- [21] MATSU-URA T, DOVZHENOK A, AIHARA E, et al. Intercellular coupling of the cell cycle and circadian clock in adult stem cell culture [J]. *Mol Cell*, 2016, 64(5): 900-912.
- [22] ZHOU SY, WANG ZM, KIAUNING JE, et al. Increased oxidative DNA damage is associated with development of colorectal cancer [J]. *Journal of Zunyi Medical University*, 2014, 37(4): 357-365.
- [23] KAWAMURA G, HATTORI M, TAKAMATSU K, et al. Cooperative interaction among BMAL1, HSF1, and p53 protects mammalian cells from UV stress [J]. *Commun Biol*, 2018, 1: 204-217.
- [24] YOUNG LM, MARZIO A, PEREZ-DURAN P, et al. TIMELESS forms a complex with PARP1 distinct from its complex with TIPIN and plays a role in the DNA damage response [J]. *Cell Rep*, 2015, 13(3): 451-459.
- [25] GOTOH T, VILA-CABALLER M, LIU J, et al. Association of the circadian factor period 2 to p53 influences p53's function in DNA-damage signaling [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(2): 359-372.
- [26] SHIN D, KIM IS, LEE JM, et al. The hidden switches underlying RORalpha-mediated circuits that critically regulate uncontrolled cell proliferation [J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(4): 338-348.
- [27] WEN Z, PAN T, YANG S, et al. Up-regulated NRIP2 in colorectal cancer initiating cells modulates the Wnt pathway by targeting ROR-beta [J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 20-34.
- [28] GOLDSMITH CS, BELL-PEDERSEN D. Diverse roles for MAPK signaling in circadian clocks [J]. *Adv Genet*, 2013, 84: 1-39.
- [29] RELOGIO A, THOMAS P, MEDINA-PEREZ P, et al. Ras-mediated deregulation of the circadian clock in cancer [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(5): e1004338.
- [30] ZHANG F, SUN H, ZHANG S, et al. Overexpression of PER3 inhibits self-renewal capability and chemoresistance of colorectal cancer stem-like cells via inhibition of notch and beta-catenin signaling [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(5): 709-719.
- [31] INNOMINATO PF, KOMARZYNSKI S, PALESH OG, et al. Circadian rest-activity rhythm as an objective biomarker of patient-reported outcomes in patients with advanced cancer [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(9): 4396-4405.
- [32] HE B, CHEN Z. Molecular targets for small-molecule modulators of circadian clocks [J]. *Curr Drug Metab*, 2016, 17(5): 503-512.

(收稿日期:2019-05-10)