



# Mathematical modeling links Wnt signaling to emergent patterns of metabolism in colon cancer

## 与Wnt信号通路相联系的结肠癌代谢模式的数学模型构建

汇报人：蔡玉缘

专业：微生物学

导师：赵述淼

2017.10.18



# Catalogue



研究背景

Research Background



实验结果

Experimental results



讨论

D i s c u s s i o n



# Background

## 1. **Warburg effect**：“有氧糖酵解”——肿瘤细胞的一大特征

即使在有氧条件下，肿瘤细胞也是通过糖酵解的方式获得生存必需的能量，这一现象被称为瓦伯格效应(Warburg effect)。糖酵解活跃，代谢产物乳酸含量高。癌细胞会倾向于使用“glycolysis”途径低效产能。

2. **代谢共生**：后续越来越多的研究发现并非所有的肿瘤中均存在瓦伯格效应，或者说并非所有的肿瘤细胞均存在瓦伯格效应。肿瘤细胞的代谢存在明显的多样性，部分细胞表现为糖酵解方式产能，另外一部分细胞表现为氧化磷酸化方式产能。两类细胞能够通过乳酸穿梭机制相互协调，和谐共处，即代谢共生。

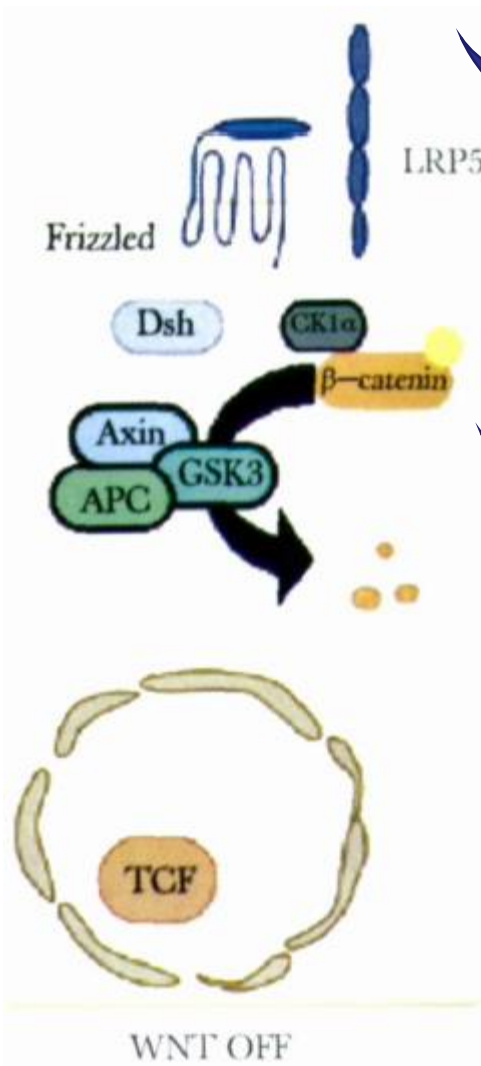
3. **肿瘤异质性**：是指肿瘤在生长过程中，经过多次分裂增殖，其子细胞呈现出分子生物学或基因方面的改变，从而使肿瘤的生长速度、侵袭能力等各方面产生差异。一般指肿瘤内既有致瘤细胞亚群，也有非致瘤细胞亚群。

本实验中观察到的异质性是糖酵解细胞 $P_g$ 和氧化磷酸化细胞 $P_0$ 中的Wnt信号强度。

代谢共生其实是肿瘤异质性的一个表现。或者说是肿瘤细胞的一种生存方式。

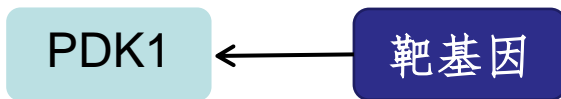
4. **Wnt信号通路**：在动物发育中起重要作用，其异常表达或激活能引起肿瘤。

# Wnt基因调控的重要信号传导系统即为Wnt通路。

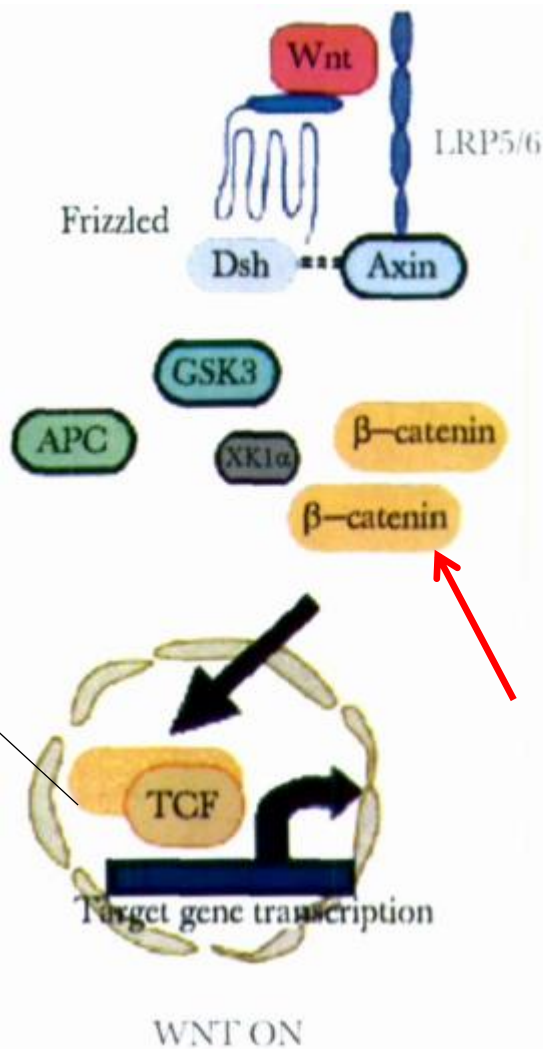


主要成员：  
 Wnt蛋白（Wnt 配体）；  
 Wnt受体（Frizzled家族包括本实验的SFPR）；  
 β-连环蛋白（β-catenin）；TCF；LEF-1；  
 APC（adenomatous polyposis coli）蛋白等。

## PDK1与Wnt的关系



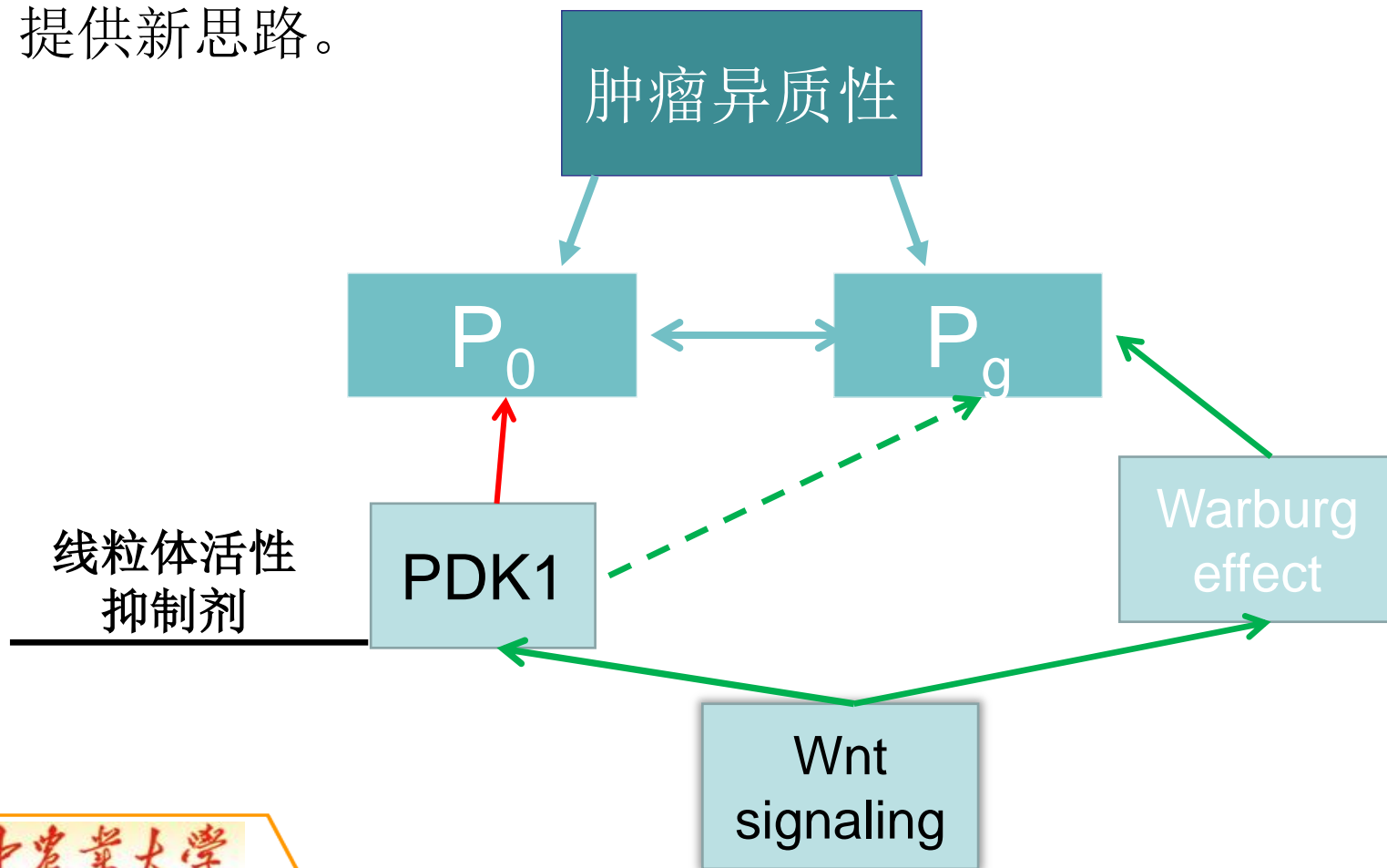
结肠中，Wnt信号传导提高丙酮酸脱氢酶激酶PDK1以抑制OXPHOS并促进糖酵解和乳酸生成。





# 整体实验思路

目的：提供一个数学模型，探索Wnt信号活性如何影响结肠癌肿瘤细胞糖酵解代谢的空间模式，为治疗结肠癌提供新思路。



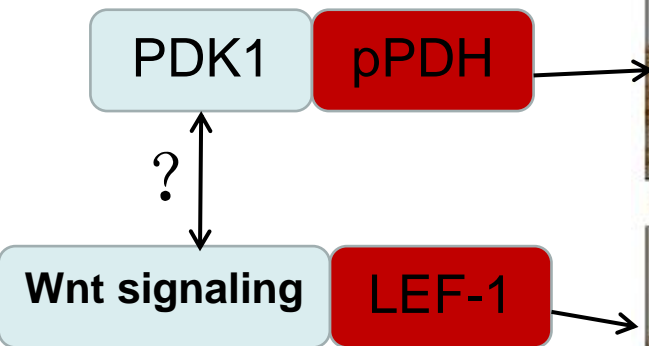
# Results 1. 在异种移植肿瘤中PDK活性和LEF-1表达的斑点模式

目的：PDK1与Wnt信号通路活性之间有无联系，有无显著相关性。

材料：通过注射人结肠癌细胞系SW480到小鼠皮下组织的异种移植肿瘤

方法：利用免疫组化染色技术(抗原-抗体)；Cochran-Mantel-Haenszel测试

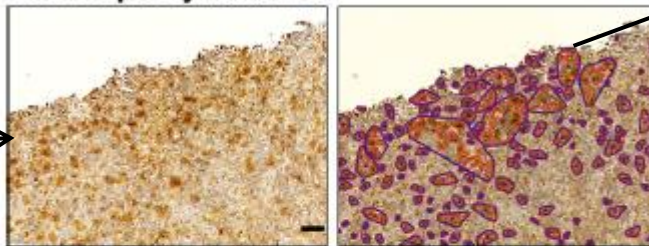
原理：



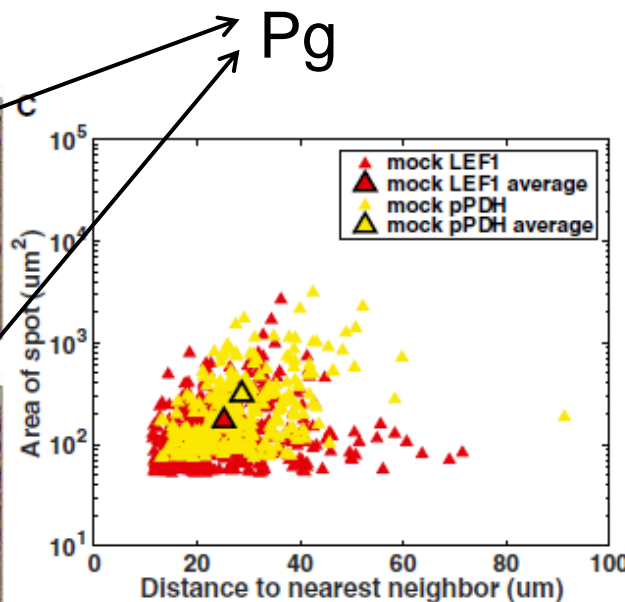
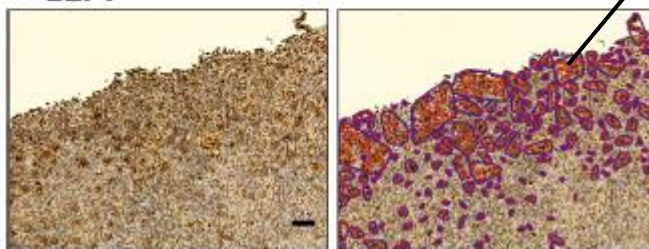
结果：

SW480 Mock Xenograft Tumor

A Phosphorylated PDH



B LEF1



结论：pPDH和LEF-1斑点重叠率非常高，斑点覆盖的肿瘤的总面积分数几乎相同（pPDH：21.2%；LEF-1：20.2%）通过成像像素距离测定，两者相关性显著，实验在原发性结肠癌中得到惊人的一致性。证明Wnt信号活性与异质代谢模式在空间上相关。斑点阵列可以很好的模拟他们之间在空间上距离和范围。





## Results 2. 反应扩散建模模拟异种移植肿瘤中PDK活性和Wnt信号的自组织模式

建模思路:

模型是基于经典图灵扩散方程（稳定），加入了短程活化剂和远程抑制剂（**Gierer-Meinhardt**活化剂-抑制剂模型），考虑了环境因素，专注于细胞代谢表型和Wnt信号活性相关联的反应扩散方程（不稳定）。

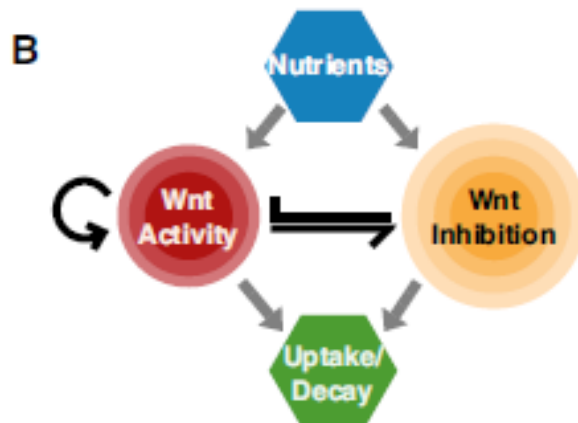
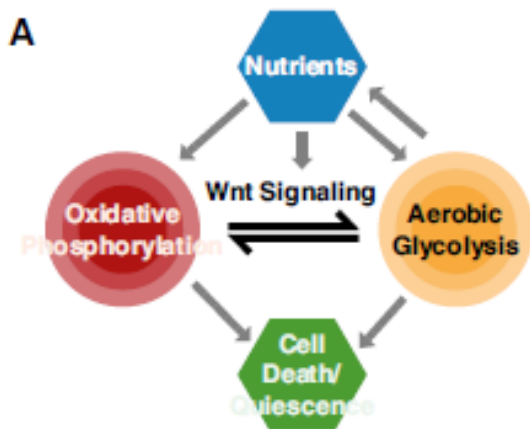
### **Turing-Gierer-Meinhardt**活化剂-抑制剂方程的数学模型

**wnt**: wnt信号通路的正向调节因子（短程扩散），用W表示。

**SFRP**: Wnt的抑制剂（长程扩散），用 $W_i$ 表示。

# Turing-Gierer-Meinhardt 数学模型

## Turing & Gierer-Meinhardt



$$\frac{\partial P_o}{\partial t} = \underbrace{D_o \nabla^2 P_o}_{\text{random motion}} + \underbrace{\frac{1}{\tau_o} N (1 - P_o - P_g - P_d) P_o}_{\text{proliferation}} + \underbrace{\frac{1}{\tau_{go}} \chi_W(W) P_g}_{\text{switch to OXPHOS}} - \underbrace{\frac{1}{\tau_{og}} \chi_W^*(W) \chi_N^*(N) P_o}_{\text{switch from OXPHOS}} - \underbrace{\mu_o \chi_N(N) P_o}_{\text{death}}$$

$$\frac{\partial P_g}{\partial t} = \underbrace{D_g \nabla^2 P_g}_{\text{random motion}} + \underbrace{\frac{1}{\tau_g} \frac{W}{\alpha_W + W} N (1 - P_o - P_g - P_d) P_g}_{\text{proliferation}} - \underbrace{\frac{1}{\tau_{go}} \chi_W(W) P_g}_{\text{switch from glycolysis}} + \underbrace{\frac{1}{\tau_{og}} \chi_W^*(W) \chi_N^*(N) P_o}_{\text{switch to glycolysis}} - \underbrace{\mu_g \chi_N(N) P_g}_{\text{death}}$$

$$\frac{\partial W}{\partial t} = \underbrace{D_W \nabla^2 W}_{\text{random motion}} + \underbrace{\frac{1}{a + bW_I} \kappa_W N W^2 P_g}_{\text{inhibition upregulation}} + \underbrace{S_W (P_o + P_g)}_{\text{upregulation}} - \underbrace{\mu_W W}_{\text{downregulation}}$$

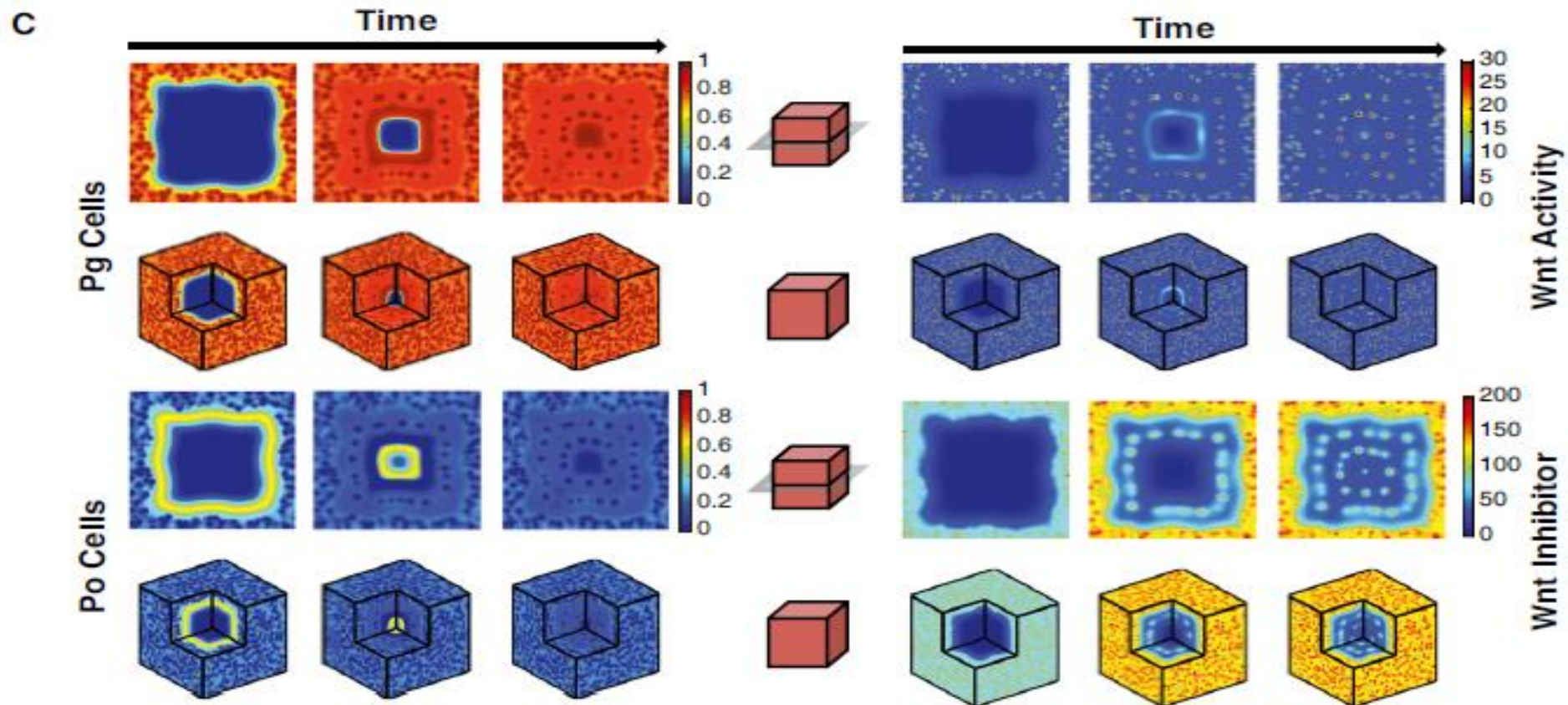
$$\frac{\partial W_I}{\partial t} = \underbrace{D_{W_I} \nabla^2 W_I}_{\text{random motion}} + \underbrace{\kappa_{W_I} N W^2 (P_o + P_g)}_{\text{upregulation}} - \underbrace{\mu_{W_I} W_I}_{\text{downregulation}}$$

$$\frac{\partial N}{\partial t} = \underbrace{D_N \nabla^2 N}_{\text{random motion}} - \underbrace{\nu_{NG} N P_g}_{\text{uptake by } P_g \text{ cells}} - \underbrace{\nu_{NO} N P_o}_{\text{uptake by } P_o \text{ cells}} - \underbrace{\mu_N N}_{\text{decay}} + \underbrace{N_s}_{\text{bulk source}}$$

反应扩散方程描述了氧化 (Po) 和糖酵解 (Pg) 细胞群, Wnt信号传导活性 (W) 和Wnt抑制剂随时间的变化



# 模拟糖酵解和氧化磷酸化细胞的分数和Wnt和Wnt抑制剂的浓度的数值结果



结果：上图与异种移植实验数据一致，模型随着时间的推移产生糖酵解细胞群体中不同的斑点模式。在整个肿瘤区域，存在高水平的糖酵解主导细胞与高活性糖酵解细胞的局部区域（暗红点）。



# Results 2. 反应扩散建模模拟异种移植肿瘤中PDK活性和Wnt信号的自组织模式

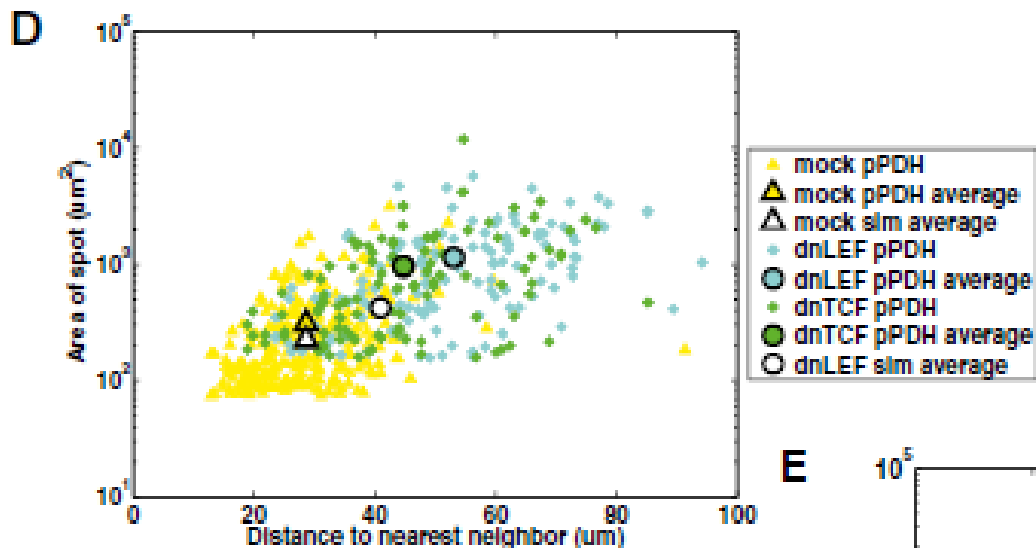
此外，该模型也进行了公式优化。通过改变各个因素来寻找能够影响此斑点模式的因素，去掉无关因素

Parameter	Description	Effect
$D_o, D_g$	Diffusion coefficients	No discernible effect
$\mu_o, \mu_g, \mu_N$	Death/decay rates	
$v_{NO^3}, v_{NG}$	Nutrient uptake rates	
$\tau_{go}, \tau_{og}$	Switching times	Proliferation of cells
$N_s$	Nutrient source	
$D_w, \mu_w$	Wnt diffusion coefficient, Wnt decay rate	Spot size
$S_w$	Constitutive Wnt activity	Background level of Wnt and glycolysis
$K_w, K_{wI}$	Upregulation rates	Number of spots, overall W and WI levels
$D_{wI}, \mu_{wI}$	Wnt Inhibitor diffusion coefficient, decay rate	Number of spots
$b$	Wnt inhibition coefficient	
$\tau_o, \tau_g$	Oxidative and glycolytic cell proliferation time	Time to pattern formation

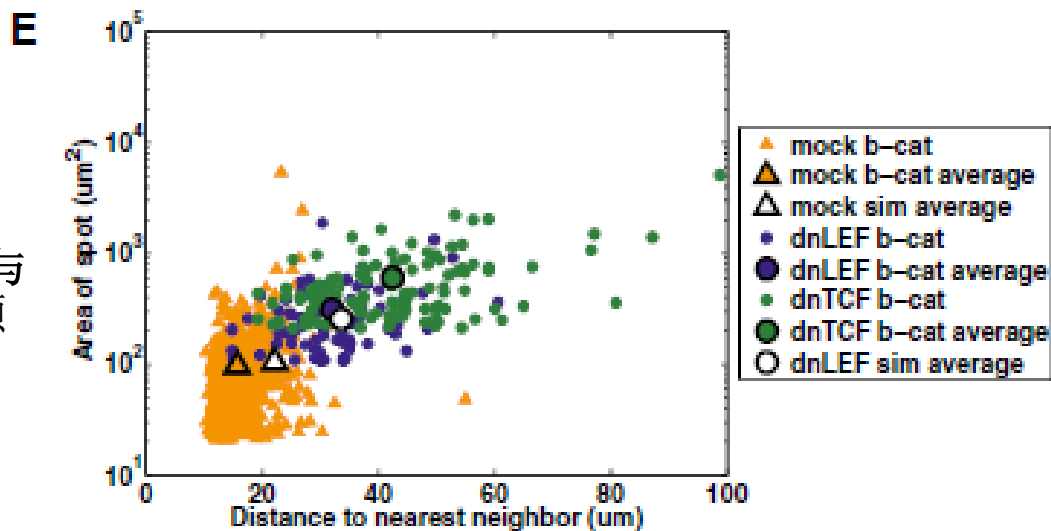
该模型描述了糖酵解和OXPHOS细胞之间的互动相互作用，通过反应扩散方程系统模拟不同代谢表型，营养物质和Wnt信号传导活动的空间和时间动力学。

# Results 2. 当dnLEF-1 / dnTCF-1表达降低Wnt信号时，pPDH和b-catenin点样模式的强度和分布均有显著变化。

- 异种移植肿瘤中的模式与模型生成的模式的定量和比较分析表明，该模型预测斑点尺寸和斑点之间的距离尺寸是相似的（见图D和E）。当dnLEF-1 / dnTCF-1表达降低Wnt信号时，pPDH和b-catenin点样模式的强度和分布均有显著变化。



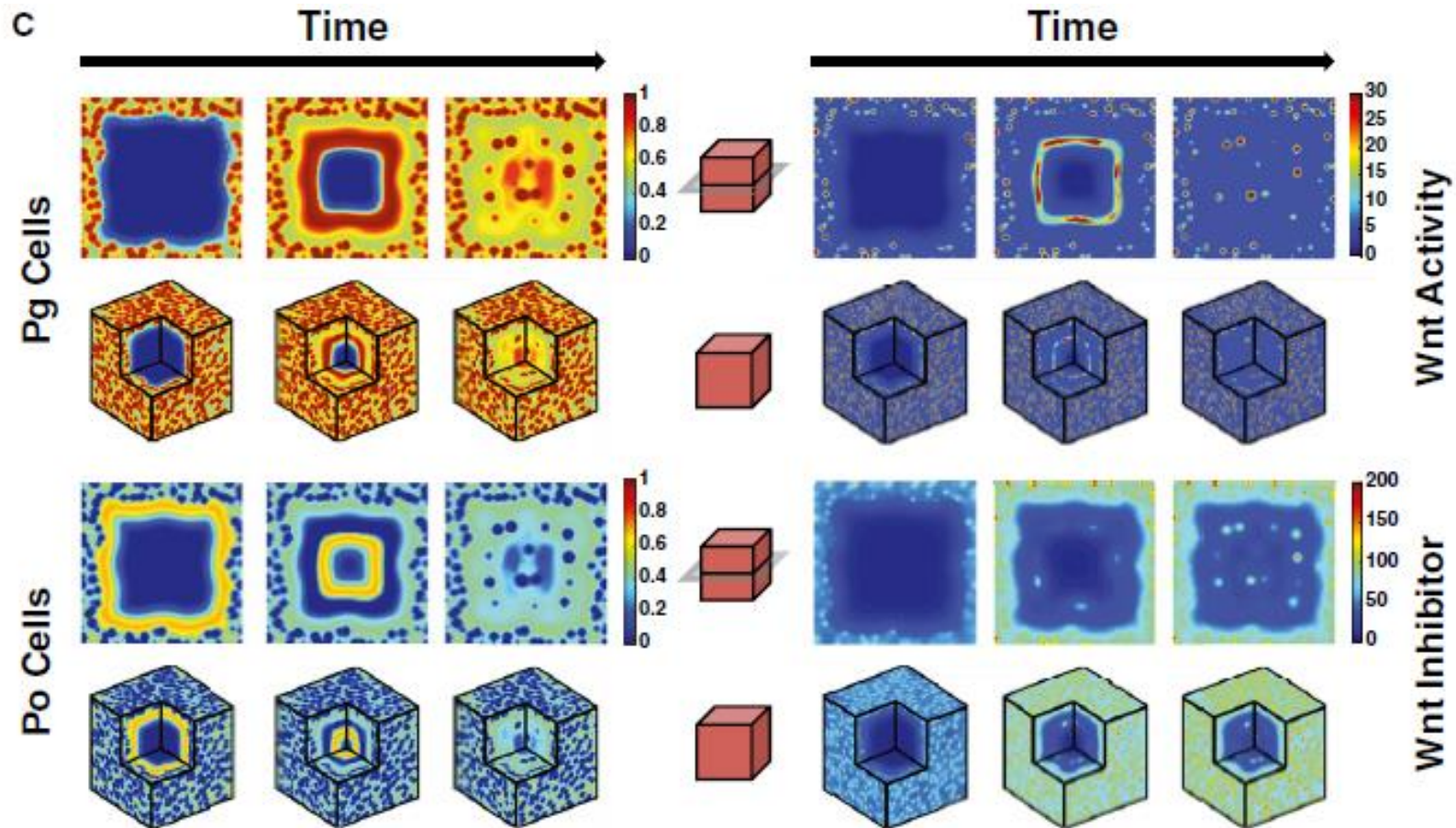
D: 对斑点尺寸与点距距离进行图像分析。模型预测，代谢斑点模式（斑点较大，点间距离更大）的变化是由于Wnt和Wnt抑制剂的扩散增加。



E: 从图像分析中比较模拟b-catenin斑点与dnLEF-1和dnTCF-1 b-连环蛋白斑点。模型预测Wnt信号通过负调控因子LEF-1和TCF的表达进一步扩散的。

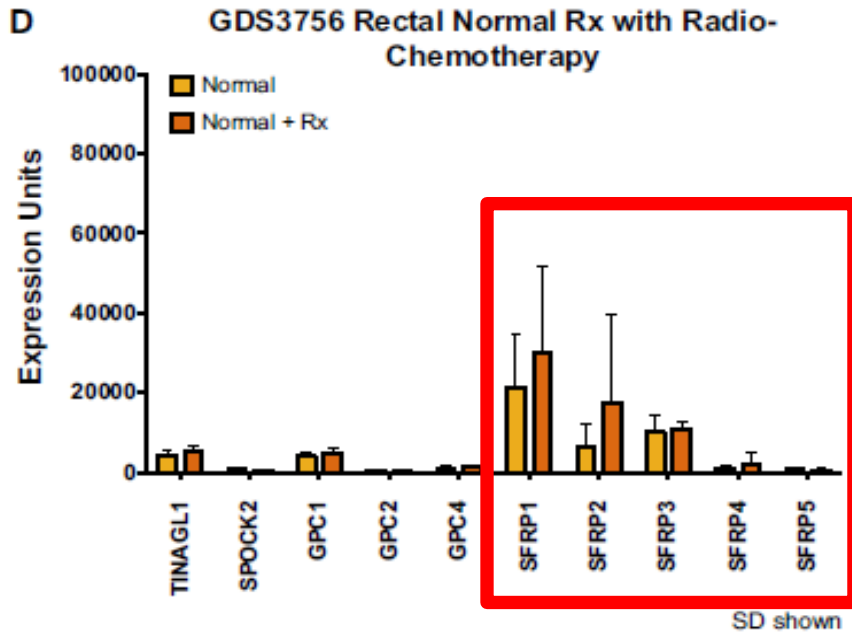


# Results 3. 反应扩散模型预测：当Wnt信号传导被部分破坏（降低 $S_w$ ），Wnt信号传导范围也会扩大，Wnt抑制剂范围也会扩大。

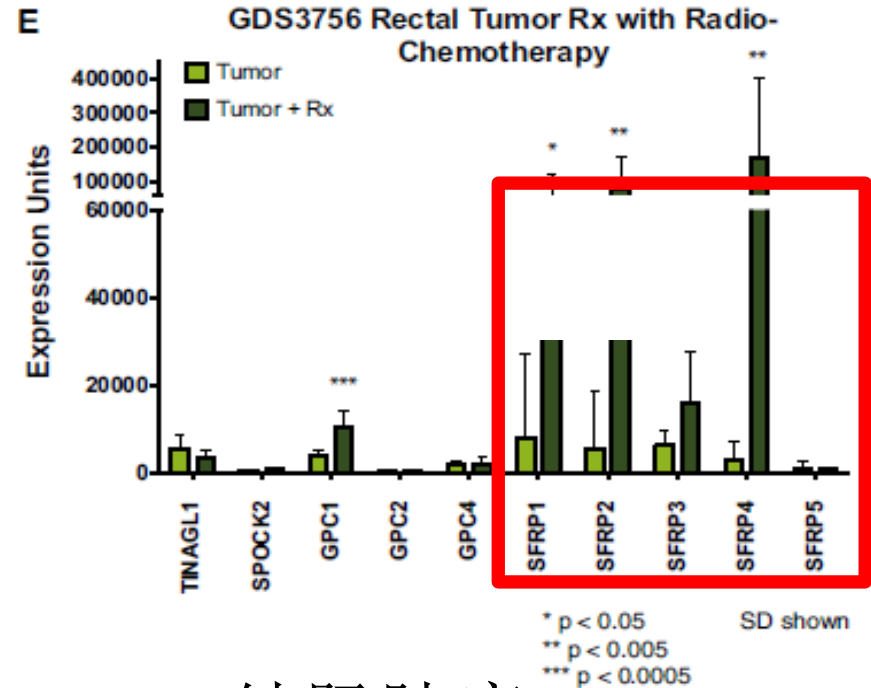


研究表明，通过干扰Wnt信号来给结肠癌细胞施加外加压力会引发增加Wnt配体扩散范围或“扩散”的因子表达的变化，并使Wnt抑制剂扩散范围增大。

# 验证:



## 正常结肠



## 结肠肿瘤

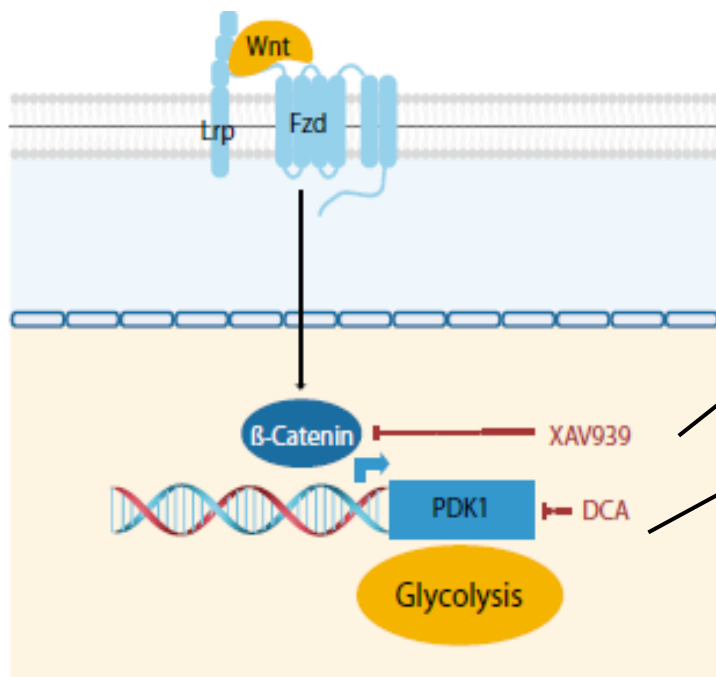
实验分析了一个数据集[NCBI GEO GDS3756], 其提供了一组结直肠癌患者在放射治疗和化疗前后的基因表达谱。通过q-PCR和模型分析得到图D和E, 治疗对正常直肠组织中Wnt配体调节物的表达无明显影响, 但是对肿瘤中一些表达因子如SFRP家族成员的表达有显著效果。

结论: 这表明放射化学疗法可能引发增加Wnt扩散范围的蛋白质表达增加, 我们预测的反应可能有助于维持肿瘤中糖酵解细胞的临界水平。

# 建立癌症治疗方案：靶向代谢

模拟将糖酵解细胞群体识别为敏感药物靶标

靶向Wnt和PDK的化合物目前正在临床前研究中作为临床试验中的单个试剂进行测试，但尚未经过组合测试。本研究使用抗Wnt和抗PDK疗法联合靶向糖酵解细胞，研究此方法是否比单一药物治疗更有效。



	XAV939	DCA
Function	Tankyrase inhibitor. Prevents dissolution of $\beta$ -catenin destruction complex, increasing degradation of $\beta$ -catenin.	Pan-PDK inhibitor, prevents shutting down mitochondrial respiration, encourages OXPHOS
Model	Decreased Wnt signaling ( $S_w$ ), increased diffusion coefficients of W & WI ( $D_w, D_{wi}$ )	Increased switching rate from glycolysis to OXPHOS ( $1/t_{g0}$ )
Clinical	Preclinical	Phase II trials in glioma patients. (Michelakis, 2010)

DCA（二氯乙酸）：抑制PDK活性直接靶向细胞代谢

XAV939：巯基酶抑制剂，可降低 $\beta$ -连环蛋白水平，从而降低Wnt信号通路活性。





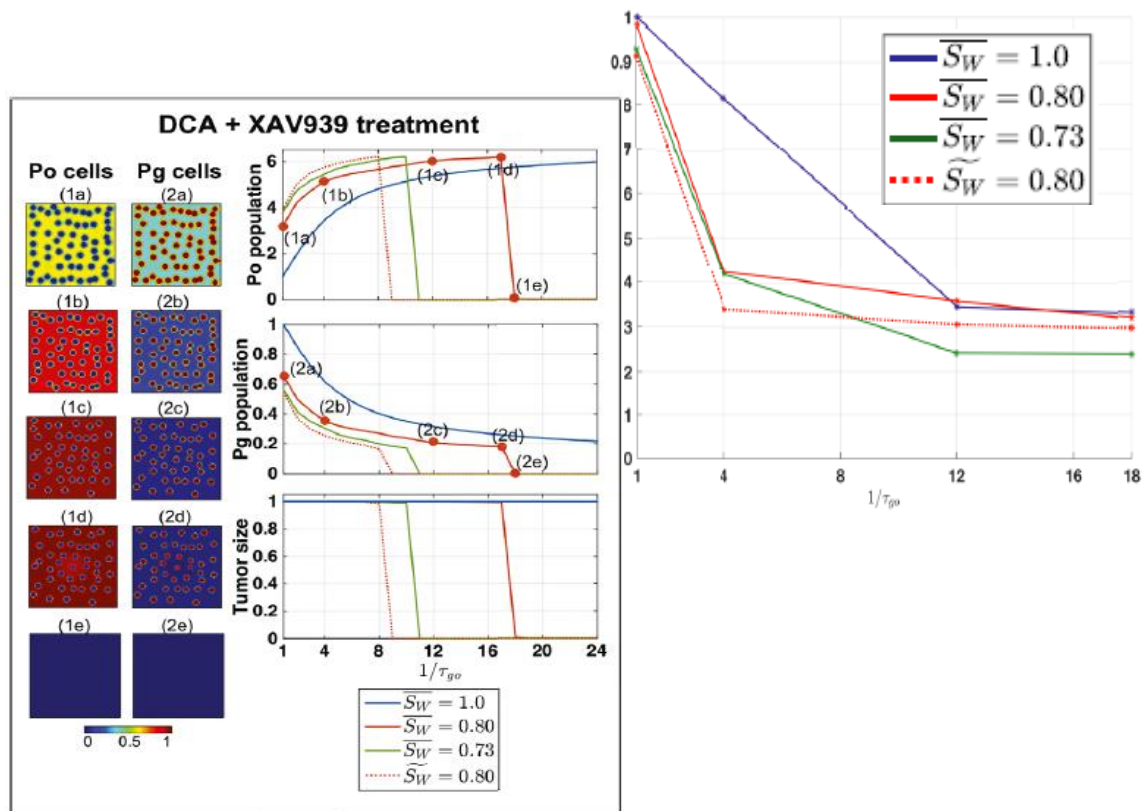
# 建立模型模拟DCA和XAV939的作用：改变参数

药物	作用	模拟参数
DCA	抑制PDK活性	提高Pg→Po的过程，增大 $1/\tau_{go}$
XAV939:	可降低 $\beta$ -连环蛋白水平，从而降低Wnt信号通路活性	降低Sw,增大Wnt和Wnt抑制剂的扩散范围Dw和 $D_{wi}$

## 组合疗法模拟结果:

模拟预测，随着细胞从糖酵解状态 (Pg) 转变为OXPHOS状态 (Po)，氧化细胞的数量将首先增加，直到糖酵解细胞水平不足以维持肿瘤和所有肿瘤细胞死亡。此外，治疗模拟表明，只要一个或另一个已经有足够作用，这两种疗法的组合将比单一疗法更有效。换句话说，如果 $\beta$ -连环蛋白的表达未被XAV939充分抑制，则DCA的PDK抑制必须被充分地提高，反之亦然。

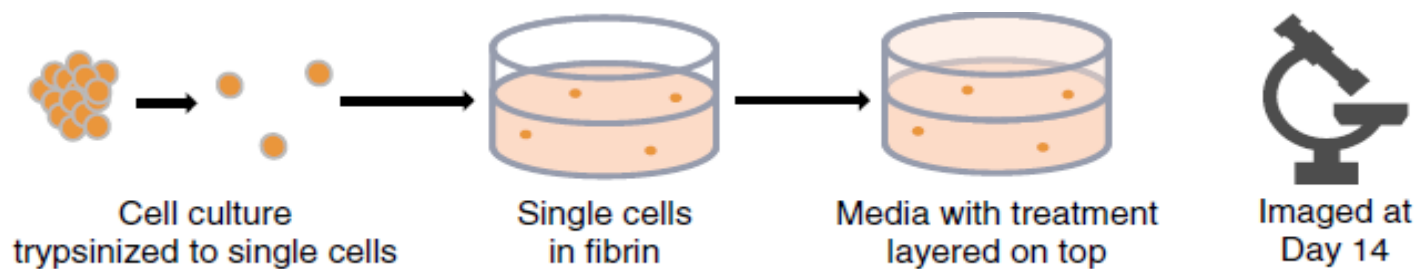
D Simulation of treatments DCA and XAV939



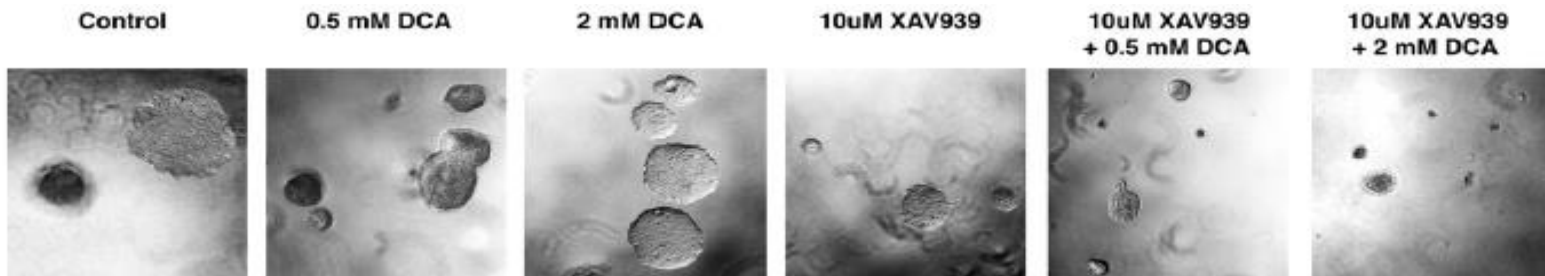
# Σ 体外验证:

方法:

1. 结肠癌细胞的3D集落生长进行了模型预测的初步实验测试。将总共200个单细胞接种在纤维蛋白凝胶中并在药物治疗下培养14天

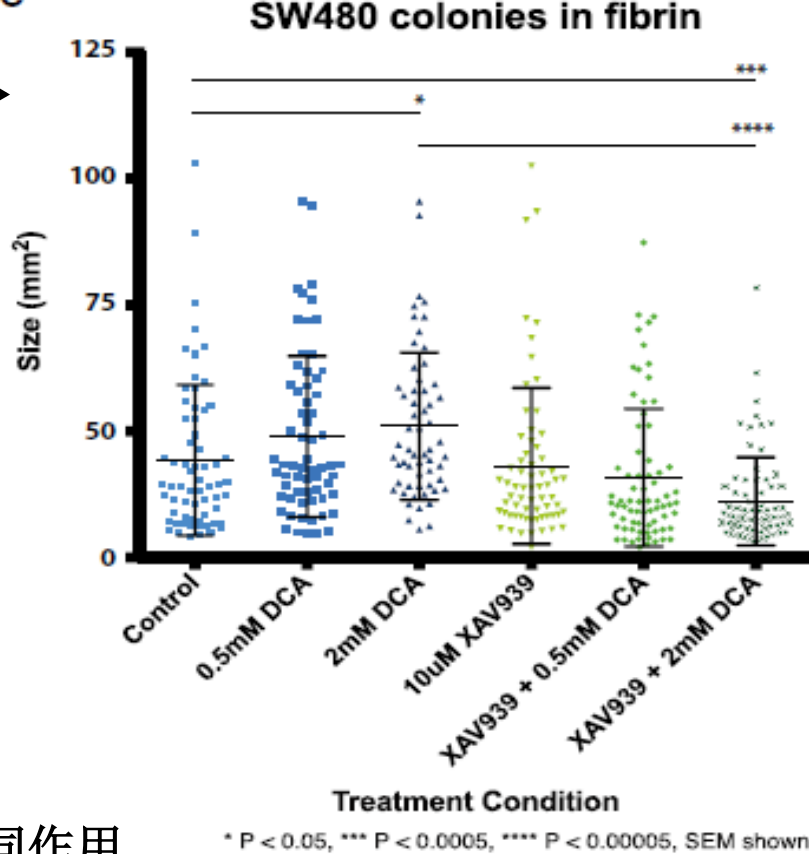


2. 单细胞增殖以产生肿瘤球体，使用图像分析来量化作为增殖代谢的菌落大小的增加



### 3. 图像量化分析

结果：  
用低剂量的DCA（0.5mM，2mM）或XAV939（5 μM）作为单一药剂的治疗对2周治疗期间菌落的发育和生长没有影响。事实上，DCA治疗似乎增加了肿瘤克隆大小。相比之下，联合治疗对肿瘤生长具有显著的抑制作用，表现出对增殖的强烈抑制，有协同作用

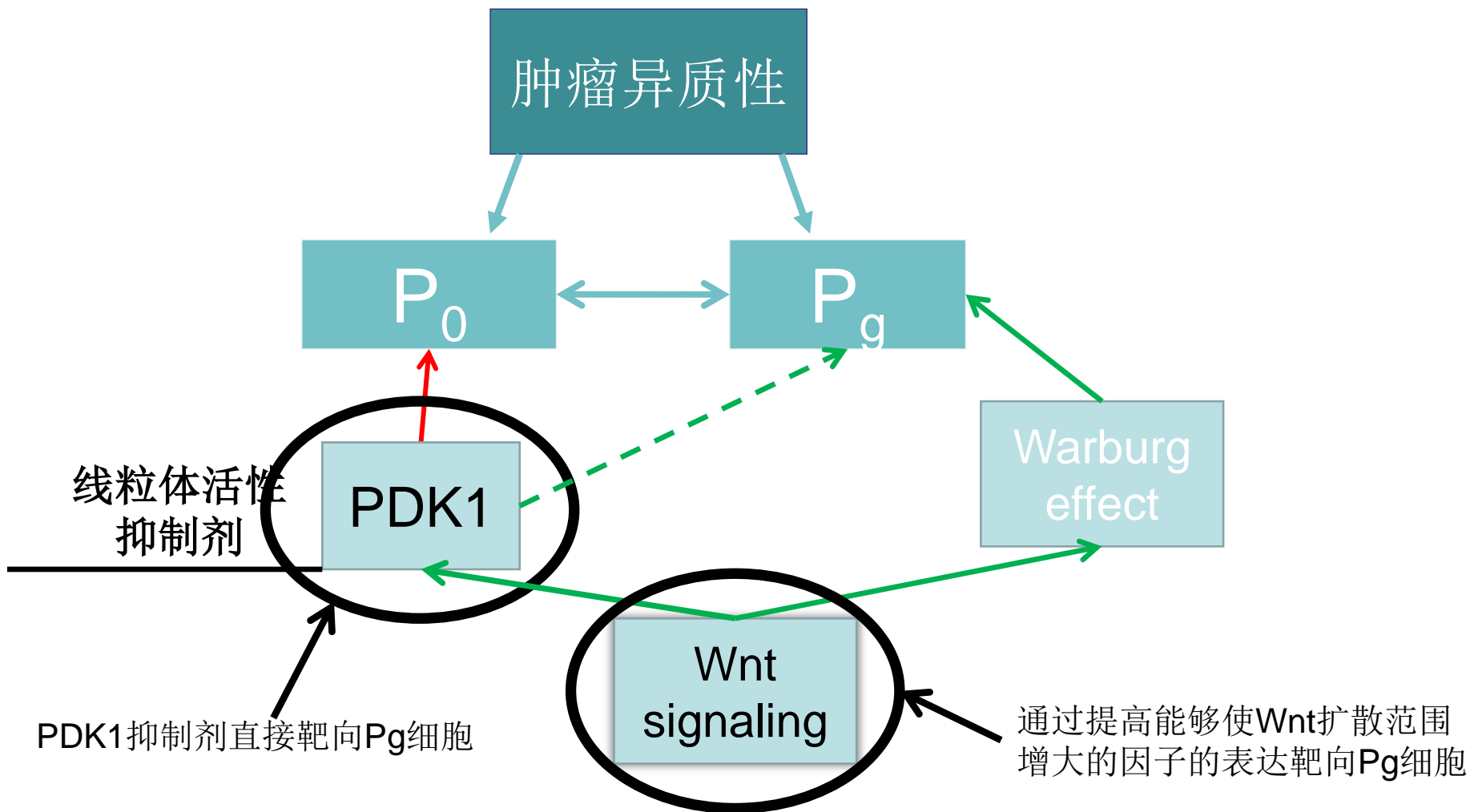


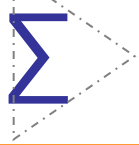
协同性分析：**Bliss**独立模型组合指数量化协同作用

该指数假设XAV939和DCA治疗独立作用（例如，XAV939靶向Wnt信号传导，DCA靶向PDK活性）。如果组合指数小于1，则表示协同效应。

结果：所有情况下的组合指数均小于1，这表明XAV939和DCA组合治疗的协同作用。如体内和体外模型所预测的，**这些结果表明，结合Wnt抑制剂和代谢靶向剂是治疗结肠肿瘤的一个有潜力的策略。**

# 讨论总结





## 概括:

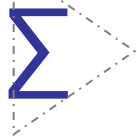
这里提出的模型是第一个描述自代谢类型与Wnt信号之间复杂空间关系的肿瘤异质性模式。结合Wnt抑制剂和PDK1抑制剂双向靶向糖酵解代谢细胞是治疗结肠肿瘤的一个有潜力的策略。

## 启发:

用模型可以较好的了解疾病代谢模式，模拟疾病发生和提出治疗策略。模型是一个整体，在模拟过程中，有许多变量需要考虑。

## 改进:

验证时主要是在异种移植肿瘤中验证，而体内肿瘤细胞的微环境有更多因素需要考虑。加入这些因素丰富这个模型可以更好的模拟体内代谢模式。



# Q & A

汇报人：蔡玉缘

2017.10.18





# 附:

- 以前的发现:
- 以前认为癌细胞代谢模式是将**Glu**输送到含氧量低的区域。
- **P0**细胞会利用由**Pg**细胞产生的乳酸来进行代谢活动, 因此, **Glu**就会倾向于向**Pg**细胞转移进而供癌细胞利用。
- 基于这个机制进行的抗血管生成治疗(切断营养来源)却使得癌细胞产生抗性。



# 附:

- 免疫组织化学染色法是指在抗体上结合荧光或可呈色的化学物质，利用免疫学原理中抗原和抗体间专一性的结合反应，检测细胞或组织中是否有目标抗原的存在，此方式不只可以用来测知抗原的表现量也可观察抗原所表现的位置。只要是能够让抗体结合的物质，也就是具有抗原性的物质包括蛋白质、核酸、多糖、病原体等都可侦测。
- 免疫组织化学的优势在于专一性、灵敏度、简便快速以及成本低廉，所以广为医院采用，通常是借由特定的肿瘤标记来筛选癌症。免疫组织化学染色法对基础研究及预防和诊疗上都是相当重要的一个方法。