

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.020

• 综述 •

肝素酶在肿瘤转移中的作用

Role of heparanase in tumor metastasis

刘启志 综述;王 烈*,宋京翔 审阅(南京军区福州总医院 普通外科研究所,福建 福州 350025)

[摘要] 肝素酶(heparanase)是一种能降低细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)的内切糖苷酶。它参与细胞表面细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解和重塑,促进多配体蛋白聚糖-1(syndecan-1)的合成和释放;它在内涵体和溶酶体等细胞器中具有管家基因的功能,广泛表达于人类的肿瘤细胞中,在侵袭型的动物肿瘤细胞中也过度表达,因此它的过度表达被认为能促进肿瘤的浸润与转移。最近的研究显示,肝素酶能释放硫酸乙酰肝素依赖的生长因子并能产生大量有活性的硫酸乙酰肝素片段,破坏、降解细胞外基底膜屏障,促进肿瘤细胞扩散和转移,并加快血管生成,对肿瘤患者的预后造成了不利的影响。现在,越来越多的肝素酶抑制剂(PI-88、肝素、肽类、硫酸昆布多糖、RNA干扰和苏拉明等)正在被开发出来,并显示出良好的前景。深入研究肝素酶在肿瘤转移和调节中的作用可能会带来肿瘤治疗的新手段。

[关键词] 肝素酶;肿瘤;硫酸乙酰肝素蛋白聚糖;转移;治疗

[中图分类号] R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0199-04

肝素酶(heparanase)是唯一一个可以将硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)链剪切成5 000~7 000短片段的 β -内切糖苷酶^[1]。肝素酶通过成功降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜(basement membrane, BM),为肿瘤细胞的转移创造了条件。肝素酶可以降解BM和ECM中的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG),破坏限制肿瘤转移的屏障,释放活性物质,产生链式反应,加快血管生成,加强肿瘤细胞的运动能力,促进肿瘤转移,这已成为肿瘤进展的重要机制之一。越来越多的研究表明,肝素酶在几乎所有的中晚期恶性肿瘤中都高表达,与肿瘤患者的预后不良密切相关,因此,肝素酶作为肿瘤治疗的靶点已经受到越来越多的关注。

1 肝素酶的分子结构、分布定位与基因调节

1.1 肝素酶的分子结构

人类肝素酶有两种基因亚型,即heparanase-1和heparanase-2。Heparanase-1最早从小板和胎盘中克隆得到,是位于4q21.3染色体上的单拷贝基因,并与遗传标记D4S400连锁,包含14个外显子和13个内含子,长度约为39 kb^[2]。基因启动子位于AUG上游2.3 kb,其cDNA全长1 758 bp,含有1个1 629 bp的开放阅读框,编码1个由543个氨基酸残基组成的蛋白质前体,相对分子质量为65 000,切除N端1~15个氨基酸残基后成为相对分子质量为50 000的活性蛋白质。Heparanase-2基因由乳腺cDNA文库克隆而来,定位于10q23.24上,与heparanase-1有高度的同源性。事实上,活性肝素酶是一个由50 000(Lys158-Ile543)和8 000(Gln36-Glu109)多肽以非共价键结合起来的异源二聚体,这2条非共价结合的异二聚体结构是肝素酶具备活性的充分必要条

件,其中插入的6 000(Ser110-Gln157)的多肽行使蛋白水解功能^[3]。肝素酶的一级结构、关键氨基酸和预测的三维空间结构如图1^[4]所示。

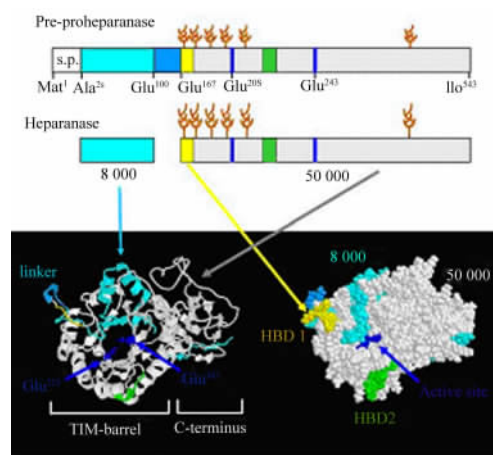


图1 肝素酶异源二聚体的一级结构、关键氨基酸和预测的三维空间结构

肝素酶的半衰期约为30 h^[5]。ATP、ADP和腺苷等核苷酸类物质均能促进肿瘤细胞中肝素酶的分泌表达,但是这种分泌与不同种类的细胞有关系。TNF- α 能促进微血管内皮细胞肝素酶的分泌。但是,TNF- α 却不能促进肿瘤源性细胞肝素酶的分泌^[6]。

[基金项目] 南京军区“十一五”科研规划重点课题资助项目(No. 2007081)。Supported by the Key Scientific Research Project in the “11th Five-year Plan” of Nanjing Military Area Command (No. 2007081)

[作者简介] 刘启志(1982-),男,山东省烟台市人,硕士研究生,主要从事RNA干扰方面的研究。E-mail: lqz2008_@163.com

*通讯作者(Corresponding author). E-mail: fzptwk@21.cn.com

1.2 肝素酶的分布与细胞定位

肝素酶可降解 HSPG, 在人类正常组织主要分布在胎盘、脾脏、淋巴结、胸腺等免疫器官和细胞内, 其他非免疫组织中如心脏、肺、肝、肾等均不表达, 但在多种人类恶性肿瘤中有较高水平表达, 尤其在一些侵袭转移性强的恶性肿瘤中表达水平更高^[7]。

对于肝素酶的细胞定位, 尽管普遍认为它是膜结合蛋白, 但实际上仅在少数细胞表面和细胞外检测到肝素酶, 大部分研究观测到该酶位于胞质。在成纤维细胞及肿瘤细胞中定位于核周的酸性内涵体和溶酶体中, 在中性粒细胞中定位于第 3 颗粒。Sommerfeldt 等^[8]用 3 种不同的方法研究了乳腺癌细胞中肝素酶的亚细胞定位, 观察到肝素酶以颗粒状存在于细胞核的周围, 进一步的研究发现它存在于高尔基体和溶酶体中, 其酶活性依赖于高尔基体的完整性。此研究提示, 肝素酶除了具有细胞外活性(如细胞侵袭, 释放各种结合在 ECM 上的生长和分化因子), 同时在细胞内也行使功能(如调控 HSPG 的更新代谢)。

1.3 肝素酶的基因调节

肝素酶的基因受到很多甲基化的影响。肝素酶基因的启动子位于 AUG 上游 2.3 kb 处。一些文献^[9]已经肯定了启动子甲基化在肝素酶的基因转录中起着重要的作用。正常情况下或者非转移性良性肿瘤细胞中, 肝素酶启动基因被甲基化(methylation)或过甲基化(hypermethylation), 一旦启动子发生去甲基化(demethylation), 则启动了整个转录和翻译程序, 造成癌症发生、发展、转移等恶性表现。

2 肝素酶促进肿瘤转移和血管生成的作用机制

肝素酶与肿瘤生长和转移有很大的关系。肿瘤的转移必须具备 2 个条件:(1)突破 ECM 和 BM 组成的天然屏障;(2)新生血管的生成。肝素酶是一种能水解 HSPG 的关键酶, 它的表达与肿瘤的生长、转移和血管生成方面有很大关系。通过降低细胞基底膜的 HSPG, 它很容易地浸润细胞上皮细胞, 破坏正常细胞赖以生存的屏障。ECM 和 BM 都是由大分子组成的复合网络结构, 主要成分有四型胶原(collagen IV)、层粘连蛋白(laminin)以及 HSPG。HSPG 位于毛细血管基底膜的内皮下, 是由一条核心蛋白与多条 HS 链、有时还有多条硫酸软骨素链(chondroitin sulfate, CS)组成的聚合体, 是脊椎动物和无脊椎动物细胞表面和细胞外基质普遍存在的大分子物质。HSPG 是很多细胞因子的储存库: β -成纤维细胞生长因子(β -fibroblast growth factor, bFGF)、VEGF、角蛋白生长因子(keratin growth factor, KGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、转化生长因子- β (transformation growth

factor, TGF- β)等。肝素酶促进肿瘤转移涉及到以下几种机制:(1)分解细胞外基质和造成血管的重塑;(2)直接释放促进血管生成的生长因子, 如成纤维细胞生长因子(FGF-2)和 VEGF 等;(3)尿激酶型纤溶酶原激活物 uPA 和组织型纤溶酶原激活物 tPA 平时也结合于肝素酶上, 被释放出来的活化生长因子(如肝细胞生长因子前体)激活胞外基质中的蛋白酶级联反应, 从而促进溶解基质网状结构和肿瘤的转移^[10];(4)促进释放组织特异性生长因子, 参与肿瘤细胞转移的器官组织特异性选择;(5)可能参与细胞的黏附、分化和增生。

Marchetti 等^[11]研究了星形胶质细胞通过产生肝素酶促成了黑素瘤的脑转移。体外细胞培养发现:星形胶质细胞有肝素酶的转录及酶的活性表达, 并且经神经营养因子刺激后表达量增加。如将星形胶质细胞和脑转移瘤细胞共同孵化则肝素酶活性进一步增加, 瘤细胞侵袭性增加 8 倍以上。研究表明通过产生肝素酶, 星形胶质细胞促进了黑素瘤细胞的脑转移。

肝素酶不仅具有酶的活性, 而且也有独立于细胞外基质和细胞外微环境的非酶活性。它能加强 Akt 信号转导通路和促进 PI3K 与 P38 依赖的上皮细胞的浸润与转移。通过 Src 通路, 它也能促进血管内皮生长因子的表达。在细胞水平, 通过作用于上皮细胞, 肝素酶能直接促进微血管生成。肝素酶促进 Akt 信号通路的能力证明它能抑制肿瘤细胞的凋亡^[12]。

肝素酶的表达在促进肿瘤细胞血管生成方面也起到重要的作用。新生血管的生成需要多种诱发因子, 如细胞因子、生长因子、ECM 复合物、蛋白酶抑制剂等, 刺激血管生成的因子如 VEGF 的过度表达和释放, 促进细胞分裂、趋化, 促进微血管形成。血管生成主要包括以下几个步骤:(1)血管内皮下基底膜溶解及内皮细胞活化;(2)内皮细胞迁移;(3)内皮细胞增殖;(4)形成血管。由于肝素酶能促进肿瘤血管生成和高密度的血管与预后不良也有重要关系, 所以肝素酶在调节肿瘤生长和进展中起到很大的作用。Kelly 等^[13]研究表明, 在骨髓瘤中, 肝素酶活性与血管密度成正相关性。肝素酶通过降解细胞和 ECM 中的 HS, 释放活性物质, 产生链式反应, 破坏 ECM 和 BM 结构, 加快血管生成, 促进肿瘤生长和转移, 已成为肿瘤发生发展的重要机制。

3 肝素酶与多配体蛋白聚糖

多配体蛋白聚糖(syndecan)^[14]是位于肿瘤细胞表面的一种主要的 HSPG, 并是表达于很多黏附和非黏附细胞上的一种跨膜蛋白。Syndecan 一端与细胞相连, 另一端连接基质蛋白, 协同在 ECM 中形成牢固的网状结构, 其降解对于肿瘤的转移具有重要的作用^[15]。它的家族有 4 个成员, 这些成员在参与细胞与细胞和细胞与细

胞外基质的黏附和调节硫酸肝素依赖的细胞因子的活性方面起到重大作用。它们能表达于各种类型的细胞,尽管其表达水平在不同的肿瘤细胞中有所不同。它们能调节生长因子、化学激活素、成纤维素,并参与 ECM 的组成。除了具有硫酸肝素链的活性,它们的蛋白核心在细胞黏附信号中也有重要的作用。Syndecan 的核心蛋白在胞质和跨膜区具有保守性,相反,它的外功能区在硫酸肝素聚糖的黏附点则有很大的不同。

肝素酶能促进多配体蛋白聚糖-1(syndecan-1, SDC-1)的合成和释放。SDC-1 又名 CD138,表达在多种细胞表面,包括上皮细胞,内皮细胞和血管平滑肌细胞。它的降低被认为与肿瘤发生、转移和进展有很大的关系。高水平的血清 syndecan-1 也被认为是一种预后不良的因素。这预示着 syndecan-1 促进了肿瘤患者恶性病程的进展^[16]。最重要的是, syndecan-1 促进体内肿瘤细胞的生长和转移,尽管具体的机制仍然不确切,可能与控制肿瘤关键信号传导通路有很大关系^[17]。

4 肝素酶的临床应用

4.1 肝素酶的表达是一个独立的预后因素

肝素酶的表达在恶性肿瘤的患者中是一个独立的预后因素,它的表达被认为能加速疾病的进程并使患者的预后恶化。

一些实验已证实了这个结论。Shinyo 等^[18]研究发现,肝素酶的 mRNA 在正常宫颈组织中是不表达的,但在晚期肿瘤中高表达($P = 0.026$)。在经过根治性子宫颈切除术和盆腔淋巴结清扫术的患者中,肝素酶 mRNA 的表达明显高于仅显示淋巴管转移的患者($P = 0.01$)。肝素酶 mRNA 与血管密度的关系更为密切($P = 0.035$)。表达肝素酶 mRNA 的患者的无病率和生存率明显低于无肝素酶 mRNA 表达的患者(P 分别为 0.019、0.017)。

4.2 肿瘤治疗的靶点

肝素酶能分解 ECM 中的 HSPG,释放一系列生长因子。因此,通过干扰肝素酶的活性为治疗肿瘤提供了一种新方法。目前已发现多种肝素酶抑制剂,其作用原理主要在于:(1)利用反义寡核苷酸技术,通过碱基互补原理,调控肝素酶转录因子,抑制肝素酶的表达,达到基因治疗的目的;(2)寻找能致肝素酶降解或失活的物质,从而保护 HSPG^[19]。最近,由于重组肝素酶和高通量筛选法,一些抑制因子已经被发展起来,包括 PI-88、肝素、肽类、硫酸昆布多糖、RNA 干扰(RNAi)和苏拉明等。

4.2.1 糖抑制剂 PI-88 PI-88 是磺化的甘露聚糖混合物,是从酵母菌发酵而来,主要成分为甘露五糖和四糖,由 5 个不同片段组成,是一种肝素酶抑制物。作为

一种单一疗法或与其他标准化疗合用治疗非小细胞肺癌、前列腺癌、肝细胞癌的肝素酶抑制物,PI-88 已经在志愿者中完成了 I 期临床实验,在澳大利亚已经进入 II 期临床实验。PI-88 抑制了肝素酶的活性,干扰了硫酸肝素依赖的生长因子的结合,从而抑制了肿瘤细胞的转移。以上研究表明,PI-88 有可能成为第 1 个应用于临床抗肿瘤治疗的肝素酶抑制剂^[19]。

4.2.2 肝素 肝素,尤其是低分子量肝素(low molecular weight heparin, LMWH),被认为能增加晚期肿瘤患者的生存率。通过抑制血液凝固,抑制细胞和血小板、细胞和内皮细胞的黏附,肝素能干扰原发肿瘤细胞的转移。肝素在临床上具有很高的潜力,但在合并出血的肿瘤患者中,肝素的应用应该排除。肝素还能促进细胞外基质中贮存的生长因子(如 bFGF 等)释放,从而引起一系列的负性效应,故应慎用。在肝素的一系列衍生物中,只有 N-已烷化肝素和 N-乙酰化肝素具有较弱的 bFGF 释放作用,且这些衍生物具有各不相同的抗凝活性^[16]。因此,寻找较少不良反应又能抑制肝素酶活性的肝素衍生物仍需继续努力。

4.2.3 肽类 Levy-Adam 等^[20]研究发现肝素酶的 3 个肝素依赖的区域中,1 个区域结合在 50 000 的 N-terminus 上。结合在此区域的(Lys 158-Asn 171)的 1 个短肽在剂量敏感的人群中能抑制肝素酶的活性。重要的是,特异结合到此部位的中和抗体能抑制肝素酶的活性。

4.2.4 硫酸昆布多糖(LS) 是一种含硫酸基的多糖,在体外实验中可以有效抑制肝素酶对 HSPG 的降解,0.2~1 mg/L 即可抑制肝素酶 50% 的活性。给小鼠皮下注射 LS 后再静脉注入黑色素瘤细胞或乳腺癌细胞,发现对肺扩散转移的抑制率达 80%~90%^[21]。

4.2.5 RNAi 通过 RNA 干扰技术(RNAi)在转录后水平阻断肝素酶基因的表达,从而抑制肿瘤细胞的浸润和转移,为临床预防肿瘤的浸润和转移奠定了理论基础,并为治疗肿瘤带来了希望^[22]。Zhang 等^[23]将直接作用于肝素酶 mRNA 的 siRNA 重组到质粒载体中,再转染到人乳腺癌(MDA-MB-435)细胞株中。结果发现,在体外,被转染的细胞株肝素酶表达水平下降,侵袭力和黏附力显著降低;在体内,表现为血管分布减少,转移能力下降。因此,我们需要进一步研究肝素酶加工激活的具体过程、其表达和活性的调控因子,以及其在整个细胞外基质降解酶系统中的平衡机制,从而研制出一种有效的抑制剂,希望能从其身上找到攻克肿瘤的突破点。

4.2.6 苏拉明 苏拉明(suramin)是一种多磺酸萘脲(polysulfonated naphthylurea),具有抗逆转录酶和抗增殖活性,可以抑制各种生长因子与其细胞表面受体结

合,通过非竞争性抑制作用抑制肝素酶活性($IC_{50} = 8 \text{ mg/L}$)。在苏拉明治疗的癌症患者中,发现血循环中的黏多糖水平升高,提示它可以抑制黏多糖代谢。在过去的 10 年里,临床上对苏拉明的疗效进行了广泛的评估,由于其毒性大,以及对其他酶的抑制作用,使之在临床上的应用受到了限制^[24]。

5 结 语

在人类的原发性肿瘤中肝素酶的表达是失控的,并且过度表达的肝素酶与肿瘤转移和血管生成有很大的关系,因此肝素酶能作为评价肿瘤患者临床预后的一个指标。基于肝素酶在肿瘤侵袭和转移中的作用,针对肝素酶靶位的肿瘤治疗有可能成为中晚期肿瘤治疗的一种手段,但目前仍有许多问题尚待进一步的解决,如检测肝素酶活性可预测肿瘤转移潜能判断肿瘤恶性程度,但目前肝素酶活性检测方法繁琐,应用于临床有尚待进一步努力。在肿瘤的治疗中,肝素酶已经成为研究癌症药物治疗的靶向目标(drug target)。希望在不久的将来,人类能通过肝素酶开发出治疗肿瘤的新方法。

[参 考 文 献]

- [1] Ben-Zaken O, Shafat I, Gingis-Velitski S, *et al.* Low and high affinity receptors mediate cellular uptake of heparanase [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(3): 530-542.
- [2] Götte M, Yip GW. Heparanase, hyaluronan, and CD44 in cancers: a breast carcinoma perspective [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(21): 10233-10237.
- [3] Simizu S, Suzuki T, Muroi M, *et al.* Involvement of disulfide bond formation in the activation of heparanase [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7841-7849.
- [4] Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(12): 2018-2039.
- [5] Gingis-Velitski S, Zetser A, Kaplan V, *et al.* Heparanase uptake is mediated by cell membrane heparan sulfate proteoglycans [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(42): 44084-44092.
- [6] Chen G, Wang D, Vikramadithyan R, *et al.* Inflammatory cytokines and fatty acids regulate endothelial cell heparanase expression [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(17): 4971-4977.
- [7] Xu X, Ding J, Rao G, *et al.* Estradiol induces heparanase-1 expression and heparan sulphate proteoglycan degradation in human endometrium [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(4): 927-937.
- [8] Sommerfeldt N, Beckhove P, Ge Y, *et al.* Heparanase: a new metastasis-associated antigen recognized in breast cancer patients by spontaneously induced memory T lymphocytes [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7716-7723.
- [9] Ogishima T, Shiina H, Breault JE, *et al.* Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1028-1036.
- [10] Nagler R, Ben-Izhak O, Cohen-Kaplan V *et al.* Heparanase up-regulation in tongue cancer: tissue and saliva analysis [J]. *Cancer*, 2007, 110(12): 2732-2739.
- [11] Marchetti D, Li J, Shen R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4767-4770.
- [12] Cohen I, Pappo O, Elkin M, *et al.* Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors [J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(7): 1609-1617.
- [13] Kelly T, Miao HQ, Yang Y, *et al.* High heparanase activity in multiple myeloma is associated with elevated microvessel density [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(24): 8749-8756.
- [14] Reiland J, Sanderson RD, Waguespack M, *et al.* Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate: functional implications for tumor cell invasion [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 8047-8055.
- [15] Ma P, Beck SL, Raab RW, *et al.* Heparanase deglycanation of syndecan-1 is required for binding of the epithelial-restricted prosecretory mitogen lacritin [J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(7): 1097-1106.
- [16] Sanderson RD, Yang Y, Suva LJ, *et al.* Heparan sulfate proteoglycans and heparanase--partners in osteolytic tumor growth and metastasis [J]. *Matrix Biol*, 2004, 23(6): 341-352.
- [17] Yang Y, Yaccoby S, Liu W, *et al.* Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo [J]. *Blood*, 2002, 100(2): 610-617.
- [18] Shinyo Y, Kodama J, Hongo A, *et al.* Heparanase expression is an independent prognostic factor in patients with invasive cervical cancer [J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(10): 1505-1510.
- [19] Fairweather JK, Hammond E, Johnstone KD, *et al.* Synthesis and heparanase inhibitory activity of sulfated mannoooligosaccharides related to the antiangiogenic agent PI-88 [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(2): 699-709.
- [20] Levy-Adam F, Abboud-Jarrous G, Guerrini M, *et al.* Identification and characterization of heparin/heparan sulfate binding domains of the endoglycosidase heparanase [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(21): 20457-20466.
- [21] Miao HQ, Elkin M, Aingorn E, *et al.* Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides [J]. *Int J Cancer*, 1999, 83(3): 424-431.
- [22] Pai SI, Lin YY, Macaes B, *et al.* Prospects of RNA interference therapy for cancer [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(6): 464-477.
- [23] Zhang ZH, Chen Y, Zhao HJ, *et al.* Silencing of heparanase by siRNA inhibits tumor metastasis and angiogenesis of human breast cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(4): 587-595.
- [24] Marchetti D, Reiland J, Erwin B, *et al.* Inhibition of heparanase activity and heparanase-induced angiogenesis by suramin analogues [J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(2): 167-174.

[收稿日期] 2008-12-28

[修回日期] 2009-03-25

[本文编辑] 王莹