

糖胺聚糖结合细胞因子与肿瘤

熊珺焯, 康晓燕, 殷正丰*

第二军医大学东方肝胆外科医院分子肿瘤实验室, 上海 200438

[摘要] 糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)是一类含有糖醛酸和氨基糖残基的重要生物大分子。在细胞表面和细胞外基质中存在着一些高亲和力的 GAG 结合细胞因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、中期因子(midkine, MK)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、肝素酶(heparanase, HPA)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)。它们除了具有多种生物学作用外,还与肿瘤发生、发展有着密切联系。GAG 结合细胞因子在肿瘤分子诊断、靶向治疗方面的研究和应用已越来越受关注。

[关键词] 糖胺聚糖;细胞因子类;肿瘤

[中图分类号] R 73 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)08-0898-04

Glycosaminoglycans-binding cytokines and tumor

XIONG Jun-ye, KANG Xiao-yan, YIN Zheng-feng*

Molecular Oncology Laboratory, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] Glycosaminoglycans (GAGs) are a group of important large biological molecules containing a hexosamine and an uronic acid component. Glycosaminoglycans-binding cytokines, such as vascular endothelial growth factor, midkine, osteopontin, heparanase, and basic fibroblast growth factor, can be found on cell surface and extracellular matrix. In addition to various biological functions, GAGs-binding cytokines are also closely related to tumor development and progression. GAGs-binding cytokines are gaining increasing attention in molecular diagnosis and targeted therapy of tumors.

[Key words] glycosaminoglycan; cytokines; neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(8):898-901]

糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)是一类含有糖醛酸和氨基糖残基的重要生物大分子,包括肝素、硫酸乙酰肝素、硫酸软骨素、透明质酸和硫酸角质素等。在细胞表面和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中,存在着一些对葡胺聚糖肝素和硫酸乙酰肝素等 GAG 具有高度亲和力的多肽,总称为 GAG 结合细胞因子(glycosaminoglycan-binding cytokines)^[1]。多数 GAG 结合细胞因子的生物学活性与肿瘤发生、发展有着密切联系,可以促进肿瘤细胞生长、黏附、侵袭、炎症反应和血管生成,直接参与肿瘤生长和转移过程^[2]。在各种类型肿瘤患者血清中,这些因子的浓度比正常人明显增高,并且与转移发生和不良预后有关^[2]。因此,GAG 结合细胞因子在肿瘤分子诊断、靶向治疗方面的研究和应用一直受到关注,本文将就 GAG 结合细胞因子与肿瘤关系方面的研究进行综述。

1 GAG 结合细胞因子的种类

目前已知相当一部分细胞因子都具有结合 GAG 的活性,GAG 参与这些细胞因子的信号传递、稳定和储存,其中研究得较多的细胞因子包括成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)家族、白介素 8(interleukin-8, IL-8)、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、VEGF-C、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、中期因子(midkine, MK)和多效因子(pleiotrophin, PTN)等。这些 GAG 结合细胞因子由肿瘤细胞和肿瘤微环境中的宿主细胞产生,在肿瘤发病机制中具有重要作用^[2]。

[收稿日期] 2011-02-14 **[接受日期]** 2011-03-17

[基金项目] 国家科技重大专项课题(2008ZX10002-021)。Supported by the National Major Science and Technology Project (2008ZX10002-021)。

[作者简介] 熊珺焯, 硕士生。E-mail: lain123@126.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81875351, E-mail: yinzfk@yahoo.com.cn

2 GAG 结合细胞因子与 GAG 的相互作用

研究表明,多数 GAG 结合细胞因子与细胞表面受体结合后激活下游信号分子,进而发挥其生物学活性^[3-7]。例如 FGFs、VEGF、MK、HGF、表皮生长因子(EGF)等细胞因子受体是与细胞质膜相连的糖蛋白,胞外结构域具有配体结合位点,胞内结构域具有酪氨酸蛋白激酶活性部位^[3]。骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是一种细胞黏附蛋白,通过依赖 RGD 序列($\alpha_{v\beta 1}$ 、 $\alpha_{v\beta 3}$ 、 $\alpha_{v\beta 5}$ 、 $\alpha_{v\beta 1}$ 、 $\alpha_{\beta 1}$)和非依赖 RGD 序列($\alpha_{4\beta 1}$ 、 $\alpha_{9\beta 1}$)与细胞表面的多种整合素受体结合而发挥细胞黏附作用^[4]。

肝素与相应细胞因子的高亲和力依赖于 2-O 硫酸基团(2-O-sulfate)、6-O 硫酸基团(6-O-sulfate)及 N-硫酸基团(N-sulfate)^[8]。以 FGFs 家族为例,肝素与 FGF 及其受体(FGFR)特异性结合,形成三元复合物^[9]。当配体与受体结合时,受体构象改变形成二聚体,随之发生自磷酸化并激活自身的酪氨酸蛋白激酶活性,由此引发下游级联放大反应。除离子间作用外,肝素/硫酸乙酰肝素与蛋白质之间适宜的范德华作用也对两者特异性的相互作用有重要影响^[10]。对 FGF-FGFR 复合物的晶体结构的研究显示,FGF 连接 2 个 FGFR 时形成一荷阳性电荷沟道,被认为是肝素结合部位^[11]。

3 GAG 结合细胞因子的生物学活性

3.1 GAG 结合细胞因子促进有丝分裂 多种 GAG 结合生长因子具有促有丝分裂活性,包括 FGFs 家族、VEGFs 家族、EGF、MK 等。bFGF、VEGF 与细胞膜上相应的受体结合后,能促进内皮细胞分裂增殖,刺激血管生成^[12]。EGF 能够刺激上皮型和间质型起源细胞生长增殖,是胚胎发育的诱导分子,促进 G₁ 期细胞进入 S 期^[13]。以一定浓度 MK 处理 P19 胚胎癌细胞株,可诱导神经元分化^[14]。Muramaki 等^[15]发现表达 MK 的膀胱癌细胞系 UM-UC-3(自身不表达 MK)明显促进人肌静脉内皮细胞增殖;将细胞注射裸鼠体内,与对照组比较,移植瘤生长加快,腹膜后和腹腔内淋巴结转移比例增加,肿瘤组织的微血管密度增加;局部注射血管生成抑制剂 TNP-470 后移植瘤生长率明显下降,微血管密度下降。

3.2 GAG 结合细胞因子诱导炎症反应 在炎症发生发展过程中,GAG 结合细胞因子起了关键作用。如 OPN 主要通过 β_1 和 β_3 整合素受体以及部分白细胞表面的 CD44 受体对白细胞的黏附和迁移发挥调节作用。OPN 经凝血酶酶切后,其 N-端片段能够与巨噬细胞表面的 CD44 受体结合,对巨噬细胞具有趋化功能;而其 C-端片段则可与细胞表面的整合素受体 $\alpha_{v\beta 1}$ 相互作用,介导巨噬细胞黏附和迁移^[16]。OPN 与 T 细胞表面整合素受体以及 CD44 受体的相互作用能够促进 Th1 的产生而抑制向 Th2 的分化,从而加强机体的细胞免疫功能,抑制体液免疫反应的发生^[17]。在心肌细胞、血管内皮细胞和巨噬细胞等细胞中,OPN 能够通过下调诱导型一氧化氮合酶(inducible NOS, iNOS)的表达抑制炎症反应的发生^[18]。最近的研究发现,OPN 的胞内形式(intracellular OPN,

i-OPN)对 TLR-9、TLR-7 依赖型 IFN- α 的调节起了关键和核心作用^[19]。

3.3 GAG 结合细胞因子与细胞凋亡 GAG 结合因子具有抑制细胞凋亡的活性。Street 等^[20]发现将 VEGF 加入原代人成骨细胞(primary human osteoblasts, PHOB)的培养液中,10 ng/ml VEGF 对 PHOB 自发性凋亡和病理性凋亡的抑制率分别为 83.6%和 71%。在药理学上,VEGF 可转化为一个凋亡因子,与 TGF- β_1 协同诱导内皮细胞凋亡^[21]。OPN 的 RGD 域通过激活 NF- κ B 通路以及诱导黏附斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)磷酸化抑制细胞凋亡^[4]。Sumida 等^[22]证实 MK 过量表达能够阻止大鼠左心室重塑以及改善左心室功能障碍,这同样是基于 MK 的抗细胞凋亡活性。

4 GAG 结合细胞因子与肿瘤的关系

4.1 GAG 结合细胞因子与血管生成 VEGF 是已知最重要的血管生长因子,是针对内皮细胞特异性最高、促血管生成最强的丝裂原之一,其能够特异性地诱导内皮细胞分裂增殖;增加血管通透性,促进血浆蛋白渗出形成新的基质;诱导内皮细胞产合成大量的纤溶酶原激活物和胶原酶,降解血管基底膜^[23]。Gerhardt^[24]证实 VEGF 能够刺激内皮细胞出芽和增殖,形成新的血管结构。肿瘤源性 VEGF 能够如内分泌激素一样通过刺激宿主远处器官髓外生血^[25]。这些均提示 VEGF 在血管生成中的重要地位。bFGF 是很强的血管生成刺激因子,并可上调 VEGF 的表达,故 bFGF 与 VEGF 可协同诱导肝癌血管生成^[26]。有研究表明,肝素酶(heparanase, HPA)也能与 VEGF 协同诱导肿瘤血管形成,其可能的机制是 HPA 与血管生长因子具有极强的亲和力。HPA 在降解硫酸乙酰肝素的同时释放出 bFGF 和 VEGF,直接作用于内皮细胞,促进细胞分裂和趋化,以出芽方式促进肿瘤新生血管的生成^[27]。MK 曾被报道对内皮细胞的血管生成有促进作用,但近期有研究发现 MK 对内皮细胞中 VEGF-A 诱导的体内及体外的促血管生成活性起着负调控作用^[28]。因此 MK 阻断剂能否作为抑制肿瘤血管生成的潜在治疗方法仍不能确定。

4.2 GAG 结合细胞因子与肿瘤侵袭、转移 在原发瘤生长早期,肿瘤细胞生长所需的养料是通过邻近组织器官微环境渗透提供。当肿瘤直径达到或超过 1 mm 时,微环境提供的营养已不能维持其继续生长,肿瘤细胞释放细胞因子,介导血管生成。许多临床和实验研究证实,肿瘤转移依赖于肿瘤血管生成。结直肠癌伴肝转移者 VEGF 的表达明显高于不伴肝转移者,VEGF 高表达与微血管密度、淋巴结转移及预后不良相关^[29]。Zhao 等^[30]对 105 例胃癌样本用原位杂交和免疫组化方法检测 bFGF mRNA 表达,结果显示 bFGF 高表达与肿瘤浸润程度、生长形式、血管侵入及淋巴结转移相关,且有血管侵入和淋巴转移的样本肿瘤微血管密度比无血管侵入和淋巴转移的样本高。HGF 是一种很强的刺激肝细胞增殖的丝裂原,不仅能刺激肝细胞再生,促进肝功能恢复,而且可改善肝纤维化,在损伤因子刺激时保护肝细胞^[31]。

C-met为 HGF 的受体,两者与恶性肿瘤的发生、发展、侵袭、转移和患者预后有着密切关系^[32]。OPN 不仅可诱导炎症反应,而且具有细胞黏着功能,是肿瘤发生、发展以及转移过程中的一个重要效应分子,比如能够促进乳腺癌骨转移^[33]。HPA 是一种内切糖苷酶,能够催化硫酸乙酰肝素侧链的 N-硫酸葡萄糖胺末端硫酸酯,切断细胞表面和 ECM 中硫酸乙酰肝素蛋白聚糖上的侧链,使其分解,导致 ECM 和基底膜稳定结构破坏。近年来许多研究小组发现 HPA 可促进肿瘤细胞扩散与转移^[34-36]。通过载体将 HPA cDNA 分别导入无转移潜能的小鼠淋巴瘤细胞系和低转移潜能的黑素瘤细胞系,结果转染细胞均有高水平 HPA 表达,并获得高转移潜能^[37]。

4.3 GAG 结合细胞因子作为肿瘤诊断和治疗的靶分子 血清 GAG 结合细胞因子水平不仅可作为肿瘤患者的预后指标,也可用于肿瘤早期筛查、良恶性疾病鉴别、不同类型恶性肿瘤的诊断以及治疗反应的预测、临床过程的监控。血清 VEGF 水平也是潜在的代表肿瘤患者的血管生成活性和肿瘤进展的可靠标志物,有助于预测和监测疗效和复发。目前的研究也显示 VEGF 抗体可作为肿瘤治疗的潜在靶向药物^[38-40]。基于 OPN 在 HCC 转移中的重要作用,以及 OPN 的过量表达与 HCC 原发瘤的转移潜能以及体外侵袭能力有关,OPN 抗体可有效抑制高转移潜能 HCC 细胞的体外侵袭和体内转移能力。OPN 既可作为 HCC 转移潜能的分子预测标记,又可作为 HCC 转移防治的潜在靶点^[41-42]。HPA 异常高表达是造成肿瘤转移的关键因素,有效抑制 HPA 表达及降低其活性可以保护 ECM 和基底膜(basilar membrane, BM)免遭破坏,抑制新血管生成,防止肿瘤细胞突破屏障迁徙到正常组织和器官^[36]。近年来 HPA 抑制剂的研究已取得突破性进展,其中有一种模拟硫酸肝素多离子化合物活性,能够竞争性地与 HPA 结合,从而降低 HPA 对底物 HS 的酶解,发挥抗肿瘤转移作用^[43]。

5 小结

目前能够帮助做出明确诊断的肿瘤分子标志物依然很少,GAG 结合因子作为肿瘤标志物已越来越受关注,为发现新的分子诊断标志物提供了可能。但是,GAG 结合因子是否能够像常规肿瘤标志物一样作为肿瘤监测、恶性程度分析、疗效监测等的指标仍需进一步研究。而且大部分 GAG 结合因子在血清中含量极低,检测烦琐,临床应用之前需要在方法上进行改进和革新。相信随着研究的不断深入,这些问题会得到解决,GAG 结合细胞因子也将在肿瘤治疗方面发挥更重要的作用。

[参考文献]

[1] Muramatsu T, Muramatsu H, Kojima T. Identification of proteoglycan-binding proteins[J]. *Methods Enzymol*, 2006, 416: 263-278.

[2] Muramatsu T, Muramatsu H. Glycosaminoglycan-binding cyto-

kines as tumor markers[J]. *Proteomics*, 2008, 8: 3350-3359.

[3] Rubin J S, Day R M, Breckenridge D, Atabey N, Taylor W G, Stahl S J, et al. Dissociation of heparan sulfate and receptor binding domains of hepatocyte growth factor reveals that heparan sulfate-c-met interaction facilitates signaling [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 32977-32983.

[4] Courter D, Cao H, Kwok S, Kong C, Banh A, Kuo P, et al. The RGD domain of human osteopontin promotes tumor growth and metastasis through activation of survival pathways[J]. *PLoS One*, 2010, 5: e9633.

[5] You W K, McDonald D M. The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis [J]. *BMB Rep*, 2008, 41: 833-839.

[6] Myles T, Leung L L. Thrombin hydrolysis of human osteopontin is dependent on thrombin anion-binding exosites[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 17789-17796.

[7] Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases[J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2010, 86: 410-425.

[8] Shipp E L, Hsieh-Wilson L C. Profiling the sulfation specificities of glycosaminoglycan interactions with growth factors and chemotactic proteins using microarrays [J]. *Chem Biol*, 2007, 14: 195-208.

[9] Wiedlocha A, Sørensen V. Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, 286: 45-79.

[10] Raman R, Venkataraman G, Ernst S, Sasisekharan V, Sasisekharan R. Structural specificity of heparin binding in the fibroblast growth factor family of proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2357-2362.

[11] Stauber D J, DiGabriele A D, Hendrickson W A. Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 49-54.

[12] Nomi M, Miyake H, Sugita Y, Fujisawa M, Soker S. Role of growth factors and endothelial cells in therapeutic angiogenesis and tissue engineering[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2006, 1: 333-343.

[13] Walker F, Zhang H H, Burgess A W. Identification of a novel EGF-sensitive cell cycle checkpoint [J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313: 511-526.

[14] Griffith M. Midkine and secondary neurulation[J]. *Teratology*, 1997, 55: 213-223.

[15] Muramaki M, Miyake H, Hara I, Kamidono S. Introduction of midkine gene into human bladder cancer cells enhances their malignant phenotype but increases their sensitivity to antiangiogenic therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 5152-5160.

[16] Chabas D. [Osteopontin, a multi-faceted molecule][J]. *Med Sci (Paris)*, 2005, 21: 832-838.

[17] Wang K X, Denhardt D T. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19(5-6): 333-345.

[18] Lund S A, Giachelli C M, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes [J]. *J Cell Commun Signal*, 2009, 3(3-4): 311-322.

- [19] Morimoto J, Kon S, Matsui Y, Uede T. Osteopontin; as a target molecule for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Curr Drug Targets*, 2010, 11:494-505.
- [20] Street J, Lenehan B. Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival-evidence for an autocrine feedback mechanism[J]. *J Orthop Surg Res*, 2009, 4:19.
- [21] Ferrari G, Pintucci G, Seghezzi G, Hyman K, Galloway A C, Mignatti P. VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF-beta1 to induce endothelial cell apoptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:17260-17265.
- [22] Sumida A, Horiba M, Ishiguro H, Takenaka H, Ueda N, Ooboshi H, et al. Midkine gene transfer after myocardial infarction in rats prevents remodelling and ameliorates cardiac dysfunction [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86:113-121.
- [23] Toomey D P, Murphy J F, Conlon K C. COX-2, VEGF and tumour angiogenesis[J]. *Surgeon*, 2009, 7:174-180.
- [24] Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting [J]. *Organogenesis*, 2008, 4:241-246.
- [25] Xue Y, Chen F, Zhang D, Lim S, Cao Y. Tumor-derived VEGF modulates hematopoiesis[J]. *J Angiogenes Res*, 2009, 1:9.
- [26] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin D J, et al. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2002, 35:834-842.
- [27] Bernfield M, Götte M, Park P W, Reizes O, Fitzgerald M L, Lincecum J, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans[J]. *Anna Rev Biochem*, 1999, 68:729-777.
- [28] van der Horst E H, Frank B T, Chinn L, Coxon A, Li S, Polesso F, et al. The growth factor Midkine antagonizes VEGF signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. *Neoplasia*, 2008, 10:340-347.
- [29] Okita N T, Yamada Y, Takahari D, Hirashima Y, Matsubara J, Kato K, et al. Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2009, 39:595-600.
- [30] Zhao Z S, Zhou J L, Yao G Y, Ru G Q, Ma J, Ruan J. Correlative studies on bFGF mRNA and MMP-9 mRNA expressions with microvascular density, progression, and prognosis of gastric carcinomas[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 3227-3233.
- [31] Marín-Serrano E, Rodríguez-Ramos C, Díaz-García F, Martín-Herrera L, Fernández-Gutiérrez-Del-Alamo C, Girón-González J A. Hepatocyte growth factor and chronic hepatitis C[J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2010, 102:365-371.
- [32] Eder J P, Vande Woude G F, Boerner S A, LoRusso P M. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15:2207-2214.
- [33] Shevde L A, Das S, Clark D W, Samant R S. Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis[J]. *Curr Mol Med*, 2010, 10:71-81.
- [34] Davidson B, Shafat I, Risberg B, Ilan N, Tropé C G, Vlodavsky I, et al. Heparanase expression correlates with poor survival in metastatic ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 104: 311-319.
- [35] Zheng L D, Tong Q S, Tang S T, Du Z Y, Liu Y, Jiang G S, et al. Expression and clinical significance of heparanase in neuroblastoma[J]. *World J Pediatr*, 2009, 5:206-210.
- [36] Jingting C, Yangde Z, Yi Z, Huining L, Rong Y, Yu Z. Heparanase expression correlates with metastatic capability in human choriocarcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 107:22-29.
- [37] 朱忠政, 殷正丰, 吴孟超. 肝素酶与肿瘤转移[J]. *中华病理学杂志*, 2000, 29:300-302.
- [38] Sullivan L A, Brekken R A. The VEGF family in cancer and antibody-based strategies for their inhibition[J]. *MAbs*, 2010, 2: 165-175.
- [39] Cao D, Hou M, Guan Y S, Jiang M, Yang Y, Gou H F. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer; association with clinical outcomes and prognostic implications [J]. *BMC Cancer*, 2009, 9:432.
- [40] Aragon-Ching J B, Madan R A, Dahut W L. Angiogenesis inhibition in prostate cancer: current uses and future promises [J]. *Oncology*, 2010, 2010:361836.
- [41] Ye Q H, Qin L X, Forgues M, He P, Kim J W, Peng A C, et al. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning[J]. *Nat Med*, 2003, 9:416-423.
- [42] Yang G H, Fan J, Xu Y, Qiu S J, Yang X R, Shi G M, et al. Osteopontin combined with CD44, a novel prognostic biomarker for patients with hepatocellular carcinoma undergoing curative resection[J]. *Oncologist*, 2008, 13:1155-1165.
- [43] Ferro V, Dredge K, Liu L, Hammond E, Bytheway I, Li C, et al. PI-88 and novel heparan sulfate mimetics inhibit angiogenesis [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33:557-568.

[本文编辑] 商素芳