

- [9] Chamoux, M. et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**:833-839.
- [10] Moroianu, J. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**:3815-3819.
- [11] Gho, Y S. et al., 1997, *Cancer Res.*, **57**:3733-3740.
- [12] Hu, G F. et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**:1217-1221.
- [13] Hu, G F. et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**:2204-2209.
- [14] Folkman, J. 1971, *N. Engl. J. Med.*, **285**:1182-1188.
- [15] Shimoyama, S. et al., 1996, *Cancer Res.*, **56**:2703-2706.
- [16] Chopra, V. et al., 1997, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **123**:167-172.
- [17] Fett, J W. et al., 1994, *Biochemistry*, **33**:5421-5427.
- [18] Olson, K A. et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**:442-446.
- [19] Gho, Y S. et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:24294-24299.
- [20] Rybak, S M. et al., 1987, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**:1240-1248.
- [21] Moenner, M. et al., 1994, *Eur. J. Biochem.*, **226**:483-490.
- [22] Ozaki, H. et al., 1996, *Ophthalmic Res.*, **28**:356-360.
- [23] Burgmann, H. et al., 1996, *J. Clin. Pathol.*, **49**:508-510.
- [24] King, T V. et al., 1991, *Br. J. Bone Jt. Surg.*, **73**:587-590.
- [25] Klagsbrun, M. et al., 1991, *Annu. Rev. Physiol.*, **53**:217-239.
- [26] Soncin, F. et al., 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**:604-610.

金属蛋白酶及其抑制因子与肝癌侵袭及转移

孙祖越 李慧芳* 谢弘

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

(*上海大学生命科学学院生物工程系 上海 201800)

金属蛋白酶(metalloproteinases, MMPs)是一组先由细胞分泌,嗣后又在细胞外获得活性的锌离子依赖性酶,它们彼此间具有同源性,但其底物不同。它们维系着细胞外基质(ECM)的平衡^[1],在肝癌细胞的侵袭和转移的过程中,起着一定的作用;还作为一种内源性的细胞表面蛋白酶(shedding proteinase),移转某些细胞因子及细胞因子受体的功能,金属蛋白酶抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)则是金属蛋白酶的拮抗剂,属糖蛋白,对肝癌的转移有抑制作用,它们不间断地接受某些因子如白介素-6的调节。

一、MMPs 成员及其作用

MMPs 主要是溶解组织的 ECM,有利于肿瘤细胞的侵袭和转移。迄今为止,所知道的 MMPs 有:间质胶原酶(interstitial colla-

nase, MMP-1)、72kD IV型胶原酶(72-kD collagenase IV, MMP-2)、基质溶解素-1(stromelysin-1, MMP-3)、软骨酸性金属蛋白酶(cartilage acid metalloproteinase, MMP-6)^[2]、小金属蛋白酶(matrilysin, MMP-7)、多形核中性核白细胞胶原酶(polymorphonuclear neutrophilic leukocytes metalloproteinase, MMP-8)^[3]、92kD IV型胶原酶(92kDa type IV collagenase=gelatinase B, MMP-9)、基质溶解素-2(stromelysin 2, MMP-10)^[4]、基质溶解素-3(stromelysin 3, MMP-11)、巨嗜细胞金属蛋白酶(macrophage metalloelastase, MMP-12)、人 III型胶原酶(human collagenase 3, MMP-13)、膜 I型基质金属蛋白酶(membrane type-1 matrix metalloproteinase, MMP-14)^[5]、膜 IV型基质金属蛋白酶(membrane type-4 matrix metalloproteinase, MMP-17)和多肽基质金属蛋白酶(polypeptide matrix metalloproteinase,

MMP-19)^[6]。但是,研究得比较清楚的还是 MMP-1、MMP-2 和 MMP-3。

MMPs 大多以非活性形式由细胞分泌,嗣后经水解后获得酶活性,它们的氨基酸序列具

有同源性,不同的金属蛋白酶能水解不同类型的底物,如:胶原蛋白、层粘连蛋白、纤维粘连蛋白、弹力蛋白和蛋白多糖的核心蛋白等^[7],见表 1。

表 1 MMPs 的底物选择性

金属蛋白酶类型	胶原蛋白类型								明胶	FN	LN	弹力蛋白	核心蛋白
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII					
MMP-1	+	+	+			+		+					
MMP-2				+	+	+		+	+				
MMP-3	+			+	+			+	+	+	+		+
MMP-7									+	+			
MMP-9				+	+	+		+	+	+			
MMP-10				+				+	+	+			+

注: FN,层粘连蛋白;LN,纤维粘连蛋白。

MMP-1 是一种最早在 Ito 细胞分泌物中发现的间质性胶原酶,其酶原系由细胞合成并以 52kD 和 55kD 两种分子量形式分泌出来,以前者为多,后者为前者的糖基化产物。MMP-2 与 MMP-1 相似,不同的是其非糖基化形式的酶原分子量为 67kD,而和糖基化形式的为 90kD。MMP-3 的酶原发现于 Ito 细胞、枯否细胞和窦内细胞,其非糖基化形式和糖基化形式的分子量分别为 60kD 和 57kD,可被蛋白酶或有机汞激活^[8]。

二、TIMPs 性质及其作用

TIMPs 是一类由细胞分泌的糖蛋白性质的酶,由于能有效地抑制 MMPs 对 ECM 作用而得名。目前已发现至少有 4 种,它们是 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 和 TIMP-4。

TIMP-1 是一种最先在兔骨中后来又在体外间叶细胞中发现的由多种细胞分泌的糖蛋白,含有 184 个氨基酸和 6 个二硫键,分子量为 28.5kD。有人发现,编码 TIMP-1 的基因可以与编码金属蛋白酶(如间质胶原酶、基质溶解素和 92kDaIV 型胶原酶等)酶原的基因形成基

因,该组合基因已经测序,克隆、并定位(X 染色体 p11 区,在人是 Xp11.23-Xp11.4)^[9]。因此,正常情况下,TIMP-1 在体内与 MMPs 保持一种平稳状态,一旦失衡,机体就有可能出现关节炎、动脉粥样硬化及肿瘤细胞转移。

1990 年,有人分别从人 A2058 黑色素瘤细胞及牛主动脉上皮细胞中分离、纯化出 TIMP-2,并克隆了其编码基因^[10]。该蛋白由 194 个氨基酸残基和 6 个二硫键组成,其 37% 的序列完全与 TIMP-1 相同,65.6% 与 TIMP-1 同源,其中包括 12 个半胱氨酸残基。TIMP-2 能选择性地以 1:1 的共价键形式与能溶解胶原和明胶 72kDa IV 型胶原酶形成复合物。但与 TIMP-1 不同的是,TIMP-2 不但能结合活性的 72kDaIV 型胶原酶,还能结合非活性状态的 72kDaIV 型胶原酶原;此外,TIMP-2 可以终止金属蛋白酶家族的所有成员的水解活性。进一步发现,TIMP-2 与无活性或激活形式的 72kDaIV 型胶原酶形成的复合物时,如果局部的 IV 型胶原酶分子数量大大超过 TIMP,即使复合物不解离,也有可能重现活性从而使 IV 型胶原降解,但此时如将该复合物再结合上一个 TIMP-2 分子,则可导致酶活性的完全抑制。

还有人证明 TIMP-2 的 C-末端不参与 TIMP-2 抑制 MMPs 活性的功能。

1991年,从鸡胚纤维母细胞中分离出一个分子量为 21kDa 的 TIMP,命名为 ChIMP-3,有人认为也就是 TIMP-3,其氨基酸序列与 TIMP-1 和 TIMP-2 的同源性分别为 28%和 42%^[11],有人证明人的 TIMP-3 的基因与 ChIMP-3、TIMP-1 和 TIMP-2 间的同源性分别为 89%、39%和 46%。但与 TIMP-1 和 TIMP-2 不同的是,人的 TIMP-3 只存在于“不溶性”的 ECM 中。它可以阻碍转化细胞的增殖及转化表型的表达。又有人从鼠纤维母细胞分离出一种新的由 212 个氨基酸组成的 TIMP-3,命名为 mTIMP-3,其基因定位于 10 号染色体,与 ChIMP-3 有 80%的同源性。Sun 等将 mTIMP-3 的基因转入小鼠 JB6 肿瘤细胞中,发现它不但在该细胞中高表达,而且该转基因细胞在体外侵袭实验中穿透基质膜的能力大大下降,接种裸鼠后未发现转移^[12]。

TIMP-4 是在 1996 年首先由 Greene 等克隆出来的,其与 TIMP-1、TIMP-2 和 TIMP-3 同源性分别是 38%、48%和 45%^[13]。其重组 TIMP-4 对 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7 和 MMP-9 的半数细胞抑制指数(IC₅₀)分别为 19、3、45、8 和 83nmol/L,是一种较强的 MMP 抑制剂,也是 ECM 重要的稳定剂^[14]。有人发现 TIMP-4 和 TIMP-2 能以同样的方式结合于明胶酶原上的一种血红素蛋白类似结构的 COOH-末端,该结合十分牢固,以致于用 1mol/L NaCl 或 10%的硫酸二甲酯都无法分离,然而 TIMP-1 就没有这样的结合方式^[15]。还有人将 TIMP-4 的全长 cDNA 转入 MDA-MB-435 人乳腺癌细胞,发现该转基因细胞能表达 TIMP-4 mRNA,并具备抗 MMP 活性,接种于裸鼠后淋巴转移灶体积小于对照组的 4—10 倍。

三、MMPs 及 TIMPs 和肝癌的关系

1. MMPs 促进肝癌浸润和转移

早先, Masure 在研究人成纤维细胞,黑色素瘤细胞, MG-63 骨肉瘤细胞和肝癌细胞的实验过程中,发现肝癌细胞能分泌相当数量的分子量为 85kD 的明胶酶,随着分泌时间的延长,细胞体积也随之增大^[16]。在临床上同样发现, 30 名肝癌病人的肝细胞中,活性形式的明胶酶和间质溶解素的分泌量与肝癌细胞的侵袭和转移能力显著相关,且在 22 名病人上发现 MMP-1 mRNA 的表达增强^[17]。种种现象表明: MMPs 在肝癌的浸润和转移中有明显的促进作用。

2. TIMPs 抑制肝癌浸润和转移

有两种 MMPs 酶的抑制剂已经从人肝癌细胞中分离出来:一种分子量为 21kD,据免疫学方法分析确定是 TIMPs 家族之一;另一种分子量为 24kD, N-末端氨基酸分析确定就是 TIMP-2,能抑制转移因子,基质素, 72kD 明胶酶和胶原酶的活性。TIMP-2 不仅能抑制有关金属蛋白酶的活性,而且还影响酶原的活化。一些实验还表明 TIMP-2 能抑制肿瘤细胞侵袭人工趋化小室(chemotaxis chamber)内的基质凝胶膜(matrigel),也能抑制体内 MMP 活性,阻碍肝癌细胞穿透细胞基质膜^[18]。从而表明: TIMPs 对肝癌细胞的转移有明显的抑制作用。

3. 某些细胞因子调节 MMPs 和 TIMP-1 对肝癌细胞生长和转移的作用

还有人报告,制瘤素 M (oncostatin M, OM), IL-6, 白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 和 IL-1 α 等都能增加肺组织,成纤维细胞 TIMP-1 RNA 表达,OM 还能增加 H2981 和 H2pG2 肝癌细胞的 TIMP-1 mRNA 的表达,从而抑制了 MMP 活性^[19]。Vollmer 等发现:原来镶嵌于细胞膜上的一些细胞因子及细胞因子受体可以由于某种内源性亲膜金属蛋白酶的作用从细胞膜不同位点上释放出来,这些脱落分子(shed molecules)将具有新的生物学功能,此时,内源性亲膜金属蛋白酶的作用宛如一种内源性脱落生物分子的蛋白

酶。例如:从粘质沙雷氏菌所分离到的金属蛋白酶能作用于人单核细胞使其表面上的 sIL-6R 快速脱落,脱落的 sIL-6R 如与其他细胞结合,可增加该种细胞对 IL-6 的敏感性^[20]。此种脱落作用只能被一种特异的抑制剂即 TAPI(注 1)所抑制。用能产生金属蛋白酶的金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和单核细胞增多性李司忒氏菌等细菌的培养液可重复上述实验结果。

有证据表明:肝癌细胞能分泌相当数量的分子量为 85kD 的明胶酶^[16];活性形式的明胶酶和间质溶解素(matrilysin)的分泌量与肝癌细胞的临床侵袭和转移能力显著相关;肝癌患者 MMP-1 mRNA 的表达增强^[17]。粘质沙雷氏菌释放的金属蛋白酶能使原来对 IL-6 不敏感的人肝癌细胞变得敏感^[20]。对人细胞上清液中新合成的肝珠蛋白 mRNA 进行定量检测,发现通过粘质沙雷氏菌金属蛋白酶而释放出的 sIL-6R 能抑制生物活性,使对 IL-6 敏感的人肝癌细胞变成不敏感^[21]。又用 IL-6 刺激原代培养的肝细胞,使细胞的 TIMP-1 mRNA 表达增加,从而确定 MMPs 及其抑制因子 TIMP-1 是经炎症因子调节,并在肝细胞中合成,由 IL-6 上调后,表达于人 HepG2 肝癌细胞中^[22]。

四、结 语

总而言之,在肝癌细胞生长及其转移的过程中,MMPs 起着促进作用,而 TIMP-1 的作用是抑制,这两种作用受 IL-6 等细胞因子调节。

注 1. TAPI; [N-(D, L-[2-(hydroxyaminocarboxonyl) methyl]-4-methylpentanoyl) L-3-(2' naphthyl)-alanyl-L-alanine, 2-aminoethyl amide]

摘 要

金属蛋白酶是一组先由细胞分泌,嗣后又在细胞外获得活性的锌离子依赖性酶,它们彼此间具有同源性,但其底物不同。它们维系着细胞外基质的平衡;在肝癌细胞的侵袭和转移的过程中,起着一定的作用;还作为一种内源性的

细胞表面蛋白脱落酶,移转某些细胞因子及细胞因子受体的功能。金属蛋白酶抑制因子则是金属蛋白酶的拮抗剂,属糖蛋白,对肝癌的转移有抑制作用,它们不断地接受某些因子如白介素-6 的调节。

参 考 文 献

- [1] Burt AD., 1993, *J. Pathol.*, **170**:105.
- [2] Azzo, W. and Woessner, J. F., 1986, *J. Biol. Chem.*, **261**:5434.
- [3] Teronen, O., Salo, T., Laitinen, J., et al., 1995, *Eur. J. Oral. Sci.*, **103**(3):141.
- [4] Patterson, B. C. and Sang, Q. A., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:28823.
- [5] Knauper, V., Will, H., Lopez, O. C., et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**:17124.
- [6] Pendas, A. M., Knauper, V., Puente, X. S., et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:4281.
- [7] 吴秉铨、郑杰, 1996, 见肿瘤学, 第一版, 张天泽、徐光炜主编. P. 261, 天津科学技术出版社, 天津.
- [8] 周永健、陈岳祥, 1996, 国外医学消化系疾病分册, **16**:67.
- [9] Gomis, R. F. X., Maskos, K., Betz, M., et al., 1997, *Nature*, **389**:77.
- [10] Ko, Y. C., Langley, K. E., Mendiaz, E. A., et al., 1997, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**:100.
- [11] Pavloff, N., Staskus, P. W., Kishnani, N. S., et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, **267**:17321.
- [12] Sun, Y., Kim, H., Parker, M., et al., 1996, *Anticancer Res.*, **16**:1.
- [13] Liu, Y. E., Wang, M., Greene, J., et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:20479.
- [14] Bigg, H. F., Shi, Y. E., Liu, Y. E., et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**:15496.
- [15] Leco, K. J., Apte, S. S., Taniguchi, G. T., et al., 1997, *FEBS Lett.*, **401**:213.
- [16] Masure, S., Billiau, A., Van, D. J., et al., 1990, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1054**:317.
- [17] Yamamoto, H., Itoh, F., Adachi, Y., et al., 1997, *Gastroenterology*, **112**:1290.
- [18] Umenishi, F., Umeda, M., Miyazaki, K., et al., 1991, *J. Biochem. Tokyo*, **110**:189.
- [19] Richards, C. D., Shoyab, M., Brown, T. J., et al., 1993, *J. Immunol.*, **150**:5596.
- [20] Ranst, M. V., Norga, K., Masure, S., et al., 1991, *Cytokine*, **3**(3):231.
- [21] Vollmer, P., Walev, I., Rose, J. S., et al., 1996, *Infect. Immun.*, **64**:3646.

[22] Kordula, T., Guttgemann, I., Rose, J. S., et

al., 1992, *FEBS Lett.*, 313:143.

理论探索

现代细胞生物学与中医学说
——Bcl-2 家族与中医肾本质关系探讨[△]

张登海 凌昌全 刘颖* 叶志斌 鲍一笑** 孔宪涛**

(第二军医大学长海医院 上海 200433 *上海中医药大学 上海 200032

**第二军医大学长征医院 上海 200003)

编者按:国际上有“理论生物学”杂志,发表生物学理论方面的探索性文章,包括提出新的理论,新的设想。国内尚未有此类期刊,为此,我们开辟“理论探索”专栏,尝试发表一些相应的文章。

本期发表一篇第二军医大学和上海中医药大学联合署名的文章,该文专题探索了 Bcl-2 基因和中医“肾”的关系。中、西医的差别,涉及东西方文明的基本差别。以往从生理学、解剖学来解释中医理论的文章曾发表过不少,但获得中、西医界双方都认可的却不多。由于中医对于根治顽疾、解除病人痛苦等方面有着不可替代的作用,在国内外长盛不衰,体现了我中华文明灿烂光辉,是值得探索的一个文化宝库。本文作者不仅发表设想,还将进一步设计实验来加以检验。这就是何以我们把它选择为本栏目首篇文章的原因。欢迎大家提出意见。

目前普遍认为, Bcl-2 家族是与细胞凋亡 (apoptosis) 关系密切的基因家族。所以,有关 Bcl-2 家族的研究,也都是围绕细胞凋亡进行的。但是我们依据 Bcl-2 基因剔除 (knock out) 小鼠出现典型的中医“肾虚”表现^[1-3],并结合其他资料,在 1997 年就提出了“Bcl-2 家族可能是中医肾本质相关基因”的假说^[4],呼吁在中医肾本质研究中充分关注 Bcl-2 家族。由于该假说涉及到中医学说一个重要概念即肾的物质基础问题,并且可能为古老的中医理论和现代医学统一找到一个突破口,因而受到中医界的重视。如在 1998 年举行的上海市中青年专家分子生物学和中医理论研讨会上,与会专家对此展开了热烈讨论。此后在上海有关专家申请卫生部重点课题项目时,也将该内容纳入研究范畴。自我们提出假说后两年来,有关 Bcl-2 研究的新成果对这一假说提供了更有力的支持。为此,本文结合 Bcl-2 家族最新研究进展,进一步论述 Bcl-2 与中医肾的关系。

一、Bcl-2 家族简介

Bcl-2 基因 (B-cell leukemia/lymphoma-2 gene) 是从人滤泡淋巴瘤细胞基因异常转位研究中发现的^[5,6],这种转位使该基因由原先位于 18 号染色体上而转位到 14 号染色体上,和免疫球蛋白重链基因并置,在后

者启动子作用下过度表达,导致淋巴细胞过度存活,加上某些基因 (如 c-myc) 的协同作用,细胞癌变率增加^[7]。所以, Bcl-2 基因在最初阶段是作为一种癌基因加以研究的。此后, Hockenbery 等^[8]在 *Nature* 杂志上撰文率先指出, Bcl-2 的主要作用是抑制细胞凋亡,由此开启了 Bcl-2 基因作为凋亡相关基因的研究时代。在 Bcl-2 与凋亡关系研究中,人们至少有两个发现^[9]:一是存在一个 Bcl-2 家族,并且该家族不限于哺乳动物,而是在生物界广泛存在;二是 Bcl-2 家族中的成分众多,且这些成分就功能而言,可以分为互相拮抗的两大类,一类与 Bcl-2 功能基本相似,如 Bcl-xL, A1, Mcl 等,一类与 Bcl-2 作用相反,如 Bcl-xS, Bad, Bak, Bik 等。但是,近年来, Bcl-2 家族功能研究中有了新的发现,如 Bcl-2 家族对细胞周期进展有调节作用,是一种周期进展调节成分^[10,11],有促进神经细胞再生能力,并且该作用和原先发现的影响凋亡作用之间没有关系^[12]。总之,随着研究的深入,至少从 3 个方面提示我们 Bcl-2 家族是一个值得高度重视的基因家族:一是它的广泛存在,二是该家族成分众多(一个基因具有的功

[△]本文受国家博士后基金资助。