

蛋白酶活化受体4在肿瘤中的作用

吴凌燕¹ 叶景佳^{1,2*} 曹江^{1*}

(¹浙江大学医学院附属第二医院, 临床研究中心, 杭州 310009; ²浙江大学竺可桢学院, 杭州 310058)

摘要 蛋白酶活化受体4(protease-activated receptor 4, PAR4)是蛋白酶活化受体家族成员之一, 其N-端胞外区能够被特定的蛋白酶裂解, 暴露出的新的N-末端可作为一种独特的配体(tethered ligand, TL)结合并激活自身受体, 进而通过其偶联的G蛋白调控相应的下游信号通路。研究表明, PAR4在不同的恶性肿瘤可能呈现截然不同的作用。在肝癌、结肠癌、乳腺癌、软骨肉瘤等组织中表达上调, 在胃癌、肺癌等组织中表达下调, 说明其可能在肿瘤细胞的发生发展、侵袭转移中通过不同的途径发挥作用。随着PAR4与肿瘤的关系研究的深入, 将对其在恶性肿瘤中的作用和机制有更明确的认识, 为进一步的临床肿瘤诊断治疗提供更多的思路和依据。

关键词 蛋白酶活化受体4; 肿瘤; 蛋白酶; 抑制剂; 信号通路

The Role of Protease-activated Receptor 4 in Tumors

Wu Lingyan¹, Ye Jingjia^{1,2*}, Cao Jiang^{1*}

(¹Clinical Research Center, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China;

²Chu Kochen Honors College, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Protease-activated receptor 4 (PAR4) is a member of protease-activated receptor family. It can be cleaved by specific proteinases at specific site within the extracellular N-terminus, and the new N-terminal exposed can act as an unique “tethered ligand” that binds to and activates the receptor itself, and regulates the downstream signaling networks mediated by its coupled G protein. Recent studies have shown that PAR4 may play different roles in different malignant tumors. Overexpression of PAR4 has been observed in human cancers including hepatocellular carcinoma, colon cancer, breast cancer and chondrosarcoma, while down-regulated expression of PAR4 has been reported in gastric cancer, lung adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma, which indicate that PAR4 may trigger different signalings via distinct mechanisms in tumorigenesis, invasion and metastasis. Further systematic investigations on the relationship between PAR4 and malignant tumors will elucidate the molecular mechanisms of PAR4 action, and provide more ideas and the basis for developing novel PAR4-related cancer diagnostic techniques and effective anticancer drugs/therapies targeting PAR4.

Keywords Protease-activated receptors 4 (PAR4); tumor; proteinase; inhibitor; signal pathways

蛋白酶活化受体(protease-activated receptors, PARs)是一类G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)家族成员。之前, 已有较多关于

PARs在肿瘤中作用的相关研究, PAR1和PAR2在某些恶性肿瘤中表达异常, 与肿瘤的发生发展和转移密切相关。而PAR4作为PARs家族成员之一, 其与

收稿日期: 2015-07-21 接受日期: 2015-11-25

浙江省自然科学基金(批准号: LQ15H160008)和国家自然科学基金(批准号: 30271450、30672365、81172516)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn; 0571-88981115, E-mail: yej001@zju.edu.cn

Received: July 21, 2015 Accepted: November 25, 2015

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LQ15H160008) and National Natural Science Foundation of China (Grant No.30271450, 30672365, 81172516)

*Corresponding authors. Tel: +86-571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn; +86-571-88981115, E-mail: yej001@zju.edu.cn

网络出版时间: 2016-02-02 14:17:15 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160202.1417.002.html>

疾病的关系倍受关注。在肿瘤细胞中, PAR4的表达也发生了变化, 这些变化与肿瘤的发生、发展以及侵袭、转移等恶性生物学行为必然存在关联。本文就PAR4在肿瘤中的研究进展进行综述。

1 PARs和肿瘤

蛋白酶活化受体是一类独特的七次跨膜的单链G蛋白偶联受体。目前, 已发现有4种不同PARs亚型, 分别为PAR1、PAR2、PAR3和PAR4, 可以被不同的蛋白酶水解其N-端后激活, 通过其偶联的G蛋白触发一系列信号转导, 引发下游级联反应, 进而调控相应基因的表达^[1-3]。

近年来的研究发现, PARs(尤其是PAR1和PAR2)在某些肿瘤中表达异常, 可被肿瘤细胞微环境中的多种蛋白酶激活, 启动重要的信号转导通路, 调控肿瘤相关基因表达, 促进肿瘤进展^[4-7]。PAR1在人类肿瘤细胞中广泛表达, 在浸润性乳腺癌^[8]、结肠癌^[6]、晚期前列腺癌^[9]中高表达, 并且与乳腺癌的发生、发展和侵袭相关^[10]。PAR2对多种肿瘤的发生和发展起作用, 包括胃癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌、子宫颈癌、皮肤癌均有较高表达^[7]。但是, 目前对于PAR3和PAR4与人类肿瘤的关系研究涉及的很少。

2 PAR4的结构与活性

PAR4基因序列最早由Xu等^[11]于1998年从淋

巴瘤Daudi细胞中克隆得到该基因, 定位于染色体19p12, cDNA全长为4.9 Kb, 编码385个氨基酸, 包含一个信号肽和一个N-端Arg-47/Gly-48丝氨酸蛋白酶结合位点(图1)。

PARs家族成员均可通过其胞外域的水解而形成独特的配体(tethered ligand, TL)活化^[7]。模拟此水解而暴露形成的新N-端的人工合成多肽PARs-激动肽(agonist peptide, AP)同样能够激活PARs^[7,12](图2)。这类外源人工合成多肽PARs-AP已经广泛应用于PARs功能的研究^[12]。

3 PAR4在肿瘤组织中的表达

PAR4在生理及病理情况下均有表达。PAR4在胎盘、肺、肝脏、胰腺、甲状腺、前列腺、睾丸、小肠等组织中呈高表达状态^[11]。

已有研究表明, PAR4在肿瘤组织中的表达与正常组织相比有异常改变, 并且与肿瘤恶性行为相关, 例如在前列腺癌、乳腺癌、肝癌、星形胶质细胞瘤、肥大细胞白血病等多种恶性肿瘤中有高表达^[7], 而在胃癌^[13]、肺腺癌^[14]、食管鳞状细胞癌^[15]等肿瘤中表达却较低。PAR4在不同肿瘤组织中表达趋势不一致, 甚至存在相反的结果(表1), 提示PAR4在恶性肿瘤生物学行为中的机制较为复杂, 值得更进一步的深入研究。

3.1 PAR4在肿瘤中的表达上调

在14种人结肠癌细胞系(HT29、SW480、

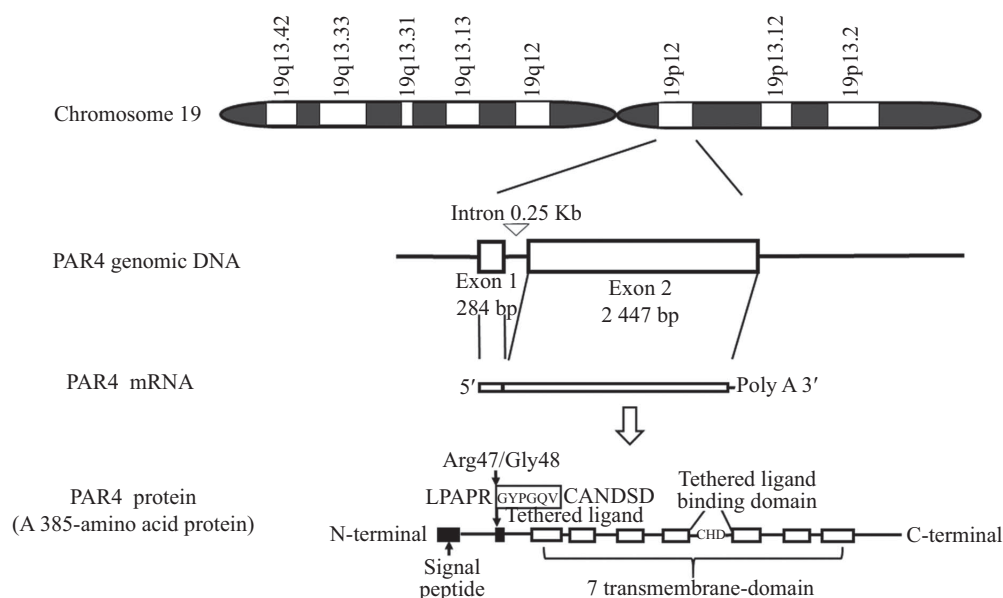
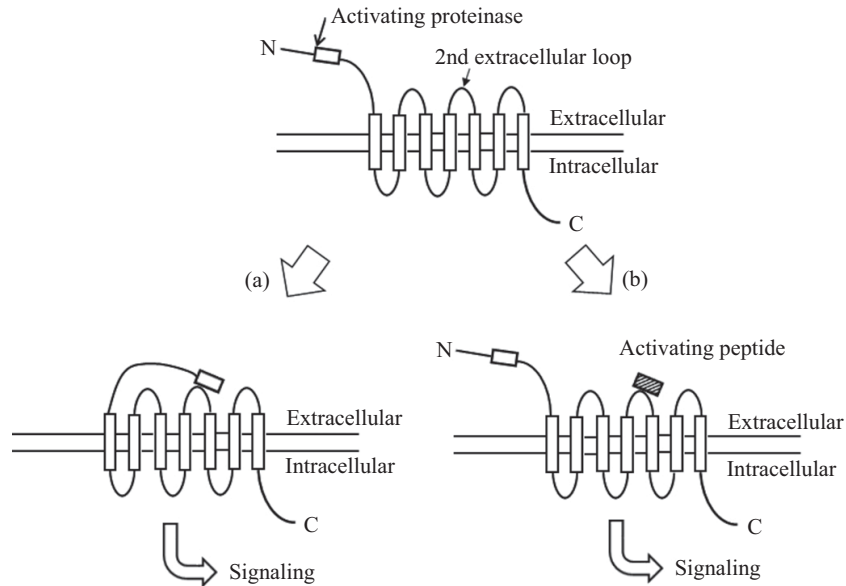


图1 PAR4结构示意图

Fig.1 Diagram illustrating the structure of PAR4



a: 蛋白酶将PARs的N-端水解, 激活该N-端信号肽, 在PARs上形成新配体(TL), 该配体与PARs胞外第二个受体环(2nd extracellular loop)结合产生信号。b: 模拟这个新配体的人工合成多肽, 不论是否激活原有N-端, 均可激活PARs产生信号。

a: the activating peptide cleaves the N-terminal end including a peptide rest from the receptor, creating a new tethered ligand (TL). The TL binds to the 2nd extracellular loop and creates a signal. b: Peptide activation with and without proteolytic cleaving.

图2 PARs激活示意图(根据参考文献[7]修改)

Fig.2 Activation of PARs (modified from reference [7])

HCT116、Caco-2、SW48、LoVo、LS174T、SW620、T84、HCT8、COLO-HSR、COLO-205、HT29-CL19A和HT29-D4)中的10种(除HT29-CL19A、LoVo、HCT116和T84细胞系外)均检测到PAR4的表达, 而正常人类结肠上皮细胞中未检测到。结肠癌患者组织中, PAR4的表达丰度具有区域特异性, 在结肠黏膜表面呈现高表达, 而在基底的隐窝细胞中表达下降^[16], PAR4表达水平与恶性肿瘤分化程度呈负相关, 低分化结肠癌组织PAR4表达丰度大于中高分化组织, 中高分化组织大于癌旁正常组织^[17]。由于多数情况下分化越低的肿瘤细胞其生长、侵袭、转移等恶性表型更突出, PAR4在这些低分化肿瘤细胞中的高表达有可能通过激活下游信号通路而发挥促进肿瘤细胞生长、侵袭及转移的作用。

大多数肿瘤患者体内都伴有不同程度凝血系统的激活, 导致凝血酶大量产生, 肿瘤微环境中富集的凝血酶直接或间接参与介导了肿瘤细胞增殖、侵袭、新生血管形成和组织重建, 凝血酶在人类肿瘤细胞侵袭和转移中起到重要作用^[18]。凝血酶主要是通过PARs的介导来影响肿瘤细胞生物学行为变化, PAR4作为凝血酶受体之一, 与肿瘤的发生发展可能存在一定的关联。人软组织肉瘤细胞系(JJ012)在凝血酶处理后, 与空白对照组相比, PAR4表达明显上升^[19]。

PAR4的表达水平不但与凝血酶存在一定关系, 与某些病原菌的存在也有关联性。牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)是一种牙周的病原菌, 流行病学调查显示, 其与口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)相关。口腔鳞状细胞癌细胞系SAS细胞在*P. gingivalis*病原菌共孵育的条件下, PAR4水平显著上升^[20]。

3.2 PAR4在肿瘤中的表达下调

之前的研究显示, PAR4在结肠癌、软组织肉瘤等肿瘤中高表达, 但是, PAR4在另外一些肿瘤中的表达存在与上述研究不一致的现象。

在胃癌中的研究显示, 胃癌组织相较于癌旁正常组织, PAR4表达均显著性降低, 在淋巴结及低分化的胃癌组织中降低尤其明显^[13]。与此同时, 与人结肠癌细胞系H29相比较, PAR4在人胃癌细胞系AGS和N87中未见表达。PAR4在胃癌中的表达下调与胃癌临床恶性表型相关。

PAR4在正常人肺组织中呈现高表达^[21], 主要表达于下支气管上皮、II型肺泡细胞、内皮细胞以及包括培养的肺部上皮细胞^[11,22-23]。而在肺腺癌中, PAR4水平相较于癌旁正常组织有显著性下降, 在不同分化程度及转移程度的肿瘤组织中PAR4表达也有显著性的差异, 高分化肺腺癌组织PAR4的表达略

有下降, 而中等分化程度及低分化肺腺癌组织PAR4的表达显著性下降。在肺腺癌细胞系NCI-H157中, PAR4表达相较于BEAS-2B细胞(一种人类支气管正常上皮细胞系)显著下降, 表达水平只有BEAS-2B细胞的57%^[14]。

在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)的研究中, 也有相同的发现^[15], 在食管鳞状细胞癌组织和细胞系TE-1、TE-10中PAR4的表达下调。

3.3 PAR4启动子甲基化对PAR4的表达调控

PAR4在不同肿瘤中的表达可以截然相反, 说明其在不同肿瘤中可能以不同的信号途径或不同的机制来发挥作用。

结肠癌组织呈现PAR4启动子的低甲基化。结肠癌细胞系LoVo细胞本身不表达PAR4, 而使用5-Aza-dC(5-氮脱氧胞苷, 一种去甲基化试剂)处理LoVo细胞, 能够显著增加PAR4的表达。在结肠癌组织和非癌组织中, 高表达PAR4的样本呈现PAR4启动子的低甲基化, CpG位点平均甲基化率为22.1%, 而非肿瘤组织PAR4低表达并且PAR4启动子高甲基化^[38]。

在胃癌的研究中发现^[13], PAR4启动子的高甲基化存在于胃癌细胞系AGS和N87中, 且这类胃癌细胞呈现PAR4表达下调, 去甲基化药物5-Aza-dC可以恢复PAR4在胃癌细胞系AGS中的表达。胃癌组织中PAR4的表达降低与PAR4启动子的高甲基化相关,

异常的DNA甲基化是PAR4下调的机制。在PAR4表达下调的食管鳞状细胞癌中也同样有类似现象^[15]。PAR4在胃癌、食管鳞状细胞癌的发生和发展中有负调节作用, 可能成为这些恶性肿瘤的抑制剂。

在肺腺癌细胞系NCI-H157中相较于人肺正常上皮细胞BEAS-2B细胞, PAR4的表达下调, 但是PAR4启动子CpG位点的甲基化水平并没有显著性差异^[14]。

PAR4启动子的甲基化, 不论是胃癌中高甲基化引起PAR4的转录沉默还是结肠癌中低甲基化促进PAR4的转录表达, 或者是在肺腺癌组织中PAR4表达下调与启动子甲基化无关联, 这些结果均提示, 启动子的甲基化水平仅仅只是导致PAR4表达差异的其中一种方式。PAR4的表达是由多重方式所调控的。

4 PAR4在肿瘤发生发展中的作用

4.1 PAR4与凝血酶

凝血酶促进肿瘤发生发展的作用已在多种肿瘤中被报道^[18,39-41], 包括肠癌^[6,42]等。凝血酶信号通路与结肠癌的发生发展有直接的关联^[43-46], 凝血酶能够通过PARs(尤其是PAR1)激活肿瘤细胞, 促进肿瘤细胞增殖, 增强肿瘤细胞对血小板、血管内皮细胞的黏附作用, 破坏血管内皮的屏障作用, 增加血管的通透性, 从而对肿瘤的发生、发展以及侵袭、转移起作用^[18,47]。而PAR4作为凝血酶受体被发现, 其与凝血

表1 PAR4在肿瘤中的表达研究
Table 1 Expression of PAR4 in tumor tissues

肿瘤类型 Tumor type	PAR4表达 PAR4 expression	相对正常组织的变化 Alternation as compared to matched normal tissues	参考文献 References
Colorectal cancer	Positive	Increased	[16-17]
Esophageal squamous cell carcinoma	Weak positive	Decreased	[15]
Gastric cancer	Weak positive or Negative	Decreased	[13]
Lung cancer	Moderate positive		[24]
Lung cancer		Decreased	[14]
Oral squamous cell carcinoma	Positive	Increased (<i>P. gingivalis</i> infection)	[20]
Astrocytomas	Positive		[25]
Breast cancer	Negative		[26-27]
Breast cancer	Positive		[28]
Hepatocellular carcinoma	Negative		[29]
Hepatocellular carcinoma	Positive		[30]
Leukemic mast cell line	Positive		[31]
Melanoma	Negative		[32]
Prostate tumor	Negative		[27,33]
Prostate tumor	Positive		[34-35]
Renal cell carcinoma	Negative		[36-37]

酶在肿瘤发生、发展以及侵袭、转移中所起的作用并未研究明确。外源人工合成多肽PAR4-AP同样能够激活PAR4, 常被用来研究PAR4的活性以及其在肿瘤中的作用。

在结肠癌细胞系HT29中, PAR4-AP活化PAR4而激活G蛋白并进一步触发钙内流等, 引起下游级联反应。凝血酶和PAR4-AP引起细胞增殖作用, 在结肠癌其他细胞系, 如WIDR、LoVo、T84、HT29-D4和CL19A中, 也同样被检测到。PAR4-AP作用于HT29细胞, 能够快速且显著性地引起p42/p44的磷酸化及细胞外调节蛋白激酶ERK(extracellular signal-regulated protein kinase)的最大磷酸化, 并持续ERK的磷酸化作用。ERK1/2持续激活, 可能与结肠癌的持续增殖相关联。已有研究报道, PAR4在体内结肠癌肿瘤和体外结肠癌细胞中均呈现异常表达, 凝血酶通过PAR4促进结肠癌细胞的增殖, 而PAR4通过Src酪氨酸激酶的作用使得表皮生长因子受体B-2(epidermal growth factor receptor B-2, ErbB-2)反式激活从而促进结肠癌细胞的增殖^[16]。MEK(MAPKinase kinase, mitogen-activated protein kinase kinase)抑制剂PD98059、EGFR(epidermal growth factor receptor)酪氨酸激酶抑制剂(AG1478、PD168393)、Src酪氨酸激酶抑制剂PP2均能显著性降低PAR4-AP诱导产生的细胞增殖和ERK1/2磷酸化(图3)。

在乳腺癌中, PAR4-AP能增加MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞的迁移^[28]。

在人软组织肉瘤细胞系JJ012和SW1353中, 相较

于空白对照组, 凝血酶刺激能增加肿瘤细胞的迁移, 并且明显增加PAR4的表达。PAR4-AP处理也能够显著性增加细胞的迁移能力, 同时PAR4-siRNA可以阻断凝血酶引起软组织肉瘤细胞的迁移运动^[19]。

PAR4在肝癌细胞系HEP-3B、SK-HEP1和原代肝癌细胞HCC(hepatocellular carcinoma)中表达, 凝血酶和PAR4-AP处理能显著性增加细胞的跨膜迁移。PAR4-AP同样能促进HCC细胞的迁移, 而对照组YAPGKF-NH₂并不能引起HCC细胞的迁移, PAR4选择性拮抗剂trans-cinnamoyl-YPGKF-amide能降低但不是完全抵消凝血酶刺激产生的细胞迁移。PAR4-AP处理HEP-3B能上调p-p42/44和p-Src的表达。蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)抑制剂BIM1、cAMP(cyclic adenosine monophosphate)依赖的蛋白激酶抑制剂H-89、MEK抑制剂PD98059、Src酪氨酸激酶抑制剂PP2、EGFR激酶抑制剂AG-1478以及Gi/G0偶联蛋白抑制剂百日咳毒素(pertussis toxin, PTX)均能抑制PAR4-AP诱导HEP-3B细胞、SK-HEP1细胞和HCC 689细胞产生的细胞迁移^[30]。由此可见, 在肝癌细胞中, 凝血酶引起的细胞迁移与PAR4表达上调密切相关, 并且该作用可能通过EGFR的反式激活以及MAPK信号通路的激活来影响细胞迁移(图3)。

4.2 PAR4与MMPs

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在肿瘤组织中的间质成纤维细胞和炎症细胞中大量表达, 能够水解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的蛋白结构, 包括: 胶原、弹性蛋白、

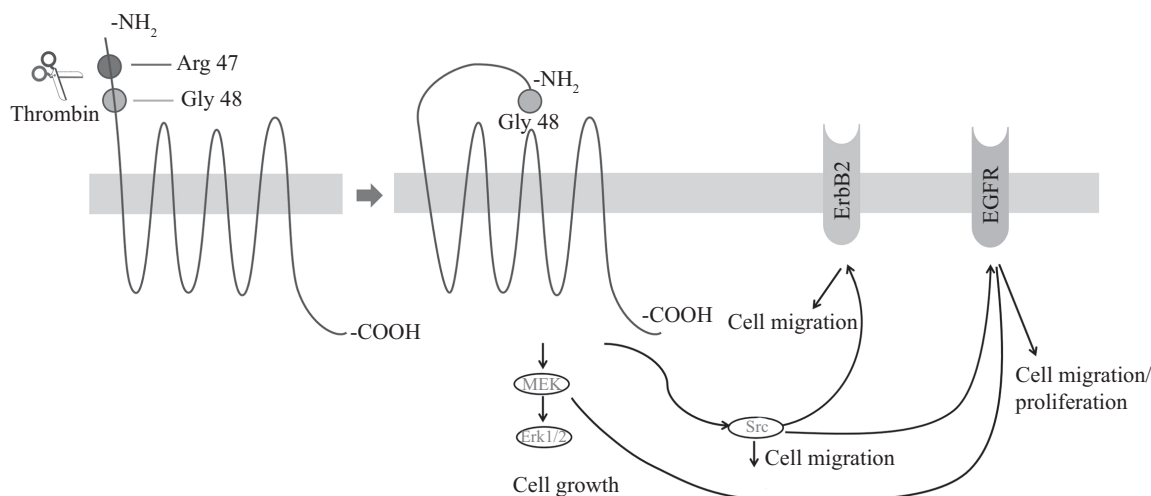


图3 凝血酶介导的PAR4激活下游信号通路示意图

Fig.3 Schematic representation of the downstream signaling pathways involved in thrombin-induced PAR4 activation

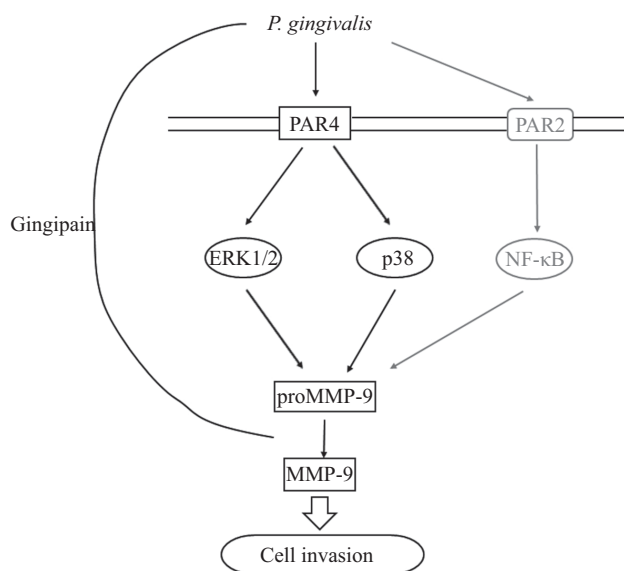


图4 *P. gingivalis*感染SAS细胞导致MMP-9前体分泌及激活的图示模型(根据参考文献[20]修改)

Fig.4 Proposed schematic model for proMMP-9 secretion and activation in SAS cells infected with *P. gingivalis* (modified from reference [20])

层连蛋白、纤连蛋白等, 从而影响肿瘤生长、肿瘤细胞增殖及其生物学行为, 例如细胞侵袭、细胞外基质降解等, 对恶性肿瘤的侵袭和转移起着重要作用。

在软骨肉瘤中, 凝血酶处理可导致MMP-2和MMP-13表达及活性的增加, 而MMP-2 siRNA或MMP-13 siRNA可以分别阻断凝血酶引起软骨肉瘤细胞迁移。通过信号通路各成员抑制剂研究表明, PAR1和PAR4通过PI-PLC(phosphoinositide-specific phospholipase C)、PKC α 和c-Src和NF- κ B信号途径上调MMP-2、MMP-13的表达促进细胞的迁移^[19]。

在肝癌细胞系中, MMP抑制剂galardin(GM-6001)能完全抑制PAR4-AP诱导HEP-3B、SK-HEP1和HCC 689产生的细胞迁移^[30]。

有研究表明, 口腔鳞状细胞癌细胞系SAS细胞与*P. gingivalis*病原菌共孵育, *P. gingivalis*可提高PAR4 mRNA的表达水平, 导致PAR4表达增多, PAR4介导的ERK1/2、p38信号通路被激活, PAR2介导的NF- κ B信号通路被激活, 共同导致proMMP-9的表达增加, proMMP-9经*P. gingivalis*产生的精氨酸特异牙龈蛋白酶(arginine-specific gingipain, Arg-gingipain)活化成MMP-9, 水解细胞外基质EMC的蛋白结构, 从而导致了SAS细胞的侵袭性增加(图4)。而利用siRNA下调PAR4的表达, 可同时抑制由*P. gingivalis*

引起的proMMP-9的表达上调和细胞的侵袭现象, 还能降低p38 MAPK以及ERK1/2的磷酸化, 但不影响NF- κ B的核转位^[20]。

4.3 PAR4与ROS

有研究表明, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)可作为信号介导受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)的激活^[48-52], 并且ROS水平的上升与肿瘤恶性表型相关^[53]。G蛋白偶联受体能够通过ROS介导肝细胞生长因子受体(hepatocyte-growth factor receptor, Met)的反式激活^[54]。在肝癌细胞系HEP-3B中, PAR4介导HEP-3B迁移主要是通过ROS的形成和RTK、Met、血小板源性生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)的反式激活以及蛋白酪氨酸磷酸酶-1B(protein tyrosine phosphatase-1B, PTP1B)的失活来实现的^[55]。PAR4-AP诱导细胞迁移增加, 并且上调ROS水平, 而这类现象能被ROS抑制剂、肝细胞生长因子受体Met活化抑制剂、PDGFR抑制剂所阻断。ROS能导致蛋白酪氨酸磷酸酶PTP的失活, ROS的抑制剂*N-acetyl-l-cysteine*能阻止PTP1B磷酸化活性的抑制^[56]。

由此可见, 在PAR4介导的肝癌细胞迁移过程中, ROS以及RTK、Met、PDGFR起到重要作用。而p42/p44 MAPKs作为已知的Met信号通路的下游^[57], 推测p42/p44 MAPKs在PAR4介导的肝癌细胞迁移中可能也起到一定的作用, 值得深入研究。在肝癌及其他上皮细胞癌中, Met作为重要的治疗靶点存在^[58]。开发Met抑制剂或沉默Met基因表达的siRNA或作用于PAR4-ROS-Met-p42/p44 MAPKs信号通路的多重抑制剂在肝癌治疗中的可能性。

4.4 PAR4与TFFs

三叶肽家族(trefoil factors, TFFs)是一类小的多肽, 广泛表达于胃肠道黏膜^[59]。TFFs通过促进细胞迁移和抑制凋亡来达到黏膜恢复和治愈的作用^[60]。先前的研究显示, TFFs与肿瘤的发生相关^[61]。TFF2通过PAR4介导ERK1/2磷酸化来促进上皮细胞的迁移和伤口的愈合^[62]。与非肿瘤组织相比, 结肠癌组织和淋巴结中PAR4和TFF2表达均呈现显著性增加, 且在低分化结肠癌组织PAR4和TFF2表达量大于高分化组织及中分化组织。结肠癌细胞系LoVo本身并不表达内源性的PAR4, TFF2不能激活其侵袭能力, 但是过表达PAR4的LoVo(LoVo-PAR4)细胞的侵

袭能力显著增强。同时,下调HT-29细胞系中PAR4的表达,能显著降低TFF2引起的侵袭活力。在结肠癌细胞中,TFF2诱导产生的侵袭作用是通过PAR4来实现的^[38]。

5 总结与展望

目前已有研究结果表明,PAR4在多种恶性肿瘤的增殖、侵袭等生物学行为中可能起着重要的作用,而此作用因肿瘤种类不同而存在差异甚至相反,但是人们对其相关的作用机制了解十分有限,因此,进一步对PAR4与肿瘤的关系进行深入研究有很重要的意义。

展望今后的研究方向,我们认为,首先需要明确PAR4在不同肿瘤中表达调控方面的差异,即为为什么PAR4在有些肿瘤中表达升高,而在另一些肿瘤中表达下降。现有研究表明,PAR4表达与启动子甲基化调控相关,但也可能存在目前尚未涉及的其他表观遗传学层面的调控,如组蛋白乙酰化及非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA),或者受诸如某些特定基因发生突变导致的遗传学层面的调控。其次,还需研究PAR4在不同肿瘤中发挥的不同作用及其分子机制。从改变肿瘤细胞内PAR4的表达水平能够影响肿瘤细胞的生长、侵袭等恶性表型这一点来看,PAR4在肿瘤细胞内的表达异常应该不仅仅是伴随现象,而确实是对肿瘤细胞的恶性表型发挥作用的。比较容易理解的是,PAR4表达升高对于肿瘤的增殖和侵袭的促进作用大多是通过其偶联的G蛋白促发钙内流及一系列第二信使上调,激活下游各种信号通路而实现的。但是对于PAR4在一些肿瘤中观察到的表达下降的情况,如果在这些类型的肿瘤细胞中恢复PAR4的正常表达,对肿瘤细胞的各种恶性表型的作用又会是怎样、又是通过哪些信号通路发挥这些作用的呢?此外,与PAR4激活密切相关的各种蛋白酶的表达与分布、这些蛋白酶活性受重要的内源性抑制因子如肝细胞生长因子激活因子抑制因子-1(hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1, HAI-1)调控^[44]等情况也都非常值得深入研究。在阐明上述问题的基础上,还可进一步根据PAR4在不同肿瘤中的临床研究的结果来分析其意义,探讨PAR4在不同肿瘤中作为辅助性诊断指标的可能性,评估其作为抗肿瘤治疗靶点的价值,并研发相应的技术手段实现这些目的。

参考文献 (References)

- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001; 53(2): 245-82.
- 张盛洁, 曹江. 蛋白酶活化受体与肿瘤. *实用肿瘤杂志(Zhang Shengjie, Cao Jiang. Protease-activated receptors and cancer. Journal of Practical Oncology)* 2009; 24(3): 302-305.
- Ossovskaia VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: Contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004; 84(2): 579-621.
- Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(2): 79-94.
- Darmoul D, Marie JC, Devaud H, Gratio V, Laburthe M. Initiation of human colon cancer cell proliferation by trypsin acting at protease-activated receptor-2. *Br J Cancer* 2001; 85(5): 772-9.
- Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol* 2003; 162(5): 1503-13.
- Elste AP, Petersen I. Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer. *J Mol Histol* 2010; 41(2/3): 89-99.
- Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, *et al.* Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med* 1998; 4(8): 909-14.
- Daaka Y. G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm. *Sci STKE* 2004; 2004(216): re2.
- Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 2005; 120(3): 303-13.
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, *et al.* Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(12): 6642-6.
- Ramachandran R, Hollenberg MD. Proteinases and signalling: Pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1: S263-82.
- Zhang Y, Yu G, Jiang P, Xiang Y, Li W, Lee W, *et al.* Decreased expression of protease-activated receptor 4 in human gastric cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43(9): 1277-83.
- Jiang P, Yu GY, Zhang Y, Xiang Y, Hua HR, Bian L, *et al.* Down-regulation of protease-activated receptor 4 in lung adenocarcinoma is associated with a more aggressive phenotype. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(6): 3793-8.
- Li SM, Jiang P, Xiang Y, Wang WW, Zhu YC, Feng WY, *et al.* Protease-activated receptor (PAR)1, PAR2 and PAR4 expressions in esophageal squamous cell carcinoma. *Dongwuxue Yanjiu* 2014; 35(5): 420-5.
- Gratio V, Walker F, Lehy T, Laburthe M, Darmoul D. Aberrant expression of proteinase-activated receptor 4 promotes colon cancer cell proliferation through a persistent signaling that involves Src and ErbB-2 kinase. *Int J Cancer* 2009; 124(7): 1517-25.
- 陈琳, 王峰, 吴月平, 陆仁飞, 邵建国, 王惠民. 蛋白酶活化受体-4在结肠癌组织中的表达及意义. *山东医药(Chen Lin, Wang Feng, Wu Yueping, Lu Renfei, Shao Jianguo, Wang Huiping. The*

- expression and significance of PAR4 in colonic cancer. *Shandong Medicine* 2011; 51: 43-4.
- 18 Nierodzik ML, Karparkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 2006; 10(5): 355-62.
 - 19 Chen HT, Tsou HK, Tsai CH, Kuo CC, Chiang YK, Chang CH, *et al.* Thrombin enhanced migration and MMPs expression of human chondrosarcoma cells involves PAR receptor signaling pathway. *J Cell Physiol* 2010; 223(3): 737-45.
 - 20 Inaba H, Amano A, Lamont RJ, Murakami Y. Involvement of protease-activated receptor 4 in over-expression of matrix metalloproteinase 9 induced by *Porphyromonas gingivalis*. *Med Microbiol Immunol* 2015; 240(5): 605-12.
 - 21 Laan LA, Vein AA. A Rett patient with a typical Angelman EEG. *Epilepsia* 2002; 43(12): 1590-2.
 - 22 Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, Vu TK, Charo IF, Coughlin SR. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest* 1992; 90(4): 1614-21.
 - 23 Saifeddine M, Al-Ani B, Sandhu S, Wijesuriya SJ, Hollenberg MD. Contractile actions of proteinase-activated receptor-derived polypeptides in guinea-pig gastric and lung parenchymal strips: Evidence for distinct receptor systems. *Br J Pharmacol* 2001; 132(2): 556-66.
 - 24 Ghio P, Cappia S, Selvaggi G, Novello S, Lausi P, Zecchina G, *et al.* Prognostic role of protease-activated receptors 1 and 4 in resected stage IB non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2006; 7(6): 395-400.
 - 25 Kaufmann R, Patt S, Zieger M, Kraft R, Tausch S, Henklein P, *et al.* The two-receptor system PAR-1/PAR-4 mediates alpha-thrombin-induced [Ca(2+)](i) mobilization in human astrocytoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126(2): 91-4.
 - 26 Jiang X, Bailly MA, Panetti TS, Cappello M, Konigsberg WH, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells. *J Thromb Haemost* 2004; 2(1): 93-101.
 - 27 Huang YQ, Li JJ, Karparkin S. Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21(waf/cip1) and caspases via a p53-independent, STAT-1-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000; 275(9): 6462-8.
 - 28 Kamath L, Meydani A, Foss F, Kuliopulos A. Signaling from protease-activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 2001; 61(15): 5933-40.
 - 29 Rullier A, Senant N, Kiesel W, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Le Bail B, *et al.* Expression of protease-activated receptors and tissue factor in human liver. *Virchows Arch* 2006; 448(1): 46-51.
 - 30 Kaufmann R, Rahn S, Pollrich K, Hertel J, Dittmar Y, Hommann M, *et al.* Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: Cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. *J Cell Physiol* 2007; 211(3): 699-707.
 - 31 Kang OH, Jeong HJ, Kim DK, Choi SC, Kim TH, Nah YH, *et al.* Trypsin induces tumour necrosis factor-alpha secretion from a human leukemic mast cell line. *Cell Biochem Funct* 2003; 21(2): 161-7.
 - 32 Bromberg ME, Bailly MA, Konigsberg WH. Role of protease-activated receptor 1 in tumor metastasis promoted by tissue factor. *Thromb Haemost* 2001; 86(5): 1210-4.
 - 33 Liu J, Bastian M, Kohlschein P, Schuff-Werner P, Steiner M. Expression of functional protease-activated receptor 1 in human prostate cancer cell lines. *Urol Res* 2003; 31(3): 163-8.
 - 34 Greenberg DL, Mize GJ, Takayama TK. Protease-activated receptor mediated RhoA signaling and cytoskeletal reorganization in LNCaP cells. *Biochemistry* 2003; 42(3): 702-9.
 - 35 Black PC, Mize GJ, Karlin P, Greenberg DL, Hawley SJ, True LD, *et al.* Overexpression of protease-activated receptors-1,-2, and-4 (PAR-1, -2, and -4) in prostate cancer. *Prostate* 2007; 67(7): 743-56.
 - 36 Kaufmann R, Junker U, Nuske K, Westermann M, Henklein P, Scheele J, *et al.* PAR-1- and PAR-3-type thrombin receptor expression in primary cultures of human renal cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2002; 20(1): 177-80.
 - 37 Kaufmann R, Schulze B, Krause G, Mayr LM, Settmacher U, Henklein P. Proteinase-activated receptors (PARs)—the PAR3 Neo-N-terminal peptide TFRGAP interacts with PAR1. *Regul Pept* 2005; 125(1/2/3): 61-6.
 - 38 Yu G, Jiang P, Xiang Y, Zhang Y, Zhu Z, Zhang C, *et al.* Increased expression of protease-activated receptor 4 and trefoil factor 2 in human colorectal cancer. *PLoS One* 2015; 10(4): e0122678.
 - 39 Nierodzik ML, Plotkin A, Kajumo F, Karparkin S. Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion *in vitro* and metastasis *in vivo*. *J Clin Invest* 1991; 87(1): 229-36.
 - 40 Nierodzik ML, Kajumo F, Karparkin S. Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets *in vitro* and tumor metastasis *in vivo*. *Cancer Res* 1992; 52(12): 3267-72.
 - 41 Ruf W, Mueller BM. Thrombin generation and the pathogenesis of cancer. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32 Suppl 1: 61-8.
 - 42 Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Peiretti F, Laburthe M.. Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cancer Res* 2004; 2(9): 514-22.
 - 43 Rickles FR. Mechanisms of cancer-induced thrombosis in cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35(1/2): 103-10.
 - 44 Zwicker JJ, Furie BC, Furie B. Cancer-associated thrombosis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62(2): 126-36.
 - 45 Iversen LH, Thorlacius-Ussing O. Systemic coagulation reactivation in recurrence of colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2003; 89(4): 726-34.
 - 46 Modrau, II, Iversen LL, Thorlacius-Ussing OO. Hemostatic alterations in patients with benign and malignant colorectal disease during major abdominal surgery. *Thromb Res* 2001; 104(5): 309-15.
 - 47 Zacharski LR. Anticoagulants in cancer treatment: malignancy as a solid phase coagulopathy. *Cancer Lett* 2002; 186(1): 1-9.
 - 48 Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, *et al.* Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272(1): 217-21.
 - 49 Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270(5234): 296-9.
 - 50 Ushio-Fukai M, Griendling KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, Alexander RW. Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species

- in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(4): 489-95.
- 51 Rhee SG, Bae YS, Lee SR, Kwon J. Hydrogen peroxide: A key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation. *Sci STKE* 2000; 2000(53): pe1.
- 52 Saito Y, Berk BC. Transactivation: A novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33(1): 3-7.
- 53 Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 1991; 51(3): 794-8.
- 54 Fischer OM, Giordano S, Comoglio PM, Ullrich A. Reactive oxygen species mediate Met receptor transactivation by G protein-coupled receptors and the epidermal growth factor receptor in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004; 279(28): 28970-8.
- 55 Mussbach F, Henklein P, Westermann M, Settmacher U, Bohmer FD, Kaufmann R. Proteinase-activated receptor 1- and 4-promoted migration of Hep3B hepatocellular carcinoma cells depends on ROS formation and RTK transactivation. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015; 141(5): 813-25.
- 56 Wetzker R, Bohmer FD. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(8): 651-7.
- 57 Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(12): 915-25.
- 58 Peruzzi B, Bottaro DP. Targeting the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(12): 3657-60.
- 59 Thim L. Trefoil peptides: From structure to function. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53(11/12): 888-903.
- 60 Taupin D, Podolsky DK. Trefoil factors: Initiators of mucosal healing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(9): 721-32.
- 61 Kjellef S. The trefoil factor family-small peptides with multiple functionalities. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66(8): 1350-69.
- 62 Zhang Y, Yu G, Wang Y, Xiang Y, Gao Q, Jiang P, *et al.* Activation of protease-activated receptor (PAR) 1 by frog trefoil factor (TFF) 2 and PAR4 by human TFF2. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(22): 3771-80.