

- 1989, *Genes. Dev.*, **3**:1493-1506.
- [14] Wiekowski, M., Miranda, M., et al., 1993, *Dev. Biol.*, **159**:366-378.
- [15] Henery, C. C., Miranda, M., et al., 1995, *Dev. Biol.*, **169**:448-460.
- [16] Majumder, S., Depamphilis, M. L., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, **14**:4258-4268.
- [17] Paranjape, S. M., Kamakaka, R. T., 1994, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**:265-297.
- [18] Bensaude, O., Babinet, C., et al., 1983, *Nature*, **305**:331-333.
- [19] Christians, E., Campion, E., et al., 1995, *Development*, **121**:113-122.
- [20] Christians, E., Michel, E., et al., 1997, *Mol. Cell. Biol.*, **17**(2):778-788.
- [21] Davis, D., Sousa, D. P., Schultz, R. M., 1996, *Dev. Biol.*, **174**:190-201.
- [22] Latham, K. E., Rambhatla, L., et al., 1995, *Dev. Biol.*, **168**:670-676.

血管生长素的研究进展

包俊敏 曹贵松 景在平

(第二军医大学长海医院血管外科 上海 200433)

70年代以来,随着对血管生长机理的认识和生物工程新技术的开发与应用,人们发现了一系列与血管生长(angiogenesis)有关的血管生长因子。通过对血管生长和血管生长因子的研究,不但逐步揭示了肿瘤生长血管依赖的机理,为肿瘤的防治提供了新的思路 and 手段,同时加深了对血管生长调控机制的认识,为一些血管生长相关疾病(如类风湿性关节炎、糖尿病性视网膜病、银屑病等)和血管闭塞性疾病的发病机理和临床治疗的研究提供了新的有效途径。

血管生长素(angiogenin, ANG)是第一个被分离纯化并确定氨基酸序列的人肿瘤产生的血管生长因子。1985年由Vallee领导的研究小组报道了从人结肠腺癌培养细胞(HT-29)的培养基中分离纯化到一种具有很强促血管生长活性的多肽^[1],测定了该物质的蛋白全序列^[2],并从人肝cDNA文库和基因组文库中分离并测定了这一多肽物质的基因序列^[3],从而证明这一血管生长相关多肽在化学结构上是一种全新物质,故命名为血管生长素(angiogenin)。

一、ANG的理化性质

由人结肠腺癌细胞培养基中获得的ANG是含有123个氨基酸的单链多肽,分子量为

14kDa,等电点9.5,是一种碱性多肽^[1]。其结构顺序为:<Glu¹-Asp-Asn-Ser-Arg-Tyr-Thr-His-Phe-Leu-Thr-Gln-His-Tyr-Asp¹⁵-Ala-Lys-Pro-Gln-Gly-Arg-Asp-Asp-Arg-Tyr-Cys-Glu-Ser-Ile-Met³⁰-Arg-Arg-Arg-Gly-Leu-Thr-Ser-Pro-Cys-Lys-Asp-Ile-Asn-Thr-Phe⁴⁵-Ile-His-Gly-Asn-Lys-Arg-Ser-Ile-Lys-Ala-Ile-Cys-Glu-Asn-Lys⁶⁰-Asn-Gly-Asn-Pro-His-Arg-Glu-Asn-Leu-Arg-Ile-Ser-Lys-Ser-Ser⁷⁵-Phe-Gln-Val-Thr-Thr-Cys-Lys-Leu-His-Gly-Gly-Ser-Pro-Trp-Pro⁹⁰-Pro-Cys-Gln-Tyr-Arg-Ala-Thr-Ala-Gly-Phe-Arg-Asn-Val-Val-Val¹⁰⁵-Ala-Cys-Glu-Asn-Gly-Leu-Pro-Val-His-Leu-Asp-Gln-Ser-Ile-Phe¹²⁰-Arg-Arg-Pro¹²³-OH。由半胱氨酸残基Cys26-81,39-92和57-107构成三对二硫键。ANG的氨基酸序列有35%与胰核糖核酸酶(胰RNase)类同,尤其是胰RNase的三个主要活性位点His-12、Lys-41、His-119和四对二硫键中的三对在ANG中都得以保留,表明两者在空间结构上有一定的相似性^[1-3],但在生物活性和功能上又有着重大差异。

二、ANG的生物活性

ANG的生物活性特点有:①具有胰

RNase的部分活性,能将18S,28S rRNA水解成100—500bp长的片段,但对胰RNase的常见底物麦RNA、poly(C)、poly(U)等并无水解活性^[1,4];② ANG能与胎盘RNA酶抑制剂(placental ribonuclease inhibitor, PRI)结合,且ANG与PRI的结合力比胰RNase-PRI复合物强500倍^[5];③ ANG有很强的促血管生长活性,50ng可使兔角膜血管明显增生,0.5ng即可使鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)试验呈阳性反应^[1],Mashtakova^[6]用人基因工程ANG在大鼠角膜和皮肤也观察到了血管增生现象,而胰RNase不具备促血管生长活性;④ ANG的抗蛋白酶水解活性与胰RNase有较大差别^[7];⑤ ANG对RNA底物的碱基裂解特异性与胰RNase有很大差异^[7]。

作为一种强效的血管生长诱导剂,ANG对血管生长这一复杂过程中的大部分环节都有作用,这些作用包括:与内皮细胞结合,刺激第二信使,介导细胞粘附,激活细胞相关的蛋白酶,促使细胞移行及重组内皮细胞形成的管状结构等。

三、ANG的作用机理

ANG作为一种信息分子,它对血管生长的调控可能是通过细胞膜表面的受体,并通过某种胞内信使传递系统将细胞有丝分裂信息传到细胞核,从而调控DNA的合成及细胞的分裂增殖。然而,典型的ANG细胞受体是否存在,一直未得到确认。Badet^[8]用¹²⁵I标记的rANG发现了牛肺动脉内皮细胞上的特异结合位点(42kDa),Chamoux等^[9]也在牛脑毛细血管内皮细胞上发现了ANG的特异结合蛋白(49kDa),这些研究都提示了ANG受体存在的可能性,并可能是靶细胞接受ANG信息并向细胞内传递的第一要素。而Moroianu^[10]研究则发现先前纯化得到的42kDa的ANG结合蛋白实际是一种平滑肌上的肌动蛋白(α -actin)。Gho^[11]、Hu^[12]等也证实肌动蛋白是ANG在内

皮细胞表面的结合蛋白,而且ANG与细胞表面肌动蛋白的结合是ANG诱导的血管生长的必要步骤。1997年,Hu等^[13]又报道了进一步研究的结果,在内皮细胞稀疏培养的条件下,用¹²⁵I标记的ANG在三种内皮细胞表面都测到了170kDa的ANG特异结合蛋白,并分离得到了这种蛋白。在该实验条件下,并未观察到有ANG-肌动蛋白复合物存在。提示肌动蛋白和170kDa的ANG受体可能在ANG诱导的血管生长过程中的不同阶段有着各自特定的功能,即ANG先与细胞表面的肌动蛋白结合,使细胞相关蛋白酶系统激活并促使细胞移行,细胞移行使其邻近的细胞密度下降,在较少细胞数时剩余细胞表面的170kDa ANG受体即得到表达,这些细胞应答ANG的刺激,分化、充填移行细胞留下的空隙,当空隙填满,细胞重又变得致密时该受体即关闭。如此细胞密度依赖的受体表达方式使得ANG诱导的新毛细血管网的生长得到调控。

四、ANG的应用研究

ANG首先是从肿瘤细胞的培养基中提取到的,具有很强的促血管生长活性。对肿瘤生长大量的研究表明,肿瘤生长与新生血管的生长两者之间有着紧密的关联,即所谓“实体肿瘤的血管依赖性”^[14]。Shimoyama^[15]对比分析了胰腺癌患者和胰腺正常的自愿者血清ANG水平,前者(566.6±191.9ng/ml)明显高于后者(359.0±59.9ng/ml),且ANG mRNA表达和血清ANG浓度的增高与患者的预后相关。Chopra^[16]也证实子宫内膜癌的进展与血清中细胞因子、ANG及其他一些生长因子的增高有关。

利用ANG拮抗剂抑制肿瘤新生血管生长,进而起到抑制肿瘤生长的作用,这是ANG应用研究中首先得到众多学者关注的课题。Fett^[17]应用抗人ANG单克隆抗体mAb 26-2F在鸡胚试验中有效地抑制了ANG引起的血管

新生。Olson 等^[18]应用抗 ANG 单克隆抗体作抑瘤体外和动物体内实验,发现抗 ANG 单克隆抗体对离体培养的肿瘤细胞没有杀伤作用,但能防止或延迟动物 HT-29 肿瘤的发生。实验提示,ANG 单抗的抑瘤作用是通过中和 ANG 而生效的;在 HT-29 结肠腺癌的早期病程发展中,ANG 具有重要作用;抗 ANG 单克隆抗体在 ANG 依赖型肿瘤的治疗中具有一定的临床应用价值。此外,肌动蛋白也被认为是一种 ANG 拮抗剂,同样具有防止肿瘤生长的作用。这些 ANG 拮抗剂除对 HT-29 肿瘤有明显抑瘤作用外,对其他能分泌 ANG 的肿瘤也有抑制作用。Gho 等^[19]找到了二种肽类 ANG 拮抗剂 chANG 和 chGNA,能与 ANG 结合而抑制 ANG 与肌动蛋白间的作用,可明显抑制 ANG 在鸡胚中的促血管生长作用,从而认为 chANG 和 chGNA 可有效地治疗各种有 ANG 分泌的人类肿瘤。所有这些对 ANG 拮抗剂抗肿瘤作用的研究证明其确具相当光明的临床应用前景,为恶性肿瘤的治疗提供了新的思路和方法。

虽然 ANG 首先是从 HT-29 结肠腺癌培养细胞中得到,但在克隆 ANG 基因时,在人肝 cDNA 文库中筛得 7 个拷贝,提示 ANG 可能并非肿瘤特异。Rybak 等人^[20]研究了 ANG mRNA 在正常组织细胞中的分布,发现 ANG 在成纤维细胞、表皮细胞和外周血细胞中均有表达。Moenner^[21]也证实 ANG 在不同的人类细胞中有广泛的表达,包括源自隐静脉和脐静脉的内皮细胞、主动脉平滑肌细胞、成纤维细胞(胚胎、新生儿、成人)及肿瘤细胞。此外,在一些非肿瘤性疾病中也观察到了 ANG 增高现象。Ozaki^[22]收集了 30 例增生性糖尿病性视网膜病(proliferative diabetic retinopathy, PDR)和 21 例增生性玻璃体视网膜病(proliferative vitreoretinopathy, PVR)患者的玻璃体液,检测发现 ANG 水平均有明显增高。Burgmann^[23]比较了不同阶段的外周动脉阻塞性疾病(PAOD)患者的血清 ANG 水平,发现Ⅳ期患者的 ANG 浓度($467 \pm 26\text{pg/ml}$)明显高于正常对照者(358

$\pm 16\text{pg/ml}$)及无 PAOD 的其他病患者($406 \pm 25\text{pg/ml}$)。这些发现为 ANG 在非肿瘤性疾病防治中的应用提供了理论依据。

因此,除了利用 ANG 拮抗剂来抑制肿瘤血管增生外,利用 ANG 的促血管生长活性来治疗某些血管生长相关疾病、促进损伤组织的修复及动脉闭塞缺血性疾病的血管再生是人们关注的另一热点。King 等^[24]用 ANG 作半月板损伤修复的动物实验,结果显示,ANG 治疗组中有 52% 的动物半月板有局部血管生长,而对照组仅有 9%。实验表明,ANG 的促血管生长作用有助于损伤半月板纤维软骨的修复,具有一定的临床应用价值。血管生长是一个相当复杂的过程,有许多血管生长活性物质,包括肽类的诸多血管生长因子、小分子非肽类因子(如前列腺素、烟酰胺等)^[25]及铜离子^[26]等,都参与了体内血管生长的调控机制,ANG 只是其中之一。在血管生长机制中,ANG 究竟处于何种地位,与其他因素如何协同,这些问题仍有待于进一步的探索。与 FGF、VEGF 等其他一些血管生长因子相比,ANG 及其拮抗剂的应用研究也还很肤浅,要使之真正能用之于临床,血管生长因子相比,ANG 及其拮抗剂的应用研究也还很肤浅,要使之真正能用之于临床,还有相当长的路要走。

参 考 文 献

- [1] Fett, J W. et al., 1985, *Biochemistry*, 24: 5480-5486.
- [2] Strydom, D J. et al., 1985, *Biochemistry*, 24: 5486-5494.
- [3] Kurachi, K. et al., 1985, *Biochemistry*, 24: 5494-5499.
- [4] Shapiro, R. et al., 1986, *Biochemistry*, 25: 3527-3532.
- [5] Shapiro, R. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 8783-8787.
- [6] Mashtakova, A D. et al., 1993, *Morfologiya*, 105: 37-42.
- [7] Rybak, S M. et al., 1988, *Biochemistry*, 27: 2288-2294.
- [8] Badet, J. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 8427-8431.

- [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(stromelysin3, 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,