

- encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma[J]. *J Biol Chem*,2003,278:10824-10830
- 6 Durkin ME. Gene structure, tissue expression and linkage mapping of the mouse DLC21 gene[J]. *Gene*,2002,17:119-127
 - 7 Durkin ME, Ullmannova V, Guan M, *et al*. Deleted in liver cancer 3 (DLC-3), a novel RhoGTPase-activating protein, is downregulated in cancer and inhibits tumor cell growth[J]. *Oncogene*,2007
 - 8 Qiao F, Bowie JU. The many faces of SAM. *Sci STKE*. 2005;re7
 - 9 Iyer LM, Aravind L, Koonin EV. Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses. *J Virol*,2001,75:11720-11734
 - 10 Liao YC, Si L, Devere White RW, *et al*. The phosphotyrosine-independent interaction of DLC-1 and the SH2 domain of cten regulates focal adhesion localization and growth suppression activity of DLC-1. *J Cell Biol*,2007,176:43-49
 - 11 Yam JW, Ko FC, Chan CY, Jin DY, Ng IO. Interaction of deleted in liver cancer 1 with tensin2 in caveolae and implications in tumor suppression. *Cancer Res*,2006,66:8367-8372
 - 12 Yamaga M, Sekimata M, Fujii M, *et al*. A PLCdelta1-binding protein, p122/RhoGAP, is localized in caveolin-enriched membrane domains and regulates caveolin internalization. *Genes Cells*,2004,9:25-37
 - 13 Durkin ME, Yuan BZ, Thorgeirsson SS, *et al*. Gene structure, tissue expression, and linkage mapping of the mouse DLC-1 gene (Arhgap7). *Gene*,2002,288,119-127
 - 14 Guan M, Zhou X, Soultz N, *et al*. Aberrant methylation and deacetylation of deleted in liver cancer-1 gene in prostate cancer: potential clinical applications. *Clin Cancer Res*,2006,12:1412-1419
 - 15 Kim TY, Jong HS, Song SH, *et al*. Transcriptional silencing of the DLC-1 tumor suppressor gene by epigenetic mechanism in gastric cancer cells. *Oncogene*,2003,22:3943-3951
 - 16 Kim TY, Lee JW, Kim HP, *et al*. GTPase-activating protein for Rho, is associated with cell proliferation, morphology, and migration in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*,2007,355:72-77
 - 17 Seng TJ, Low JS, Li H, *et al*. The major 8p22 tumorsuppressor DLC1 is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal, and cervical carcinomas, and inhibits tumor cell colony formation. *Oncogene*,2007,26:934-944
 - 18 Yuan BZ, Durkin ME, Popescu NC. Promoter hypermethylation of DLC-1, a candidate tumor suppressorgene, in several common human cancers. *Cancer Genet Cytogenet*,2003,140:113-117
 - 19 Wong CM, Yam JW, Ching YP, Yau TO, Leung TH, Jin DY, Ng IO. Rho GTPase-activating protein deleted in liver cancer suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*,2005,65:8861-8868
 - 20 Sekimata M, Kabuyama Y, Emori Y, Homma Y. Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho. *J Biol Chem*,1999,274:17757-17762

(收稿:2009-08-28)

(修回:2009-12-21)

MCP-1 及 HIF-1 与肿瘤血管生成关系的研究进展

陈宝英 官成浓

一、MCP-1 与肿瘤血管生成的关系

1. MCP-1 的生物学特性:(1)趋化因子及受体:趋化因子(chemokine)是能使细胞向高浓度刺激物方向做定向运动的小分子细胞因子,为一类结构、功能相似,相对分子质量 8~10kDa 小相对分子质量蛋白质。对多种细胞(如白细胞、肿瘤细胞)具有趋化作用(使其作定向运动)。可由多种细胞产生,如淋巴细胞、NK 细胞、中性粒细胞、单核-吞噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞乃至上皮细胞和肿瘤细胞等。自 1987 年发现第 1 个趋化因子 IL-8 至今已发现并克隆出趋化因子达 50 余种^[1]。根据其 4 个保守的半胱氨酸残基中前两个的相对位置不同,可

将它们分成 4 大类:CXC(α)、CC(β)、C(γ)、CX3C(δ)趋化因子。根据配体的不同,趋化因子受体可分为 4 类,CXC 族受体(CXCR)、CC 族受体(CCR)、C 族受体(XCR1)和 CX3C 族受体(CX3CR)。它们属于 G 蛋白偶联的 7 次跨膜受体,目前已鉴定的趋化因子受体至少有 20 种^[2]。趋化因子与趋化因子受体结合后具有广泛的生物学功能,涉及免疫调节、器官形成、调节造血、神经元通讯、白细胞运动、血管生成以及恶性肿瘤的侵袭和转移等^[3]。(2)MCP-1 及受体:单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是趋化因子 CC 亚家族中的一员,于 1989 年首先在人胶质细胞瘤间单核细胞中发现和提纯^[4]。基因定位于 17q11.2~q12,包含了 3 个外显子与 2 个内含子,其中 5'端非翻译区及 23 个氨基酸的信号肽遗传信息和 MCP-1 蛋白的前 2 个氨

作者单位:524001 湛江,广东医学院附属医院肿瘤防治中心
通讯作者:官成浓,电子邮箱:guanchengnong@163.com

基酸由第1个外显子编码,第2个外显子编码3~40个氨基酸,而第3个外显子则编码C端其余36个氨基酸序列及3'端非翻译区^[5]。人MCP-1前体蛋白长99个氨基酸,切除23个氨基酸组成的信号肽分子先导序列后形成76个氨基酸的成熟分子,为碱性蛋白。MCP-1分子中11与36Cys和12与52Cys之间所形成的两个链内二硫键以及Try28和Arg30,对于MCP-1的生物学活性是必需的。在氨基酸水平上,MCP-1与另外两种单核细胞趋化蛋白MCP-2(HC14)和MCP-3(NC28)分别有62%和72%同源性,与CXC亚族中IL-8有24%同源性。MCP-1可以结合的趋化因子受体有:CCR1,CCR2,CCR4,CCR5,CCCKR2A和CCCKR2B。MCP-1主要通过与CCR2结合发挥其生物学效应,CCR2是含有7个跨膜区的G蛋白偶联受体,位于3号染色体上。由于剪切方式不同,产生CCR2A、CCR2B两种类型。当MCP-1与CCR2受体结合后,引起胞内PTX敏感的胞内Ca²⁺内流增加、cAMP抑制、磷脂酶C以及磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)的激活。同时也有研究证实,趋化因子发挥生物学效应存在其他信号转导通路。人MCP-1,由包括正常组织细胞、白细胞及许多肿瘤细胞等多种细胞分泌,在正常组织细胞中,MCP-1的主要细胞来源是内皮细胞、成纤维细胞及外周血单核细胞;而在部分肿瘤细胞株中,如乳腺癌、前列腺癌细胞等均发现存在MCP-1表达。MCP-1基因表达的调控主要发生在转录水平,一些刺激因子如脂多糖(LPS)、白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素2 γ (IFN2 γ)、血小板源性生长因子(PDGF)可上调MCP-1的表达;而雌激素、类视黄质等可下调MCP-1的表达^[6]。MCP-1对单核细胞、T淋巴细胞、嗜碱性细胞、NK细胞及造血祖细胞等都具有趋化活性而对嗜中性粒细胞无作用。在体外研究中,MCP-1可激活单核-吞噬细胞使其胞质内游离钙水平升高、释放溶酶体酶、超氧阴离子,及可上调单核细胞和吞噬细胞黏附分子如integrin家族 β 2组和 α 4分子的表达和细胞因子IL-1、IL-6的产生。

2. MCP-1与血管生成:MCP-1是主要的吸引单核-吞噬细胞到炎症、肿瘤部位的趋化因子,参与多种病理、生理过程,它的功能在于一方面能介导局部的免疫炎症反应,即趋化和激活单核-吞噬细胞,使之产生炎症细胞因子并放大这一过程。目前研究得较多的是在动脉粥样硬化中的作用,认为MCP-1介导的单核细胞转内皮迁移在动脉硬化形成早期起

关键作用,单核细胞迁移到内皮后变为吞噬细胞和泡沫细胞(脂质积聚),吞噬细胞、血管平滑肌细胞等亦分泌趋化因子与生长因子,引发慢性炎症反应,最终形成成熟斑块。Daly等在基因工程高脂兔模型中的研究表明:血管壁过度表达MCP-1,可加速发生动脉粥样硬化的进程^[7];另一方面在于能够诱导和刺激病理性血管生成,在许多炎症性疾病中,如动脉粥样硬化和类风湿性关节炎,这些疾病的显著特点就是较多的血管生成,而且MCP-1有着较高的表达^[8]。部分肿瘤细胞也可直接分泌MCP-1,通过促进肿瘤的血管新生来促进肿瘤的生长,在乳腺癌、膀胱癌、骨癌、非小细胞肺癌、食管癌等^[9-13]研究中证实了MCP-1的表达和分泌与恶性肿瘤微血管的密度、黏附分子的表达以及侵袭和转移的出现密切相关,表明MCP-1可能通过血管生成影响肿瘤的进展和预后。

目前MCP-1介导血管发生的分子机制尚未完全清楚,目前主要认为MCP-1参与肿瘤血管新生的机制包括两种途径:即直接途径和间接途径。(1)直接途径:MCP-1可以直接作用于血管内皮细胞膜上的CCR2受体,趋化内皮细胞定向运动,促进血管生成。Rosalba Salcedo等在鸟绒毛膜尿囊膜试验(CAM)和鼠主动脉环萌发试验中,在排除炎症细胞浸润影响的情况下,研究结果发现:MCP-1可在微摩尔浓度水平诱导人内皮细胞趋化,诱导体内血管形成,这种血管生成作用也与内皮细胞表面CCR2受体表达相一致,显示了MCP-1在血管生成中的作用^[14]。用MCP-1的中和抗体治疗人乳腺癌细胞负载性免疫缺陷型小鼠,发现其成活率明显提高,并抑制肺部转移灶的生长,亦表明MCP-1是血管生成的直接介质。(2)间接途径:MCP-1可能通过使肿瘤内浸润的吞噬细胞,即所谓肿瘤相关吞噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs)的聚集、迁徙及释放VEGF、TNF- α 、IL-8等而发挥间接的血管生成作用,TAMs同时还可分泌基质金属蛋白酶MMP2、MMP9等,参与细胞外基质破坏与重构,促进肿瘤细胞侵袭和转移。TAMs主要由外周血循环中不成熟的单核细胞经趋化因子的募集作用到达肿瘤组织,并在特定的肿瘤微环境作用下,定向发育成熟,获得特定的细胞表型,发挥特定的功能,是肿瘤间质的一个主要成分,其浸润进入肿瘤被许多细胞素和化学介质调节,而MCP-1是主要的调节剂。而NiuJ等认为MCP-1促进血管发生是由新的转录因子MCP-1诱导蛋白(MCPIP)通过转录激活钙黏着蛋白12

(cdh12)和钙黏着蛋白19(cdh19)介导发生的^[15]。

二、HIF-1与肿瘤血管生成的关系

1. HIF-1的生物学特性:缺氧诱导因子1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是1992年由Semenza等在低氧的肝细胞癌细胞株Hep3B细胞的核提取物中发现的一种蛋白^[16]。是由120kDa的 α 亚基和91~94kDa的 β 亚基组成的异二聚体转录子,属于(basic-helix-loop-helix)bHLH/PAS转录因子家族,基因定位于染色体14q21~q24^[17]。该家族的主要结构特征是在N端有一个bHLH区,负责和DNA结合,紧随其后的是一个保守的PAS(Per、AN-RT、Sim)区,其职责主要为与另一个亚单位形成二聚体,而C末端的变化变大,与其转录活性密切相关^[18]。HIF-1 α 多肽链含826个氨基酸残基,是唯一的氧调节亚单位,它决定HIF-1的活性,氧对HIF-1活性的调节主要通过该亚基。HIF- β 是芳烃受体核转位子(aryl hydrocarbon receptor or nuclear translocator, ARNT)基因产物,具有789或774个氨基酸残基,与HIF-1在核内的稳定性维持、二聚体形成后构象变化以及DNA结合等有关。HIF-1 α 为HIF-1所特有,对氧的依赖性较强,仅在缺氧细胞核中存在。正常细胞内环境中HIF-1 α 的含量甚微,很难检测到,而在低氧环境中,HIF-1 α 却大量集聚并转移到细胞核中,此过程称作核转位。HIF-1 β 对氧的依赖性较弱,但在HIF-1中也必不可少。因为HIF-1 α 和HIF-1 β 均有氨基酸末端的bHLH-pas结构,而它是两个亚基聚合所必需的结构^[19],只有两个亚基聚合,并且发生适形性变化后与其要调节的下游因子或酶(如VEGF、P53和Epo)的缺氧反应元件(hypoxia response element, HRE)结合,才能发挥调节作用。HIF-1广泛参与哺乳动物细胞中缺氧诱导产生的特异应答。在缺氧状态下,肿瘤细胞可通过位于细胞膜上的氧分子受体来感受低氧信号,使细胞内许多与肿瘤血管生成相关的基因的转录和表达发生改变,从而对缺氧作出复杂的应激反应,增加氧气供应。这些基因被称为缺氧反应基因(hypoxia inducible genes)。缺氧反应基因中均存在细胞特异性的缺氧反应元件,这些缺氧反应元件中存在一共同序列5'-TAGCGTG-3'(增强子)^[20],而HIF-1能特异性结合到缺氧反应元件增强子中,参与相应靶基因的转录调控。受HIF-1调控的缺氧反应基因涉及物质与能量代谢、血管生成、儿茶酚胺代谢等,包括血管内皮生长因子(VEGF)、血红素加氧酶(HO-1)、诱导型一氧化氮合酶、促红细胞

生成素、葡萄糖载体蛋白1及糖酵解酶等。

2. HIF-1调控VEGF机制:恶性肿瘤在生长过程中,由于组织增生过快必然会造成局部组织严重缺氧和供能与耗能之间的不平衡。肿瘤细胞适应缺氧的重要机制之一是新生血管体系形成,大量研究已证实VEGF是刺激肿瘤血管形成最关键的生长因子,其表达受许多外部因子调控,其中HIF-1通过增强VEGF的转录活性与增加VEGFmRNA稳定性两个方面来调节VEGF的表达。在VEGF基因转录起始点上游大约1kb的5'侧翼区域有286bp的HRE,包括HIF-1结合共有区域(结合点序列为5'-CACAG-3'和5'-ATCGTGGG-3')和其上游的激活蛋白1(activator protein 1, AP1)结合点。在缺氧条件下积累起来的HIF-1可与VEGF基因5'端低氧反应元件结合,通过环二磷酸(cGMP)途径调节VEGF表达,另外,NO可与VEGF基因HRE结合,增加HIF-1结合活性和HIF-1 α 蛋白水平。VEGF进而以旁分泌方式作用于存在于血管内皮细胞表面的两种受体VEGFR1和VEGFR2,从而激活了一系列的缺血转导通路,诱导新生血管的生成,增高毛细血管通透性从而缓解组织、细胞的缺血缺氧。

3. HIF-1与各种恶性肿瘤:正如前述,HIF-1能通过诱导VEGF和糖酵解相关酶的表达,增加机体对肿瘤组织的供血、供氧和供能。这说明HIF-1与肿瘤的发生、发展密切相关。对活检标本的免疫组织化学分析已证明,在人类大多数肿瘤中HIF-1 α 呈过度表达,尤其是存在缺氧微环境的肿瘤组织,并且HIF-1的表达水平与各种实体瘤的微血管密度相关。其中包括卵巢癌、胃癌、前列腺癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、骨肉瘤、鼻咽癌、结直肠癌、乳腺癌等。并发现这些癌组织中HIF-1 α 过表达,特别在肿瘤坏死明显的区域和肿瘤浸润的边缘HIF-1 α 表达明显增多,而肿瘤组织内的基质细胞和邻近的正常组织则未见HIF-1 α 的表达。

综上所述,血管生长在组织修复、炎症和恶性肿瘤这些生理与病理过程中起着至关重要的作用。对于恶性肿瘤,瘤细胞通过新生的血管组织获得必要的养分,带走大量的新陈代谢产物,同时瘤细胞穿过新生的毛细血管经由血路远处转移。新生血管形成是有多种因子参与的复杂过程,取决于正性和负性调控因子的平衡状态,在肿瘤新生血管形成的影响因素中,最有效和特异的因子就是血管内皮生长因子,研究表明MCP-1和HIP-1均可上调VEGF的表达,

是恶性肿瘤诱导新生血管形成的两个重要调控因子。目前 MCP-1 介导血管发生的分子机制尚未完全清楚, MCP-1 除了直接促进血管生成外, Hong KH 等认为 MCP-1 可正调节缺氧诱导因子-1 α 基因表达, 而 HIF-1 α 基因可通过激活 p42/44MAPK 而诱导 VEGF-A 在人的主动脉壁和主动脉内皮细胞的表达。目前抑制 HIF-1 活性成为肿瘤血管生成抑制药物研究的新热点, 而通过对 MCP-1 表达的调控亦可能成为肿瘤治疗的新靶点。通过抑制 MCP-1 可能使肿瘤内 HIF-1 α 的表达减少, 从而使 HIF-1 α 诱导血管生成减小肿瘤的复发和转移。MCP-1 等趋化因子、缺氧诱导因子等在肿瘤中的作用值得进一步深入研究, 而肿瘤微环境中的趋化因子的基因调节、作用机制网络, 也可能成为肿瘤治疗中的新靶点。

参考文献

- 1 Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines. *Dev Com Immunol*, 2004;28(5):443-460
- 2 Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression [J]. *Eur J Cancer*, 2006, 42(6):760-767
- 3 Wang J, Adelsen DL, Yilmaz A, et al. Genomic organization, annotation, and ligand-receptor inferences of chicken chemokines and chemokine receptor genes based on comparative genomics [J]. *BMC Genomics*, 2005, 6(1):45
- 4 Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, et al. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants [J]. *J Exp Med*, 1989;169(4):1449-1459
- 5 Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 1999, 10(1):61-86
- 6 Kumar SN, Boss JM. Site A of the MCP-1 distal regulatory region functions as a transcriptional modulator through the transcription factor NF1 [J]. *Mol Immunol*, 2000, 37(11):623-632
- 7 Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity; therapeutic opportunities and controversies [J]. *Microcirculation*, 2003, 10(3-4):247-257
- 8 Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces Monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*,

- 1990, 87:5134-5138
- 9 Saji H, Koike M, Yamori T, et al. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2001, 92(5):1085-1091
- 10 Parekattil ST, Fisher HA, Kogan BA, et al. Neural network using combined urine nuclear matrix protein-22, MCP-1 and urinary intercellular adhesion molecular-1 to detect bladder cancer [J]. *J Urol*, 2003, 169(3):917-920
- 11 David R G. Role of stromal-derived cytokines and growth factor in bone metastasis [J]. *Cancer*, 2003, 97(3 supp 1):738
- 12 Shibakura M, Niiya K, Kiguchi T, et al. Induction of IL-8 and monocyte chemoattractant protein-1 by doxorubicin in human small cell lung carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2003, 103(3):380-386
- 13 Koide N, Nishio A, Sato T, et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus [J]. *Am J Gastroenterol*, 2004, 99(9):1667-1674
- 14 Rosalbo Salcedo, Maria Lourdes Ponce, et al. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*, 2000, 96(1):34-40
- 15 Niu J, Azfer A, Zhelyabovska O, Fatma S, et al. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP). *J Biol Chem*, 2008, 283(21):14542-14551
- 16 Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 1992, 2(12):5447-5454
- 17 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:5510-5514
- 18 Jain S, Dolwick KM, Schmidt JV, et al. Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *J Biol Chem*, 1994, 269(50):31518-31524
- 19 Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*, 2000, 88(4):1474-1480
- 20 Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(1):47-53

(收稿:2009-08-28)

(修回:2009-10-26)

第10届中国海洋药物学术研讨会召开

由中国药学会海洋药物专业委员会主办的第10届中国海洋药物学术研讨会在青岛召开。本次研讨会以“海洋创新药物——人类健康的新希望”为主题, 总结交流近年来我国海洋创新药物研究开发及产业化取得的成果和经验。开幕式上, 中国药学会海洋药物专业委员会主任委员管华诗院士颁发了首届华实海洋药物青年科技奖。中国海洋大学副教授李春霞、山东大学教授李敏勇获此殊荣。中国海洋大学副校长董双林、中国药学会副秘书长陈兵也出席了开幕式并致辞。据悉, 本次研讨会还邀请到“重大新药创制”国家科技重大专项技术副总师、天津中医药大学校长张伯礼等30余位专家学者做大会报告和专题报告。