

PEDF 抗肿瘤的生物学作用

刘玉伟 卢云汉 孙鹏程 李乐晨 徐万海

摘 要 色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是丝氨酸蛋白酶抑制因子超基因家族的一员,显著的特点是序列高度保守、分子结构独特。因其具有营养和保护神经、抗新生血管生成、促进肿瘤分化和凋亡等多种生物学功能而受到广泛关注与研究。大量研究表明 PEDF 抑制实体肿瘤血管生成功效显著,因此其抑制血管生成的功能尤为受到重视。同时 PEDF 也是近年来国外研究较多的肿瘤生长和转移抑制因子之一。如果将 PEDF 应用于肿瘤的防治中,笔者还需对其抗肿瘤的生物学效应有更深入的理解。因此笔者现就其生物化学、抗肿瘤表现等方面进行综述。

关键词 色素上皮衍生因子 肿瘤 生长

中图分类号 R730.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.004

色素上皮衍生因子(PEDF),最早从胎儿视网膜色素上皮(RPE)细胞条件培养基中发现,是一种相对分子质量为 50kDa 的分泌性糖蛋白,目前的研究已经从最初发现的可以诱导视网膜母细胞瘤细胞分化到现在的抗血管生成作用、抗肿瘤生长和抗肿瘤细胞转移等作用。PEDF 生物学功能的多样性看似复杂,但参与这一系列过程的作用因子是却是一致的。

一、PEDF 的生物化学

PEDF 作为丝氨酸蛋白酶抑制因子超基因家族成员之一,属于一组具有共同三维结构的蛋白质。其比较显著的一个特点是其具有高度保守的序列,但其不具有抑制蛋白酶的功能。人类的 PEDF 基因定位于染色体 17p13.1 短臂末端,全长为 16kb,其基因由 8 个外显子和 7 个内含子构成,其中第 4 第 7 外显子呈多态性,AG/GT 序列分布于外显子与内含子连接处,基因的 5' 端为 Alu 序列,相对分子质量为 46.3kDa 的 PEDF 多肽链由 418 个氨基酸残基编码^[1-3]。PEDF 的三维结构的测定是通过 X 线晶体学,由蛋白质数据库(PDB)中的标示符 1IMV 来测定,显示蛋白质折叠方式与丝氨酸类似。大多数丝氨酸是丝氨酸蛋白酶抑制剂,例如胰蛋白酶,抗胰凝乳蛋白酶和凝血酶等。而另一些没有蛋白酶抑制作用,例如卵清蛋白,血管紧张素原和 maspin 蛋白等^[3,4]。PEDF、抗凝血酶、血管紧张素原和 maspin 蛋白表现

出来的抗新生血管生成和抗肿瘤活性,说明有一个共同的决定簇使它们表现出这种功能。PEDF 因不具备压缩构象到松散构象的变化,所以 PEDF 也被认为是失去了蛋白酶抑制活性的非抑制性丝氨酸亚组成员之一,换言之 PEDF 没有活化的丝氨酸蛋白酶抑制的特性。但有趣的是在进化过程中,这些没有蛋白酶抑制作用的丝氨酸获得了其他功能,如抗血管生成和抗肿瘤活性等功能^[3]。

二、PEDF 与肿瘤的相关性

PEDF 已经涉及多个生物过程,如神经再生、神经保护、抗血管生成、视网膜保护、干细胞再生和炎症等。而比较令人感兴趣的一个新出现的领域是 PEDF 的抗肿瘤作用。而这一新发现主要源于研究证实了 PEDF 具有抗血管生成和转移作用。此外,在动物模型中,外源性给予 PEDF 来补充在肿瘤发展过程中下降的 PEDF,这使肿瘤生长受到了抑制并且延长了患者的生存时间。但需要注意的一点是 PEDF 的功能和机制往往与促癌过程是相反的。

1. 从促进神经细胞分化到抑制肿瘤生长: PEDF 的发现基于其促进了人类 Y-79 和 WERI 视网膜母细胞瘤细胞分化这一事实^[1]。PEDF 可促进神经突从上述细胞向外生长,并且可使神经元特异性烯醇化酶和神经丝蛋白等神经元特异性标志物表达增高,还可促进视网膜母细胞瘤以及神经源性的其他肿瘤细胞分化。从这一结果可以看出 PEDF 可以直接作用于肿瘤细胞,并且具有降低肿瘤细胞恶性表型的作用。有研究表明,用 PEDF 处理视网膜母细胞比未经处理的对照组致瘤性降低。在大脑中,施万细胞自然分泌 PEDF 使神经母细胞瘤细胞分化成为恶性程度

基金项目:黑龙江省杰出青年基金资助项目(JC201311)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学第四附属医院泌尿外科

通讯作者:徐万海,博士,教授,博士生导师,电子信箱:xuwanhai@

163.com

较低的表型,并且同时抑制了肿瘤血管的生成,从而表明 PEDF 在体内具有多重抗肿瘤作用^[3-5]。在前列腺癌细胞中 PEDF 还可引起神经内分泌分化同时抑制肿瘤血管生成^[4]。最近,又有研究表明 PEDF 可抑制乳腺癌细胞脑转移瘤的数量与增殖,并且保护转移瘤附近的神经元细胞免于死亡^[6]。这使笔者看到 PEDF 具有限制癌细胞脑转移和保护大脑细胞的双重作用。PEDF 的诱导能力可能还具有使细胞生长停滞和促进肿瘤细胞分化为低恶性表型的作用。但保护正常神经细胞的功能这需要由一个复杂的调控系统来完成,具体机制还需要进一步探究

2. 从抑制眼部新生血管形成到抗肿瘤血管生成作用:美国国家癌症研究所指定把抗肿瘤血管生成作为国家重点研究项目之一。Dawson 等^[1]发现 PEDF 在眼中是一种天然有效的血管生成抑制剂。在生理条件下, PEDF 的作用是维持 IPM、玻璃体和房水中没有血管,这对视觉功能的影响至关重要。需要指明的是 PEDF 在眼中的浓度与眼部血管发育呈负相关^[8],且 PEDF 在体内过表达或局部蛋白的传递均可抑制眼部血管新生,延迟眼部感光和神经视网膜细胞的死亡^[7-9]。这些事实清楚的表明 PEDF 是血管生成的内源性抑制剂。上述发现奠定了科学工作者们研究 PEDF 抑制肿瘤血管生成的基础。

大量的实验研究证实 PEDF 表达水平的降低是驱动肿瘤生长的机制之一。在胰腺癌动物模型中,用慢病毒载体介导使 PEDF 过表达,用以阻断新生血管^[10]。同样的,在肝母细胞瘤异种移植模型中,用腺病毒或者是腺病毒相关表达 PEDF 的病毒载体来增强肿瘤内 PEDF 水平,通过减少血管生成和降低 VEGF 表达来抑制肿瘤生长。PEDF 过表达也可抑制骨肉瘤原位生长、血管生成和转移^[10]。PEDF 对原发黑色素瘤异种移植物的影响大多与抑制肿瘤内血管生成反应和降低微血管密度(MVD)相关。在此模型中 PEDF 通过对血管生成的抑制从而抑制黑色素瘤的生长。此外,在体外 PEDF 通过诱导细胞凋亡抑制黑色素瘤的生长^[11]。在小鼠体内还研究发现 PEDF 发挥其抑制血管形成的生物学功能来抑制异位的 SO-RB50 视网膜母细胞瘤移植瘤的生长,即同时降低了 VEGF 和 MVD 的表达水平^[1]。同样的,无论同正常宫颈上皮相比还是与非肿瘤瘤周上皮相比,宫颈癌癌巢中的 PEDF 表达水平都下降。在小鼠宫颈癌移植瘤模型中腹腔内注射重组 PEDF,肿瘤生长得到抑制。这不仅与 VEGF 和 MVD 的表达水平降低有

关,还与 PEDF 抑制癌细胞增殖和诱导内皮细胞凋亡有关^[12]。另据报告显示 PEDF 下调缺氧诱导因子 1 α (HIF1 α)和 VEGF 表达,抑制胃癌在异种移植瘤模型中血管的生成和肿瘤的增长^[13]。目前已经证实, PEDF 与放疗相结合治疗鼻咽癌效果明显,好于两种方法单独使用。此方法 PEDF 和射线共同作用,下调 VEGF 的表达,抑制血管生成^[14]。此外,通过腺病毒相关介导的基因转染使 PEDF 过表达,通过降低 MVD 和促进肿瘤细胞凋亡来抑制 Lewis 肺癌生长,抑制大肠癌腹膜转移的小鼠模型肿瘤转移^[15,16]。

PEDF 的抗血管生成作用与中断肿瘤内血管网有关。PEDF 阻断内皮细胞毛细血管网的形成。但需要说明的一点是 PEDF 是选择性的诱导活跃的新生内皮细胞凋亡并不是诱导成熟的内皮细胞凋亡或是已存在血管凋亡。与其他内源性新生血管抑制剂相比, PEDF 抑制新生血管生成这一生物学功能使得其成为药物开发中一个很好的候选药物。目前认为 PEDF 是与血管内皮细胞表面上特定的受体结合触发抗血管生成信号转导通路,从而使基因的表达改变,发挥其强大的抗新生血管生成作用^[17]。总之,在众多的动物模型中 PEDF 表达水平的升高,可使肿瘤生长收到抑制,这主要是通过抑制肿瘤内新生血管形成,抑制内皮细胞增殖和促进内皮细胞凋亡,下调促血管生成因子表达等方式完成的。

3. PEDF 对肿瘤细胞凋亡、增殖的影响:如上所诉的研究指出, PEDF 不仅有促进细胞分化和抗血管生成作用, PEDF 还对体内肿瘤生长有直接作用。PEDF 能抑制体外培养的细胞增殖,促进其凋亡。用外源重组 PEDF 诱导体外上皮细胞凋亡,并通过引起肿瘤广泛坏死和显著减少其余有活性肿瘤区域中的细胞扩散来抑制前列腺肿瘤在体内的生长。与对照组相比,通过腺病毒转染使 PEDF 过表达,也可以抑制细胞增殖并增加 PC-3 前列腺癌细胞凋亡。类似的,经 PEDF 处理的神经胶质瘤细胞,细胞的死亡数量与 PEDF 剂量呈正比^[18]。PEDF 的过表达可以抑制癌细胞生长,诱导癌细胞凋亡,此过程同时伴随血小板反应蛋白上调,血管内皮生长因子和成纤维细胞生长因子 2(FGF2)的下调以及 MMP9 的降低^[19]。同样的, PEDF 诱导细胞凋亡与 P53 及 Bax 表达水平增高和 Bcl-2 的抑制相关。在体内, PEDF 转染的 U251 胶质瘤细胞也发生凋亡且肿瘤大小显著缩小。在其他过表达 PEDF 的异种移植瘤模型中也发现了细胞凋亡,例如大肠癌小鼠腹腔转移癌和 Lewis 肺癌

中^[15,16,20]。在体外实验中,重组 PEDF 可诱导骨肉瘤的 Sao-2 细胞凋亡,在小鼠体内实验中重组 PEDF 降低 Sao-2 的胫骨肿瘤生长和肺转移瘤的数量^[17]。这些结果证明了 PEDF 对肿瘤细胞存活具有负面的影响。Konson 等^[21]比较了用 PEDF 处理的 MDA-MB-231、HCT116 及 U87-MG 肿瘤细胞和同样用 PEDF 处理的 BAEC 及 HUVEC 内皮细胞的凋亡率得出 PEDF 对体外培养的细胞、PEDF 对内皮细胞凋亡诱导效果强于对肿瘤细胞的诱导效果这一结论。

大量实验研究已经证实 PEDF 诱导凋亡的机制,如 Bcl-2 家族、Fas/FasL、PEDF 受体本身、c-Flip 等^[22]。同时另有研究表明 PEDF 与受体结合发挥功能,目前发现至少有两种 PEDF 受体,分别是层粘连蛋白受体(laminin receptor,LR)和脂肪甘油三酯酯酶(adipose triglyceride lipase,ATGL),这两种蛋白能与 PEDF 以高亲和力结合并激活 NF- κ B 旁路发挥生物学功能。NF- κ B 旁路对神经元的保护起到重要作用:避免神经元细胞受到凋亡引起的细胞死亡。同时 PEDF 可促进角膜上皮细胞、前列腺良性生长^[1]。

4. PEDF 抑制肿瘤细胞的转移与侵袭:在众多肿瘤中笔者观察到 PEDF 可以明显的抑制肿瘤血管新生,从而抑制肿瘤生长及转移。肿瘤临床治疗失败的事例中,导致患者死亡最主要的原因是肿瘤细胞的转移,这与肿瘤新生血管关系密切。在通过对正常前列腺组、前列腺癌及癌旁组织的研究中发现,PEDF 在前列腺癌中表达量低且与前列腺癌的恶性度呈负相关^[1]。在体内外的转移模型中,可以看到 PEDF 的表达在转移瘤中明显下降,Fitzgerald 等研究发现,重新恢复高表达水平的 PEDF 会抑制肿瘤细胞的转移,在他的实验中也发现 PEDF 过表达可以减少人、鼠乳腺癌转移到脑的可能,并且这种方式非常迅速而与血管生成无关^[23]。同时,在离体细胞试验中 PEDF 表现出强大的抗肿瘤迁徙作用,另外还有对神经元的保护作用^[24]。此外,另有人研究发现在小鼠中肾细胞肿瘤移植肿瘤的生长可以受到 PEDF 的抑制。PEDF 还能通过诱导细胞凋亡来抑制黑色素瘤细胞的生长。这些结论都证明了 PEDF 既是一种转移抑制因子,也是一种神经保护因子。同时更表明了 PEDF 在治疗肿瘤转移与侵袭方面具有巨大的应用价值。

三、展 望

综上所述,无论在体外还是体内,PEDF 都发挥其强大的抗肿瘤作用。在大多数肿瘤中无论直接作用或通过腺病毒载体等转导来提高 PEDF 浓度均能

抑制肿瘤生长、抗肿瘤新生血管生成、减少转移瘤细胞数量以及促进肿瘤细胞凋亡。PEDF 以其强大的抑制新生血管生成及抗肿瘤作用在肿瘤治疗研究领域中日益受到青睐。但 PEDF 在体内抗肿瘤具体作用机制的研究才刚刚开始,还需要众多科学工作者的共同努力去探索明确的作用机制。同时 PEDF 受体的发现令人激动,它不仅强调了在抗肿瘤中 PEDF 的重要性,而且还连接了细胞生物学之前没有涉及的领域。

PEDF 受体在癌症发生和进展过程中作用的研究,以及在肿瘤组织和正常组织中相对定量的研究对于潜在的治疗目的都是有益的。精确地掌握 PEDF 是如何在特定的细胞环境和特定的肿瘤中促进其对防癌进展的多样作用,对我们来说意义重大。同时 PEDF 众多的生物学功能也显示出其应用到临床治疗中的巨大潜力。值得欣慰的是在任何研究的动物模型中从未出现给药中毒的结果^[9]。因此,将 PEDF 应用到临床治疗中不仅要继续探究 PEDF 具体的作用机制还要关注如何安全、高效、高性价比的驾驭 PEDF,将其多种生物学功能尽数发挥。所以,笔者认为 PEDF 在抗肿瘤方面具备天然优势,会为人类对抗肿瘤产生积极作用。

参考文献

- 1 Becerra SP, Notario V. The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(4): 258-271
- 2 Xiang JD, Zhou LN, Xi XW. Research progress of PEDF in tumors [J]. *Journal of Modern Oncology*, 2011, 19(4): 812-815
- 3 Silverman GA, Whisstock JC, Bottomley SP, *et al.* Serpins flex their muscle I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(32): 24299-24305
- 4 Whisstock JC, Silverman GA, Bird PI, *et al.* Serpins flex their muscle II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization, and transport functions[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(32): 24307-24312
- 5 Moghaddam - Taaheri S, Aqarwal M, Amaral J, *et al.* Effects of docosahexaenoic acid in preventing experimental choroidal neovascularization in rodents[J]. *J Clin Experiment Ophthalmol*, 2011, 2:10
- 6 Fitzgerald DP, Subramanian P, Deshpande M, *et al.* Opposing effects of pigment epithelium - derived factor on breast cancer cell versus neuronal survival: implication for brain metastasis and metastasis - induced brain damage. [J] *Cancer Res*, 2012, 72:144-153
- 7 Broadhead ML, Choong PF, Dass CR. Efficacy of continuously administered PEDF - derived synthetic peptides against osteosarcoma growth and metastasis[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012:230298
- 8 Chavan S, Hudson LK, Li JH, *et al.* Identification of pigment epithelium

- lium – derived factor as an adipocyte derived inflammatory factor[J]. Mol Med, 2012, 18:1161 – 1168
- 9 Banumathi E, Sheikpranbabu S, Haribalaganesh R, *et al.* Retracted: PEDF prevents reactive oxygen species generation and retinal endothelial cell damage at high glucose levels[J]. Experimental Eye Research, 2010, 90(1): 89 – 96
- 10 Yang H, Grossniklaus HE. Constitutive overexpression of pigment epithelium – derived factor inhibition of ocular melanoma growth and metastasis[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51:28 – 34
- 11 Unterlauff JD, Eichler W, Kuhne K, *et al.* Pigment epithelium – derived factor released by Muller glial cells exerts neuroprotective effects on retinal ganglion cells[J]. Neurochem Res, 2012, 37:1524 – 1533
- 12 Yang J, Chen S, Huang X, *et al.* Growth suppression of cervical carcinoma by pigment epithelium – derived factor via anti – angiogenesis [J]. Cancer Biol, Ther, 2010,9:967 – 974
- 13 Zhang Y, Han J, Yang X, *et al.* Pigment epithelium – derived factor inhibits angiogenesis and growth of gastric carcinoma by down – regulation of VEGF[J]. Oncol Rep, 2011, 26:681 – 686
- 14 Xu Z, Fang S, Zuo Y, *et al.* Combination of pigment epithelium – derived factor with radiotherapy enhances the antitumor effects on nasopharyngeal carcinoma by downregulating vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis [J]. Cancer Sci, 2011, 102: 1789 – 1798
- 15 He SS, Shi HS, Yin T, *et al.* AAV – mediated gene transfer of human pigment epithelium – derived factor inhibits Lewis lung carcinoma growth in mice[J]. Oncol Rep, 2012, 27:1142 – 1148
- 16 Wu QJ, Gong CY, Luo ST, *et al.* AAV – mediated human PEDF inhibits tumor growth and metastasis in murine colorectal peritoneal carcinomatosis model[J]. BMC Cancer,2012,12:129
- 17 Zolocheska O, Yu G, Gimble JM, Figueiredo ML. Pigment epithelial – derived factor and melanoma differentiation associated gene – 7 cytokine gene therapies delivered by adipose – derived stromal/ mesenchymal stem cells are effective in reducing prostate cancer cell growth[J]. Stem Cells Dev, 2012, 21:1112 – 1123
- 18 Grippo PJ, Fitchev PS, Bentrem DJ, *et al.* Concurrent PEDF deficiency and Kras mutation induce invasive pancreatic cancer and adipose – rich stroma in mice[J]. Gut, 2012, 61:1454 – 1464
- 19 Fernandez – Barral A, Orgaz JL, Gomez V, *et al.* Hypoxia negatively regulates antimetastatic PEDF in melanoma cells by a hypoxia inducible factor – independent, autophagy dependent mechanism[J]. PLoS One, 2012, 7:e32989
- 20 Cui FY, Song XR, Li ZY, *et al.* The pigment epithelial – derived factor gene loaded in PLGA nanoparticles for therapy of colon carcinoma[J]. Oncol Rep, 2010, 24:661 – 668
- 21 Konson A, Pradeep S, Seger R. Phosphomimetic mutants of pigment epithelium – derived factor with enhanced antiangiogenic activity as potent anticancer agents[J]. Cancer Res, 2010, 70:6247 – 6257
- 22 Wu QJ, Gong CY, Luo ST, *et al.* AAV – mediated human PEDF inhibits tumor growth and metastasis in murine colorectal peritoneal carcinomatosis model[J]. BMC Cancer, 2012, 12(1): 129 – 134
- 23 Deshpande M, Notari L, Subramanian P, *et al.* Inhibition of tumor cell surface ATP synthesis by pigment epithelium – derived factor: implications for antitumor activity[J]. Int J Oncol,2012,41:219 – 227
- 24 Ji D, Li M, Zhan T, *et al.* Prognostic role of serum AZGP1, PEDF and PRDX2 in colorectal cancer patients[J]. Carcinogenesis,2013, 34(6):1265 – 1272

(收稿日期:2015 – 03 – 31)

(修回日期:2015 – 04 – 05)

(上接第 10 页)

- 11 Erben P, Storb P, Horisberger K, *et al.* KRAS and BRAF mutation and PETEN expression do not predict efficacy of cetuximab – based chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2011,81(4): 1032 – 1038
- 12 Sun PL, Li B, Ye QF. Effect of neoadjuvant cetuximab,capecitabine, and radiotherapy for locally advanced rectal cancer:results of a phase II study[J]. Int J Colorectal Dis,2012,27(10):1325 – 1332
- 13 Fokas E. Preoperative chemoradiation therapy with capecitabine/oxaliplatin and cetuximab in rectal cancer: long – term results of a prospective phase 1/2 study[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2013,87(5): 992 – 999
- 14 Eisterer W. Preoperative treatment with capecitabine, cetuximab and radiotherapy for primary locally advanced rectal cancer – a phase II clinical trial[J]. Anticancer Res, 2014,34(11): 6767 – 6773
- 15 Bengala C, Patelli S, Bertolini F, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene copy number KRAS mutation and pathological response to preoperative cetuximab, 5FU and radiation therapy in locally advanced rectal cancer[J]. Ann Oncol,2009,20(2):469 – 474
- 16 Lieskovan SH, Vallbohmer D, Zhang W, *et al.* EGF61 polymorphism predicts complete pathologic response to cetuximab – based chemoradiation independent of KRAS status in locally advanced rectal cancer patients[J]. Clin Cancer Res,2011, 17(15):5161 – 5169
- 17 Scalfani F. RAS mutations and cetuximab in locally advanced rectal cancer: results of the EXPERT – C trial[J]. Eur J Cancer,2014,50(8): 1430 – 1436
- 18 Scalfani F. FcgammaR II a and FcgammaR III a polymorphisms and cetuximab benefit in the microscopic disease[J]. Clin Cancer Res, 2014,20(17): 4511 – 4519
- 19 Scalfani F. HER2 in high – risk rectal cancer patients treated in EXPERT – C, a randomized phase II trial of neoadjuvant capecitabine and oxaliplatin (CAPOX) and chemoradiotherapy (CRT) with or without cetuximab[J]. Ann Oncol,2013,24(12): 3123 – 3128
- 20 Scalfani F. TP53 mutational status and cetuximab benefit in rectal cancer: 5 – year results of the EXPERT – C trial[J]. J Natl Cancer Inst,2014,106(7):298 – 310

(收稿日期:2015 – 03 – 23)

(修回日期:2015 – 04 – 13)