

硫酸乙酰肝素酶基因表达及其内切酶活性调控 对肿瘤细胞浸润、转移作用的影响*

张 怡 岑国欣**

(香港大学医学院生物化学系, 中国香港)

摘要 硫酸乙酰肝素酶是迄今为止在哺乳动物细胞中发现的唯一可以剪切胞外和细胞表面硫酸乙酰肝素多糖侧链的葡糖苷酸内切酶. 在恶性肿瘤、炎症细胞以及胚胎组织等具有侵袭性组织中有较高的表达, 肿瘤病人病灶部位的肝素酶 mRNA 表达量越高, 病人存活期越短. 在正常生理条件下, 肝素酶基因及其表达蛋白的活性受到启动子甲基化、变化转录剪切、转录因子、蛋白质加工、pH 环境以及免疫因子释放等多种内源因素的精确调控, 以防止机体非正常恶性变化的发生. 目前就有关乙酰肝素酶基因表达调控、酶活性的调控机制作详尽的专述.

关键词 硫酸乙酰肝素酶, 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖, 基因调控, 内切酶活性, 肿瘤细胞浸润、转移

学科分类号 R73, Q556, Q50

癌细胞转移到新的脏器必须经过癌细胞扩增、获得新血管生成因子 (angiogenic factors)、脱离原位癌细胞、突破细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和基底膜 (basement membrane, BM)、侵入循环系统、为新位点的内皮细胞黏附或捕获、渗出微血管系统 (microvasculature)、新位点定位生长等几个环节^[1]. 其中成功降解 ECM 和 BM 已成为癌细胞成功转移的首要条件. ECM 和 BM 都是由大分子组成的复合网络结构, 主要成分有四型胶原 (collagen IV)、层粘连蛋白 (laminin) 以及硫酸肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycans, HSPG) 组成. 一般来说, 恶性肿瘤细胞通过过量分泌蛋白水解酶 (proteases), 如金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs)、丝氨酸蛋白酶 (serine protease)、半胱氨酸蛋白酶 (cysteine protease)、天门冬氨酸蛋白酶 (aspartic protease) 以及硫酸乙酰肝素酶 (heparanase, 以下简称肝素酶) 来完成整个转移环节的. 近年来对肝素酶的突破性研究表明, 肿瘤细胞分泌的肝素酶起着决定性的作用, 因为肝素酶是目前为止在哺乳动物中发现的唯一一个可以剪切 HSPGs 上硫酸肝素 (HS) 侧链的水解酶. HSPGs 是由一条核心蛋白与多条 HS 链, 有时还有多条硫酸软骨素链 (chondroitin sulfate, CS) 组成的聚合体, 它一端连接着细胞, 另一端连接基质蛋白, 在 ECM 中形成牢固的网状结构. 肿瘤细胞只有首先大量分泌肝素酶, 将连接 ECM 中连接各种蛋白质的网络破坏, 随后在蛋白酶的协助下共同完成肿瘤细

胞扩散、转移任务, 可见肝素酶起着举足轻重的作用^[2,3].

研究表明, 侵袭性肿瘤细胞中肝素酶 mRNA 表达量比非侵袭性细胞明显增高. 癌症病人体内的肝素酶水平越高, 其术后的存活率也越低. 但是研究同时表明, 在正常生理条件下, 肝素酶基因, 甚至酶蛋白本身也同样存在, 只是相比之下表达量低, 或者酶活性极低^[4]. 正常生理情况下, 肝素酶的基因、蛋白质表达, 以及酶活性强弱受到基因转录水平、翻译水平、蛋白质加工等全方位的调控, 以防止肝素酶过量表达导致的肿瘤转移 (tumor cell metastasis)、炎症细胞渗出 (inflammatory cell extravasation)、内皮细胞血管增生 (endothelial cell angiogenesis) 等恶性过程发生.

1 基因表达调控

1.1 启动子去甲基化 (promoter demethylation)

人类肝素酶基因是位于 4q21.3 染色体上的单拷贝基因. 基因启动子位于 AUG 上游 2.3 kb 处^[5]. DNA 印迹分析发现, 此单拷贝基因并非癌症患者特有, 在正常人基因组中同样存在^[6], 然而在转录过程中则出现明显变化, 肝素酶 mRNA 在侵袭性

*CRCG基金资助项目(10204997 和 10205634).

** 通讯联系人.

Tel: +852-28199171, E-mail: shumdkhk@hkucc.hku.hk

收稿日期: 2005-05-08, 接受日期: 2005-05-31

癌细胞和免疫细胞中明显升高. Simizu 等^[6]用 AzaC (DNA 甲基化抑制剂)处理 5 种转录水平低的人细胞系(WI-38, HepG2, Jurkat, HL-60, K562), 结果肝素酶转录水平平均大幅增高. 对低肝素酶活性的肿瘤细胞系 (choriocarcinoma, JAR 和 glioma, C6) 研究同样表明, 去甲基化制剂 AzaC 不仅可以提高 mRNA 表达水平, 同时蛋白质翻译水平和酶活性、肿瘤细胞转移性都相应提高^[7]. 由此推论, 人肝素酶基因表达是通过基因后成性 (epigenesis) 调控的. 正常情况下或者非转移性良性肿瘤细胞中, 肝素酶启动基因被甲基化 (methylation) 或过甲基化 (hypermethylation), 一旦启动子发生去甲基化 (demethylation), 则启动了整个转录和翻译程序, 造成癌症发生、发展、转移等恶性表现.

1.2 转录剪切变化 (alternative splice variant)

肝素酶基因的唯一性已经得到确认, 其 mRNA 的不唯一性也被不同研究小组证实^[4,8]. Hulett 等^[9]通过 RNA 印迹分析发现, 人肝素酶存在 2 种剪切形式, 分别为 4.4 kb 和 2 kb. Dong 等^[10]进一步研究证实, 这 2 种形式的分子质量约为 5 kb (以下简称 *1a*) 和 1.7 kb (*1b*). 它们含有相同的开放阅读框(ORF), 翻译相同的蛋白质. 与 *1b* 相比, *1a* 在 3'端具有较长的不翻译区, 两者在体内的分布也有区别 (表 1).

Table 1 Tissue-specific expression of heparanase mRNA^[4]

表 1 各组织肝素酶 mRNA 表达^[4]

表达组织		表达量	
		HPSE <i>1a</i>	HPSE <i>1b</i>
非 免 疫 组 织	心脏	+	-
	脑	+	-
	胎盘	++	+++
	肺	+	-
	肝脏	-	-
	骨骼肌	-	-
	肾脏	+	-
	胰藏	+	-
	脾脏	++	++
免 疫 组 织	淋巴结	++	++
	胸腺	+	-
	外周血白细胞	+++	+++
	骨髓	+	+
	胎儿肝脏	++	++

由此可见 *1b* 主要在侵袭性的组织如免疫系统和胎盘中较高的表达, 而 *1a* 则基本上在所有的组织中有较弱的表达, 并且不能被有效翻译. 目前, 对于何种因素控制不同剪切形式的发生尚不明确, 在肿瘤细胞中, 这种控制因素是否被修饰或升高, 从而造成 *1a* 向 *1b* 剪切转变是个值得研究的课题.

1.3 转录因子调控 (transcription factor)

正常组织中 (physiological processes), 肝素酶基因仅在胚胎和淋巴结有高效转录, 而在病理条件下 (pathological processes), 如肿瘤恶化转移时, 肝素酶在恶性肿瘤中会得到高效转录, 这提示我们是否有转录因子参与了肿瘤基因的转录过程. 几个研究小组的工作的确回答了这个问题. Jiang 等^[9]和 Lu 等^[10]的研究表明, Ets 启动子家族参与了肝素酶 mRNA 在癌细胞中的表达. Jiang 等^[9]强调 Ets 成员之一 GA 结合蛋白 (GA-binding protein, GABP) 需要和 Sp1 结合, 共同调控甲状腺肿瘤细胞系肝素酶转录. Lu 检测了 4 种转录因子 (Est1, Est2, PEA3, ER81), 发现仅有 Ets1、Ets2 有顺式激活恶性乳腺癌细胞系肝素酶基因的功能. de Mestre 等^[11]研究发现, 在 Jurkat T 细胞中肝素酶的转录可以被转录因子 Egr1 (early growth response-1, Egr1) 诱导, 过量表达 Egr1 可以导致进一步激活肝素酶启动子的作用, 并且他利用突变和 supershift 试验确认, 在肝素酶启动子中的一个 280 bp 区为高效诱导区, 其中的 4 bp 序列可与 Egr1 相结合. 当然, 这仍需进一步研究以确认是否这一现象仅为 T 细胞的特例, 亦或适用于其他癌细胞. Ogishima 等^[12]比较了 177 例前列腺癌样本与 69 例良性前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 样本, 发现 Egr1 表达在前列腺癌病例中明显比 BPH 病例高. 回归分析表明, Egr1 表达升高对肝素酶基因转录的调节作用远远超过启动子去甲基化对肝素酶基因的调节作用 ($P < 0.0001$).

2 酶生物活性调控

2.1 原酶的剪切加工 (proteolytic processing)

肝素酶 cDNA 初始编码的是一个 65 ku 的肝素酶原 (pro-heparanase), 经蛋白水解酶的加工而产生 2 个多肽亚基 (subunit), 分别为对应于 N 端蛋白的 8 ku 亚基和对应于 C 端蛋白的 50 ku 亚基^[4, 5, 13], 这 2 条多肽非共价结合的异二聚体形成是具备肝素酶活性的充分必要条件^[14, 15]. 通过对 50 ku 亚基序列分析以及对 8 ku 亚基质谱分析, 确认酶原上有 2 个

可能的肝素酶加工位点, 分别为 Glu₁₀₉ ~ Ser₁₁₀ (位点 1) 和 Gln₁₅₇ ~ Lys₁₅₈ (位点 2)^[4,16]. 有关具体参与剪切活化的蛋白酶只有最近才有报道. Abboud-Jarrous 等^[17]采用多位点定位诱变与消除法研究发现, Tyr₁₅₆ 是肝素酶原剪切加工关键位点, 同时组织蛋白酶 L (cathepsin L) 在体外 (*in vitro*) 可以剪切加工并激活重组肝素酶原, 采用组织蛋白酶 L 抑制剂可以抑制肝素酶的加工与活化, 由此推论, 很可能组织蛋白酶 L 先行将 Tyr₁₅₆ 剪切后再由蛋白外切酶将 Gln₁₅₇ 去除, 从而得到具有 Lys₁₅₈ 氨基酸残基的高活性 50 ku 亚基. 当然这种推论仍有待进一步证实, 因为在体内 (*in vivo*) 组织蛋白酶 L 是否可以接触到肝素酶原仍是个疑问, 而且组织蛋白酶 L 本身也需由酶原激活成活性蛋白酶的加工激活过程.

2.2 pH 调控

肝素酶活性受环境 pH 影响很大, 在 pH 4.5 ~ 6.5 具有最佳内切糖苷酶活性, 因此炎症发生部位、缺血的肿瘤中心部位都为肝素酶提供适宜的酸性环境, 使其发挥最大的剪切 HS 活性, 辅助炎症细胞、癌细胞突破 ECM 和 BM^[18]. 当然, 肝素酶不仅具有酶切功能, 在 pH 中性生理情况下, 肝素酶虽然可逆地失活, 但此时却拥有黏附作用. Gilat 等^[19]认为 pH 就像一个调节开关, 当开关开到酸性位置, 肝素酶就执行酶切任务, 而开关偏离酸性范围后, 肝素酶就成为一个 T 细胞黏附分子, 使不具黏附能力的淋巴细胞获得黏附性能. Goldshmidt 等^[20]研究也支持了这一观点, 他同时进一步证明这种存在于细胞表面的肝素酶产生的黏附性能与其酶活性无关.

2.3 HSPG 内化调控 (internalization)

HSPG 与肝素酶的关系不仅是底物和酶的关系, 最新的研究表明, 细胞表面的 HSPG 还具备肝素酶活性调节剂的功能. Gingis-Velitski 等^[21]示踪 (chasing) 肝素酶转染的 293 细胞系合成和分泌肝素酶全过程, 发现细胞首先在胞内合成 65 ku 的肝素酶原, 然后将此酶原分泌到胞外, 整个过程仅需要 4 h. 有趣的是, 被分泌的酶原又迅速被细胞表面的 Syndecan (一类跨膜 HSPG) 相结合并经内吞作用 (endocytosis) 重新进入细胞体内, 甚至进入细胞核中^[22], 与此同时, 酶原也被剪切活化成为 50 ku 活性酶. 肝素酶的内化作用也可以发生在无内源分泌肝素酶的成纤维细胞、CHO 等细胞中^[21, 23], 如果将重组肝素酶原加到 CHO-K1 培养基中, 不到

15 min 肝素酶原就迅速与细胞结合, 约 2 h 已经将达到最大内化、活化程度, 这一现象却不能在 HS 缺乏的突变细胞株 CHO745 和 HSPG 缺乏的突变株 HT-29 中观察到. 为什么体外培养的细胞一定要通过细胞表面的 HSPG 将刚刚分泌的酶原迅速内吞活化成为具有活性的肝素酶, 而不是直接在胞内直接在蛋白水解酶的作用下活化? 尽管这种体外培养 (*in vitro*) 的结论仍然需要通过体内 (*in vivo*) 研究证实, 起码这类研究给我们一个启示, 那就是 HSPG 是肝素酶活性的重要调节剂.

3 内源因子调控

3.1 免疫因子 (inflammatory cytokines)

在炎症发生以及肿瘤细胞转移时, 机体会大量分泌免疫因子, 多项研究表明, 免疫因子可以刺激细胞分泌肝素酶, 这种刺激其实也使细胞获得在可溶性 ECM 中游走的能力. 体外细胞培养研究表明, 在培养基中加入 TNF- α 、IL-1 β 可以使内皮细胞分泌肝素酶蛋白增加 2~10 倍, 而 VEGF 却可使肝素酶分泌降低. 脂肪酸可以促进肝素酶 mRNA 和蛋白质的分泌^[24]. 雌激素 (estrogen) 可以诱导具有雌激素受体的乳腺癌细胞 (MCF-7) 肝素酶 mRNA 的表达, 而在不具有雌激素受体的乳腺癌细胞系中则观察不到这一现象^[25]. LPS^[26]和 NGF^[27]可以诱导原代星形胶质细胞肝素酶 mRNA 的表达, 星形胶质细胞是黑色素瘤脑转移中首先遇到的脑细胞, 被诱导的肝素酶进一步促进了黑色素瘤的脑转移.

3.2 内源抑制因子 (natural inhibitor)

由于肝素酶表达和活性与恶性肿瘤正相关, 所以研究人员千方百计设计出多种合成抑制剂以抑制肝素酶的危害作用. 鉴于生理状态下体内肝素酶的严格控制, 寻找内源抑制因子的努力一直在进行. Keren 等^[28]发现, 在 B16 黑色素瘤细胞表面存在内源性肝素酶抑制剂, 丁醇提取后的细胞转移性明显加强, 而将丁醇提取物培养其他细胞则可抑制这种细胞的转移特性. 经纯化, 得到的抑制物分子质量约 2 000 ~ 1 0000 个氨基酸, pI 5.6~5.8. Temkin 等^[29]首次报道了嗜曙红细胞碱性蛋白 (eosinophil major basic protein, MBP) 是一种肝素酶天然抑制蛋白. 嗜曙红细胞虽然分泌肝素酶, 但是由于 MBP 的存在, 不论是否处于激活, 嗜曙红细胞内都检测不到肝素酶的活性, 从而可能对炎症起到反馈抑制作用.

4 结 语

抑制肝素酶的基因表达, 抑制酶活性对肿瘤病或者疾病治疗起到关键的作用, 因此, 肝素酶已经成为研究癌症药物治疗的靶向目标 (drug target), 多类肝素酶合成抑制剂已经进入临床检验, 相信一定会为肿瘤或者手术后治疗带来福音. 其实机体本身也具备严密的防御系统, 不论从基因调控角度还是蛋白质调控角度, 多方位抑制调节、调控肝素酶在正常生理状态下的表达. 如果调控的任何一个环节失控, 则预示着机体由正常向病理过程过渡. 充分了解机体对肝素酶的调控机制有助于建立相应的临床治疗对策, 延长患者生命.

参 考 文 献

- Marchetti D, Denkins Y, Reiland J, *et al.* Brain-metastatic melanoma: a neurotrophic perspective. *Pathol Oncol Res*, 2003, **9** (3):147~158
- Parish C R, Freeman C, Hulett M D. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1471** (3): M99~108
- Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, *et al.* Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J*, 2000, (Suppl): 37~45
- Hulett M D, Freeman C, Hamdorf B J, *et al.* Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med*, 1999, **5** (7): 803~809
- Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, *et al.* Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 1999, **5** (7): 793~802
- Simizu S, Ishida K, Wierzbicka M K, *et al.* Expression of heparanase in human tumor cell lines and human head and neck tumors. *Cancer Lett*, 2003, **193** (1): 83~89
- Shteper P J, Zcharia E, Ashhab Y, *et al.* Role of promoter methylation in regulation of the mammalian heparanase gene. *Oncogene*, 2003, **22** (49): 7737~7749
- Dong J, Kukula A K, Toyoshima M, *et al.* Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene*, 2000, **253** (2):171~178
- Jiang P, Kumar A, Parrillo J E, *et al.* Cloning and characterization of the human heparanase-1 (HPR1) gene promoter: role of GA-binding protein and Sp1 in regulating HPR1 basal promoter activity. *J Biol Chem*, 2002, **277** (11): 8989~8998
- Lu W C, Liu Y N, Kang B B, *et al.* Trans-activation of heparanase promoter by ETS transcription factors. *Oncogene*, 2003, **22** (6): 919~923
- de Mestre A M, Khachigian L M, Santiago F S, *et al.* Regulation of inducible heparanase gene transcription in activated T cells by early growth response 1. *J Biol Chem*, 2003, **278** (50): 50377~50385
- Ogishima T, Shiina H, Breault J E, *et al.* Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, **11** (3): 1028~1036
- Toyoshima M, Nakajima M. Human heparanase. Purification, characterization, cloning, and expression. *J Biol Chem*, 1999, **274** (34): 24153~24160
- Nardella C, Lahm A, Pallaoro M, *et al.* Mechanism of activation of human heparanase investigated by protein engineering. *Biochemistry*, 2004, **43** (7):1862~1873
- Levy-Adam F, Miao H Q, Heinrikson R L, *et al.* Heterodimer formation is essential for heparanase enzymatic activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **308** (4): 885~891
- Fairbanks M B, Mildner A M, Leone J W, *et al.* Processing of the human heparanase precursor and evidence that the active enzyme is a heterodimer. *J Biol Chem*, 1999, **274** (42): 29587~29590
- Abboud-Jarrous G, Aingorn H, Rangini-Guetta Z, *et al.* Site-directed mutagenesis, proteolytic cleavage, and activation of human proheparanase. *J Biol Chem*, 2005, **280** (14):13568~13575
- Ihrcke N S, Parker W, Reissner K J, *et al.* Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases. *J Cell Physiol* 1998, **175** (3): 255~267
- Gilat D, Hershkovich R, Goldkorn I, *et al.* Molecular behavior adapts to context: heparanase functions as an extracellular matrix-degrading enzyme or as a T cell adhesion molecule, depending on the local pH. *J Exp Med*, 1995, **181** (5): 1929~1934
- Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, *et al.* Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. *FASEB J*, 2003, **17** (9):1015~1025
- Gingis-Velitski S, Zetser A, Kaplan V, *et al.* Heparanase uptake is mediated by cell membrane heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 2004, **279** (42): 44084~44092
- Schubert S Y, Ilan N, Shushy M, *et al.* Human heparanase nuclear localization and enzymatic activity. *Lab Invest*, 2004, **84**(5): 535~544
- Nadav L, Eldor A, Yacoby-Zeevi O, *et al.* Activation, processing and trafficking of extracellular heparanase by primary human fibroblasts. *J Cell Sci*, 2002, **115** (Pt 10): 2179~2187
- Chen G, Wang D, Vikramadithyan R, *et al.* Inflammatory cytokines and fatty acids regulate endothelial cell heparanase expression. *Biochemistry*, 2004, **43** (17): 4971~4977
- Elkin M, Cohen I, Zcharia E, *et al.* Regulation of heparanase gene expression by estrogen in breast cancer. *Cancer Res*, 2003, **63**(24): 8821~8826
- Irony-Tur-Sinai M, Vlodavsky I, Ben-Sasson S A, *et al.* A synthetic heparin-mimicking polyanionic compound inhibits central nervous system inflammation. *J Neurol Sci*, 2003, **206** (1): 49~57
- Marchetti D, Li J, Shen R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase. *Cancer Res*, 2000, **60** (17): 4767~4770
- Keren Z, Leland F, Nakajima M, *et al.* Inhibition of experimental metastasis and extracellular matrix degradation by butanol extracts from B16-F1 murine melanoma. *Cancer Res*, 1989, **49** (2): 295~300
- Temkin V, Aingorn H, Puxeddu I, *et al.* Eosinophil major basic protein: first identified natural heparanase-inhibiting protein. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, **113** (4): 703~709

Regulation of Heparanase Gene Expression and Endoglucuronidase Activity: Implication in Cell Invasion and Metastasis*

ZHANG Yi, SHUM Daisy Kwok-Yan**

(Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, 21 Sassoon Road, Hong Kong, China)

Abstract Heparanase is the only mammalian endo- β -D-glucuronidase known to cleave heparan sulfate (HS) components of proteoglycans (PGs) at limited intra-chain sites. Heparanase release in response to an inflammatory stimulus or in relation to tumor metastasis alters the composition and structural integrity of extracellular matrix and basement membrane. The enzymatic degradation of HS by heparanase is, therefore, involved in range of biological phenomena, from pregnancy, morphogenesis and development to inflammation, vascularization, and cancer progression. In normal physiological processes, expression of the active enzyme is tightly regulated by promoter methylation, mRNA splicing, transcription factors, proteolytic processing and inflammatory cytokines. The recent findings about the strict regulation of heparanase from the expression of the gene to processing of the protein product to yield the active enzyme are reviewed.

Key words heparanase, heparan sulfate proteoglycans, gene regulation, endoglucuronidase activity, cell invasion, metastasis

*This paper is supported by CRCG, The University of Hong Kong, Grants 10204997 & 10205634 to DKYS.

**Corresponding author. Tel: +852-28199171, E-mail: shumdkhk@hkucc.hku.hk

Received: May 8, 2005 Accepted: May 31, 2005