

细胞迁移相关蛋白酶的研究进展*

宋海飞¹⁾ 林博文¹⁾ 龚诚宸¹⁾ 崔映宇^{1,2,3)**}

⁽¹⁾ 同济大学医学院再生医学系, 上海 200092; ⁽²⁾ 同济大学医学遗传研究所, 上海 200092;

⁽³⁾ 同济大学心律失常教育部重点实验室, 上海 200120)

摘要 蛋白酶在胚胎发育、免疫防御、损伤修复、血管新生及肿瘤转移等相关细胞迁移过程中发挥关键作用。近年, 蛋白酶影响肿瘤细胞侵袭、迁移的机制研究渐成热点, 但肿瘤细胞免疫逃逸、增生、迁移、侵袭、异位定植等机制仍不明确, 因此对相关蛋白酶的功能和作用机制的研究愈显重要。本文从蛋白酶的正常生理功能入手, 综述肿瘤细胞迁移中相关蛋白酶的研究进展, 以期靶向肿瘤浸润和迁移过程的蛋白酶抑制剂类新药筛选和研发提供线索和新思路。

关键词 细胞迁移, 肿瘤细胞侵袭转移, 蛋白酶, 基质金属蛋白酶, 组织蛋白酶

学科分类号 Q71, R34, R394

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0329

细胞迁移(cell migration)在胚胎发育^[1]、免疫防御^[2]、损伤修复^[3]、血管新生^[4]以及肿瘤转移^[5]等诸多生理和病理过程中发挥核心作用, 普遍存在于组织发育、伤口愈合、血管新生等正常生理过程中, 也是炎症与肿瘤等病理发展过程中的关键环节^[6]。

1 细胞迁移在正常生理活动中的作用

细胞迁移是机体正常发育和生理活动的基础, 贯穿了整个生命周期。例如: 胚胎期不同类型祖细胞迁移至特异靶位以保证各组织、器官的正常发育; 骨髓造血干细胞受微环境中不同因素诱导迁移至不同部位, 进而选择性分化为各种血细胞; 神经嵴细胞迁移发育成神经系统; 血管新生需内皮细胞迁移形成新的血管床; 趋化效应致白细胞向潜在的炎症发生部位聚集; 纤维母细胞向伤口部位迁移并参与伤口愈合; 上皮细胞的迁移活动帮助消化道、呼吸道等上皮屏障损伤后快速修复等。在基因、环境等内、外因作用下依次进行: a. 前端细胞膜前伸形成伪足。b. 伪足于胞外基质 (extracellular matrix, ECM)形成新黏着斑。c. 肌动蛋白和肌球蛋白使细胞骨架收缩, 整体易位。d. 尾端脱黏附致细胞前行^[7-8]。通常, 胞外环境改变会显著影响细胞运动^[8-10], 其中纤连蛋白(fibronectin, FN)介导细胞表面受体和整合素、胶原、多糖和其他粘连分

子间的联系, 层粘连蛋白(laminin, LN)作为 ECM 的主要成分参与细胞增殖、分化、迁移和抗凋亡等生理活动^[11]。靶向 ECM 的蛋白酶数量、功能状态等发生明显改变, 将显著影响正常生理。

2 肿瘤恶化后的癌细胞迁移

细胞异常迁移会导致机体正常生理改变, 引发疾病。如血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)迁移促动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)形成; 又如, 血管内皮细胞迁移致肿瘤形成新生血管, 促进肿瘤细胞依附及增殖。肿瘤恶化后通过以下两种途径转移, 一是通过组织间隙局部浸润和直接蔓延, 破坏邻近组织或器官; 二是侵入淋巴管、血管后随脉管系统实现远处转移, 其中还包括一种特殊类型, 常见于腹腔恶性肿瘤的种植性转移, 由脱落的癌细胞像播种一样种植在体腔表面形成多个转移瘤。其中远处迁移主要经历 3 个过程: a. 侵入周围基质→b. 进入并穿过脉管系统→

* 上海市大学生创新计划(201610247134), 同济大学医学院扬帆计划(2012YF05)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 021-65983213, E-mail: yycui@tongji.edu.cn

收稿日期: 2016-10-25, 接受日期: 2017-01-17

c. 远处转移^[12-13]. 近年研究表明, 微环境所含胞外蛋白、蛋白酶、趋化因子和细胞因子等对肿瘤生长、免疫逃逸、耐药性等意义重大^[14]. 其中, 神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)和神经营养因子 3(neurotrophin 3, NT-3)等可通过调控肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)影响肿瘤生存^[15]. 定向迁移的过程还涉及黏附因子与肿瘤细胞表面受体的结合, 诱导细胞骨架重排, 使其紧密黏附于淋巴管内皮细胞. 黏附分子或骨架缺陷致迁移行为畸变原因如下: a. 胞间连接最发达的上皮细胞突变, 削弱胞间连接. b. 微环境中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)分泌异常, 加上整合素(integrin)对 MMP 的进一步活化^[16], 从而降解 ECM, 导致肿瘤脱黏附现象. c. 膜流动性大, 易变形, 利迁移, 癌细胞借阿米巴运动通过基底膜缺损处移出至间质. 丧失位置识别能力的肿瘤细胞, 降解 ECM 能力增强, 其迁移速率、效率和细胞取向、定位改变, 引起转移的无序性、失控性^[17].

综上所述, 细胞迁移在生命活动各阶段均发挥作用, 通过相关基因的合理、适度表达调控, 维系生命体“生、老、病、死”四重奏的演进.

研究表明, 在细胞迁移中蛋白酶不可或缺^[18]. 兹将其主要作用及相关机制研究进展分述如下, 为后续对肿瘤细胞迁移具体机制的研究和药物筛选提

供线索启示或新的切入点.

3 影响细胞迁移的几类蛋白酶

3.1 泛素蛋白酶系 (ubiquitin-proteasome system, UPS)

UPS 参与胞内 80% 以上蛋白质降解, 除降解功能失调和氧化损伤的蛋白, 释放能量刺激细胞自我复制完成人体自身代谢修复外, 还可调控蛋白聚糖(proteoglycans, PGs)、MMPs、胶原蛋白等肿瘤微环境^[19]. 平衡失调时, UPS 还参与了血管平滑肌细胞的异常增殖、迁移, 诱发动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)^[20-21]、缺血再灌注损伤、高血压、冠状动脉成形术后再狭窄、糖尿病性心肌病^[22]和心衰等心血管疾病^[23]. 该体系含泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme E1)、结合酶(ubiquitin-conjugating enzyme E2)、连接酶(ubiquitin ligase E3)、解离酶(deubiquitinating enzymes, DUBs)及 26S 蛋白酶体等多成员. 首先 ATP 水解促 E1 通过其活性中心的 Cys 残基与泛素的 C 端形成硫酯键活化单个游离的泛素, 而后 E1 将其递交给 E2, 紧接着 E3 募集特异的底物, 并介导泛素从 E2 移位到靶蛋白, 最后由 26S 蛋白酶体识别泛素化靶蛋白并降解之^[23-25], DUBs 则解离泛素与底物, 重复利用, 维持泛素量的相对稳定(图 1). 最近发现, 泛素连接酶 E3 家族中的 CBL (casitas B-cell lymphoma)蛋白介导了 miR-124-3p 抑制乳腺癌细胞

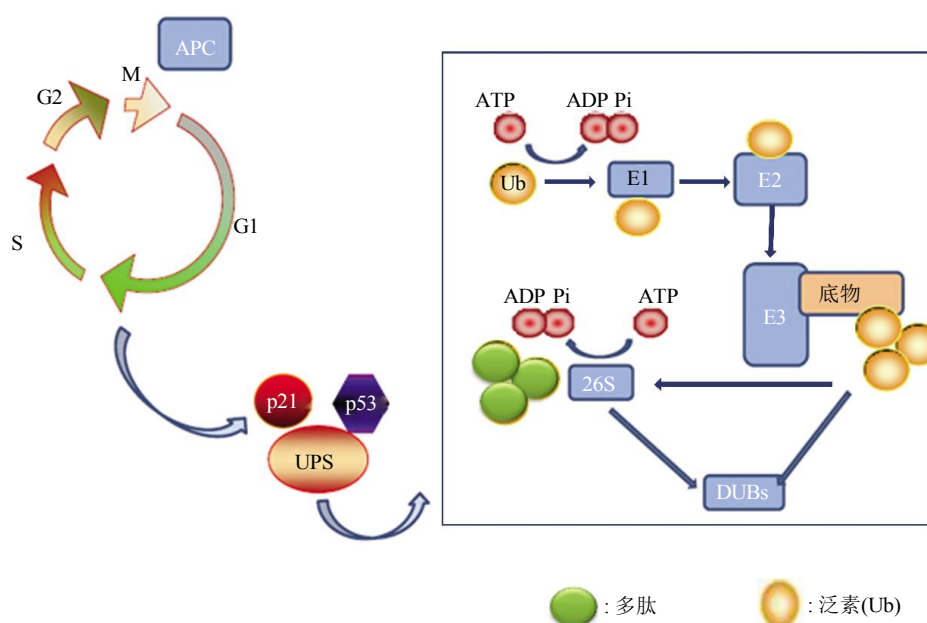


Fig. 1 The mechanisms by which UPS influence the proliferation of tumor cells

图 1 UPS 参与肿瘤细胞增殖的机制

的增殖和侵袭. 近年, miR-124-3p 被证实是肝癌、宫颈癌和胃癌等多种癌症的抑癌基因, 据此, 可以 miR-124-3p 或 CBL 的通路为调控癌细胞增殖和侵袭靶点, 为后续机制研究和临床治疗提供思路^[26].

UPS 一方面精准调控 p53 和 p21 负性调控蛋白, 修复 DNA 损伤, 减少受损 DNA 的积累, 参与细胞增殖调控^[27], 一旦失调, 则会导致肿瘤等疾病发生, 与迁移抑制因子 (migration inhibitory factor, MIF) 相关^[28]. 目前, 大多研究以此为切入点研究肿瘤侵袭迁移相关机制^[29]. 另一方面, UPS 联合核因子 κ B (NF- κ B) 通过降解蛋白, 使 VSMC 从收缩型转向增殖型. 通常 NF- κ B 的 p65 亚基与其抑制因子 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 单体结合, 以失活状态居于胞浆, 当 I κ B 被 UPS 降解时, NF- κ B 被释放并恢复活性, 转位至胞核, 启动转录, 参与 G1 期向 S 期过渡, 促细胞增殖. 此外, UPS 还可通过 Skp1-Cul1-F-box (SCF)、有丝分裂后期促进复合物 (anaphase promoting complex, APC) 和 VBC-Cul2 复合物 (von-Hippel-Lindau-elongins B and C- Cul2 complex), 对细胞周期 G1 蛋白和细胞周期依赖性激酶抑制剂的特异识别而参与细胞 G1-S 期的调控^[30]. 由此, UPS 可通过影响 VSMC 的细胞周期, 促进其从收缩型向增殖型转变, 影响正常的心肌细胞和血管内皮细胞的增殖、分化与重塑, 影响 VSMC 的收缩力, 破坏正常心肌功能, 提示其与心血管系统病变的联系^[31].

3.2 基质金属蛋白酶——与肿瘤转移最密切相关的蛋白酶

基质金属蛋白酶 (MMP) 于 1962 年被发现, 是锌离子依赖性蛋白酶^[32]. 按其结构和底物不同可分为五类 (表 1).

除多糖外, MMPs 能降解几乎全部 ECM, 且可互相激活, 形成瀑布效应^[33]. MMPs 还与上皮钙黏着蛋白 (cadherin)、整合素、T 蛋白、白介素 8、膜辅助蛋白因子、趋化因子、基质细胞衍生因子等共同参与 ECM 和基底膜 (basement membrane, BM) 的降解与重塑, 帮助上皮纤维母细胞迁移、增殖^[34], 参与胚胎发育、细胞迁移、血管生成、伤口愈合^[35]、AS^[36]等. MMPs 降解 BM 可释放不同生长因子^[37-38]、蛋白酶或其他信号分子^[39]. 例如, MMP2、9、14 通过激活无活性的转化生长因子 β (transforming growth factor, TGF- β), 降解 ECM 释放出成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth

factor, bFGF)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等, 促血管生成^[40].

近年, Tu 等^[41]发现腓骨蛋白 5 (fibulin-5) 通过下调 MMP-7 的表达抑制肝癌细胞的迁移和侵袭. 最近, Breig 等^[42]发现安眠蛋白 (reptin) 可通过调节金属蛋白酶 Mep1A 的表达和分泌, 调控 HuH7he Hep3B 等肝癌细胞的迁移和侵袭. 此外, 几种特殊的 MMP 和组织型基质金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) 还参与骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 的增殖、迁移和分化, 其确切机制均需深入研究. 正常瘢痕形成主要依靠机体内 TIMPs 与 MMPs 调控, 两者维持 1:1 的动态平衡, MMP-1、MMP-2 先升高, 降解胶原蛋白, 促成纤维细胞移行; 后 TIMP-1 受 MMPs 负反馈影响而升高, 抑制 ECM 降解, 促进伤口愈合, ECM 经历如此降解与重塑形成瘢痕组织^[43-44]. 若平衡被打破, 将导致肿瘤、关节炎、组织溃疡和慢性肺炎等疾病发生^[45].

微环境中, MMPs 对肿瘤细胞效应具多重性:

a. 组织浸润. MMP-1, 2, 3, 9, 13, 14 等作用于 ECM, MMP-1 结合 PAR-1, MMP-14 结合 CD-44, MMP-3、MMP-7、ADAM-10 (adisintegrin and metalloproteinase-10)、ADAM-17 作用于钙黏着蛋白 E, MMP-2 又可激活 MMP-9、MMP-13 呈瀑布效应, 共同介导癌细胞侵袭. b. 血管生成. MMP-9 结合 VEGF、MMP-7、MMP-9、MMP-12 结合 Plg, 参与肿瘤中血管新生. c. 炎症发生. MMPs 可结合 TNF- α 的前体, 进而生成 TNF, 其中 MMP-2 结合 MCP-3, MMP-9 结合 CXCL8, 通过炎症因子介导炎症, 也可协同活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 参与炎症发生^[40]. d. 转移. MMP-9 连同 VEGF, MMP-2、MMP-3 结合 ECM, 通过影响血管生成和降解胞外基质, 促进肿瘤转移、远处依附和增殖等^[40, 46].

此外, 动脉粥样硬化小鼠体内巨噬细胞过表达 MMP-9, 有效水解弹性蛋白和胶原导致斑块急性破裂, 提示抑制 MMPs 活性可有效稳定动脉粥样硬化斑块^[47]; MMP-3、MMP-7、MMP-11 参与肿瘤细胞逃避免疫监视, 其中 MMP-7 可降解细胞膜上的 Fas 配体, 抑制 Fas 介导的凋亡, 促进肿瘤生长; MMP-11 则能通过分解胰岛素样生长因子受体, 促进胰岛素样生长因子的释放而减少肿瘤细胞自噬; MMP-26 启动子区含一个雌激素表达元件,

Table 1 Similarities and differences between MMPs

表 1 MMP 家族不同成员间异同

分类	相同点	不同点			参考文献
		名称	作用位点	效应	
胶原类 (MMP-1,8,12)	降解胶原, 参与伤口愈合、瘢痕形成	MMP-1	I、III型胶原	伤口愈合, 瘢痕形成.	[41-43]
		MMP-8	I、II、III型胶原	在舌癌中, 呈负相关; 在其他癌症中呈正相关	[33-34]
明胶类(MMP-2,9)	降解IV型胶原, 在肿瘤转移中最直接、最重要	MMP-2	I、IV胶原	非糖基化, 促进伤口愈合, 瘢痕形成, 激活 MMP-9、MMP-13, 形成瀑布效应	[39, 43, 45, 47]
		MMP-9	IV胶原	糖基化, 降解IV胶原, 促肿瘤浸润转移	[33-34, 39, 43, 45]
基质蛋白酶 (MMP-3,10,11)	促进细胞增殖、发育	MMP-3、10	LN、FN、III、IV型胶原	促增殖、生长、发育, 抑凋亡, 促侵袭转移	[41]
		MMP-11	胰岛素样生长因子结合蛋白	分解胰岛素样生长因子结合蛋白, 释放胰岛素样生长因子, 抑细胞自发性凋亡	[33]
膜型 (MMP-14,15,16,17)	促进细胞侵袭、转移、血管生成	MMP-14	前 MMP-2/13、I、II、III型胶原	降解 ECM, 调节黏附分子, 促血管生成	[40]
其他 (MMP-7,19,20)	降解 ECM, 促进细胞迁移	MMP-7	FN、Fas 配体、明胶	抑制 Fas 介导的肿瘤细胞凋亡; 降解 ECM, 促肿瘤浸润转移	[33]
MMP-26	分子质量最小, 缺失典型的半胱氨酸开关, 启动子内含雌激素翻译元件. 其功能与雌激素、孕激素相关, 参与胚胎植入、伤口愈合等				[32]

决定了其表达与雌激素和孕激素水平密切相关, 提示其与雌激素依赖型肿瘤如乳腺癌、子宫内膜癌和卵巢癌有关, 也可调控子宫基质、内皮细胞, 协助胚胎着床, 影响慢性损伤中的 ECM 在角蛋白细胞的表达; 联合生长因子、蛋白酶、缺氧等因素, 完成上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 促细胞迁移进而促进慢性溃疡^[33]的修复.

另外, 研究提示, 高糖与 MMP-2,9 对肿瘤的增殖、迁移、侵袭、异位依附和增殖等过程发挥协同作用^[48]. 其一, 高糖和高代谢可为肿瘤生长、发育提供物质和能量基础. 其二, 升高的 MMP-2、MMP-9 可促进弹性蛋白降解, 分解释放具抗原性的活性物质 EDPs (elastin-derived peptides), 刺激机体产生抗胰蛋白酶抗体, 正反馈促进 MMP-2,9 降解 ECM, 破坏大小血管壁完整性的同时帮助肿瘤细胞转移. 其三, 抑制血小板聚集, 一定程度上抑制血栓形成^[48]. 整合素家族协同 MMP-2 参与肿瘤细胞诱导血小板聚集反应 (tumor cell induced-platelet aggregation, TCIPA)^[49]和介导肿瘤的侵袭转移过程, MMP-2、MMP-9、整合素 $\alpha v \beta 3$ 、整合素 $\alpha v \beta 5$ 和 GP II b/III a 共同作用于胶原, 溶解 ECM, 促进了乳腺癌等细胞的迁移^[50-51].

值得注意的是, MMP-8 可因肿瘤类型不同而呈现不同效应. 例如, Korpi 等发现, MMP-8 表达与舌癌患者生存呈正相关^[52-53].

综上所述, MMPs 与大多数肿瘤的浸润转移密切相关^[33], 其中, MMP-2, 3, 8, 9, 13, 14 可分别诱导黑色素瘤、纤维肉瘤、肝癌、肺腺癌细胞瘤等发生 EMT, 减少黏附、促进侵袭和转移, 相关机制如图 2 所示.

3.3 组织蛋白酶

组织蛋白酶(cathepsin)是一类半胱氨酸蛋白酶的统称, 有 11 个成员, 在酸性溶酶体中可自我溶解活化, 具有内、外切酶活性, 分布于胞核、胞质、细胞表面和胞外, 可裂解 ECM 和 BM^[54]. 组织蛋白酶 B (cathepsin B, CTS-B)^[55]、组织蛋白酶 C (cathepsin C, CTS-C)、组织蛋白酶 D (cathepsin D, CTS-D)、组织蛋白酶 S (cathepsin S, CTS-S)分泌至肿瘤微环境, 在非小细胞肺癌、肝癌、子宫内膜癌、乳腺癌、恶性黑色素瘤和神经胶质瘤等恶性肿瘤中表达并发挥相应作用.

根据组织蛋白酶病理作用异同分述如下:

CTS-B、CTS-D 和组织蛋白酶 L (cathepsin L, CTS-L)可降解 ECM, 间接激活尿激酶活化因子,

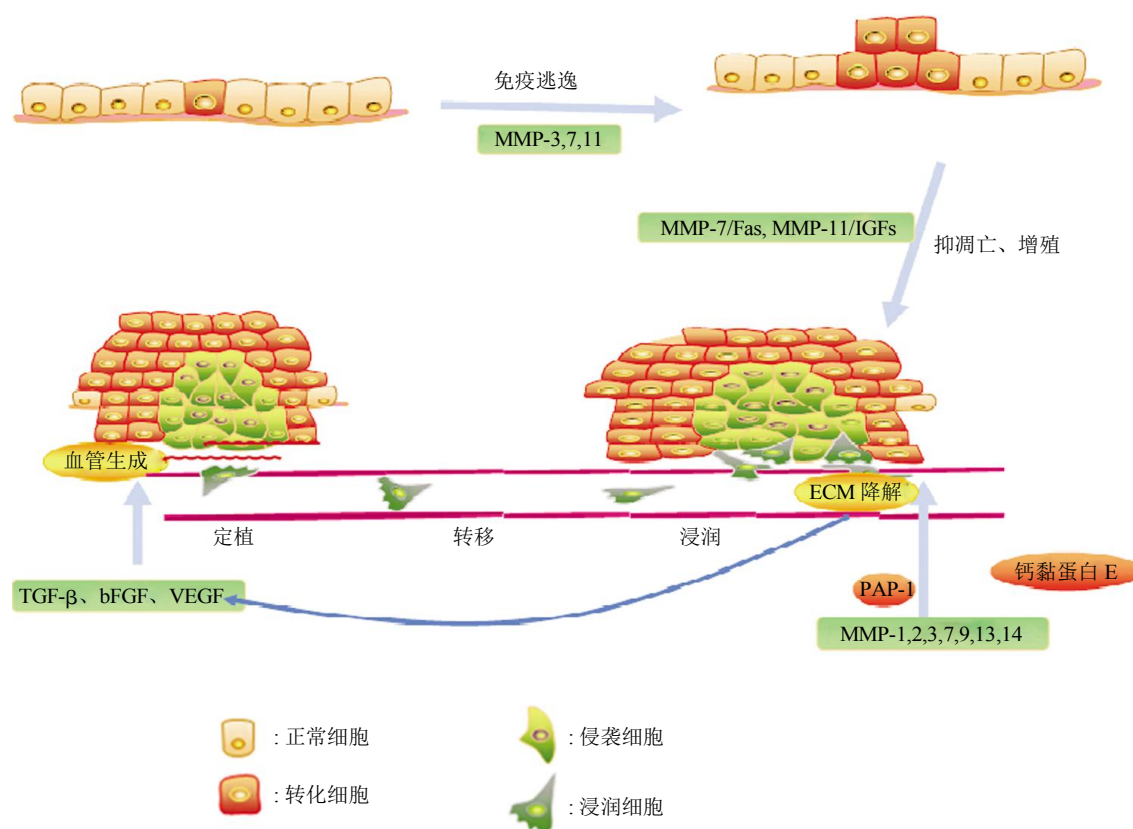


Fig. 2 The mechanisms by which MMPs influence the proliferation and migration of tumor cells

图2 MMP家族参与肿瘤细胞增殖、迁移的机制

破坏胞间连接, 促肿瘤细胞侵袭转移, CTS-D 和 CTS-L 还可激活 CTS-B^[56-57]. CTS-B 可协同尿激酶型纤维蛋白原激活物及其受体参与肿瘤血管的生成^[57]. 还可参与溶酶体-线粒体轴凋亡途径, 亦可直接激活 Caspase-9, 启动凋亡. CTS-D 可提高 VEGF-C/-D 表达, 间接诱导肿瘤淋巴管生长^[55, 58], 其主要分布在浆膜腔内, 受雌激素调节, 故 CTS-D 与子宫内膜癌、卵巢癌等雌激素相关的癌症有密切关系. 此外, CTS-D 也可正向调节 MMP-9^[59]. 近年发现 CTS-D 可作为肿瘤转移侵袭的生物学标志^[60-61]. CTS-L 可入核, 影响转录, 参与细胞周期调控^[62], 修饰组蛋白, 从而改变肿瘤细胞的基因表达^[63], 其在多种实体肿瘤高表达, 预后不良^[60-61]. 最近, Fei 等^[64]发现敲减 CTS-L 可以促进姜黄素介导的胶质瘤细胞的生长、迁移和侵袭, 详细机制尚待深入研究.

组织蛋白酶 K (cathepsin K, CTS-K)、组织蛋白酶 S (cathepsin S, CTS-S) 和 CTS-C 同属于半胱氨酸类蛋白酶. CTS-K 在破骨细胞和破骨样细胞中

的浓度尤其高, 降解 I 型胶原、骨连接素在内的多种基质蛋白, 介导骨吸收, 可特异性降解心肌细胞外基质, 分解弹力纤维和胶原, 释放血管生成因子, 协助血管重塑^[65]. CTS-S 只分泌于局部微环境并维持其 pH 的相对稳定, 可作为微环境改变引发疾病的分子标志, 它不仅源于肿瘤相关巨噬细胞 (tumor associated macrophages, TAMs), 也源于正常细胞, 依靠 IL-4 表达酶活性^[66]. CTS-C 可通过非特异性地去除氨基端二肽, 对免疫细胞和炎症细胞内的许多蛋白质降解和丝氨酸蛋白酶的活化起调节作用.

组织蛋白酶的活性机制可概括如图 3.

3.4 胰蛋白酶及蛋白酶激活受体

胰蛋白酶及蛋白酶激活受体 (protease activated receptor, PAR) 异常表达于多种肿瘤细胞, 且与其生物学特性及恶性程度密切相关.

人类胰腺细胞合成胰蛋白酶原 1 和胰蛋白酶原 2, 胰蛋白酶原 2 又称为肿瘤相关胰蛋白酶原 2 (tumor associated trypsinogen-2, TAT-2). 研究表

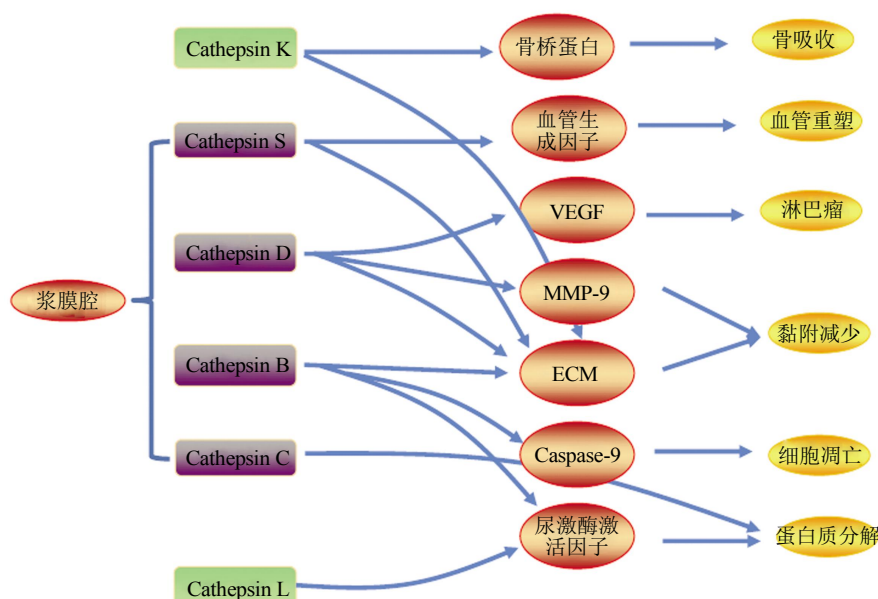


Fig. 3 The Multiple functions of cathepsins to cells

图3 组织蛋白酶对细胞的多重作用

明, 胰蛋白酶原也存在于胰腺癌、大肠癌、舌癌、肝癌、胃癌等多种肿瘤细胞中, 作为生长刺激因子, 活化 PAR-2, 促癌细胞增殖, 协同尿激酶前体、MMPs 等与肿瘤侵袭相关的蛋白酶, 降解 ECM, 促进肿瘤迁移^[67].

蛋白酶活化受体(PARs)参与众多蛋白酶, 如胰蛋白酶、MMPs 的生理过程. 其中 PAR-1 最为重要, 可调控 ECM 重塑, 同时在血小板和内皮细胞表达, 促凝血, 通过血管内皮损伤、血小板活化、纤溶活性改变、血流迟滞等, 导致血栓形成, 继而促进恶性细胞的生长和转移^[68]. 研究提示, PAR-1 通过凝血酶促进肿瘤细胞和内皮细胞的生长、增强肿瘤细胞的致瘤性; 降解基底膜, 减少黏附, 助肿瘤细胞脱离; 激活 MAPK/ERK 信号通路, 加快细胞体内转移^[69]; 促进 VEGF mRNA 的转录及翻译, 诱导肿瘤血管发育、形成和生长. 此外, 凝血酶还可促进癌细胞对 ECM 的重塑, 促进肿瘤侵袭转移^[70].

胰蛋白酶与 PAR-2 则涉及以下机制: a. TGF- α -EGFR-Src-ERK1/2 途径. 胰蛋白酶和 PAR-2 激动肽降解 MMPs, 释放 TGF- α (transforming growth factor α , TGF- α), 激活 EGFR (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和 Src, 进而调节 ERK1/2 的活性, 介导其下游信号转导调控细胞的增殖、分化、黏附、侵袭和迁移. b. 钙

离子通道. 钙离子可通过钙调蛋白使许多蛋白质的丝氨酸残基磷酸化, 参与癌细胞的分化、增殖等. PAR-2 可偶联 G α q/11 和磷脂酶 C β 导致磷脂酰二磷酸肌醇水解、钙离子动员, 进而激活蛋白激酶 C (PLC)、ERK1/2 和酪氨酸激酶(TK). c. 环氧合酶 2 途径. 环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素(prostaglandin, PG)合成过程中的重要限速酶. 研究发现 PAR-2 激活后可增强 COX-2 表达, 促进胰腺癌细胞增殖. d. 胰蛋白酶自分泌环作用. 多种肿瘤细胞中存在自分泌循环, PAR-2 激活后可诱导胰腺癌细胞分泌 TGF- β 、TAT、MMP-2, 进而促进胰腺癌细胞增殖、黏附、血管形成及侵袭转移过程. e. IL-8 途径. IL-8 通过趋化因子受体 CXCR1 和 CXCR2 发挥作用, 促进有丝分裂与血管生成. 如人结肠癌与胃腺癌细胞释放 IL-8, 以自分泌和旁分泌方式作用于胰腺癌细胞及其周围成纤维细胞, 促进肿瘤增殖和侵袭过程. f. 组织因子途径. 组织因子(tissue factor, TF)通过 PAR 介导信号转导, 除参与凝血过程外, 还参与调节血管生成、肿瘤生长和转移等. 研究表明, TF 在胰腺癌、乳腺癌、急性白血病等肿瘤细胞表面和血管内皮细胞均异常增高, 参与肿瘤生物学行为发生及肿瘤微环境形成. 胰蛋白酶与 PAR-2 可通过上述多种方式实现信号转导, 不同途径间可能有交互作用, 共

同参与肿瘤细胞增殖和侵袭转移。

综上, 不同蛋白酶参与细胞迁移的机制和效应各异(表 2), 综合理解和利用将有助于人类正常生理过程的调控和病理过程诊断、监视、防御, 进而为相关疾病的有效治疗提供诊断标准和施药靶点, 提高预后的准确性和精准度。

Table 2 Comparison of different proteases related to cancer cell migration
表 2 与肿瘤迁移相关的不同蛋白酶的比较

类别	生理		病理		参考文献
	机制	效应	机制	效应	
泛素蛋白酶 (UPS)	多结构、多步骤、主动耗能	代谢失活损坏的蛋白、毒素、脂肪、癌细胞等, 参与血管重塑	通过 p53、p21 影响细胞周期, 促细胞增殖, 使 VSMC 转变为增殖型	动脉粥样硬化、冠状动脉成形术后再狭窄、心肌肥厚等心血管疾病	[20-22, 29-30]
基质金属蛋白酶 (MMPs)	降解 ECM, 促进细胞增殖、生长	参与胚胎发育、伤口愈合、瘢痕形成	降解 ECM, 促进细胞增殖、生长、迁移, 反馈失调致细胞不可控	降解 ECM, 促增殖、新生血管的形成, 发展恶性	[33, 35, 37, 40]
组织蛋白酶 (cathepsin)	合成 VEGF, 参与溶酶体线粒体轴凋亡途径, 分解弹性纤维和胶原	促血管修复、新生, 代谢废物, 促细胞凋亡, 参与免疫、炎症反应	合成 VEGF, 降解 ECM, 独立浆膜腔, 稳定微环境	促血管新生, 降解 ECM, 促转移和肿瘤生长发育	[54-56]
胰蛋白酶 (trypsin)	酶原形式分泌, 激活后消化食物	食物消化	TGF- α -EGFR-Src-ERK1/2、钙离子通道、COX-2、蛋白酶自分泌环作用、IL-8、组织因子等多途径	降解 BM、ECM 调控肿瘤细胞生长、分化、增殖、黏附、侵袭、迁移等	[65-68]

4 总结与展望

细胞迁移是机体发育的基本过程之一, 在胚胎发育、免疫监视、损伤修复、血管新生等生理过程中扮演重要角色, 同样影响着肿瘤发生发展。而肿瘤细胞的特异性主要是: 胞间连接明显减弱、局部酶类分泌异常使细胞软化、黏附不稳而易于浸润转移。浸润转移往往预示着病情的恶化, 故攻克肿瘤可从其基础细胞迁移入手。蛋白酶则通过作用于微环境的主成分 ECM 影响细胞迁移。本文综述了蛋白酶家族中对细胞迁移影响作用巨大、机制较清晰、与肿瘤转移密切相关的泛素蛋白酶系(UPS)、基质金属蛋白酶(MMPs)、组织蛋白酶和胰蛋白酶及其激活受体的研究进展, 为深入研究肿瘤细胞迁移及癌的防治策略提供理论基础和方法线索。

其中, MMPs 共性在于能降解 ECM 主成分, 参与伤口愈合、细胞增殖等, 其临床意义在于其破坏 ECM 的完整性, 破坏了肿瘤细胞侵袭转移中的组织学屏障。据此, 有大量研究以 MMPs 作为治疗靶点, 在临床上, 也被作为诊断和预后的标记

物^[71]。MMPs 抑制剂 (matrix metalloproteinase inhibitors, MMPI)早在 1990 年就被作为抗肿瘤药物应用于临床^[72-74]。

近年, 有临床试验以少数蛋白酶抑制剂作为靶点治疗肿瘤的报道^[19]。但制约肿瘤治疗的瓶颈依然, 也许以预示病情进一步恶化、扩散的癌细胞浸润、迁移为突破口是一个可行的策略选择。但人们对此过程的机制及相关蛋白酶的认识尚浅。鉴于此, 基于我们对马尾松树皮提取物影响 HeLa 细胞迁移和侵袭能力的先期探索^[75-76]和进一步思考, 建议后续研究从以下几个方面进行: a. 开展酶谱学分析, 基于不同肿瘤酶谱特点, 强化人体免疫防御机制探查, 堵住肿瘤细胞改变自身以适应环境的主动逃避免疫监视漏洞, 为恶性肿瘤的个性化治疗提供基础数据和治疗线索。b. 加强和深化蛋白酶对肿瘤发生、发展功能的全面认识, 挖掘更多像 MMP-8 那样在某些肿瘤里发挥着负性作用的蛋白酶, 为攻克癌症提供新思路和新途径。c. 加强蛋白酶在人体基本生理、常见病理活动中具体机制的集成性(micro-array)研究, 从而推测其与肿瘤等疾

病间的联系强弱, 探明具体途径及效应, 为相关临床治疗药物的筛选奠定基础. 随着肿瘤在疾病谱中地位的日益提高, 相关机理有待深究. 蛋白酶的功能及机制也将成为研究重点, 期待随技术进步和深入研究, 人们对肿瘤与蛋白酶关系的认识能更全面、具体, 从而为肿瘤防治提供有效靶点.

致谢 感谢编辑与审稿人对充实文章内容、提升文章高度和质量提出的宝贵意见!

参 考 文 献

- [1] Hamada H. Role of physical forces in embryonic development. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, **47-48**: 88-91
- [2] Samstag Y, John I, Wabnitz G H. Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration. *Immunol Rev*, 2013, **256**(1): 30-47
- [3] Rustad K C, Wong V W, Gurtner G C. The role of focal adhesion complexes in fibroblast mechanotransduction during scar formation. *Differentiation*, 2013, **86**(3): 87-91
- [4] Hasan S S, Siekmann A F. The same but different: signaling pathways in control of endothelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, **36**: 86-92
- [5] Clark A G, Vignjevic D M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, **36**: 13-22
- [6] Kai F, Laklai H, Weaver V M. Force matters: biomechanical regulation of cell invasion and migration in disease. *Trends Cell Biol*, 2016, **26**(7): 486-497
- [7] Alvarez-Gonzalez B, Meili R, Firtel R, *et al.* Cytoskeletal mechanics regulating amoeboid cell locomotion. *Appl Mech Rev*, 2014, **66**(5): 0508041-05080414
- [8] Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, 2011, **147**(5): 992-1009
- [9] Friedl P, Wolf K. Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol*, 2010, **188**(1): 11-19
- [10] van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res*, 2011, **728**(1-2): 23-34
- [11] Halper J, Kjaer M. Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Adv Exp Med Biol*, 2014, **802**: 31-47
- [12] Paz H, Pathak N, Yang J. Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis. *Oncogene*, 2014, **33**(33): 4193-4202
- [13] Wells A, Grahovac J, Wheeler S, *et al.* Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, **34**(5): 283-289
- [14] Heissig B, Eiamboonsert S, Salama Y, *et al.* Cancer therapy targeting the fibrinolytic system. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **99**(Pt B): 172-179
- [15] Chopin V, Lagadec C, Toillon R, *et al.* Neurotrophin signaling in cancer stem cells. *Cell Mol Life Sci*, 2016, **73**(9): 1859-1870
- [16] Sun C C, Qu X J, Gao Z H. Integrins: players in cancer progression and targets in cancer therapy. *Anticancer Drugs*, 2014, **25** (10): 1107-1121
- [17] Le Devedec S E, Yan K, de Bont H, *et al.* Systems microscopy approaches to understand cancer cell migration and metastasis. *Cell Mol Life Sci*, 2010, **67**(19): 3219-3140
- [18] Toriseva M, Kahari V M. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**(2): 203-204
- [19] Skandalis S S, Aletras A J, Gialeli C, *et al.* Targeting the tumor proteasome as a mechanism to control the synthesis and bioactivity of matrix macromolecules. *Curr Mol Med*, 2012, **12**(8): 1068-1082
- [20] Powell S R, Herrmann J, Lerman A, *et al.* The ubiquitin-proteasome system and cardiovascular disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012, **109**: 295-346
- [21] Herrmann J, Ciechanover A, Lerman L O, *et al.* The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases-a hypothesis extended. *Cardiovasc Res*, 2004, **61**(1): 11-21
- [22] Bai T, Wang F, Mellen N, *et al.* Diabetic cardiomyopathy: role of the E3 ubiquitin ligase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, **310**(7): 473-483
- [23] Willis M S, Bevilacqua A, Pulinilkunnil T, *et al.* The role of ubiquitin ligases in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, **71**: 43-53
- [24] Cheng Q, Wang H, Jiang S, *et al.* A novel ubiquitin-protein ligase E3 functions as a modulator of immune response against lipopolysaccharide in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol*, 2016, **60**: 180-190
- [25] Marfella R, D'Amico M, Di Filippo C, *et al.* The possible role of the ubiquitin proteasome system in the development of atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Diabetol*, 2007, **6**: 35
- [26] Wang Y, Chen L, Wu Z, *et al.* miR-124-3p functions as a tumor suppressor in breast cancer by targeting CBL. *BMC Cancer*, 2016, **16**(1): 826
- [27] Kim T W, Kang Y K, Park Z Y, *et al.* SH3RF2 functions as an oncogene by mediating PAK4 protein stability. *Carcinogenesis*, 2014, **35**(3): 624-634
- [28] Nemaiova A, Moll U M, Petrenko O, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor coordinates DNA damage response with the proteasomal control of the cell cycle. *Cell Cycle*, 2007, **6** (9): 1030-1034
- [29] Schulz R, Marchenko N D, Holembowski L, *et al.* Inhibiting the HSP90 chaperone destabilizes macrophage migration inhibitory factor and thereby inhibits breast tumor progression. *J Exp Med*, 2012, **209**(2): 275-289
- [30] Teixeira L K, Reed S I. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem*, 2013, **82**: 387-414

- [31] 刘 夏, 孙瑞红. 泛素-蛋白酶体抑制剂对血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响. 医学综述, 2015(20): 3675-3677
Li X, Sun H R. Med Rev, 2015(10): 3675-3677
- [32] Gross J, Lapiere C M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci USA, 1962, **48**(6): 1014-1022
- [33] Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, *et al.* Role of Matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. Int J Mol Sci, 2016, **17**(6), 868; doi:10.3390/ijms17060868
- [34] Page-McCaw A, Ewald A J, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, **8**(3): 221-233
- [35] Woessner J F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. FASEB J, 1991, **5**(8): 2145-2154
- [36] Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. Biochim Biophys Acta, 2012, **1825**(1): 29-36
- [37] Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer, 2003, **3**(6): 422-433
- [38] Yurchenco P D. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011, **3**: doi: 10.1101/cshperspect.a004911
- [39] Scandolera A, Odoul L, Salesse S, *et al.* The elastin receptor complex: a unique matricellular receptor with high anti-tumoral potential. Front Pharmacol, 2016, **7**: 32. doi: 10.3389/fphar.2016.00032. eCollection 2016
- [40] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell, 2010, **141**(1): 52-67
- [41] Tu K, Dou C, Zheng X, *et al.* Fibulin-5 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-7 expression. BMC Cancer, 2014, **14**: 938. doi: 10.1186/1471-2407-14-938
- [42] Breig O, Yates M, Neaud V, *et al.* Metalloproteinase meprin α regulates migration and invasion of human hepatocarcinoma cells and is a mediator of the oncoprotein Reptin. Oncotarget, 2016, doi: 10.18632/oncotarget.13975.[Epub ahead of print]
- [43] Jacob A, Prekeris R. The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. Front Cell Dev Biol, 2015, **3**: 4(DOI: 10.3389/fcell.2015.00004. eCollection 2015)
- [44] Simon F, Bergeron D, Larochelle S, *et al.* Enhanced secretion of TIMP-1 by human hypertrophic scar keratinocytes could contribute to fibrosis. Burns, 2012, **38**(3): 421-427
- [45] Navratilova, Z, Kolek V, Petrek M. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in chronic obstructive pulmonary disease. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2016, **64**(3): 177-193
- [46] Bourboulia D, Stetler-Stevenson W G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. Semin Cancer Biol, 2010, **20**(3):161-168
- [47] Gough P J, Gomez I G, Wille P T, *et al.* Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. J Clin Invest, 2006, **116**(1): 59-69
- [48] Wells A, Grahovac J, Wheeler S, *et al.* Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. Trends Pharmacol Sci, 2013, **34**(5): 283-289
- [49] Alonso-Escolano D, Strongin A Y, Chung A W, *et al.* Membrane type-1 matrix metalloproteinase stimulates tumour cell-induced platelet aggregation: role of receptor glycoproteins. Br J Pharmacol, 2004, **141**(2): 241-252
- [50] Jiang Q, Pan Y, Cheng Y, *et al.* Lunasin suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 *via* the FAK/Akt/ERK and NF-kappaB signaling pathways. Oncol Rep, 2016, **36**(1): 253-262
- [51] Zhao F, Li L, Guan L, *et al.* Roles for GP IIb/IIIa and alphavbeta3 integrins in MDA-MB-231 cell invasion and shear flow-induced cancer cell mechanotransduction. Cancer Lett, 2014, **344**(1):62-73
- [52] Pradhan-Palikhe P. Plasma level of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 but not that of matrix metalloproteinase-8 predicts survival in head and neck squamous cell cancer. Oral Oncol, 2010, **46**(7): 514-518
- [53] Korpi J T, Kervinen V, Maklin H, *et al.* Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. Br J Cancer, 2008, **98**(4): 766-775
- [54] Verbovsek U, Van Noorden C J, Lah T T. Complexity of cancer protease biology: Cathepsin K expression and function in cancer progression. Semin Cancer Biol, 2015, **35**: 71-84
- [55] Aggarwal N, Sloane B F. Cathepsin B: multiple roles in cancer. Proteomics Clin Appl, 2014, **8**(5-6): 427-437
- [56] VanderStappen J, Williams A C, Maciewicz R A, *et al.* Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. Int J Cancer, 1996, **67**(4): 547-554
- [57] Aggarwal N, Sloane B F. Cathepsin B: multiple roles in cancer. Proteomics Clin Appl, 2014, **8**(5-6): 427-437
- [58] 胡振宇. 组织蛋白酶 D 对口腔鳞癌中 VEGF-C 和 VEGF-D 的影响及淋巴管生成作用的研究. 医学研究杂志, 2012(1): 130-132
Hu Z Y. J Med Res, 2012 (1):130-132
- [59] Pandurangan A K, Dharmalingam P, Sadagopan S K, *et al.* Luteolin inhibits matrix metalloproteinase 9 and 2 in azoxymethane-induced colon carcinogenesis. Hum Exp Toxicol, 2014, **33**(11):1176-1185
- [60] Donepudi M S, Kondapalli K, Amos S J, *et al.* Breast cancer statistics and markers. J Cancer Res Ther, 2014, **10**(3): 506-511
- [61] Pranjol M Z I, Gutowski N, Hannemann M, *et al.* The potential role of the proteases cathepsin D and cathepsin L in the progression and metastasis of epithelial ovarian cancer. Biomolecules, 2015, **5**(4): 3260-3279
- [62] Goulet B, Baruch A, Moon N S, *et al.* A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and

- processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell*, 2004, **14**(2): 207–219
- [63] Santos-Rosa H, Kirmizis A, Nelson C, *et al.* Histone H3 tail clipping regulates gene expression. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, **16**(1): 17–22
- [64] Fei Y, Xiong Y, Zhao Y, *et al.* Cathepsin L knockdown enhances curcumin-mediated inhibition of growth, migration, and invasion of glioma cells. *Brain Res*, 2016, **1646**: 580–588
- [65] Verbovsek U, Van Noorden C J, Lah T T. Complexity of cancer protease biology: Cathepsin K expression and function in cancer progression. *Semin Cancer Biol*, 2015, **35**: 71–84
- [66] Wilkinson R D A, Williams R, Scott C J, *et al.* Cathepsin S: therapeutic, diagnostic, and prognostic potential. *Biol Chem*, 2015, **396**(8): 867–882
- [67] Itkonen O. Human trypsinogens in the pancreas and in cancer. *Scand J Clin Lab Invest*, 2010, **70**(2): 136–143
- [68] Alberelli M A, De Candia E. Functional role of protease activated receptors in vascular biology. *Vascul Pharmacol*, 2014, **62** (2): 72–81
- [69] McDonald J A. Canonical and noncanonical roles of Par-1/MARK kinases in cell migration. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2014, **312**: 169–199
- [70] Gutierrez-Rodriguez M, Herranz R, from multiple PAR1 receptor/protein interactions to their multiple therapeutic implications. *Curr Top Med Chem*, 2015, **15**(20): 2080–2114
- [71] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*, 2011, **41**(2): 271–290
- [72] Coussens L M, Fingleton B, Matrisian L M. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, 2002, **295**(5564): 2387–2392
- [73] Vandenbroucke R E, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? *Nat Rev Drug Discov*, 2014, **13**(12): 904–927
- [74] Vandooren J, Opdenakker G, Loadman P M, *et al.* Proteases in cancer drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, **97**: 144–155
- [75] Wu D, Li S, Yang D, *et al.* Effects of *Pinus massoniana* bark extract on the adhesion and migration capabilities of HeLa cells. *Fitoterapia*, 2011, **82**(8): 1202–1205
- [76] Li Y, Feng J, Zhang X, *et al.* Effects of *Pinus massoniana* bark extract on the invasion capability of HeLa cells. *Journal of Functional Foods*, 2016, **24**: 520–526

The Research Progress on Proteases Involved in Cell Migration*

SONG Hai-Fei¹⁾, LIN Bo-Wen¹⁾, GONG Cheng-Chen¹⁾, CUI Ying-Yu^{1, 2, 3)**}

¹⁾ *Department of Regenerative Medicine, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China;*

²⁾ *Institute of Medical Genetics, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200092, China;*

³⁾ *Key Laboratory of Arrhythmias, Ministry of Education (Tongji University), Shanghai 200120, China)*

Abstract Proteases play a key role in embryogenesis, immune defense, tissue damage repair, angiogenesis, tumor metastasis and other biological processes related to cell migration. In recent years, the mechanisms of protease-mediated tumor cells invasion and migration have been gradually becoming topic of great interest, but the mechanisms of tumor cells escape immune surveillance, proliferation, migration, invasion and ectopic colonization is still not clear. As a result, study on relevant proteases function and mechanism is of importance. In this paper, we summarized the development of studies on the role of relevant proteases in the migration of tumor cells from the normal physiological functions, so as to provide clues and new ideas on the screening and R&D of novel protease inhibitor drugs to target tumor invasion and migration process.

Key words cell migration, invasion and migration of tumor cells, protease, matrix metalloproteinase, cathepsin

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0329

* This work was supported by grants from the University Students Innovation Training Program of Shanghai Municipal Government (201610247134) and the Yangfan Project of Tongji University School of Medicine (2012YF05).

**Corresponding author.

Tel: 86-21-65983213, Fax: 86-21-65987071, E-mail: yycui@tongji.edu.cn

Received: October 25, 2016 Accepted: January 17, 2017