靶向诱导内皮细胞凋亡抑制肿瘤血管新生的研究进展

杨　霞[1,2]
(中山大学 1. 中山医学院生化教研室,2. 中山医学院心血管研究群体,广东 广州　510080)

作者简介:杨霞,博士,教授,博士生导师。广东省生物化学学会常务理事、秘书长,广东省高校"千百十"人才省级培养对象。致力于 K5、PEDF、KBP 等血管抑制因子对恶性肿瘤的治疗作用、结构基础和分子机制研究。截至目前作为主持人已获得国家自然科学基金(4 项)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金、广东省自然科学基金重点及面上项目、广东省高层次人才计划、广州市科技计划项目(2 项)等项目的资助。发表相关论文 53 篇,其中在 *Diabetes*, *J Biol Chem* , *Apoptosis* 等国际专业期刊上发表 SCI 收录论文 36 篇(第一作者 2 篇,通讯作者 22 篇)。作为第二完成人获得教育部、广东省自然科学二等奖各 1 项;作为第二申请人获得国家发明专利 2 项。E-mail: yangxia@mail.sysu.edu.cn。

杨　霞

摘　要:血管新生是肿瘤发生发展中一个重要的病理特征,抗血管新生已经成为肿瘤治疗研究的一大热点。目前抗血管新生的策略主要是应用血管新生刺激因子拮抗剂或血管新生抑制因子,以恢复肿瘤中被打破的血管新生平衡。相比于血管新生刺激因子拮抗剂,内源性血管新生抑制因子展现了更好的治疗前景,但是其分子机制还有待进一步阐明。内源性血管新生抑制因子包括两类,一类是前体蛋白的水解片段,如人纤溶酶原 K5(plasminogen kringle 5, K5)、血管抑素(angiostatin/ kringle 1-4)、内皮抑素(endostatin)等;另一类是细胞分泌性的蛋白质,如色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)、激肽释放酶结合蛋白(kallikrein-binding protein, KBP/kallistatin)、抗凝血酶(antithrombin)等。本文以 K5、PEDF、KBP 为例,分别介绍其生物学功能、抗肿瘤血管新生机制及应用前景等方面的研究进展,希望这些研究能够为未来抗肿瘤血管新生治疗提供借鉴。

关键词:肿瘤;血管新生;内皮细胞凋亡;K5;PEDF;KBP
中图分类号:R73　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1672-3554(2017)02-0204-11

Inhibition of Tumor Angiogenesis by Targeted Induction of Endothelial Cell Apoptosis

YANG Xia[1,2]
(1. Department of Biochemistry, 2. Cardiovascular Research Program, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Angiogenesis is one of the important pathological characteristics in the development of tumor growth. Hence, anti-angiogenes is has become a hot topic in the field of cancer research. The current strategy for anti-angiogenesis therapy is to restore the angiogenic balance which is broken in the tumor via either block of proangiogenic factorsor application of angiogenic inhibitors. Endogenous angiogenic inhibitors show more promising prospects compared with proangiogenic factor antagonists. However, the underlying mechanisms for the angiogenic inhibitors remain to be thoroughly elucidated. There are two kinds of endogenous angiogenic inhibitors, one is the hydrolyzed fragments of precursor protein, such as plasminogen Kringle 5(K5), angiostatin/ kringle 1~4, endostatin, etc; the other is cell secreted proteins, such as pigment epithelium-derived factor(PEDF), kallikrein-binding protein(KBP/kallistatin), antithrombin, etc. Here we summarized the research progresses on the biological functions, underlying mechanisms of tumor angiogenesis and application prospects of K5, PEDF, and KBP, so as to provide insights into the antiangiogenic therapies of tumor in the future.

Key words: tumor; angiogenesis; endothelial cell apoptosis; K5; PEDF; KBP
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2017, 38(2): 204-214]

收稿日期:2017-01-16
基金项目:国家自然科学基金(81272515, 81572342);科技部新药创制重大专项(2013ZX09102-053);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20130171110053);广东省自然科学基金(2014A030313073, 2016A030311035);广东省高等学校高层次人才项目

血管新生(angiogenesis)是指从已经存在的毛细血管网上再大量生成新生血管的过程,包括血管基膜和血管外基质的降解,内皮芽孢的生成、增殖和迁移,以及血管管腔的形成和动静脉分化,最后形成毛细血管的过程。在某些情况下,如外伤和血管闭塞过程中,血管新生对恢复血供和促进伤口愈合起到积极作用。然而在肿瘤进程中,当肿瘤体积增长到一定程度时,即2 ~ 3 mm^3,肿瘤内部就会有新生血管的生成。新生血管的长入不仅提供肿瘤生长需要的营养物质和氧气以及带走代谢废物,内皮细胞还为肿瘤组织生长提供促进因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和成纤维生长因子(fibroblast growth factor,FGF)等。同时由于新生血管结构和功能的不完整,更是癌细胞广泛浸润、转移和肿瘤复发的基础[1]。血管新生是肿瘤发生发展中一个重要的病理特征,抗血管新生已经成为肿瘤治疗研究的一大热点。目前抗血管新生的策略主要是应用血管新生刺激因子拮抗剂或血管新生抑制因子,以恢复肿瘤中被打破的血管新生平衡。相比于血管新生刺激因子拮抗剂,内源性血管新生抑制因子包括两类,一类是前体蛋白的水解片段,如人纤溶酶原K5(plasminogen kringle 5,K5)、血管抑素(angiostatin/ kringle 1-4)、内皮抑素(endostatin)等;另一类是细胞分泌性的蛋白质,如色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)、激肽释放酶结合蛋白(kallikrein-binding protein, KBP/kallistatin)、抗凝血酶(antithrombin)等。本文以K5、PEDF、KBP为例,分别介绍其生物学功能、抗肿瘤血管新生机制及应用前景等方面的研究进展,希望这些研究能够为未来抗肿瘤血管新生治疗提供借鉴。

1　抗肿瘤血管新生策略

关于肿瘤血管新生的研究可以追溯到100多年前,当时的德国病理学家们发现肿瘤的发生发展往往伴随着血管的增多[2],但是原因不明。直到1968年,有学者提出:可能是肿瘤分泌了某些促进血管新生的物质导致血管的增多[3]。1971年,Judah Folkman发现肿瘤的生长是依赖血管新生的,他提出了通过抑制肿瘤的血管新生治疗肿瘤的学说[4]。此后抑制肿瘤血管新生成为肿瘤治疗研究的一大热点。

新生血管的形成是一个极其复杂的过程。在这一过程中,血管新生刺激因子和血管新生抑制因子共同发挥作用,二者的动态平衡对血管的稳态起到关键作用。常见的刺激因子有VEGF、bFGF、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors,IGF)等,常见的抑制因子有血管抑素(angiostatin)、内皮抑素(endostatin)、PEDF、kallistatin、肿瘤抑素(tumstatin)等。刺激因子和抑制因子之间的平衡在血管新生的调节中起关键作用。在生物发育的早期,组织增生、分化需要大量的新生血管提供营养,此时,血管新生刺激因子高表达,在平衡中占主导地位;成年以后,除去伤口愈合等特殊情况,血管新生减弱甚至停止,此时,血管新生抑制因子高表达,在平衡中占主导地位;但是在肿瘤等某些疾病状况下,肿瘤微环境中的低氧(hypoxia)条件能够诱导刺激因子如VEGF过度产生而抑制因子如PEDF产生下降,正常的平衡被打破从而导致大量不正常的新生血管形成。

新生血管形成的平衡假说已为大量的研究所证实。几乎所有的新生血管丰富的实体瘤(solid tumor)都有VEGF及其受体(VEGF receptor, VEGFR)的高表达和内源性抑制因子如PEDF、kallistatin的低表达。所以目前治疗肿瘤血管新生的主要策略是:要么采用血管新生刺激因子的拮抗剂,要么应用血管新生抑制因子,以恢复病理状况下被打破的血管新生调控的平衡[5]。

2　抗肿瘤血管新生的药物

如前所述,治疗肿瘤血管新生的主要策略是采用血管新生刺激因子的拮抗剂或者应用血管新生抑制因子,因此抗肿瘤血管新生的药物主要为以下两种:

2.1　血管新生刺激因子的拮抗剂类药物

在血管新生刺激因子中,VEGF及其受体VEGFR是血管新生过程中最有特征性和代表性的信号通路,早期的抗肿瘤血管新生治疗药物研发主要集中在应用血管新生刺激因子拮抗剂阻断VEGF/VEGFR信号通路。VEGF家族至少有7种异构体,其中VEGFA是最重要的血管新生刺激因子,其主要来源于肿瘤细胞、肿瘤微环境下的基质细胞。VEGF通过与VEGFR1(Flt-1)和VEGFR2

(Flk-1/KDR)结合启动下游信号通路,促进细胞分裂增殖、增加血管通透性、促进血管重构,因此阻断VEGF/VEGFR信号通路可以抑制血管新生。美国FDA批准的第一个针对肿瘤血管新生的药物贝伐单抗(avastin)即是针对VEGF的单克隆抗体,通过抗体阻断VEGF/VEGFR信号通路的激活,从而抑制血管新生[6]。阿柏西普(aflibercept),是VEGFR1和VEGFR2的重组融合蛋白,能够与内源性的VEGF-A、VEGF-B结合,抑制VEGF/VEGFR信号通路的活化从而抑制血管新生[7]。

VEGFR属于酪氨酸激酶型受体,针对VEGFR也上市了不少药物,包括索拉菲尼(sorafenib)和舒尼替尼(sunitinib)等,其中,索拉菲尼是一种多激酶抑制剂,能够有效抑制Raf激酶、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、PDGFR-β等,从而抑制肿瘤增殖和肿瘤血管新生。而舒尼替尼则是一种酪氨酸激酶抑制剂,通过抑制VEGFR从而抑制肿瘤血管新生。

虽然这些上市的抗血管新生药物在抑制血管新生方面取得了一定的疗效,但是也存在很多问题,包括:①容易产生耐药性;②特异性不强,副作用较大;③抗血管效果不佳,由于这些拮抗剂只能阻断VEGF的作用,而对其他血管新生刺激因子不能发挥作用,因此效果受限。

2.2 内源性血管新生抑制因子类药物

内源性血管新生抑制因子由于其靶向作用于增殖的血管内皮细胞,且对已有的正常血管无影响,副作用小,抗血管活性强,不易产生耐药性等优点备受关注。内源性血管新生抑制因子包括两类,一类为蛋白质大分子前体的水解产物,如纤溶酶原(plasminogen)水解后可产生一组具有抑制血管新生作用的小分子片段:血管抑素(angiostatin/kringle 1-4),kringles 1-5,kringles 1-3和kringles 5(Plasminogen kringle 5, K5);内皮抑素(endostatin)是胶原蛋白XVIII的水解多肽;肿瘤抑素(tumstatin)是胶原蛋白IV的水解多肽[8];另一类是蛋白质家族中的一些成员,如目前最典型的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族(serine proteinase inhibitor, serpin super family)中的PEDF(pigment epithelium derived factor),KBP(kallikrein-binding protein),抗凝血酶(antithrombin),乳腺丝抑蛋白(maspin)等。

在以上血管新生抑制因子中,血管抑素(angiostatin)、内皮抑素(endostatin)等在二十世纪九十年代初被发现并成功用于肿瘤生长抑制的实验研究并进入临床试验,极大促进了多个新的血管新生抑制因子的发现及其功能研究[9]。重组人血管内皮抑素(Endostar,恩度)成为我国针对肿瘤血管新生第一个上市的药物。恩度主要是通过特异性的诱导内皮细胞凋亡,从而抑制肿瘤血管新生和肿瘤生长,其疗效还需要临床上进一步观察和确定。而后来出现的K5、PEDF、KBP等拥有更高效的抗血管生成活性,在靶向抑制内皮细胞增殖的同时,还具有血管正常化、对放化疗增敏的功能,展现了很好的抗肿瘤血管新生的前景。下面重点就近年来本课题组对这3个靶向诱导内皮细胞凋亡的血管新生抑制因子的研究作一综述。

3 人纤溶酶原K5

3.1 K5的分子结构与生物学功能

在已发现的众多的血管抑制因子中,人纤溶酶原K5是目前发现的分子质量小、性质稳定、活性最强的血管新生抑制剂之一[10]。人纤溶酶原(plasminogen)含有5个环状结构域(kringles),每个环由80个氨基酸残基组成,含3个二硫键,形成双环状构象。水解后可产生一组具有抑制血管新生作用的小分子片段:angiostatin(kringles 1-4),kringles 1-5,kringles 1-3和kringles 5(K5)[8]。K5和血管抑素都是人纤溶酶原的水解片段,均具有抑制血管新生的作用。较之血管抑素(分子质量约45 ku),K5具有分子质量小(16 ku)、性质稳定且活性更强(动物实验表明,angiostatin的EI_{50}约为70 nmol/L,K5的EI_{50}约为30 nmol/L)的优点,K5还可抑制内皮细胞的迁移及诱导内皮细胞凋亡。因此我们推测K5与血管抑素类似,同样具备抗肿瘤的作用。

以往,K5的研究主要集中在眼新生血管领域,有关K5对恶性肿瘤血管新生和肿瘤生长转移的报道缺乏。一直到2005年才有K5基因治疗脑神经胶质原位瘤的首例报道[11]。我们发表在*Cancer Biology & Therapy*的研究论文首次报道K5具有抑制小鼠和裸鼠肝癌血管生成和肿瘤生长的作用[12],也是治疗肝癌的首例报道。与我们的研究类似,近年来其他课题组的研究也发现K5通过有效抑制肿瘤组织血管新生抑制多种组织来源的肿瘤生长,例如神经胶质瘤[13]、Lewis肺癌[14]、卵巢癌[15]、

乳腺癌[16]等。这些研究拓宽了K5治疗血管新生性疾病的范围、提高了其应用价值，也为肝癌等恶性肿瘤的治疗提供了新的强效候选药物。

3.2　K5抗血管新生活性的结构基础

相对于K5功能和潜在临床应用价值的研究，其抑制血管新生的活性和Kringle结构域中二硫键的位置、数量所决定的内外环结构的关系尚不明确。Cao等[17]研究证实破坏血管抑素Kringle环与环之间和环内部的二硫键能显著降低其抗内皮细胞增殖的活性。但是对K5的Kringle结构与其功能关系的研究尚无明确结论[18-19]。Ji等[18]用还原和烷基化处理的K5比K5本身具有更强的抗内皮细胞增殖的能力，其原因可能是Kringle结构“掩盖”了K5中某些功能性基团与内皮细胞的有效作用；而Tarui等[19]用高浓度的尿素（8 mol/L）处理纯化的K5，能使K5丧失抗内皮细胞增殖和迁移的能力。

究竟是天然构型的K5还是打开二硫键的还原型K5更有活性需要进一步探讨。因此，为了明确K5结构与功能的关系，我们根据K5蛋白的结构特征和二硫键分布特点，用基因缺失的方法准确地构建了K5的四种缺失突变体：K5 mut1（Cys462-Cys541），K5 mut2（Met463-Cys541），K5 mut3（Cys483- Cys536）和K5 mut4（Gln484-Cys536）。其中，K5 mut1删除了K5 kringle结构域外环两端的氨基酸残基，但保留完整的由三个二硫键构成的kringle结构域；K5 mut2是在K5 mut1的基础上将K5第一个二硫键打开；K5 mut3仅保留由两个二硫键组成的内环结构；K5 mut4在K5 mut3的基础上将K5第二个二硫键打开。利用原核表达体系获得高纯度、可溶性重组蛋白[20]。在体外细胞模型和体内肝癌小鼠和裸鼠皮下种植瘤模型上分析其抗血管新生的活性，从而判断维持K5生物活性所需的最小氨基酸序列和基本空间结构，以明确K5 kringle结构域和二硫键与其功能的关系[21]。我们的研究发现，含有不完整Kringle结构的其他3种缺失突变体不具备抗血管新生的活性，因此该研究结果提示完整的Kringle结构（包含3个二硫键）是维持人纤溶酶原K5抗血管新生活性的必需结构域，K5分子中Kringle结构域外的N端和C端氨基酸并非其活性所必需[22]。

我们的体外实验结果表明K5 mut1具有较K5更强的抑制视网膜毛细血管内皮细胞生长的活性；在氧诱导的视网膜血管增生大鼠模型的体内实验中，K5 mut1展现了其较K5更强的抑制视网膜血管新生的作用[23]；在两种肝癌模型的体内实验中，我们同样发现K5 mut1具有比K5更强的抑制肝癌血管生成和肿瘤生长的作用[24]。我们分析K5 mut1活性增强的可能原因是K5蛋白N-端10个氨基酸残基中含有5个带负电荷的酸性氨基酸，通过与kringle结构内带正电荷的碱性氨基酸相互作用遮挡和掩盖了K5与内皮细胞特异性结合的功能域，因此影响了K5的活性[24]。

3.3　K5抑制肿瘤血管新生的分子机制

K5能够在血管新生的多个环节发挥其抗血管新生的作用，但其中的具体机制还不完全清楚。目前认为K5抗血管新生的机制主要有以下两种。

3.3.1　*抑制内皮细胞迁移、增殖，促进内皮细胞凋亡*

Ji等[18]证实K5可选择性地抑制处于增殖状态下的内皮细胞迁移，但对静止期及正常内皮细胞的迁移则没有影响。与血管抑素一样，K5可特异性地抑制内皮细胞的增殖，使细胞周期停滞，阻止细胞从G1期进入G2期，诱导其凋亡[25]。与之类似，我们的研究显示K5细胞特异性地抑制视网膜微血管内皮细胞的生长，而对非内皮细胞来源的视网膜周皮细胞、正常肝细胞、肝癌细胞的生长无明显作用，显示K5具有细胞特异性的抑制内皮细胞生长的作用。在体内的两种肝癌模型上，K5展现了其抑制肝癌小鼠和裸鼠肿瘤生长的效应；肿瘤组织微血管密度的结果显示K5通过抗血管新生来抑制肿瘤生长；K5激活HepA肝癌小鼠肿瘤组织Caspase-3的切割，提示K5可以诱导肿瘤组织的凋亡[12]。我们的研究首次发现K5通过调节线粒体和胞浆中Bak/Bcl-XL的比例，降低线粒体膜电位，促进Cyt c释放，激活线粒体途径诱导内皮细胞凋亡[26]，但其上游通路还不明确，值得进一步探讨。

K5与受体结合才能发挥功能，目前已报道的K5结合蛋白或受体主要是位于血管内皮细胞或肿瘤细胞表面的VDAC[27-29]。电压依赖性阴离子通道（voltage-dependent anion channel，VDAC）主要位于线粒体外膜，通过其通道的开放或关闭调控线粒体凋亡途径。近年发现VDAC也可转位到线粒体以外的膜结构包括细胞膜[27-29]和内质网膜[30]等。文献报道，K5通过与细胞膜上的VDAC结合

诱导前列腺癌细胞系1-LN细胞凋亡[27]和抑制人脐静脉内皮细胞HUVEC增殖[29];我们最近的研究也发现,K5通过与视网膜Müller细胞膜上VDAC结合介导其抑制VEGF表达的作用[31]。我们最近发表在*J BiolChem*的研究首次发现在血管内皮细胞中,K5通过与其受体VDAC结合抑制泛素化降解上调VDAC的表达和促进其磷酸化,减少VDAC-HK结合,促进VDAC-Bax结合,增加线粒体膜通透性,导致线粒体内Cyt c的释放,诱导血管内皮细胞凋亡。我们的研究首次阐明配体K5和受体VDAC之间存在"VDAC1-AKT-GSK3β-VDAC1"正反馈调节环路促进K5对细胞凋亡的诱导放大功能[32]。正反馈调节环路的存在可以经济有效地放大生长因子等配体调控细胞的功能,具有重要的生理学意义。

3.3.2 K5促进血管新生平衡 除了对内皮细胞的作用,课题组早期研究发现K5能通过抑制HIF-1和p42/p44 MAPK的活性来下调内源性血管刺激因子VEGF的表达,同时提高内源性血管新生抑制因子PEDF的表达[33]。这种调节有利于已打破的血管新生平衡恢复正常,也揭示了血管刺激因子和抑制因子之间的联系。我们最近的研究发现K5通过减少肺癌细胞HIF-1α的表达,进而抑制其下游蛋白CXCR4和VEGF的表达,减少荷瘤小鼠肺组织中SDF-1α的含量,最终抑制肺癌转移和生长[34]。P42/P44有丝分裂原激活蛋白激酶(P42/P44 MAPK)途径能调节VEGF的表达,同时VEGF也能通过相应受体激活P42/P44 MAPK途径。而K5能够快速抑制P42/P44 MAPK活化,进而下调VEGF的活性,但是具体的信号转导机制尚不明确。

3.4 K5抗肿瘤血管新生应用前景

一些研究进一步探讨了K5抗肿瘤血管新生应用前景。单独应用重组K5蛋白可以靶向诱导增殖的内皮细胞发生凋亡从而抑制肿瘤生长,抑制作用呈剂量依赖性;将K5重组蛋白与放疗、化疗联用后,能够明显增强放化疗对肿瘤细胞的杀伤性。Shi等[35]发现在胶质母细胞瘤中,用人钠/碘转运体(sodium/iodide symporter)介导的^{131}碘放射治疗与K5联用可以增加内皮对K5诱导凋亡的敏感性。Jin等[14]在肺癌研究中,用重组K5蛋白联合化疗处理荷瘤小鼠,对比单独进行化疗和单独注射K5重组蛋白,对肿瘤有更明显的抑制效果,而且毒性反应也更小。除此之外,McFarland等[13]发现,在恶性胶质瘤中,预先使用放射(2~5 Gy)处理皮肤微血管内皮细胞(MvEC)后,再加入重组K5蛋白处理,可以明显提高K5诱导MvEC凋亡的能力(500倍)。Ahn等[36]研究表明K5与常规化疗药5-氟脲嘧定(5-fluorouracil)联用,对比单独使用化疗药和K5组,可以增加结肠癌小鼠的生存周期。这些研究证明注射重组蛋白K5不单可以直接治疗肿瘤血管新生,也可以作为肿瘤放疗和化疗的一种辅助治疗方式。

由于单纯注射K5重组蛋白药效维持时间短,需要长时间注射才能起作用,为了改进K5的给药方式,Bui等[15]构建了K5的腺相关病毒(AAV),通过肌肉注射5×10^9滴度的AAV-K5后,小鼠血清中K5的浓度能够达到800 ng/mL,而血清中K5的表达高峰期出现在第63天,其后才逐渐减少。注射AAV后,小鼠的卵巢癌原位瘤缩小,血管新生明显减少,且AAV安全性高,所引起的毒副作用小。这些实验证明构建K5腺相关病毒治疗卵巢癌可以明显延长K5的起效时间,减少给药频率。

K5具有治疗血管增生性疾病的潜在临床应用价值和较血管抑素更多的优势,但是K5已在美国和中国获得专利保护(美国专利序号08/832,087,1997年4月3日,美国伊利诺伊州艾博特公司;中国专利公开号CN1223690A,1997年7月21日),限制了其进一步开发和应用。本课题组经过多年的前期研究,应用基因突变和基因重组技术开发出一种新的突变型K5重组蛋白(K5 mut5)[37-38],去除无关序列并对N端5个酸性氨基酸进行替代消除其对活性部位的"遮挡效应",具有分子质量更小、可溶性更强、表达量高、性质稳定、易于纯化及更强的抗血管增生活性等优点,具有良好的开发前景。已获得发明专利一项(专利号ZL 2010 1 0600078.9),具有自主知识产权,已完成实验室规模发酵、蛋白纯化、基本的药效学、安全性评价并已初步明确其通过抑制血管新生治疗肝癌的作用机制。在国家科技重大专项的支持下,目前正在进行临床前研究。

4 色素上皮衍生因子PEDF

4.1 PEDF的定义及生物学功能

PEDF是一种分子质量为50 ku的分泌性糖蛋白,最早是从胎儿色素上皮视网膜细胞的培养上

清中分离出来的[39]。之后被鉴定为丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的一员，具有神经营养的活性[40]。经过最近几十年的研究，PEDF越来越多的生物学功能被揭示，研究证明PEDF具有神经保护[41]、促神经干细胞自我更新[42]、抑制血管新生[43]、抗炎[44]、调控脂质代谢[45]以及抗肿瘤[46]等多种生物学功能。

以往包括我们在内的研究显示PEDF的抗肿瘤作用主要是通过其抑制血管新生和诱导肿瘤细胞凋亡来实现的。迄今为止，已在多种组织来源的肿瘤上证明了PEDF通过有效地抑制肿瘤组织中的血管新生达到抑制肿瘤生长的目的，这些肿瘤包括结肠癌、黑色素瘤、前列腺癌、肝癌、肺癌、胰腺癌等[47]。我们最近的研究也显示，PEDF通过诱导血管内皮细胞凋亡、抑制肿瘤组织的血管新生抑制视网膜母细胞瘤[48]、宫颈癌[49]、鼻咽癌[50]、胃癌[51]和结肠癌[52]的生长。除抑制血管新生的作用外，PEDF对少数肿瘤细胞具有直接杀伤作用：PEDF抑制骨肉瘤细胞[53]、黑色素瘤细胞[54]、前列腺癌细胞[55]和胶质瘤细胞[56]增殖，诱导上述肿瘤细胞凋亡。我们最新的研究发现PEDF具有诱导肺癌[57]、前列腺癌细胞凋亡[58]和抑制乳腺癌转移的作用[59]。

4.2　PEDF抗肿瘤血管新生机制

PEDF与受体结合才能发挥功能，目前已报道的PEDF结合蛋白或受体主要有脂肪甘油三酯脂肪酶（adipose triglyceride lipase，ATGL）[60]、层粘连蛋白受体（laminin receptor，LR）[61]、ATP合成酶的F1亚基（F1ATPase）[62]和低密度脂蛋白相关受体蛋白（low-density lipoprotein receptor-related protein，LRP6）[63]，这些蛋白能与PEDF以高亲和力结合并介导PEDF的生物学功能。目前关于PEDF抗血管新生的机制主要有以下4种。

4.2.1　*对内皮细胞的直接作用*　PEDF能够激活P38/MAPK信号通路抑制内皮细胞迁移[64]，激活的P38通过上调胞质磷脂酶A2α（PLA2α），进而上调PPARγ，PPARγ作为转录因子促进了促凋亡因子P53的表达，最终诱导内皮凋亡。PEDF还能激活MEK5 Erk5信号通路激活NF-κB，上调FasL进而引发外源性凋亡[65-66]。PEDF选择性的促进重构血管的内皮细胞发生凋亡，而不影响已经存在的成熟血管。机制可能是静息的内皮细胞低表达CD95L，血管重构中活化的内皮细胞膜表面CD95L表达增加，因此PEDF处理后能够促进增殖的内皮细胞通过死亡受体信号通路发生凋亡[65]。除此之外，PEDF还能够增加γ分泌酶介导的对VEGFR1和VEGFR2的切割，并促进VEGFR的降解，同时PEDF能够抑制VEGF诱导的VEGFR磷酸化和激活[67-68]。我们的研究发现，PEDF能够靶向抑制内皮细胞增殖，通过激活死亡受体信号通路促进内皮细胞凋亡，注射PEDF重组蛋白能够抑制视网膜母细胞瘤、胃癌的血管新生[48]。

4.2.2　*直接诱导肿瘤细胞凋亡*　已有的研究表明，PEDF能够直接促进黑色素瘤细胞、骨肉瘤细胞等发生凋亡，主要由死亡受体凋亡通路介导[53-54]。PEDF有两个功能表位，即PEDF34和PEDF44，PEDF34的主要功能是促进内皮细胞凋亡和抑制血管新生，PEDF44的功能则是促进神经内分泌细胞的分化。然而究竟是PEDF的哪个功能肽段诱导肿瘤细胞发生凋亡及背后的具体机制还不清楚。我们最近在前列腺癌细胞和脐静脉内皮细胞（HUVEC）上的研究都证明了不是PEDF44，而是PEDF34能够上调FasL和激活caspase8，最终诱导细胞发生外源性凋亡。PEDF34通过结合Laminin受体，从而磷酸化JNK激活JNKMAPK信号通路并上调FasL的转录调控因子PPARγ，而对另一转录因子NF-κB则没有影响。PPARγ的上调促进了FasL的转录合成增多，最终激活死亡受体信号通路诱导前列腺癌细胞发生凋亡[58]。

一些研究已报道肺癌细胞A549[69]，H720和H69[70]普遍存在着细胞膜上Fas的表达下调或缺失，因而会较大程度地降低紫杉醇[71]和顺铂[72]等通过死亡受体信号通路诱导细胞凋亡的化疗药物的作用效果，甚至对这些化疗药物产生耐受。我们的实验结果也显示，肺癌细胞A549和Calu-3细胞膜上只有极少量的Fas表达，且对FasL介导的凋亡不敏感。我们最近的研究首次报道PEDF通过p53/FAP-1通路促进Fas细胞膜转位，修复Fas-L/Fas死亡受体信号通路直接诱导肺癌细胞凋亡[57]。为PEDF作为一种理想的肿瘤治疗候选药物，尤其是为那些对Fas介导的凋亡耐受的肿瘤的治疗提供理论依据。

4.2.3　*下调肿瘤细胞VEGF的表达和分泌*　我们的研究发现，PEDF通过诱导视网膜母细胞瘤分化和抑制血管新生双重作用抑制视网膜母细胞瘤生长[48]。我们首次报道PEDF在肿瘤组织中低表达，通过抑制血管新生抑制宫颈癌、鼻咽癌和结肠

癌肿瘤生长,并阐明PEDF抑制血管新生的机制为直接诱导内皮细胞凋亡及促进HIF-1α降解下调肿瘤细胞旁分泌VEGF[49-50, 52]。

4.2.4 其他的可能机制 PEDF主要存在于富含胶原的组织中(如角膜,玻璃体),与细胞基质中的成分如肝素、透明质酸及胶原蛋白等有高度的结合亲和力[73-75]。提示PEDF可能作用于细胞黏附分子(胶原蛋白,肝素),即靶向细胞外基质来调节其抑制血管内皮细胞增生的活性。

4.3 PEDF抗肿瘤血管新生应用前景

在PEDF对鼻咽癌的研究中,我们发现,对比单独注射PEDF或者是单独放疗,用PEDF与放疗相结合的方法能够增强抗肿瘤的效果,显示PEDF可能可以作为放疗的一种辅助药[50]。PEDF重组蛋白虽然有着很强的抑制血管新生的能力,但是PEDF蛋白的纯化以及稳定性、需要重复注射等都成为了重组蛋白PEDF治疗肿瘤的障碍,而基因治疗能够较好解决这些问题。我们成功合成了纳米载体cRGD-PEG-PEI,通过与PEDF质粒结合形成复合物,根据cRGD与αvβ3的特殊亲和力,能够靶向运输PEDF基因到肿瘤内皮细胞中,进而过表达PEDF达到抑制血管新生的目的[52]。

5 激肽释放酶结合蛋白(KBP)

5.1 KBP的定义及生物学功能

KBP,是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族中的一员,分子质量为58 ku,能够与组织激肽释放酶结合并抑制其活性,在多种病理生理情况下发挥调控血压、抗血管和抗炎的作用[76-81]。KBP主要有两个功能结构域:肝素结合结构域和反应中心环,通过反应中心环铰链区与组织激肽释放酶结合发挥调控血压、内皮增殖的作用,通过肝素结合结构域竞争性抑制VEGF和TNFα等与其受体的结合,发挥抗血管生成、抗氧化应激和抗炎的作用[82-84]。

5.2 KBP抗血管新生抑制肿瘤生长的机制

KBP主要通过抑制肿瘤血管新生发挥抗肿瘤作用,其抗血管新生的主要机制是:①与VEGF、bFGF竞争性结合内皮细胞表面的受体乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG),阻断血管生成信号转导通路促进凋亡。②通过与激肽释放酶结合抑制其发挥作用。在肝癌和胃癌中,我们发现,与PEDF的机制类似,KBP能够直接诱导内皮细胞凋亡和抑制肿瘤细胞分泌VEGF的旁分泌作用[79-80]。我们最近的研究发现KBP通过激活Fas/FasL/caspase-8通路直接诱导结肠癌细胞凋亡[85];同时还发现KBP具有抗炎作用,通过上调SOCS3表达抑制LPS诱导的TNF-α的产生[86]。

虽然目前肿瘤抗血管新生治疗已经取得了一定的进展,但出现了效果不持久、耐药甚至可能诱发肿瘤转移的报道。原因可能是多方面的:①肿瘤的异质性、肿瘤干细胞的存在;②肿瘤微环境下血管、内皮结构与功能均不正常;③肿瘤发生血管拟态;④其他新的血管新生信号通路代偿。血管新生抑制因子具有显著的抗血管生成活性和多重作用,较好的特异性和较小的副作用,展现出良好的治疗前景。但仅用血管新生抑制因子不能完全控制肿瘤,需要和其他疗法相结合,血管新生抑制因子的作用机制尚未完全阐明,新的更有效和特异的血管新生抑制因子也需要进一步去发现。相信随着研究的深入,作为肿瘤治疗的一种新策略和手段必定会为人类全面征服肿瘤做出重要贡献。

(致谢:非常感谢高国全教授和本实验室全体成员的研究贡献,这些贡献体现在本文引用的已发表和尚待发表的研究成果中。特别感谢2016级博士生罗创华同学在本综述撰写过程中收集文献和准备初稿等)

参考文献:

[1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31.

[2] Goldmann E. The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with special reference to the Vascular System [J]. Proc R Soc Med, 1908, 1(Surg Sect): 1-13.

[3] Greenblatt M, Shubi P. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique [J]. J Natl Cancer Inst, 1968, 41(1): 111-124.

[4] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 407(6801): 249-257.

[5] Gao G, Ma J. Tipping the balance for angiogenic disorders [J]. Drug Discov Today, 2002, 7(3): 171-172.

[6] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2004, 350(23): 2335-2342.

[7] Sharma T, Dhingra R, Singh S, et al. Aflibercept: a novel VEGF targeted agent to explore the future perspectives of anti-angiogenic therapy for the treatment of multiple tumors[J]. Mini Rev Med Chem, 2013, 13(4): 530-540.

[8] Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins [J]. Cancer Metastasis Rev, 2000, 19(1-2): 97-107.

[9] O'reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285.

[10] Cao Y, Chen A, An SS, et al. Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth[J]. J Biol Chem, 1997, 272(36): 22924-22928.

[11] Perri SR, Nalbantoglu J, Annabi B, et al. Plasminogen kringle 5-engineered glioma cells block migration of tumor-associated macrophages and suppress tumor vascularization and progression[J]. Cancer Res, 2005, 65(18): 8359-8365.

[12] Yang X, Cheng R, Li C, et al. Kringle 5 of human plasminogen suppresses hepatocellular carcinoma growth both in grafted and xenografted mice by anti-angiogenic activity[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(4): 399-405.

[13] Mcfarland BC, Stewart J, Jr., Hamza A, et al. Plasminogen kringle 5 induces apoptosis of brain microvessel endothelial cells: sensitization by radiation and requirement for GRP78 and LRP1[J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5537-5545.

[14] Jin GH, Ma DY, Wu N, et al. Combination of human plasminogen kringle 5 with ionizing radiation significantly enhances the efficacy of antitumor effect[J]. Int J Cancer, 2007, 121(11): 2539-2546.

[15] Bui Nguyen TM, Subramanian IV, Xiao X, et al. Adeno-associated virus-mediated delivery of kringle 5 of human plasminogen inhibits orthotopic growth of ovarian cancer[J]. Gene Ther, 2010, 17(5): 606-615.

[16] Perri SR, Martineau D, Francois M, et al. Plasminogen Kringle 5 blocks tumor progression by antiangiogenic and proinflammatory pathways[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(2): 441-449.

[17] Cao Y, Ji RW, Davidson D, et al. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells[J]. J Biol Chem, 1996, 271(46): 29461-29467.

[18] Ji WR, Barrientos LG, Llinas M, et al. Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 247(2): 414-419.

[19] Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v)beta(3) in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(43): 39562-39568.

[20] 李朝阳, 温南, 杨中汉, 等. 人纤溶酶原K5突变体在大肠杆菌中的优化表达[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2008, 29(2): 221-225.

[21] Yang X, Cai W, Xu Z, et al. High efficacy and minimal peptide required for the anti-angiogenic and anti-hepatocarcinoma activities of plasminogen K5[J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(10): 2519-2530.

[22] 李朝阳, 蔡卫斌, 杨中汉, 等. 纤溶酶原K5抗血管增生活性依赖其完整Kringle结构域[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(1): 17-23.

[23] Cai W, Ma J, Li C, et al. Enhanced anti-angiogenic effect of a deletion mutant of plasminogen kringle 5 on neovascularization[J]. J Cell Biochem, 2005, 96(6): 1254-1261.

[24] 杨霞, 王青松, 程锐, 等. 突变型KS重组蛋白抑制小鼠肝癌血管生成和肿瘤生长的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(2): 220-224.

[25] Lu H, Dhanabal M, Volk R, et al. Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(3): 668-673.

[26] Gu X, Yao Y, Cheng R, et al. Plasminogen K5 activates mitochondrial apoptosis pathway in endothelial cells by regulating Bak and Bcl-x(L) subcellular distribution[J]. Apoptosis, 2011, 16(8): 846-855.

[27] Gonzalez-Gronow M, Kaczowka SJ, Payne S, et al. Plasminogen structural domains exhibit different functions when associated with cell surface GRP78 or the voltage-dependent anion channel[J]. J Biol Chem, 2007, 282(45): 32811-32820.

[28] Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson CE, et al. The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(29): 27312-27318.

[29] Lawen A, Ly JD, Lane DJ, et al. Voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1)--a mitochondrial protein, rediscovered as a novel enzyme in the plasma membrane[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(2): 277-282.

[30] Shoshan-Barmatz V, Israelson A. The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function [J]. J Membr Biol, 2005, 204(2): 57-66.

[31] Ma J, Li C, Shao C, et al. Decreased K5 receptor expression in the retina, a potential pathogenic mechanism for diabetic retinopathy[J]. Mol Vis, 2012, 18(330-336.

[32] Li L, Yao YC, Gu XQ, et al. Plasminogen kringle 5 induces endothelial cell apoptosis by triggering a voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) positive feedback loop[J]. J Biol Chem, 2014, 289(47): 32628-32638.

[33] Gao G, Li Y, Gee S, et al. Down-regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5[J]. J Biol Chem, 2002, 277(11): 9492-9497.

[34] Cai WB, Zhang Y, Cheng R, et al. Dual inhibition of plasminogen kringle 5 on angiogenesis and chemotaxis suppresses tumor metastasis by targeting HIF-1alpha pathway[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e53152.

[35] Shi S, Zhang M, Guo R, et al. 131I therapy mediated by sodium/iodide symporter combined with kringle 5 has a synergistic therapeutic effect on glioma[J]. Oncol Rep, 2016, 35(2): 691-698.

[36] Ahn JH, Yu HK, Lee HJ, et al. Suppression of colorectal cancer liver metastasis by apolipoprotein(a) kringle V in a nude mouse model through the induction of apoptosis in tumor-associated endothelial cells[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93794.

[37] Li C, Li L, Cheng R, et al. Acidic/neutral amino acid residues substitution in NH2 terminal of plasminogen kringle 5 exerts enhanced effects on corneal neovascularization[J]. Cornea, 2013, 32(5): 680-688.

[38] 黄莉钧, 石丁波, 姚亚超, 等. 具有抗血管新生活性的K5突变体GST-K5M5基因的构建、表达及纯化[J]. 热带医学杂志, 2013, 13(2): 133-139,161.

[39] Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity[J]. Exp Eye Res, 1991, 53(3): 411-414.

[40] Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, et al. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(4): 1526-1530.

[41] Cao W, Tombran-Tink J, Elias R, et al. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(7): 1646-1652.

[42] Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, et al. Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(3): 331-339.

[43] Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, et al. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(5): 2593-2597.

[44] Zhang SX, Wang JJ, Gao G, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor[J]. FASEB J, 2006, 20(2): 323-325.

[45] Crowe S, Wu LE, Economou C, et al. Pigment epithelium-derived factor contributes to insulin resistance in obesity[J]. Cell Metab, 2009, 10(1): 40-47.

[46] Ek ET, Dass CR, Choong PF. Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(7): 1641-1646.

[47] Broadhead ML, Dass CR, Choong PF. In vitro and in vivo biological activity of PEDF against a range of tumors[J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(12): 1429-1438.

[48] Yang H, Cheng R, Liu G, et al. PEDF inhibits growth of retinoblastoma by anti-angiogenic activity[J]. Cancer Sci, 2009, 100(12): 2419-2425.

[49] 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(12): 967-974.

[50] 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(10): 1789-1798.

[51] 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(3): 681-686.

[52] Li L, Yang J, Wang WW, et al. Pigment epithelium-derived factor gene loaded in cRGD-PEG-PEI suppresses colorectal cancer growth by targeting endothelial cells[J]. Int J Pharm, 2012, 438(1-2): 1-10.

[53] Ek ET, Dass CR, Contreras KG, et al. Pigment epithelium-derived factor overexpression inhibits orthotopic osteosarcoma growth, angiogenesis and metastasis[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(7): 616-626.

[54] Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, et al. Overexpression

of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo[J]. Am J Pathol, 2004, 164(4): 1225-1232.

[55] Guan M, Jiang H, Xu C, et al. Adenovirus-mediated PEDF expression inhibits prostate cancer cell growth and results in augmented expression of PAI-2[J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(3): 419-425.

[56] Guan M, Pang CP, Yam HF, et al. Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium-derived factor[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(5): 325-332.

[57] Li L, Yao YC, Fang SH, et al. Pigment epithelial-derived factor (PEDF)-triggered lung cancer cell apoptosis relies on p53 protein-driven Fas ligand (Fas-L) up-regulation and Fas protein cell surface translocation[J]. J Biol Chem, 2014, 289(44): 30785-30799.

[58] Gong Q, Qiu S, Li S, et al. Proapoptotic PEDF functional peptides inhibit prostate tumor growth--a mechanistic study[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 92(3): 425-437.

[59] Hong H, Zhou T, Fang S, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits breast cancer metastasis by down-regulating fibronectin[J]. Breast Cancer Res Treat, 2014, 148(1): 61-72.

[60] Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, et al. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor[J]. J Biol Chem, 2006, 281(49): 38022-38037.

[61] Bernard A, Gao-Li J, Franco CA, et al. Laminin receptor involvement in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor[J]. J Biol Chem, 2009, 284(16): 10480-10490.

[62] Notari L, Arakaki N, Mueller D, et al. Pigment epithelium-derived factor binds to cell-surface F(1)-ATP synthase[J]. FEBS J, 2010, 277(9): 2192-2205.

[63] Park K, Lee K, Zhang B, et al. Identification of a novel inhibitor of the canonical Wnt pathway[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(14): 3038-3051.

[64] Konson A, Pradeep S, D'acunto CW, et al. Pigment epithelium-derived factor and its phosphomimetic mutant induce JNK-dependent apoptosis and p38-mediated migration arrest[J]. J Biol Chem, 2011, 286(5): 3540-3551.

[65] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor[J]. Nat Med, 2002, 8(4): 349-357.

[66] Biyashev D, Veliceasa D, Kwiatek A, et al. Natural angiogenesis inhibitor signals through Erk5 activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)[J]. J Biol Chem, 2010, 285(18): 13517-13524.

[67] Cai J, Jiang WG, Grant MB, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1[J]. J Biol Chem, 2006, 281(6): 3604-3613.

[68] Ablonczy Z, Prakasam A, Fant J, et al. Pigment epithelium-derived factor maintains retinal pigment epithelium function by inhibiting vascular endothelial growth factor-R2 signaling through gamma-secretase[J]. J Biol Chem, 2009, 284(44): 30177-30186.

[69] Nambu Y, Hughes SJ, Rehemtulla A, et al. Lack of cell surface Fas/APO-1 expression in pulmonary adenocarcinomas[J]. J Clin Invest, 1998, 101(5): 1102-1110.

[70] Viard-Leveugle I, Veyrenc S, French LE, et al. Frequent loss of Fas expression and function in human lung tumours with overexpression of FasL in small cell lung carcinoma[J]. J Pathol, 2003, 201(2): 268-277.

[71] Srivastava RK, Sasaki CY, Hardwick JM, et al. Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription[J]. J Exp Med, 1999, 190(2): 253-265.

[72] Fulda S, Los M, Friesen C, et al. Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system[J]. Int J Cancer, 1998, 76(1): 105-114.

[73] Alberdi E, Hyde CC, Becerra SP. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) binds to glycosaminoglycans: analysis of the binding site[J]. Biochemistry, 1998, 37(30): 10643-10652.

[74] Becerra SP, Perez-Mediavilla LA, Weldon JE, et al. Pigment epithelium-derived factor binds to hyaluronan. Mapping of a hyaluronan binding site[J]. J Biol Chem, 2008, 283(48): 33310-33320.

[75] Meyer C, Notari L, Becerra SP. Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived actor. Implications for its antiangiogenic activity[J]. J Biol Chem, 2002, 277(47): 45400-45407.

[76] Zhou GX, Chao L, Chao J. Kallistatin: a novel human

tissue kallikrein inhibitor: Purification, characterization, and reactive center sequence[J]. J Biol Chem, 1992, 267(36): 25873-25880.

[77] Chai KX, Chen LM, Chao J, et al. Kallistatin: a novel human serine proteinase inhibitor. Molecular cloning, tissue distribution, and expression in Escherichia coli [J]. J Biol Chem, 1993, 268(32): 24498-24505.

[78] Wang CR, Chen SY, Wu CL, et al. Prophylactic adenovirus-mediated human kallistatin gene therapy suppresses rat arthritis by inhibiting angiogenesis and inflammation[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(4): 1319-1324.

[79] Zhu B, Lu L, Cai W, et al. Kallikrein-binding protein inhibits growth of gastric carcinoma by reducing vascular endothelial growth factor production and angiogenesis [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(12 Pt 1): 3297-3306.

[80] Lu L, Yang Z, Zhu B, et al. Kallikrein-binding protein suppresses growth of hepatocellular carcinoma by anti-angiogenic activity[J]. Cancer Lett, 2007, 257(1): 97-106.

[81] Miao RQ, Agata J, Chao L, et al. Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Blood, 2002, 100(9): 3245-3252.

[82] Xiong W, Tang CQ, Zhou GX, et al. In vivo catabolism of human kallikrein-binding protein and its complex with tissue kallikrein[J]. J Lab Clin Med, 1992, 119(5): 514-521.

[83] Miao RQ, Chen V, Chao L, et al. Structural elements of kallistatin required for inhibition of angiogenesis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284(6): C1604-1613.

[84] Chen VC, Chao L, Pimenta DC, et al. Identification of a major heparin-binding site in kallistatin[J]. J Biol Chem, 2001, 276(2): 1276-1284.

[85] Yao Y, Li L, Huang X, et al. SERPINA3K induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activating the Fas/FasL/caspase-8 signaling pathway[J]. FEBS J, 2013, 280(14): 3244-3255.

[86] Dai Z, Lu L, Yang Z, et al. Kallikrein-binding protein inhibits LPS-induced TNF-alpha by upregulating SOCS3 expression[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(5): 1020-1028.

(编辑 刘清海)

(上接第188页 from page 188)

Pathway Enhances Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) Responsiveness of Msx2 Gene to Induce Osteogenic Differentiation and Mineralization of Vascular Smooth Muscle Cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(21): 19138-19148.

[30] Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development[J]. Cell, 1997, 89(5): 765-771.

[31] Luo G, Ducy P, Mckee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein[J]. Nature, 1997, 386(6620): 78-81.

[32] Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, et al. Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study[J]. Lancet, 2003, 361(9360): 827-833.

[33] Schoppet M, Kavurma MM, Hofbauer LC, et al. Crystallizing nanoparticles derived from vascular smooth muscle cells contain the calcification inhibitor osteoprotegerin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(1): 103-107.

[34] Gao J, Zhang K, Chen J, et al. Roles of aldosterone in vascular calcification: An update[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 786: 186-193.

(编辑 刘清海)