

# 细胞外基质中的蛋白多糖与腹主动脉瘤

吴建秋 综述, 景在平 审校

(上海长海医院血管外科, 上海 200433)

[关键词] 动脉瘤, 腹主动脉; 细胞外基质; 蛋白多糖

[摘要] 蛋白多糖是细胞外基质的重要组成部分, 细胞外基质的破坏和重构与腹主动脉瘤密切相关。硫酸乙酰肝素蛋白多糖是蛋白多糖的最主要成份, 以其为底物的肝素酶活性增强, 它对细胞外基质的降解及对细胞因子、生长因子和某些细胞生物学行为的调节在腹主动脉瘤的形成发展中起着重要作用。

[中图分类号] R543.16

[文献标识码] A

随着现代医学的发展, 腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysms, AAA)在临床上已得到有效治疗, 但本病的触发因素以及持续扩张直至破裂的控制因素仍未清楚。经过广泛的基础和临床研究, 所有学者较一致认为腹主动脉瘤壁的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解失衡是其形成和发展的关键环节之一。ECM在维持腹主动脉正常组织结构与功能、细胞生长与分化过程中起着非常重要的作用, 它不是静止不动的, 而是处于不断代谢更新、降解重塑的动态平衡中。ECM主要由两类组成: 一是结构蛋白, 包括胶原蛋白和弹性蛋白; 二是非结构蛋白, 包括蛋白多糖和糖蛋白。一般认为结构蛋白的破坏是腹主动脉瘤形成发展的决定性步骤, 因而近年来的研究主要集中在以结构蛋白为底物的降解酶上, 尤其是细胞外基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)及其激活剂与抑制剂<sup>[1]</sup>是目前研究热点; 而蛋白多糖作为ECM的另一重要成份近年来才得到逐步重视, 本文就蛋白多糖分类与功能、硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)及其降解酶—肝素酶在腹主动脉瘤的发生发展中的作用作一综述。

## 1 蛋白多糖的分类与功能

传统上根据与核心糖蛋白结合的不同糖胺聚糖类型, 将蛋白多糖分为HSPG、硫酸软骨素蛋白多糖、硫酸皮肤素蛋白多糖、硫酸角质素蛋白多糖等, 其中HSPG为蛋白多糖的主要组份。然而近年来的研究表明, 许多不同的核心蛋白与各种长度和组成的糖胺聚糖结合, 能产生多样性蛋白多糖, 因此根据其在正常血管壁的位置, 又可分为4类<sup>[2]</sup>: 血管外膜大的蛋白多糖, 主要为Versican, 能与某些蛋白结合充填于特殊基质。

## 2 硫酸乙酰肝素蛋白多糖与肝素酶

硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)是由一个核心蛋白通过糖苷键和数个直链硫酸乙酰肝素(heparan sulfate, HS)结合。

HSPG通过HS侧链与其相邻蛋白质、生长因子、细胞因子等相互作用, 调节着ECM内以及ECM与细胞间的信号转导, 从而影响细胞的迁移粘附和增殖分化等功能<sup>[3]</sup>。

肿瘤细胞扩散、转移必须首先穿越ECM屏障。有研究表明, 肝素酶作为非结构蛋白的主要水解酶, 对细胞穿越血管可能具有重要意义<sup>[4]</sup>。以往由于缺乏分子探针, 制约了肝素酶生物学功能的研究。直到新近, 随着肝素酶基因的克隆, 肝素酶在肿瘤细胞穿越血管壁的扩散、转移过程中的关键作用才受到空前重视。肝素酶是目前已确定的HSPG降解酶, 其活性与HSPG降解产物之间呈明显直线关系<sup>[5]</sup>。完整的人肝素酶cDNA由543个氨基酸残基编码组成, 分子量约为61 192 Da, 主要分布在胎盘及免疫器官内。肝素酶是一种葡萄糖苷酸内切酶, 其水解位点正是HS侧链与核心蛋白相连的糖苷键。肝素酶表达异常或活性变化可能影响以下生物学过程<sup>[6-9]</sup>: 破坏、改变ECM结构, 使肿瘤细胞得以侵袭、转移。④HSPG不仅作为碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的辅受体, 而且在ECM中以HS-bFGF复合体存在, 充当bFGF储存池。肝素酶通过将具有高度活性的bFGF从储存于ECM和肿瘤微环境中释放出来, 促进肿瘤细胞、内皮细胞和成纤维细胞增殖迁移, 诱发肿瘤血管生成反应, 从而间接促进肿瘤细胞转移。④促进尿激酶型和组织型纤溶酶原激活物释放, 产生的纤溶酶除能活化MMP外, 还可进一步促进游离bFGF释放。具有粘附因子功能, 辅助T淋巴细胞与血管内皮细胞和ECM粘附, 从而发挥T细胞在肿瘤免疫中的作用。

## 3 动脉粥样硬化中蛋白多糖与肝素酶变化

众多研究表明, 至少90%腹主动脉瘤并发动脉粥样硬化, 无论两者是因果关系或同时并存, 动脉粥样硬化都与腹主动脉瘤发生发展密切相关。动脉粥样硬化研究已发现, 蛋白多糖通过与其邻近分子相互作用, 影响着动脉壁的粘弹性、通透性、脂肪沉积、止血及血栓形成等<sup>[2]</sup>。一般认为, 蛋白多糖在动脉粥样硬化的早期主要表现为增多与积累, 而在晚期及纤维化期其水平是下降的。随着检测水平进一步提

高,如应用分子杂交技术、定量 PCR 技术等发现不同的蛋白多糖在病损区的局部解剖分布也发生变化<sup>[10,11]</sup>。例如 versican 主要位于早期阶段内膜增厚区并易与脂蛋白 B 结合,而 biglycan 易与脂蛋白 E 结合,decorin 则位于粥样硬化损伤的更晚期的纤维帽区。另有研究认为,ECM 中的 HSPG 通常抑制正常动脉壁平滑肌细胞增殖,但在动脉粥样硬化斑块形成过程中,可能由于浸润白细胞产生的肝素酶对 HSPG 的降解,使上述抑制性作用解除,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)得以增殖、移行,随之动脉粥样硬化形成<sup>[12]</sup>。

Fitzgerald 等<sup>[13]</sup>在 VSMC 体外培养中发现,巨噬细胞或巨噬细胞溶酶体源肝素酶除能降解 HSPG 外,还能诱导 VSMC 从分化型向幼稚型转变,促进 VSMC 增殖和迁移,从而进一步促进动脉粥样硬化的发生与发展。应用兔颈动脉导管损伤的动脉粥样硬化体内模型研究,动态观察发现,损伤后数小时至数周,肝素酶与 MMP 的高表达表现在同一时段上;体外研究进一步发现,MMP 能促进上述肝素酶诱导的表型转变,推测其可能是 MMP 在体内加强或触发了肝素酶的活性,使 ECM 中包绕于 VSMC 外的基底膜或暴露于细胞外的 HSPG 降解作用增强;与此同时,在人体冠状动脉和内膜切除后的颈总动脉标本中亦发现上述两种酶均出现在人体晚期复合性血管损伤期,这初步提示了肝素酶在血管性疾病中的重要作用。

#### 4 腹主动脉瘤中蛋白多糖的变化

蛋白多糖在腹主动脉瘤中的变化正逐步得到证实。研究表明,与动脉阻塞性疾病相比,腹主动脉瘤中 VSMC 呈现不同的表型<sup>[14]</sup>。在小鼠实验中发现,动脉粥样硬化损伤的 2~4 周内,perlecan、syndecan 及 versican 转录水平提高。Melrose 等<sup>[15]</sup>第一次提出体外单层培养的腹主动脉瘤的平滑肌细胞能与透明质酸作用,而使 versican 水平提高。与细胞相连的 HSPG,如 syndecan 家族及 perlecan,可与生长因子如血小板源生长因子、bFGF、血管内皮源生长因子等相互作用,从而调节它们表达与生物活性。bFGF 首先与 HSPG 结合,再与酪氨酸激酶-FGF 受体结合,从而触发细胞内信号转导及后续细胞生物学行为改变,如 VSMC 的迁移、表型改变及凋亡增强等。Patel 等<sup>[16]</sup>在体外证实,与动脉阻塞性疾病相比,腹主动脉瘤中层平滑肌细胞有更大的增殖潜能,从而间接说明腹主动脉瘤能产生更多的蛋白多糖,然后通过粘附更多的生长因子而发生上述变化。此外,Halpert 等<sup>[17]</sup>发现动脉粥样硬化区巨噬细胞源 MMP 位于 versican 沉积的位置,说明 versican 是 MMP 的原位基质,促进巨噬细胞的趋化。Melrose 等<sup>[15]</sup>也发现了夹层主动脉瘤中 HSPG 的增高,并首次提出蛋白多糖比 MMP 出现更早,这与 Schneideman 等<sup>[18]</sup>结果相补充,后者认为动脉瘤损伤分三个阶段:一是急性期,纤维蛋白溶解处于关闭状态;二是亚急性期,出现急性纤维蛋白溶解;三是慢性期,出现慢性期纤维蛋白溶解状态。因此,当急性期纤维蛋白降解酶如 MMP 还没来得及产生时,蛋白已发生改变。通过某些蛋白多糖与 MMP 结合的动态观察可能有助于腹主

动脉瘤早期诊断及治疗监测。

Gutierrez 等<sup>[19]</sup>采用人体夹层动脉瘤标本体外观察证实,versican 和透明质酸更主要在动脉壁中层的中外侧;与此同时,hyaluronan 几乎贯穿于动脉瘤发展的全过程,尤其在早期修复阶段,而 biglycan 和大部分 versican 多见于晚期修复过程中,这种不同阶段中的不同蛋白多糖沉积与局部解剖位置可能说明血管修复过程中不同的生物学紊乱状态。

Melrose 等<sup>[15]</sup>认为腹主动脉瘤中蛋白多糖具有内源性蛋白溶解作用,如 perlecan 和 versican。VSMC 源性蛋白多糖可能导致局部有丝分裂生长因子释放增加,此因子能影响 MMP 及内源性金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)合成,这一过程可能说明腹主动脉瘤中 VSMC 有更大的增殖能力,因而 MMP 高表达的同时,提高了基质破坏。但 Tamarina<sup>[20]</sup>却得出了一个相反的结论,他认为 biglycan 和 decorin 主要调节着细胞增殖和胶原的排列,并通过 Northern 印迹杂交及竞争性 PCR 方法,在分子水平检测人体腹主动脉瘤与正常动脉标本时,发现 biglycan mRNA 水平在腹主动脉瘤明显降至 1/25,而在动脉粥样硬化及阻塞性疾病中, biglycan 却是提高的。因此 biglycan 生物合成与基因表达可能对腹主动脉瘤发病机理的探讨有更大冲击力。

#### 5 肝素酶在腹主动脉瘤中的可能作用

基于以上认识,我们认为 HSPG 及肝素酶在腹主动脉瘤形成中可能发挥了非常重要的作用。腹主动脉瘤是以 VSMC 密度降低和 ECM 的降解与重构为主要特征,其中血管损伤与修复中 VSMC 增殖迁移必不可少,并且炎性细胞的浸润贯穿本病的全过程,这些细胞动力学行为与肿瘤细胞的扩散转移有很大的相似性,推测肝素酶在腹主动脉瘤中的作用有:

通过对非结构蛋白的破坏直接降低血管壁的应力;并且形成了一个局部溶解区,构成上述迁移与浸润的通道,这已被结构蛋白及其以 MMP 为首的降解酶的实验初步证实<sup>[15]</sup>。

④通过将具有高度活性的生长因子、细胞因子从 ECM 中释放出来,肝素酶促进 VSMC、内皮细胞的增殖和/或迁移。④通过促进尿激酶型和组织型纤溶酶原激活物释放,激活纤溶酶从而间接活化 MMP,导致结构蛋白降解而加重对动脉壁的破坏作用。研究表明,CD4+、CD8+ 和 T 淋巴细胞浸润腹主动脉瘤壁并产生细胞死亡介质,如细胞因子、穿孔素、Fas 及 Fas 配体,促进 VSMC 凋亡<sup>[21]</sup>;另外,T 细胞也是 MMP 的主要来源;结合上述肿瘤转移研究结果,肝素酶可能通过辅助 T 细胞与血管内皮细胞、ECM 的粘附,发挥 T 细胞在腹主动脉瘤中的重要作用。因此,对肝素酶及其作用底物 HSPG 在腹主动脉瘤发病中的作用作系统研究,可进一步了解腹主动脉瘤发病机理中基质的降解与合成、异常细胞的增殖与死亡的信号转导途径及其调节机制。

#### 6 小结

综上所述,蛋白多糖在正常血管中占有极其重要的地位,预测以 HSPG 为底物的肝素酶在腹主动脉瘤形成发展中

亦起着不可忽视的作用。但现有 ECM 的研究还存在以下不足: ①对非结构蛋白中的蛋白多糖在腹主动脉瘤发病机理中的作用研究缺乏系统性和深入性; ②以 HSPG 为底物的肝素酶与腹主动脉瘤发生发展的关系至今尚未见国内外报道, 并在国内尚未见肝素酶在其它领域的研究报道; ③关于酶类在腹主动脉瘤中作用的现有知识主要停留在基质降解上, 而对生长因子、细胞因子以及功能细胞的调节作用及信号转导途径所知甚少; ④现有的关于结构蛋白降解酶(尤其是 MMP)的研究均局限在对 mRNA 及其蛋白的定量定性水平, 而对其活性检测尚是难题。因此, 通过动态系统地比较腹主动脉瘤、动脉闭塞性疾病及正常血管 ECM 中蛋白多糖及肝素酶表达水平, 可进一步阐明腹主动脉瘤的发病机制, 从而为其临床防治提供靶点。

## 参考文献

- [1] Palombo D, Maione M, Cifello BI, et al. Matrix metalloproteinases: Their role in degenerative chronic diseases of abdominal aorta [J]. *J Cardiovasc Surg Torino*, 1999, **40**(2): 257- 260
- [2] Fuster V, Ross R, Topol EJ, et al. The vascular extracellular matrix [M]. In: Washington, Wight TN. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers, 1996, 421- 435
- [3] Eccles SA. Heparanase: breaking down barriers in tumors [J]. *Nat Med*, 1999, **5**: 735- 736
- [4] Vaday GG, Lider O. Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation [J]. *J Leukoc Biol* 2000, **67**(2): 149- 159
- [5] Finkel E. Potential found for antimetastasis drugs [J]. *Science*, 1999, **285**(7): 33- 34
- [6] Freeman C, Parish CR. Human platelet heparanase: purification, characterization and catalytic activity [J]. *Biochem J*, 1998, **330**: 1 341- 350
- [7] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, et al. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis [J]. *Nat Med*, 1999, **5**: 793- 802
- [8] Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, et al. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis [J]. *Nat Med*, 1999, **5**: 803- 809
- [9] Kosir MA, Wang W, Zukowski KL, et al. Degradation of basement membrane by rostate tumor heparanase [J]. *J Surg Res*, 1999, **81**: 42- 47
- [10] Kaplan M, Aviram M. Macrophage plasma membrane chondroitin sulfate proteoglycan binds oxidized low- density lipoprotein [J]. *Atherosclerosis*, 2000, **149**(1): 5- 17
- [11] Obunike JC, Pillarisetti S, Paka L, et al. The heparin- binding proteins apolipoprotein E and lipoprotein lipase enhance cellular proteoglycan production [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**(1): 111- 118
- [12] Lemire JM, Braun KR, Maurel P, et al. Versican/PG- M isoforms in vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**(7): 1 630- 639
- [13] Fitzgerald M, Hayward IP, Thomas AC, et al. Matrix metalloproteinases can facilitate the heparanase- induced promotion of phenotypic change in vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **145**(1): 197- 106
- [14] Jarrold BB, Bacon WL, Velleman SG. Expression and localization of the proteoglycan decorin during the progression of cholesterol induced atherosclerosis in Japanese quail: implications for interaction with collagen type iv and lipoproteins [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **146**(2): 299- 308
- [15] Melrose J, Whitlock J, Xu Q, et al. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: possible role of differential production of proteoglycans by smooth muscle cells [J]. *J Vasc Surg*, 1998, **28**(4): 676 - 686
- [16] Patel MI, Ghosh P, Melrose J, et al. Smooth muscle cell migration and proliferation is enhanced in abdominal aortic aneurysms [J]. *Aust NZ J Surg*, 1996, **66**: 305- 308
- [17] Halpert I, Sires UI, Roby JT, et al. Matrilysin is expressed by lipid- laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 9 748- 753
- [18] Schneideman J, Bordin GM, Adar R, et al. Patterns of expression of fibrinolytic genes and matrix metalloproteinase- 9 in dissecting aortic aneurysm [J]. *Am J Pathol*, 1998, **152**(3): 703- 710
- [19] Gutierrez PS, Reis MM, Higuchi ML, et al. Distribution of hyaluronan and dermatan/ chondroitin sulfate proteoglycans in human aortic dissection [J]. *Connect Tissue Res*, 1998, **37**(3~ 4): 151 - 161
- [20] Tamarina NA, Grassi MA, Johnson DA, et al. Proteoglycan gene expression is decreased in abdominal aortic aneurysms [J]. *J Surg Res*, 1998, **74**(1): 76- 80
- [21] Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, et al. Death of smooth muscle cells and expression of mediators by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms [J]. *Circulation*, 1999, **99**(1): 96 - 104

(此文 2001- 04- 10 收到, 2000- 08- 10 修回)

(此文编辑 文玉珊, 胡必利)