

组织因子途径抑制物 2 与肝脏疾病研究进展

姜 燕,周 静综述,姜 政[△]审校

(重庆医科大学附属第一医院消化内科 400016)

关键词:组织因子途径抑制物 2;肝硬化;肝癌

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.070

中图分类号:R365.575

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)16-2228-03

据统计我国 HBsAg 阳性者约为 1.2 亿,其中慢性乙型肝炎患者约为 3 000 万,慢性乙型肝炎演变为肝硬化约 300 万,在此基础上合并原发性肝癌 30 多万,全世界每年约有 100 万人死于肝癌,而我国约占其中的 1/3 还多。组织因子途径抑制物 2(tissue factor pathway inhibitor-2,TFPI-2)是一种新近发现的丝氨酸蛋白酶抑制物,可抑制包括纤溶酶、胰蛋白和基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinases,MMPs)在内的多种蛋白酶。越来越多的研究表明,TFPI-2 可通过降解 MMPs,抑制 MMPs 的活性,促进肝脏细胞外基质(extra cellular matrix,ECM)过度沉积,导致合成的 ECM 不仅有量的变化,而且有质的改变,一方面可抑制肿瘤转移、降低肿瘤的侵袭转移能力,与此同时这种 ECM 质和量的改变加速激活静息状态的肝星形细胞(hepatic stellate cell,HSC),而 HSC 持续激活,又大量合成 ECM,进一步加重 ECM 的沉积,从而形成恶性循环,导致肝纤维化和肝硬化的发生。因此本文就 TFPI-2 结构、功能与肝脏疾病的关系作一综述,为肝脏疾病的生物学治疗奠定基础。

1 TFPI-2 结构与分布

TFPI-2 是 1997 年由 Jandial 和 Horne 首次在双胞胎妊娠者体内发现的一种蛋白,并将其命名为胎盘蛋白-5(placental protien,PP-5)。后来研究发现,PP-5 和人的 TFPI 的氨基酸序列有很高的同源性,且两者的性质也有一定的相似性,因此最终命名为 TFPI-2。TFPI-2 基因位于人类染色体 7q22,全长约 7.0 kb,含有 5 个外显子和 4 个内含子,可编码 mRNA 含有 3 个外显子和 4 个内含子,其翻译 213 个氨基酸残基,为广谱的丝氨酸蛋白酶抑制物,相对分子质量为 32 000^[1]。成熟的 TFPI-2 由 5 个部分组成,即富含酸性氨基酸的 N 端、3 个首尾相连的 Kunitz 结构域(kunitz domain)和富含碱性氨基酸的 C 端,每个结构域都有 3 对二硫键。其中第 1 个结构域(KD1)表现出与 TFPI-1 45%同源性以及与碱性胰蛋白酶抑制剂 40%同源性,第 3 个结构域(KD3)与 TFPI-1 的相似性为 53%,而第 2 个结构域(KD2)为 35%。成熟的蛋白 70%~72%为 Asp-Ala-Ala-Glu-Glu-Pro-Thr-Gly-Asn-Asn 结构,约 30%为 Ala-Glu-Glu-Pro-Thr-Gly-Asn-Asn 结构。TFPI-2 是通过 Kunitz 结构域对蛋白水解酶进行抑制,主要是通过 KD1 和 P1 残基与蛋白水解酶的蛋白袋结构(主要是精氨酸和赖氨酸残端)的结合来抑制其活性。TFPI-2/KD1 的三维结构是典型的 Kunitz 蛋白酶抑制剂折叠结构,即从 Arg20 到 Phe33 的双带反平行 β -sheet 以及从 Trp48 到 Ala54 的 α -螺旋,其核心区域由 3 对二硫键和一定的二级结构组成,并呈高度的保守性。另外从 Leu19 到 Tyr33 的结合环与纤维蛋白酶的活性位点有直接关联,特别是与纤维蛋白酶活性位点的残基(P'1、P'2、P1 和 P3)

都存在氢键,其中最重要的是 P1 残基(Arg15)^[2]。与 TFPI-2/胰胰岛素复合物相比,TFPI-2/纤维蛋白酶复合物在接触面上多出 2 个氢键,这使得两者更加牢固。有研究发现,与 ECM 相关的丝氨酸蛋白酶抑制物是相对分子质量为 33 000、27 000 和 31 000 的蛋白,均是 TFPI-2 基因表达的不同糖基化产物,说明 TFPI-2 是一种广谱丝氨酸蛋白酶抑制物^[3]。

TFPI-2 广泛分布于人类肝脏、胰腺、肾脏和胎盘组织等,由表皮细胞、内皮细胞和间质细胞,尤其是肝窦内皮细胞分泌产生^[4],以 TFPI-2 和其糖基化的 2 种亚型形式存在^[5]。在正常细胞中表达的 TFPI-2 能够抑制纤溶酶、MMP-1、MMP-2、MMP-3 和 MMP-9 以及胰蛋白酶等,其在循环血液中含量极低,男性为 0.190~0.750 $\mu\text{g/L}$,女性为 0.200~0.905 $\mu\text{g/L}$,且水平不随月经周期改变,而妊娠妇女 TFPI-2 水平可高达 40~70 倍。在血浆中大多数以脂蛋白结合形式存在,在组织中主要存在于细胞外基质,约占体内含量的 75%~95%。有研究发现,TFPI-2 与 ECM 中的肝素及硫酸皮肤素的结合对 TFPI-2 的定位起重要作用。

2 TFPI-2 的生物学功能与调控

2.1 TFPI-2 的生物学功能

2.1.1 凝血功能 大量研究表明,TFPI 是组织因子(tissue factor,TF)诱导凝血过程的负性调节物之一,可直接抑制凝血因子 Xa ,并与凝血因子 Xa 结合反馈抑制凝血因子 VIIa /组织因子复合物。在正常情况下,TF 与凝血因子 VII (或 FVIIa)结合是血液凝固的触发点,两者形成复合物后能使凝血因子 VII 更迅速地被血液中痕量 FXa 激活,同时也使 FVIIa 的活性增强 1 000 倍。凝血因子 VIIa /TF 复合物将更多的 FX 活化为 FXa ,而 TFPI 的 KD2 与 FXa 活性位点结合直接抑制 FXa 的活性,当血液中 TFPI 达到一定浓度时,还能识别位于凝血酶原复合物中的 FXa ,从而抑制凝血酶原酶,阻碍凝血酶原激活,减少凝血酶的生成,防止血栓的形成,正是这种 TF 与 TFPI 动态平衡的维持,防止了血液系统的疾病^[6]。

2.1.2 维持 ECM 及基底膜(basement membrane,BM)的完整性 在正常情况下,TFPI-2 能与 MMPs、ECM 及 BM 结合,阻止 MMPs 与 ECM 结合,且进一步成为 MMPs 的粘合剂并降解 MMPs,从而阻止 MMPs 对 ECM 和 BM 的破坏,保持 ECM 和 BM 的完整性,有利于阻止疾病的侵袭与扩散。同时 TFPI-2 可以增强金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloprotenase,TIMP)与 MMPs 结合部位的结合和提高其降解 MMPs 的能力^[7]。

2.1.3 抑制肿瘤细胞的侵袭与转移 恶性肿瘤引起患者死亡的一个重要原因是肿瘤的侵袭和远处转移,而恶性肿瘤的转移

[△] 通讯作者,电话:13500328655;E-mail:jiangz1753@163.com。

是多因素和多阶段实施的复杂过程,涉及肿瘤细胞自身生长优势的获得、细胞间黏附能力的降低、肿瘤细胞对 ECM 和 BM 的降解和破坏、细胞骨架重构引起的细胞运动和迁移、细胞因子诱导肿瘤细胞特异定向归巢以及肿瘤血管、淋巴管生成、细胞凋亡和免疫杀伤等诸多因素,由于 ECM 的特殊结构和组成成分,不仅是肿瘤侵袭、转移的天然组织屏障,而且是肿瘤细胞与周围环境相互作用的场所,因此 ECM 在肿瘤发生、发展的整个过程中都起着重要的作用,而 MMPs 作为 ECM 微环境的重要组成部分,不仅通过降解 ECM 促进肿瘤的转移,而且通过酶解从细胞表面和 ECM 释放的生物活性丝裂因子(FGF、IGFs 和 EGF),促进肿瘤侵袭和转移。一方面丝裂因子调控肿瘤细胞的生长、增殖、新生血管的生成等,另一方面上调 MMPs 的表达与分泌,又进一步促进丝裂因子的释放。因此降解 MMPs,同时抑制 MMPs 的活性与功能可阻止和控制肿瘤的侵袭与远处转移。

据研究,TFPI-2 作为一种广谱的丝氨酸蛋白酶抑制剂,能明显抑制肿瘤中的 MMPs 活性和功能从而抑制肿瘤的侵袭、转移能力,其抑制肿瘤的侵袭、转移的可能机制如下:(1)抑制肿瘤新生血管的形成^[8]。其主要机制包括下调血管内皮生长因子-C(VEGF-C)、VEGF-R1 和 IL-8 的表达。在对神经胶质细胞瘤、纤维肉瘤和恶性脑膜瘤等研究中发现,TFPI-2 通过抑制新生血管的形成抑制肿瘤细胞的生长,降低其与对周围组织的侵袭及远处转移的能力;其次通过抑制纤溶物和金属蛋白酶、增强其抑制物的活性等加速 ECM 的沉积以及重塑^[7]。据研究,VEGF 以时间、剂量依赖性增加内皮细胞 TFPI-2 的转录和表达,同时对 TNF- α 、IL-1 β 和 FGF-2 的刺激可明显上调 TFPI-2 mRNA,相反 TFPI-2 能明显抑制由 VEGF 和 FGF-2 介导的内皮细胞增殖,从而减少新生血管的形成^[9]。(2)诱导肿瘤细胞凋亡。近年来研究发现,TFPI-2 在抑制细胞增殖及诱导细胞凋亡中发挥重要作用,VEGF 能够上调 TFPI-2 的表达,进而降解丝氨酸的蛋白产物以结合细胞凋亡受体,引导细胞程序性死亡。现已证实,凋亡蛋白(Bax)表达的增加和(或)抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达的抑制均可导致线粒体膜渗透性的改变甚至破裂,继而引起线粒体细胞色素 C 的释放,而细胞色素 C 可进一步激活 caspase-3 并诱发凋亡的发生。TFPI-2 可使 Bax 的表达水平增高,而 X 连锁凋亡抑制蛋白、Bcl-2 的表达水平降低,同时增强 caspase-9、caspase-3、TNF- α 、Bax、Fas 相关的死亡结构域、TNFR-1 有关的死亡结构域和 Fas 配体的活性,从而导致肿瘤细胞凋亡增加,发挥其抗肿瘤的效应^[10-12]。(3)抑制 MMPs。ECM 由多种蛋白聚糖组成,在细胞黏附、迁移、生长和分化中起重要作用,其内环境的稳定依赖生长因子、蛋白水解酶及其抑制剂之间的动态平衡。各种肿瘤细胞分泌的蛋白水解酶,如 MMPs 所参与的 ECM 的降解是肿瘤发生侵袭和转移的关键步骤。由于 TFPI-2 与金属蛋白酶组织抑制剂有相似的结构,其氨基末端自由氨基上存在 Zn²⁺ 活化位点,可以通过多价螯合剂作用与 MMPs 及 MMP 前体结合,从而抑制各种丝氨酸蛋白酶及 MMPs,如 MMP-1、MMP-2、MMP-9 和 MMP-13 等与 ECM 结合,降低对 ECM 的破坏作用,因此 TFPI-2 能够抑制 ECM 的降解,在肿瘤的侵袭和转移中发挥调节作用^[13]。(4)抑制 TF/FVIIa 复合物^[8]。肿瘤细胞及肿瘤血管内皮细胞表面常有 TF 的异常表达,与 FVIIa 形成 TF/FVIIa 复合物是外源性凝血途径的始动因子,与肿瘤的高凝状态有关,能够增加肿瘤的侵袭、转移特性,其效应可以被 TFPI-2 所抑制,而 TFPI-2 作为组织因子途径的重要生理抑制物则可能

在抑制 TF/FVIIa 复合物介导的信号传导途径中发挥作用,抑制肿瘤的侵袭与转移^[6]。

2.2 TFPI-2 基因表达的调控 TFPI-2 基因位于人类染色体 7q22,全长约 7.0 kb,含有 5 个外显子和 4 个内含子,所有的外显子和内含子周围的核苷酸序列都比较保守,服从 GT-AC 原则,TFPI-2 mRNA 启动子有典型的管家基因特征,在 TFPI-2 基因调节中起关键作用:(1)凝血酶上调 TFPI-2 基因的表达。该效应发挥依赖于 G 蛋白偶联受体 I 及环氧合酶-2,以通过促分裂原活化蛋白酶依赖途径增加环氧合酶-2 mRNA 的表达,进而促进促分裂原活化蛋白酶/环氧合酶-2 依赖的信号传导途径上调 TFPI-2。凝血酶介导的 TFPI-2 上调表达能抑制 MMP 前体的活化,降低 MMP 对 ECM 的降解。(2)炎症介质以及理化因素可调节 TFPI-2 基因的表达。IL-1、TNF- α 和 INF- α 、 β 、 γ 等炎症介质、内毒素以及山梨醇和紫外线等理化因素通过增加 cAMP 激活蛋白激酶 C 途径或通过激活蛋白激酶/c-Jun 氨基酸激酶信号传导途径实现对 TFPI-2 基因表达的调节,TFPI-2 启动子区域的 4 个 AP-1 结合位点在该过程中起重要作用。(3)TFPI-2 的凝酸胞苷酰(cytidylyl phosphate guanosine,CPG)可调节 TFPI-2 基因的表达。TFPI-2 基因存在 1 个典型的 220 bp 的 CPG 岛区域,跨越外显子 1 和 3 个转录起始位点,其中 G+C 含量大约 77%,TFPI-2 基因的沉默与 CPG 岛甲基化有关,与 KLF-6 结合的启动子 DNA 超甲基化可阻止 TFPI-2 的转录与表达^[12]。多种肿瘤中 TFPI-2 的表达受到抑制都与 CPG 岛甲基化有关,同时 TFPI-2 甲基化常常提示组织细胞的恶性演变^[13-14];同时发现 TFPI-2 mRNA 的表达与 TFPI-2 甲基化呈负相关^[20];而 5' 乙酰唑胺和曲古抑菌素 A 能解除 CPG 岛甲基化,两者结合可发挥协同效应,增加 TFPI-2 的表达,抑制肿瘤的侵袭和转移^[15]。除此之外,细胞外信号调节激酶/促分裂原活化蛋白酶信号传导途径也参与对 TFPI-2 基因表达的调节^[16]。

3 TFPI-2 与肝脏疾病

3.1 TFPI-2 与肝硬化 目前认为肝纤维化是肝损害持续存在,组织发生修复反应时因 ECM 合成、降解与沉积不平衡而引起的病理过程,而 TFPI-2 过度表达在肝纤维化和肝硬化的发生与发展中起到了推波助澜的作用。据研究,TFPI-2 具有降解 MMPs、抑制 MMPs 的活性、同时与 TIMP 一起共同促进 ECM 过度沉积的作用。合成和沉积的 ECM 不仅有量的变化,而且有质的改变,这种 ECM 质和量的改变又加速激活静息状态的 HSC,而 HSC 持续激活后又将导致:(1)HSC 数量增多,合成 ECM 能力增强,从而导致胶原合成增加^[17];(2)纤维凝聚加强和胶原降解减少,这主要缘于 HSC MMPs 及 TIMP 表达的改变,随着纤维化的进展 MMPs 下降,伴随 TIMP 的表达上调,TIMP/MMPs 比值增加,导致胶原降解减少^[18];(3)ECM 比例失调以及 ECM 质和量的改变,导致 HSC 分泌不溶性 I 型胶原明显增加,取代 III 型胶原而成为肝内主要胶原,进一步引起 ECM 分子结构发生微异质性改变,形成恶性循环。因此 TFPI-2 过度表达在肝纤维化和肝硬化的发生与发展过程中起到了重要的病理生理作用。以 TFPI-2 作为靶点治疗肝纤维化将成为肝纤维化基因治疗的一个途径。如果采用现代分子生物学技术阻断 TFPI-2 的过度表达,从而切断其降解 MMPs、抑制 MMPs 活性的作用,加速 ECM 的降解,从而在一定程度上达到预防和治疗肝纤维化的目的^[19]。

3.2 TFPI-2 与肝癌 由于 ECM 是肿瘤侵袭、转移的天然组织屏障,同时是肿瘤细胞与周围环境相互作用的场所,因此

ECM 在阻止肿瘤侵袭与转移的过程中起着重要的作用。由于肿瘤细胞大量分泌 MMPs, 不仅降解 ECM 促进肿瘤的转移, 而且通过酶解从细胞表面和 ECM 释放的生物活性丝裂因子 (FGF、IGFs 和 EGF), 促进肿瘤细胞的生长、增殖以及新生血管的生成等, 同时丝裂因子上调 MMPs 的表达与分泌, 又进一步促进丝裂因子的释放, 形成恶性循环。因此降解 MMPs、抑制 MMPs 的活性可阻止和控制肿瘤的侵袭与远处转移。据研究, 导致肿瘤的侵袭与转移常常是 TFPI-2 基因在肿瘤细胞中的突变、甲基化以及 TFPI-2 不表达所致^[20-21]。Rao 等^[22]分别测定了人类高度恶性、中度恶性以及低度恶性的神经胶质瘤中 TFPI-2 的表达, 发现 TFPI-2 mRNA 和蛋白质表达水平与肿瘤恶性程度呈负相关, 而恶性程度最高的肿瘤细胞株体内转移、侵袭能力最强, 其 TFPI-2 几乎无表达, 同时将 TFPI-2 基因转染到高度恶性的肿瘤细胞中, 则发现明显抑制肿瘤的侵袭与转移能力。Jin 等^[23]将 TFPI-2 转染到绒毛癌细胞株 JAR 研究 TFPI-2 与绒毛癌细胞转移、侵袭能力的关系发现, 恶性肿瘤不表达 TFPI-2, 其转移、侵袭能力较强, 而经转染后表达 TFPI-2, 其侵袭力减弱, 说明 TFPI-2 表达的下调与肿瘤侵袭、转移能力呈正相关。据 Wong 等^[24]研究发现, 在大约 90% 原发性肝癌中 TFPI-2 低表达或不表达, 47% 肝癌以及 80% 肝癌细胞系存在 TFPI-2 启动子甲基化, 从而导致 TFPI-2 转录和表达减少, 而脱甲基作用的 5' 乙酰唑胺和组蛋白脱乙酰基酶抑制剂——曲古抑菌素 A 使 TFPI-2 去甲基化后能恢复 TFPI-2 的表达; 同时发现异位过表达的 TFPI-2 能明显抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭, 提示 TFPI-2 是一种候选的抑癌基因^[25]。因此采用现代分子生物学技术增加 TFPI-2 的表达, 增强 TFPI-2 活性, 有助于降解 MMPs 等多种蛋白水解酶, 从而达到预防和治疗肝癌的目的。

4 问题与展望

尽管 20 世纪在肝纤维化和肝癌研究领域已取得重大突破, 然而目前可用于肝纤维化和肝癌基因治疗的靶基因还相当有限, 更多基因的功能还需要进一步认识和挖掘, 而 TFPI-2 是一个组织因子途径抑制物, 在肝纤维化和肝癌的发生与发展中具有不同的病理、生理作用, 同时在基础与临床应用研究过程中仍有许多问题亟待解决, 如 TFPI-2 对各细胞因子和相应的传导途径的影响如何? 在肝纤维化和肝癌形成过程中的作用孰轻孰重? 同时针对肝纤维化和肝癌复杂的分子机制, 如何进行多靶点协同调控以提高疗效以及如何实现基因治疗中的靶向性、调控性以及安全性? 因此肝纤维化与肝癌的基因治疗目前依然任重道远。针对目前存在的问题, 下一步研究重点将是 TFPI-2 在体内、外的表达调控和对细胞转移机制作用探讨以及在动物模型中进一步研究 TFPI-2 的作用, 为临床的开发与利用奠定基础。

参考文献:

- [1] Kamei S, Kazama Y, Kuijper JL, et al. Genomic structure and promoter activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 gene [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1517 (3): 430.
- [2] Chand HS, Schmidt AE, Bajaj SP, et al. Structure-function analysis of the reactive site in the first Kunitz-type domain of human tissue factor pathway inhibitor-2 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (17): 17500.
- [3] Chand HS, Foster DC, Kisiel W. Structure, function and

- biology of tissue factor pathway inhibitor-2 [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 94 (6): 1122.
- [4] Hisaka T, Lardeux B, Lamireau T, et al. Expression of tissue factor pathway inhibitor-2 in murine and human liver regulation during inflammation [J]. *Thromb Haemost*, 2004, 91 (3): 569.
- [5] Choi MS, Parikh K, Saxena A, et al. Protective effects of recombinant kunitz-domain 1 of human tissue factor pathway inhibitor-2 against 2-chloroethyl ethyl sulfide toxicity in vitro [J]. *Eplasty*, 2007, 8: e3.
- [6] Schmidt AE, Chand HS, Cascio D, et al. Crystal structure of Kunitz domain 1 (KD1) of tissue factor pathway inhibitor-2 in complex with trypsin. Implications for KD1 specificity of inhibition [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280 (30): 27832.
- [7] Ivanciu L, Gerard RD, Tang H, et al. Adenovirus-mediated expression of tissue factor pathway inhibitor-2 inhibits endothelial cell migration and angiogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27 (2): 310.
- [8] Sierko E, Wojtkiewicz MZ, Kisiel W. The role of tissue factor pathway inhibitor-2 in cancer biology [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2007, 33 (7): 653.
- [9] Xu Z, Maiti D, Kisiel W, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 is upregulated by vascular endothelial growth factor and suppresses growth factor-induced proliferation of endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (12): 2819.
- [10] Kempaiah P, Kisiel W. Human tissue factor pathway inhibitor-2 induces caspase-mediated apoptosis in a human fibrosarcoma cell line [J]. *Apoptosis*, 2008, 13 (5): 702.
- [11] Rollin J, Régina S, Vourc'h P, et al. Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2007, 56 (2): 273.
- [12] Guo H, Lin Y, Zhang H, et al. Tissue factor pathway inhibitor-2 was repressed by CpG hypermethylation through inhibition of KLF6 binding in highly invasive breast cancer cells [J]. *BMC Mol Biol*, 2007, 8: 110.
- [13] Ohtsubo K, Watanabe H, Okada G, et al. A case of pancreatic cancer with formation of a mass mimicking alcoholic or autoimmune pancreatitis in a young man. Possibility of diagnosis by hypermethylation of pure pancreatic juice [J]. *JOP*, 2008, 9 (1): 37.
- [14] Jiang P, Watanabe H, Okada G, et al. Diagnostic utility of aberrant methylation of tissue factor pathway inhibitor 2 in pure pancreatic juice for pancreatic carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97 (11): 1267.
- [15] Steiner FA, Hong JA, Fischette MR, et al. Sequential 5-Aza 2'-deoxycytidine/depsipeptide FK228 treatment induces tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI-2) expression in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (14): 2386.
- [16] Kast C, Wang M, Whiteway M. The ERK/MAPK pathway regulates the activity of the human tissue factor pathway inhibitor-2 promoter [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (9): 6787.