

# 新生血管抑制剂人纤溶酶原 kringle 5 的研究进展

董丽 李彪

**【摘要】** 新生血管对于肿瘤的生长、浸润和转移具有重要的意义,当瘤体体积超过 1~2 mm<sup>3</sup> 时就需要新生血管提供营养维持代谢,同时提供转移通路。人纤溶酶原 kringle 5 作为一种血管生成抑制因子,能够与新生血管的内皮细胞特异性结合,通过抑制新生血管内皮细胞增殖而减少新生血管的形成,因此在肿瘤新生血管靶向性治疗中具有很大的应用前景。利用核素标记人纤溶酶原 kringle 5 对多种肿瘤及其转移病灶进行显像的同时实施内照射治疗,这一独特的肿瘤诊疗方法将受到人们的重视。

**【关键词】** 纤维蛋白溶酶原;血管生成抑制剂;肿瘤辅助疗法

## Studying and progression of human plasminogen kringle 5

DONG Li, LI Biao

(Department of Nuclear Medicine, Shanghai Ruijin Hospital Affiliated Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

**【Abstract】** Neovascularization plays an important role in the processes of growth, invasion and metastasis in tumors. Solid tumors rely on neovascularization to get oxygen and other nutrients supply, otherwise they are not able to expand over 1~2mm<sup>3</sup>. Meanwhile angiogenesis offers the pathway for metastasis. Hence, inhibitors of angiogenesis become the promise in the therapeutic research. Plasminogen kringle 5 is a proteolytic fragment of plasminogen. Inhibit proliferating vascular endothelial cells but also can induce apoptosis. These results suggest that the anti-angiogenic activity of kringle 5 shows its promising future in cancer therapy. The certain radiopharmaceuticals can be used to perform both imaging and internal radiotherapy in many kinds of carcinomas, in both original and metastatic sites. This unique method will catch our eyes dramatically.

**【Key words】** Plasminogen; Angiogenesis inhibitors; Neoadjuvant therapy

## 1 人纤溶酶原 kringle 5 (K5) 的分子结构

人纤溶酶原是分子质量为 92×10<sup>3</sup>、由 791 个氨基酸残基组成的糖蛋白,包括一个丝氨酸蛋白酶结构域和 5 个通过二硫键连接而成的联环结构域(kringle),分别为 K1、K2、K3、K4 和 K5。人纤溶酶原 K5 是纤溶酶原中与血管抑素相连的第五个环状结构域,含 3 个二硫键(Cys461-Cys540、Cys482-Cys523、Cys511-Cys535),成双环状构象,分子质量约为 14×10<sup>3</sup>,其对新生血管内皮细胞同时具有抑制增生和抗迁移能力。

## 2 人纤溶酶原 K5 的生物学活性及分子机制

### 2.1 肿瘤血管形成

血管增生是从现有血管中长出新生毛细血管的

过程。血管形成在生理情况如组织再生等占有重要地位,在病理情况下,如糖尿病视网膜病变、肿瘤的生长和转移过程中也是必要条件之一。现在普遍承认,新生血管的形成在体内由正性和负性双重信号调控,血管刺激因子和抑制因子之间的平衡起关键作用,当受缺氧、低 pH 值、细胞内部压力等因素使局部微环境发生变化时,出现一系列基因表型改变,二者之间的平衡被打破,促进了血管的形成和生长。

### 2.2 人纤溶酶原 K5 抗肿瘤新生血管生长的作用机制

人纤溶酶原 K5 发挥生物学作用的机制还不是十分清楚,但人纤溶酶原 K5 特异性抑制新生血管内皮细胞增殖和迁移的作用已被确定。有研究显示,高浓度尿素(8 mol/L)将人纤溶酶原 K5 变性处理后,人纤溶酶原 K5 丧失活性,表明人纤溶酶原 K5 中某些天然结构是维持生物活性所必需<sup>[1]</sup>。根

据人纤溶酶原 K5 结构特征和二硫键分布特点构建人纤溶酶原 K5 的两个缺失突变体: K5 mut1 (Cys461-Cys540) 和 K5 mut2 (Cys482-Cys535), 其中 K5 mut1 为删除人纤溶酶原 K5 结构中 N 端 10 个氨基酸和 C 端 1 个氨基酸而保留 kringle 基本结构域和 3 个二硫键(Cys461-Cys540、Cys482-Cys523、Cys511-Cys535), K5 mut2 为打开 kringle 环, 只保留 2 个二硫键及部分 kringle 结构域 (Cys482-Cys523、Cys511-Cys535), 通过对人视网膜血管内皮细胞增殖抑制试验发现: K5 mut1 的半数有效剂量约为 35 nmol/L, 抑制活性是完整人源性纤溶酶原 K5 蛋白的 2 倍, 而在同样浓度范围, K5 mut1 并不抑制周边的同源细胞, 这就表明 K5 mut1 特异性抑制新生血管内皮细胞增生; K5 mut2 蛋白对人视网膜血管内皮细胞无显著抑制作用, 说明完整地包含 3 个二硫键的 kringle 结构是维持人纤溶酶原 K5 抗血管内皮细胞增生活性的前提, 分子中 kringle 结构域外的 N 端和 C 端氨基酸臂并非其活性所必需; 另一推测认为, N 端氨基酸臂中含有丰富的酸性氨基酸和某些支链氨基酸的形态和空间结构, 与 kringle 相互作用后抑制了人纤溶酶原 K5 的抗血管增生活性<sup>[2]</sup>。另有报道, 将人纤溶酶原 K5 部分肽段与人血清清蛋白联接, 可增强生物学活性, 同时抑制在血浆中降解<sup>[3]</sup>。

人纤溶酶原 K5 对血管内皮生长因子诱导的血管内皮细胞和人脐血管内皮细胞迁移均有显著抑制作用, 对血管周边细胞、肝癌细胞和正常肝细胞、鼠成纤维细胞系 NIH3T3、人单核细胞、巨噬细胞系 THP-1、中性粒细胞和人结肠癌细胞系 HCT116 的迁移均未见抑制作用, 可见, 人纤溶酶原 K5 对新生血管内皮细胞有特异性抑制作用; 体外模型实验显示, 在血管内皮生长因子或成纤维细胞生长因子存在时, 重组人纤溶酶原 K5 通过减少血管分支数目及长度来抑制血管管腔的形成, 这与重组人纤溶酶原 K5 特异性抑制新生血管内皮细胞增殖一致<sup>[4]</sup>。

纤溶酶原经蛋白酶作用可产生三种血管生长抑素 K1-3、K4 和 K1-4, 尿激酶或组织型纤溶酶原激活物的作用位点为第 561~562 位氨基酸处, 此位点位于纤溶酶原 K5 处, 因此可产生一种血管生长抑素 K4.5, 其包括纤溶酶原 K1-4 的结构和 80%人纤溶酶原 K5 的氨基酸序列 (Lys78~Arg529)<sup>[5]</sup>。血管生长抑素 K4.5 抗血管增生活性强于血管生长抑

素 K1-3 或 K1-4, 可能是由于含有部分人纤溶酶原 K5 氨基酸序列, 因此有学者认为, 血管生长抑素 K1-4 结构域分离可能解除了对人纤溶酶原 K5 的屏蔽作用, 使人纤溶酶原 K5 可以发挥更强的生物学活性<sup>[6]</sup>。Wang 等<sup>[7]</sup> 发现, 纤溶酶原和纤溶酶可以与 PC-3 细胞表面的  $\beta$ -肌动蛋白结合, 并呈剂量依赖性 (动力学解离常数为 140 nmol/L), 是因为含有完整 K5 结构, 而含完整 K1-4 和 80%K5 结构的血管生长抑素 K4.5 浓度达到 40  $\mu$ mol/L 时仍不与  $\beta$ -肌动蛋白结合, 证明了完整的 K5 结构对纤溶酶原和纤溶酶结合至细胞表面  $\beta$ -肌动蛋白的必要性, 并解释了血管生成是在局部、而血管抑制却作用于全身的现象; 同时也明确了细胞表面  $\beta$ -肌动蛋白中 Lys61 和 Lys68 在与纤溶酶原和纤溶酶结合时的重要意义。

研究显示, 在人脐静脉内皮细胞内, 人纤溶酶原 K5 与其表面受体电压依从性阴离子通道相互作用后, 干扰了  $Ca^{2+}$  浓度及胞液的 pH 值, 细胞内酸化, 诱导内皮细胞凋亡, 间接影响血管内皮细胞的增殖<sup>[8]</sup>。

还有报道称, 人纤溶酶原 K5 与血管生长平衡之间, 可能是通过抑制缺氧诱导因子 1 和 p42/p44 有丝分裂原激活蛋白激酶活性来下调血管内皮生长因子的表达, 而不是通过减少血管内皮生长因子来抑制 p42/p44 活化, 同时提高内源性血管增生抑制因子表达, 这种调节有利于使被打破的血管增生平衡恢复正常, 也揭示血管刺激因子和抑制因子之间的联系<sup>[9]</sup>。Tarui 等<sup>[10]</sup> 认为, 人纤溶酶原 K5 可能是通过细胞外基质中某些小分子如整合素而发挥作用, 因为整合素是维持有丝分裂原激活蛋白激酶活性所必需。

Davidson 等<sup>[11]</sup> 发现, 血管内皮细胞中表面蛋白葡萄糖调节蛋白 78 是人纤溶酶原 K5 特异性结合位点, 人纤溶酶原 K5 与葡萄糖调节蛋白 78 高效结合后, 抗血管增生活性和前凋亡活性即可表现出来; 在缺氧条件下, 重组人纤溶酶原 K5 可诱导纤维肉瘤细胞 HT1080 等肿瘤细胞系凋亡, 其原理可能是: 缺氧条件下这些肿瘤细胞表面的葡萄糖调节蛋白 78 表达增高, 重组人纤溶酶原 K5 与该蛋白结合后, 增高肿瘤细胞 caspase-7 的表达, 诱导细胞凋亡。

Nguyen 等<sup>[4]</sup> 报道, 重组人纤溶酶原 K5 不但诱

导新生血管内皮细胞凋亡,同时可引起细胞自体吞噬,提出 caspase 诱导凋亡的体内途径是通过线粒体去极化及细胞色素 C 的释放而实现,并且确定 1.5 mg/L 的重组人纤溶酶原 K5 在 10%胎牛血清中就可促进血管内皮细胞线粒体去极化,诱导凋亡。重组人纤溶酶原 K5 通过打乱 Beclin 1 和 Bel-2 之间的平衡诱导自体吞噬,且在 Beclin 1 减少的同时细胞内 caspase-3 和 caspase-7 活性有少量增强,减少内皮细胞自体吞噬作用将会增强重组人纤溶酶原 K5 诱导凋亡的作用。Nguyen 等还提出,葡萄糖调节蛋白 78 并非是重组人纤溶酶原 K5 惟一结合点,电压依从性阴离子通道和葡萄糖调节蛋白 94 也是与重组人纤溶酶原 K5 结合的目的蛋白。

### 3 人纤溶酶原 K5 对血管增生性疾病的诊断和治疗

肿瘤的传统治疗方法是切除术、放疗和化疗,是直接针对肿瘤治疗。凡是在体外能杀死肿瘤细胞的任何细胞毒性药物都可成为化疗药物,但这种方法有两个缺点:①化疗药物选择性差,在杀伤肿瘤细胞的同时对机体正常细胞也有很强杀伤作用;②肿瘤细胞在遗传学上的不稳定性,对化疗药物容易发生耐药。血管生长抑制是一种间接的肿瘤治疗方法,抑制剂以肿瘤组织内新生血管为目标,通过抑制肿瘤组织新生血管生长,终止对肿瘤组织的营养供应,减慢瘤体生长速度而达到治疗目的。该方法的优点:①非针对某种肿瘤进行治疗,因为所有实体瘤生长均有血管依赖性;②针对的肿瘤新生血管内皮细胞基因稳定,与肿瘤细胞相比不易产生耐药;③正常血管处于低增长状态,一般情况下仅有 0.01%的血管内皮细胞进行分裂,而肿瘤组织内增殖状态的血管内皮细胞较正常组织高 2~3 个数量级,因此抗新生血管治疗对正常组织新生毛细血管的影响很小。

近年来,天然血管增生抑制剂或人工合成抑制剂陆续被发现,其中纤溶酶原 K5 倍受关注,人纤溶酶原 K5 的自身优点决定了其在肿瘤治疗或其他血管增生性疾病中广泛的应用前景:①人纤溶酶原 K5 是正常情况下机体拥有的细胞因子,目前尚未发现有不良反应;②人纤溶酶原 K5 具有新生血管内皮细胞高度选择性;③氨基酸序列短,结构稳定,免疫原性低,生物活性高;④诱导新生血管内皮细胞及某些肿瘤细胞的凋亡;⑤抑制血管

内皮细胞作用明显强于血管生长抑素和内皮细胞抑素。上述特点为人纤溶酶原 K5 的应用和研究开拓了思路,也为新生血管性疾病及肿瘤的诊断和治疗提供了新方法。

Yang 等<sup>[12]</sup>对人纤溶酶原 K5 在接种小鼠肝癌细胞 HepA 和人肝癌细胞系 Bel7402 的裸鼠模型中的作用进行研究显示,人纤溶酶原 K5 组的两种瘤体内微血管密度均降低,肿瘤增长速度减慢,瘤体较对照组小。其机制可能是人纤溶酶原 K5 发挥了抗血管增生活性并诱导血管内皮细胞发生凋亡。因此,人纤溶酶原 K5 具有应用于肝细胞癌治疗的潜在价值。

新生血管生成抑制剂特异性靶向肿瘤新生血管,通过打乱肿瘤生长和血管生成之间的互相依赖关系来抑制肿瘤生长,还可抑制放射治疗后的肿瘤血管再生<sup>[13]</sup>。因此,使用放射性核素标记血管生长抑制剂进行肿瘤显像和治疗,可以克服常规显像剂靶向性差、对正常组织有毒性作用的缺陷。目前,已有研究分别采用 <sup>99m</sup>Tc 标记内皮细胞抑素和用 <sup>123</sup>I 标记血管生长抑素进行相关的研究,近年来也有学者对人纤溶酶原 K5 进行放射性核素 <sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I 标记后的研究,结果显示标记后未改变人纤溶酶原 K5 的生物活性<sup>[14,15]</sup>。这也为人纤溶酶原 K5 在肿瘤放射性核素的靶向治疗、肿瘤诊断及疗效评价奠定了基础。人纤溶酶原 K5 不但特异性地与新生血管内皮细胞结合,而且相对于内皮细胞抑素和血管生长抑素有许多其他优点,为人纤溶酶原 K5 联合放射性核素进行肿瘤诊断和治疗提供了先决条件,因此有理由相信,通过人纤溶酶原 K5 的单独应用或与其他治疗手段联合应用,必将为肿瘤的诊断和治疗提供更有效的手段。

### 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Léger R, Benquet C, Huang X, et al. Kringle 5 peptide-albumin conjugates with anti-migratory activity[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14(4): 841-845.

且 24 h 摄  $^{131}\text{I}$  率越大者受  $^{131}\text{I}$  剂量不足的影响越大。

本研究发现, 甲状腺结节影响  $^{131}\text{I}$  疗效, 其原因可能为: 结节内部血液循环较差, 且摄  $^{131}\text{I}$  能力低, 致使结节中  $^{131}\text{I}$  浓度低于应有水平。临床数据提示: 甲状腺有结节的患者, 应加大  $^{131}\text{I}$  剂量。

本研究结果认为,  $\text{FT}_3$ 、 $\text{FT}_4$ 、 $\text{sTSH}$ 、 $\text{TgAb}$  及  $\text{TMAb}$  水平对疗效的影响无统计学意义, 与国外文献报道一致<sup>[7]</sup>。有研究表明, 给予  $^{131}\text{I}$  前服用 ATD 会影响  $^{131}\text{I}$  摄取率和有效半衰期, 降低  $^{131}\text{I}$  疗效, 因此在  $^{131}\text{I}$  治疗前应至少停用 ATD 一周<sup>[26]</sup>。我科在  $^{131}\text{I}$  治疗前均要求患者停用 ATD 及禁碘至少 2 周, 因此, 给予  $^{131}\text{I}$  前服用 ATD 的疗程并无统计学意义。

多数研究报道,  $^{131}\text{I}$  有效半衰期延长, 患者治愈(包括甲减)的概率升高<sup>[2,6,8]</sup>, 但由于来我科  $^{131}\text{I}$  治疗者均为门诊患者, 等待治疗时间短, 无法记录有效半衰期, 因此无法给出具体统计值。

#### 4 结论

为提高  $^{131}\text{I}$  的疗效, 应采取个性化剂量方案, 对于年龄偏大、甲状腺 24 h 摄  $^{131}\text{I}$  率高、甲状腺质

量大和有结节的患者, 可适当增加  $^{131}\text{I}$  剂量或在疗效不佳的基础上行二次治疗。反之, 应减少  $^{131}\text{I}$  剂量, 以减少甲减的发生率。

#### 参 考 文 献

- [1] 张永学. 核医学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 355, 189, 393.
  - [2] 武海明, 谭天秩, 匡安仁, 等.  $^{131}\text{I}$  治疗 Graves 甲亢疗效影响因素的研究[J]. 中华核医学杂志, 2003, 23(5): 291-293.
  - [3] 郭一玲, 冯程, 汤学民, 等. 影响  $^{131}\text{I}$  治疗甲状腺功能亢进效果及剂量因素分析[J]. 中国地方病学杂志, 2004, 23(3): 248-250.
  - [4] 唐武儒, 刁丽娜, 韦南仕, 等.  $^{131}\text{I}$  治疗 225 例甲亢患者的疗效分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2006, 13(1): 57-58.
  - [5] 方毅, 刘剑锋, 张友仁, 等.  $^{131}\text{I}$  治疗甲亢后 61 例早发甲状腺功能减低分析[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(2): 168-169.
  - [6] 庞华, 谭本旭, 罗加.  $^{131}\text{I}$  治疗 Graves 病疗效影响因素分析[J]. 中华核医学杂志, 2003, 23(6): 337-338.
  - [7] Véliz J, Plineda G, Arancibia P, et al. Treatment of diffuse hyperthyroid goiter with radioiodine: influence of propylthiouracil pretreatment[J]. Rev Med Chil, 2000, 128(8): 609-612.
  - [8] 耿建, 陈勇, 计学理, 等.  $^{131}\text{I}$  治疗 Graves 病 320 例疗效影响因素分析[J]. 山西职工医学院学报, 2005, 15(1): 16-18.
- (收稿日期: 2007-11-27)
- 
- (上接第 71 页)
- [4] Nguyen TM, Subramanian IV, Kelekar A, et al. Kringle 5 of human plasminogen, an angiogenesis inhibitor, induces both autophagy and apoptotic death in endothelial cells[J]. Blood, 2007, 109(11): 4793-4802.
  - [5] Wang H, Schultz R, Hong Y, et al. Cell surface-dependent generation of angiostatin4.5[J]. Cancer Res, 2004, 64(1): 162-168.
  - [6] Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation[J]. Pharmacol Rev, 2000, 52(2): 237-268.
  - [7] Wang H, Doll JA, Jiang K, et al. Differential binding of plasminogen, plasmin, and angiostatin4.5 to cell surface beta-actin: implications for cancer-mediated angiogenesis[J]. Cancer Res, 2006, 66(14): 7211-7215.
  - [8] 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.
  - [9] 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 kringle5[J]. J Biol Chem, 2002, 277(11): 9492-9497.
  - [10] 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.
  - [11] Davidson DJ, Haskell C, Majest S, et al. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78[J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 4663-4672.
  - [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] Wachsberger P, Burd R, Dicker AP. Tumor response to ionizing radiation combined with antiangiogenesis or vascular targeting agents: exploring mechanisms of interaction[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6): 1957-1971.
  - [14] 李彪, 赵龙, 张一帆, 等. 重组人纤溶酶原 Kringle5 的标记及其肿瘤显像[J]. 上海第二医科大学学报, 2005, 25(12): 1218-1220.
  - [15] 尹桂芝, 李彪, 张大东, 等. 重组人纤溶酶原 Kringle 5 的  $^{125}\text{I}$  标记及其体内代谢[J]. 黑龙江医药科学, 2007, 30(1): 51-53.
- (收稿日期: 2007-09-16)