

· 综 述 ·

人类斯钙素与肿瘤相关性研究进展*

郝卫刚[#]综述,张海蓉,段丽平 审校

(昆明医学院附属第一医院消化内科 650032)

关键词:细胞低氧;细胞增殖;血管内皮生长因子类;斯钙素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.36.039

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)36-3725-03

斯钙素(stanniocalcin, STC)是一种首先在硬骨鱼类中发现,并已被充分阐明的糖蛋白激素,近年来在人和哺乳动物中发现也存在类似的蛋白。根据其蛋白分子中氨基酸序列的差异可以分为 STC-1 和 STC-2,在生物体内发挥着相辅相成的作用。STC 以旁分泌和自分泌的方式参与机体的多种生理功能,它不但可以通过肾脏和胃肠道来调节钙和磷酸盐的代谢,而且在促进脑神经元的终末分化^[1]、防止因大脑局部缺血造成脑神经元损害^[2]以及影响骨骼和肌肉的结构和功能^[3]等方面也有重要作用。随着对 STC 研究的不断深入,越来越多的研究表明 STC 的表达与人类癌症的发展过程相关,现将相关研究进展综述如下。

1 诱导肿瘤细胞适应低氧环境

肿瘤细胞生长迅速,缺氧在实体肿瘤中经常发生,虽然缺氧对肿瘤生长不利,但是肿瘤细胞会发生一系列基因和代谢改变得以存活并增殖,研究证明缺氧刺激可以促使包括结肠癌、鼻咽癌、卵巢癌在内的多种人类癌细胞系的 STC-1 基因表达,在鼻咽癌(CNE-2)细胞观察到的反应最强。进一步应用 CNE-2 细胞进行研究,发现去铁胺、氯化钴和氧消耗均使 CNE-2 细胞的缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)蛋白和 STC-1 mRNA 表达增高。RNA 干扰技术进一步证实内源性 HIF-1 是缺氧诱导的 STC-1 表达的关键调节因子, HIF-1 直接与 STC-1 启动子区域相结合,调节 STC-1 的表达。提示 STC-1 在缺氧诱导的肿瘤细胞适应性反应中起作用。STC-1 可提高肿瘤细胞中的磷浓度。在 STC-1 自分泌或旁分泌的作用下,在肿瘤细胞中高 STC-1 含量可能反映这些细胞中磷的高代谢需求。从有氧氧化到糖酵解代谢的转变成为实体肿瘤代谢的最为普遍的特征之一。乳酸和丙酮酸能上调 HIF-1, HIF-1 和转录因子 C-Myc 可上调肿瘤细胞中糖转运和糖酵解途径中代谢酶的表达^[4],因此肿瘤细胞的糖酵解代谢旺盛可能是一种反馈机制来维持由 HIF-1 调节的基因表达结果。STC-1 表达也增加了电子的转运和增加线粒体的体积,这将会减少乳酸和丙酮酸的堆积,因此 STC-1 可能调整被公认为的 HIF-1/丙酮酸盐正反馈^[5]。此外,通过对牛心脏亚线粒体颗粒研究显示,STC-1 可以呈浓度依赖对电子传递链起刺激作用^[6],以上均提示低氧状态下 STC-1 具有诱导肿瘤适应低氧环境的作用。

STC-2 也是 HIF-1 作用的靶基因之一, Law 和 Wong^[7] 使用卵巢癌细胞研究结果表明,缺氧条件下, HIF-1 可以上调 STC-2 表达促进细胞增殖, STC-2 不表达则可引起细胞增殖减少,提示 STC-2 在缺氧条件下表达上调可能是肿瘤细胞适应微环境改变的一种反应。

2 调节内皮细胞功能,促进新生血管的成熟

实体肿瘤的生长依赖于血管网的建立和形成,未血管化的肿瘤只能生长到 1 mm³, 约含 10⁶ 个癌细胞,肿瘤血管网在瘤细胞释放血管生成因子诱导下生成,供应氧和养料以满足瘤细胞增殖的需要。肿瘤血管生长因子中最重要的就是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)。有研究发现, VEGF-A165 通过蛋白激酶-C、细胞外信号调节蛋白激酶和 Ca²⁺ 通路上调血管内皮细胞的 STC-1 mRNA 的表达,成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2)对此反应有协同作用,在血管生成的基因谱研究中 STC-1 的急剧表达上调可能是血管生成反应的关键步骤^[8]。此外, STC-1 可以通过保持细胞间紧密连接、抑制超氧阴离子产物生成及核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)活性等途径维持血管内皮通透性,从而起到调节血管内皮功能的作用^[9]。

3 肿瘤的侵袭性

肿瘤细胞的侵袭性是恶性肿瘤的重要特征之一,吴平等^[10]检测 69 例消化道肿瘤患者外周血 STC-1 mRNA 发现,外周血 STC-1 的表达与肿瘤浸润深度、分化程度、有无淋巴结转移等有显著的相关性。Ieta 等^[11]采用适时定量-逆转录-聚合酶链反应检测 139 例结肠癌患者组织中 STC-2 的表达与肿瘤大小、浸润深度、分化程度、有无淋巴结转移和肿瘤分期等相关,文献^[12-13]与以上报道类似。

肿瘤细胞突破细胞外基质屏障是浸润和转移的前提条件之一,研究证明钙黏蛋白是钙依赖性跨膜糖蛋白,是一组依赖细胞外 Ca²⁺ 的黏附分子,介导 Ca²⁺ 依赖性细胞间黏附,通过同类或同分子亲和反应相结合,参与建立和维持细胞间连接,可能是最重要的形成细胞间联系的细胞黏附因子之一。有研究发现 STC-1 可通过自分泌或旁分泌途径与肿瘤细胞表面的趋化因子和整合素相互作用,调节细胞内 Ca²⁺/Pi 浓度,激活一系列细胞内信号,引起多种蛋白酶合成、分泌,从而溶解细胞外基质屏障,使肿瘤发生浸润和转移^[14-15]。

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是胚胎发育、组织重建和伤口修复中的基础过程,同时也是肿瘤浸润、转移的一个非常重要的机制。有研究运用蛋白质印迹和免疫细胞化学法揭示在缺氧条件下,稳定的 STC-2 的表达能通过增加神经型钙黏蛋白、波形蛋白和降低上皮型钙黏蛋白水平而促进 SKOV3 细胞的 EMT 过程。胶原蛋白降解基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinase MMP)-2 和 MMP-9 活性的提高可能参与了这个过程^[16],在原发性人类神经母细胞瘤组织中,STC-2 转染的神经母细胞瘤细胞浸润能力增加并提高了 MMP-2 的活性,增加了肿瘤细胞转移和出血的风险^[17]。

* 基金项目:云南省教育厅科学研究基金资助项目(06Y273C)。

[#] 现在四川省眉山市人民医院消化内科工作(邮编:620010)。

4 促进肿瘤细胞增殖

p53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因,其编码的 p53 蛋白主要集中于核仁区,能与 DNA 特异结合,其活性受磷酸化调控。Lai 等^[18]用碘乙酰胺 (iodoacetamide, IDAM) 作用于鼻咽癌 (CNE-2) 发现其能引起 p53 乙酰化、STC-1 和热休克蛋白的表达及细胞凋亡,N-乙酰半胱氨酸能阻断 IDAM 诱导的线粒体去极化、STC-1 的表达和细胞死亡,但不影响热休克蛋白的表达,证明 STC-1 在肿瘤细胞凋亡中发挥作用,并且如果 p53 不表达则能减少 IDAM 诱导的 STC-1 的表达,RNA 干扰研究也证实 p53 在 STC-1 的表达中发挥着重要作用。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDACi) 是一类新型的抗肿瘤药物。通过抑制 HDAC 的活性,诱导靶细胞中组蛋白高度乙酰化,由于乙酰化修饰可以改变组蛋白与 DNA 链间的结合状态,使染色质结构变得疏松,有利于转录因子与 DNA 链的结合,启动某些特异性基因的表达,从而达到阻断肿瘤细胞的生长^[19]。Law 等^[20]用 HDACi 曲古抑菌素-A 作用于人克隆腺瘤 HT29 细胞能激活 STC-1 的表达,STC-1 启动区域的超乙酰化、NF- κ B、染色体相关的非组蛋白的募集等因素参与其中,如果 STC-1 基因不表达则明显降低曲古抑菌素-A 诱导的细胞凋亡的数量,亦说明 STC-1 是一种前凋亡细胞因子。

Block 等^[21]研究还发现,将多能间质细胞 (multipotent stromal cells, MSCs) 与肺癌上皮细胞暴露于酸中毒和缺氧共培养系统中,MSCs 通过增加 STC-1 的分泌能够有效地降低肺癌上皮细胞凋亡,促进细胞增殖。

Tamura 等^[22]运用 RT-PCR 和免疫组化检查方法在去势抵抗和恶性程度比较高的前列腺癌组织中发现 STC-2 呈高表达,通过小干扰 RNA 可有效沉默 STC-2 基因表达减少前列腺细胞系的增殖,提示它可能是预测前列腺癌恶性程度和治疗前列腺癌的一个靶分子。

5 抑制免疫反应

肿瘤细胞在其发生、发展过程中,由于细胞基因突变等原因会表达一些新的抗原,这些新抗原作为“非己物质”可被机体的免疫系统识别和杀伤,机体可通过天然和获得性免疫抵抗肿瘤。然而恶性肿瘤能够发展和转移,说明免疫系统功能的变化在此过程中发挥着一定的作用。Kanellis 等^[23]研究显示,STC-1 可有效抑制单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、基质细胞转移因子-1a (stromal cell derived factor-1, SDF-1a) 与巨噬细胞表面相应受体结合,抑制趋化因子的趋化功能,从而抑制巨噬细胞趋化运动和参与免疫及炎症反应等诸多生物学功能。其作用与 STC-1 提高单核巨噬细胞内高浓度 Ca^{2+} 相关,增加的 Ca^{2+} 可直接影响细胞内激酶和磷酸化酶活化、吞噬体-溶酶体融合、转录调控、表面受体和细胞黏附调控、细胞趋化性和对抗原刺激的细胞反应等重要过程,从而抑制单核巨噬细胞参与炎症反应、抗原吞噬与提呈,诱导宿主抗原递呈细胞的功能低下或缺陷,以有助于肿瘤细胞逃避宿主免疫系统的攻击。

综上所述,STC 在人类肿瘤的发生和发展过程中发挥着比较广泛的作用,目前,它可以作为判断肿瘤转移和复发以及疗效观察的客观指标之一应用于临床工作中。随着对其生物学活性研究的不断深入,相信可以为恶性肿瘤的诊断和治疗开辟出一条新途径。

参考文献:

- [1] Filvaroff EH,Guillet S,Zlot C,et al. Stanniocalcin 1 alters muscle and bone structure and function in transgenic mice [J]. *Endocrinology*,2002,143(9):3681-3690.
- [2] Westberg JA,Serlachius M,Lankila P,et al. Hypoxic preconditioning induces neuroprotective stanniocalcin-1 in brain via IL-6 signaling [J]. *Stroke*,2007,38(3):1025-1030.
- [3] Law AY,Ching LY,Lai KP,et al. Identification and characterization of the hypoxia-responsive element in human stanniocalcin-1 gene [J]. *Mol Cell Endocrinol*,2010,314(1):118-127.
- [4] Yeung HY,Lai KP,Chan HY,et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells [J]. *Endocrinology*,2005,146(11):4951-4960.
- [5] Ellard JP,McCudden CR,Tanega C,et al. The respiratory effects of stanniocalcin-1 (STC-1) on intact mitochondria and cells:STC-1 uncouples oxidative phosphorylation and its actions are modulated by nucleotide triphosphates [J]. *Mol Cell Endocrinol*,2007,264(1/2):90-101.
- [6] Eisenhofer G,Huynh TT,Pacak K,et al. Distinct gene expression profiles in norepinephrine- and epinephrine-producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia-driven angiogenic pathways in von Hippel-Lindau syndrome [J]. *Endocr Relat Cancer*,2004,11(4):897-911.
- [7] Law AY,Wong CK. Stanniocalcin-2 is a HIF-1 target gene that promotes cell proliferation in hypoxia [J]. *Exp Cell Res*,2010,316(3):466-476.
- [8] Holmes DI,Zachary IC. Vascular endothelial growth factor regulates stanniocalcin-1 expression via neuropilin-1-dependent regulation of KDR and synergism with fibroblast growth factor-2 [J]. *Cell Signal*,2008,20(3):569-579.
- [9] Chen C,Jamaluddin MS,Yan S,et al. Human stanniocalcin-1 blocks TNF-alpha-induced monolayer permeability in human coronary artery endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2008,28(5):906-912.
- [10] 吴平平,黄培林,郭英,等. 消化道恶性肿瘤患者外周血人类类钙素基因表达的检测 [J]. *中华病理学杂志*,2004,33(5):467-468.
- [11] Ieta K,Tanaka F,Yokobori T,et al. Clinicopathological significance of stanniocalcin 2 gene expression in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*,2009,125(4):926-931.
- [12] Nakagawa T,Martinez SR,Goto Y,et al. Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes [J]. *Clin Cancer Res*,2007,13(14):4105-4110.
- [13] Yokobori T,Mimori K,Ishii H,et al. Clinical significance of stanniocalcin 2 as a prognostic marker in gastric cancer [J]. *Ann Surg Oncol*,2010,17(10):2601-2607.
- [14] Paciga M,James K,Gillespie JR,et al. Evidence for cross-

- talk between stanniocalcins[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005, 83(11):953-956.
- [15] Zlot C, Ingle G, Hongo J, et al. Stanniocalcin 1 is an autocrine modulator of endothelial angiogenic responses to hepatocyte growth factor [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(48):47654-47659.
- [16] Law AY, Wong CK. Stanniocalcin-2 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasiveness in hypoxic human ovarian cancer cells [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(20):3425-3434.
- [17] Volland S, Kugler W, Schweigerer L, et al. Stanniocalcin 2 promotes invasion and is associated with metastatic stages in neuroblastoma [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(9):2049-2057.
- [18] Lai KP, Law AY, Yeung HY, et al. Induction of stanniocalcin-1 expression in apoptotic human nasopharyngeal cancer cells by p53 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 356(4):968-975.
- [19] Johnstone RW. Histone deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1(4):287-299.
- [20] Law AY, Lai KP, Lui WC, et al. Histone deacetylase inhibitor induced cellular apoptosis involves stanniocalcin-1 activation experimental [J]. *Exp cell Res*, 2008, 314(16):2975-2984.
- [21] Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1 [J]. *Stem cells*, 2009, 27(2):670-681.
- [22] Tamura K, Furihata M, Chung SY, et al. Stanniocalcin 2 overexpression in castration resistant prostate cancer and aggressive prostate cancer [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(5):914-919.
- [23] Kanellis J, Bick R, Garcia G, et al. Stanniocalcin-1, an inhibitor of macrophage chemotaxis and chemokinesis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286(2):356-362.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-07-12)

· 综 述 ·

体外生产血小板的研究进展

陆 华 综述, 赵树铭 审校

(第三军医大学西南医院输血科, 重庆 400038)

关键词: 血小板生成; 造血干细胞; 细胞因子类; 细胞培养技术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.36.040

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)36-3727-04

血小板是骨髓巨核细胞系统分化的终末细胞, 在止、凝血中发挥着重要的作用。血小板减少或血小板功能障碍会引起不同程度的出血, 常常影响临床治疗效果, 甚至导致患者死亡。对血小板减少或血小板功能障碍的有效治疗措施是输注供者血小板, 目前还没有满意的血小板代用品。血小板的来源较其他血液细胞和成分相对困难, 且不易保存, 易主动活化, 导致临床上血小板长期以来供不应求。国内外不少学者在积极探索如何通过造血干细胞体外培养生产血小板, 以从根本上解决临床血小板供不应求的问题。现将这方面的研究综述如下。

1 造血干细胞的来源

传统的用于体外培养的造血干细胞包括骨髓造血干细胞、脐血造血干细胞、外周血造血干细胞等。近年来, 随着胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC)、诱导性多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 细胞) 的发现和逐步深入的研究, 已有利用这两种细胞作为种子细胞, 诱导分化生成造血细胞甚至产出血小板的文献报道^[1-5]。

利用骨髓造血干细胞、脐血造血干细胞、外周血造血干细胞诱导分化成巨核系细胞, 并产出血小板的文献报道比较多^[6-19]。在这 3 种来源的造血干细胞中, 近几年的研究成果认为脐血造血干细胞更具有优势^[9,11], 除了取材方便外, 脐血造血干细胞还具有部分 ESC 的特性, 较骨髓和外周血造血干细胞更为原始, 在体外扩增的效率更高, 诱导分化后获得的巨核祖细胞以及后续的各阶段巨核细胞较多^[20-23], 但脐血干细胞在培养过程中, 产生的巨核细胞成熟较骨髓和外周血干

细胞来源的巨核细胞更为困难, 主要表现为成熟巨核细胞染色体倍数不够, 导致单个细胞产生的血小板数相对较少^[20,22-23]。

2001 年 Kaufman 等^[24]报道人类 ESC (hESC) 与小鼠骨髓基质细胞 S17 或卵黄囊内皮细胞 C166 共培养 17 d, 不需任何生长因子, 可自发分化形成 CD34⁺ 造血前体细胞, 诱导效率为 1%~2%。此后, 几个研究小组成功在体外诱导人或鼠 ESC 产出血小板^[25-27]。2007 年 11 月日本的一个研究小组成功获得 iPS 细胞^[28], 2008 年该研究组成功地将 Oct3/4、Klf4、Sox2 和 c2Myc 基因植入人表皮成纤维细胞, 生成 iPS 细胞, 然后将 iPS 细胞分化成了血小板的前身巨核细胞, 并进一步分化成血小板^[27]。这两种细胞为体外生产血小板提供了新的种子细胞来源, 其最大的优势在于来源方便, 尤其是 iPS 细胞, 如不考虑 HLA 配型的问题, 几乎可以按需获得。虽然 ESC、iPS 细胞让造血细胞的体外扩增、诱导分化的种子细胞在数量上的问题得到了一定程度的解决, 却涉及到伦理方面的一些问题。而且, 在转化成造血干细胞的过程中还有不少调控环节尚未完全明了, 诱导率还需要进一步提升。另外, 这两种干细胞获得的血小板的生物学特性如何、能否满足临床需求也还没有完全阐明。

2009 年, Matsubara 等^[29]报道不需基因植入制成 iPS 细胞, 而是直接将人皮下脂肪组织中的成脂肪细胞在“MA”培养体系中培养为成熟脂肪细胞, 然后将这些成熟脂肪细胞在含有促血小板生成素 (TPO) 的液体培养体系中分化为巨核系细胞, 进而获取血小板。该方法的产量约为 10⁷ 个成脂肪细胞, 可产