

• 综 述 •

凝血酶蛋白酶激活受体-1 作为转移性黑色素瘤治疗潜在靶点的研究进展

周植星¹, 张 玥², 潘婷婷^{1,3}, 徐为人¹

1. 天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

2. 天津中医药大学 中医药研究院, 天津 300193

3. 天津医科大学 天津医科大学研究生院, 天津 210009

摘 要: 黑色素瘤由于转移性强, 成为皮肤癌中死亡率最高的恶性肿瘤之一, 目前没有有效的治疗方法。凝血酶蛋白酶激活受体-1 (PAR-1) 在黑色素瘤的发病过程中起到重要作用, PAR-1 通过激活肿瘤细胞黏附和侵袭以及新生血管因子生成促进黑色素瘤转移。PAR-1 有望成为治疗转移性黑色素瘤药物新靶点。

关键词: 凝血酶蛋白酶激活受体-1; 黑色素瘤; 靶点

中图分类号: R739.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)04-276-05

Advances in PAR-1 as potential therapeutic targets for metastatic melanoma treatment

ZHOU Zhi-xing¹, ZHANG Yue², PAN Ting-ting^{1,3}, XU Wei-ren¹

1. Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Graduate school of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Melanoma remains as the deadliest form of skin cancer with limited and inefficient treatment options available for patients with metastatic disease. The thrombin receptor, Protease Activated Receptor-1, has been considered to play an important role in the progression of human melanoma. PAR-1 is known to activate adhesive, invasive and angiogenic factors to promote melanoma metastasis. This review is about the advance in the research of PAR-1 as a potential target of metastatic melanoma.

Key words: Protease Activated Receptor-1; melanoma; Target

近年来黑色素瘤的发病趋势有所增加, 大约80%的黑色素瘤在早期临床阶段(区域转移之前)被诊断出, 局部黑色素瘤患者5年存活率大于95%。然而, 当黑色素瘤扩散至淋巴或者转移至其他器官后, 病人的存活率显著降低, 发生转移的黑色素瘤患者5年存活率降至15%^[1]。氨烯咪胺(DTIC)是FDA唯一批准的用于黑色素瘤转移治疗化学药物, 该药不仅响应率低, 大约只有5%的病人适用, 而且响应时间也不持久, 只有大约5个月时间^[2]。利用干扰素 α 对高风险II、III期的黑色素瘤进行辅助免疫治疗及应用高剂量的白介素IL-2对第IV期的黑色素瘤进行治疗, 响应率也低于15%。黑色素瘤

癌基因的鉴定, 抑癌基因及基因芯片信息研究从分子水平阐明了黑色素瘤的发病机制, 为黑色素瘤的临床治疗提供了新的思路。凝血酶蛋白酶激活受体-1 (PAR-1) 在黑色素瘤从非转移性到转移性的过程中起到了关键的作用, 有望成为治疗黑色素瘤的新靶点, 本文对此做一简单综述。

1 PAR-1 受体与黑色素瘤

PAR-1 在1991年由Vu等首次发现, 至今仍为最热门的、最具特点的蛋白酶活性抑制剂。PAR-1不仅在血液凝固、伤口愈合及炎症反应中起了重要的作用, 而且参与了许多癌症的发病进程, 包括乳腺癌、结肠癌、前列腺癌和黑色素瘤等^[3-4]。

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 国家重大新药创制专项(2011ZX09401-009); 天津市科技支撑计划重点项目(10ZCKFSH01300)

作者简介: 周植星, E-mail: zhouzx@yjipr.com

凝血酶受体属于7次跨膜G-蛋白偶联受体家族中的一员,具有独特的激活方式。与结合于其他类型的G蛋白受体这种典型的受体结合方式不同,PAR-1是通过丝氨酸蛋白酶裂解受体N端结构域而发生激活的。

虽然凝血酶是PAR-1最有效的强力激活剂,但是其他配体也可以激活PAR-1,如凝血因子Xa、胰蛋白酶、颗粒酶A和纤溶酶等。在乳腺癌细胞中,PAR-1同样可被基质金属蛋白酶(MMP-1)裂解和激活。凝血酶对PAR-1的激活发生于凝血酶的阴离子次要结合位点插入PAR-1氨基端第51到63个氨基酸的酸性区域,这个高度酸性的区域称为水蛭素样结合区域,与水蛭抗凝多肽(水蛭素)的氨基酸排列类似,该区域增加了凝血酶对PAR-1的亲合力。PAR-1同样包含了一个凝血酶切割位点,位于PAR-1序列的第41位精氨酸和第42位丝氨酸之间,凝血酶对PAR-1 N端的蛋白水解作用是不可逆的,它与第42位丝氨酸形成了新的氨基端作为配体端去激活受体,一旦被激活,PAR-1信号通过活性的G蛋白亚型,如Gaq、Gai、Gα12、13和Gβγ等,导致下游许多转导通路的激活,如磷酸肌醇3(PI-3)激酶、有丝分裂原激活蛋白(MAPK)激酶、Rho激酶等,PAR-1还可以通过增加细胞内的钙离子(Ca^{2+})激活蛋白激酶C(PKC)^[5]。PAR-1主要通过参与凝血酶作用的调节,在癌症和肿瘤的转移过程中通过持续激活细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)而发挥作用。蛋白酶激活受体同样可接受源于肿瘤和肿瘤微环境的信号(如MMP-1)而与蛋白酶发生响应。凝血酶对PAR-1的激活也会导致促血管生成和侵入性因子如IL-8、VEGF、PDGF2以及MMP-2的过度表达和分泌^[6-8]。

在多种癌症中都可以看到包括凝血因子激活在内的多种通路导致凝血酶的生成,从而导致PAR-1信号的产生。黑色素瘤与其他癌症一样,引发凝血级联的组织因子(TF)上调,从而导致凝固因子X的激活表达使凝血酶表达。此外,许多研究表明黑色素瘤细胞中,TF组成型的表达,可以通过独立的凝结核方式激活凝血酶,从而导致PAR-1受体活化,促进黑色素瘤的转移。不仅如此,凝血酶的激活还可以导致纤维蛋白原变成纤维蛋白,这些纤维蛋白沉淀至肿瘤微环境中,由纤维蛋白溶酶将其降解为纤维蛋白同时相当于储存了活性凝血酶^[9]。

Nierodzik等^[10]在一个关于鼠的黑色瘤肺转移模型中发现,当B16F10鼠黑色素瘤细胞转染PAR-1基因后,使得黑色素瘤肺转移增加40倍以上,这也就是说在凝血酶增强肺转移中PAR-1为限速因子。另一项研究表明,往B16F10细胞中加入特殊的凝血酶抑制剂后,细胞迁移被抑制,体内转移下降^[11]。

Tellez等^[12]研究发现,与人类非转移性细胞株相比,PAR-1在人类转移性黑色素瘤细胞株中过表达,通过免疫组化观察到,恶性黑色素瘤标本及转移灶中PAR-1表达水平明显高于良性色素痣和正常皮肤。人类黑色素瘤由径向生长阶段向垂直生长阶段的转变主要是与转录活化因子Protein-2a(AP-2a)的缺失有关。AP-2a的缺失伴随而来的就是PAR-1表达的增加。观察PAR-1启动子区域发现AP-2a与SP-1有多个结合位点,近3'端有两个重叠的SP-1和AP-2a转录因子的结合序列,这些转录因子调节PAR-1启动子的活性。通过基因芯片研究发现在低、非转移性黑色素瘤细胞株内AP-2a结合PAR-1启动子,而在转移性黑色素瘤细胞株SP-1结合PAR-1。另外,AP-2a和SP-1在重叠结合区域是以一种互相排斥的方式结合的。因此,在黑色素瘤中AP-2a水平低,致使SP-1易结合至PAR-1的启动子上,这就使PAR-1基因活化。在非转移性黑色素瘤细胞中AP-2a表达,PAR-1启动子与AP-2a转录因子结合,因而抑制PAR-1基因的表达^[13]。

2 PAR-1沉默对黑色素瘤的影响

Villares等^[14]利用基于慢病毒的shRNA稳定沉默了PAR-1高表达的人类转移性黑色素瘤细胞株A375SM和C8161中大于80%的PAR-1,并且将这些细胞sc(评估肿瘤生长)和iv(评估实验性肺转移生成)到小鼠体内,发现与对照组相比,PAR-1沉默黑色素瘤细胞株组肿瘤的生长显著减缓,PAR-1沉默细胞株组实验性肺转移生成被显著抑制。虽然体内实验表现出了显著的效果,但是将这种利用慢病毒传递系统将shRNA转入黑色素瘤细胞或者其他癌症细胞的技术作为一个治疗方式还是存在许多问题,包括将病毒整合至一个区域是否可行,有可能导致非目标基因的表达从而发展为疾病或者癌症。另外,穿梭系统将shRNA从细胞核移动至细胞质进行加工,在这个过程中基因沉默有可能会被淹没,如输出蛋白-5(expotin-5),参与shRNA和miRNA的穿梭,可能出现过载而导致重要的miRNA或者其他正常细胞功能所必须的其他

因子未被输出。不仅如此,要想使 shRNA 发挥作用,细胞中必须有 Dicer。Merritt 等^[15]发现卵巢癌标本中 Dicer 的表达是一个变量,同时,进一步发现当使用 shRNA 时,Dicer 低表达的细胞不能显著的沉默目标基因。若想有效的使用慢病毒 shRNA 进行基因沉默,Dicer 的持续表达是必要条件。

在临床上使用病毒作为运输工具有许多的不良反应,包括毒性、核输出机制抑制、病毒整合后的不必要和不可预测的遗传变异等。近些年来,许多的研究都已转向去研究不仅有效同时安全性也好的替代技术,将 siRNA 转运入肿瘤细胞,包括纳米脂质体技术。脂质体是一个脂质的囊泡,不仅可以包封 siRNA,同时也可以包封许多类型的药物或者小分子。当 siRNA 被装载进入脂质体后,脂质体可以保护 siRNA 不被退化,同时 siRNA 的半衰期和效力得到提高,把 siRNA 装载入 1, 2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸卵磷脂(DOPC)中性脂质体后,在体内有效的被用于对抗促红素人肝细胞 A2 (EphA2) 和局部黏着斑激酶(FAK),治疗卵巢癌以及大肠癌。这些研究表明,通过腹腔注射将低剂量的 siRNA-DOPC 注入体内可以有效的沉默目标基因。脂质体可以快速的到达连同靶组织在内的肝脏、脾脏、肾脏和网状内皮组织系统(RES)。将靶基因在体内沉默展现了这种传递系统的有效性,可在癌症及其他的疾病治疗中作为一个潜在的治疗方式^[16-17]。与使用基于慢病毒沉默的 PAR-1 的结果相类似,与 NT-siRNA-DOPC 处理的小鼠相比,使用 PAR-1 siRNA-DOPC 处理的荷瘤小鼠黑色素瘤的生长和实验性肺转移都显著性下降,对 PAR-1 siRNA-DOPC 和 NT siRNA-DOPC 治疗小鼠肿瘤的侵袭性及对血管生成因子(包括 MMP-2、IL-8 和 VEGF)进行免疫组化分析,发现 PAR-1 沉默治疗后这些血管生成及侵袭因素都有所下降,PAR-1 沉默组与 NT siRNA-DOPC 处理组相比血管数量减少,而 NT siRNA-DOPC 组血管大量扩张。对于肿瘤细胞来说,将 PAR-1 siRNA 封装入 DOPC 脂质体中不具有目标特异性,如果使用人类特异序列的 PAR-1 不能识别鼠类的 PAR-1,人类 PAR-1 不在鼠类的血小板中表达,对血小板的聚集不起作用,而且不会干扰凝血酶产生纤维蛋白(随后形成凝块),也不会干扰血小板激活的其他机制,如受损血管接触胶原蛋白。另外,在凝血酶浓度较高时血小板还可被 PAR-4 激活。因此,与其他抗血栓药物相比,PAR-1 的下降

对于血凝来说不会产生特别大的不良反应。尽管如此,寻找 PAR-1 新下游目标基因,这不仅可以增加对 PAR-1 影响黑色素瘤生长和转移机制的理解,同样也是 siRNA-DOPC 治疗的新靶标。

3 PAR-1 受体调节连接蛋白(Cx 43)和肿瘤抑制基因 Maspin

Villares 等^[18]通过 cDNA 的基因芯片研究确定 PAR-1 的下游靶基因 Cx-43 可能会促进黑色素瘤的转移。肿瘤细胞从原始病灶向其他位点转移的过渡状态需要衔接物,如肿瘤细胞迁移通过血管内皮细胞,肿瘤细胞和内皮细胞的连接是由 Cx-43 介导的,它对肿瘤细胞转移到其他位点是十分重要的。McLachlan 等^[19]研究表明在很多癌症中 Cx-43 表达增加,包括乳腺癌和神经胶质瘤,降低 Cx-43 的表达可以减少乳腺癌细胞对肺血管内皮细胞的粘连。研究表明当 PAR-1 沉默后,由于 SP-1 和 AP-1 与 Cx-43 启动子的结合位点减少,导致 Cx-43 的表达显著下降,转移性黑色素瘤细胞株与人类血管内皮细胞和人类真皮微血管内皮细胞的结合下降。在 PAR-1 沉默细胞株中重新表达 PAR-1 后发现连接的衔接物增加,稳定沉默黑色素瘤细胞株中的 Cx-43 后,发现黑色素瘤细胞与内皮细胞连接的衔接物减少,证实了衔接物的变化源于 Cx-43。这即表明 PAR-1 能够调节 Cx-43 的表达,又从一个侧面阐明了 PAR-1 与转移性黑色素瘤相关的机制^[20]。以上研究表明 Cx-43 对于内皮细胞和肿瘤细胞的连接是至关重要的,对肿瘤细胞的粘附和转移起到了很重要的作用。

Villares 等^[20]通过 cDNA 基因芯片研究发现,当 PAR-1 沉默后,与转入 NT shRNA 的黑色素瘤细胞相比,Maspin 增加了 45 倍。Maspin 是首次从人类乳腺上皮细胞分离的丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpins)家族的一员。抑制 serpins 结合蛋白酶与其功能域活性中心循环(RSL)结合。由于丝氨酸蛋白酶抑制剂引起 RSL 构象发生改变(变为松弛状态),从而使蛋白酶失活。Maspin 是第一个被定义为组织型纤溶酶原激活剂和尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)的抑制剂。近来,Denk 等^[21]提出,恶性黑色素瘤中,Maspin 的作用是抑制丝氨酸蛋白酶抑制剂而阻碍基质降解蛋白酶。许多恶性肿瘤中 Maspin 的表达下降或不表达,同时 Maspin 的表达造成了前列腺癌和乳腺癌的侵略性降低。乳腺癌细胞转染 Maspin 会导致肿瘤生长和体内转移的降

低^[24]。近来在黑色素瘤中发现 Maspin 是一种肿瘤抑制蛋白。Sheng 等^[22]研究发现与人体正常表皮黑色素细胞相比,转移的黑色素瘤细胞 Maspin 的表达水平降低,当黑色素瘤细胞中 Maspin 重新表达,它们的侵袭能力显著下降。

Villares 等^[20]研究发现在黑色素瘤中 PAR-1 调控 Maspin 肿瘤抑制基因, PAR-1 和 Maspin 的表达呈负相关,在高转移性黑色素瘤细胞株中 PAR-1 高表达而 Maspin 低表达,通过慢病毒 shRNA 沉默 PAR-1,致使已知调节 Maspin 的两个转录因子 c-Jun 和 Ets-1 结合增加而使 Maspin 表达增加,但是 PAR-1 沉默后 c-Jun 和 Ets-1 蛋白质表达不变,研究表明沉默 PAR-1 后抑制磷酸化 p-38 MARK (一个已知的 CBP/p300 的抑制剂)活性,从而导致 CBP/p300 HAT 活性增加,使 c-Jun 和 Ets-1 与 Maspin 启动子的结合增加,最终导致 Maspin 的表达增加。进一步研究发现 Maspin 的表达增加导致 MMP-2 表达及活性受到抑制从而使肿瘤侵袭性下降。在体内研究中,利用 Maspin 表达载体发现对黑色素瘤生长及实验性肺转移有显著降低作用,同时也减少了肿瘤部位的 MMP-2 和 VEGF 的表达。

4 临床意义

现今转移性黑色素瘤的治疗效率不高,唯一由 FDA 批准治疗的化药 DTIC 的响应率很低,且响应时间短,利用 INF α 或者 IL-2 进行辅助治疗的响应率也不高。所以认清黑色素瘤发展过程中涉及到的 PAR-1 和它的下游靶基因 Cx-43 和 Maspin 有利于寻找新的治疗方法和靶点。大量的研究表明 PAR-1 可能被用来作为人类黑色素瘤治疗的新靶标,不仅如此, PAR-1 调控很多对黑色素瘤生长和转移的必要基因,如 Cx-43 和 Maspin,它们也可以成为黑色素瘤治疗的新型靶点。然而,利用单靶点治疗黑色素瘤还没有成功的先例。近些年来对 PAR-1 的研究发现, PAR-1 靶向治疗与化疗、抗血管生成的药物治疗相结合,甚至与组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 抑制剂相结合可以增强抗肿瘤和抗转移的效果。

综上所述, PAR-1 在黑色素瘤进展中起到了重要的作用,以 PAR-1 或它的下游基因为靶向对转移性黑色素瘤的治疗很有帮助,对其他类型的癌症治疗也具有潜在的益处。

参考文献

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.

- [2] Hocker T L, Singh M K, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside [J]. *J Invest Dermatol*. 2008, 128(8): 2575-95.
- [3] Fujimoto D, Hirono Y, Goi T, et al. The activation of Proteinase-Activated Receptor-1 (PAR1) mediates gastric cancer cell proliferation and invasion [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10(8): 443.
- [4] Yang E, Boire A, Agarwal A, et al. Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating peptiducins inhibits Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(15): 6223-6231.
- [5] O'Brien P J, Molino M, Kahn M, et al. Protease activated receptors: theme and variations [J]. *Oncogene*, 2001, 20(13): 1570-1581.
- [6] Ruf W, Mueller B M. Thrombin generation and the pathogenesis of cancer [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2006, 32 (Suppl 1): 61-68.
- [7] Boire A, Covic L, Agarwal A, et al. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells [J]. *Cell*, 2005, 120(3): 303-313.
- [8] Arora P, Ricks T K, Trejo J. Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(6): 921-928.
- [9] Tellez C, Bar-Eli M. Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma [J]. *Oncogene*, 2003, 22(20): 3130-3137.
- [10] Nierodzik M L, Chen K, Takeshita K, et al. Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is required and rate limiting for thrombin-enhanced experimental pulmonary metastasis [J]. *Blood*, 1998, 92(10): 3694-3700.
- [11] Asanuma K, Wakabayashi H, Hayashi T, et al. Thrombin inhibitor, argatroban, prevents tumor cell migration and bone metastasis [J]. *Oncology*, 2004, 67(2): 166-173.
- [12] Tellez C, McCarty M, Ruiz M, et al. Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma [J]. *J Biol Chem*. 2003, 278(48): 46632-46642.
- [13] Tellez C S, Davis D W, Prieto V G, et al. Quantitative analysis of melanocytic tissue array reveals inverse correlation between activator protein-2alpha and protease activated receptor-1 expression during melanoma progression [J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(2): 387-393.

- [14] Villares G J, Zigler M, Wang H, *et al.* Targeting melanoma growth and metastasis with systemic delivery of liposome-incorporated protease-activated receptor-1 small interfering RNA [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(21): 9078-9086.
- [15] Merritt W M, Lin Y G, Han L Y, *et al.* Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer [J]. *N Engl Jmed*, 2008, 359(25): 2641-2650.
- [16] Sanguino A, Lopez-Berestein G, Sood A K. Strategies for *in vivo* siRNA delivery in cancer [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2008, 8(3): 248-255.
- [17] Shen Y. Advances in the development of siRNA-based therapeutics for cancer [J]. *Drugs*, 2008, 11(8): 572-578.
- [18] Villares G J, Dobroff A S, Wang H, *et al.* Overexpression of protease activated receptor-1 contributes to melanoma metastasis via regulation of connexin 43 [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(16): 6730-6737.
- [19] McLachlan E, Shao Q, Laird D W. Connexins and gapjunctions in mammary gland development and breast cancer progression [J]. *J Membr Biol*, 2007, 218(1-3): 107-121.
- [20] Villares G J, Zigler M, Dobroff A S, *et al.* Protease activated receptor-1 inhibits the Maspin tumor-suppressor gene to determine the melanoma metastatic phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108 (2): 626-631.
- [21] Denk A E, Bettstetter M, Wild P J, *et al.* Loss of maspin expression contributes to a more invasive potential in malignant melanoma [J]. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(2): 112-119.
- [22] Sheng S. The promise and challenge toward the clinical application of maspin in cancer [J]. *Front Biosci*, 2004, 9: 2733-2745.

中草药杂志社 4 种期刊为允许刊载处方药广告的医药专业媒体

根据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知，**中草药**杂志社编辑出版的《**中草药**》、Chinese Herbal Medicines (CHM, **中草药**英文版)、《现代药物与临床》、《药物评价研究》4 本期刊作为第一批医药专业媒体，允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821 传真: 23006821 联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com E-mail: zcy@tiprpress.com