

海参糖胺聚糖的抗肿瘤转移前景分析

钱文慧¹, 王颖钰¹, 王 生¹, 赵 扬¹, 王爱云^{1,2}, 陆 茵^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210029

2. 南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046

摘 要: 恶性肿瘤的侵袭和转移是导致临床肿瘤患者死亡的重要原因, 研究肿瘤转移并且寻找出安全有效的抗肿瘤药物一直是研究者关注的焦点。肝素被证实各种临床前和临床的恶性肿瘤模型中均有效, 但其引起较大的出血不良反应限制了其临床应用。与其生物活性十分相似的海参糖胺聚糖(hGAG)因不良反应小而成为了近年来研究的热点。查阅国内外大量的文献, 总结了 hGAG 与肝素理化性质的异同, 综述了二者抗肿瘤的药理作用, 并以肝素为参照, 分析了 hGAG 抗肿瘤转移的可能作用机制, 以期临床开发安全、有效的抗肿瘤药物提供依据。

关键词: 海参糖胺聚糖(hGAG); 肝素; 抗肿瘤; 肿瘤转移; 玉足海参

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)04-0814-05

Prospect of holothurian glycosaminoglycan in tumor metastasis treatment

QIAN Wen-hui¹, WANG Ying-yu¹, WANG Sheng¹, ZHAO Yang¹, WANG Ai-yun^{1,2}, LU Yin^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Key words: holothurian glycosaminoglycan (hGAG); heparin; antitumor; tumor metastasis; *Holothuria leucospilota* Brandt

恶性肿瘤是威胁人类健康的重要疾病之一, 其侵袭和转移的特性是导致临床肿瘤患者死亡的重要原因。因此, 研究肿瘤的转移并且寻找出安全、有效的抗肿瘤药物是全世界研究者关注的热点^[1-2]。肝素应用于临床长达 70 多年, 在抗炎和抗肿瘤方面具有良好的生物活性, 肝素单独或与其他药物联合使用, 被证实各种临床前和临床的恶性肿瘤模型中均有效^[3-6], 但是由于其具有较大的出血不良反应, 使其临床应用受到极大的限制。传统中医药由于其独特的抗肿瘤活性, 以及不良反应小而受到研究者的广泛关注。因此研究者更有兴趣从祖国传统中医药中寻找安全、有效的抗肿瘤药物。海洋天然产物是发现重要先导化合物的主要源泉和研发新药的基础^[7]。海参糖胺聚糖(holothurian glycosaminoglycan, hGAG)是从玉足海参体壁中提取的含岩藻糖分支结构的糖胺聚糖。体内外研究均证实, hGAG 具有

良好的抗凝血、抗血栓作用^[8-10]。hGAG 与肝素虽同属于糖胺聚糖家族, 并且生物学活性也极其相似, 但 hGAG 可作用于抗凝的多个环节, 因而引起出血的危险性较小。如果能将不良反应小的 hGAG 替代肝素用于临床肿瘤的治疗那将为肿瘤患者带来福音。目前国内外对 hGAG 的研究集中在抗凝血、抗血栓方面, 关于 hGAG 抗肿瘤的药理作用及其机制的研究较少。笔者查阅了国内外大量的文献, 总结了 hGAG 与肝素理化性质的异同, 综述了二者抗肿瘤的药理作用, 并以肝素为参照, 分析了 hGAG 抗肿瘤转移的可能作用机制, 以期临床开发安全、有效的抗肿瘤药物提供依据。

1 肝素与 hGAG 理化性质的比较与分析

肝素因最先从肝脏发现而得名, 发现于 1916 年, 又称普通肝素、标准肝素或未分级肝素^[11]。近年来, 各种相对分子质量低的肝素以及经化学和酶

收稿日期: 2010-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371727, 30772766); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2007239); 江苏省教育厅重大专项(09KJA360002); 江苏省六大人才高峰课题(06-B-023); 江苏省六大人才高峰课题 A 类第 5 批资助项目(08-A-012); 江苏省中医药局项目(LZ09022); 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室开放课题(P09013)

作者简介: 钱文慧(1986—), 女, 江苏省宜兴市人, 硕士研究生, 研究方向为活血化瘀中药及其复方对肿瘤转移的影响。

Tel: 13675137840 E-mail: woshiqwh@163.com

***通讯作者** 陆 茵 Tel: (025)86798154 E-mail: luyingreen@126.com

修饰的肝素已被研究开发,大大增加了肝素的应用范围。普通肝素是一种硫酸化的糖胺聚糖,由葡萄糖胺、*L*-艾杜糖醛酸、*N*-乙酰葡萄糖胺和 *D*-葡萄糖醛酸交替组成(图 1-A)。hGAG 由氨基半乳糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖和硫酸基构成(图 1-B)。关于肝素与 hGAG 的其他理化性质见表 1。

由表 1 可知,肝素与 hGAG 同属糖胺聚糖家族,虽然两者化学结构和相对分子质量不尽相同,但是二者的活性部位中均含有带负电荷的硫酸基,并且理化性质相似,这些可能是两者生物学活性相仿的

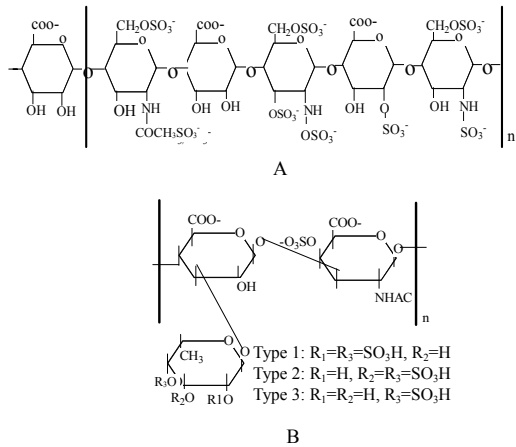


图 1 肝素 (A) 和 hGAG (B) 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of heparin (A) and hGAG (B)

表 1 肝素与 hGAG 的理化性质

Table 1 Physico-chemical properties of heparin and hGAG

理化性质	肝 素	hGAG
制备来源	从牛肺或猪小肠黏膜提取	从玉足海参体壁中提取
分类	分为未分级肝素、低分子肝素、肝素修饰物 ^[12]	分为糖胺聚糖、解聚糖胺聚糖
相对分子质量	5 000~30 000	10 000~150 000
基本结构	由交替存在的葡萄糖胺和糖醛酸 (<i>L</i> -艾杜糖醛酸和 <i>D</i> -葡萄糖醛酸) 二糖单位构成 ^[13]	由氨基半乳糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖和硫酸基构成 ^[14]
活性部位	与带负电荷的硫酸根阴离子相关 ^[13]	与含硫酸岩藻糖的分支结构相关 ^[15]
性状	白色或类白色粉末,无臭无味,有吸湿性,易溶于水,不溶于乙醇、丙酮等有机溶剂	白色或微黄色粉末,无臭无味,有吸湿性,易溶于水,不溶于乙醇或丙酮

主要原因。另一方面,与肝素相比,hGAG 来源于非哺乳动物——海参,因此其病原体污染的危险性降低,药物安全性可大大提高。

2 肝素与 hGAG 抗肿瘤作用的比较

肝素作为抗凝剂广泛应用于临床,已有 70 多年的历史。除了具有抗凝活性外,肝素还具有促进脂蛋白酯酶和肝酯酶的释放、抑制补体激活、抑制血管生成和肿瘤生长、抗病毒等活性^[16-18]。近年研究发现肝素在抗肿瘤转移方面发挥着重要作用。在临床前的实验研究中,肝素被证实对原发瘤的生长和肿瘤的转移均有抑制作用,并且疗效显著。在原发瘤模型的研究中,Back 等^[19]发现高剂量肝素能够抑制肉瘤 MSLS 的生长,抑制率达 44%; Ono 等^[20]的研究同样也发现肝素能够降低 Lewis 肺癌和黑色素瘤的原发瘤质量。在实验性转移模型的研究中,Irimura 等^[21]发现肝素可减少黑色素瘤细胞株的肺转移结节数;Drago 等^[22]发现肝素能够减少大鼠前列腺癌的肺转移。肝素在多种恶性肿瘤的动物模型中,都被确认有良好的药效,可以有效地抑制包括结肠癌、肺癌、前列腺癌、黑色素瘤、纤维肉瘤以及乳腺癌等多种恶性肿瘤的转移^[19-26]。在临床的肿瘤治疗中,肝素单独或与其他药物联合使用,可发挥良好的疗效。Klerk 等^[27]将 302 例肿瘤病人分成肝素组和安慰剂组给药,发现肝素组病人给予肝素 6 周后其生存期明显延长,死亡率也较安慰剂组明显下降;Hettiarachchi 等^[28]用低分子肝素治疗肿瘤病人,3 个月后低分子肝素组病人死亡率仅为 7%。由此可见,肝素用于临床肿瘤的治疗,可以降低肿瘤患者的死亡率,延长其生存期。

体内外研究证实,hGAG 具有多种药理学活性,包括抗凝血、抗血栓、抗肿瘤、免疫调节、促进纤维蛋白溶解、抑制肿瘤新生血管形成等作用^[29]。hGAG 的生物学活性与肝素十分相似。近年来,随着对肝素抗肿瘤研究的深入,hGAG 也引起了研究者的广泛关注,关于其抗肿瘤的研究也日渐增多。早在 1999 年,Collin^[30]就在鸡胚尿囊膜模型中发现 hGAG 具有明显抑制新生血管形成的活性,高浓度时有效抑制率可达到 63%。Zhang 等^[31]的研究同样证实 hGAG 在体内外均能够抑制血管生成,并且在体外能够抑制黑色素瘤细胞的迁移和侵袭,提示 hGAG 具有良好的抗肿瘤活性。高翔等^[32]发现 hGAG 可剂量依赖性抑制 B16 黑色素瘤的生长。袁长吉等^[33]也发现 hGAG (1 mg/mL) 能明显抑制卵

巢癌 SKOV-3 的细胞增殖。王强基等^[34]发现 hGAG 能明显增加小鼠免疫器官——脾脏的质量, 推测其可通过提高机体的免疫活性来发挥抗肿瘤作用。由此可见, hGAG 可通过抑制血管生成, 抑制肿瘤的增殖、迁移和侵袭, 提高机体的免疫等多种途径发挥抗肿瘤作用。

肝素与 hGAG 在国内外的研究中已被证实具有良好的抗肿瘤活性。目前, 肝素在临床上已被广泛地用于多种恶性肿瘤的治疗, 但其引起较大的出血不良反应限制了其临床应用。而 hGAG 在临床上仅被用于血栓疾病的预防和治疗, 关于其用于临床肿瘤治疗的报道较少。虽然实验研究表明 hGAG 与肝素一样具有多种抗肿瘤的生物学活性, 但是要将不良反应小、安全性高的 hGAG 代替肝素用于肿瘤的治疗还有待于进一步的研究。

3 以肝素为对照分析 hGAG 抗肿瘤的机制

肝素在临床前的实验研究以及临床的多种恶性肿瘤模型中, 均显示良好的效果, 关于其抗肿瘤的作用机制也比较明确, 主要包括: (1) 以组织因子 (TF) 为靶点。恶性肿瘤细胞表面高度表达 TF, TF 的表达与血小板的激活以及肿瘤-纤维蛋白团块的形成 (癌栓的形成) 密切相关。肝素能够促进 TF 旁路抑制剂 (TFPI) 的释放, 从而抑制 TF 引起的血小板的活化以及肿瘤细胞-纤维蛋白团块的形成, 达到抑制肿瘤转移的作用。(2) 以选择素为靶点^[35]。临床前的研究显示肿瘤细胞在循环血流中的存活以及在血管壁上的成功黏附与血小板密切相关。肿瘤细胞-血小板复合物能够抵抗肿瘤细胞被机体免疫系统的杀伤。这个过程中肿瘤细胞表面的糖蛋白与血小板表面的选择素之间的初始黏附起着重要作用。而肝素因自身特殊的多糖结构, 使其能够模拟血小板表面 P-选择素的配体, 从而抑制血小板-肿瘤细胞之间的黏附, 达到抗肿瘤转移的目的。(3) 以肝素酶为靶点。肝素酶是一种能够降解细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的核苷酶, 其能释放硫酸乙酰肝素依赖的生长因子 (如 VEGF、bFGF 等), 并能产生大量有活性的硫酸乙酰肝素片段, 破坏、降解细胞外基底膜屏障, 促进肿瘤细胞扩散和转移, 并加快血管生成。肝素通过抑制肿瘤细胞表面高表达的肝素酶的活性来达到抑制肿瘤侵袭和转移的作用。(4) 以硫酸乙酰肝素蛋白聚糖为靶点。肝素能够与硫酸乙酰肝素片段在硫酸乙酰肝素蛋白聚糖上竞争性地与生长因子结合, 从而抑制生长因子的释

放, 抑制肿瘤的血管生成^[12]。

hGAG 抗肿瘤的研究起步较晚, 大量研究集中在其抗血栓的作用上, 作用机制包括: (1) 通过抑制肝素辅因子 II (HC II) 介导的抗凝作用, 直接抗凝血酶 III (AT III)、抑制凝血酶裂解因子 VIII 轻链等多环节来发挥抗凝作用^[36-37], 与单一抗凝机制的肝素相比, 其抗凝疗效好, 引起的出血不良反应小。(2) 通过抑制整合素的表达来抑制纤维蛋白间的聚合, 从而抑制纤维蛋白凝块的形成^[38]。(3) 促进 TFPI 的释放, 从而阻滞凝血级联的激活^[5]。(4) 抑制血小板的正常生理活性和功能, 以及血小板选择素的表达, 血小板的凝集过程中不引起血小板的活化和代谢。(5) 抑制血管平滑肌细胞的增殖, 促进内皮细胞的血管再生^[39]。

从以上分析可以发现, hGAG 抗血栓机制与肝素抗肿瘤机制相似, 二者均能促进 TFPI 的释放从而阻滞与肿瘤相关的凝血级联的激活; 均能抑制与血小板、纤维蛋白黏附、聚集相关的癌栓的形成。因此, 有理由推测肝素的类似物 hGAG 也是通过与肝素相类似的靶点来发挥抗肿瘤活性的。

4 hGAG 抗肿瘤转移前景展望

肝素已被用于临床肿瘤疾病的治疗, 但其引起的小血小板减少、出血倾向增多等不良反应大大限制了其在临床中的应用。如何从祖国传统医药中寻找出疗效好、不良反应小的抗肿瘤中药一直是研究者关注的焦点。hGAG 是由氨基半乳糖、葡萄糖醛酸、岩藻糖和硫酸基构成的酸性黏多糖, 其与肝素均属糖胺聚糖家族成员, 并且生物学活性也十分相似。肝素抗肿瘤的作用机制已比较清晰, 包括抑制 TF 的表达、抑制选择素的表达、抑制肝素酶的活性等, 通过比较分析, 不难发现 hGAG 抗血栓的作用机制与肝素抗肿瘤的作用机制存在着交叉。hGAG 与肝素均可以抑制 TF 的表达, 从而抑制与肿瘤相关的凝血级联的激活; 二者都可以通过抑制选择素的表达来抑制纤维蛋白团块、血小板等的聚集, 它们在抑制肿瘤转移的过程中发挥着重要的作用, 肝素正是通过以上的机制来抑制肿瘤的转移和癌栓的形成。因此, 有理由推测 hGAG 也存在着良好的抗肿瘤转移活性。目前本实验室的相关研究已经证实了 hGAG 体外具有良好地抑制血管生成、抑制肿瘤细胞的增殖、迁移等药理活性, 并且与肝素相比, 可大大降低出血的不良反应, 机体的免疫功能大大提高。由此可见, hGAG 是一个比较理想而又具有应用前景

的抗肿瘤药。目前,国内外关于hGAG抗肿瘤的机制和靶点并未阐明,如果能以肝素的作用靶点为参照,来逐一研究并阐明hGAG抗肿瘤的分子机制和靶标,将为研究出安全有效的抗肿瘤转移新药提供依据,同时也将为临床广大肿瘤患者带来福音。

参考文献

- [1] 李森,雷宇,林霖,等. 中药逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 228-232.
- [2] 习利平,宋新波,张丽娟. 长春碱类抗肿瘤药的研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 59-62.
- [3] Zacharski L R, Ornstein D L. Heparin and cancer [J]. *Thromb Haemost*, 1998, 80: 10-23.
- [4] Hejna M, Raderer M, Zielinski C C. Inhibition of metastases by anticoagulants [J]. *J Nat Cancer Inst*, 1999, 91(1): 22-36.
- [5] Nitti D, Wils J, Sahmoud T, et al. Final results of a phase III clinical trial on adjuvant intraportal infusion with heparin and 5-fluorouracil (5-FU) in resectable colon cancer [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(8): 1209-1215.
- [6] Smorenburg S M, Hettiarachchi R J K, Vink R, et al. Clinical experience of nadroparin in patients with cancer [J]. *Thromb Haemost*, 1999, 82: 1600-1604.
- [7] 史清文,李力更,霍长虹,等. 海洋天然产物研究概述[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1031-1047.
- [8] Shen W Z, Zhou R F, Wang X F, et al. Antithrombotic mechanisms of holothurian glycosaminoglycan extracted from sea cucumber [J]. *Chin J Hematol*, 2006, 27(9): 579-583.
- [9] 王学锋,李志广. 海参糖胺聚糖抗血栓形成机制的研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2002, 21(12): 718-721.
- [10] Mourao P A, Gitunaraes B, Mulloy B, et al. Antithrombotic activity of a fucosylated chondroitin sulphate from echinoderm: sulphated fucose branches on the polysaccharide account for its antithrombotic action [J]. *Br J Haematol*, 1998, 101(4): 647-652.
- [11] 黄寿吾,王鸿利. 肝素临床应用[M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 1999.
- [12] Niersab T M H, Klerkac C P W, DiNisioc M, et al. Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models [J]. *Critical Rev Oncol Hematol*, 2007, 61: 195-207.
- [13] Folkman J, Langer R, Linhardt R J, et al. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone [J]. *Science*, 1983, 19(221): 719-725.
- [14] Vieira R P, Mourao P A. Occurrence of a unique fucose-branched chondroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(34): 18176-18183.
- [15] Mourao P A, Pereira M S, Pavao M S, et al. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(39): 23973-23984.
- [16] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, et al. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. [J]. *J Nat Med*, 1999, 5(7): 793-802.
- [17] Miao H Q, Elkin M, Aingorn E, et al. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides [J]. *Int J Cancer*, 1999, 83: 424-431.
- [18] Parish C R, Freeman C, Brown K J, et al. Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel *in vitro* assays for angiogenesis and heparanase activity [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 3433-3441.
- [19] Back N, Steger R. Effect of aprotinin, EACA and heparin on growth and vasoactive system of Murphy-Sturm lymphosarcoma [J]. *Eur J Pharmacol*, 1976, 38: 313-319.
- [20] Ono K, Ishihara M, Ishikawa K, et al. Periodate-treated, nonanticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86: 1803-1812.
- [21] Irimura T, Nakajima M, Nicolson G L. Chemically modified heparins as inhibitors of heparan sulfate specific endo-beta-glucuronidase (heparanase) of metastatic melanoma cells [J]. *Biochemistry*, 1986, 25: 5322-5328.
- [22] Drago J R, Lombard J S. Metastasis in the androgen-insensitive Nb rat prostatic carcinoma system [J]. *J Surg Oncol*, 1985, 28: 252-256.
- [23] Lee A E, Rogers L A, Longcroft J M, et al. Reduction of metastasis in a murine mammary tumour model by heparin and polyinosinicpolycytidylic acid [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1990, 8: 165-171.
- [24] Mook O R, Van Marle J, Vreeling-Sindelarova H, et al. Visualization of early events in tumor formation of eGFP-transfected rat colon cancer cells in liver [J]. *Hepatology*, 2003, 38(2): 295-304.
- [25] Halangk W, Schulz H U. Low-molecular-weight heparin (reviparin) diminishes tumor cell adhesion and invasion *in vitro*, and decreases intraperitoneal growth of colonadeno-carcinoma cells in rats after laparoscopy [J].

- Thromb Res*, 2003, 110: 215-220.
- [26] Poggi A, Rossi C, Casella N, *et al*. Inhibition of B16-BL6 melanoma lung colonies by semisynthetic sulfamino-heparosan sulfates from *E. coli* K5 polysaccharide [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2002, 28(4): 383-392.
- [27] Klerk C P W, Smorenburg S M, Otten H M, *et al*. The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(10): 2130-2135.
- [28] Hettiarachchi R J, Smorenburg S M, Ginsberg J, *et al*. Do heparins do more than just treat thrombosis? The influence of heparins on cancer spread [J]. *Thromb Haemost*, 1999, 82(2): 947-952.
- [29] Kelly M S. Echinoderms: their culture and bioactive compounds [J]. *Prog Molec Subcell Biol*, 2005, 39: 139-165.
- [30] Collin P D. Inhibition of angiogenesis by sea cucumber fractions containing sulfated polysaccharides [P]. US: 5985330A, 1999-11-16.
- [31] Zhang W W, Lu Y. Acidic mucopolysaccharide from holothuria leucospilota has antitumor effect by inhibiting angiogenesis and tumor cell invasion *in vivo* and *in vitro* [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(15): 1489-1499.
- [32] 高翔, 王悦怡. 海参糖胺聚糖的提取及抗肿瘤活性的研究 [J]. *食品工业科技*, 2008, 6(29): 117-124.
- [33] 袁长吉, 葛媛媛. 海参糖胺聚糖对卵巢癌细胞增殖及凋亡的影响 [D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [34] 王强基, 李春艳. 玉足海参黏多糖对小鼠免疫功能的影响 [J]. *海洋药物*, 1984(1): 12-15.
- [35] Borsig L, Wong R, Feramisco J, *et al*. Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis [J]. *PNAS*, 2001, 98(6): 3352-3357.
- [36] Nagase H, Enjyoji K I, Minamiguchi K, *et al*. Depolymerized holothurian glycosaminoglycan with novel anticoagulant actions: antithrombin III and heparin cofactor II-independent inhibition of factor X activation by factor IXa-factor VIIIa complex and heparin cofactor II-dependent inhibition of thrombin [J]. *Blood*, 1995, 85(6): 1527-1534.
- [37] Nagase H, Enjyoji K I, Shima M, *et al*. Effect of depolymerized holothurian glycosaminoglycan (DHG) on the activation of factor VIII and factor V by thrombin [J]. *J Bio Chem*, 1996, 119(1): 63-69.
- [38] Li Z G, Wang H L, Li J Z. Basic and clinical study on the antithrombotic mechanism of glycosaminoglycan extracted from sea cucumber [J]. *Chin Med J*, 2000, 113(8): 706-711.
- [39] Tapon-Brethaudiere J, Drouet B, Matou S, *et al*. Modulation of vascular human endothelial and rat smooth muscle cell growth by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm [J]. *Thromb Haemost*, 2000, 84(2): 332-337.