·综述·

Angiomotin在乳腺癌中的研究进展

于治灏 李越 王欣

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。全球每年约120万名妇女罹患乳腺癌,其中约50万人死于该病。在发达国家及中国的一些大型工业化城市,乳腺癌的发病率已位居女性常见恶性肿瘤之首,严重危害广大妇女的健康。19世纪以来,学者们试图寻找抗肿瘤治疗的新途径和新方法。1971年Folkman等[1-2]首次提出肿瘤血管生成依赖学说,提出血管生成不仅在肿瘤的生长过程中是必需的,而且在肿瘤的侵袭和转移阶段也发挥作用。这一观点已被大量的研究结果所证实。

乳腺癌治疗失败的主要原因是肿瘤的浸润和转移。肿瘤的转移是一个复杂的过程,包括肿瘤细胞的脱落、向间质的微转移、渗入血管和淋巴管以及向远处侵入和生长。肿瘤细胞遗传学的不稳定性给直接针对肿瘤细胞的治疗带来困难,而Folkman等的血管依赖学说使得某些血管生成抑制因子和以遗传学相对稳定的血管内皮细胞为靶向的抗血管生成治疗成为肿瘤治疗领域的一线曙光。与传统的以肿瘤细胞为靶点的治疗方法相比,抗血管生成疗法具有低毒、广谱、特异性高及不易产生抗药性的优点。近年来已有多种血管抑素制剂进入Ⅰ、Ⅱ期临床试验,取得了良好效果[3-5],且未显示出剂量限制性毒性[6]。然而,抗血管生成的血管生成抑制素(Angiostatin)作为治疗药物存在半衰期短(仅3个小时)、用药剂量高、用药水平难以控制、提纯蛋白的花费较为昂贵、不易运输和贮存等缺点,这为Angiostatin的广泛应用带来了困难[7]。

Angiomotin(Amot)是一种血管生成抑制素结合蛋白,在调节内皮细胞迁移和管状结构形成以及细胞极性和趋化等的过程中发挥重要作用,并且克服了上述Angiostatin的缺点,为抗血管生成的治疗提供全新的方向。笔者就Amot的研究进展及其在肿瘤治疗方面的前景作一综述。

1 Amot家族的结构和特点

2001年,Troyanovsky等[8]利用酵母双杂交技术在人类胎盘cDNA文库中筛查血管生成抑制素结合蛋白时发现了一种新蛋白——Angiomotin。它是一种膜相关蛋白,与血管生成抑制素结合,有介导其抑制内皮细胞迁移和管状结构形成的作用。由于其在调节细胞移动中的作用而得名为“移动素(motins)”。随后

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院乳腺一科 国家教育部乳腺癌防治重点实验室
通信作者:王欣,E-mail:xinwangse@126.com

的研究又发现了与 Amot 结构相似的两种新蛋白——Angiomotin 样蛋白 1(AmotL1 即 JEAP)[9] 和 Angiomotin 样蛋白 2(AmotL2 即 MASCOT)[10],与 Angiomotin 共同构成 Amot 家族。Amot 家族拥有可变的剪接位点,可形成不同亚型的蛋白质[11-12]。现已知道 Amot、AmotL1、AmotL2 都有不同功能的一长一短两种亚型。Amot 家族中所有的蛋白质都含有一个保守的卷曲螺旋结构和 C-端的 PDZ 结合域,长的亚型还拥有一个富含谷氨酸的结构域,但功能尚未知[11,13]。

1.1 Amot

Amot 由 675 个氨基酸残基组成,多定位于内皮细胞膜,主要表达在肌间以及大脑毛细血管的内皮细胞中,在主动脉及主要的血管中未发现 mRNA 和蛋白质的表达。研究证明,Amot 在人和鼠的肿瘤细胞中都出现上调,在小鼠视网膜的生理性血管生成中也有所表达,但在正常组织的血管中并未发现这个现象[8,13-14],说明 Amot 主要在血管新生的组织中表达。

Amot 的 PDZ(postsynaptic density 95, PSD-95; discs large, Dlg; zonula occludens-1, ZO-1)结合域是蛋白的结合位点,去除这个位点的 3 个氨基酸可引起趋化抑制以及迁移和管状结构形成的障碍。该位点突变的 Amot 不能使内皮细胞迁移,在体外的血管生成实验中不能形成血管,并且该位点基因突变的小鼠在胚胎 9.5 d 死亡,提示 PDZ 结合域是 Amot 发挥作用的关键部位[15-16]。另外,Wells 等[17]发现,Amot 的卷曲螺旋结构与鸟苷三磷酸酶激活蛋白 Rich1(GTPase activating protein Rich1, GAP Rich1)结合,PDZ 结合域 Pals1、Patj 及蛋白酶激活受体-3(proteinase-activated receptor-3, Par-3)与 Rich1 组成蛋白复合物,定位于细胞紧密连接,调控 Cdc42 GTPase(Rho 家族鸟苷三磷酸酶成员,一种通过细胞骨架重排移行的重要调节因子)的活性,来保持细胞紧密连接的完整性并影响细胞的极性。

1.2 p-80 Amot 和 p-130 Amot

Amot 有两个拓扑异构体:p-80 Amot 和 p-130 Amot。在血管生成不同阶段分别发挥不同的作用[11-12]。体外实验表明,p-80 Amot 可以增强细胞的迁移(定位于板状伪足前端),并稳定管状结构,而 p-130Amot 则与肌动蛋白相关并影响细胞的塑形[13]。Ernkvist 等[18]分析了两种 Amot 异构体在小鼠胚胎视网膜血管生成过程中的表达,显示 p-80 Amot 主要在细胞迁移阶段表达,而 p-130Amot则主要在管状结构稳定和成熟阶段表达,进一步证实了二者相互作用,共同调节血管生成。

2 Amot 作为抗血管生成靶点的作用机制

2.1 Amot 对细胞迁移的影响

免疫荧光显示,Amot 位于迁移细胞的板状伪足及肌动蛋白重组的区域,

而且表达 Amot 的细胞迁移明显快于对照组[8]。这证明 Amot 直接影响细胞的移动。

Aase 等[19]发现,敲除 Amot 的斑马鱼,毛细血管从背主动脉或后主静脉的芽生并未受到影响,但却无法成功的进行血管迁移和形成有功能的背侧纵向吻合血管,表现出了明显的结间血管的迁移缺陷。Huang 等[20]的研究也显示斑马鱼的 AmotL2 是一个 FGF 反应基因,对于脊椎动物胚胎的细胞运动有重要作用。除此之外,p80 Amot 可以促进迁移,其与血管抑素相反的作用也得到了广泛的研究证实[8,11,13,16]。这些都证明了 Amot 在细胞移动中的促进作用。

2.2 Amot 对管状结构的形成及稳定的影响

Levchenko 等[21]证明:Amot 可以稳定管状结构;在血管内皮细胞中表达外源性人 Amot 能够将建成的管状结构维持 30 d,而对照组在 72 h 后即退化。作者还给免疫缺陷病鼠(SCID 鼠)皮下注射 Amot 转染的小鼠主动脉内皮细胞(MAE 细胞),肿瘤迅速生长并向周围肌肉组织侵袭。而同样用功能基因突变的 Amot 转染细胞注射后,则在肿瘤周围形成纤维囊性包裹,使肿瘤维持原状,证明 Amot 可以支持血管再生。

2.3 Amot 对趋化及极性的影响

研究证实,敲掉 Amot 的斑马鱼表现出血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)激酶活性的缺失,同样无 Amot 基因表达的胚胎干细胞虽然在血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor ,VEGF)刺激下完全可以分化和增殖,但是这些细胞缺乏对 VEGF 的化学趋向性[22]。

Aase 等[19]对胚胎干细胞衍生的内皮细胞以及 siRNA 介导敲除 Amot 的牛毛细血管内皮细胞进行分析后得出,Amot 缺失的细胞对 VEGF 或碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)刺激的趋化作用失去反应。这个现象可能证明了 Amot 在生长因子诱导的信号翻译至细胞运动的过程中不可或缺。高效的趋化来源于敏感的趋化梯度、细胞极性和细胞运动的协同,这更加证明了极性蛋白质如蛋白酶激活受体-6(proteinase-activated receptor-6,Par-6)、蛋白激酶 C(PKC)和 Patj 不仅参与底-外侧极性的建立,而且对迁移过程中的前-后极性也很重要[23]。时间推移分析显示野生型的细胞极化有一个前缘,但 Amot 缺陷的细胞存在高尔基复合体的极化缺失,展现出突出的非极化行为。

近来,Wells 等[17]证明:Amot 还可作为极性蛋白(如 GAP Rich-1 等)的支架,并且 GAP Rich-1 也在内皮细胞中表达,位于迁移细胞的前缘;在 Amot 缺失的内皮细胞中,Rich-1 不能定位于板状伪足,从而影响细胞的迁移及极

性。另外,Amot 还影响丝状伪足的数量、细胞形态维持、细胞骨架重排等。这些作用相互联系,共同影响于血管的生成。正是以上原因,使得 75% 的敲除 Amot 基因小鼠在胚胎发育的第 11.0～11.5 天死亡。死亡胚胎显示肌节间区域有严重的血管缺陷并伴有脑部的血管舒张[19]。在斑马鱼胚胎发育过程中下调 Amot 的表达,则出现内皮细胞的丝状伪足数目减少和节间管道移动严重受损的现象。

3 Amot 与乳腺癌的关系及潜在的靶向治疗价值

血管生成在乳腺癌的发生与转移中起到重要的作用。有关人类乳腺癌的研究发现,与正常乳腺组织相比,乳腺癌组织的 Amot 转录水平明显增高,且在侵袭性肿瘤中,Amot 的表达比非侵袭性肿瘤要高,发生转移的乳腺癌患者远高于未转移患者,而且 Amot 的水平与血管生成标志物水平相关[24]。这些均证明 Amot 与血管生成和乳腺癌的侵袭特性相关。多变量分析显示,Amot 转录是肿瘤转移的独立预后因子,而且高水平的 Amot 转录与生存率的降低有关,提示其可能作为肿瘤治疗的一个新的靶点[24]。目前针对 Amot 的抗体和疫苗正在研制阶段。

还有研究证明, AmotL1 是细胞紧密连接的相关分子,并在紧密连接处高度聚集[9],而细胞紧密连接有着强大的细胞黏附能力并在肿瘤抑制上有很大潜力[25]。有证据证明细胞紧密连接分子(如 ZO-1、ZO-2、occludin)缺乏更易发生肿瘤,并与肿瘤的侵袭相关[26],提示 AmotL1 存在着与 Amot 不同的潜在抗肿瘤能力。

Holmgren 等[14]用小鼠制作 Amot 疫苗模型来研究其在抑制血管生成和肿瘤生长中的作用。作者将 DNA 疫苗注入小鼠体内后发现,80% 的小鼠出现肿瘤形成受阻长达 70 周以上,且并未出现交叉免疫而使其他组织的功能受影响。初步的实验数据显示,利用 Amot 为靶向的 DNA 疫苗在体内有效抑制血管生成和肿瘤生长长达 150 d。另外,在 HER-2/*neu* 转基因小鼠中,联合 p80 Amot 和 HER-2/*neu* 的 DNA 疫苗可以削弱肿瘤血管生成,抑制乳腺癌进展[14]。

Amot 抗体的作用类似于血管生成抑制素。其在内皮细胞表面与 Amot 结合,能抑制 FGF-2 和 VEGF 诱导的内皮迁移,明显减少内皮细胞伪足的数目,在体内能抑制视网膜新生血管的内皮细胞迁移,并抑制与肿瘤相关的病态血管生成[27]。另外,在血管基底膜类似物栓子实验(Matrigel plug assay)中,研究者发现加入 Amot 抗体的血管基底膜类似物与对照组相比几乎没有血管生成[27]。这些发现都说明以 Amot 为靶点抑制病理性血管生成的重要意义。

Amot作为治疗作用的抗体在应用方面显示出几种重要的优势,包括剂量降低、特异性结合增加、半衰期延长等。相对于血管生成抑素,实验室生产的治疗性抗体被认为有更好的半衰期,因此更适用于长效的治疗,有更为重要的临床价值。

4 结语

Amot是一个血管形成的正调节因子,在生理性和病理性的血管生成中都扮演着重要的角色。它通过对细胞运动、管状结构的形成及稳定、趋化及极性、丝状伪足的数量、细胞形态维持、细胞骨架重排等的影响来促进血管生成。针对Amot的疫苗及抗体是抗肿瘤及治疗血管依赖性疾病的新思路,并取得了良好的试验效果。但其应用于人体的治疗尚未成熟,且长期效果及不良反应未知。另外,随着对淋巴管生成研究的增多,学者们发现许多血管生成相关因子也参与淋巴管的生成。那么,Amot是否也存在于淋巴管内皮细胞中,针对Amot的抗血管生成是否也能阻止淋巴管生成将成为一个值得研究的方向。相信随着研究的不断深入,Amot家族在肿瘤治疗方面将会发挥更大的作用。

【关键词】 血管生成抑制素结合蛋白;血管生成抑制素;血管生成;肿瘤

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

参考文献

[1] Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. Semin Cancer Biol, 2003,13:159-167.

[2] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med, 1971,285:1182-1186.

[3] Galaup A, Opolon P, Bouquet C, et al. Combined effects of docetaxel and angiostatin gene therapy in prostate tumor model. Mol Ther, 2003,7:731-740.

[4] Ponnazhagan S, Mahendra G, Kumar S, et al. Adeno-associated virus 2-mediated antiangiogenic cancer gene therapy: long-term efficacy of a vector encoding angiostatin and endostatin over vectors encoding a single factor. Cancer Res, 2004,64:1781-1787.

[5] Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. Cancer Metastasis Rev, 2000,19:97-107.

[6] Tandle A, Blazer DG 3rd, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. J Transl Med, 2004,2:22.

[7] Beerepoot LV, Witteveen EO, Groenewegen G, et al. Recom-binant human angiostatin by twice-daily subcutaneous injection in advanced cancer: a pharmacokinetic and long-term safety study. Clin Cancer Res, 2003,9:4025-4033.

[8] Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, et al. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. J Cell Biol, 2001,152:1247-1254.

[9] Nishimura M, Kakizaki M, Ono Y, et al. JEAP, a novel component of tight junctions in exocrine cells. J Biol Chem, 2002,277:5583-5587.

[10] Patrie KM. Identification and characterization of a novel tight junction-associated family of proteins that interacts with a WW domain of MAGI-1. Biochim Biophys Acta, 2005,1745:131-144.

[11] Ernkvist M, Aase K, Ukomadu C, et al. p130-angiomotin associates to actin and controls endothelial cell shape. Febs J, 2006,273:2000-2011.

[12] Moreau J, Lord M, Boucher M, et al. Protein diversity is generated within the motin family of proteins by alternative pre-

mRNA splicing. Gene, 2005,350:137-148.

[13] Bratt A, Birot O, Sinha I, et al. Angiomotin regulates endothelial cell-cell junctions and cell motility. J Biol Chem, 2005, 280:34 859-34 869.

[14] Holmgren L, Ambrosino E, Birot O, et al. A DNA vaccine targeting angiomotin inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA, 2006,103:9208-9213.

[15] Bratt A, Wilson WJ, Troyanovsky B, et al. Angiomotin belongs to a novel protein family with conserved coiled-coil and PDZ binding domains. Gene, 2002,298:69-77.

[16] Levchenko T, Aase K, Troyanovsky B, et al. Loss of responsiveness to chemotactic factors by deletion of the C-terminal protein interaction site of angiomotin. J Cell Sci, 2003,116:3803-3810.

[17] Wells CD, Fawcett JP, Traweger A, et al. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. Cell, 2006,125:535-548.

[18] Ernkvist M, Birot O, Sinha I, et al. Differential roles of p80- and p130-angiomotin in the switch between migration and stabilization of endothelial cells. Biochim Biophys Acta, 2008,1783:429-437.

[19] Aase K, Ernkvist M, Ebarasi L, et al. Angiomotin regulates endothelial cell migration during embryonic angiogenesis. Genes Dev, 2007,21:2055-2068.

[20] Huang H, Lu FI, Jia S, et al. Amotl2 is essential for cell movements in zebrafish embryo and regulates c-Src translocation. Development, 2007,134:979-988.

[21] Levchenko T, Bratt A, Arbiser JL, et al. Angiomotin expression promotes hemangioendothelioma invasion. Oncogene, 2004,23:1469-1473.

[22] Covassin LD, Villefranc JA, Kacergis MC, et al. Distinct genetic interactions between multiple Vegf receptors are required for development of different blood vessel types in zebrafish. Proc Natl Acad Sci USA, 2006,103:6554-6559.

[23] Shin K, Wang Q, Margolis B. PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. EMBO Rep, 2007,8: 158-164.

[24] Jiang WG, Watkins G, Douglas Jones A, et al. Angiomotin and angiomotin like proteins, their expression and correlation with angiogenesis and clinical outcome in human breast cancer. BMC Cancer, 2006,6:16.

[25] Tobioka H, Sawada N, Zhong Y, et al. Enhanced paracellular barrier function of rat mesothelial cells partially protects against cancer cell penetration. Br J Cancer,1996,74:439-445.

[26] Satoh H, Zhong Y, Isomura H, et al. Localization of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. Exp Cell Res, 1996,222:269-274.

[27] Levchenko T, Veitonmaki N, Lundkvist A, et al. Therapeutic antibodies targeting angiomotin inhibit angiogenesis *in vivo*. Faseb J, 2008,22:880-889.

(收稿日期:2009-02-06)

(本文编辑:明佳)

于治灏,李越,王欣. Angiomotin 在乳腺癌中的研究进展[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2010,4(4):447-452.