

文章编号: 1004-0374(2012)01-0025-07

## 人源性激肽释放酶结合蛋白与内皮细胞功能

邢永梅, 刁 勇\*

(华侨大学分子药理学研究所, 泉州 362021)

**摘要:** 人源性激肽释放酶结合蛋白 (Kallistatin, Kal) 是一种负性急性期内源性蛋白, 与多种内皮相关性生理和病理过程密切相关, 如血管生成及损伤修复、炎症、心功能不全、肾损伤、糖尿病等。炎症和氧化应激可引起内皮功能障碍, 而 Kal 可抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  引起的内皮细胞活化, 通过 KLF4-eNOS、PI3K-AKT-eNOS 和 AKT-FOXO1 等信号通路, 增加内皮细胞 NO 合酶的表达和 NO 生成, 抑制内皮细胞损伤和凋亡。动物实验显示, Kal 表达增加可减弱氧化应激诱导的细胞凋亡和器官损伤。基于内皮细胞所处的状态或来源, 如健康或损伤情况, 成熟内皮细胞或内皮祖细胞, Kal 的作用可能有所区别。内皮细胞是参与肿瘤生长与转移的关键因素已达成共识, 但肿瘤新生血管形成的机制尚待确认。Kal 可诱导肿瘤内皮细胞凋亡, 抑制肿瘤新生血管生成和肿瘤生长的能力已被证实。临床前研究结果表明, Kal 具有多种药理作用, 对氧化应激相关性疾病, 特别是肿瘤治疗具有应用前景, 但其药理作用的分子机制仍需深入探讨。

**关键词:** 人源性激肽释放酶结合蛋白; 氧化应激; 内皮细胞; 肿瘤

**中图分类号:** Q513; R730.59; R979.1

**文献标志码:** A

## Kallistatin and endothelial cell activity

XING Yong-Mei, DIAO Yong\*

(Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** Kallistatin (Kal) is a negative acute phase endogenous protein which is closely related with a variety of endothelium associated physiological and pathological processes, such as angiogenesis, blood vessel injury recovery, heart failure, kidney damage, diabetes and so on. Kal increases endothelial NO synthase expression and NO production, inhibits endothelial cell apoptosis and organ damage caused by inflammation and oxidative stress, through activation of KLF4-eNOS, PI3K-AKT-eNOS and AKT-FOXO1 signaling pathways, and prevents TNF- $\alpha$  mediated endothelial activation. Animal experiments showed increased Kal expression *in vivo* can reduce oxidative stress-induced cell apoptosis and organ damage. Kal may play different roles with different kinds of endothelial cells, depending on their phenotypes and conditions, such as mature or progenitor cells, healthy or diseased. It is established that tumor growth and metastasis are regulated in part by endothelial cells within the tumor microenvironment, and yet, the exact mechanisms of neovascularization in tumor are less well understood. Numerous studies demonstrated that Kal can inhibit tumor angiogenesis, growth and metastasis effectively. Although the preclinical results suggest that Kal has pleiotropic pharmacological effects and represents a promising strategy for the treatment of oxidative stress related diseases, especially cancer, detailed molecular mechanism still needs to be explored before clinic application.

**Key words:** kallistatin; oxidative stress; endothelial cell; tumor

收稿日期: 2011-08-04; 修回日期: 2011-08-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30973591); 江苏省科技重点项目(BC2009029); 福建省生物医药工程研究生教育创新基地资助项目(06070205)

\*通信作者: E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn; Tel: 0595-22692516

Kallistatin(Kal) 是一种人源性激肽释放酶结合蛋白<sup>[1]</sup>, 具有独特的丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin) 活性<sup>[1-2]</sup>, 后来发现其参与高血压<sup>[3-4]</sup>、心肌梗死<sup>[5-6]</sup>、炎症<sup>[7]</sup>、血管生成<sup>[8-9]</sup>、肿瘤<sup>[9-16]</sup>、纤维化<sup>[17-18]</sup>等多种疾病的发生和发展过程, 是一个极具临床应用前景的蛋白类药物。有关 Kal 的研究提示, Kal 相关性疾病均与内皮功能障碍有关。近期研究表明, 内皮细胞不仅仅是构成输送营养和代谢产物管道的内衬细胞, 还形成一种血管生态位 (vascular niche), 在不同条件下, 通过调节各种血管分泌因子 (angiocrine factor) 的生成, 指导周边组织的生长和损伤修复功能<sup>[19]</sup>。在正常条件下, 体内大部分内皮细胞处于静息状态, 所产生的血管分泌因子可维持体内动态平衡。但在缺氧、炎症等应激压力下, 内皮细胞内特定血管分泌因子表达上调, 促进新生血管形成和组织修复, 甚至募集内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 的参与。血管内皮细胞所处的独特位置使其成为针对各种伤害的屏障, 而内皮细胞功能损伤会严重干扰内皮细胞单层的完整性, 并启动各种疾病事件。所以, 深入研究 Kal 对内皮细胞功能影响的特点及作用机制, 有助于为炎症、感染、心血管和肿瘤等重大疾病的防治提供新手段。

## 1 Kal与内皮细胞氧化应激

氧化应激是活性氧物质 (ROS) 增加和抗氧化能力下降引起的氧化还原失衡状态, 可引起高血压、动脉粥样硬化、心肌肥厚、心脏衰竭、肾脏损伤、糖尿病等<sup>[1,20-22]</sup>。Kal 作为一种抗氧化物质, 在维持体内氧化还原平衡, 防止氧化应激引起的内皮细胞和组织损伤中发挥着重要作用, 如长期高盐饮食诱导大鼠肾脏和血管 NAD(P)H 氧化酶活性升高, NO 生成减少, 继而发生高血压和肾功能损伤<sup>[23-24]</sup>, 而 Kal 基因治疗则减少了氧化应激引起的大鼠炎症、肾功能损伤和纤维化<sup>[18]</sup>。在心肌缺血再灌注损伤和慢性心肌梗死动物模型<sup>[5-6]</sup>, Kal 基因表达也可减轻氧化应激引起的细胞凋亡、炎症和器官损伤。过表达 Kal 的转基因小鼠耐受内毒素休克的能力大大增强, 死亡率显著降低<sup>[7]</sup>。在由胶原蛋白诱导的大鼠关节炎模型, 人 Kal 在关节局部表达, 可以显著降低关节肿胀和炎症细胞因子水平<sup>[8]</sup>。

### 1.1 氧化应激抑制Kal的表达

已知氧化应激造成血管内皮功能障碍, 导致血管损伤和炎症, 引起高血压、动脉粥样硬化、心肌肥厚、心脏衰竭、肾脏损伤、糖尿病等多种疾病<sup>[20-22]</sup>。

多项动物实验显示氧化应激可抑制 Kal 的体内表达<sup>[4-6,18]</sup>, 临床研究也发现脓毒症和急性坏死性胰腺炎患者血液内 Kal 浓度显著下降<sup>[25-26]</sup>, 说明血液 Kal 水平与氧化应激呈负相关关系, 可作为氧化应激相关性疾病的生物标志。

近期研究表明, 叉头框转录因子 1 (forkhead box O 1, FOXO1) 是 Kal 表达的负调控因子<sup>[27]</sup>。FOXO 通过调节一系列特定的靶基因表达, 参与细胞分化和应激反应等多种细胞反应。对人类 Kal 基因启动子区域的分析表明, 在 5' 侧翼区 -675 和 -915 bp 处存在两个共有 FOXO 反应元件 (forkhead-responsive element, FRE), 提示 FOXO1 可能通过与 FRE 结合直接调控 Kal 的表达。过氧化氢 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 可以增加细胞内 ROS 的浓度, 通常作为氧化应激的诱导剂。内皮细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后, Kal 的表达呈 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 剂量依赖性减少。当采用 siRNA 有效敲除 FOXO1 的表达后, 在内皮细胞内由氧化应激诱导的 Kal 表达降低被有效抑制, 说明 FOXO1 确实是负责 Kal 负调控的转录因子<sup>[27]</sup>。

c-Jun N 端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 是丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 的家族成员, 可被氧化应激和炎症因子激活, 磷酸化程度增加, 继而促进 FOXO1 的核内转运<sup>[28-29]</sup>。在正常情况下, 血管内皮细胞内大部分 (65%) FOXO1 存在于细胞质。JNK 经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 激活后, FOXO1 的核内转运增加, Kal 的表达被抑制 (图 1)。血管内皮细胞经 JNK 抑制剂预处理后, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激不再影响 Kal 的表达。JNK 表达敲除后, 氧化应激也不能引起 Kal 的表达抑制。这说明氧化应激条件下, FOXO1 的核转运过程由 JNK 调节, 发挥 Kal 的表达调节作用<sup>[27]</sup>。

动物实验显示, 氧化应激会引起糖尿病大鼠视网膜内 Kal 水平的降低<sup>[30-31]</sup>, 但 1 型糖尿病患者体内 Kal 的水平却高于正常人, 且与炎症或氧化应激没有相关性<sup>[32]</sup>。在类风湿关节炎 (炎症) 患者, 血浆和关节内 Kal 水平较人骨关节炎患者相对增加<sup>[33]</sup>。提示 Kal 是一种负急性期反应蛋白, 炎症或氧化应激的慢性刺激也可能会引起患者体内的代偿性增加, 其临床指标意义应根据病种和病情灵活掌握。

### 1.2 Kal的抗炎作用

肿瘤坏死因子 - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 与细胞表面的 TNF- $\alpha$  受体 1 (TNFR1) 结合后可引起炎症级联反应。Kal 通过与 TNF- $\alpha$  竞争结合 TNFR1 抑制内皮细胞的激活、黏附和渗透性增加等炎症反应<sup>[39]</sup>。内皮细胞经

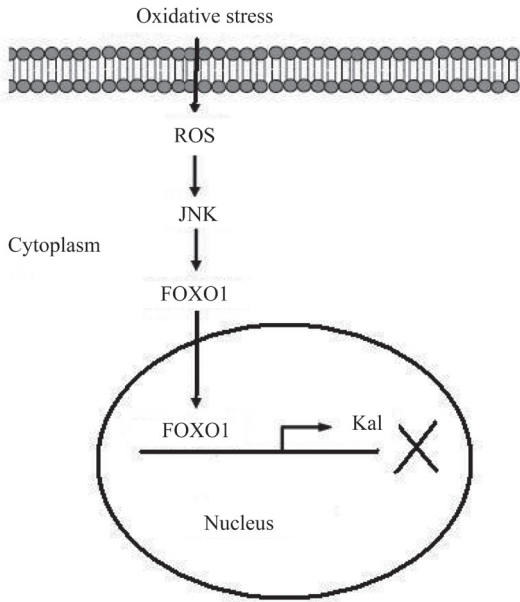


图1 在氧化胁迫条件下通过JNK-FOXO1途径抑制Kal表达

Kal 处理后, TNFR 相关死亡域蛋白 (TNFR-associated death domain protein, TRADD) 水平降低, 不能有效招募 TNFR 相关因子 (TNF receptor associated factors, TRAF) 和受体相互作用蛋白 (receptor interacting protein, RIP) 形成三聚体, NF- $\kappa$ B 抑制蛋白 (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) 磷酸化程度降低而与 NF- $\kappa$ B 的 p65 与 p50 亚基持续结合, 抑制 NF- $\kappa$ B p65 亚基的入核, 其下游基因的表达不能被激活。另外, Kal 还抑制 TNF- $\alpha$  引起的有丝分裂原激活蛋白激酶 (p38 MAPK) 的磷酸化, 抑制血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecular 1, VCAM-1)、细胞间黏附因子 1 (intercellular adhesion molecular 1, ICAM-1) 和单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 的表达 (图 2)。

### 1.3 Kal的抗氧化作用

血管内皮功能障碍往往与胞内 ROS 数量增加有关<sup>[34-35]</sup>。ROS 水平上升, 促进血管炎症和细胞凋亡, 继而加重血管内皮功能障碍<sup>[34-36]</sup>。细胞因子, 如 TNF- $\alpha$  等炎症因子通过激活内皮细胞表面 NAD(P)H 氧化酶, 激发细胞内超氧化物生成。在炎症血管中, NO 缺乏是 ROS 增加的主要原因。NO 通过抑制 NAD(P)H 氧化酶活性或中和有毒的氧自由基而发挥保护内皮细胞的功能。内皮细胞内 NO 水平由组成性表达的内皮细胞一氧化氮合酶 (eNOS) 控制。eNOS 缺陷小鼠一般表现为高血压,

缺乏内皮依赖性血管舒张功能, 对炎症刺激敏感, 容易形成动脉粥样硬化病变<sup>[37]</sup>。Kal 分别通过 KLF4-eNOS、PI3K-Akt-eNOS 和 Akt-FOXO1 等多条信号通路 (图 3), 调节胞内 NO 水平, 抑制内皮细胞损伤。

### 1.3.1 KLF4-eNOS信号通路

Hamik 等<sup>[37]</sup>首次证明 Kruppel 样因子 4 (kruppel-like factor 4, KLF4) 对 eNOS 表达具有促进作用。KLF4 是 Sp1/KLF 锌指转录因子家族的一员, 是上皮细胞内富含的一种转录因子, 各种动脉和静脉腔内的内皮细胞也表达 KLF4。Shen 等<sup>[38]</sup>的研究确

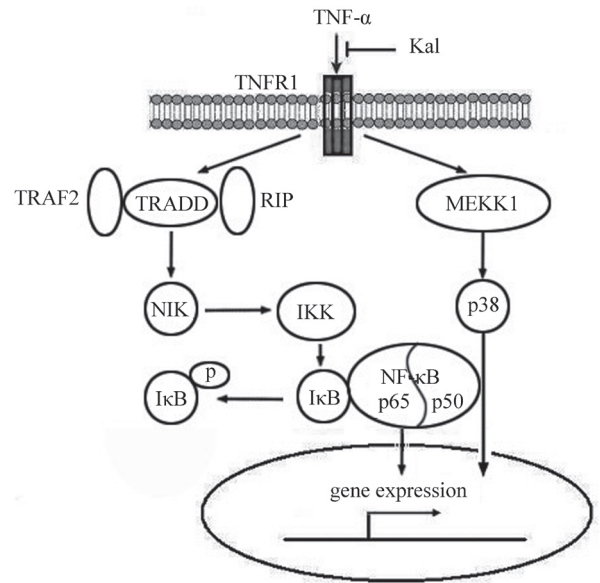


图2 Kallistatin与TNF- $\alpha$ 竞争结合TNFR1, 抑制内皮细胞炎症

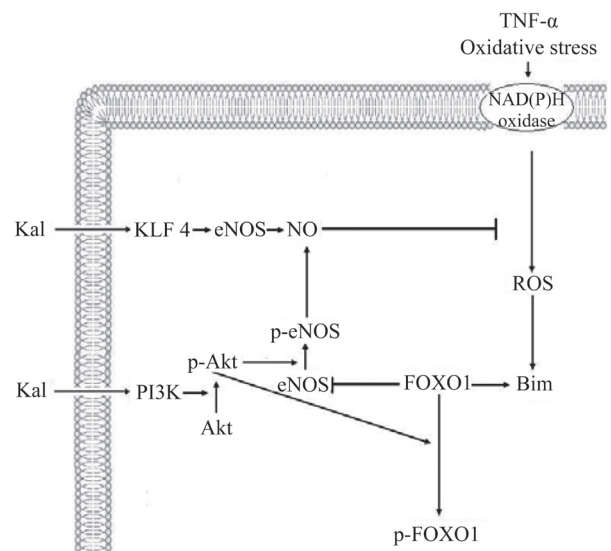


图3 Kallistatin介导的内皮细胞信号通路

认 KLF4 是 Kal 的结合蛋白, 血管内皮细胞表面的 KLF4 与 Kal 结合后, 将 Kal 转运入细胞内部, 从而促进 eNOS 的合成和 NO 的生成增加。在体外培养的内皮细胞, Kal 以剂量依赖的方式增加 eNOS 的表达。当 KLF4 的表达被抑制后, Kal 则失去了对 eNOS 的表达促进效果, 说明 Kal 对 eNOS 表达的诱导作用确由 KLF4 所介导。

除促进 eNOS 的表达外, Kal 与 KLF4 的结合还有助于减轻 TNF- $\alpha$  诱导的 NF- $\kappa$ B 活化, 降低黏附分子 MCP-1 和 VCAM-1 的表达, 抑制白细胞与血管内皮细胞黏附<sup>[38]</sup>。在生理条件下, MCP-1 和 VCAM-1 在内皮细胞内的表达水平非常低, 但在细胞因子 TNF- $\alpha$  作用下则迅速升高。内皮细胞表面黏附分子的表达上调可启动病理性白细胞-内皮细胞相互作用, 最终将血管壁及周围组织暴露于激活的白细胞, 并导致血管内皮功能障碍。

### 1.3.2 PI3K-Akt-eNOS信号通路

Kal 处理内皮细胞后, 可抑制 TNF- $\alpha$ 、血管紧张素 II、低氧/氧再灌注等引起的 ROS 形成。采用 PI3K 抑制剂 LY-294002、功能缺失型 Akt 和 NOS 抑制剂 L-NAME 处理后, Kal 不再发挥抑制作用, 说明 Kal 是通过激活 PI3K-Akt-eNOS 信号通路发挥保护作用<sup>[4]</sup>。内皮细胞经 Kal 短暂处理 (15~30 min) 后, Akt、eNOS 和 FOXO1 的磷酸化程度均明显增加。eNOS 的磷酸化程度增加, 意味着其合成 NO 的效率显著提高。下述 FOXO1 对 eNOS 表达负调控的解除, 则有利于提高 eNOS 表达水平, 说明通过 PI3K-Akt-eNOS 信号通路, Kal 不仅可以增加 eNOS 的比活性, 还可以促进 eNOS 的表达。

### 1.3.3 Akt-FOXO1信号通路

前凋亡蛋白 Bim 是 FOXO1 的重要靶基因, 氧化应激可促进 Bim 的表达, 诱导内皮细胞的凋亡。当 FOXO1 表达被敲除后, 氧化应激诱导的内皮细胞凋亡得以抑制, 说明 FOXO1 参与了 Bim 介导的细胞凋亡。内皮细胞经 Kal 短暂处理, FOXO1 的磷酸化程度明显增加, 而 PI3K 活性抑制则阻断了 FOXO1 的磷酸化, 说明 PI3K 和 Akt 参与了 FOXO1 的磷酸化。Kal 经 PI3K-Akt-FOXO1 通路诱导 FOXO1 磷酸化, FOXO1 因磷酸化失活而不能入核, FOXO1 依赖性 Bim 表达降低, 因此, 氧化应激不能诱导内皮细胞凋亡。在蛋白质和 mRNA 水平的检测也证明 Kal 可有效抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 Bim 表达, 从而对内皮细胞实施保护作用<sup>[4]</sup>。

FOXO1 是成熟内皮细胞内表达最高的 FOXO

转录因子, 其过度表达显著抑制内皮细胞管道形成和迁移, 而表达沉默则显著增加内皮细胞管形成和迁移, 表明 FOXO 转录因子在调节血管形成和成熟方面具有重要作用。Potente 等<sup>[40]</sup>的研究显示, 内皮细胞敲除 FOXO1 后, eNOS 蛋白表达显著上调, 说明对血管内皮功能和产后血管形成至关重要的 eNOS 也是 FOXO 的靶基因之一。对 eNOS 的启动子进行分析, 发现其中含有一个保守的 FRE 元件, 位于起始密码子上游 2 753 bp 处。染色质免疫沉淀分析表明, FOXO1 和 FOXO3a 与 eNOS 的启动子区域结合, 可抑制 eNOS 的转录。Kal 经 PI3K-Akt 通路诱导的 FOXO1 磷酸化失活, 不仅仅降低 Bim 表达, 还可能通过调控 eNOS 以及 Ang2 和 ELK-3 等其他细胞因子, 共同发挥血管功能调控活性<sup>[40]</sup>。

## 2 Kal与肿瘤血管形成

血管形成主要存在两种方式, 即血管新生 (vasculogenesis) 和血管生成 (angiogenesis)。血管新生是从头开始形成血管的过程, 需要原始祖细胞分化为成熟的内皮细胞, 一般认为只发生在胚胎发育期。血管生成则是在预先存在的血管基础上产生新的血管, 在胚胎发育期和出生后均可发生。长期以来学界一直认为肿瘤血管形成仅来自分化的成熟内皮细胞, 即血管生成。

### 2.1 Kal抑制肿瘤血管生成

Folkman<sup>[41]</sup>首先提出血管生成是肿瘤生长、侵袭和转移的必要条件, 为抗肿瘤新药研究指出了新方向。肿瘤的最初生长依赖于周围组织中的氧气和营养物质的扩散, 不需要一个新的血液供应。但在肿瘤长到 1~2 mm<sup>3</sup> 大小后, 其日益增加的营养与代谢需求必须由新生血管来满足。肿瘤新生成的血管通常表现为泄漏、扩张和曲折的畸形状态, 血管结构和功能的异常为肿瘤提供了缺氧和酸性的微环境, 反过来又进一步刺激肿瘤血管生成。抗血管生成治疗通过抑制肿瘤异常血管的萌芽和组装, 限制了肿瘤细胞获取氧气及其他营养物质的能力, 某些血管生成依赖性肿瘤得以转归或生长停滞<sup>[41-43]</sup>。大部分抗血管生成药物在动物肿瘤模型中可有效阻断肿瘤的侵袭和发展, 佐证了 Folkman 假说的合理性。

Miao 等<sup>[9]</sup>首先发现 Kal 的血管形成抑制作用, 并证明 Kal 通过竞争结合内皮细胞表面的乙酰肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG) 受体, 抑制 VEGF 和  $\beta$ FGF 诱导的血管生成信号级联反应。以病毒载体介导的 Kal 基因治疗, 不仅可有效降低

肿瘤的血管密度和生长速率, 而且可以抑制肿瘤细胞的侵袭与转移。Kal 的抗肿瘤血管形成活性已被多篇研究报告所证实, 涉及的肿瘤包括乳腺癌、结肠癌、肝癌、胃癌和肺癌等<sup>[9-16]</sup>。Kal 通过诱导内皮细胞凋亡<sup>[12]</sup>, 从而抑制肿瘤内血管形成的结果, 似乎与前述 Kal 对内皮细胞损伤的保护作用相互矛盾。我们推测, 肿瘤内皮细胞所处的环境及其本身的性质, 可能有别于正常内皮细胞, 肿瘤血管形成可能还包括了血管新生机制, Kal 对肿瘤血管形成影响的机制尚存在深入探索的空间。

## 2.2 内皮细胞对肿瘤作用的两面性

尽管抗肿瘤血管生成药物在动物模型取得了极好的疗效, 但临床研究结果却让人大失所望。虽然治疗后患者肿瘤负荷明显减少<sup>[44-45]</sup>, 但长期生存率并没有显著延长<sup>[46-47]</sup>, 肿瘤细胞甚至出现侵袭和转移倾向增加<sup>[48-49]</sup>。最近研究发现, 抑制特定的血管生成通路会导致一些促进组织修复的新生血管的衰退, 会导致其他血管生成途径的代偿性替代, 有可能因此加剧血管生成, 并增强肿瘤的侵袭能力<sup>[48-49]</sup>, 说明血管生成抑制的后果并不像预计的那样简单。

近期研究表明, 内皮细胞不仅为肿瘤建立输送氧气和营养物质的管道, 还可以通过释放血管分泌因子, 直接调节肿瘤生长, 其调节作用对肿瘤细胞具有两面性。健康哺乳动物体内大部分内皮细胞处于静态状态, 所产生的血管分泌因子维持体内动态平衡, 使肿瘤处于休眠状态<sup>[50]</sup>。在缺氧、炎症等应激压力下, 以及癌基因诱导的肿瘤细胞恶性转化期, 内皮细胞内特定血管分泌因子表达上调, 反而刺激肿瘤的生长。内皮细胞表型的微小变化都可能对肿瘤细胞的命运产生深远影响<sup>[51]</sup>。Franses 等<sup>[52]</sup>的研究显示, 正常内皮细胞释放的因子可抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭。在小鼠的移植瘤附近植入正常内皮细胞后, 原发性肿瘤生长速率和转移倾向得以抑制。敲除内皮细胞表面 HSPG 受体后, 内皮细胞对肿瘤细胞的调控作用发生改变, 抑制肿瘤增殖的能力略微增加, 但抑制肿瘤侵袭的能力则丧失。

基于内皮细胞对肿瘤细胞影响的两面性, Butler 等<sup>[19]</sup>提出在不破坏血管正常功能的情况下, 选择性抑制血管分泌因子有可能既阻止肿瘤的生长, 又可以避免血管生成抑制对血管潜在的毒副作用。内皮细胞产生的对肿瘤细胞具有潜在作用的血管分泌因子包括 VEGF、FGF2、NO 等生长因子; ICAM1、VCAM1、E-选择素等黏附分子; 白细胞介素 8(IL-8)、MCP1 等趋化因子。现有研究表明,

Kal 对内皮细胞多种血管分泌因子具有调节作用, 其中既可以与 VEGF 和 FGF2 竞争性结合内皮细胞表面的 HSPG 受体<sup>[9]</sup>, 又可以调节氧化应激及炎症状态下内皮细胞内的 NO 水平<sup>[4,18,38]</sup>, 还可以抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 NF- $\kappa$ B 活化, 降低 MCP-1 和 VCAM-1 的表达<sup>[39]</sup>, 抑制白细胞与内皮细胞黏附等。Kal 很有可能通过对肿瘤内环境中内皮细胞各种血管分泌因子的调控, 抑制肿瘤的生长。

## 2.3 内皮祖细胞

除血管生成外, 由 EPC 主导的血管新生也参与了肿瘤血管形成<sup>[53-54]</sup>。EPC 既可以直接参与肿瘤新生血管形成<sup>[55]</sup>, 还可以在肿瘤附近通过旁分泌作用分泌血管分泌因子刺激血管生成。Arbab 等<sup>[56]</sup>的研究显示, EPC 对肿瘤血管新生的作用与肿瘤生长阶段有关系。直径为 0.5~1.0 cm 大小的肿瘤外围血管主要由 EPC 构成, 随着肿瘤继续长大到超过 1.0 cm, 肿瘤外周血管内 EPC 的比例显著下降。可能在肿瘤生长的早期, 血管形成以血管新生为主, 在肿瘤达到一定体积后, 则由内皮细胞参与的血管生成逐渐占据了上风。

与成熟的内皮细胞相比, EPC 对氧化应激不敏感<sup>[57]</sup>, 但对血管抑素诱导的凋亡却更敏感<sup>[58]</sup>, 提示两者在性质上存在明显的差异。此外, EPC 和内皮细胞之间基因表达谱也有显著差异。以对内皮细胞功能有重要影响的 FOXO 为例, FOXO4 在造血细胞源性的 EPC 中高度表达, 而 FOXO1 和 FOXO3a 则是成熟内皮细胞内表达最高的 FOXO 亚型<sup>[59]</sup>。FOXO1 和 FOXO3a 过度表达可抑制内皮细胞的迁移活性和成管能力, 而 FOXO4 的表达则无显著影响<sup>[40]</sup>。FOXO4 过度表达可激活 Bim 启动子, Bim 的表达引起 EPC 凋亡<sup>[60]</sup>。

迄今为止, 尚未见 Kal 对 EPC 作用的任何研究报告。已知 VEGF 在体外和体内都能促进 EPC 的增殖, 推测 Kal 至少可以通过竞争结合, 抑制 VEGF 对 EPC 的作用。另外, 鉴于 PI3K-Akt 信号通路对 EPC 的重要作用, 以及 Kal 对 PI3K-Akt 信号通路的调控作用, 相信 Kal 与 EPC 的相互关系研究值得探索。

## 3 总结

起初 Kal 是以激肽释放酶结合蛋白的形式被发现, 被认为是一种特异性组织激肽释放酶抑制剂, 通过与激肽系统的相互作用参与血管舒张和局部血流调节。之后发现, 除了对组织激肽释放酶的抑制

作用外, Kal 还有其他重要功能, 如抗炎、抗氧化、抑制新生血管形成等。近年来又发现, Kal 通过减少氧化应激引起的内皮损伤, 对心脏、肾脏等重要器官具有保护作用。更有意义的是, Kal 对多种肿瘤的生长及转移具有很好的抑制作用。已有的研究结果显示, Kal 是一种非常值得开发的蛋白质药物, 可用于多种重大疾病的治疗。希望随着对 Kal 药理作用及分子机制更广泛和深入的研究, 以蛋白质或基因治疗形式出现的 Kal 药物可以真正为人类健康作出应有贡献。

### [参 考 文 献]

- [1] Chao J, Chai KX, Chen LM, et al. Tissue kallikrein-binding protein is a serpin. I. Purification, characterization, and distribution in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Biol Chem*, 1990, 265(27): 16394-401
- [2] Chai KX, Chen LM, Chao J, et al. Kallistatin: a novel human serine proteinase inhibitor—molecular cloning, tissue distribution, and expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1993, 268(32): 24498-505
- [3] Chao J, Stallone JN, Liang YM, et al. Kallistatin is a potent new vasodilator. *J Clin Invest*, 1997, 100(1): 11-7
- [4] Shen B, Gao L, Hsu YT, et al. Kallistatin attenuates endothelial apoptosis through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010, 299(5): H1419-27
- [5] Chao J, Yin H, Yao YY, et al. Novel role of kallistatin in protection against myocardial ischemia-reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(12): 1201-13
- [6] Gao L, Yin H, Smith R Jr, et al. Role of kallistatin in prevention of cardiac remodeling after chronic myocardial infarction. *Lab Invest*, 2008, 88(11): 1157-66
- [7] Chen LM, Chao L, Chao J. Beneficial effects of kallikrein-binding protein in transgenic mice during endotoxic shock. *Life Sci*, 1997, 60(17): 1431-5
- [8] Wang CR, Chen SY, Wu CL, et al. Prophylactic adenovirus-mediated human kallistatin gene therapy suppresses rat arthritis by inhibiting angiogenesis and inflammation. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(4): 1319-24
- [9] Miao RQ, Agata J, Chao L, et al. Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Blood*, 2002, 100(9):3245-52
- [10] Diao Y, Ma J, Xiao WD, et al. Inhibition of angiogenesis and HCT-116 xenograft tumor growth in mice by kallistatin. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(34):4615-9
- [11] Luo Q, Siconolfi-Baez L, Annamaneni P, et al. Altered protein expression at early-stage rat hepatic neoplasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(5): G1272-82
- [12] Lu L, Yang Z, Zhu B, et al. Kallikrein-binding protein suppresses growth of hepatocellular carcinoma by anti-angiogenic activity. *Cancer Lett*, 2007, 257(1): 97-106
- [13] Tse LY, Sun X, Jiang H, et al. Adeno-associated virus-mediated expression of kallistatin suppresses local and remote hepatocellular carcinomas. *J Gene Med*, 2008, 10(5): 508-17
- [14] Jiang X, Li H, Qiao H, Jiang H, Xu R, Sun X. Combining kallistatin gene therapy and meloxicam to treat hepatocellular carcinoma in mice. *Cancer Sci*, 2009, 100(11): 2226-33
- [15] Zhu B, Lu L, Cai W, et al. Kallikrein-binding protein inhibits growth of gastric carcinoma by reducing vascular endothelial growth factor production and angiogenesis. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(12 Pt 1): 3297-306
- [16] Shiau AL, Teo ML, Chen SY, et al. Inhibition of experimental lung metastasis by systemic lentiviral delivery of kallistatin. *BMC Cancer*, 2010, 10: 245
- [17] Diao Y, Zhao XF, Lin JS, et al. Protection of the liver against CCl4-induced injury by intramuscular electro-transfer of a kallistatin-encoding plasmid. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(1): 111-7
- [18] Shen B, Hagiwara M, Yao YY, et al. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation and fibrosis via anti-oxidative stress. *Hypertension*, 2008, 51(5): 1358-65
- [19] Butler JM, Kobayashi H, Rafii S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(2): 138-46
- [20] Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*, 2008, 31 (Suppl 2): S170-80
- [21] Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, et al. Molecular mechanisms of hypertension: role of NOx family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009, 18(2): 122-7
- [22] Stenvinkel P. Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. *J Ren Nutr*, 2003, 13(2): 144-8
- [23] Guo P, Nishiyama A, Rahman M, et al. Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of left ventricular failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats: effects of angiotensin II blockade. *J Hypertens*, 2006, 24(6): 1097-104
- [24] Taylor NE, Glocka P, Liang M, et al. NADPH oxidase in the renal medulla causes oxidative stress and contributes to salt-sensitive hypertension in Dahl S rats. *Hypertension*, 2006, 47(4): 692-8
- [25] Chao J, Schmaier A, Chen LM, et al. Kallistatin, a novel human tissue kallikrein inhibitor: levels in body fluids, blood cells, and tissues in health and disease. *J Lab Clin Med*, 1996, 127(6): 612-20
- [26] Bläckberg M, Berling R, Ohlsson K. Tissue kallikrein in severe acute pancreatitis in patients treated with high-dose intraperitoneal aprotinin. *Pancreas*, 1999, 19(4): 325-34
- [27] Shen B, Chao L, Chao J. Pivotal role of JNK-dependent FOXO1 activation in down-regulation of kallistatin expression by oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(3): H1048-54
- [28] Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, et al. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J*, 2004, 23:

- 4802-12
- [29] Wang MC, Bohmann D, Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell*, 2005, 121(1): 115-25
- [30] Hatcher HC, Ma JX, Chao J, et al. Kallikrein-binding protein levels are reduced in the retinas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(3): 658-64
- [31] Zhang B, Ma JX. SERPINA3K prevents oxidative stress induced necrotic cell death by inhibiting calcium overload. *PLoS One*, 2008, 3(12): e4077
- [32] Jenkins AJ, McBride JD, Januszewski AS, et al. Increased serum kallistatin levels in type 1 diabetes patients with vascular complications. *J Angiogenesis Res*, 2010, 2: 19
- [33] Wang CR, Chen SY, Shiao AL, et al. Upregulation of kallistatin expression in rheumatoid joints. *J Rheumatol*, 2007, 34(11): 2171-6
- [34] Papaharalambus CA, Griendling KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17(2): 48-54
- [35] Schiffrin EL. Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: a matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary circulation. *Hypertension*, 2008, 51(1): 31-2
- [36] Yoshida LS, Tsunawaki S. Expression of NADPH oxidases and enhanced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity in human coronary artery endothelial cells upon induction with tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(10): 1377-85
- [37] Hamik A, Lin Z, Kumar A, et al. Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *J Biol Chem*, 2007, 282(18): 13769-79
- [38] Shen B, Smith RS Jr, Hsu YT, et al. Kruppel-like factor 4 is a novel mediator of Kallistatin in inhibiting endothelial inflammation via increased endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem*, 2009, 284(51): 35471-8
- [39] Yin H, Gao L, Shen B, et al. Kallistatin inhibits vascular inflammation by antagonizing tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced nuclear factor  $\kappa$ B activation. *Hypertension*, 2010, 56(2): 260-7
- [40] Potente M, Urbich C, Sasaki K, et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2382-92
- [41] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(4): 273-86
- [42] Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*, 2008, 358(19): 2039-49
- [43] Thurston G, Noguera-Troise I, Yancopoulos GD. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(5): 327-31
- [44] Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy—endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*, 2006, 312(5): 594-607
- [45] Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: Targets for antiangiogenesis and normalization. *Microvasc Res*, 2007, 74(2-3): 72-84
- [46] Jain RK. Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(4): 309-16
- [47] Ahmed F, Steele JC, Herbert JM, et al. Tumor stroma as a target in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(6): 447-53
- [48] Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 2009, 15(3): 232-9
- [49] Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*, 2009, 15(3): 220-31
- [50] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407(6801): 249-57
- [51] Albin A, Benelli R. The chemoinvasion assay: A method to assess tumor and endothelial cell invasion and its modulation. *Nat Protoc*, 2007, 2(3): 504-11
- [52] Franses JW, Baker AB, Chitalia VC, et al. Stromal endothelial cells directly influence cancer progression. *Sci Transl Med*, 2011, 3(66): 66ra5
- [53] Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(3-4): 489-502
- [54] Dome B, Hendrix MJ, Paku S, et al. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*, 2007, 170(1): 1-15
- [55] Janic B, Guo AM, Iskander AS, et al. Human cord blood-derived AC133+ progenitor cells preserve endothelial progenitor characteristics after long term *in vitro* expansion. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9173
- [56] Arbab AS, Janic B, Knight RA, et al. Detection of migration of locally implanted AC133+ stem cells by cellular magnetic resonance imaging with histological findings. *FASEB J*, 2008, 22(9): 3234-46
- [57] Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, et al. Anti-oxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood*, 2004, 104(12): 3591-7
- [58] Ito H, Rovira II, Bloom ML, et al. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res*, 1999, 59(23): 5875-7
- [59] Urbich C, Knau A, Fichtlscherer S, et al. FOXO dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells. *FASEB J*, 2005, 19(8): 974-6
- [60] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*, 1999, 18(14): 3964-72