

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.02.033

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2015.02.033>

Kallistatin的生物学作用及机制研究进展

詹丽君 综述 卿国忠 审校

(南华大学附属第一医院急诊科, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] 人组织激肽释放酶结合蛋白(Kallistatin, KS)是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 最早发现具有与组织型激肽释放酶(tissue Kallikrein, TK)特异性结合并抑制TK的功能。近年研究发现KS具有抗炎、抗氧化应激、抗血管生成及抗肿瘤等广泛的生物学作用, 作用机制与其肝素结合结构域密切相关。KS可通过其肝素结合结构域竞争性抑制TNF- α 、HMGB1与相应的内皮细胞表面受体结合, 从而抑制其介导的炎性细胞因子的表达; 竞争性抑制VEGF、bEGF与其受体结合, 从而抑制肿瘤血管生成。KS通过参与调控多条细胞信号通路发挥抗氧化应激作用。KS还能够调节内皮细胞功能, 诱导肿瘤细胞凋亡。KS具有多种生物学作用, 具有广阔的应用前景, 尤其对于需要多靶点治疗的疾病, 如脓毒症具有潜在的治疗价值。其生物学作用机制仍需进一步研究, 本文就KS的主要生物学作用及其作用机制的最新研究进展进行阐述。

[关键词] 人组织激肽释放酶结合蛋白; 氧化应激; 炎症

Advances in the biological effects and mechanism of Kallistatin

ZHAN Lijun, QING Guozhong

(Department of Emergency, First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang Hunan 421001, China)

Abstract Human tissue kallikrein-binding protein (Kallistatin, KS) was first found to bind to tissue kallikrein (TK) and inhibit its function as a serine protease inhibitor (SERPIN). Recent studies found that KS has extensive biological effects including anti-inflammation, oxidation resistance, anti-angiogenesis and anti-tumor activities; its mechanism is closely related to its heparin-binding domain. KS can competitively inhibit TNF- α or HMGB1 binding to its corresponding endothelial cell surface receptor via its heparin-binding domain, thereby inhibiting expression of inflammatory cytokines mediated by TNF- α or HMGB1. KS can also competitively inhibit VEGF or bEGF binding to its receptor, thereby inhibiting VEGF or bEGF mediated tumor angiogenesis. KS plays a role in oxidative stress by involving in the regulation of several cell signaling pathways. KS can also regulate endothelial cell function and induce tumor cell apoptosis. With a variety of biological activities, KS has broad application prospects. Especially for multi-target therapy of disease such as sepsis, KS has potential therapeutic value. Its biological mechanism needs further research. In this paper, the latest research progress in biological effects and mechanism of KS will be elaborated.

Keywords Kallistatin; oxidative stress; inflammatory

收稿日期 (Date of reception): 2014-11-16

通信作者 (Corresponding author): 卿国忠, Email: gzqing9923@163.com

1 前言

人组织激肽释放酶结合蛋白(Kallistatin, KS)是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂(SERPINA4),首次被Chao等人^[1]从人血清及人肺成纤维细胞(WI-38)和啮齿类神经胶质瘤细胞(NG-108)的无血清培养基中分离出。从人血清中分离并经过高度纯化的KS是一条单链蛋白,分子质量为58 kDa,等电点为4.6~5.2^[2]。KS蛋白二级结构中有2个重要的功能区:中心反应环和肝素结合结构域。KS中心反应环铰链区与TK结合形成分子质量为92 kDa的复合物并抑制TK功能的发挥,参与调控血压、内皮细胞增殖等活动^[3]。KS在脓毒症、高血压、肿瘤、糖尿病视网膜病变等疾病^[4-7]中发挥抗炎、抗氧化应激、及抗血管生成等生物学作用与其肝素结合结构域密切相关。研究^[8-10]表明KS还可能成为主动脉瘤、急性胰腺炎、社区获得性肺炎(communitary-acquired pneumonia, CAP)等疾病的新血清生物标志物帮助诊断及判断预后。KS具有多种生物学作用,研究其具体机制对炎症、血管损伤、肿瘤,尤其是需要多靶点治疗的疾病如脓毒症有潜在的治疗价值。

2 KS的抗炎作用

早期研究^[9,11-13]发现急性胰腺炎、炎症性肠病、类风湿关节炎、脓症患者血清KS浓度下降,提示KS可能在炎症反应中起保护作用。进一步研究发现,KS能够抑制炎症因子的表达,减轻炎症反应。

Lin等人^[10]研究发现,CAP患者血清KS水平明显低于健康对照组,严重社区获得性肺炎合并有脓毒性休克、ARDS的患者KS水平明显低于无严重合并症患者,且CAP患者血清KS水平与炎症因子IL-6、IL-1 β 、CRP水平呈负相关。动物实验^[14]显示,在胶原诱导的关节炎大鼠关节内注射腺病毒携带KS基因可明显降低大鼠关节炎症因子TNF- α 、IL-1 β 表达水平,减轻关节肿胀。

动物实验研究^[4]发现,通过脓毒症造模前大鼠尾静脉注射重组人KS,可明显减轻脓毒症引起的炎症反应、器官损伤及降低病死率。注射KS的大鼠建模后24 h其血清炎症因子TNF- α 水平明显低于无KS干预的脓毒症组,HMGB1、TLR4在肺、肾组织的表达也明显降低。研究表明,KS的抗炎作用机制与其参与调控TNF- α -NF- κ B信号通路有关。

脓毒症时,TNF- α 的表达上调,并通过其肝

素结合位点与血管内皮细胞表面的肿瘤坏死因子受体1(tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)结合,激活IK-B激酶,导致核内因子NF- κ B的活化。NF- κ B在静息状态下与胞浆中的IK-B结合,当细胞外信号激活IK-B后导致IK-B水解,游离的NF- κ B向细胞核内易位,启动其下游的细胞因子(TNF- α 、IL-6)的表达^[15]。TNF- α 还能够导致丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)激活,并启动与炎症相关的粘附分子如细胞间粘附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)的表达。TNF- α 是炎症持续存在的重要因素,KS能够竞争性结合TNFR1,阻断TNF- α 诱导的NF- κ B及p38MAPK的激活,且能抑制TNF- α 诱导的caspase依赖的细胞凋亡信号通路,发挥抗炎及抗内皮细胞凋亡作用,对脓毒症的器官损伤起保护作用。

KS对脓毒症的器官保护作用与另一个重要的炎症介质即高迁移率组蛋白B1(high mobility group box-B1, HMGB1)有关。HMGB1是脓毒症的晚期炎症介质,与TNF- α 相似,也是通过其肝素结合位点与其内皮细胞膜上的toll样受体4(TLR4)结合,激活核转录因子NF- κ B,诱导细胞因子TNF- α 、VCAM-1的表达,同时通过激活NF- κ B通路上调自身的HMGB1的表达^[16]。KS可通过抑制HMGB1,抑制NF- κ B的激活,对脓毒症晚期的器官损伤起保护作用。

炎症反应时,LPS等诱导TNF- α 表达上调,而在KS作用下TNF- α 、HMGB1表达下调。研究^[17]显示,KS能抑制细胞因子信号转导抑制分子3(suppressor of cytokine signaling, SOCS3)的转录和表达,并且发现SOCS3可能与KS下调LPS诱导的TNF- α 的表达有关。但是目前KS对LPS的直接作用尚无文献报道。

另有研究^[18]发现,通过KS基因预处理的小鼠在局部感染A组链球菌(group A streptococcal, GAS)后24及48 h感染部位的炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的水平较对照组的小鼠明显下降。并且,KS预处理组小鼠的在感染后48 h出现菌血症的比率为6.7%(1/15),而生理盐水处理组为40%(6/15),质粒处理组为26.7%(4/15),感染部位浸润的免疫细胞内(90%以上为中性粒细胞)的活性氧化物(ROS)水平较对照组升高。KS预处理组小鼠的菌血症的数量下降可能与其增加免疫细胞的活力有关。KS可通过竞争性抑制TNF- α 诱导的NADPH酶的激活,抑制白细胞产生ROS,而这项研究^[5]却表明KS

可增加感染部位的免疫细胞内(90%以上为中性粒细胞)ROS水平发挥抗炎作用,产生这种不同现象的原因仍需进一步探索。KS与免疫细胞之间的相互作用可能成为KS的抗炎作用新的研究方向。

3 KS的抗氧化应激机制

氧化应激是高血压、动脉粥样硬化、缺血再灌注、糖尿病等疾病共同的病理生理机制,可导致内皮损伤、细胞凋亡、细胞间质纤维化。研究表明,KS可通过参与多条细胞通路的调控增加内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的活性,产生NO,发挥抗氧化应激作用。

Shen等人研究^[5]证明,KS能够通过激活磷脂酰肌醇-3激酶-蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶-内皮型一氧化氮合酶(PI3K-Akt-eNOS)通路抑制TNF- α 诱导的氧化应激和细胞凋亡。经KS处理的内皮细胞Akt及其下游因子eNOS、叉头框转录因子1(Forkhead box O 1, FOXO1)的磷酸化程度明显升高,eNOS的活性提高,同时FOXO1磷酸化失活对eNOS表达负调控的解除使eNOS表达增加,使内皮细胞生成NO明显增加。NO增加能够抑制NADPH酶活性,抑制ROS的产生,且能中和有毒自由基产生的线粒体损伤及钙超载,抑制ROS导致的氧化应激及诱导的细胞凋亡。

Gao等人研究^[19]发现,H₂O₂共孵育的的心肌细胞经KS短暂处理后eNOS的活性增加,PI3K、Akt的mRNA表达却降低。KS可能通过与细胞上的Kruppel样因子4(KLF4)结合,通过KLF4-eNOS通路促进eNOS的表达,NO生成增加^[20]。研究者认为ROS可诱导Akt的磷酸化,激活下游NF- κ B,通过NF- κ B通路引起心肌细胞肥大。KS可能通过抑制Akt-NF- κ B通路抑制ROS诱导的心肌细胞肥大。这些研究表明,KS可能通过其他机制发挥对PI3K-Akt通路的调控作用。

研究^[21]发现,FOXO1可调控多个靶基因的表达,TNF- α 、H₂O₂均可诱导NADPH酶活性增加,激活c-Jun N端粒酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK),诱导FOXO1核内转运并增加其活性,促进前促凋亡蛋白Bim的表达,抑制eNOS的表达,并抑制KS的表达。而生长因子诱导的Akt及ROS诱导的JNK激活对FOXO1的作用相反。Akt使FOXO1磷酸化失活,其下游靶基因eNOS表达增加,Bim表达减少。KS通过PI3K-Akt-FOXO1通路调控FOXO1活性,不仅能够调控其下游靶基因的表达,还能够上调自身KS的表达^[22]。

4 KS的抗血管生成及抗肿瘤作用

4.1 KS的抗血管生成作用

血管生成是一系列的细胞事件包括内皮细胞的增值、迁移,是肿瘤、糖尿病视网膜病变、关节炎等疾病的重要病理生理机制,对血管生成的干预,可望成为治疗这些疾病的靶点。

内皮细胞分泌的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bEGF)是血管生成的重要分子,介导血管生成的信号级联反应。KS可通过其肝素结合结构域与VEGF、bEGF竞争其内皮细胞表面的乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)受体,阻断其血管生成细胞通路^[23]。

目前多认为KS的抗肿瘤作用是通过抗肿瘤血管生成,调控内皮细胞的分泌因子VEGF、bEGF介导的血管生成细胞通路发挥作用^[23]。新的研究^[24]发现,KS可结合到Wnt的共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白6(low-density lipoprotein receptor-related protein 6, LRP6),可抑制经典的Wnt/ β 连环蛋白信号通路和Wnt信号介导的MDA-MB-231乳腺癌细胞的生长和迁移。Wnt/ β 连环蛋白信号通路是肿瘤生长的经典通路,可诱导靶基因c-Myc、细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、VEGF的表达,介导癌细胞的增值、迁移、侵袭^[24]。KS也可通过结合视网膜上皮细胞的LRP6,抑制Wnt信号/ β 连环蛋白通路介导的视网膜新生血管的生成^[7]。

内皮祖细胞是血管内皮细胞的前体细胞,在生理及病理因素刺激下可参与外周及损伤血管修复。内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPC)介导的新生血管形成也参与肿瘤的血管生成。Gao等人研究^[25]发现,内源性KS通过促进内皮祖细胞的迁移和血管形成的能力防止高血压大鼠血管损伤,并通过激活PI3K-Akt通路提高NO和血管内皮生长因子水平从而提高EPC的血管生成能力。KS可能成为治疗疾病血管损伤新的方法。KS可能通过作用于内皮祖细胞抑制肿瘤血管新生,但目前关于KS对肿瘤中内皮祖细胞的作用尚无文献报道。

4.2 KS的抗肿瘤作用

KS的抗肿瘤作用与其抑制血管生成、癌细胞的增值、迁移及侵袭相关。最新研究^[6]表明,KS具有诱导体外培养的结直肠癌细胞SW480和HT-29凋亡的作用。研究显示,KS处理的SW480和HT-29细胞caspase3, caspase8水平明显增加,而caspase9

水平无明显变化, 这说明外源性凋亡途径参与KS诱导的凋亡。FasL是外源性凋亡通路的重要分子。通过RNAi干扰FasL表达, KS诱导癌细胞凋亡的作用被阻断, 说明KS诱导癌细胞SW480和HT-29凋亡是FasL依赖的。过氧化物酶体增值子激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)被认为是FasL的转录因子, 介导FasL的表达, 诱导细胞凋亡。通过RNAi阻断PPAR γ 的表达后, KS并不能上调FasL的表达, 说明KS是通过作用于PPAR γ 抑制Fas/FasL信号通路的激活, 促进SW480和HT-29细胞凋亡。KS使PPAR γ 上调可能是通过阻断Wnt通路作用实现的。

5 展望

KS最初以激肽释放酶结合蛋白的形式被发现, 能够特异性结合TK并通过结合抑制TK的功能, 参与血压调节, 维持血管内稳态。随后发现KS在抗炎、抗氧化应激、抗血管生成、抗肿瘤中发挥重要作用。KS在肿瘤中的作用已被证实, 其作用不仅仅是抗血管生成, 还能够抑制癌细胞的侵袭, 诱导癌细胞凋亡, 有别于单纯的血管生成通路抑制剂, 在肿瘤治疗的研究中有重要价值。KS通过减轻炎症、氧化应激诱导的内皮损伤、细胞凋亡、组织纤维化, 发挥对心脏、肾脏、肝脏等重要脏器的保护作用, 对严重的血管疾病、如脓毒症的治疗具有广阔的应用前景。国内研究^[26]使用酵母系统可产生KS蛋白, 随着对其生物学作用机制的研究深入, KS可望以蛋白药物的形式出现为肿瘤、脓毒症等严重疾病提供新的治疗方法。

参考文献

- Chao J, Tillman DM, Wang MY, et al. Identification of a new tissue-kallikrein-binding protein[J]. *Biochem J*, 1986, 239(2): 325-331.
- Chao J, Miao RQ, Chen V, et al. Novel roles of kallistatin, a specific tissue kallikrein inhibitor, in vascular remodeling[J]. *Biol Chem*, 2001, 382(1): 15-21.
- Chen VC, Chao L, Chao J. Reactive-site specificity of human kallistatin toward tissue kallikrein probed by site-directed mutagenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1479(1-2): 237-246.
- Li P, Bledsoe G, Yang ZR, et al. Human kallistatin administration reduces organ injury and improves survival in a mouse model of polymicrobial sepsis[J]. *Immunology*, 2014, 142(2): 216-226.
- Shen B, Hagiwara M, Yao YY, et al. Salutary effect of kallistatin in salt-induced renal injury, inflammation, and fibrosis via antioxidative stress[J]. *Hypertension*, 2008, 51(5): 1358-1365.
- Yao Y, Li L, Huang X, et al. SERPINA3K induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activating the Fas/FasL/caspase-8 signaling pathway[J]. *FEBS J*, 2013, 280(14): 3244-3255.
- Zhao L, Patel SH, Pei J, et al. Antagonizing Wnt pathway in diabetic retinopathy[J]. *Diabetes*, 2013, 62(12): 3993-3995.
- Satoh K, Maniwa T, Oda T, et al. Proteomic profiling for the identification of serum diagnostic biomarkers for abdominal and thoracic aortic aneurysms[J]. *Proteome Sci*, 2013, 11(1): 27.
- Bläckberg M, Berling R, Ohlsson K. Tissue kallikrein in severe acute pancreatitis in patients treated with high-dose intraperitoneal aprotinin[J]. *Pancreas*, 1999, 19(4): 325-334.
- Lin WC, Lu SL, Lin CF, et al. Plasma kallistatin levels in patients with severe community-acquired pneumonia[J]. *Crit Care*, 2013, 17(1): R27.
- 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]. *J Lab Clin Med*, 1996, 127(6): 612-620.
- Wang CR, Chen SY, Shiao AL, et al. Upregulation of kallistatin expression in rheumatoid joints[J]. *J Rheumatol*, 2007, 34(11): 2171-2176.
- Stadnicki A, Mazurek U, Plewka D, et al. Intestinal tissue kallikrein-kallistatin profile in inflammatory bowel disease[J]. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(7): 939-44.
- Wang CR, Chen SY, Wu CL, et al. Prophylactic adenovirus-mediated human kallistatin gene therapy suppresses rat arthritis by inhibiting angiogenesis and inflammation[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(4): 1319-1324.
- Yin H, Gao L, Shen B, et al. Kallistatin inhibits vascular inflammation by antagonizing tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor kappaB activation[J]. *Hypertension*, 2010, 56(2): 260-267.
- Xu D, Young J, Song D, et al. Heparan sulfate is essential for high mobility group protein 1 (HMGB1) signaling by the receptor for advanced glycation end products (RAGE)[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(48): 41736-41744.
- Dai Z, Lu L, Yang Z, et al. Kallikrein-binding protein inhibits LPS-induced TNF- α by upregulating SOCS3 expression[J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(5): 1020-1028.
- Lu SL, Tsai CY, Luo YH, et al. Kallistatin modulates immune cells and confers anti-inflammatory response to protect mice from group A streptococcal infection[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11): 5366-5372.
- Gao L, Yin H, Smith R Jr, et al. Role of kallistatin in prevention of cardiac remodeling after chronic myocardial infarction[J]. *Lab Invest*, 2008, 88(11): 1157-1166.
- 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]. *J Biol Chem*, 2009, 284(51): 35471-35478.
21. Shen B, Gao L, Hsu YT, et al. Kallistatin attenuates endothelial apoptosis through inhibition of oxidative stress and activation of Akt-eNOS signaling[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(5): H1419-H1427.
 22. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor[J]. *Cell*, 1999, 96(6): 857-868.
 23. Miao RQ, Chen V, Chao L, et al. Structural elements of kallistatin required for inhibition of angiogenesis[J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, 284(6): C1604-C1613.
 24. Zhang J, Yang Z, Li P, et al. Kallistatin antagonizes Wnt/ β -catenin signaling and cancer cell motility via binding to low-density lipoprotein receptor-related protein 6[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379(1-2): 295-301.
 25. Gao L, Li P, Zhang J, et al. Novel role of kallistatin in vascular repair by promoting mobility, viability, and function of endothelial progenitor cells[J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(5): e001194.
 26. 黄晓平, 王晓, 董浩, 等. 重组人kallistatin蛋白在毕赤酵母中的高效表达及生物活性分析[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(2): 249-255. HUANG Xiaoping, WANG Xiao, DONG Hao, et al. High level expression of recombinant human kallistatin in *Pichia pastoris* and its bioactivity. *Chin J Biotech*, 2010, 26(2): 249-255.

本文引用: 詹丽君, 卿国忠. Kallistatin 的生物学作用及机制研究进展 [J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(2): 319-323. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.02.033

Cite this article as: ZHAN Lijun, QING Guozhong. Advances in the biological effects and mechanism of Kallistatin[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2015, 35(2): 319-323. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.02.033