



硫酸肝素蛋白多糖在疾病中的作用

宫锋^①, 张晓^②, 李晋萍^{①③}

① 军事医学科学院, 野战输血研究所, 北京 100850;

② 青岛大学, 复杂性科学研究所, 青岛 266071;

③ Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala 75123, Sweden

E-mail: gongfeng@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2009-11-09; 接受日期: 2009-11-20

摘要 硫酸肝素蛋白多糖广泛分布于动物组织的细胞膜和细胞外基质, 对于机体发育和维持生理平衡至关重要. 聚糖链硫酸肝素特有的分子结构使得这类大分子复合物具有多种生物功能, 这些功能主要通过和蛋白质配体的结合实现. 细胞表面的硫酸肝素蛋白多糖介导多种细胞活性因子与其受体的结合, 参与信号转导的过程. 硫酸肝素蛋白多糖也是细胞间质的重要组成部分, 与胶原蛋白一起维持间质结构的稳定. 肝素酶通过降解硫酸肝素从而调节细胞因子的活性和细胞间质的微环境. 因此, 揭示硫酸肝素的分子结构及其功能是生物学的一个重要研究方向. 然而, 由于硫酸肝素结构复杂, 且不均一, 使得这个领域的研究发展相对缓慢. 不过, 随着分析手段的提高和完善, 国际上对于硫酸肝素结构与功能的报道迅速增加, 同时国内对于硫酸肝素的研究也逐步受到重视. 关于硫酸肝素的生理功能最近已有几篇比较全面的综述. 此综述主要介绍硫酸肝素在病变中的作用, 旨在探讨利用硫酸肝素和肝素酶作为靶标, 研发预防和治疗这些疾病药物的可能性.

关键词

硫酸肝素蛋白多糖
乙酰硫酸肝素
老年性痴呆
肿瘤转移
病毒
炎症

1 硫酸肝素蛋白多糖

硫酸肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG, 又称乙酰硫酸肝素蛋白多糖)是一类由核心蛋白和(乙酰)硫酸肝素(heparan sulfate, HS)多糖链组成的糖复合物的总称. 根据核心蛋白结构的不同, HSPG被分为磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican, Gpc)、多配体蛋白多糖(syndecan, Sdc)、基膜蛋白多糖(perlecan)和集聚蛋白多糖(agrins). 磷脂酰肌醇蛋白聚糖和多配体蛋白多糖主要位于细胞膜, 基膜蛋白多糖和集聚蛋白是两种分泌型的HSPG, 主要存在于细胞间质和基底膜^[1].

Sdc家族由 4 个成员组成(Sdc-1~ Sdc-4), 虽然每个成员的分子量不同(22~45 kD, 表 1), 但是其结构都由胞内部分(C末端)、跨膜区和胞外区(N末端)组成. 4 个成员的胞外区序列差异较大, 但是共同之处是都有HS和硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)修饰位点^[1]. 目前对于Sdc的表达与生理功能的关联尚未完全了解, 但已有的研究结果提示Sdc在发育过程中起重要的调控作用^[10]. 大多数成熟组织表达不只一种Sdc. Sdc-1 在血管内皮细胞占主导地位, 参与新生血管形成、伤口愈合以及白细胞与内皮细胞间的相互作用^[11]. Sdc-2 在肾、肺和胃的间质细胞, 以及在软骨和骨形成细胞中大量表达^[12], 主要与发育过程中左右模式

的形成有关。Sdc-3 主要存在于神经细胞并且可能是 Agouti 相关蛋白 Agouti-related peptide (AGRP) 的共同受体, AGRP 通过结合褪黑素受体调节摄食行为^[13]。Sdc-4 广泛存在于胚胎发育的全过程, 也存在于大部分成体组织, 但表达水平不高, Sdc-4 的主要功能是调节基质的结构和细胞的黏附及游动^[14]。

Gpc 是被葡萄糖磷酸肌醇锚定在细胞膜的 HSPG, 在人肺成纤维细胞中最先被发现^[15], 在哺乳动物中目前发现有 6 个家族成员。Gpc 核心蛋白分子量大约为 60 kD, 通常带有 3~4 个 HS 链。在机体发育过程中 Gpc-1 主要在中枢神经和骨骼系统中表达, 也在一些成熟组织中表达^[16]。发育过程中 Gpc-2 较特异地在脑特别是神经轴突、眼的圆锥细胞中表达, 在成熟细胞中未见表达^[17]。Gpc-3~Gpc-6 广泛存在于胚胎发育期, 成熟时表达水平降低^[18]。所以 Gps 与机体的发育关系密切。

Perlecan 的核心蛋白分子量最大, 大于 400 kD, 存在于细胞间质和基底膜, 通常有 3~4 条 HS 或 CS 糖链修饰。核心蛋白被分为 5 个区域, 第 1 区域有 3 个 HS 结合位点或一个硫酸软骨素结合位点, 在第 5 区域有一个 HS 结合位点。目前还没有发现 Perlecan 的异构体。作为细胞外基质的重要组成成分, Perlecan 在机体发育、软骨成熟及伤口愈合中起关键作用^[19]。

Agrin 核心蛋白分子量约 220 kD, 但是通常带有多条 HS 链, 使之总分子量高达 500 kD^[20]。Agrin 是神经肌肉接头形成、维持和再生的关键分子, 也参与神经突触和细胞骨架的形成和病变肌肉的功能改善^[21]。虽然 Agrin 在机体发育过程中广泛表达于各种组织, 但目前的研究结果倾向于 Agrin 是神经组织特异性蛋白多糖。

大部分细胞不只表达一种核心蛋白, 而位于同一细胞表面不同的核心蛋白所带的糖链也可能在分子结构上有很大的差异。基因敲除 HSPG 核心蛋白导致了不同的缺陷型, 但这些缺陷并不一定都是核心蛋白缺失的结果, 因为核心蛋白的缺失也导致了 HS 糖链的缺失, 而 HS 缺失也会导致不同的发育缺陷。因此敲除核心蛋白的小鼠所表现的发育缺陷很难确定是由于缺失核心蛋白本身还是由于缺失 HS 多糖链所导致。

1.1 硫酸肝素多糖

如上所述, 广泛存在于组织中的 HSPG 具有多种生物学活性, 许多重要的生理、病理功能源于带负电荷的 HS 糖链与多种蛋白配体的反应^[22]。HS 多聚糖链由葡萄糖胺(GlcN)和六碳糖醛酸[葡萄糖醛酸(GlcA)或艾杜糖醛酸(IdoA)]双糖的重复单位组成(图 1), 每

表 1 哺乳动物(小鼠)HSPGs

名称	基因	分子量(kD)	基因缺失表型(功能)	主要参考文献
集聚蛋白多糖(Agrin)	<i>Agrin</i>	215	突触发生障碍	[2]
磷脂酰肌醇蛋白聚糖(Glypican)				
1	<i>Gpc1</i>	62	N.r. ^{a)}	
2	<i>Gpc2</i>	63	N.r.	
3	<i>Gpc3</i>	66	体细胞尤其骨骼过度生长 (Simpson-Golabi-Behmel)综合征	[3]
4	<i>Gpc4</i>	62	N.r.	
5	<i>Gpc5</i>	64	N.r.	
6	<i>Gpc6</i>	63	N.r.	
基膜蛋白多糖(Perlecan)	<i>Hspg2</i>	469	胚胎及新生死亡, 严重的发育缺陷	[4,5]
多配体蛋白多糖(Syndecan)				
1	<i>Sdc1</i>	34	抑制 Wnt-1 信号通路	[6]
2	<i>Sdc2</i>	22	N.r.	
3	<i>Sdc3</i>	45	增强 LTP、损伤海马依赖记忆	[7,8]
4	<i>Sdc4</i>	22	多种轻度发育缺陷表型	[9]

a) N.r. 示未见发表

条HS糖链的平均分子量为 30~60 kD. 这一复杂多糖的合成于高尔基体分别在 11 个不同功能的催化酶的控制下完成^[22,23]. HS的合成起始于蛋白和多糖的连接处, 由 4 个糖单位连接于核心蛋白的丝氨酸残基, 此后, 由聚合酶催化, 交替连接D-乙酰葡萄糖胺和D-葡萄糖醛酸, 形成[D-乙酰葡萄糖胺 1,4-D-葡萄糖醛酸] n 的重复二糖链. 在这一聚合化过程中, 重复的二糖单位通过一系列酶促反应被修饰. 第一个修饰是对N-乙酰葡萄糖胺的N去乙酰基和N-磺酸化, 形成GlcNS. 接着是对葡萄糖醛酸五号碳原子的异构化使其变为艾杜糖醛酸(IdoA)和后续的IdoA 第 2 位碳原子的磺酸化和GlcNS第 6 位碳原子的磺酸化. 在GlcNS第 3 位碳原子上发生磺酸化的几率较小^[24]. 在一条HS多聚糖链上, 通常只有 1/3~1/2 的糖单位被磺酸化修饰, 造成了HS分子的高度不均一性. 为了方便叙述, 常常将高磺基化区定义为S区, 将未修饰的序列定义为NA区, 而修饰与未修饰的混合片段定义

为NS区(图 1). 然而, HS具有高度的组织特异性, 这主要源于合成过程的精密调控^[25]. 这种特异调控使得HS在不同的组织, 或同一组织中可与多种蛋白作用^[26~28].

近十几年的研究对HS合成的调控和功能有了很大的进展. 通过逐个敲除参与HS合成的酶和对HS分子微细结构的分析, 研究者对HS的关键作用有了深入的认识, 尤其是对这些合成酶在发育过程中的功能有了全面的了解. 如HS聚合酶EXT1 的缺失造成HS链完全缺失, 以至胚胎在原肠胚形成前终止发育^[29]. 同时, 定向敲除葡萄糖酰胺脱乙酰基和磺酸化酶(Ndst)、艾杜糖磺酸化酶(Hs2st)以及葡萄糖醛酸异构酶(Clce)基因, 小鼠胚胎可发育至出生, 但并发多种发育缺陷, 包括肾缺失、肺不张、骨骼发育不良, 导致小鼠新死亡^[30~32]. 因为分别缺失这 3 个HS合成关键酶导致了HS微细结构上不同的变化, 因此基因定向敲除为HS结构与功能的研究提供了很好的模

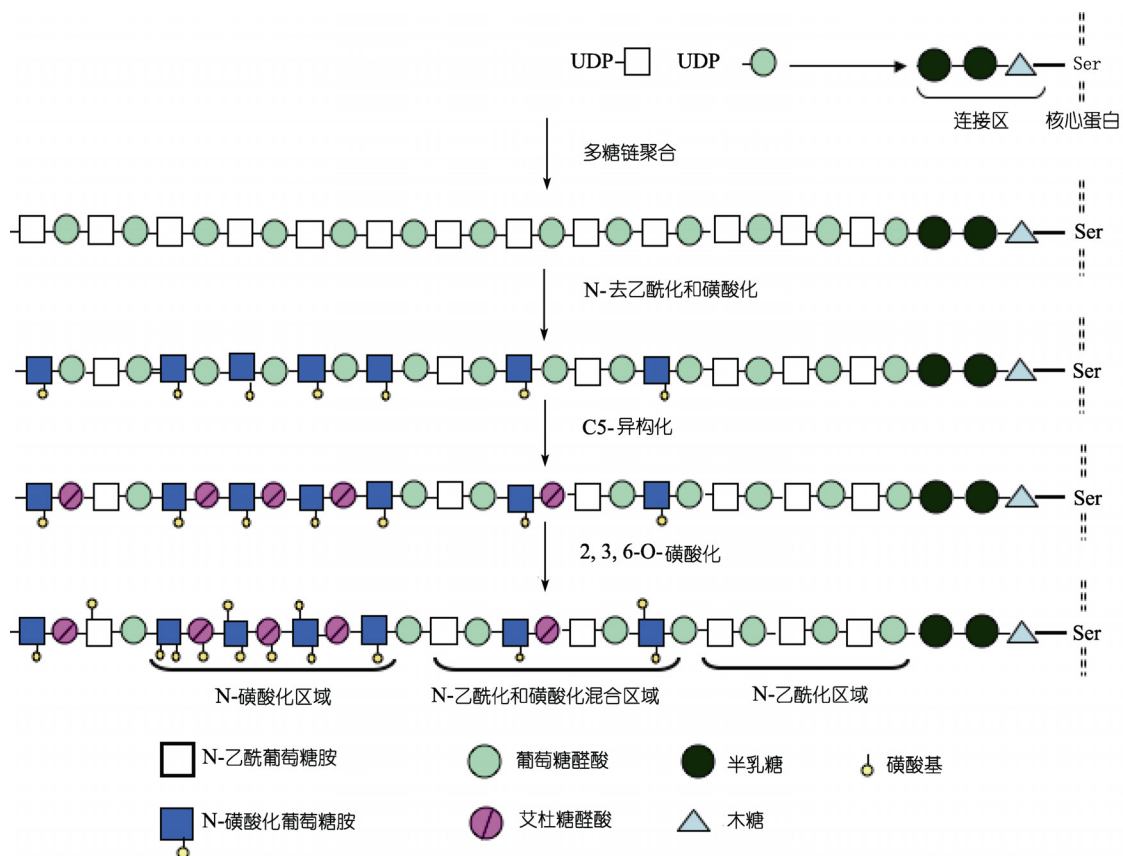


图 1 硫酸肝素的生物合成过程和结构示意图

型, 对研究HS在发育过程中的作用有了重要的推进作用. 同时, 用HS合成酶缺陷的细胞和生化手段的体外实验对于有关HS介导细胞因子信号转导的功能研究也有了很大进展^[33-35]. 然而, 虽然知道HSPG的变化会影响生理平衡, 甚至导致病理变化, 但目前对于HSPG在病理过程中的具体作用仍不甚了解, 本综述旨在讨论有关HSPG与几种病变的关系.

1.2 肝素酶

早期的研究在肥大细胞瘤中最先发现了肝素酶(heparanase, 又称heparanase-1 或类肝素酶)的糖苷内切酶的活性, 由于它特异性地作用于GlcA 和GlcN之间的糖苷键, 被定义为葡萄糖苷酸内切酶. 至今, 多家研究小组的实验结果均提示, 哺乳动物细胞只表达一种具有葡萄糖苷酸内切酶活性的(类)肝素酶, 未发现其异构酶^[36-38]. 曾有文献报道了与肝素酶有 40%氨基酸同源性的蛋白, 称之为肝素酶 2(heparanase- 2)^[39], 但本实验室的研究结果显示, 此蛋白无肝素酶活性(结果未发表). 并且最近本研究组在小鼠上敲除肝素酶基因的研究结果也证明哺乳动物只有一个能表达具有肝素酶活性蛋白的基因^[40].

肝素酶的前体蛋白酶活性很低, 在胞内通过蛋白酶在N-端剪切后, 形成由 8 和 50 kD组成的高活性的二聚体. 此成熟过程中组织蛋白酶(Cathepsin L)可能对肝素酶的活性有关键性的调控作用^[41]. 肝素酶在胞内表达水平受早期生长应答因子(early growth response transcription factor), P53, 炎性细胞因子和低氧的调控^[42]. 研究还发现, 受细胞外PKA 和PKC信号通路的调节, 活性形式的肝素酶可出现于晚期溶酶体或/和内质体并可分泌至细胞外基质, 这种分泌性的肝素酶在pH 5.0~6.0 呈现最大活性, 而当pH>7.5 时活性大大减低^[43]. 除此之外, 肝素酶本身还可能以非酶活性形式参与其他功能^[44].

鉴于HS具有广泛存在及功能多样的特点, 肝素酶对于HS的降解将直接影响机体的多种生物功能. 特别是作为细胞外基质的主要成分, HS的降解将直接影响胞外基质(ECM)和血管基底膜的完整性和生物活性. 所以肝素酶对HS的过度降解可引发机体组织的多种生物学改变, 继而导致病理变化, 如炎症、淀粉样病变、糖尿病性肾病、肿瘤转移和血管增生等^[45-47].

2 HSPG 和疾病

2.1 HSPGs 和淀粉样变性病

淀粉样变性是一类由不同病因引发的以组织、器官中沉积淀粉样蛋白为病理特征的病变. 这类病变典型的病理变化是可溶性蛋白的变性, 继而聚集沉积于组织. 已经发现有 20 多种不同的多肽可形成淀粉样变性, 分别沉积于不同的器官, 导致不同的疾病和临床表现. 值得指出的是, 这些病理变化的一个共性是在淀粉样蛋白的沉积物中有 HSPG. 表 2 列出了几种常见淀粉样病变.

长久以来人们认为HSPG在淀粉样病变中被动地参与沉积物的形成, 但现在越来越多的证据显示, HSPG在淀粉样变性的病理过程中很可能起着积极的作用^[46]. 老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)和糖尿病是两种典型的淀粉样变性临床高发疾病, 其他类型的淀粉样变性疾病发病率虽较低, 但病变及临床症状常常较重.

(1) HSPG 在老年性痴呆病变中的作用. AD 是一种最常见的淀粉样变性疾病, 最突出的临床表现是随着年龄的增长, 患者的认知能力逐渐下降, 典型的病理特征是 β 多肽(amyloid β -peptide, A β)在神经炎性斑块的大量聚集或在脑实质及血管壁的弥散沉积. A β 为蛋白水解酶对淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)的降解而产生的由 40~42 个氨基酸组成的多肽. 早在 1989 年已有研究报道, A β 淀粉样病变

表 2 与 HSPG 结合的淀粉样蛋白

淀粉样蛋白名称	缩写	相关疾病
血清淀粉样蛋白 A	SAA	淀粉样蛋白 A 病变
β 2 微球蛋白	A β 2M	β 2 血透析相关性淀粉样病变
凝溶胶蛋白	AGel	凝溶胶蛋白淀粉样病变
免疫球蛋白轻链	AL	免疫球蛋白轻链淀粉样病变
溶菌酶	ALys	溶菌酶淀粉样病变
转甲视蛋白	TTR	心肌症及多发性神经病
β 多肽	A β	老年性痴呆
胰岛淀粉样蛋白	IAPP	II 型糖尿病
朊病毒蛋白	PrP	亚急性海绵状脑病变

中HSPG与 $A\beta$ 共同沉积的特性^[48]. 本课题组最近研究发现, $A\beta$ 淀粉样病变中存在不止一种HSPG^[49], 但HSPG在淀粉样病形成过程中的具体作用未见明确报道. 体外实验证明完整的HSPG或HS链均可与APP和 $A\beta$ 结合^[50,51]. 也有研究结果证明, HSPG或HS链具有促进 $A\beta$ 聚集和维持 $A\beta$ 聚集物稳定的作用^[52], 因此推断ECM和细胞表面的HS可能是 $A\beta$ 聚集的契合物或分子伴侣, 但到目前为止尚无体内实验佐证这一结论. 曾有实验结果显示, AD病例的脑实质中HS精确结构有所改变, 如N-磺基的分布^[53], 研究者推测这一改变也许是HS与 $A\beta$ 结合、沉积的前提.

HS能够稳定 $A\beta$ 沉积物也可能是由于 $A\beta$ -HSPG复合物的形成可能阻止了蛋白水解酶对 $A\beta$ 的降解作用. 一个间接的证据是在 $A\beta$ 沉淀中常可检测到集聚蛋白多糖(agrins)的存在, 而agrins含有9个卵泡抑制蛋白(follistatin)样的蛋白酶抑制剂域^[54]; 另一方面, 也有报道认为, HS可通过对天冬氨酸蛋白酶 β 分泌蛋白酶(aspartyl protease β -secretase, 又称 β 位点裂解蛋白, β -site APP-cleaving enzyme 1, BACE-1)的抑制作用, 降低 β APP向 $A\beta$ 的转化^[55,56], 从而减少 $A\beta$ 的沉积, 因此可能具有抑制淀粉样沉淀的作用. 鉴于BACE1是目前治疗AD的靶标之一^[57], 用肝素片段对BACE1活性的抑制作用也成为研究热点^[58].

肝素和硫酸肝素的化学结构非常类似, 不同的是肝素只表达于结缔组织的肥大细胞, 而硫酸肝素则广泛存在于几乎每种细胞. 作为一个抗凝药物, 肝素在临床已经使用了半个多世纪. 由于化学结构的类似性, 肝素常常在实验中被用作硫酸肝素的替代物. 因此, 用低分子肝素处理AD模型小鼠, 可使小鼠脑中AD斑块和 $A\beta$ 的聚集减轻^[59]. 此外, 在过去的十几年里, 对AD的研究多集中在对 $A\beta$ 的形成和沉积的病理过程的研究, 其实及时、有效的清除新产生的 $A\beta$ 对于调节 $A\beta$ 的沉积也非常重要. 近年来的研究发现, $A\beta$ 沉积导致的继发性炎症反应是大脑清除 $A\beta$ 的一个积极的反应机理^[60,61]. 而本研究组最近对肝素酶转基因小鼠^[62]的研究显示, HS和肝素酶可能参与两种主要的清除途径, 即对 $A\beta$ 的天然免疫清除作用和促进蛋白水解酶对 $A\beta$ 的降解作用(未发表资料). 一方面, 细胞表面的HS参与吞噬细胞对 $A\beta$ 的吞噬作用; 另一方面, 血管内皮细胞的HS可能通过调节炎症反

应从而控制 $A\beta$ 通过血脑屏障^[63]. 总的来说, HS在AD病变过程中可能起多方面的作用. 揭示HS的这些作用有助于开发基于肝素和HS的药物, 从而协助改善AD的临床症状.

(2) HSPG和糖尿病. II型糖尿病占糖尿病病人的90%, 主要病因是对胰岛素的抵抗和胰岛细胞分泌功能降低. 大约95% II型糖尿病病人的胰岛郎格罕细胞(Langerhans)内可见淀粉样物沉积, 这些沉积可进一步导致胰岛 β 细胞功能的进行性丧失. 这种淀粉样变性物的主要成分是胰岛淀粉样多肽(islet amyloid polypeptide, IAPP). IAPP是IAPP前体蛋白的非正常降解产物^[64], 可与细胞间质和基底膜中的HSPG相互作用^[65]. 此外, 肾小球基底膜晶体渗透压的改变主要取决于HS的含量, 而在糖尿病并发的肾脏病变中肾组织中HS的含量降低^[66]. 由于缺乏适合的组织标本和动物模型, 目前对HS与IAPP的相互作用报道较少, 而有关HSPG在糖尿病淀粉样变性形成过程中的作用的了解更少. 目前对HS在糖尿病的病理过程中作用的了解主要来源于对糖尿病肾脏病变的研究而不是糖尿病本身^[67]. 但目前一些研究者开始关注HS在IAPP沉积过程中的作用^[68,69]. 将来的研究应用IAPP转基因小鼠^[70]以及HS代谢失调的小鼠模型有望进一步了解HS在胰腺和胰岛内IAPP沉积以及胰岛素释放的病理过程的作用.

(3) HSPG和其他的淀粉样变性. 与AD和糖尿病不同, 大部分淀粉样变性疾病并不常见. 这些相对罕见的病变多为系统性和家族性, 但也不乏散发性. 虽然由于引发淀粉样变性的多肽类型的不同, 病变可表现于不同的器官, 如肝、脾、肾、心脏和神经系统, 但是都有一个共同的病理特征, 即HSPG与淀粉样蛋白的共沉积. 在这些淀粉样变性疾病中, 对HSPG在急性时相血清淀粉样蛋白A(acute phase protein serum amyloid A, SAA)病变中的作用研究较多. SAA在急性炎症期由肝脏分泌, 血清浓度可升高1000倍, 后常常沉积于肝脏和脾脏引发脏器损伤. 早期研究发现了SAA淀粉样病变的小鼠模型中肝脏和脾脏有淀粉样物和糖胺聚糖的共沉积^[71], 其后发现人工合成的磺酸化糖胺聚糖类似物具有明显降低模型小鼠脾脏SAA沉淀的作用^[72], 说明HS在AA淀粉样变的形成过程中扮演重要角色. 本研究组最近通过肝素酶转基

因鼠的体内实验发现, HS糖链的长度可影响SAA多肽沉积^[46], 同时动物实验也证明低分子肝素可抑制小鼠急性炎症诱发的淀粉样变性^[72].

转甲视蛋白(transthyretin, TTR)淀粉样病变以严重的神经系统和心脏TTR淀粉样沉积为主要病理特性, 表现为散发的老年系统性淀粉样变性、家族性淀粉样变心肌病及中枢神经相关的淀粉样变性^[73,74]. 与SAA淀粉样变性相比, 对于HSPG与TTR淀粉样变性的关系研究的更少. 本研究组最近对散发的老年心脏TTR病变样本切片的免疫染色首次发现, TTR与HS在心肌共沉淀. 同时, 生化实验也证明肝素和HS可促进TTR聚集, 形成不可溶性的纤维(未发表资料). 另一个重要的实验手段是建立可用于TTR病理研究的动物模型. 目前已有超表达TTR淀粉样变性基因的果蝇^[75]模型, 建立TTR小鼠模型的研究也在进行中.

除上述几种淀粉样变性病变, 越来越多的研究结果证实, HS与 $\beta 2$ 微球蛋白($\beta 2$ -microglobulin)^[76]、凝溶胶蛋白(gesolin)^[77]、突触核蛋白(α -synuclein)^[78]以及免疫球蛋白轻链^[79]的沉积也有关. HS在这些病变中的共性是与变性的多肽结合, 促进蛋白纤维的形成, 导致沉积. 此外, 体外实验证明, HS还具有稳定新生多肽寡聚体的作用, HS这些作用可能通过HS链上的磷酸基密集的区域与多肽特定蛋白质序列的结合. 对于这方面的研究需要继续分析淀粉蛋白的特性, 通过突变或选择性的剪接, 确定多肽中与HS结合的序列. 另一方面, 进一步综合各种病例以及动物模型淀粉样病变中HS的结构变化, 从而合理地设计出能够干扰与淀粉样变性多肽结合的HS或类似物小分子糖, 用于预防和治疗淀粉样蛋白聚集相关的疾病.

2.2 HSPG 与肿瘤发生及转移

癌症的病死率与肿瘤的侵袭和转移性密切相关. 肿瘤的转移需要细胞有适当的黏附性、运动和生长能力, 而这些行为必要的条件就是细胞外基质和基底膜结构的改变以及新生血管的形成. HS通过介导细胞与细胞外基质、细胞与细胞之间的黏附性和调节细胞活性因子的活性而影响上述过程. 作为细胞外基质的主要成分, HSPG具有调节多种分子之间的相互

作用和肿瘤细胞转移的能力. HS影响FGF, VEGF及PDGF家族成员及其受体的活性, 从而调节肿瘤新生血管生成^[80]. 除了在肿瘤侵袭和转移中的作用, HS还被发现与原发肿瘤生长有关^[81].

HS在促进肿瘤转移方面的一个重要机理是通过调节储存于细胞外基质中的细胞活性因子^[82]. 如前所述, 葡萄糖酸内切酶, 即肝素酶, 是HS的特异性降解酶^[83,84]. 对于多种肿瘤组织和细胞模型的分析发现, 此酶表达明显增高^[85-87]. 在肝素酶的作用下, 完整的HS被肝素酶降解后, 与HS结合的储存于细胞间质的分子被释放, 由非活性状态的细胞因子变为活性形式进一步刺激肿瘤的生长(图 2). HS促进肿瘤生长转移的另一机理是肿瘤组织中的HS通过改变其精细结构而变得更适合与细胞活性因子结合^[85]. 早期研究发现, 大鼠肝癌细胞的HS结构有所改变^[88], 后来在肺癌^[89]和人原发性肝癌^[90]中也发现HS结构的改变. 近期本研究组分析了人乳腺癌和结肠癌组织中的HS, 发现其总的磷酸化程度增加. 这一高磷酸化的改变使得FGF1, FGF2 更易于与其受体形成复合物^[86]. HS在肿瘤转移中的另一直接作用是肝素酶降解HS后使ECM和基底膜的结构被破坏, 从而易于肿瘤细胞的迁移, 进入血管并进一步扩散^[91,92]. 以上机理都与肝素酶活性相关, 因此肝素酶也成为与肿瘤转移密切相关的标志物. 而基因敲除小鼠肝素酶基因对小鼠的发育和生长未造成任何影响^[40], 这一事实提示用肝素酶抑制剂治疗肿瘤的安全性.

遗传性多发性骨瘤(hereditary multiple exostosis, HME)是第一个被证明HS合成酶缺陷可导致肿瘤发生的实例^[81]. HME是一种常染色体异常导致的发生于长骨骨骺端的多发性骨瘤^[93]. 最初的遗传研究揭示, HME是染色体 8q24(*EXT1*), 11p11-13(*EXT2*), 19p(*EXT3*)共 3 处的多基因异常性的遗传病. *EXT*后来被证实是编码硫酸肝素聚合酶(polymerase)的基因^[94]. 值得注意的是, 最近有报道显示, HS合成中的另一个关键酶, C5 葡萄糖醛酸异构酶(Hsepi)具有抑制乳腺癌细胞生长的作用^[95], 但是还没有发现临床病例.

另外一个调节 HS 在肿瘤生物学作用的酶是 C6-内脱磺基酶(endo-6-O-sulfotase, Sulf), 其功能是选择性地去除葡萄糖酰胺六号碳上的磺基. Sulf 在哺乳细胞内有 2 个异构体, 即 Sulf1 和 Sulf2. 与肝素酶类似,

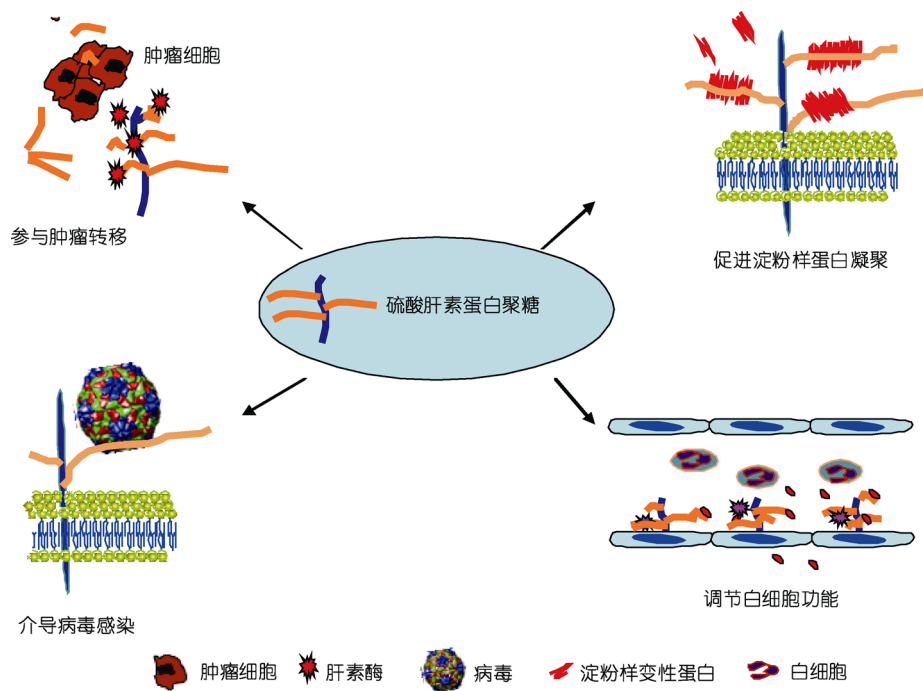


图 2 HSPG 在一些疾病中的作用示意图

修饰酶在多数肿瘤组织中表达增高, 可能通过调节某些生长因子, 如Wnt^[96], VEGF, SDF-1 和FGF-1^[97], GDNF^[98]和FGF2 的活性^[99], 从而促进肿瘤的进一步恶化. Sulf的这些作用是缘于对HS去磺酸化的作用, 亦或通过其他途径影响肿瘤的生长尚无确切定论.

虽然HSPG的生物学功能主要源于HS糖链, 但有报道指出核心蛋白本身在肿瘤生物学中也具有重要功能. 比如, Sydecn-1 核心蛋白被脱落酶(主要指蛋白酶)水解切除后, 使得HSPG从细胞表面脱落, 释放出的核心蛋白外部区域具有活性功能^[100].

总之, HS 合成酶、修饰酶和降解酶对 HS 结构细微的改变和生长因子活性的影响在肿瘤转移和血管形成方面起重要作用, 深入认识 HSPG 的结构和功能对肿瘤微环境的影响将为肿瘤治疗提供新思路.

2.3 HSPG 和炎症反应

炎症反应是机体对损伤刺激的防御性反应. 这种保护性行为始于增加白细胞从血管向损伤部位的移动, 继而是一系列生化反应以促进炎症反应的进程, 涉及局部血管系统、免疫系统和损伤部位的多种细胞. 这个系列的关键步骤是启动白细胞表面的选

择素与内皮细胞表面的HS的相互作用, 使得循环系统的粒细胞移动缓慢并沿血管壁滚动. 内皮细胞表面的HS可激活白细胞黏附分子—整合素, 促进炎性细胞黏附并停止滚动直至穿透血管壁. 另一重要步骤是激活趋化因子, 如内皮细胞表面HS为吸引白细胞而呈递的MIP(macrophage inflammatory protein)和白细胞介素. 最近, 应用倒置显微镜实时、慢速观察活体内炎性血管, 发现在内皮细胞连接处黏附的白细胞通常行进缓慢、横向或逆流移动, 并且这种缓慢移动受趋化物包括内皮细胞表面HS的影响^[101]. 生化实验结果显示, HS可与多种炎性趋化因子结合, 包括MIP^[102], RANTES^[103], IL-2^[104], IL-8^[105]和IL-10^[106], 从而影响或调节这些因子在炎症过程中的功能.

直接揭示HS参与炎症反应过程的体内实验数据目前还较少见, 但是最近对选择性失活HS合成酶之一——NDST1 模型小鼠白细胞和内皮细胞的研究提供了HS参与炎症反应的直接证据^[107]. 这种模型小鼠对炎症的刺激反应明显减弱, 明确提示是由于白细胞表面L-选择素对内皮细胞表面HS结构的依赖. 实验结果同时显示, 内皮细胞HS的N-, O-磺酸化程度对于白细胞运动起调控作用, 而白细胞表面HS对于

其自身的运动影响不大^[107]。此外, 动物体内白细胞与HS直接作用可诱导、促进免疫细胞及Th1 细胞因子对炎症的反应^[108]。这些发现同时提示, 其他参与HS合成的修饰酶缺陷可能也将导致类似的结果, 相关研究值得关注。

由于肝素酶通过降解HS能够调节其结构, 从此种意义上看肝素酶也是参与炎症反应的重要分子。已有研究报道在不同的炎症状态下肝素酶的表达水平有所改变, 包括过敏性结肠炎(inflammatory bowl disease)^[109]和风湿性关节炎^[110]。早期的研究显示, 炎症条件下, 被激活的血小板迅速释放大量肝素酶, 从而降解内皮细胞表面的HS^[111]。再者, HSPG是ECM的主要成分, 肝素酶降解HS可能影响ECM的构架, 促进锚定在ECM网架中的趋化因子的释放。同时, ECM结构的改变将促进炎症细胞向损伤部位的游动。

2.4 HSPG 与微生物感染

病毒的存活和复制需要依赖宿主的设施进行, 复制过程包括与宿主接触、融合、通过高尔基体转运、装配和从宿主表面出芽。这一过程关键的步骤是病毒通过宿主细胞表面受体进入细胞。鉴于病毒感染的首要步骤是与细胞表面接触, 从而进入细胞, 病毒与细胞表面受体的结合至关重要。不同的病毒种类选择不同的家族成员作为受体, 一类常见的受体是整合素家族^[112]; 另一类是广泛存在于各种组织细胞表面的HS, 是病毒接近、附着宿主的初级受体。在这一领域中研究最早和最多的是单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)通过与细胞表面HS结合感染上皮细胞^[113], 其后, 发现多种病毒利用HS作为初始受体。至今, 大约有 20 种病毒被证明通过HS进入细胞, 包括HIV、手足口病病毒、Sindbis病毒(表 3)。

辛德毕斯病毒(SV)属于RNA病毒家族, 可在昆虫、鸟类和人类哺乳细胞中复制^[132]。这种以蚊子为宿主的RNA病毒具有广泛地理分布和传播的特性, 尽管发生率低, 但可在特定区域对人类造成威胁, 引起发热、皮疹、关节痛、肌肉痛和致命的脑炎。两个外壳糖蛋白, E1 和E2, 是病毒进入细胞的关键蛋白, 这两个病毒表面蛋白具有HS依赖性^[121]。E1 和E2 的点突变提示碱性氨基酸是E1 和E2 尤其是E2 与HS结合的关键^[133]。

表 3 利用细胞表面 HS 作为受体的病毒

病毒	参考文献
单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV)	[113]
人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)	[114]
水痘一带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV)	[115]
伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus)	[116]
口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV)	[117]
登革病毒 (dengue virus, DENV)	[118]
II 型腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV)	[119]
痘苗病毒(vaccinia virus)	[120]
辛德毕斯病毒(sindbis virus, SINV)	[121]
人呼吸道合胞病毒 (human respiratory syncytial virus, RSV)	[122]
猪瘟病毒(swine fever virus)	[123]
委内瑞拉马脑脊髓炎病毒 (venezuelan equine encephalitis virus, VEEV)	[124]
蜱传脑炎病毒 (tick-borne encephalitis virus, TBEV)	[125]
罗斯河病毒(ross River virus, RRV)	[126]
人类III型副流感病毒 (human parainfluenza virus type 3)	[127]
丙型肝炎病毒(hepatitis C virus)	[128]
乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)	[129]
人类 I 型 T 细胞白血病病毒 (human T-cell leukemia virus, HTLV)	[130]
禽传染性支气管炎冠状病毒 (avian coronavirus infectious bronchitis virus)	[131]

HIV感染后的不可治性使之成为最具危险性的病毒之一。HIV进入细胞的一个机理是通过衣壳蛋白-gp120 与宿主细胞表面的HS反应^[134], 也就是说, HS可能是HIV在细胞表面的一个受体。直接的证据是经细菌肝素酶处理后, HIV对淋巴瘤细胞的易感性降低^[135]。后来的研究表明, 从HIV感染的细胞释放的Tat蛋白, 可与HS作用储存在细胞外间质中^[136]。除了与病毒蛋白直接反应外, HS还调节具有抗病毒活性的趋化因子的作用^[137]。现有的实验数据提示, 干扰细胞表面HS与HIV衣壳蛋白, 即gp120 或Tat的选择性反应有望达到干扰病毒吸附和进入细胞。

相比于近代爆发的由HIV感染引起的AIDS病, 疟疾是一个经典的传染病. 虽经一个世纪的努力疟疾的蔓延得到了控制, 但由于疾病病理过程的复杂性和对现有药物的抗药性疟疾并未得到完全控制, 每年仍约有 100 万人死亡. 因此, 研发新的抗疟药物仍是预防和治疗疟疾的关键. 最近的研究显示, HS具有介导感染红细胞与血管内皮细胞、正常红细胞与血管内皮细胞相互结合的作用, 这种作用可被肝素衍生物抑制^[138]. 实验证明, 疟原虫环子孢子蛋白与高磺酸化HS结合, 而此蛋白也是疟疾孢子附着肝细胞的位点, 提示HS可能参与疟疾生命周期一个或多个阶段. 因此, 目前进行的对HS与疟原虫结合部位序列的研究将有助于找到新的治疗和预防疟疾的药物. 图2总结了HSPG在以上讨论的几种疾病中的作

用.

3 结语

HS 的广泛存在性和多功能性使得 HS 在生理、病理状态下的作用逐渐受到关注. 目前最迫切需要阐明的是 HS 生物合成的调控, 从而解释 HS 与多种不同的蛋白质配体结合的分子机理. 推测所有与 HS 结合的蛋白分子可能以一个共同的机制与带负电荷的 HS 结合, 但不同分子可能选择 HS 长链中不同的序列作为结合位点. 因此解析不同病变组织中 HS 的精细结构, 设计可阻止 HS 与活性蛋白结合的特定的寡糖或类似物具有潜在的预防和治疗上述疾病的应用前景.

参考文献

- 1 Kirkpatrick C A, Selleck S B. Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *J Cell Sci*, 2007, 120: 1829—1832[DOI]
- 2 Gautam M, Noakes P G, Moscoso L, et al. Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell*, 1996, 85: 525—535[DOI]
- 3 Cano-Gauci D F, Song H H, Yang H, et al. Glypican-3-deficient mice exhibit developmental overgrowth and some of the abnormalities typical of Simpson-Golabi-Beckwith syndrome. *J Cell Biol*, 1999, 146: 255—264
- 4 Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, et al. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet*, 1999, 23: 354—358[DOI]
- 5 Costell M, Gustafsson E, Aszódi A, et al. Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol*, 1999, 147: 1109—1122[DOI]
- 6 Alexander C M, Reichsman F, Hinkes M T, et al. Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet*, 2000, 25: 329—332[DOI]
- 7 Kaksonen M, Pavlov I, Vöikar V, et al. Syndecan-3-deficient mice exhibit enhanced LTP and impaired hippocampus-dependent memory. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 21: 158—172[DOI]
- 8 Strader A D, Reizes O, Woods S C, et al. Mice lacking the syndecan-3 gene are resistant to diet-induced obesity. *J Clin Invest*, 2004, 114: 1354—1360
- 9 Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, et al. Syndecan-4 deficiency impairs focal adhesion formation only under restricted conditions. *J Biol Chem*, 2000, 275: 5249—5252[DOI]
- 10 Bartlett A H, Hayashida K, Park P W. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells*, 2007, 24: 153—166
- 11 Carey D J. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J*, 1997, 327: 1—16
- 12 Oh E S, Couchman J R. Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol Cells*, 2004, 17: 181—187
- 13 Reizes O, Lincecum J, Wang Z, et al. Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. *Cell*, 2001, 106: 105—116[DOI]
- 14 Woods A, Couchman J R. Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 578—583[DOI]
- 15 David G, Lories V, Decock B, et al. Molecular cloning of a phosphatidylinositol-anchored membrane heparan sulfate proteoglycan from human lung fibroblasts. *J Cell Biol*, 1990, 111: 3165—3176[DOI]
- 16 Litwack E D, Ivins J K, Kumbasar A, et al. Expression of the heparan sulfate proteoglycan glypican-1 in the developing rodent. *Dev Dyn*,

- 1998, 211: 72—87[DOI]
- 17 Ivins J K, Litwack E D, Kumbasar A, et al. Cerebroglycan, a developmentally regulated cell-surface heparan sulfate proteoglycan, is expressed on developing axons and growth cones. *Dev Biol*, 1997, 184: 320—332[DOI]
- 18 Fransson L A, Belting M, Cheng F, et al. Novel aspects of glypican glycobiology. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61: 1016—1024[DOI]
- 19 Knox S M, Whitelock J M. Perlecan: how does one molecule do so many things? *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 2435—2445[DOI]
- 20 Rupp F, Payan D G, Magill-Solc C, et al. Structure and expression of a rat agrin. *Neuron*, 1991, 6: 811—823[DOI]
- 21 Bezakova G, Ruegg M A. New insights into the roles of agrin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 295—308[DOI]
- 22 Lindahl U, Li J P. Interactions between heparan sulfate and proteins-design and functional implications. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2009, 276: 105—159[DOI]
- 23 Esko J D, Lindahl U. Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest*, 2001, 108: 169—173
- 24 Lindahl U. Biosynthesis of heparin. *Biochem Soc Trans*, 1990, 18: 803—805
- 25 Ledin J, Staatz W, Li J P, et al. Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J Biol Chem*, 2004, 279: 42732—42741[DOI]
- 26 Bishop J R, Schuksz M, Esko J D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, 2007, 446: 1030—1037[DOI]
- 27 Kreuger J, Spillmann D, Li J P, et al. Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J Cell Biol*, 2006, 174: 323—327[DOI]
- 28 Lindahl U. Heparan sulfate-protein interactions-a concept for drug design? *Thromb Haemost*, 2007, 98: 109—115
- 29 Lin X, Wei G, Shi Z, et al. Disruption of gastrulation and heparan sulfate biosynthesis in EXT1-deficient mice. *Dev Biol*, 2000, 224: 299—311[DOI]
- 30 Ringvall M, Ledin J, Holmborn K, et al. Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. *J Biol Chem*, 2000, 275: 25926—25930[DOI]
- 31 Li J P, Gong F, Hagner-McWhirter A, et al. Targeted disruption of a murine glucuronyl C5-epimerase gene results in heparan sulfate lacking L-iduronic acid and in neonatal lethality. *J Biol Chem*, 2003, 278: 28363—28366[DOI]
- 32 Bullock S L, Fletcher J M, Beddington R S, et al. Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev*, 1998, 12: 1894—1906[DOI]
- 33 Coombe D R, Kett W C. Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 410—424[DOI]
- 34 Jastrebova N, Vanwildemeersch M, Rapraeger A C, et al. Heparan sulfate-related oligosaccharides in ternary complex formation with fibroblast growth factors 1 and 2 and their receptors. *J Biol Chem*, 2006, 281: 26884—26892[DOI]
- 35 Jia J, Maccarana M, Zhang X, et al. Lack of L-iduronic acid in heparan sulfate affects interaction with growth factors and cell signaling. *J Biol Chem*, 2009, 284: 15942—15950[DOI]
- 36 Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, et al. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 1999, 5: 735—736[DOI]
- 37 Hulett M D, Freeman C, Hamdorf B J, et al. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med*, 1999, 5: 735—736[DOI]
- 38 Toyoshima M, Nakajima M. Human heparanase: purification, characterization, cloning, and expression. *J Biol Chem*, 1999, 274: 24153—24160[DOI]
- 39 McKenzie E, Tyson K, Stamps A, et al. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276: 1170—1177[DOI]
- 40 Zcharia E, Jia J, Zhang X, et al. Newly generated heparanase knock-out mice unravel co-regulation of heparanase and matrix metalloproteinases. *PLoS One*, 2009, 4: e5181[DOI]
- 41 Abboud-Jarrous G, Atzmon R, Peretz T, et al. Cathepsin L is responsible for processing and activation of proheparanase through multiple cleavages of a linker segment. *J Biol Chem*, 2008, 283: 18167—18176[DOI]
- 42 Sandwall E, Bodevin S, Nasser N J, et al. Molecular structure of heparan sulfate from *Spalax*. Implications of heparanase and hypoxia. *J Biol Chem*, 2009, 284: 3814—3822[DOI]
- 43 Shafat I, Vlodavsky I, Ilan N. Characterization of mechanisms involved in secretion of active heparanase. *J Biol Chem*, 2006, 281: 23804—23811[DOI]

- 44 Fux L, Feibish N, Cohen-Kaplan V, et al. Structure-function approach identifies a COOH-terminal domain that mediates heparanase signaling. *Cancer Res*, 2009, 69: 1758—1767[DOI]
- 45 Vlodavsky I, Elkin M, Abboud-Jarrous G, et al. Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression. *Connect Tissue Res*, 2008, 49: 207—210[DOI]
- 46 Li J P, Galvis M L, Gong F, et al. *In vivo* fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein A amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 6473—6477[DOI]
- 47 Nasser N J. Heparanase involvement in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 1706—1715[DOI]
- 48 Snow A D, Wight T N. Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiol Aging*, 1989, 10: 481—497[DOI]
- 49 O'Callaghan P, Sandwall E, Li J P, et al. Heparan sulfate accumulation with Abeta deposits in Alzheimer's disease and Tg2576 mice is contributed by glial cells. *Brain Pathol*, 2008, 18: 548—561
- 50 Van Horssen J, Wesseling P, van den Heuvel LvP, et al. Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol*, 2003, 2: 482—492[DOI]
- 51 Narindrasorasak S, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, et al. High affinity interactions between the Alzheimer's beta-amyloid precursor proteins and the basement membrane form of heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem*, 1991, 266: 12878—12883
- 52 Snow A D, Sekiguchi R, Nochlin D, et al. An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron*, 1994, 12: 219—234[DOI]
- 53 Lindahl B, Eriksson L, Lindahl U. Structure of heparan sulphate from human brain, with special regard to Alzheimer's disease. *Biochem J*, 1995, 306: 177—184
- 54 Biroc S L, Payan D G, Fisher J M. Isoforms of agrin are widely expressed in the developing rat and may function as protease inhibitors. *Brain Res Dev Brain Res*, 1993, 75: 119—129[DOI]
- 55 Scholefield Z, Yates E A, Wayne G, et al. Heparan sulfate regulates amyloid precursor protein processing by BACE1, the Alzheimer's beta-secretase. *J Cell Biol*, 2003, 163: 97—107[DOI]
- 56 Patey S J. The role of heparan sulfate in the generation of Abeta. *Drug News Perspect*, 2006, 19: 411—416[DOI]
- 57 Cole S L, Vassar R. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener*, 2007, 2: 1—25[DOI]
- 58 Patey S J, Edwards E A, Yates E A, et al. Engineered heparins: novel beta-secretase inhibitors as potential Alzheimer's disease therapeutics. *Neurodegener Dis*, 2008, 5: 197—199[DOI]
- 59 Bergamaschini L, Rossi E, Storini C, et al. Peripheral treatment with enoxaparin, a low molecular weight heparin, reduces plaques and beta-amyloid accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2004, 24: 4181—4186[DOI]
- 60 Deane R, Bell R D, Sagare A, et al. Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2009, 8: 16—30[DOI]
- 61 Bates K A, Verdile G, Li Q X, et al. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry*, 2009, 14: 469—486[DOI]
- 62 Zcharia E, Metzger S, Chajek-Shaul T, et al. Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis, vascularization, and feeding behavior. *FASEB J*, 2004, 18: 252—263[DOI]
- 63 Deane R, Wu Z, Sagare A, et al. LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron*, 2004, 43: 333—344[DOI]
- 64 Betsholtz C, Christmansson L, Engström U, et al. Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (IAPP) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS Lett*, 1989, 251: 261—264[DOI]
- 65 Abedini A, Tracz S M, Cho J H, et al. Characterization of the heparin binding site in the N-terminus of human pro-islet amyloid polypeptide: implications for amyloid formation. *Biochemistry*, 2006, 45: 9228—9237[DOI]
- 66 Lewis E J, Xu X. Abnormal glomerular permeability characteristics in diabetic nephropathy: implications for the therapeutic use of low-molecular weight heparin. *Diabetes Care*, 2008, 31: S202—S207[DOI]
- 67 Yokoyama H, Høyer P E, Hansen P M, et al. Immunohistochemical quantification of heparan sulfate proteoglycan and collagen IV in skeletal muscle capillary basement membranes of patients with diabetic nephropathy. *Diabetes*, 1997, 46: 1875—1880[DOI]
- 68 Hull R L, Zraika S, Udayasankar J, et al. Inhibition of glycosaminoglycan synthesis and protein glycosylation with WAS-406 and azaserine result in reduced islet amyloid formation *in vitro*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 293: C1586—C1593[DOI]

- 69 Paulsson J F, Andersson A, Westermark P, et al. Intracellular amyloid-like deposits contain unprocessed pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) in beta cells of transgenic mice overexpressing the gene for human IAPP and transplanted human islets. *Diabetologia*, 2006, 49: 1237—1246[DOI]
- 70 Inoue S, Hultin P G, Szarek W A, et al. Effect of poly(vinylsulfonate) on murine AA amyloid: a high-resolution ultrastructural study. *Lab Invest*, 1996, 74: 1081—1090
- 71 Lyon A W, Narindrasorasak S, Young I D, et al. Co-deposition of basement membrane components during the induction of murine splenic AA amyloid. *Lab Invest*, 1991, 64: 785—790
- 72 Zhu H, Yu J, Kindy M S. Inhibition of amyloidosis using low-molecular-weight heparins. *Mol Med*, 2001, 7: 517—522
- 73 Hou X, Aguilar M I, Small D H. Transthyretin and familial amyloidotic polyneuropathy. Recent progress in understanding the molecular mechanism of neurodegeneration. *FEBS J*, 2007, 274: 1637—1650[DOI]
- 74 Stangou A J, Hawkins P N. Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy. *Curr Opin Neurol*, 2004, 17: 615—620[DOI]
- 75 Pokrzywa M, Dacklin I, Hultmark D, et al. Misfolded transthyretin causes behavioral changes in a *Drosophila* model for transthyretin-associated amyloidosis. *Eur J Neurosci*, 2007, 26: 913—924[DOI]
- 76 Relini A, De Stefano S, Torrassa S, et al. Heparin strongly enhances the formation of beta2-microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *J Biol Chem*, 2008, 283: 44912—44920
- 77 Suk J Y, Zhang F, Balch W E, et al. Heparin accelerates gelsolin amyloidogenesis. *Biochemistry*, 2006, 45: 2234—2242[DOI]
- 78 Cohlberg J A, Li J, Uversky V N, et al. Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein *in vitro*. *Biochemistry*, 2002, 41: 1502—1511[DOI]
- 79 Stevens F J, Kisilevsky R. Immunoglobulin light chains, glycosaminoglycans, and amyloid. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57: 441—449[DOI]
- 80 Iozzo R V, San Antonio J D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest*, 2001, 108: 349—355
- 81 Stickens D, Zak B M, Rougier N, et al. Mice deficient in Ext2 lack heparan sulfate and develop exostoses. *Development*, 2005, 132: 5055—5068[DOI]
- 82 Vlodavsky I, Fuks Z, Ishai-Michaeli R, et al. Extracellular matrix-resident basic fibroblast growth factor: implication for the control of angiogenesis. *J Cell Biochem*, 1991, 45: 167—176[DOI]
- 83 Pikas D S, Li J P, Vlodavsky I, et al. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. *J Biol Chem*, 1998, 273: 18770—18777[DOI]
- 84 Gong F, Jemth P, Escobar Galvis M L, et al. Processing of macromolecular heparin by heparanase. *J Biol Chem*, 2003, 278: 35152—35158
- 85 Escobar Galvis M L, Jia J, Zhang X, et al. Transgenic or tumor-induced expression of heparanase upregulates sulfation of heparan sulfate. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 773—778[DOI]
- 86 Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest*, 2001, 108: 341—347
- 87 Chen G, Dang Y W, Luo D Z, et al. Expression of heparanase in hepatocellular carcinoma has prognostic significance: a tissue microarray study. *Oncol Res*, 2008, 17: 183—189[DOI]
- 88 Robinson J, Viti M, Höök M. Structure and properties of an under-sulfated heparan sulfate proteoglycan synthesized by a rat hepatoma cell line. *J Cell Biol*, 1984, 98: 946—953[DOI]
- 89 Nackaerts K, Verbeken E, Deneffe G, et al. Heparan sulfate proteoglycan expression in human lung-cancer cells. *Int J Cancer*, 1997, 74: 335—345[DOI]
- 90 Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, et al. Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *Int J Cancer*, 1997, 74: 482—491
- 91 Dempsey L A, Brunn G J, Platt J L. Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25: 349—351[DOI]
- 92 Parish C R, Freeman C, Hulett M D. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1471: M99—M108
- 93 Hecht J T, Hogue D, Strong L C, et al. Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome II and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes II and 8. *Am J Hum Genet*, 1995, 56: 1125—1131
- 94 Lind T, Tufaro F, McCormick C, et al. The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J Biol Chem*, 1998, 273: 26265—26268[DOI]

- 95 Grigorieva E, Eshchenko T, Rykova V I, et al. Decreased expression of human D-glucuronyl C5-epimerase in breast cancer. *Int J Cancer*, 2008, 122: 1172—1176[DOI]
- 96 Ai X, Do A T, Lozynska O, et al. QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J Cell Biol*, 2003, 162: 341—351[DOI]
- 97 Uchimura K, Morimoto-Tomita M, Bistrup A, et al. HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem*, 2006, 7: 1—13[DOI]
- 98 Michos O, Gonçalves A, Lopez-Rios J, et al. Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development*, 2007, 134: 2397—2405[DOI]
- 99 Lamanna W C, Frese M A, Balleininger M, et al. Sulf loss influences N-, 2-O-, and 6-O-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem*, 2008, 283: 27724—27735[DOI]
- 100 Yang Y, Macleod V, Miao H Q, et al. Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J Biol Chem*, 2007, 282: 13326—13333[DOI]
- 101 Phillipson M, Heit B, Colarusso P, et al. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, 2006, 203: 2569—2575[DOI]
- 102 Stringer S E, Nelson M S, Gupta P. Identification of an MIP-1 α -binding heparan sulfate oligosaccharide that supports long-term *in vitro* maintenance of human LTC-ICs. *Blood*, 2003, 101: 2243—2245[DOI]
- 103 Vives R R, Sadir R, Imberty A, et al. A kinetics and modeling study of RANTES(9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerization. *Biochemistry*, 2002, 41: 14779—14789[DOI]
- 104 Najjam S, Mulloy B, Theze J, et al. Further characterization of the binding of human recombinant interleukin 2 to heparin and identification of putative binding sites. *Glycobiology*, 1998, 8: 9—16
- 105 Spillmann D, Witt D, Lindahl U. Defining the Interleukin-8-binding Domain of Heparan Sulfate. *J Biol Chem*, 1998, 273: 15487—15493[DOI]
- 106 Salek-Ardakani S, Arrand J R, Shaw D, et al. Heparin and heparan sulfate bind interleukin-10 and modulate its activity. *Blood*, 2000, 96: 1879—1888
- 107 Wang L, Fuster M, Sriramarao P, et al. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory response. *Nat Immunol*, 2005, 6: 861—862[DOI]
- 108 Parish C R. Heparan sulfate and inflammation. *Nat Immunol*, 2005, 6: 861—862[DOI]
- 109 Waterman M, Ben-Izhak O, Eliakim R, et al. Heparanase upregulation by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Mod Pathol*, 2007, 20: 8—14[DOI]
- 110 Li R W, Freeman C, Yu D, et al. Dramatic regulation of heparanase activity and angiogenesis gene expression in synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2008, 58: 1590—1600[DOI]
- 111 Ihrcke N S, Parker W, Reissner K J, et al. Regulation of platelet heparanase during inflammation: role of pH and proteinases. *J Cell Physiol*, 1998, 175: 255—267[DOI]
- 112 Triantafilou K, Takada Y, Triantafilou M. Mechanisms of integrin-mediated virus attachment and internalization process. *Crit Rev Immunol*, 2001, 21: 311—322
- 113 WuDunn D, Spear P G. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol*, 1989, 63: 52—58
- 114 Roderiquez G, Oravecz T, Yanagishita M, et al. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J Virol*, 1995, 69: 2233—2239
- 115 Zhu Z, Gershon M D, Gabel C, et al. Entry and egress of varicella-zoster virus: role of mannose 6-phosphate, heparan sulfate proteoglycan, and signal sequences in targeting virions and viral glycoproteins. *Neurology*, 1995, 45: S15—17
- 116 Trybala E, Bergström T, Spillmann D, et al. Mode of interaction between pseudorabies virus and heparan sulfate/heparin. *Virology*, 1996, 218: 35—42[DOI]
- 117 Jackson T, Ellard F M, Ghazaleh R A, et al. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 1996, 70: 5282—5287
- 118 Chen Y, Maguire T, Hileman R E, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med*, 1997, 3: 866—871[DOI]
- 119 Summerford C, Samulski R J. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J*

- Viol, 1998, 72: 1438—1445
- 120 Chung C S, Hsiao J C, Chang Y S, et al. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. J Virol, 1998, 72: 1577—1585
- 121 Byrnes A P, Griffin D E. Binding of Sindbis virus to cell surface heparan sulfate. J Virol, 1998, 72: 7349—7356
- 122 Lin M, Lin F, Mallory M, et al. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. J Virol, 2000, 74: 11619—11625[DOI]
- 123 Hulst M M, van Gennip H G, Vlot A C, et al. Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication *in vivo* and virulence. J Virol, 2001, 75: 9585—9595[DOI]
- 124 Bernard K A, Klimstra W B, Johnston R E. Mutations in the E2 glycoprotein of Venezuelan equine encephalitis virus confer heparan sulfate interaction, low morbidity, and rapid clearance from blood of mice. Virology, 2000, 276: 93—103[DOI]
- 125 Mandl C W, Kroschewski H, Allison S L, et al. Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation *in vivo*. J Virol, 2001, 75: 5627—5637[DOI]
- 126 Heil M L, Albee A, Strauss J H, et al. An amino acid substitution in the coding region of the E2 glycoprotein adapts Ross River virus to utilize heparan sulfate as an attachment moiety. J Virol, 2001, 75: 6303—6309[DOI]
- 127 Bose S, Banerjee A K. Role of heparan sulfate in human parainfluenza virus type 3 infection. Virology, 2002, 298: 73—83[DOI]
- 128 Barth H, Schafer C, Adah M I, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. J Biol Chem, 2003, 278: 41003—41012[DOI]
- 129 Cooper A, Tal G, Lider O, et al. Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. J Immunol, 2005, 175: 3165—3176
- 130 Jones K S, Petrow-Sadowski C, Bertolette D C, et al. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD⁴⁺ T cells. J Virol, 2005, 79: 12692—12702[DOI]
- 131 Madu I G, Chu V C, Lee H, et al. Heparan sulfate is a selective attachment factor for the avian coronavirus infectious bronchitis virus Beaudette. Avian Dis, 2007, 51: 45—51[DOI]
- 132 Zhu W Y, Wang L H, Yang Y L, et al. Interaction of E2 glycoprotein with heparan sulfate is crucial for cellular infection of Sindbis virus. PLoS ONE, 2010, in press
- 133 Strauss J H, Strauss E G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. Microbiol Rev, 1994, 58: 491—562
- 134 Vivès R R, Imberty A, Sattentau Q J, et al. Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site. J Biol Chem, 2005, 280: 21353—21357
- 135 Patel M, Yanagishita M, Roderiquez G, et al. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993, 9: 167—174[DOI]
- 136 Rusnati M, Coltrini D, Oreste P, et al. Interaction of HIV-1 Tat protein with heparin. Role of the backbone structure, sulfation, and size. J Biol Chem, 1997, 272: 11313—11320[DOI]
- 137 Wagner L, Yang O O, Garcia-Zepeda E A, et al. Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. Nature, 1998, 391: 908—911[DOI]
- 138 Vogt A M, Pettersson F, Moll K, et al. Release of sequestered malaria parasites upon injection of a glycosaminoglycan. PLoS Pathog, 2006, 2: 853—863

Implication of heparan sulfate proteoglycans in diseases

GONG Feng¹, ZHANG Xiao² & LI JinPing^{1,3}

¹ *Beijing institute of transfusion medicine, Beijing 100850, China*

² *Institute of Complexity Science, Qingdao University, Qingdao 266071, China*

³ *Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Uppsala University, Uppsala 75123, Sweden*

Heparan sulfate proteoglycan (HSPG), a group of macromolecular glycoconjugates expressed on the cell surfaces and in the extracellular matrix (ECM), is essential for animal development and homeostasis. HSPG participates in many important biological activities, mostly through interactions of the side heparan sulfate (HS) polysaccharide chains with a wide range of protein ligands. Cell surface HS interacts with growth factors and their receptors, mediating signal transduction. As a main component of the ECM, HSPG maintains the integrity and architecture of the ECM together with collagens. Heparanase specifically degrades HS, hence affects a range of biological activities and microenvironment of the ECM by cleavage of HS. Accordingly, to uncover the molecular structure of HS and its biological correlation has become very important under normal and disease conditions. Due to the complicated heterogeneous structure of HS, progress on analysis of HS molecular properties and its interaction with proteins has been relatively slow. Recently, with development of advanced technologies, activities in this research field are significantly increased. Given the dramatic expansion of the field in investigation of the physiopathological functions of HSPG and heparanase, we do not endeavor to comprehensively cover all aspects of this development. Excellent reviews dealing with structural, metabolic, and functional aspects of HS, with detailed account of methodological progress regarding HS compositional and sequence analysis, conformational aspects, and HS-protein interactions, have been published (see references). The primary aim of this review is to discuss the roles of HS in diseases with hope to shed light on development of therapeutics targeting HSPGs.

heparan sulfate proteoglycan(HSPG), heparan sulfate(HS), alzheimer's disease(AD), tumor metastasis, virus, inflammation

doi: 10.1360/052009-712