

# 肝素酶：一种新的广谱的肿瘤转移相关抗原在中晚期肿瘤免疫治疗中的作用研究进展

杨仕明, 汤旭东, 陈婷, 熊震, 陈陵, 蔡永国, 房殿春

杨仕明, 汤旭东, 陈婷, 熊震, 陈陵, 蔡永国, 房殿春, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化病研究所 重庆市 400038

国家自然科学基金资助项目, No.30200123, No.30570841  
通讯作者: 杨仕明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化病研究所. shimingyang@yahoo.com  
电话: 023-68765184  
收稿日期: 2006-12-21 接受日期: 2007-01-10

## Heparanase: a new universal metastasis-associated antigen in the immunotherapy for the advanced cancers

Shi-Ming Yang, Xu-Dong Tang, Ting Chen, Zhen Xiong, Ling Chen, Yong-Guo Cai, Dian-Chun Fang

Shi-Ming Yang, Xu-Dong Tang, Ting Chen, Zhen Xiong, Ling Chen, Yong-Guo Cai, Dian-Chun Fang, Institute of Gastroenterology of Chinese PLA, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30200123 and No.30570841

Correspondence to: Yang Shi-Ming, Institute of Gastroenterology of Chinese PLA, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038. shimingyang@yahoo.com

Received: 2006-12-21 Accepted: 2007-01-10

## Abstract

Heparanase (Hpa) was an endo- $\beta$ -D-glucuronidase that can cleave heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and has been implicated in tumor angiogenesis and metastasis. It has been reported that Hpa was expressed in almost all the advanced tumors, especially in metastatic tumors, and in contrast, down-regulation of Hpa could inhibit the metastasis of tumors. These results indicated that Hpa could serve as a new universal tumor-metastasis-associated antigen in the immunotherapy for the advanced tumors. Development of Hpa vaccine may establish a new method for the treatment of the advanced tumors. In this review, structure and functions of Hpa and its possibility as a new universal antigen in the immunotherapy of the advanced tumors were discussed.

Key Words: Heparanase; Tumor; Immunotherapy

Yang SM, Tang XD, Chen T, Xiong Z, Chen L, Cai YG, Fang DC. Heparanase: a new universal metastasis-associated antigen in the immunotherapy for the advanced cancers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(8):849-854

## 摘要

肝素酶(Hpa)是裂解硫酸乙酰肝素蛋白多糖的唯一酶类,能破坏细胞外基质及基底膜,参与肿瘤血管生成,与肿瘤的侵袭转移密切相关。目前的研究表明,Hpa在大多数中晚期肿瘤中都有表达,尤其在转移性肿瘤中强表达,而Hpa表达的下调可以抑制肿瘤细胞的转移,提示Hpa可以作为一种广谱的肿瘤转移相关抗原用于中晚期肿瘤的免疫治疗。Hpa疫苗的开发可望为中晚期肿瘤的治疗开辟新的途径。本文详细综述了Hpa的结构与功能、对肿瘤转移的促进作用及其机制、以及其作为肿瘤转移相关抗原用于中晚期肿瘤免疫治疗的可能性。

关键词: 肝素酶; 肿瘤; 免疫治疗

杨仕明, 汤旭东, 陈婷, 熊震, 陈陵, 蔡永国, 房殿春. 肝素酶: 一种新的广谱的肿瘤转移相关抗原在中晚期肿瘤免疫治疗中的作用研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(8):849-854

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/849.asp>

## 0 引言

树突状细胞(dendritic cells, DC)是目前发现的体内功能最强的,也是唯一能激活初始T淋巴细胞(native T cell)的抗原提呈细胞(APC)。DC起源于骨髓CD34<sup>+</sup>细胞,他能高水平的表达与抗原递呈有关的MHC- I类和MHC- II类分子,DC细胞摄取肿瘤相关抗原(tumor associated antigen, TAA)后,呈递给T细胞,激活相应的CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞。DC还可以靠表达的黏附分子与T细胞膜表面的相应配体CD28和CTLA-4的相互作用而活化Th细胞,使Th细胞产生大量的细胞因

## ■背景资料

肝素酶是近年来发表的与肿瘤转移相关的新基因,在中晚期肿瘤中高表达,因此已有许多研究表明,肝素酶可以作为肿瘤治疗的新靶位。由于肝素酶在大部分中晚期肿瘤中表达,而在正常组织细胞中仅有少量表达。因此,肝素酶有可能作为一种肿瘤相关抗原用于肿瘤的治疗。

## ■相关报道

国内已有研究表明,将肝素酶全长基因负载树突状细胞,可以诱导产生肝素酶特异性CTL,对肝素酶阳性且MHC相匹配的肿瘤细胞具有杀伤作用,而对肝素酶阳性但MHC不匹配的肿瘤细胞不具有杀伤效应;更为可喜的是,这种肝素酶特异性CTL对肝素酶阳性的淋巴细胞亦不具有杀伤效应,提示肝素酶作为肿瘤相关抗原应用于临床的安全性。近期,国外亦有一篇文献采用生物信息学技术,预测到了肝素酶的特异性抗原表位,这种表位对肝素酶阳性且MHC相匹配的乳腺癌细胞具有明显的杀伤效应,而对肝素酶阴性或MHC不匹配的乳腺癌细胞不具有杀伤效应。

子,进一步调节活化的Th细胞,以增强机体的细胞免疫和体液免疫功能,发挥主动免疫的抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>。将TAA与DC相结合,通过DC对肿瘤抗原的高效提呈作用激发机体的特异性抗肿瘤免疫反应是肿瘤免疫治疗的一个热门课题。目前多采用TAA致敏的DC免疫机体,以产生抗原特异性的抗肿瘤反应。肿瘤患者虽然DC功能处于失常状态<sup>[2]</sup>,但亦有研究表明肿瘤患者的T细胞能被其自身负载TAA的DC所激活,患者自身的DC被肿瘤相关抗原负载后,亦可激发机体产生TAA特异性的细胞毒T淋巴细胞(CTL)反应,对自身肿瘤细胞具有强烈的细胞毒作用,而对自身的正常细胞不具溶解作用<sup>[3-4]</sup>。

肿瘤细胞要发生转移,就必须同时破坏构成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的两种主要成分:结构蛋白和蛋白多糖。在过去的10多年中,研究兴趣大多集中在以结构蛋白为底物的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)上,但后来发现MMPs至少有17种<sup>[5]</sup>,所有MMPs合起来几乎能够降解所有的细胞外基质的结构蛋白成分,对其中一个酶的抑制会有代偿的途径进行弥补,这样以结构蛋白为底物的蛋白酶的抑制剂就很难在抗肿瘤转移中发挥很好的作用。而近年来发现的肝素酶(heparanase, Hpa)是唯一能裂解ECM内蛋白多糖主要成分硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPG)的内源性糖苷内切酶,研究表明抑制Hpa后可明显抑制肿瘤细胞的扩散与转移<sup>[6-8]</sup>,故Hpa作为抗肿瘤治疗新靶点具有很好的应用前景。那么Hpa能否作为一种TAA用于中晚期肿瘤的免疫治疗呢?本文就Hpa在中晚期肿瘤免疫治疗的可能性作一综述。

## 1 Hpa的结构与功能

人类Hpa基因位于染色体4q21.3,基因全长50 kb,内含14个外显子和13个内含子,转录两种mRNA,一种为5 kb大小的Hpa-1a型,另一种为1.7 kb大小的Hpa-1b型。在免疫系统,如脾及外周血白细胞内,Hpa基因主要转录前者,而在胎盘、血小板及W138/VA13细胞系,则主要转录后者<sup>[6]</sup>。两种亚型均含有相同的开放读码框架,编码含有543个氨基酸的Hpa蛋白前体,其相对分子质量为 $M_r$  61192。在正常情况下,Hpa分布于胸腺、脾脏、淋巴结、骨髓、血小板、中性粒细胞、活化的T淋巴细胞、B淋巴细胞等免疫组织及胎盘中,此外,胎肝中也见分布。以外周白

细胞表达水平最高,其次为胎盘。除胎盘外的非免疫组织中未见或极少表达<sup>[8,10-13]</sup>。其生理功能有:(1)帮助胚泡附着于子宫内膜,促进胎盘的发育和功能形成过程;(2)在损伤或炎症时,Hpa可通过降解基底膜HSPG从而帮助免疫细胞渗到无血管区,并且释放和调节促细胞增生因子和促血管生成因子,加快创面愈合,帮助组织修复<sup>[14]</sup>。

## 2 Hpa对肿瘤扩散及转移中的促进作用及其机制

已有大量研究证明了Hpa对肿瘤扩散及转移的促进作用。研究者先后对多种肿瘤(胃癌<sup>[15-16]</sup>,肝癌<sup>[17]</sup>,胰腺癌<sup>[18-20]</sup>,结肠癌<sup>[21]</sup>,乳腺癌<sup>[8,10,22]</sup>,卵巢癌<sup>[23]</sup>,血液系肿瘤<sup>[24]</sup>,前列腺癌<sup>[25]</sup>,膀胱癌<sup>[26-27]</sup>,淋巴瘤及黑色素瘤<sup>[28-29]</sup>,口腔鳞状细胞癌<sup>[30]</sup>,嗜铬细胞瘤<sup>[31]</sup>)采用RT-PCR技术检验肿瘤细胞内Hpa mRNA表达水平,或用免疫组化荧光染色技术检验Hpa蛋白含量,均发现肿瘤恶性程度越高,转移潜能越大,生长速度越快的肿瘤细胞,其Hpa mRNA的表达水平越高,而良性肿瘤则低水平表达,瘤旁正常组织则不表达;将鼠Hpa cDNA转染至无转移潜能的小鼠淋巴瘤细胞系Eb和低转移潜能的黑色素瘤细胞系,其转染细胞能够高水平表达Hpa的稳定克隆后,这些肿瘤细胞获得了高转移潜能,接种到裸鼠肝脏后的转移性及致死能力均明显升高<sup>[28-29]</sup>。这表明低转移潜能肿瘤细胞可通过导入Hpa cDNA获得高转移潜能。此外,具有高转移潜能的肿瘤或细胞系应用Hpa抑制剂后,肿瘤细胞转移的数量和部位均明显减少<sup>[32-34]</sup>,可进一步证明Hpa具有促进肿瘤细胞转移的作用。这些研究结果表明,Hpa促进肿瘤的扩散与转移的作用是确凿无疑的。其机制有如下几点:(1)促进血管生成。在肿瘤的生长转移中,血管的生成提供了非常便利的物质基础和通道。Vlodavsky *et al*<sup>[35]</sup>发现,在体外将EBT淋巴瘤细胞转染Hpa基因后,其血管生成能力增加了3-4倍,并且认为Hpa通过直接、间接两种方式发挥促血管生成作用。Hpa可直接作用于内皮细胞以生芽方式促进血管生成;bFGF平时以无活性形式与乙酰肝素结合贮存于ECM中,当HSPG被Hpa裂解时,可将结合的具有高度活性的HS-bFGF复合物从微环境中释放出来,间接诱发血管生成反应。而bFGF是目前认为极有活性的血管生成因子(angiogenesis factor)之一<sup>[8,10,36]</sup>,同时也是强有力的有丝分裂促进因子。

此外, 另一种被固化在HSPG上的血管生成因子, 即血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在Hpa裂解HSPG的过程中也得到释放并被激活, 与bFbF共同诱导肿瘤血管生成<sup>[37]</sup>; (2)通过两种途径破坏ECM, BM. 降解HSPG, 与其他基质降解酶(如MMPs、丝氨酸蛋白酶)协同破坏、降解ECM和BM屏障<sup>[28,36]</sup>; 促进释放内皮下尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase type-plasminogen activator, u-PA)及组织型纤溶酶原激活物(tissue type-plasminogen activator, t-PA), 激活纤溶酶原, 活化MMPs, 裂解ECM、BM中结构蛋白. t-PA和u-PA还可通过活化表皮生长因子(epidermic growth factor, EGF), 激活细胞外基质中的蛋白质酶联反应, 使膜的屏障功能减退<sup>[38]</sup>; (3)介导细胞黏附. 表达于细胞表面的Hpa可直接介导细胞对ECM及BM的黏附, 引起细胞在基质中的扩散以及促进BM的重塑而帮助肿瘤细胞侵入血管<sup>[39]</sup>; (4)增加癌细胞迁移能力. Hpa裂解HSPG后产生的HS(heparan sulfate)片段可激活HS的受体CD44v3(CD44 variant exon 3), 发出细胞内迁移信号, 促使细胞变形, 运动, 从而促进肿瘤细胞的扩散与转移<sup>[40]</sup>. (5)抑制活化T淋巴细胞. 此外, 该酶降解HSPG后的产物可以抑制活化的T淋巴细胞的生物学功能, 从而引起免疫抑制<sup>[9,37]</sup>, 使肿瘤的转移更容易.

总之, Hpa通过降解BM和ECM中的HSPG, 破坏限制肿瘤转移的屏障, 释放活性物质, 产生链式反应, 加快血管生成, 加强肿瘤细胞的运动能力, 促进肿瘤生长和转移, 这已成为肿瘤进展的重要机制之一.

### 3 Hpa作为一种广谱的肿瘤相关抗原用于肿瘤免疫治疗的可能性

有效的肿瘤免疫治疗要求肿瘤相关抗原必须是肿瘤特异性的, 在正常组织和细胞中不表达或少有表达, 只有这样, 这种抗原诱导产生的免疫效应只对肿瘤细胞有效, 而对正常细胞几乎没有作用, 从而避免自身免疫性疾病的产生. 理想的肿瘤应符合: (1)在绝大多数肿瘤组织中表达从而可以广泛应用; (2)只表达于肿瘤细胞以避免自身免疫反应; (3)不表达于正常成熟组织以避免免疫耐受; (4)在肿瘤的发生、发展过程中具有不可替代的作用, 以避免抗原缺失; (5)能诱导足够强度的免疫反应并导致肿瘤消退; (6)同时包含有MHC I 和MHC II类分子, 从而可诱导CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞反应<sup>[41]</sup>.

Hpa是目前发现的唯一的一种能够降解ECM及BM中HSPG的酶类<sup>[6-8]</sup>, 在正常组织中除淋巴细胞、骨髓等少有表达外, 在正常成熟的非免疫组织中(如心、肺、肝脏、骨骼肌及胰腺等)均不表达, 但在几乎所有的转移性恶性肿瘤细胞中普遍存在<sup>[15-31]</sup>. 由于Hpa的活化, 肿瘤细胞不仅可以突破ECM及BM屏障, 而且还可以释放多种因子, 促进肿瘤新生血管的生成及肿瘤细胞的局部定植, Hpa的活化是肿瘤细胞发生转移的一个重要因素<sup>[28,36-37]</sup>. 某些肿瘤细胞为逃避免疫监视而下调肿瘤相关抗原的表达, 但如果为逃避免疫监视而下调Hpa的表达, 其本身就足以抑制肿瘤细胞的增殖及转移. 因此, Hpa可以作为一种广谱的肿瘤转移相关抗原用于中晚期肿瘤的免疫治疗.

基于以上认识, 我们在国家自然科学基金的资助下(No. 30200123), 将Hpa全长基因序列克隆到pDC315腺病毒载体中, 在HEK-293细胞中进行同源重组, 将Hpa的腺病毒修饰体外培养的DC细胞, 结果发现这种Hpa修饰的DC可以诱导产生Hpa特异性的CTL细胞, 对肝素酶阳性且HLA-A2匹配的KATO-III胃癌细胞、SW-480结肠癌细胞等具有明显的免疫杀伤效应, 而对肝素酶阳性但HLA-A2不匹配的SGC-7901胃癌细胞不具有免疫杀伤效应, 进一步研究发现, 这种Hpa特异性的CTL对自体淋巴细胞不具有杀伤效应, 我们的研究还发现, Hpa修饰的DC刺激的效应细胞与KATO-III共孵育后, 其IFN- $\gamma$ 的表达明显高于空病毒修饰组以及IL-2刺激组, 而经Hpa修饰的DC刺激的特异性效应细胞与SGC-7901或自体淋巴细胞孵育后所检测的IFN- $\gamma$ 在各组间无明显差别, 以上研究表明Hpa修饰的DC疫苗可以诱发特异性CTL, 对HLA相匹配且肝素酶阳性的肿瘤细胞具有良好的免疫杀伤活性, 而对自体淋巴细胞不具有免疫杀伤作用, 是一种安全有效的肿瘤免疫基因治疗的靶位<sup>[42-44]</sup>.

目前的免疫学研究表明, CD8<sup>+</sup>T细胞所识别的靶抗原需先经抗原递呈后, 以“抗原肽-MHC I 类分子”复合物的形式呈现于抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)或靶细胞表面, 才能被CD8<sup>+</sup>T细胞所识别. 相应的与主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC) I 类分子结合的抗原肽即为CTL表位(cytotoxic T lymphocyte epitopes)<sup>[45]</sup>. 随着对免疫应答分子机制的深

#### ■应用要点

研究和开发肝素酶疫苗, 对肿瘤, 尤其是中晚期肿瘤的治疗可能具有很好的治疗价值.

#### ■同行评价

肝素酶是近年研究的焦点之一,有关他的文章国内外均比较多,本文的新颖之处在于免疫治疗,有参考价值。

入研究,人们已认识到机体的免疫细胞并不是一一对应于各种各样的病原体或天然抗原的整体分子,而是针对各种各样抗原分子的抗原表位(epitope),蛋白质抗原是通过其表位来体现其免疫特异性。因此,在表位水平上对抗原性的认识已促成这样一种趋势:基于抗原分子的免疫干预手段已不再停留在病原体或天然抗原的整体水平,而开始向CTL表位水平过渡。CTL表位作为抗肿瘤的新一代多肽疫苗,尤其是负载CTL表位的树突状细胞疫苗,被认为是最有希望的新一代肿瘤免疫治疗策略,已在临床实验中显示出较好的疗效<sup>[45-46]</sup>。

已有研究已表明,Hpa全长基因负载的DC可以诱导产生Hpa特异性的免疫反应,这个结果一方面提示Hpa可以作为一种肿瘤转移相关的抗原用于肿瘤的免疫治疗,另一方面提示在Hpa的氨基酸序列中应该存在CTL抗原表位,这种抗原表位经DC细胞递呈后,可以激活CTL细胞,从而发挥抗肿瘤效应。最近德国学者从Hpa氨基酸序列中设计了3条受HLA-A2限制的Hpa抗原表位,即Hpa8-16(ALPPPLMMLL)、Hpa16-24(LLLGPLGPL)、Hpa183-191(DLIFGLNAL)。HLA-A2是最常见的HLA基因型,约50%白种人、亚洲人和西班牙人以及33%的非洲人和美洲人具有这种表型。实验表明这3条抗原表位负载的DC细胞均可以产生Hpa特异性的CTL,对Hpa阳性且HLA-A2阳性的乳腺癌细胞(BT-20、BT-549及BT-124)具有明显的杀伤效应,而对HLA2阳性但Hpa阴性的MCF-7乳腺癌细胞不具有杀伤效应,只有将Hpa基因转染到MCF-7细胞使之变成Hpa阳性的细胞后才出现特异性的杀伤效应,而且HLA-A2 mAb封闭靶细胞的HLA-A2表位后,这种特异性杀伤效应明显下降,提示上述3种Hpa特异性抗原表位诱导的CTL对乳腺癌细胞的杀伤效应具有Hpa特异性,且受MHC-I类分子限制,可以作为乳腺癌及其他转移性肿瘤的多肽疫苗<sup>[47]</sup>。

在国家自然基金的资助下(No. 30570841),我们采用生物信息学技术,在人和小鼠的肝素酶氨基酸序列中各预测5条多肽,初步结果显示,人的3条多肽(受HLA-A2限制)以及小鼠的2条多肽(受H-2Kb限制)诱导的CTL对Hpa阳性且MHC相匹配的肿瘤细胞具有明显的杀伤效应,而对Hpa阴性或MHC不匹配的肿瘤细胞不具有杀伤效应(结果待发表)。需要说明的是,我们所预测的3条人类Hpa抗原表位与Sommerfeldt

*et al*<sup>[47]</sup>所报道的序列完全不同,提示在人类的Hpa氨基酸序列中可能还存在更多的抗原表位有待于开发和利用。

总之,相对于多肽表位而言,全长基因负载的DC细胞可以诱导产生更为强烈的肿瘤杀伤效应。这是因为全长基因中存在多个已知或未知的受不同MHC限制抗原表位,他们负载DC后可以多抗原表位的形式递呈到DC表面,从而可以产生多个克隆的CTL细胞,其杀伤效果应该明显高于单个抗原表位诱发的CTL反应<sup>[48-51]</sup>。但全长基因克隆到腺病毒或慢病毒载体中,由于载体的安全性目前仍未很好的解决,因而限制其在临床的应用;多肽疫苗本身亦存在缺陷,首先,这种疫苗在体内半衰期短,容易被降解;其次这类疫苗穿透力不强,不易进入APC细胞,难以形成“抗原肽-MHC I类分子”复合物,最终表现为弱免疫原性,因而不能有效的激发特异性免疫反应。如何使免疫原有效的进入APC细胞的MHC-I类系统,是肿瘤免疫治疗研究中急需解决的一个难题。近年来有文献报道,将肿瘤抗原或CTL表位与一些可穿透细胞膜的短肽序列(cell-penetrating peptides, CPP)融合后,其免疫原性明显增强<sup>[52-54]</sup>。能否借助穿膜肽的作用增强多肽疫苗的免疫原性及穿膜能力,值得进一步的研究。

#### 4 参考文献

- 1 Decker WK, Xing D, Shpall EJ. Dendritic cell immunotherapy for the treatment of neoplastic disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 113-125
- 2 Mailliard RB, Dallal RM, Son YI, Lotze MT. Dendritic cells promote T-cell survival or death depending upon their maturation state and presentation of antigen. *Immunol Invest* 2000; 29: 177-185
- 3 Collins MK, Cerundolo V. Gene therapy meets vaccine development. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 623-626
- 4 Santin AD, Bellone S, Ravaggi A, Pecorelli S, Cannon MJ, Parham GP. Induction of ovarian tumor-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes by acid-eluted peptide-pulsed autologous dendritic cells. *Obstet Gynecol* 2000; 96: 422-430
- 5 Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781-792
- 6 Eccles SA. Heparanase: breaking down barriers in tumors. *Nat Med* 1999; 5: 735-736
- 7 Finkel E. Potential target found for antimetastasis drugs. *Science* 1999; 285: 33-34
- 8 Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function

- in tumor progression and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 793-802
- 9 Dong J, Kukula AK, Toyoshima M, Nakajima M. Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene* 2000; 253: 171-178
  - 10 Hulett MD, Freeman C, Hamdorf BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med* 1999; 5: 803-809
  - 11 Dempsey LA, Brunn GJ, Platt JL. Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 349-351
  - 12 Parish CR, Freeman C, Hulett MD. Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1471: M99-108
  - 13 McKenzie E, Tyson K, Stamps A, Smith P, Turner P, Barry R, Hircok M, Patel S, Barry E, Stubberfield C, Terrett J, Page M. Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 1170-1177
  - 14 Bame KJ. Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* 2001; 11: 91R-98R
  - 15 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭. 肝素酶mRNA在胃癌组织中的表达及其与c-met表达的关系. *中华医学杂志* 2004; 84: 974-978
  - 16 Wang Z, Xu H, Jiang L, Zhou X, Lu C, Zhang X. Positive association of heparanase expression with tumor invasion and lymphatic metastasis in gastric carcinoma. *Mod Pathol* 2005; 18: 205-211
  - 17 El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1299-1305
  - 18 杨彦, 崔明, 陈陵, 段体德. 反义肝素酶基因对胰腺癌细胞体外增殖和侵袭的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2493-2498
  - 19 Rohloff J, Zinke J, Schoppmeyer K, Tannapfel A, Witzigmann H, Mossner J, Wittekind C, Caca K. Heparanase expression is a prognostic indicator for postoperative survival in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 1270-1275
  - 20 Kim AW, Xu X, Hollinger EF, Gattuso P, Godellas CV, Prinz RA. Human heparanase-1 gene expression in pancreatic adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 167-172
  - 21 Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, Aviv A, Peretz T, Pecker I, Pappo O. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1167-1175
  - 22 Cohen I, Pappo O, Elkin M, San T, Bar-Shavit R, Hazan R, Peretz T, Vlodavsky I, Abramovitch R. Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors. *Int J Cancer* 2006; 118: 1609-1617
  - 23 Ginath S, Menczer J, Friedmann Y, Aingorn H, Aviv A, Tajima K, Dantes A, Glezerman M, Vlodavsky I, Amsterdam A. Expression of heparanase, Mdm2, and erbB2 in ovarian cancer. *Int J Oncol* 2001; 18: 1133-1144
  - 24 Bitan M, Polliack A, Zecchina G, Nagler A, Friedmann Y, Nadav L, Deutsch V, Pecker I, Eldor A, Vlodavsky I, Katz BZ. Heparanase expression in human leukemias is restricted to acute myeloid leukemias. *Exp Hematol* 2002; 30: 34-41
  - 25 Ogishima T, Shiina H, Breault JE, Tabatabai L, Bassett WW, Enokida H, Li LC, Kawakami T, Urakami S, Ribeiro-Filho LA, Terashima M, Fujime M, Igawa M, Dahiya R. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1028-1036
  - 26 Shafat I, Zcharia E, Nisman B, Nadir Y, Nakhoul F, Vlodavsky I, Ilan N. An ELISA method for the detection and quantification of human heparanase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 958-963
  - 27 Gohji K, Hirano H, Okamoto M, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Katsuoka Y, Nakajima M. Expression of three extracellular matrix degradative enzymes in bladder cancer. *Int J Cancer* 2001; 95: 295-301
  - 28 Pikas DS, Li JP, Vlodavsky I, Lindahl U. Substrate specificity of heparanases from human hepatoma and platelets. *J Biol Chem* 1998; 273: 18770-18777
  - 29 Vlodavsky I, Fuks Z, Bar-Ner M, Ariav Y, Schirmacher V. Lymphoma cell-mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial extracellular matrix: relationship to tumor cell metastasis. *Cancer Res* 1983; 43: 2704-2711
  - 30 Kurokawa H, Katsube K, Podyma KA, Ikuta M, Iseki H, Nakajima M, Akashi T, Omura K, Takagi M, Yanagishita M. Heparanase and tumor invasion patterns in human oral squamous cell carcinoma xenografts. *Cancer Sci* 2003; 94: 277-285
  - 31 Quiros RM, Kim AW, Maxhimer J, Gattuso P, Xu X, Prinz RA. Differential heparanase-1 expression in malignant and benign pheochromocytomas. *J Surg Res* 2002; 108: 44-50
  - 32 Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 2018-2039
  - 33 Parish CR, Freeman C, Brown KJ, Francis DJ, Cowden WB. Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel *in vitro* assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res* 1999; 59: 3433-3441
  - 34 Bentolila A, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, Kovalchuk O, Haloun C, Domb AJ. Poly(N-acryl amino acids): a new class of biologically active polyanions. *J Med Chem* 2000; 43: 2591-2600
  - 35 Vlodavsky I, Elkin M, Pappo O, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Aviv A, Pecker I, Friedmann Y. Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J* 2000; 2: 37-45
  - 36 Marchetti D, Li J, Shen R. Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase. *Cancer Res* 2000; 60: 4767-4770
  - 37 Gohji K, Katsuoka Y, Okamoto M, Kamidono S, Kitazawa S, Toyoshima M, Dong J, Nakajima M. Human heparanase: roles in invasion and metastasis of cancer. *Hinyokika Kiyo* 2000; 46: 757-762
  - 38 Pillarisetti S, Paka L, Sasaki A, Vanni-Reyes T, Yin B, Parthasarathy N, Wagner WD, Goldberg

- IJ. Endothelial cell heparanase modulation of lipoprotein lipase activity. Evidence that heparan sulfate oligosaccharide is an extracellular chaperone. *J Biol Chem* 1997; 272: 15753-15759
- 39 Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, Aingorn H, Cohen I, Nadav L, Katz BZ, Geiger B, Vlodavsky I. Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity. *FASEB J* 2003; 17: 1015-1025
- 40 Kuniyasu H, Chihara Y, Kubozoe T, Takahashi T. Co-expression of CD44v3 and heparanase is correlated with metastasis of human colon cancer. *Int J Mol Med* 2002; 10: 333-337
- 41 Schultze JL, Maecker B, von Bergwelt-Baildon MS, Anderson KS, Vonderheide RH. Tumour immunotherapy: new tools, new treatment modalities and new T-cell antigens. *Vox Sang* 2001; 80: 81-89
- 42 蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭. 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定. 世界华人消化杂志 2004; 12: 336-338
- 43 陈陵, 蔡永国, 郑兴春, 杨仕明, 房殿春, 罗元辉, 王东旭. 负载肝素酶复制缺陷型腺病毒的包装及鉴定. 解放军医学杂志 2006; 31: 38-41
- 44 蔡永国, 房殿春, 陈陵, 王东旭, 罗元辉, 汤旭东, 陈婷, 杨仕明. 肝素酶基因修饰的树突状细胞疫苗对胃癌细胞的免疫效应研究. 中华医学杂志 2006; 86: 3122-3127
- 45 Ueda Y, Itoh T, Nukaya I, Kawashima I, Okugawa K, Yano Y, Yamamoto Y, Naitoh K, Shimizu K, Imura K, Fuji N, Fujiwara H, Ochiai T, Itoi H, Sonoyama T, Hagiwara A, Takesako K, Yamagishi H. Dendritic cell-based immunotherapy of cancer with carcinoembryonic antigen-derived, HLA-A24-restricted CTL epitope: Clinical outcomes of 18 patients with metastatic gastrointestinal or lung adenocarcinomas. *Int J Oncol* 2004; 24: 909-917
- 46 Gross DA, Graff-Dubois S, Opolon P, Cornet S, Alves P, Bennaceur-Griscelli A, Faure O, Guillaume P, Firat H, Chouaib S, Lemonnier FA, Davoust J, Miconnet I, Vonderheide RH, Kosmatopoulos K. High vaccination efficiency of low-affinity epitopes in antitumor immunotherapy. *J Clin Invest* 2004; 113: 425-433
- 47 Sommerfeldt N, Beckhove P, Ge Y, Schutz F, Choi C, Bucur M, Domschke C, Sohn C, Schneeweis A, Rom J, Pollmann D, Leucht D, Vlodavsky I, Schirmacher V. Heparanase: a new metastasis-associated antigen recognized in breast cancer patients by spontaneously induced memory T lymphocytes. *Cancer Res* 2006; 66: 7716-7723
- 48 Nakamura M, Iwahashi M, Nakamori M, Ueda K, Ojima T, Naka T, Ishida K, Yamaue H. Dendritic cells transduced with tumor-associated antigen gene elicit potent therapeutic antitumor immunity: comparison with immunodominant peptide-pulsed DCs. *Oncology* 2005; 68: 163-170
- 49 Oh ST, Kim CH, Park MY, Won EH, Sohn HJ, Cho HI, Kang WK, Hong YK, Kim TG. Dendritic cells transduced with recombinant adenoviruses induce more efficient anti-tumor immunity than dendritic cells pulsed with peptide. *Vaccine* 2006; 24: 2860-2868
- 50 Chen L, Liang GP, Tang XD, Chen T, Cai YG, Fang DC, Yu ST, Luo YH, Yang SM. In vitro anti-tumor immune response induced by dendritic cells transfected with hTERT recombinant adenovirus. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 927-934
- 51 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭. 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点. 世界华人消化杂志 2004; 12: 439-442
- 52 Lundberg P, Langel U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit* 2003; 16: 227-233
- 53 Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV, Lebleu B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 2003; 278: 585-590
- 54 Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* 2001; 24: 247-256

电编 李琪 编辑 张焕兰