

平足蛋白在肿瘤发生发展中的研究现状

董 熠,李莹歌,姚 颐,宋启斌

(武汉大学人民医院肿瘤中心,湖北 武汉 430060)

摘要:平足蛋白(podoplanin, PDPN)作为淋巴内皮细胞的标志,在炎症的发生发展、淋巴管的分化形成及血小板的聚集等方面都起着一定作用。近来研究发现在肿瘤组织或肿瘤微环境中也有不同水平的 PDPN 表达,可作为评估肿瘤患者预后的生物学指标。进一步研究还发现 PDPN 及其相关信号通路可影响癌细胞的侵袭转移,进而促进肿瘤的发生发展。全文对 PDPN 研究现状进行综述。

关键词:平足蛋白;肿瘤;机制

中图分类号:R73 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2019)04-0345-04

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2019.04.B012

Research Progress of PDPN in Carcinogenesis and Development of Cancer

DONG Yi, LI Ying-ge, YAO Yi, SONG Qi-bin

(Cancer Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: Podoplanin(PDPN) as marker of lymphatic endothelial cells is involved in the onset and development of inflammation, differentiation of lymph vessels and platelet aggregation. In recent years, researchers have demonstrated that PDPN is overexpressed on the surface of tumor cells and tumor microenvironment, it can affect the biological behavior of tumor cells, promoting tumor progression, invasion and metastasis, and it may be used as a biological marker of tumor prognosis. This article reviews the current research progress of PDPN and its roles in tumor progression.

Subject words: podoplanin; tumor; mechanism

平足蛋白(podoplanin, PDPN),也称 gp36、Aggrus、PA2.26、gp38、OTS-8、RANDAM-2、gp40等,是淋巴管内皮细胞的特异性标志物。C型凝集素样受体2(C-type lectin-like receptor 2, CLEC-2)是一个非典型的C型凝集素受体,也是PDPN内源性受体,主要表达在血小板、中性粒细胞等细胞表面,能形成二聚体,结合后直接诱导血小板的聚集,同时两者的相互作用在炎症、淋巴管的分化及形成中也有着重要作用,PDPN在肿瘤细胞的生长、迁徙与转移中的作用已经得到证实,影响肿瘤的发生发展。本文就PDPN结构功能及其在肿瘤发生发展中的研究现状进行综述。

基金项目:国家自然科学基金(81670123)

通信作者:姚颐,副主任医师,博士;武汉大学人民医院肿瘤中心,湖北省武汉市武昌区张之洞路99号(430060);E-mail: yiyawhu@qq.com
宋启斌,主任医师,博士生导师,博士;武汉大学人民医院肿瘤中心,湖北省武汉市武昌区张之洞路99号(430060);
E-mail: qibinsong@163.com

收稿日期:2017-11-21; **修回日期:**2018-01-23

1 PDPN 的结构与分布

PDPN是I型唾黏蛋白样的跨膜糖蛋白,基因位于1p36.21上,全长共34.2 kb,其合成受到8个外显子控制,编码的PDPN蛋白由162个氨基酸组成,相对分子质量为36kD^[1]。其结构由3部分组成:N-末端富含O-糖基化的胞外结构域中,包括三个串联重复序列(ED_{xx}VTPG),其中一个序列与CLEC-2相互作用,被称为血小板聚集血小板刺激(PLAG1-3)结构域,PLAG结构域附着在苏氨酸多肽链第52位,具有一个I型的核心及两个唾液酸残基的结构,是O-糖苷链载体;胞内结构域由9个氨基酸组成,主要通过结合ezrin-radixin-moesin(ERM)复合体,从而参与细胞骨架的形成;胞质尾端,包含两个丝氨酸残基(S167/S171),与PDPN的促癌、促细胞运动及细胞间相互作用有关^[2]。跨膜区是一条单链跨膜蛋白;被认为与上皮间质转化(epithelial to mesenchy-

mal transition, EMT)有关^[3]。

PDPN 主要表达在淋巴管内皮细胞上, 是其特异性的标志物。此外, 前期研究表明 PDPN 也在人体很多组织细胞上表达, 包括 I 型肺泡上皮细胞、肾足细胞、淋巴源性纤维网状细胞(fibroblastic Reticular cells, FRCs)以及中枢神经系统等; PDPN 缺陷小鼠的实验表明, PDPN 在小鼠心脏、肺的发育中也发挥着至关重要的作用^[4]。

2 PDPN 的生理病理功能

2.1 PDPN 的生理作用

PDPN 在淋巴管生成中发挥重要作用, 循环淋巴细胞通过高内皮静脉进入淋巴结, PDPN 可发挥屏障功能, 维持淋巴管、静脉的完整性^[5], PDPN 缺陷的小鼠则会发生病理性淋巴管扩张、功能不良等现象^[6]。作为 PDPN 的受体之一, CLEC-2 主要表达于血小板和巨核细胞, 骨髓微动脉周围 CLEC-2/PDPN 相互作用促进巨核细胞和血小板的生成, CLEC-2 敲除小鼠模型中, 幼稚巨核细胞数减少, 而给野生型小鼠注射 PDPN 后, 可见巨核细胞明显增多; 并通过诱导骨髓 FRC 样细胞分泌趋化因子配体 5 (chemokine C-C motif ligand 5, CCL5) 促进血小板前体的形成^[7]。

2.2 PDPN 的病理作用

PDPN/CLEC-2 相互作用可激活血小板, 诱导促炎症因子的产生, 参与炎症反应。Peters 等^[8]在炎症组织中发现 PDPN(+) 效应 T 细胞; PDPN 敲除动物模型中证实, PDPN 过表达会显著影响 IL-17 介导的 T 细胞增殖, 并通过减少 CD4+ 效应 T 细胞表现出对中枢神经系统炎症的快速反应; 该研究表明, PDPN 通过抑制 CD4+ 效应 T 细胞生成维持组织耐受性。Nylander 等^[9]也证实 PDPN 可调节 Th17 介导的炎症反应, PDPN (+) T 细胞协同 Th17 可诱导免疫抑制、通路调控相关转录因子的产生, 结合 CLEC-2 减轻 Th17 介导的炎症反应; 而经 shRNA 沉默 PDPN 后可促进 IL-17 的分泌。

3 PDPN 与肿瘤

3.1 肿瘤中 PDPN 的表达及其预后

鉴于 PDPN 在淋巴管内皮细胞上的显著表达, 其逐渐被作为淋巴管内皮细胞标志物, 广泛运用到口

腔鳞状细胞癌、肺癌、乳腺癌、食管癌、结直肠癌等肿瘤中, 越来越多的研究证实在各种肿瘤组织中 PDPN 表达从无到有或表达上调, 意味着 PDPN 在肿瘤发生发展中的潜在作用。

食管鳞癌通常由高级别上皮内瘤变(high-grade intraepithelial neoplasia, HGIEN)发展到浸润性鳞状细胞癌, 但对于早期诊断, 尤其是 HGIEN 和早期浸润癌的确诊, 仍是一个难题; Chen 等^[10]为了探讨 PDPN 在 HGIEN 和早期浸润性鳞癌的表达差异及潜在价值, 对 133 例经病理确诊为早期食管癌或癌前病变的组织标本进行免疫组化分析, PDPN 在病变组织基底层表达模式分为三种: 完全型、不完全型(非连续), 或缺失型; 若基底层呈完全或不完全表达 PDPN 则可诊断为 HGIEN, 若 PDPN 表达完全缺失即可诊断为早期浸润癌; 该研究证实 PDPN 可作为早期浸润性鳞癌的潜在标志物。Patricia 等^[11]在宫颈上皮样瘤变的患者中也发现了类似现象, 相较于 CIN1、2 级, 在 CIN3 级的组织中, PDPN 表达缺失或仅呈局部表达(60.0%, $P=0.016$)。

在肿瘤发生之初, 伴随血管的形成, 淋巴管也参与其中, 两者也是肿瘤生长及侵袭转移的主要限制因素; 作为淋巴管生成的重要组成部分, PDPN 的预后预测价值也逐渐被挖掘。Kubouchi 等^[12]对 158 例 IA 期肺腺癌患者手术标本分析发现, 在癌细胞上, 并未发现 PDPN 阳性(>10%)与患者预后相关, 但在癌相关成纤维细胞(cancer associated fibroblasts, CAFs)中, 其阳性表达($n=41$)与肿瘤分化程度、淋巴浸润显著相关($P<0.001$), 并影响患者无病进展期(disease-free survival, DFS)($P<0.001$)和疾病特异性生存率($P=0.015$); Cox 多元分析也证实, PDPN(+) CAFs 是 DFS 最显著的影响因素($HR=4.411, P=0.004$), 可作为 IA 期肺腺癌高危复发的独立预测因子。Cañueto 等^[13]则在皮肤鳞癌中发现, 近半标本呈 PDPN(+), 并与肿瘤浸润性生长及淋巴管侵袭显著相关, 阳性表达患者疾病进展风险更高, DFS 更短。Cobec 等^[14]针对卵巢癌标本经免疫组化评估癌组织中淋巴管生成及 PDPN 表达特异性; 结果发现肿瘤内的微淋巴管密度(lymphatic microvessel density, LMVD)与其周围肿瘤血管增生及肿瘤内成熟血管数量明显相关($P=0.024, P<0.0001$), 而癌周 LMVD 则与癌周的成熟血管相关($P<0.0001$), 有浸润倾向

的癌细胞 PDPN 阳性率更高;该研究表明,PDPN 可作为肿瘤扩散及淋巴转移的潜在靶点。

3.2 PDPN 参与肿瘤发生发展的机制

尽管各种报道均发现 PDPN 在各种恶性肿瘤中的表达与不良预后相关,但具体机制仍在不断探索中。Atsumi 等^[15]发现,PDPN(+)A431 细胞同样表达肿瘤干细胞标志物:sonic hedgehog(Shh,是发育过程中的重要信号因子,参与器官及血管形成等过程)和 CD44,此研究表示 PDPN 可作为肿瘤干细胞的标志之一。随后,Rahadiani 等^[16]对 61 例食管癌患者组织标本进行分析发现,超过 10%的患者 PDPN 呈明显高表达状态,对高表达 PDPN 的细胞系予以敲除 PDPN 后,细胞克隆形成率较对照组明显降低,对低表达 PDPN 的 TE-1 细胞进行过表达处理后,细胞对 5-Fu 和顺铂的药物耐受性明显增高,而无论是细胞克隆形成还是裸鼠皮下成瘤均较对照组呈现明显优势。Wang 等^[17]表明 PDPN 的下调可显著抑制癌细胞活性、迁移和侵袭,在 miR-203 过表达 FaDu 细胞中过量表达 PDPN 能够逆转其上游靶点 miR-203 对肿瘤细胞活性、迁移及侵袭的抑制作用。

自 Stephen Paget 提出“种子与土壤”理论,肿瘤细胞与其微环境的相互作用也逐渐进入研究者的视线,而肿瘤微环境中的 PDPN(+)细胞同样有着不可忽视的作用。Ito 等^[18]则进一步揭示了 PDPN(+)间质成纤维细胞促进肿瘤形成的分子机制,相较于对照组人成纤维细胞(human fibroblasts, hFBs),皮下共注射人肺腺癌 A549 细胞和过表达 PDPN 的 hFBs 可明显促进皮下肿瘤的形成(64% vs 21%);但去除胞内段后,成瘤率明显降低(33%);而过表达 PDPN 的 hFBs,其 RhoA 活性是对照组的 2.7 倍;RhoA 是各种细胞结构的主要调节器,参与到细胞的细胞动力学、细胞骨架调节和细胞迁移等过程中;间质成纤维细胞中活化 RhoA 能显著影响 ECM(extracellular matrix)重构,参与到肿瘤的早期形成。这些结果表明,肿瘤微环境中 PDPN(+)间质细胞也参与到肿瘤的发展中。PDPN 胞内段包含两个高度保守的丝氨酸残基。Krishnan 等^[19]发现细胞周期蛋白依赖性激酶 5(cyclin dependent kinase 5, CDK5)通过与蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)协作,共同参与 PDPN 胞内段丝氨酸残基的磷酸化,经胞内受体 ERM/Rho 引起一系列结构的改变,进而导致细胞运动功能减弱。

对于肿瘤细胞而言,PDPN 促迁徙与转移的机制多认为与其促进 EMT 的发生相关。而作为 EMT 标志物之一,E-钙黏蛋白(E-Cadherin)可通过降低细胞间黏附,促进癌细胞浸润。Cho 等^[20]对 Paget 病患者皮肤标本分析发现,2/3 的标本中癌周基底角化细胞为 PDPN(+),并与肿瘤浸润深度相关($P<0.005$),染色显示 PDPN(+)者 E-Cadherin 为阴性,而 PDPN(+)细胞可观察到伪足形成。Takeuchi 等^[21]也在恶性间皮瘤细胞中证实,PDPN 通过调节癌细胞运动功能及诱导癌细胞聚集促进肿瘤进展;90%的标本中超过 50%的细胞呈 PDPN(+),敲除 PDPN 后细胞运动能力明显下降,动物成瘤率降低;而过表达处理则可通过 RhoA/ROCK 通路,使该现象逆转。研究表明伪足是富含激动蛋白的细胞膜突起,在穿透基底膜中发挥重要作用,而 PDPN 可通过调节 RhoGTPase 活性,激活 ROCK-LIMK-Cofilin 信号通路,参与伪足的形成,使癌细胞侵袭能力加强^[22]。Neri 等^[23]通过胶原侵袭模型,共培养癌细胞和 CAFs,发现相较于对照组,PDPN(+)CAF 侵袭距离更大,并为癌细胞提供侵袭“轨道”,PDPN(+)CAF 扮演着促肿瘤细胞作用,引导和提升癌细胞的局部浸润。

除了促进肿瘤细胞的运动能力,增强其局部浸润,PDPN 还可通过其与 CLEC-2 相互作用加强癌细胞血液转移能力,血小板通过聚集在肿瘤细胞周围,降低血流剪切力及免疫原性,促进其向远处转移,与此同时,被激活的血小板还可以分泌多种生物活性物质,直接促进转移灶肿瘤的生长和血管新生^[24]。Miyata 等^[25]发现敲除 PDPN 后,肺鳞癌癌细胞(lung squamous cell carcinomas, LSCC)生长受阻;而 LSCC 通过 PDPN 介导血小板聚集(podoplanin-mediated platelet aggregation, PMPA)活化瘤内血小板,体外实验证实,经 PMPA 引起的血小板释放所介导的 LSCC 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)磷酸化是促进癌细胞生长的主要原因。

4 结 语

随着目前对癌细胞及癌组织周围细胞表面所表达的 PDPN 的研究越来越深入,它在肿瘤的生长、迁徙、转移、早期诊断甚至预后中的作用逐渐被认识,通过相关深入研究,对于 PDPN 在各癌种中的调控

及作用机制也将逐渐被发现,而这也将会对以PDPN为靶点的抗肿瘤药物制备及改善肿瘤患者的预后提供更加确切的证据。

参考文献:

- [1] Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(1): 1–5.
- [2] Krishnan H, Ochoa-Alvarez JA, Shen Y, et al. Serines in the intracellular tail of podoplanin (PDPN) regulate cell motility[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(17): 12215–12221.
- [3] Fernandez-Munoz B, Yurrita MM, Martin-Villar E, et al. The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(6): 886–896.
- [4] Takemoto A, Miyata K, Fujita N. Platelet-activating factor podoplanin: from discovery to drug development[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(2): 225–234.
- [5] Herzog BH, Fu J, Wilson SJ, et al. Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2[J]. *Nature*, 2013, 502(7469): 105–109.
- [6] Uhrin P, Zaujec J, Breuss JM, et al. Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation [J]. *Blood*, 2010, 115(19): 3997–4005.
- [7] Tamura S, Suzuki-Inoue K, Tsukiji N, et al. Podoplanin-positive periaerterial stromal cells promote megakaryocyte growth and proplatelet formation in mice by CLEC-2[J]. *Blood*, 2016, 127(13): 1701–1710.
- [8] Peters A, Burkett PR, Sobel RA, et al. Podoplanin negatively regulates CD4+ effector T cell responses [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 129–140.
- [9] Nylander AN, Ponath GD, Axisa PP, et al. Podoplanin is a negative regulator of Th17 inflammation [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(17): pii: 92321.
- [10] Chen G, Xu R, Yue B, et al. The expression of podoplanin protein is a diagnostic marker to distinguish the early infiltration of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19013–19020.
- [11] Belfort-Mattos PN, Focchi GR, Ribalta JC, et al. Immunohistochemical expression of VEGF and podoplanin in uterine cervical squamous intraepithelial lesions[J]. *Dis Markers*, 2016, 2016: 8293196.
- [12] Kubouchi Y, Yurugi Y, Wakahara M, et al. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts unfavourable prognosis in patients with pathological stage I A lung adenocarcinoma[J]. *Histopathology*, 2018, 72(3): 490–499.
- [13] Cañueto J, Cardenoso-Alvarez E, Cosano-Quero A, et al. The expression of podoplanin is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma [J]. *J Cutan Pathol*, 2017, 44(2): 144–151.
- [14] Cobec I M, Sas I, Pirtea L, et al. Podoplanin as key player of tumor progression and lymph vessel proliferation in ovarian cancer[J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(10): 5265–5272.
- [15] Atsumi N, Ishii G, Kojima M, et al. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(1): 36–41.
- [16] Rahadiani N, Ikeda J, Makino T, et al. Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(5): 1311–1323.
- [17] Wang L, Mou Y, Meng D, et al. MicroRNA-203 inhibits tumour growth and metastasis through PDPN[J]. *Clin Otolaryngol*, 2017, 42(3): 620–628.
- [18] Ito S, Ishii G, Hoshino A, et al. Tumor promoting effect of podoplanin-positive fibroblasts is mediated by enhanced RhoA activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 422(1): 194–199.
- [19] Krishnan H, Retzbach EP, Ramirez MI, et al. PKA and CDK5 can phosphorylate specific serines on the intracellular domain of podoplanin (PDPN) to inhibit cell motility [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 335(1): 115–122.
- [20] Cho Z, Konishi E, Kanemaru M, et al. Podoplanin expression in peritumoral keratinocytes predicts aggressive behavior in extramammary Paget’s disease [J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 87(1): 29–35.
- [21] Takeuchi S, Fukuda K, Yamada T, et al. Podoplanin promotes progression of malignant pleural mesothelioma by regulating motility and focus formation [J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(4): 696–703.
- [22] Martin-Villar E, Borda-D’Água B, Carrasco-Ramirez P, et al. Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability[J]. *Oncogene*, 2015, 34(34): 4531–4544.
- [23] Neri S, Ishii G, Hashimoto H, et al. Podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts lead and enhance the local invasion of cancer cells in lung adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(4): 784–796.
- [24] Chang YW, Hsieh PW, Chang YT, et al. Identification of a novel platelet antagonist that binds to CLEC-2 and suppresses podoplanin-induced platelet aggregation and cancer metastasis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(40): 42733–42748.
- [25] Miyata K, Takemoto A, Okumura S, et al. Podoplanin enhances lung cancer cell growth in vivo by inducing platelet aggregation[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4059.