

## · 综述 ·

## Fibulin-3 在胶质瘤中的研究进展

罗均然<sup>1,2</sup>, 柯超<sup>2</sup>, 荆国杰<sup>1</sup> 综述 陈忠平<sup>2\*</sup> 审校

1. 惠州市第一人民医院神经外科, 广东医科大学惠州第一临床医学院, 广东 惠州 516000

2. 华南肿瘤学国家重点实验室、肿瘤医学协同创新中心, 广东 广州 510060

**摘 要:**神经胶质瘤是最常见的原发性颅内肿瘤, 其中胶质母细胞瘤 (GBM) 是最具侵袭性的恶性脑瘤。它生长速度快, 侵袭性强、对放化疗不敏感, 预后极差。越来越多的研究发现, 胶质母细胞瘤这些特性与细胞内多种信号通路异常、肿瘤细胞与肿瘤微环境的相互作用等因素相关, 而作为原纤维蛋白家族中的 Fibulin-3 参与胶质瘤细胞的黏附、迁移、侵袭和新生血管的生成, 在胶质瘤发生发展的病理生理中发挥重要的作用, 并影响病人的预后。因此研究 Fibulin-3 在胶质瘤发生发展中的调节规律和作用机制, 可能发掘到潜在的治疗靶点, 并为临床治疗提供依据和参考。

**关键词:**胶质瘤; Fibulin-3; 侵袭; 血管生成

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.03.019

胶质瘤的发生、发展与环境致癌物、病毒感染、遗传多态性、肿瘤微环境等多种因素的影响有关, 其中, 存在于肿瘤细胞和细胞外基质之间的肿瘤微环境是影响肿瘤细胞恶性进展的重要因素。作为细胞外基质蛋白, Fibulin 家族参与肿瘤微环境的构成, 并通过调节细胞信号通路系统影响其形态、代谢、迁移、增殖和分化<sup>[1, 2]</sup>。家族成员有 Fibulin 1-7 共 7 个, 研究表明 Fibulin-3 的活化, 参与肿瘤细胞增殖、黏附、迁移、侵袭和新生血管的生成, 并在其中发挥重要作用, 从而影响肿瘤进展和患者预后。Fibulin-3 在神经胶质瘤中的作用机制研究正逐步深入, 现就近年来关于 Fibulin-3 在胶质瘤发生发展的作用机制的研究进展展开综述。

### 1 Fibulin-3 的概述

Fibulin-3 (也称为 EFEMP1) 在人体发育过程中广泛表达于各种组织, 是一种与基底膜、弹性纤维和其他基质相关的分泌型糖蛋白。它是 Fibulin 家族 7 个成员之一, Fibulins 的特征是钙结合的串联阵列 (cb) EGF 结构域和 C 末端纤维蛋白型模块<sup>[3]</sup>。人 Fibulin-3 由位于染色体 2p16 上的基因 EFEMP1 编码组成, 它含有 11 个外显子, 是编码

493 个氨基酸的蛋白, 分子量为 55 kDa。氨基酸序列含有信号肽, 其中五个 cbEGF 结构域的串联阵列前是修饰 cbEGF 的结构域和 C 末端纤维蛋白型模块。电子显微镜下旋转投影后的 Fibulin-3 为约 20 nm 长短的短杆状结构, 末端为球状含有 88 个氨基酸的插入片段修饰 cbEGF 的结构域。生理条件下 Fibulin-3 作为单体存在, 它高度保守, 在不同物种中, 如人, 大鼠和小鼠有 92% ~ 94% 的氨基酸序列同源性<sup>[2, 4]</sup>。Fibulin-3 与细胞外基质蛋白 1 (ECM1) 有相互作用, 也与金属蛋白酶-3 的组织抑制剂 (TIMP-3) 联系, 这有助于基底膜区域的完整性, 并锚定其他 ECM 结构作为基底膜的弹性纤维。除了其在 ECM 中的功能之外, Fibulin-3 也具有调节细胞内信号通路的作用, 其中它与 DA41 (一种肿瘤抑制因子 DAN 的结合蛋白) 相互作用, 可刺激 DAN 合成, 进而抑制肿瘤细胞的生长<sup>[5]</sup>。Fibulin-3 主要位于细胞外基质, 是连接细胞与细胞外基质之间的大分子桥梁, 调节细胞的增殖和迁移, 同时为细胞外基质中血管生成及器官形成提供基质结构上的稳定<sup>[6, 7]</sup>。

**基金项目:**国家自然科学基金项目: EFEMP1 源性肿瘤抑制蛋白对胶质瘤的疗效及机制研究 (81672484)。

**收稿日期:** 2018-01-05; **修回日期:** 2018-04-23

**作者简介:** 罗均然 (1990-), 男, 在读研究生, 主要研究方向: 胶质瘤靶向治疗。

**通信作者:** 陈忠平 (1957-), 男, 教授、主任医师、博士生导师、神经外科主任, 主要研究方向: 胶质瘤分子特征与个体化综合治疗、胶质瘤血管生成拟态研究、胶质瘤耐药/放射抗拒分子机制与化疗等。Email: chenzhp@sysucc.org.cn

## 2 Fibulin-3 在肿瘤中的作用

细胞外基质的重构包括基质蛋白的合成、分布、降解,而重构后 ECM 的蛋白组成、物理学性质和空间结构均发生了明显的改变,因此 ECM 重构与多数肿瘤细胞的增殖、迁徙转移、分化密切相关。Fibulin-3 蛋白作为 ECM 的重要组成蛋白,参与肿瘤微环境的构成,并在肿瘤细胞外基质的重构中发挥重要作用。研究表明,Fibulin-3 在实体肿瘤中多呈现异常表达,然而其扮演的具体角色仍然缺乏统一的认识。Albig 最早发现 Fibulin-3 在多种实体肿瘤中表达降低,而且能够通过抑制肿瘤血管的发生进而抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[8]</sup>,后续的研究进一步证实了鼻咽癌<sup>[9]</sup>、乳腺癌<sup>[10]</sup>、结肠癌<sup>[11]</sup>、肺癌<sup>[12]</sup>、胃癌<sup>[13]</sup>、子宫内膜癌<sup>[14]</sup>、前列腺癌<sup>[15]</sup>等多种肿瘤中 Fibulin-3 表达下调,其高表达是预后良好的一个指标,而且能够通过抗血管生成<sup>[10]</sup>、抗 EGFR/AKT 介导的细胞增殖<sup>[11]</sup>、抗 IGF1R17 和(或) TGF- $\beta$  介导的内皮间质转换<sup>[16]</sup>,抑制基质金属蛋白酶表达及活性<sup>[17]</sup>,从而抑制肿瘤的血管生成、增殖和侵袭。但同时也在少部分肿瘤如胸膜恶性间皮瘤<sup>[18]</sup>、卵巢癌<sup>[19]</sup>、宫颈癌<sup>[20]</sup>中检测到 Fibulin-3 高表达是预后不良的指标,通过 NOTCH<sup>[21]</sup>或 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[22]</sup>发挥肿瘤促进作用。这提示我们 Fibulin-3 蛋白调控了与肿瘤增殖、侵袭以及血管生成相关的多条信号通路,在抑制或促进肿瘤进展的过程中具有组织特异性。

## 3 Fibulin-3 在胶质瘤中的表达及与预后的关系

Hu 等<sup>[23]</sup>通过生物信息学分析了 Oncomine Research<sup>TM</sup> 数据库中 68 个独立研究的基因芯片以及 REMBRANDT 中 275 个 II-IV 级胶质瘤、28 个对照脑肿瘤的数据,发现相对于低级别胶质瘤和正常脑组织,高级别胶质瘤中的 Fibulin-3 表达上调。他进一步对高级别胶质瘤病人的肿瘤组织,原代培养细胞及人和鼠的胶质瘤细胞系用 Western 印迹、qRT-PCR 等实验方法发现 Fibulin-3 分长、短两种形式,其中长形式的 Fibulin-3 在很大程度上是由胶质瘤细胞分泌到胞外,而短形式表达水平较低,积累在胞内。后来他们又对 REMBRANDT 和 TCGA 两个数据库进行分析表明 Fibulin-3 在胶质瘤患者中高度特异表达上调,并与级别相关,级别越高的胶质瘤,Fibulin-3 表达越上调。生存分析提示部分低表达 Fibulin-3 的病人获得更长的总生存期,而 Fibulin-3 RNA 转录水平高的病人预后差。动物实验中

证实敲低 Fibulin-3 表达的裸鼠中获得更长的生存时间<sup>[24]</sup>。此外,Hiddingh 等在研究 Fibulin-3 与 TMZ 治疗胶质母细胞瘤患者的疗效和预后相关性时,也证实胶质母细胞瘤组织与非肿瘤性脑组织相比,Fibulin-3 明显过表达;另外在分析替莫唑胺(TMZ)治疗组和无 TMZ 治疗对照组 2 组胶质母细胞瘤病人的总生存期与 Fibulin-3 的相关性发现,当肿瘤中 Fibulin-3 表达量高于 2 倍于非肿瘤脑组织,TMZ 组的预后较差,相应的低 Fibulin-3 表达量,TMZ 治疗组预后好,但结果显示无 TMZ 治疗的病人的总生存期与 Fibulin-3 不相关<sup>[25]</sup>。然而 Hu 等在恶性程度最高的胶质母细胞瘤的研究中,从 95 GBM 标本中分析 Fibulin-3 RNA 的表达与病人预后的关系发现,生存时间随着 Fibulin-3 RNA 的表达水平增加而增加,可能是 GBM 预后良好的一个指标<sup>[26]</sup>。综合起来,随着胶质瘤进展,也就是说级别越高,Fibulin-3 的表达有增加的趋势,但 Fibulin-3 的表达与预后的相关性并不十分明确,这更加说明它在胶质瘤的发生发展所起作用的复杂性。

## 4 Fibulin-3 在胶质瘤中的作用

### 4.1 胶质瘤细胞的增殖、黏附、迁移、侵袭

肿瘤细胞有着不同的特性,包括粘附、迁移、侵袭以及分泌促血管生成因子等,这几种特性相互联系,促进肿瘤的生长和进展。Fibulin-3 在外周肿瘤中下调,并认为抑制肿瘤生长。然而,早期研究表明,Fibulin-3 具有独特的表达和促肿瘤作用,可能是肿瘤进展的潜在靶点。Hu 在过表达 Fibulin-3 基因的 CNS-1 鼠胶质瘤动物模型中,通过 Ki67 阳性细胞比例分析细胞增殖,未显示实验组与对照组有显著的统计学差异,说明 Fibulin-3 在体内不影响总细胞增殖或凋亡。另外研究还发现 Fibulin-3 不影响胶质瘤细胞形态,但增强底物特异性细胞粘附和促进细胞在器官型培养物的运动和分散<sup>[23]</sup>。实验中,颅内原位植入 Fibulin-3 过表达的胶质瘤细胞导致肿瘤体积增加,并向脊髓扩散。过表达 Fibulin-3 的肿瘤组织和体外培养的细胞中发现基质金属蛋白酶如 MMP-2/9 和 ADAMTS-5 的表达和活性升高,而这些酶参与细胞周围 ECM 细胞降解和神经胶质瘤侵袭和转移。后期研究发现,Fibulin-3 是 Notch 信号传导的新型可溶性激活剂,其拮抗 DLL3,并且以 Notch 依赖性方式促进肿瘤细胞存活和侵袭<sup>[24]</sup>。Hu 等诱导敲低 Fibulin-3,发现可控下调 Fibulin-3 减少 Notch 信号传导并导致细胞凋亡增

加,胶质母细胞瘤起始细胞的自我更新减少,颅内肿瘤的生长和分散受到抑制。此外,Fibulin-3 表达与 Notch 依赖性基因的表达水平相关,并且是胶质瘤肿瘤组织中 Notch 活化的标志物。这个发现强调了 Fibulin-3 通过激活关键 Notch 途径调节胶质瘤侵袭的肿瘤细胞外基质蛋白的主要作用。最新的研究发现,Fibulin-3 基因是 miR-338-5p 的靶点,当 miR-338-5p 与 Fibulin-3 mRNA 的 3' UTR 末端结合后,阻碍 Fibulin-3 基因的转录和翻译,能够抑制胶质瘤细胞增殖、迁移,并促进细胞凋亡<sup>[27]</sup>。

与上面结果有些矛盾的是,有研究发现,Fibulin-3 在一定程度上,有抑制胶质瘤恶性进展的作用。Hu 等发现在高级别胶质瘤细胞动物模型中 Fibulin-3 的过表达阻碍了胶质瘤细胞的侵袭,而内源性 Fibulin-3 表达的敲低则是相反的<sup>[26]</sup>。体外实验方面,在外源 Fibulin-3 或过表达内源性 Fibulin-3 处理的胶质瘤细胞中,EGFR 水平降低,AKT 信号活性减弱。体内实验方面,在皮下注射 Fibulin-3 与胶质瘤细胞混合物,其小鼠皮下模型肿瘤生长速度和体积都受到抑制。胶质瘤中 EGFR 高表达常常预示着患者预后不良,有研究证明 Fibulin-3 是通过与 EGFR 竞争性结合,从而抑制表达高水平 EGFR 的胶质瘤细胞的颅内致瘤性<sup>[28]</sup>。更加深入的研究发现,Fibulin-3 在高表达 EGFR 的胶质瘤细胞中可以抑制 EGFR 的表达,还能减弱细胞呼吸作用的水平,但是在低表达 EGFR 的胶质瘤细胞中,并不能减弱细胞呼吸作用的水平,氧化磷酸化和糖酵解呼吸却是增加的,而且细胞中 NOTCH1、MMP2 的活性增高,细胞侵袭能力增强<sup>[29]</sup>。即肿瘤中有高表达 EGFR 的细胞,也有低表达 EGFR 而侵袭性强的细胞,胶质瘤中的 Fibulin-3 有利于稳定其内部这两个亚群平衡,以达到应对不断变化的肿瘤微环境和/或治疗干预应激,获得有利于肿瘤生长的优势。

#### 4.2 新生血管形成

胶质瘤新生血管的形成,不仅能为肿瘤细胞提供营养物质,促进生长增殖,还能为迁移的肿瘤细胞建立侵袭行径。研究发现,Fibulin-3 可以减弱鼠脑神经胶质瘤内皮细胞对 VEGF 的反应,并阻碍下游 MAPK 的活化,抑制 MMP 表达,从而影响内皮细胞肌动蛋白细胞骨架重排,最终起到抑制新生血管形成的作用<sup>[8]</sup>。一方面 Fibulin-3 抑制 MMP-2 和 MMP-3 表达,诱导静息和血管内皮细胞表达 TIMP-1 和 TIMP-3,同时刺激内皮细胞表达 TSP-1 来抑制

MMP-9 的活化,并能引起内皮细胞的凋亡。另一方面,Fibulin-3 COOH 端子 FBLN 型模块与内皮细胞表达的 TIMP-3 结合其形成 Fibulin-3 : TIMP-3 复合体,复合体中的 TIMP-3 与 VEGF KDR 受体结合时,能抑制内皮细胞 VEGF 信号传导,阻止 VEGF 介导的血管发生。然而不同的是,最近发表的研究结果表明 Fibulin-3 可以激活胶质瘤细胞中的 ADAM10 / 17,来抑制 TIMP3 活性,还可以通过促进 Notch 激活和 DLL4 表达,促进胶质瘤血管生成<sup>[21]</sup>。此项研究通过免疫组织化学染色,还发现 Fibulin-3 与胶质瘤血管壁在结构上存在某种关联,即在激光共聚焦显微镜下显示 Fibulin-3 以独特的方式包裹在人类 GBM 血管周围,但与 Fibulin-4、Fibulin-5 不同的是,Fibulin-3 不与弹性蛋白及 Fibulin-1 相互作用形成血管周围纤维。可能解释这种现象的是在胶质瘤内皮细胞上存在 Fibulin-3 独特的对接分子,利于胶质瘤脉管系统在结构上稳定和新生血管的形成。

总之,Fibulin-3 影响胶质瘤细胞的侵袭,参与胶质瘤新生血管的形成,在胶质瘤恶性进展中发挥多重关键作用,可被利用来抑制胶质瘤细胞侵袭和血管生成,作为限制胶质瘤发生发展的治疗靶点。

#### 5 展望

Fibulin-3 通过多个分子途径,如黏附,迁移,侵袭,新生血管形成,参与胶质瘤的发生、发展,从而影响临床预后。研究表明,Fibulin-3 的有着不同分子功能及通过多条信号通路,在胶质瘤发生发展的过程以及多种病理生理过程中发挥抑制或促进肿瘤进展的作用。因此需要更全面和深入的研究,才有望以 Fibulin-3 为靶标在各个分子途径寻找胶质瘤的诊治新靶点,并且发挥其指导治疗的重要作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology [J]. Cell, 1997, 91 (4) : 439-442.
- [2] Timpl R, Sasaki T, Kostka G, et al. Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins [J]. Nat Rev Mol Cell Biology 2003, 4 (6) : 479-489.
- [3] de Vega S, Iwamoto T, Yamada Y. Fibulins: multiple roles in matrix structures and tissue functions. Cellular and molecular life sciences [J]. Cell Mol Life Sci. 2009, 66 (11-12) : 18900-18902.
- [4] Kobayashi N, Kostka G, Garbe JH, et al. A comparative a-

- analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization [J]. J Biol Chem, 2007, 282(16):11805-11816.
- [5] Zhang Y, Marmorstein LY: Focus on molecules: fibulin-3 (EFEMP1) [J]. Exp Eye Res, 2010, 90(3):374-375.
- [6] Argraves WS, Greene LM, Cooley MA, et al. Fibulins: physiological and disease perspectives [J]. EMBO reports 2003, 4(12):1127-1131.
- [7] Cirulis JT, Bellingham CM, Davis EC, et al. Fibrillins, fibulins, and matrix-associated glycoprotein modulate the kinetics and morphology of in vitro self-assembly of a recombinant elastin-like polypeptide [J]. Biochemistry 2008, 47(47):12601-12613.
- [8] Albig AR, Neil JR, Schiemann WP: Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo [J]. Cancer Res, 2006, 66(5):2621-2629.
- [9] Hwang CF, Chien CY, Huang SC, et al. Fibulin-3 is associated with tumour progression and a poor prognosis in nasopharyngeal carcinomas and inhibits cell migration and invasion via suppressed AKT activity [J]. J pathol 2010, 222(4):367-379.
- [10] Sadr-Nabavi A, Ramser J, Volkmann J, et al. Decreased expression of angiogenesis antagonist EFEMP1 in sporadic breast cancer is caused by aberrant promoter methylation and points to an impact of EFEMP1 as molecular biomarker [J]. Int J Cancer, 2009, 124(7):1727-1735.
- [11] Tong JD, Jiao NL, Wang YX, et al. Downregulation of fibulin-3 gene by promoter methylation in colorectal cancer predicts adverse prognosis [J]. Neoplasma, 2011, 58(5):441-448.
- [12] Chen X, Meng J, Yue W, et al. Fibulin-3 suppresses Wnt/beta-catenin signaling and lung cancer invasion [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(8):1707-1716.
- [13] Zhu XJ, Liu J, Xu XY, et al. Novel tumor-suppressor gene epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 is epigenetically silenced and associated with invasion and metastasis in human gastric cancer. Molecular medicine reports 2014, 9(6):2283-2292.
- [14] Yang T, Qiu H, Bao W, et al. Epigenetic inactivation of EFEMP1 is associated with tumor suppressive function in endometrial carcinoma. PloS one 2013, 8(6):e67458.
- [15] Almeida M, Costa VL, Costa NR, et al. Epigenetic regulation of EFEMP1 in prostate cancer: biological relevance and clinical potential. Journal of cellular and molecular medicine 2014, 18(11):2287-2297.
- [16] Tian H, Liu J, Chen J, Gatz ML, et al. Fibulin-3 is a novel TGF-beta pathway inhibitor in the breast cancer micro-environment. Oncogene 2015, 34(45):5635-5647.
- [17] Kim EJ, Lee SY, Woo MK, et al. Fibulin-3 promoter methylation alters the invasive behavior of non-small cell lung cancer cell lines via MMP-7 and MMP-2 regulation. International journal of oncology 2012, 40(2):402-408.
- [18] Creaney J, Dick IM, Meniawy TM, et al. Comparison of fibulin-3 and mesothelin as markers in malignant mesothelioma. Thorax 2014, 69(10):895-902.
- [19] Chen J, Wei D, Zhao Y, et al. Overexpression of EFEMP1 correlates with tumor progression and poor prognosis in human ovarian carcinoma. PloS one 2013, 8(11):e78783.
- [20] Song EL, Hou YP, Yu SP, et al. EFEMP1 expression promotes angiogenesis and accelerates the growth of cervical cancer in vivo. Gynecologic oncology 2011, 121(1):174-180.
- [21] Nandhu MS, Hu B, Cole SE, et al. Novel paracrine modulation of Notch-DLL4 signaling by fibulin-3 promotes angiogenesis in high-grade gliomas. Cancer research 2014, 74(19):5435-5448.
- [22] Wang Z, Cao CJ, Huang LL, et al. EFEMP1 promotes the migration and invasion of osteosarcoma via MMP-2 with induction by AEG-1 via NF-kappaB signaling pathway. Oncotarget 2015, 6(16):14191-14208.
- [23] Hu B, Thirumara-Rajamani KK, Sim H, et al. Fibulin-3 is uniquely upregulated in malignant gliomas and promotes tumor cell motility and invasion. Molecular cancer research : MCR 2009, 7(11):1756-1770.
- [24] Hu B, Nandhu MS, Sim H, et al. Fibulin-3 promotes glioma growth and resistance through a novel paracrine regulation of Notch signaling. Cancer research 2012, 72(15):3873-3885.
- [25] Hiddings L, Tannous BA, Teng J, et al. EFEMP1 induces gamma-secretase/ Notch-mediated temozolomide resistance in glioblastoma. Oncotarget 2014, 5(2):363-374.
- [26] Hu Y, Pioli PD, Siegel E, et al. EFEMP1 suppresses malignant glioma growth and exerts its action within the tumor extracellular compartment. Molecular cancer 2011, 10:123.
- [27] Lei D, Zhang F, Yao D, et al. MiR-338-5p suppresses proliferation, migration, invasion, and promote apoptosis of glioblastoma cells by directly targeting EFEMP1. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedicine & pharmacotherapie 2017, 89:957-965.
- [28] Hu Y, Gao H, Vo C, et al. Anti-EGFR function of EFEMP1 in glioma cells and patient prognosis. Oncoscience 2014, 1(3):205-215.
- [29] Hu Y, Ke C, Ru N, et al. Cell context-dependent dual effects of EFEMP1 stabilizes subpopulation equilibrium in responding to changes of in vivo growth environment. Oncotarget 2015, 6(31):30762-30772.