

抗血管生成与肿瘤治疗

王 琪¹, 李嘉姝², 程莉莉³ 综述, 聂莹雪⁴ 审校(中国医科大学七年制: 1. 93 期 2 班; 2. 93 期 4 班; 3. 94 期 1 班, 沈阳 110001; 4. 中国医科大学附属第一医院神经内科, 沈阳 110001)

【关键词】 肿瘤; 血管生成; 血管生成抑制因子; 抗血管生成治疗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 01. 031 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)01-0056-03

20 世纪 60 年代初, Folkman 在血红蛋白溶液灌注狗的离体甲状腺支持移植肿瘤生长实验中观察到肿瘤因为缺乏血管, 其体积不超过 1~2 mm³, 而将这些肿瘤株植回机体后, 随着血管的生长, 肿瘤也迅速增大数倍。对此现象的进一步研究还发现, 血红蛋白溶液灌注离体器官时, 导致血管内皮细胞损伤, 通过抑制肿瘤血管的生长阻止了肿瘤的增生^[1]。20 世纪 70 年代初, Folkman 又提出了肿瘤生长和转移具有血管依赖性的观点, 并认为抑制肿瘤血管的生成可以作为治疗肿瘤的一种手段^[2]。从此揭开了对肿瘤血管及抗血管生成的广泛研究。

1 肿瘤的血管生成及结构特点

血管生成在人体发育、组织修复、女性月经周期等正常生理过程中发挥重要作用。与正常血管相比, 肿瘤血管的结构缺乏完整性, 内皮细胞之间存在较大缝隙, 通透性强, 血管网状结构紊乱, 有大量的血管盲端和动静脉短路, 这种结构的异常导致渗出增加及组织间高压, 同时也易于癌细胞发生转移。

2 内源性血管生成抑制因子的结构、功能以及作用机制

内源性的血管生成抑制因子按照作用的特异性不同可分为两大类: 一类是特异性作用于内皮细胞的血管生成抑制因子, 包括各种大分子蛋白前体的酶解片段; 另一类是非特异性作用于内皮细胞的血管生成抑制因子, 包括细胞因子、组织金属蛋白酶抑制剂、丝氨酸蛋白酶抑制剂等^[3-6]。目前对第一类血管生成抑制因子研究较多。

大分子蛋白前体酶解片段: 多种内源性血管生成抑制因子是体内无血管生成抑制活性的大分子蛋白前体的蛋白酶降解产物。这些大分子蛋白前体分别来源于血浆和胞外基质, 在此类血管生成抑制因子中研究较多的包括血管生成抑制素、内皮细胞抑制素、Tumstatin、Canstatin 等(表 1)。

表 1 有血管生成抑制活性的大分子蛋白前体酶解片段

蛋白前体的起源	蛋白前体	酶解片段
血浆	纤溶酶原	血管生成抑制素
	抗纤维蛋白酶	抗血管生成抗纤维蛋白酶 III
细胞外基质	催乳素	16 kU 催乳素片段
	IV 型胶原 α ₁ 链	Arresten
	IV 型胶原 α ₂ 链	Canstatin
	IV 型胶原 α ₃ 链	Tumstatin
血管抑制剂	IV 型胶原 α ₆ 链	
	XV 型胶原	网状内皮系统刺激素
	XVIII 型胶原	内皮细胞抑制剂
	纤维连结蛋白	现为黏连蛋白肝素结合片段
	基底膜蛋白多糖	Endorepellin

2.1 血管生成抑制素 血管生成抑制素是最先发现的内源性

血管生成抑制因子之一。它是纤溶酶原的蛋白酶解产物, 大小约为 38 kU, 由纤溶酶原的前 4 个 kringle 区组成(K1-4), 最初在 Lewis 肺癌小鼠的血清和尿液中分离获得^[7-8]。血管生成抑制素特异作用于内皮细胞, 体内和体外实验的研究结果表明, 血管生成抑制素可以抑制内皮细胞的增殖和迁移, 并诱导内皮细胞凋亡^[9]。

血管生成抑制素通过内皮细胞表面的受体发挥作用。现已发现的血管生成抑制素受体包括三磷酸腺苷(ATP)合成酶 α/β 亚基, 整联蛋白 α₅β₃ 和 Angiomotion。血管生成抑制素与 ATP 合成酶的结合会抑制 ATP 合成酶的活性, 继而抑制内皮细胞的存活、增殖和迁移^[10]。血管生成抑制素与整联蛋白 α₅β₃ 的结合则会影响内皮细胞与胞外基质的相互作用, 抑制内皮细胞的迁移, 并影响其存活。

血管生成抑制素抑制内皮细胞增殖并诱导内皮细胞凋亡的生物学作用是由 P53 和 Fas/FasL 信号通路介导^[11]。P53 是参与介导血管生成抑制素生物活性的重要蛋白, 血管生成抑制素无法抑制 P53 缺陷型小鼠角膜的血管生成。血管生成抑制素作用于内皮细胞, 上调细胞内 P53 及其下游效应因子 BAX 的表达水平, 通过 P53 发挥诱导细胞周期停滞和细胞凋亡的活性^[11]。此外, 血管生成抑制素作用于内皮细胞, 会导致细胞内 FasL 的表达水平提高, c-Flip 的表达水平下降, 引发 Fas/FasL 细胞凋亡信号通路。另外 3 种有促进内皮细胞凋亡活性的血管生成抑制因子血小板反应蛋白-1(TSP-1)、Constatin 与色素上皮衍生因子(PEDF)也可以通过激活 Fas 介导的信号途径诱导细胞凋亡^[11-13]。

目前, 不同种类的血管生成抑制素已经进入了 I 期、II 期或 III 期临床试验阶段。然而, 在对这些药物的临床有效性评价仍存在问题。在动物实验模型中, 可以更直接地检测药物疗效, 比如, 病理检查、血管生成活性标志物的检测。但是在临床试验中, 对转移性肿瘤连续病理标本的获取是不实际的^[14]。因此, 发现血清和尿液中血管生成抑制因子的有效标志替代物是很有必要的, 无创性的治疗策略也有待完善。一些研究已经成功地应用一些无创的医疗影像设备(如核磁共振成像、多普勒超声)来检测肿瘤血液动力、血管结构等。此外, 长期应用该疗法的延迟毒性反应令人堪忧, 血管抑制因子对生理性血管生成的影响(如肿瘤患者的损伤愈合, 女性子宫内膜的周期性生成, 胚胎的血管生成)限制了该疗法的发展^[14]。为了解决这些问题, 近些年来, 基因疗法受到了很大关注, 利用具有高度特异性的分子作用于特定的肿瘤血管细胞可以减少不良反应^[14]。

2.2 内皮细胞抑制素

内皮细胞抑制素是 1997 年在鼠血管瘤细胞株的培养上清液中分离得到的一种血管生成抑制因子, 它可以抑制内皮细胞的增殖和迁移, 并诱导内皮细胞凋亡^[15]。内皮细胞抑制素分子量约为 20 kU, 测序发现它是源于胶原蛋

白 X VIII C132AA-315AA 的片段,是以胶原蛋白 X VIII 为前体切割而来^[15]。

内皮细胞抑制素的抗血管生成活性主要是通过抑制内皮细胞迁移实现的。它可与内皮细胞表面的 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白结合,抑制局部黏着斑激酶的激活,进一步影响其下游 ERK1/P38 MAPK 的活化,从而抑制细胞迁移,影响细胞存活^[16]。内皮细胞抑制素还可以在不影响 Akt 活性的情况下,使内皮一氧化氮合成酶失活,抑制细胞迁移^[17]。此外,内皮细胞抑制素可以与基质金属蛋白酶-2(MMP-2)原的活性区结合形成复合物,抑制 MMP-2 原的激活,从而抑制细胞迁移^[18]。

除了抑制内皮细胞迁移,内皮细胞抑制素还可以诱导内皮细胞凋亡。内皮细胞抑制素可显著降低内皮细胞胞内凋亡抑制蛋白 Bcl-2 和 Bcl-XL 的水平,而不影响促凋亡蛋白 Bax 水平^[19]。此外,Shb 配体蛋白可能参与介导内皮细胞抑制素引起的凋亡信号转导^[20]。

一直以来,对内皮细胞抑制素是否通过干扰血管内皮生长因子(VEGF)及成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导的信号转导通路发挥其活性存在争议。Abdollahi 等^[21]用毕节酵母表达系统表达的全长内皮细胞抑制素处理人微血管内皮细胞(HDMVEC),对胞内多种信号转导通路及多个基因的表达水平进行了系统的分析。研究结果表明,内皮细胞抑制素可影响内皮细胞中参与血管生成调控的多条信号通路,其中包括 VEGF 和 bFGF 诱导的信号转导通路。

内皮细胞抑制素可上调与血管生成抑制相关的基因,下调与血管生成相关的基因,这一结果与它所表现出的生理活性是一致的。内皮细胞抑制素影响调控血管生成的多条信号通路,它可以下调促血管生成信号通路中多种关键性调控因子的基因转录水平,如 Ids、低氧诱导因子(HIF)- α 、Ephrins、核因子 κ B(NF- κ B)、Ap-1、STATs 与凝血酶受体,还会下调信号通路中上述上游因子与下游因子的表达水平,如 VEGF 家族 Bcl-2、LDH-A、肿瘤坏死因子- α 、环氧合酶-2(COX-2)、整合蛋白 $\alpha_5\beta_3$ 及基质金属蛋白酶。此外,内皮细胞抑制素还可使多种参与血管生成信号通路的蛋白去磷酸化,从而抑制其活化。如 Id1、JNK、NF- κ B、Bcl-2 与 VEGFR2,它也会引起 cyclinD 的磷酸化,导致细胞周期停滞。

内皮细胞抑制素在对血管生成抑制因子进行正调控的同时,对其拮抗因子进行负调控(如 TSP 与 Id1),而且它在对血管生成因子进行负调控的同时,也对其拮抗因子进行正调控(如 HIF1- α 与 HIF-1AN),这两种作用最终导致了血管生成的抑制。上述研究结果有助于解释内皮细胞抑制素的各种生理活性。

内皮细胞抑制素可以抑制内皮细胞的增殖和迁移,并诱导内皮细胞凋亡。它通过对凋亡抑制基因(如 Bcl-2 和 COX-2)的上游调控因子(如 HIF1- α 、NF- κ B、Ets-1)进行负调控,促进细胞凋亡,还对 NF- κ B、AP-1 参与的细胞增殖通路进行负调控,引起细胞周期停滞,抑制细胞的增殖;内皮细胞抑制素对 MAPK 和 c-myc 的抑制则会抑制细胞的迁移。

在以 Lewis 肺癌小鼠为模型的体内抑癌实验中,使肿瘤完全消退的内皮细胞抑制素剂量是每天 20 mg/kg。内皮细胞抑制素高效的抑癌活性使它成为第一个进入临床的此类血管生成抑制因子。内皮细胞抑制素已通过了 I 期临床试验。它的用量范围从 15~600 mg/mm²,未显示出剂量限制性毒性。内皮细胞抑制素 I 期临床试验的结果证明内皮细胞抑制素不存在安全性问题^[6]。

3 抗血管生成疗法

3.1 抗血管生成疗法的优势 与传统的以肿瘤细胞为靶点治疗方法(放疗、化疗)相比,血管生成抑制剂以肿瘤血管内皮细胞为靶点,具有低毒(无细胞毒性)、广谱(不受肿瘤细胞异质性的影响)、特异性高(特异作用于激活的内皮细胞)及不易产生抗药性(内皮细胞极少发生自发突变)的优点。目前已进入临床试验阶段的内源性血管生成抑制因子包括血管生成抑制素、内皮细胞抑制素、干扰素- α (IFN- α)、IFN- γ 、白细胞介素-12、PF-4 等^[3-6]。

3.2 抗血管生成疗法的发展趋向

3.2.1 基因治疗 采用血管生成抑制因子重组蛋白治疗肿瘤目前仍存在某些局限性^[3-6]。首先,抗血管疗法需要长期给药,且目前进入临床试验阶段的几种血管生成抑制因子的用量相对较高,这些重组蛋白制备困难,无法满足大量患者长期用药的需要,患者也难以负担高额的费用。而且这些蛋白在体内的半衰期相对较短,需要在短时间内重复给药,长期频繁注射这些可能含有毒素和热源的重组蛋白,有可能导致毒性反应的发生。这些问题限制了血管生成抑制因子在临床上的应用,而采用血管生成抑制因子进行基因治疗有助于解决这些问题。抗血管生成基因治疗可以介导血管生成抑制因子在体内长期表达,不需要在短期内重复给药,也不需要纯化蛋白,因此,在操作上相对简单,成本也较低。基因治疗载体主要分为非病毒载体和病毒载体两类。与非病毒载体相比,病毒载体因具有易于制备、靶向性高、可长效表达的优点,在临床上有更大的应用潜力。在 2000 年和 2002 年,研究人员采用携带 rC 基因的逆转录病毒载体转导造血干细胞,成功治愈了重症联合免疫缺陷患儿。但其后有二例患者发生白血病,研究表明,这是由于逆转录病毒载体整合入原癌基因 LMO2 的启动子,激活 LMO2 造成的。这一问题的出现使得整合型的逆转录病毒载体和慢病毒载体的安全性问题受到极大的质疑。另有研究表明,腺病毒载体也有致癌的可能性^[22]。因此,高效、安全的腺病毒载体成为最有希望用于临床的病毒载体之一。基因治疗药物“今又生”就是以复制缺陷型腺病毒为载体的重组 P53 腺病毒。

3.2.2 联合治疗 内皮细胞抑制素和血管生成抑制素虽然已经进行了临床 I 期试验,但它们在人体试验中所显示的抑癌效果远不如动物实验所显示的结果理想,这说明体内特别是肿瘤的血管生成过程是一个有多种因素参与、多条信号通路,调控的极其复杂的过程,单独使用某种血管生成抑制因子或是阻断与血管生成相关的某条信号通路并不能完全阻断血管的生成,因此抗血管生成疗法未来的主要发展方向是与其他疗法联合应用,以发挥协同作用^[3-6,22]。

4 结 语

Folkman 的理论为肿瘤治疗开辟了一条崭新的道路,采用抗血管疗法治疗肿瘤具有高效、低毒、不易产生耐药性的特点,这一疗法在肿瘤的治疗中有广阔的应用前景,针对目前抗血管生成疗法中存在的一些问题,抗血管生成研究今后主要的研究方向应集中在加强对血管生成抑制因子作用机制的深入了解,构建安全而且高效的基因治疗载体以及设计更加合理的联合治疗方案之上,这些问题的解决将有助于推动抗血管生成疗法在临床治疗中的应用。

参考文献

- [1] Folkman J. Angiogenesis and apoptosis[J]. Semin Cancer Biol, 2003, 13(2):159-167.

[2] Folkman J. Tumor angiogenesis; therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.

[3] Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(4): 357-369.

[4] Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(6): 1144-1155.

[5] Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis; regulators and clinical applications [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61(3): 253-270.

[6] Tandle A, Blazer DG, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer; recent developments [J]. *J Transl Med*, 2004, 2(1): 22-42.

[7] Marnaros AG, Olsen BR. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis [J]. *Matrix Biol*, 2001, 20(5-6): 337-345.

[8] Sottile J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1654(1): 13-22.

[9] O'Reilly MS, Hahngren L, Shing Y, et al. Angiostatin; a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [J]. *Cell*, 1994, 79(2): 315-328.

[10] Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, et al. Endothelial cell surface F1-FO ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6656-6661.

[11] Chen YH, Wu HL, Chen CK, et al. Angiostatin antagonizes the action of VEGF-A in human endothelial cells via two distinct pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310(3): 804-810.

[12] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin and pigment epithelium-derived factor [J]. *Nat Med*, 2002, 8(4): 349-357.

[13] Panka DJ, Mier JW. Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas-dependent apoptosis in endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37632-37636.

[14] Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(4): 357-369.

[15] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin; an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285.

[16] Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, et al. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4766-4771.

[17] Urbich C, Reissner A, Chavakis E, et al. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin [J]. *FASEB J*, 2002, 16(7): 706-708.

[18] Kim YM, Jang JW, Lee OH, et al. Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5410-5413.

[19] Dhanabal M, Ramehandran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(17): 11721-11726.

[20] Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, et al. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis [J]. *Blood*, 2000, 95(11): 3403-3411.

[21] Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, et al. Endostatin's antiangiogenic signaling network [J]. *Mol Cell*, 2004, 13(5): 649-663.

[22] Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F. The future of gene therapy [J]. *Nature*, 2004, 427(6977): 779-781.

(收稿日期: 2011-05-30)

同型半胱氨酸检测在临床上的应用

史亚红 综述, 徐翠杰 审校(甘肃省定西市医院检验中心 743000)

【关键词】 同型半胱氨酸; 高同型半胱氨酸血症; 临床应用

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 01. 032 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)01-0058-03

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)又称高半胱氨酸,是一种与半胱氨酸同系的含硫非必需氨基酸,是蛋氨酸循环的正常代谢产物,人类不能从食物中直接获得,只有蛋氨酸在体内代谢后形成。健康成人血浆 Hcy 浓度为 5~15 μmol/L,儿童明显低于成人。随着年龄的增长,血浆 Hcy 浓度逐渐增加^[1]。由于高 Hcy 血症在动脉粥样硬化和血栓栓塞性疾病的发生中起重要作用,一直以来被认为是心血管疾病的独立危险因素之一^[2]。近年来通过大量的研究表明,高 Hcy 还与肿瘤、老年性痴呆等其他疾病相关,从而使 Hcy 在临床应用领域大大增加,其在医学上的价值正得到广泛验证和承认,现将其临

床应用综述如下。

1 Hcy 及其影响因素

1.1 Hcy 是人体必需氨基酸——蛋氨酸的中间代谢产物,在体内主要以还原型,胱氨酸(氧化型),高半胱氨酸-高半胱氨酸及高半胱氨酸-胱氨酸二硫化物混合氧化型等形式存在,在血浆中约 70%与清蛋白结合成为结合型 Hcy,通常所指的是总的 Hcy 浓度。

正常情况下 Hcy 的代谢途径有 3 条^[3]: (1)再甲基化途径。以维生素 B₁₂为辅助因子,在蛋氨酸合成酶作用下,由亚甲基四氢叶酸为甲基供体,再甲基化形成蛋氨酸,这一过程在任