

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0150-03

## 抗肿瘤血管生成的新策略——组织因子靶向免疫治疗

齐协飞 综述, 饶纬华 审阅 (江西医学院第二附属医院及分子医学研究所 南昌 330006)

[摘要] 一种以组织因子为靶向的免疫结合物(icon), 可以选择性地结合肿瘤血管内皮细胞及某些肿瘤细胞异常表达的组织因子, 并通过结合 Fc 受体和补体, 启动机体免疫系统以攻击肿瘤血管或肿瘤细胞, 与此同时, 正常血管内皮细胞因不表达组织因子而免受损害, 是一种具有广谱抗肿瘤免疫治疗的新方法。

[关键词] 肿瘤血管; 组织因子; 免疫结合物

[中图分类号] R73-36+2 [文献标识码] A

恶性肿瘤的发生、发展和转移均依赖于血管生成, 以新生血管为靶点, 抑制肿瘤血管生成、阻断肿瘤的营养来源和迁移通道, 已成为近年来国内外研究的热点。在诸多的抗肿瘤血管生成因子中, 研究较多且疗效较好的主要有: 抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体、血管抑素(angiotatin)、内皮抑素(endostatin)和血管内皮生长抑制剂(vascular endothelial growth inhibitor, VEGI)等, 然而, 这些抑制因子多数仍以阻止或减缓肿瘤血管进一步生长为主, 对已形成的血管则难以达到破坏作用。最近耶鲁大学的 Hu 和 Garen 等<sup>[1-3]</sup>研究出一种以组织因子为靶向的免疫结合物(immunoconjugate, 简称 icon), 可以选择性用来破坏已形成的肿瘤血管而不损害正常血管。这一研究成果引起了国际著名肿瘤生物学家的高度重视(摘自 www.science-now.org), 本文就此作一综述。

### 1 组织因子与恶性肿瘤

组织因子(tissue factor, TF)是血液凝固的生理性始动因子, 它是一种跨膜糖蛋白, 广泛存在于血管外膜层和某些组织血管外细胞, 它的配体是血浆第 VII 因子, 正常时两者保持分离状态, 当组织受损伤时, 组织因子被释放, 并与因子 VII、钙离子结合形成复合物, 从而激活外源性凝血系统, 以促使血凝块形成。研究表明, 组织因子在正常血管内皮细胞不表达, 但在肿瘤血管内皮细胞和某些恶性肿瘤如黑色素瘤、肺癌、前列腺癌和乳腺癌等肿瘤细胞以及肿瘤相关的巨噬细胞则存在组织因子的异常表达<sup>[4,7]</sup>。这些组织因子可以通过诱导血管内皮生长因子表达或抑制抗血管生成因子如凝血蛋白 2(thrombospondin 2)表达来调节肿瘤血管生成, 其表达量与血管内皮生长因子和微血管密度(microvessel density, MVD)的表达具有显著相关性, 而且过度表达组织因子的肿瘤细胞往往生长更迅速, 肿瘤内形成的血管较粗而丰富, 因此组织因子与肿瘤血管生成和肿瘤生长密切相关<sup>[4,6]</sup>, 并可能是肿瘤血管生成的标志物<sup>[8]</sup>。组织因子诱导血管内皮生长因子合成的机理可能与组织因子的胞浆区有关, 而与其启动血液凝固的细胞外区无关, 两者共同定位于某些肿瘤细胞上<sup>[7]</sup>。另有研究表明, 肿瘤细胞表达的组织因子还可以促使

肿瘤细胞转移, 其转移程度与组织因子表达量呈正相关。如 Bromberg 等<sup>[9-10]</sup>将低表达和高表达组织因子的黑色素瘤细胞系分别于 SCID 小鼠尾静脉注射, 发现注射后高表达者 86% 存在癌细胞转移, 而低表达者仅 5% 有转移, 产生的原因可能与组织因子的胞浆区有关。

肿瘤病人常伴血液凝固性升高, 在肿瘤组织中也常有血凝块形成, 可能与肿瘤血管内皮细胞和肿瘤细胞均可表达组织因子, 以及肿瘤血管通透性高有利于与因子 VII 接触有关, 但这种血凝块并不能阻止肿瘤生长和转移<sup>[1]</sup>。虽然这种血凝块形成并不能阻止肿瘤生长, 但可通过针对肿瘤血管内皮标志物的单克隆抗体, 选择性地靶向肿瘤内组织因子, 以增加血凝块形成, 从而抑制肿瘤生长。如 Ran 等<sup>[11]</sup>应用抗鼠血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)的单克隆抗体作为靶向, 选择性作用于表达 VCAM-1 肿瘤组织中组织因子的细胞外区, 促使这些血管形成血栓。尽管 VCAM-1 在小鼠心脏和肺脏的小静脉中也有表达, 但并不引起血栓形成, 可能与肿瘤细胞同时表达磷脂酰丝氨酸(PS), 而这些小静脉缺少 PS 有关。因此, 这种选择性作用肿瘤血管, 促使血栓形成, 以减少肿瘤血供, 引起肿瘤细胞“饥饿”死亡的抗肿瘤措施具有很好的应用前景<sup>[12]</sup>。

### 2 免疫结合物的抗肿瘤作用

免疫结合物(icon)分子是一种含有肿瘤靶向区域(domain)的 IgG1 免疫球蛋白, 它由 2 条重链组成, 每条重链的可变区(V<sub>H</sub>)含有一段肿瘤靶向区域, 用来识别不同肿瘤细胞特异性抗原或受体, 恒区(C<sub>H</sub>)为 Fc 效应区, 用来结合 Fc 受体和补体, 启动机体的免疫系统以攻击肿瘤细胞, 中间由铰链区(H)相连, 相同的 2 条重链由二硫链相连。根据肿瘤血管内皮细胞和肿瘤细胞可表达组织因子而正常血管内皮细胞不表达这一现象, Hu 和 Garen 等<sup>[13]</sup>在设计 icon 分子时, 将鼠的突变因子 VII(mfVIIasm)作为靶向区域, 用来识别肿瘤血管内皮细胞以及肿瘤细胞表达的组织因子。因为鼠因子 VII 能与人或鼠组织因子强有力地接合, 激活凝血系统形成弥散性血管内凝血(DIC), 为避免 DIC 发生的可能性, 研究人员在构建重组质粒时, 将鼠第 VII 因子第 341 号密码子的赖

氨酸(AAG)替换成丙氨酸(GCG),使凝血活性部分突变,抑制血液凝固,同时又保留对组织因子有高亲和性的部分。每条链的一端为鼠的突变因子Ⅶ区域,二链形成同源二聚体以增强对表达组织因子细胞的亲和力,另一端为人IgG1 Fc效应区(hFc),构成由mfⅦ/hFc组成的icon分子,并将其DNA构建于腺病毒载体上。

然后,他们将人前列腺癌细胞系C4-2接种于雌性SCID/CB-17小鼠一侧或两侧背部皮下,当瘤体达350 mm<sup>3</sup>时,在一侧瘤体内注射编码mfⅦ/hFc icon的腺病毒载体,而另一侧不注射作为转移瘤模型,经20 d共7次注射治疗后,小鼠肿瘤逐渐缩小,当肿瘤再次生长时,继续追加注射3次后,肿瘤又缩小,在第53天停止注射,其后仍不见肿瘤复发,最后只剩下含坏死细胞的很小结节,整个实验持续194 d,小鼠健康状况良好,在8只治疗的小鼠中无1只出现肿瘤转移,而且未注射的对侧瘤体也出现消退。由于其血浆浓度大约是能延长凝血酶元时间(PT)最小浓度的1%,远低于引起出血的浓度,因而无出血等相关毒副作用。与此相比,仅注射腺病毒空载体的对照组小鼠肿瘤生长迅速,少数出现骨转移,通常在49~63 d内死亡。表明mfⅦ/hFc icon分子瘤体内注射,不仅对局部肿瘤有治疗作用,对远处转移同样有效<sup>[1]</sup>。

在此之前,该实验室的Wang等<sup>[13]</sup>曾构建并合成了2种抗人黑色素瘤相关硫酸软骨素蛋白聚糖(melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan, MCSP)的免疫结合物(即E26-1和G71-1)。由于MCSP主要由黑色素瘤细胞所表达,而正常黑色素细胞、其他正常细胞或肿瘤细胞等不表达,具有相对特异性,因此在该免疫结合物中,含有一段从MCSP特异性抗体分离而来的单链Fv(scFv)分子,用以作为黑色素瘤细胞靶向区域,使免疫结合物能与人黑色素瘤细胞特异性结合。而人IgG1的Fc区域能结合自然杀伤(NK)细胞表面的CD16受体(IgG的Fc受体)和补体C1q蛋白,故当免疫结合物与人黑色素瘤细胞在体内或体外结合后,可激活NK细胞和补体系统,通过抗体依赖细胞介导的细胞溶解作用(ADCC),使结合有icon分子的黑色素瘤细胞裂解死亡,以达到抗肿瘤治疗的目的。同时他们还发现,scFv免疫结合物因分子量小,容易透过肿瘤细胞膜,以及来源于自体组织而呈现低免疫排斥反应,其抗肿瘤免疫治疗效果优于单克隆抗体。之后,Hu等<sup>[2]</sup>在此基础上又进行了双靶向免疫治疗的研究,他们将编码鼠的突变因子Ⅶ和抗人黑色素瘤MCSP单链Fv抗体(G71-1)分别构建于腺病毒载体形成2个不同的免疫结合物(即mfⅦasm免疫结合物和G71-1免疫结合物)。然后单独或联合在有黑色素瘤的SCID小鼠尾静脉内注射,每周1次,共3次,结果显示,重组腺病毒载体静脉内注射后,可使转染肿瘤细胞合成和分泌免疫结合物分子,并释放进入血流,首次注射后,G71-1免疫结合物的血浆浓度达4 mg/ml,是mfⅦasm免疫结合物的100倍,再次注射后血浆浓度随之升高,并在血液中持续至少1周,两者均能有效抑制肿瘤生长,使局部肿瘤或远处转移灶消退,且mfⅦasm免疫结合物对肿瘤抑制作用强于G71-1免疫结合物,两者合用时

作用更明显,肿瘤重量减少最多。但静脉注射时可引起肝脏损害,可能与肝细胞被转染并持续合成高水平免疫复合物有关。因此他们又将上述2种icon重组腺病毒进行瘤体内注射<sup>[3]</sup>,同样取得了类似效果,转染icon重组腺病毒的肿瘤细胞也能合成和分泌icon分子并进入血流,有效地抑制局部或远处转移肿瘤的生长,同时又避免了肝脏等器官的损害,表明瘤体内注射较静脉注射安全。如果体表无肿瘤部位可供注射,亦可肌肉注射。由于组织因子在多种实体肿瘤的血管内皮细胞有表达,因此,以组织因子为靶向的免疫治疗方法具有广谱抗肿瘤作用<sup>[1-3]</sup>,值得进一步深入研究。

### 3 问题与展望

目前抗肿瘤血管生成治疗尚处于实验研究及临床试用阶段,特别是基因治疗才刚起步不久,还很难确切评价其临床应用价值,但初步结果是令人鼓舞的。当然,也存在不少问题有待于进一步观察和研究,如icon分子中的因子Ⅶ与组织因子结合,是否会激活外源性凝血系统,促使血凝块形成,与内源性因子Ⅶ竞争结合组织因子是否抑制凝血系统而引起出血,以及icon分子激活细胞溶解免疫反应是否损伤正常血管等等。相信随着这些问题的解决,抗肿瘤血管生成治疗将会日益受到重视,并有可能成为21世纪肿瘤治疗的重要手段之一。

### [参考文献]

- [1] Hu Z, Garen A. Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(21): 12180-12185.
- [2] Hu Z, Sun Y, Garen A. Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(14): 8161-8166.
- [3] Hu Z, Garen A. Intratumoral injection of adenoviral vectors encoding tumor-targeted immunoconjugates for cancer immunotherapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(16): 9221-9225.
- [4] Abe K, Shoji M, Chen J, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(15): 8663-8668.
- [5] Koomagi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: Correlation between tissue-factor and angiogenesis[J]. Int J Cancer, 1998, 79(1): 19-22.
- [6] Abdulkadir SA, Carvalho GF, Kaleem Z, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma[J]. Hum Pathol, 2000, 31(4): 403-405.
- [7] Rickles FR, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer[J]. Int J Hematol, 2001, 73(2): 145-150.
- [8] Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, et al. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: Correlation with the malignant phenotype of human breast disease[J]. Nat Med, 1996, 2(5): 491-492.
- [9] Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, et al. Tissue factor

promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92( 18 ): 8205-8209.

[ 10 ] Bromberg ME, Sundaram R, Homer RJ, *et al.* Role of tissue factor in metastasis: Functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule[ J ]. Thromb Haemost, 1999, 82( 1 ): 88-92.

[ 11 ] Ran S, Gao B, Duffy S, *et al.* Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature[ J ]. Cancer Res, 1998, 58( 20 ): 4646-4653.

[ 12 ] Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, *et al.* Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice[ J ]. Cancer Res, 2001, 61( 2 ): 711-716.

[ 13 ] Wang B, Chen YB, Ayalon O, *et al.* Human single-chain Fv immunoconjugates targeted to a melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan mediate specific lysis of human melanoma cells by natural killer cells and complement[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96( 4 ): 1627-1632.

[ 收稿日期 ] 2001 - 12 - 03

[ 修回日期 ] 2002 - 01 - 20

## · 研究简报 ·

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )02-0152-01

# GPI 信号肽序列与 B7-1 基因的拼接及其真核表达载体的构建和序列分析

易平勇, 余海, 马文学 ( 浙江大学医学院肿瘤研究所, 浙江 杭州 310006 )

B7-1 提供 T 细胞激活需要的辅助信号, 大多数的肿瘤细胞表面并不表达 B7-1 分子, 这可能是肿瘤逃避机体免疫攻击的原因之一。通过基因转染法, 将 B7-1 基因导入肿瘤细胞中表达, 能诱导抗肿瘤免疫反应, 但基因转染有其局限性, 因此有必要探寻更好的转染法。糖基化磷脂酰肌醇 ( GPI ) 锚定蛋白是通过其羧基末端的 GPI 结构锚定于细胞膜表面的一类蛋白, 人胎盘碱性磷酸酶-1 ( hPLAP-1 ) 也是一种 GPI 锚定蛋白, 指导蛋白锚定附着的信号是 C 末端信号肽。利用这一个特点, 我们将鼠 B7-1 基因胞外区与 hPLAP-1 C 末端信号肽基因序列进行拼接, 并构建该融合基因的真核表达载体。经测序是正确的, 从而为进一步研究 GPI 锚定 mB7-1 分子的抗肿瘤作用打下基础。

用常规方法提取人胎盘组织 DNA, 根据 hPLAP-1 的基因序列, 利用 PCR 技术, 以人胎盘组织 DNA 为模板, 构建 hPLAP-1 第 10 外显子克隆载体 pGEM-hPLAP10exon, 它包含 GPI 锚定信号序列。根据 mB7-1 基因序列, 设计一对引物 P1 ( 5'-GGA ATT CGC TAT GGC TTG CAA TTG TCA G-3' ) 和 P2 ( 5'-CGC AGG CGG TGT ATG TGT TCT TGC TAT CAG G-3' )。根据 hPLAP-1 基因序列, 设计一对引物 P3 ( 5'-GAT AGC AAG AAC ACA TAC ACC GCC TGC GAC CT-3' ) 和 P4 ( 5'-ATC TCG AGT CAG GGA GCA GTG GCC GTC T-3' )。P1-P2 扩增: 以 pLNSX-mB7-1 ( 含有小鼠 B7-1 完整开放阅读框 ) 为模板, 94℃ × 5 min, 94℃ × 1 min, 62℃ × 1 min, 72℃ × 1 min, 共 25 个循环; P3-P4 扩增: 以 pGEM-hPLAP10exon 为模板, 94℃ × 5 min, 94℃ × 1 min, 60℃ × 1 min, 72℃ × 45 s, 共 25 个循环; 回收 PCR 产物。P1-P4 扩增: 将 400 ng 的 P1-P2, P3-P4 产物等量混合, 作为模板行 PCR, 以 P1, P4 为引物, 94℃ × 5 min, 94℃ × 1 min, 50℃ × 1 min, 72℃ × 1.5 min, 共 25 个循环, 回收产物。P1-P4 产物与 pGEM-T 载体连接, 构建克隆载体 pGEM-T/mB7. 1-GPI, 转化 JM109, 挑取克隆, 扩增并提取质粒, 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定, 回收插入片段, 亚克隆到真核表达载体 pcDNA3. 1( + ) 中, 构建表达载体 pcD-

NA3. 1( + )/mB7. 1-GPI, 转化 JM109, 挑取克隆, 扩增并提取质粒, 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切鉴定和测序。

P1-P2, P3-P4 和 P1-P4 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 分别可见到与引物设计预期的片段 ( 764 bp, 155 bp 和 891 bp )。P1-P4 扩增产物的克隆载体 pGEM-T/mB7. 1-GPI 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳见有目的条带 DNA ( 886 bp )。重组表达载体 pcDNA3. 1( + )/mB7. 1-GPI 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳见有目的条带 DNA ( 886 bp )。序列分析证明构建的表达载体含有融合基因的序列。

人们对 B7-1 在肿瘤免疫中的作用已作了广泛的研究, 将 B7-1 基因导入肿瘤细胞, 可以诱导产生 T 细胞介导的抗肿瘤免疫反应, Townsend 等将 B7-1 基因导入小鼠黑色素瘤细胞中, 发现转基因的肿瘤细胞在有免疫力的同系小鼠中不能成瘤。他们使用的是基因转染法, 该方法有其局限性: 低效的基因转染、整合后基因的降解及其表达的不稳定性。近年来开展的蛋白转染法为肿瘤免疫治疗开辟了新的途径, 蛋白转染法有许多优点: 不依赖于细胞的转染性、可同时转染多种蛋白及耗时少。B7-1 是一种跨膜蛋白, 起功能作用的是胞外区。Mchugh 等将 mB7-1 基因胞外区与 CD16B 的 GPI 锚定信号肽基因序列融合, 表达出 mB7. 1-GPI 蛋白, 该蛋白能嵌入细胞膜, 细胞学实验发现它能提供 T 细胞增殖的共刺激信号。我们将 mB7-1 基因的胞外区与 hPLAP-1 的 C 末端的信号肽基因序列拼接成融合基因, 经测序是正确的。下一步我们将进行表达, 制备 mB7. 1-GPI 蛋白, 进行蛋白转染, 行肿瘤免疫治疗。

[ 关键词 ] 共刺激分子; 糖基化磷脂酰肌醇; 融合基因; 人胎盘碱性磷酸酶

[ 中图分类号 ] R730.51

[ 文献标识码 ] D

[ 收稿日期 ] 2001 - 10 - 22

[ 修回日期 ] 2002 - 01 - 14

[ 基金项目 ] 浙江省自然科学基金项目资助 ( No. 399131 )