

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0217-03

## 人 NK 细胞系的建立及其在肿瘤生物治疗中的应用前景

张慰慈, 张 建 综述, 孙 纳, 田志刚 审阅 (山东省医学科学院肿瘤生物治疗中心, 济南 250062)

[摘要] 自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)是无需预先致敏,无 MHC 限制性,能直接杀伤靶细胞的一类特殊的淋巴细胞群体,由于 NK 细胞在抗感染和抗肿瘤中起着重要作用而成为近来肿瘤生物治疗的研究热点。NK 细胞系的建立尤其是 NK-92 的建立促进了其在肿瘤过继免疫治疗中的应用研究,并为深入研究 NK 细胞的特征、功能,进一步揭示它在免疫系统中的作用,提供了更为有利的研究材料和方法。

[关键词] 自然杀伤细胞; 细胞系; 肿瘤; 生物治疗

[中图分类号] R392.12 [文献标识码] A

NK 细胞属于体积较大的异质性的淋巴细胞群体,在免疫监视、免疫防御中起着十分重要的作用。近来研究发现,肿瘤细胞可以通过上调自身的 HLA-A, B, C 和 HLA-G, E 的表达等机制来逃逸 NK 细胞的免疫监视而导致肿瘤的发生,同时患有恶性肿瘤的病人其 NK 细胞的功能与正常人相比有不同程度的损害。研究人员尝试通过不同的途径来提高 NK 的抗肿瘤作用,但是 NK 细胞的纯化及体外大量扩增在技术上存在一定的难度,因此有许多人试图建立 NK 细胞系用于肿瘤生物治疗。随着细胞克隆化技术的不断成熟,相继报道的 NK 细胞系有许多,但是只有 6 种来自 NK 细胞瘤的 NK 细胞系是定性的,它们是经过单克隆化、可以永久生存的大颗粒淋巴细胞,含有嗜苯胺蓝颗粒,胚系 TCR 基因,其免疫表型为: CD1<sup>-</sup> CD2<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD5<sup>-</sup> CD7<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>-</sup>, TCR $\gamma\delta$ <sup>-</sup>, 染色体在数量上和结构上均发生变化,具有 NK 活性,有/无 ADCC 效应, EBV<sup>+/-</sup>。本文现将这几种 NK 细胞系的建立情况以及应用前景进行概述。

### 1 正常 NK 细胞来源的 NK 细胞系

NK3.3 为 Kornbluth 等<sup>[1]</sup>从混合淋巴细胞培养中的 PB-MC 培养于软琼脂板上,分离单个克隆,而后在液体培养基中扩增而获得的 NK 细胞系。其形态、免疫组化、表型都与 LGL 相似。为 IL-2 依赖型,具有很强的自然杀伤活性,可以杀伤 NK 敏感靶细胞 K562, MOLT-4, HSB-2, CEM, BUC, Daudi。其表型为 9.6E<sup>+</sup>, 3A1<sup>+</sup>, HLA-DA<sup>+</sup>, T200<sup>+</sup>, T10<sup>+</sup> T3/Leu4<sup>-</sup>, T8/Leu2a<sup>-</sup>, T4/Leu3a<sup>-</sup>, Leu7<sup>-</sup>。

### 2 恶性变细胞来源的 NK 细胞系

#### 2.1 YT

YT 是 Yodoi 等<sup>[2]</sup>于 1983 年建立。细胞来源于一名 15 岁患有急性淋巴瘤和胸腺瘤的日本男性的心包积液。细胞学检查发现心包积液中有大量变异的单核细胞。在整个疾病过程中,外周血中始终未检测到白血病细胞。YT 细胞大小

不一,核不规则,胞浆内有许多空泡和嗜苯胺蓝颗粒。免疫表型: CD2<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, 表达 TacAg/IL-2, 但在体外培养过程中 TacAg 的表达逐渐减少。染色体分析: 四倍体,有 4q+ 染色体标志。染色体数目在 83~95 之间。YT 是已建成的细胞系中唯一一个不依赖 IL-2 的细胞系。不需要条件培养基和 IL-2 而可在体外长期扩增。YT 可杀伤 K562, MOLT-4, HPB-ALL, HSB-2 细胞。

#### 2.2 NK-92

NK-92 是 Gong 等<sup>[3]</sup>于 1992 年建立的依赖 IL-2 的细胞系。细胞取自一名 50 岁患有快速侵袭性非何杰金氏淋巴瘤的男性患者的外周血。患者的骨髓被大颗粒淋巴细胞浸润,骨髓和外周血的淋巴细胞免疫表型为 CD56<sup>+</sup> CD2<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>。培养后获得的 NK-92 细胞仍具有大颗粒淋巴细胞的形态,细胞核圆形或有凹痕,核仁明显,胞浆嗜碱性,内有大量嗜苯胺蓝颗粒,细胞易聚集。免疫表型为 CD3<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup>, CD2<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup>。尽管缺少 CD16 但它仍具有高度的细胞毒活性,能杀伤大多数的 MHC- I 类抗原阳性的肿瘤和新鲜分离的恶性细胞,尤其是造血系统来源的恶性细胞。经(4 h)<sup>51</sup>Cr 释放法测定的细胞杀伤活性,在效靶比为 1:1 时对 K562 细胞的杀伤活性为 83%,对 Daudi 为 76%,由于其具有高度的杀伤能力,故可用于临床细胞过继免疫治疗。

#### 2.3 NKL

NKL 是 Robertson 等<sup>[4]</sup>建立的。细胞来源于一名 63 岁男性 CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> 的大颗粒淋巴细胞白血病患者的外周血。其外周血淋巴细胞多数具有 LGL 的形态特点,约 50% 的外周血单个核细胞表达 CD56 和 MHC- II 类抗原,33% 表达 CD3。骨髓活检: 10%~20% 为淋巴细胞侵袭,以 LGL 居多。病情恶化后,末梢血白细胞 95% 为 LGL。NKL 细胞经过几个月的连续培养,仍具有 LGL 的形态。电镜显示 NKL 的超微结构与扩增后正常的多克隆 NK 细胞相似。NKL 的基因型分析: 获得的 2 个克隆之一接近二倍体,染色体数目在 41~50 之间。另一克隆接近四倍体,数目在 66~104 之间。NKL 核型为 47,XY add(1)(q42)+6,del(6)(q15q23),

del(17)(p11)。免疫表型: NKL 表达 CD2, CD6, CD11a, CD26, CD27, CD29, CD38, CD43, CD58, CD81, CD94, CD95, MHC-II。在体外培养过程中 CD16, CD56, CD57 的表达密度明显降低。NKL 依赖于 IL-2 生长, 具自然杀伤活性和 ADCC 效应, 表现的增殖反应也与正常的 CD16<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK 细胞相似。

#### 2.4 HANK-1

HANK-1 是 Kagami 等<sup>[5]</sup>于 1994 年建立, 取自一名 46 岁患有鼻部血管中心性 NK/T 细胞淋巴瘤女性患者腹膜后的淋巴结, 细胞表型为 CD56<sup>+</sup>, 种植于 SCID 鼠的皮下, 从小鼠长出的肿瘤中建立了该细胞系。细胞形态: 多形的大细胞, 有不规则的核, 胞浆内有嗜苯胺蓝颗粒。免疫表型分析: HANK-1 表达 CD2, CD3 $\epsilon$ , CD7, CD56, TIA-1, granzyme B 和 HLA-DR, 但没有其它 T 细胞系的标记, CD25 呈强势表达。HANK-1 的基因型分析: 有 TCR $\beta$ ,  $\gamma$  和 IgH 的胚系结构。EBV 的克隆整合表现为 LMP-1<sup>+</sup> 和 EBNA2<sup>-</sup>。Southern blot 分析证实 EBV 来源于淋巴瘤细胞。HANK-1 在体外培养中, 表现为 IL-2 依赖性。

#### 2.5 NK-YS

NK-YS 是 Tsuchiyama 等<sup>[6]</sup>人于 1996 年建立的 NK 细胞系。细胞取自一名 19 岁患有鼻部血管中心性 NK 细胞淋巴瘤白血病人外周血, 细胞表型为 CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>。免疫组化染色、原位杂交示淋巴瘤细胞为 CD3<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup>。病理检查示淋巴瘤细胞侵袭真皮和表皮, 这些细胞为 CD56<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD20<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup>。从皮损处组织中提取的 RNA 分析示无 TCR $\beta$ ,  $\gamma$  和 IgH 的重排。原位杂交结果显示在淋巴瘤细胞的细胞核内存在 EBER-1。病人白细胞 99% 为变异的 LGL, 胞内有粗大的嗜苯胺蓝颗粒, 表达 CD2, CD5, CD7, CD56 和 EBER-1, 但 CD3<sup>-</sup>。NK-YS 表达 CD2, CD5, CD7, CD25, CD56 和 CD95( Fas ), 保存了原型 NK 淋巴瘤细胞的特性, 对 K562 和 Jurkat 细胞有细胞毒活性。染色体分析: NK-YS 的核型为 46, XX, add(3)(q26.2), der(4)(1;4)(q12;p16)。Southern blot 分析: NK-YS 细胞存在 TCR $\beta$  和  $\gamma$  链的胚系结构。EB 病毒在新鲜白血病人细胞和 NK-YS 中均存在。免疫细胞化学示 NK-YS 表达低水平的 LMP-1 而不表达 EBNA-2 和 ZEBRA 蛋白, 这一结果表明 NK-YS 有 EB 病毒 II 型潜在感染模式。无 ZEBRA 蛋白表明 EBV 在 NK-YS 细胞内不进行复制。LMP-1 的 RT-PCR 结果也预示在 NK-YS 中的 EBV 可能有 LMP-1 基因的部分缺失。

#### 2.6 KHYG-1

Yagita 等<sup>[7]</sup>于 1997 年从一名 45 岁女性, 恶性 NK 细胞白血病人外周血中建立了具有 p53 基因点突变的 KHYG-1 细胞系。细胞形态: 具有 LGL 的形态学特点, 有一个较大的细胞核, 染色体粗糙, 核仁明显, 胞浆丰富, 嗜碱性, 内有嗜苯胺蓝颗粒。免疫表型: KHYG-1 的细胞表型为 CD1<sup>-</sup>, CD2<sup>+</sup>, sCD3<sup>-</sup>, CD3 $\epsilon$ <sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, CD16<sup>-</sup>, CD25<sup>-</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD57<sup>-</sup>, CD122<sup>+</sup>, CD132<sup>+</sup>, TdT<sup>-</sup>。Southern blot 分析结果示 TCR $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  链和 IgH 有正常的胚系结构。

PCR/SSCP 结果示在 p53 基因的第 7 个外显子上点突变。测序结果表明, 在第 248 密码子第 877 位的核苷酸由 C 变为 T。KHYG-1 具有 NK 细胞的活性, 在体外依赖 IL-2 生长。

### 3 NK 细胞系的应用前景

#### 3.1 在肿瘤生物治疗中的应用

由于 NK-92 具有高强度、广谱的细胞毒效应, 成为临床前应用研究中最为关注的一个 NK 细胞系。在特征上 NK-92 缺乏杀伤细胞免疫球蛋白样受体( killer cell immunoglobulin-like receptors, KIRs )但仍具有 perforin 和 granzyme B 介导的溶细胞活力<sup>[8]</sup>。NK-92 的表达大量的活化受体 NKp30, NKp46, 2B4, NKGD, E, CD28, 而抑制受体的表达却极少, 只有 NKGA/B 和低水平的 KIR2DL4 与 ILT-2, 缺乏大多数正常 NK 细胞克隆表达的 KIRs, 如 p58 复合体( p58 复合体通过结合靶细胞上的 HLA 抗原而抑制 NK 细胞的杀伤 )<sup>[9]</sup>。在 NK-92 细胞中与 perforin-granzyme 细胞溶解途径有关的分子以及其它的细胞毒效应分子如 TNF-超家族成员 FasL, TRAIL, TWEAK, TNF-alpha 呈高水平表达。NK-92 对不同来源肿瘤的细胞系, 如白血病、淋巴瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、乳腺癌等, NK-92 都表现出高效的杀伤活性。为了使 NK-92 更适于临床应用, Nagashima 等<sup>[10]</sup>又成功将 IL-2 基因转染到 NK-92 细胞中, 建立了非 IL-2 依赖的 NK 细胞, 并通过体内外实验证明基因修饰的 NK-92 细胞的细胞毒效应明显高于 IL-2 依赖的亲代 NK-92 细胞, 对建立的肝转移癌小鼠也有较强的抗瘤作用。Tam 等<sup>[11]</sup>通过体外实验和 SCID 鼠的体内实验发现 NK-92 对人类的黑色素细胞瘤有很强的杀伤能力。诸多研究结果证明了 NK-92 在生物治疗中作用, 使其成为进入 I ~ II 期临床试验的细胞系。随着临床 I 期试验的顺利进行, 应用 NK-92 进行的过继免疫治疗必将成为肿瘤生物治疗中的一部分。

#### 3.2 其他应用

除 NK-92 的临床应用的前景广阔外, EBV<sup>+</sup> 的 NK 细胞系 HANK-1, NK-YS, SNK-6 的建立有利于探讨 EBV 在鼻部 T/NK 细胞淋巴瘤发病机制中的所起作用。尽管鼻部 T/NK 细胞淋巴瘤的病因尚不清楚, 但有学者认为其发病与 EBV 有密切的联系。CD21 是已知唯一的病毒受体, Kaneko 等<sup>[12-13]</sup>从一例鼻部 T/NK 细胞淋巴瘤细胞中以及正常的 NK 细胞中均检测到 CD21 的表达, 但 SNK-6 和 NK-YS 却不表达 CD21 抗原。因此这 2 种细胞系的建立还将有利于研究 EBV 感染 NK 细胞的途径以及 CD21 在病毒感染 NK 细胞过程中所起的作用<sup>[14]</sup>。

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Kornbluth J, Flomenberg N, Dupont B, *et al.* Cell surface phenotype of a cloned line of human natural killer cells[ J ]. *J Immunol*, 1982, 129: 2831-2837.
- [ 2 ] Yodoi J, Teshigawara K, Nikaido T, *et al.* TCGF( IL-2 )-receptor inducing factor( s ). 1. Regulation of IL-2 receptor on a natural killer-like cell line( YT cells ) [ J ]. *J Immunol*, 1985, 134: 1623-1630.

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )03-0219-03

## TNP-470 抑制肿瘤血管内皮细胞增殖的作用机制

吴晓娟 综述, 杨向红, 董玉兰 审阅 ( 中国医科大学实验病理学研究室, 沈阳 110001 )

[ 摘 要 ] 肿瘤血管形成是一个复杂的过程, 包括内皮细胞增殖、迁移、分化, 最后形成管状结构, 肿瘤的生长和侵袭离不开血管新生。TNP-470 O-( 氯乙酰-氨基酰基 ) 烟曲霉醇, 是一类人工合成的烟曲霉素类衍生物, 它可抑制肿瘤微环境中新生血管形成, 从而发挥其强有力的抗肿瘤生长及转移的能力。此外, TNP-470 还能增强放、化疗的效果, 并且能与某些免疫制剂起协同作用。

[ 关键词 ] TNP-470; 肿瘤细胞; 内皮细胞; 增殖

[ 中图分类号 ] R730.5 [ 文献标识码 ] A

肿瘤的生长和侵袭离不开血管新生。实体肿瘤的生长可分为血管前期和血管期, 在血管前期, 如果没有新生血管的长入, 其大小不会超过 ( 2 ~ 3 ) mm<sup>3</sup>; 一旦进入血管期, 则其体积可呈指数增长, 并具有转移能力。因此, 早在 70 年代 Folkman 就提出对抗肿瘤血管可以治疗肿瘤这一设想, 此种观点已被广泛接受。

### 1 与肿瘤血管生成有关的生长因子及这些生长因子受体

肿瘤血管生成是一个复杂的多步骤的过程, 包括内皮细胞增殖、迁移、分化, 最后成为管状结构。到目前为止, 报道的与血管生长有关的生长因子有 30 多种<sup>[1]</sup>, 如血管内皮细胞生长因子( vascular endothelial growth factor, VEGF )、纤维母细胞生长因子( fibroblast growth factors, FGFs )、转化生长因子( transformang growth factor, TGF )、IL-8、血管生成素等。

其中, VEGF 和 FGFs 既是生理性血管生成的主要调节因子, 又是肿瘤血管生成的主要刺激因子。

#### 1.1 VEGF 及其受体 VEGFR

VEGF 是目前知道的作用最强、特异性最高的直接作用于血管内皮细胞的生长因子<sup>[2]</sup>。肿瘤组织中丰富的 VEGF 主要来源于肿瘤细胞。VEGF 具有使小静脉、微静脉通透性增加, 血管内皮细胞分裂、增殖以及诱导血管形成的作用。它可与 3 种选择性表达于血管内皮细胞上的高亲和力酪氨酸受体 Flk-1/KDR,flt-1 和 flt-4 结合发挥其作用。VEGF 与受体 KDR 的结合能通过 MAPK 信号途径即 VEGF→KDR→Crb2→SOS→Ras→MAPK→AP-1 引起内皮细胞增殖; VEGF 与 flt-1 的结合虽能引起 flt-1 酪氨酸磷酸化, 但并不引起内皮细胞的增殖, 而是诱导内皮细胞与内皮细胞之间的相互作用及微血管的形成, 有关 flt-1 的下游信号通路尚不清楚。

- [ 3 ] Gong JH, Maki G, Klingemann HG, *et al.* Characterization of a human cell line ( NK-92 ) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells[ J ]. *Leukemia*, 1994, 8: 652-658.
- [ 4 ] Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, *et al.* Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia[ J ]. *Exp Hematol*, 1996, 24: 406-415.
- [ 5 ] Kagami Y, Nakamura S, Suzuki R, *et al.* Establishment of an IL-2 dependent cell line derived from nasal-type NK/T-cell lymphoma of CD2<sup>+</sup>, sCD3<sup>-</sup>, CD3e<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup> phenotype and associated with the Epstein-Barr virus[ J ]. *Br J Haematol*, 1998, 103: 669-677.
- [ 6 ] Tsuchiyama J, Yoshino T, Mori M, *et al.* Characterization of a novel human natural killer cell line ( NK-YS ) established from natural killer cell lymphoma /leukemia associated with Epstein-Barr virus infection[ J ]. *Blood*, 1998, 92: 1374-1383.
- [ 7 ] Yagita M, Huang CL, Umehara H, *et al.* A novel natural killer cell line from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying p53 point mutation[ J ]. *Leukemia*, 2000, 14: 922-930.
- [ 8 ] Tonn T, Becker S, Esser R, *et al.* Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line nk-92[ J ]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10( 4 ): 533-544.
- [ 9 ] Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, *et al.* Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, nk-92 [ J ]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10( 3 ): 369-383.
- [ 10 ] Nagashima S, Mailliard R, Kashii Y, *et al.* Stable transduction of the interleukin-2 gene into human natural killer cell lines and their phenotypic and functional characterization *in vitro* and *in vivo*[ J ]. *Blood*, 1998, 15: 91( 10 ): 3850-3861.
- [ 11 ] Tam YK, Miyagawa B, Ho VC, *et al.* Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell NK-92[ J ]. *J Hematother*, 1999, 8( 3 ): 281-290.
- [ 12 ] Chan JKC, Yip TTC, Tsang WYW, *et al.* Detection of Epstein-Barr viral RNA in malignant lymphoma of the upper aerodigestive tract[ J ]. *Am J Surg Pathol*, 1994, 18: 938-946.
- [ 13 ] Kaneko T, Fukuda J, Yoshihara T, *et al.* Natural killer ( NK ) cell lymphoma: Report of a case with activated NK cells containing Epstein-Barr virus and expressing CD21 antigen, and comparative studies of their phenotype and cytotoxicity with normal NK cells [ J ]. *Br J Haematol*, 1995, 91: 355-361.
- [ 14 ] Tanner J, Weis J, Fearon D, *et al.* Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocytes C3d receptor mediates adsorption, capping and endocytosis[ J ]. *Cell*, 1987, 50: 203-213

[ 收稿日期 ] 2002 - 04 - 22

[ 修回日期 ] 2002 - 07 - 20

## 1.2 FGFs 及其受体 FGFR

FGFs 参与许多生理过程,如纤维母细胞和内皮细胞的增殖和分化。FGFs 至少包括 9 个成员,FGF-1/aFGF,FGF-2/bFGF,FGF-3,FGF-4,FGF-5,FGF-6,FGF-7,FGF-8,FGF-9 等<sup>[3]</sup>。其中,bFGF 是该家族中的重要一员,最初由 Gospodarowicz 于 1974 年从牛脑垂体中提取,是一种对成纤维细胞株 3T3 有明显促增殖作用的多肽分子。它可与两类位点结合,这两类位点代表的是一个受体。FGFR( fibroblast growth factor receptor )是一类具有自主磷酸化活性的跨膜糖基化受体<sup>[4]</sup>。早期研究将其分为高亲和力受体和低亲和力受体。bFGF 与 FGFR 结合后激活受体胞内段即酪氨酸激酶活性区,从而引起一系列信号传导。bFGF 发挥作用离不开低亲和力受体,即硫酸乙酰肝素蛋白聚糖( heparan sulfate proteoglycan, HPG )的辅助,HSPG 具有促进 bFGF-FGFR 结合,增强 bFGF 稳定性,调节 bFGF 活性等生物学作用。

目前发现,bFGF 与 VEGF 的关系也很密切,研究表明,尽管静息期的内皮细胞不表达 VEGF,但加入外源性重组 bFGF 到培养的内皮细胞或上调内源性 bFGF 能引起 VEGF 的表达增加。

## 2 血管生成抑制剂的分类

研究表明,通过干预血管生长因子作用能使实验动物的肿瘤退化,如应用抗-VEGF 单抗、可溶性 FGF 受体等。但這些仅能抑制/中和单一的血管生长因子的方法,会导致肿瘤细胞出现变异、分泌其它生长因子而诱导血管生成。

应用血管生成抑制剂治疗肿瘤的设计已被广泛接受,主要通过①抑制血管内皮细胞的增殖和迁移。②抑制血管基底膜和细胞外基质的降解和更新,抑制血管重建。血管生成抑制剂主要有两大类<sup>[5]</sup>:①直接抗血管生成剂:它们直接对内皮细胞起作用,如血管抑素、内皮抑素等。②间接抗血管生成剂:它们仅影响肿瘤生成的微环境,目前大多数血管生成抑制剂属于这一类。

TNP-470 O-( 氯乙酰-氨甲基 )烟曲霉醇,简称 TNP-470 ( 或 AGM-1470 )<sup>[6]</sup>,是一类人工合成的烟曲霉素类衍生物,因其高效低毒现已成为颇受人们关注的血管生成抑制剂之一。TNP-470 以一种相对特异的方式抑制内皮细胞生长。其抑制曲线呈双相性,即低浓度时( 第 1 相 )呈可逆的细胞抑制作用,高浓度时( 第 2 相 )起不可逆的细胞毒性作用。它在皮克分子浓度能特异地抑制正常内皮细胞的增生,但对已被转化了的内皮细胞则无此作用。

## 3 TNP-470 可能的作用机制

TNP-470 显示了强有力的抑制内皮细胞生长的能力,但其作用机制不明。有研究表明,TNP-470 可能与蛋氨酸氨基肽酶 2( methionine aminopeptidase 2, MetAP2 )共价结合<sup>[7]</sup>。MetAP2 在体内参与翻译后蛋白酰基化,Src 酪氨酸激酶家族成员、cAMP 依赖的激酶、磷酸钙调神经蛋白,也是经十四烷酸与谷氨酸残基共价结合修饰的。谷氨酸残基是 MetAP2

将氨基氨基末端蛋氨酸水解掉后才暴露的。由于酰基化是几种信号转导蛋白功能所必需的,因而,MetAP2 功能受抑制也就可以特异性调节内皮细胞周期转导成员的酰基化。另外,TNP-470 介导的 MetAP2 的抑制可以改变蛋白的稳定性,这些蛋白均为内皮细胞周期障碍所异常表达或缺失的蛋白。按照 N-末端法则,由切割原始蛋氨酸残基而产生的倒数第二个氨基末端残基,对体外蛋白稳定性起重要作用。Yeh<sup>[8]</sup>等研究发现,无论在何种细胞,生物素化的烟曲霉素均可与 MetAP2 形成一化合物,推测该药可能选择性作用于内皮细胞 MetAP2;也可能是在 MetAP2 的下游有一特定的复合物选择性激活内皮细胞 P53,内皮细胞正常 P53 的表达可诱导细胞凋亡。

TNP-470 在低浓度时即可选择性抑制内皮细胞的 DNA 合成,其 IC<sub>50</sub> 值为 15 pg/ml。这一现象提示,TNP-470 可能与某种直接或间接抑制 DNA 合成的特异分子有着较强的相互作用。Antoine 等<sup>[6]</sup>研究发现 TNP-470 的作用靶点主要是正常内皮细胞的细胞周期。流式细胞仪计数分析证实,TNP-470 特异性阻断正常内皮细胞进入细胞周期 G<sub>1</sub> 期,使 G<sub>0</sub> 期细胞所占百分数上升。TNP-470 处理人脐静脉内皮细胞( HUVEC ),孵育超过 21 h 后,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例上升,而 G<sub>2</sub>/M 期和 S 期细胞比例降低。而转化后的内皮细胞即 EA. hy926 细胞株( HUVEC 与人瘤细胞株杂交获得 )或 cEnd. 1 细胞株对 TNP-470 不敏感。说明,TNP-470 可能是一种能够特异性影响正常内皮细胞周期调控通道活化的分子,即 TNP-470 作用后,正常内皮细胞进入 G<sub>1</sub> 期的通道受阻;而对转化的内皮细胞则无此作用,这可能与经旁路或通道性质改变有关。Hori 等<sup>[9]</sup>的实验显示,TNP-470 能抑制细胞周期蛋白 D<sub>1</sub> ( CyclinD<sub>1</sub> )的表达,从而遏制 HUVEC 的 DNA 合成。但也有报道 TNP-470 对 CyclinD<sub>1</sub> 的表达并无影响,而是抑制了细胞周期蛋白依赖型激酶( CDK )-2 的活性<sup>[10]</sup>,故其作用位点可能为 G<sub>1</sub>/S 分界线,使内皮细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期。Zhang 等<sup>[11]</sup>报道,TNP-470 经 P53, P21<sup>WAF1/CIP1</sup> 通路抑制细胞周期来发挥抗血管作用。P21<sup>WAF1/CIP1</sup> 是最早发现并克隆的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白( CDI )家族成员。P21<sup>WAF1/CIP1</sup> 分别与 Cyclin, CDK 结合,使 Cyclin-CDK 复合物激酶活性丧失。P21<sup>WAF1/CIP1</sup> 还可抑制 PCNA 与 DNA 多聚酶 6 结合形成复合物或使 DNA 全酶不能在 DNA 单链上滑动,影响 DNA 复制。另外,TNP-470 抑制尿激酶原激活因子( uPA )活性:肿瘤可以产生 PA,它能降解正常血管基底膜成分,还可介导 MMP 的作用。PA 可分为 uPA 和 tPA,它们属丝氨酸蛋白酶家族,其中 uPA 与肿瘤生长和转移关系密切。

Sheldon 等<sup>[12]</sup>研究 TNP-470 干扰 bFGF 活化刺激的损伤修复时发现,TNP-470 可以与 bFGF 竞争结合 NIH/3T3 细胞表面的 bFGF 低亲和力受体,但对高亲和力受体则无影响。TNP-470 可以经由此种机制使损伤修复延迟。Ishida 等<sup>[13]</sup>在研究 TNP-470 能否抑制脉络膜血管新生时发现,处理组脉络膜血管新生发生率明显低于对照组,且处理组 bFGFmRNA 表达下调,即 TNP-470 能够抑制与脉络膜血管新生有关的

bFGF 的表达。体内、体外实验已证实 TNP-470, INF- $\alpha$  两者有协同作用<sup>[14]</sup>。体外, TNP-470 和 rhINF- $\alpha$ 2a 以剂量依赖方式抑制 HUVECs 和 EA. hy926 内皮细胞株的增殖。

#### 4 TNP-470 对肿瘤细胞生长抑制作用的机制

TNP-470 有强的抗激素依赖性前列腺癌 PC-3 作用<sup>[15]</sup>。PC-3 可产生大量 bFGF, bFGF 为最强的促血管生成因子之一。bFGF 直接诱导血管新生及作为一个自分泌生长因子刺激肿瘤生长。TNP-470 对无酒精琼脂培养基上锚定生长的 PC-3 的剂量—依赖曲线与单层培养内皮细胞相似。PC-3 锚定生长的 IC<sub>50</sub> 与内皮细胞生长抑制的 IC<sub>50</sub> 相似, 提示 TNP-470 的作用靶点可能为介导内皮细胞生长和 PC-3 锚定生长的信号转导通路。Yoshida<sup>[16]</sup> 等发现, TNP-470 处理的肝细胞瘤细胞其 DNA 琼脂凝胶电泳出现典型的凋亡带。这种凋亡可能与肿瘤和肿瘤微环境内浸润的巨噬细胞释放 NO 增加有关, 并且在 TNP-470 处理的肝细胞瘤其 NOS 蛋白也明显增加。

此外, 高浓度的 TNP-470( 大于 10<sup>-6</sup> g/ml ) 对内皮细胞、肿瘤细胞均有不可逆的细胞毒作用。

#### 5 TNP-470 与放、化疗联合应用的作用机制

单用放疗治疗的恶性胶质瘤, 放疗后 8 h 光镜显示, 肿瘤血管内皮细胞肿胀及向管腔内突出<sup>[17]</sup>; 电镜下可见, 内皮细胞变圆、向管腔内突起, 内皮细胞间失去连接及细胞内细胞器破坏、丢失, 这样也就使得血管通透性增高。单用 TNP-470 处理后电镜下见肿瘤血管壁增厚、血管基底膜样物质大量聚集, Northern 杂交表明 angiopoietin-1 的 mRNA 表达上调, 两者间可能有一定关系。预先应用 TNP-470, 可明显削弱放疗引起的血管内皮形态改变, 这可能是 TNP-470 抑制了放疗引起的急性内皮损伤。因此, 临床应用 TNP-470 阻断放疗引起的微血管损伤, 而明显增强放疗的延迟肿瘤生长作用。此外, TNP-470 与米诺环素及环磷酰胺合用, 可延缓肿瘤生长, 可使 40% ~ 50% 的 Lewis 肺癌鼠长期存活; 与阿霉素合用, 可抑制大鼠垂体肿瘤微环境中血管形成; 与二十五碳烯酸合用, 72 h 后乳腺癌细胞系 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比率增加, S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞减少。

#### 6 结语

肿瘤的抗血管治疗为肿瘤治疗提供了崭新的前景, TNP-470 选择性抑制内皮细胞 DNA 合成, 使内皮细胞生长阻滞。大量的实验研究和临床试验均已证实, 它能有效地抑制肿瘤的生长和转移, 且不易产生耐药。并且它还能增强放疗、化疗的效果, 减少后者的用量, 降低毒性。TNP-470 临床试验的初步结果是肯定的。因而研究其作用机制对了解肿瘤的生物行为及进一步开展对血管生成抑制剂的研究都有重要意义。

#### [ 参考文献 ]

[ 1 ] 车国卫, 张世霞. 肺癌侵袭和转移的分子机制及其调控的研

究进展[ J ]. 中国肺癌杂志, 2001, 4( 2 ): 125-129.

- [ 2 ] 寿成超. 血管内皮细胞的增殖调节与抗血管肿瘤生物治疗[ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6( 3 ): 175.
- [ 3 ] Sheldon J, Bond MD, Scott A, *et al.* Interaction of angiogenesis inhibitor TNP-470 with basic fibroblast growth factor receptors[ J ]. J Surg Res, 2000, 92: 18-22.
- [ 4 ] Okada Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Factor growth factor-2[ J ]. Int J Biochem, 2000, 32( 2 ): 263-267.
- [ 5 ] 时伟. 肿瘤血管生成抑制物作用机制及应用研究进展[ J ]. 国外医学肿瘤学分册, 2001, 28( 1 ): 36-39.
- [ 6 ] Antoine N, Greimers R, De Roanne C, *et al.* AGM-1470, a potent angiogenesis inhibitor, prevents the entry of normal but not transformed endothelial cells into G<sub>1</sub> phase of the cell cycle[ J ]. Cancer Res, 1994, 54: 2073-2076.
- [ 7 ] Sin N, Meng L, Wang M, *et al.* The antiangiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 6099-6103.
- [ 8 ] Yeh JR, Mohan R, Crews CM, *et al.* The anti-angiogenic agent TNP-470 require P53 and P21<sup>CIP/WAF</sup> for endothelial cell growth arrest[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97( 23 ): 12782-12787.
- [ 9 ] Hori A, Ikeyama S, Sudo K. Suppression of cyclin D1 mRNA expression by the angiogenesis inhibitor TNP-470( AGM-1470 ) in vascular endothelial cells[ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 204: 1067-1073
- [ 10 ] Abe J, Zhou W, Takuwa N, *et al.* Fumagillin derivative angiogenesis inhibitor, AGM-1470, inhibits the activation of cyclin dependent kinases and phosphorylation of retinoblastoma gene product but not tyrosyl phosphorylation or proto-oncogene expression in endothelial cell[ J ]. Cancer Res, 1994, 54: 3407-3412.
- [ 11 ] Zhang Y, Griffith EC, Sage J, *et al.* Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent TNP-470 is mediated by P53 and P21<sup>WAF1/CIP1</sup>[ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97( 12 ): 6427-6432.
- [ 12 ] Sheldon J, Bond MD, Scott A, *et al.* Interaction of angiogenesis inhibitor TNP-470 with basic fibroblast growth factor receptors[ J ]. J Surg Res, 2000, 92: 18-22.
- [ 13 ] Ishida K, Yoshimura N, Mandai M, *et al.* Inhibitory effect of TNP-470 on experimental choroidal neovascularization in a rat model[ J ]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40( 7 ): 1512-1259.
- [ 14 ] Minischetti M, Vacca A, Ribatti D, *et al.* TNP-470 and recombinant human interferon- $\alpha$ 2a inhibit angiogenesis synergistically[ J ]. Br J Haematol, 2000, 109: 829-837.
- [ 15 ] Yamaoka M, Yamamoto T, Ikeyama S, *et al.* Angiogenesis inhibitor TNP-470( AGM-1470 ) potently inhibits the tumor growth of hormone-independent human breast and prostate carcinoma cell lines[ J ]. Cancer Res, 1993, 53: 5233-5236.
- [ 16 ] Yoshida T, Kanoko Y, Tsukamoto A, *et al.* Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP-470 possible involvement of nitric oxide synthase[ J ]. Cancer Res, 1998, 58( 16 ): 3751-3756.
- [ 17 ] Lund EL, Bastholm L, Kristjansen PE. Therapeutic synergy of TNP-470 and ionizing radiation: Effects on tumor growth, vessel morphology, and angiogenesis in human glioblastoma multiforme xenografts[ J ]. Clin Cancer Res, 2000, 6( 3 ): 971-978.

[ 收稿日期 ] 2001 - 12 - 26

[ 修回日期 ] 2002 - 04 - 03