

[文章编号] 1007-385X(2002)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-氨基乙酰基)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) mm³;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^[1],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(transforming 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^[2]。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。

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^[3]。其中,bFGF是该家族中的重要一员,最初由Gospoda-

rowiz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^[4]。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想已被广泛接受,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^[5]: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-氨基乙酰基)烟曲霉醇,简称TNP-470(或AGM-1470)^[6],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^[7]。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、磷酸钙调神经素蛋白,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^[8] 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 IC₅₀ 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^[6] 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 G₁ 期,使 G₀ 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, G₀/G₁ 期细胞比例上升,而 G₂/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 G₁ 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^[9] 的实验显示, TNP-470 能抑制细胞周期蛋白 D₁ (CyclinD₁) 的表达,从而遏制 HUVEC 的 DNA 合成。但也有报道 TNP-470 对 CyclinD₁ 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^[10], 故其作用位点可能为 G₁/S 分界线,使内皮细胞阻滞于 G₁ 期。Zhang 等^[11] 报道, TNP-470 经 P53, P21^{WAF1/CIP1} 通路抑制细胞周期来发挥抗血管作用。P21^{WAF1/CIP1} 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^{WAF1/CIP1} 分别与 Cyclin, CDK 结合,使 Cyclin-CDK 复合物激酶活性丧失。P21^{WAF1/CIP1} 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^[12] 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^[13] 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 bFGF mRNA 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- α 两者有协同作用^[14]。体外, TNP-470 和 rhINF- α 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^[15]。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 IC₅₀ 与内皮细胞生长抑制的 IC₅₀ 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^[16] 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 10⁻⁶ 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^[17];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 G₀/G₁ 期细胞比率增加, S 期和 G₂/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. Facter 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 G₁ 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^{CIP/WAF} 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^{WAF1/CIP1}[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- α 2a inhibit angiogenesis synergistically[J]. Br J Haem, 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