

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0222-03

靶向端粒酶的肿瘤基因治疗新策略

苏长青 综述, 钱其军, 吴孟超 审阅 (第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438)

[摘 要] 端粒酶在 85% 以上的各类恶性肿瘤中激活并维持细胞的无限增殖能力, 是目前发现的恶性肿瘤细胞区别于正常细胞最广谱的分子标记, 具备了作为肿瘤靶向基因治疗的物质基础。因此, 端粒酶已成为肿瘤基因治疗的理想靶点, 有望为肿瘤基因治疗提供一种全新的途径。

[关键词] 肿瘤; 端粒酶; 基因治疗

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

* 端粒酶是目前所发现的恶性肿瘤最广谱的分子标记, 在绝大多数恶性肿瘤中被激活, 而其在正常体细胞中一般为阴性表达, 因此端粒酶是进行肿瘤基因治疗的理想靶点。从理论上讲, 针对端粒酶的肿瘤基因治疗比单纯针对某个癌基因或抑癌基因的治疗具有更广阔的应用前景。目前国内外提出的以端粒酶为靶点的肿瘤治疗策略, 主要是以抑制端粒酶活性的方法为主。近来, 国外提出更优越的新策略, 即以肿瘤组织端粒酶激活为目标, 以端粒酶逆转录酶(human reverse transcriptase, hTERT)启动子调控其它抗肿瘤基因, 从而达到靶向肿瘤细胞并破坏肿瘤细胞的目的^[1]。

1 抑制肿瘤细胞端粒酶活性的策略

1.1 靶向端粒酶 RNA 组分(human telomerase RNA, hTR)

研究证实, 针对 hTR 模板区及其周围序列设计的反义核苷酸可抑制端粒酶合成端粒序列。1995 年, Feng 等^[2]构建了含 hTR 模板区反义序列的质粒并转染 HeLa 细胞, 经 23 ~ 26 次分裂后, 细胞出现变圆、生长抑制、死亡等细胞危象, 伴随端粒酶活性下降和端粒缩短。人工合成的反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASOs)亦可封闭 hTR 的模板功能^[3], 但 ASOs 存在明显的弱点, 即需要相对较长序列和较高浓度才能提高与 hTR 的亲合性和稳定性, 而 ASOs 的加长又会影响到细胞的摄取, 并且 ASOs 在体内易被核酸酶降解。对此, Norton 等^[4]设计了针对 hTR 模板区的反义肽核酸(peptide nucleic acid, PNA), 它以多肽骨架替换 DNA 分子中磷酸脱氧核糖骨架, 其重复单位为 N-(2-氨基)-甘氨酸, 具有与天然 DNA 分子相似的结构特征和结合特性, 可与 DNA 或 RNA 形成稳定的 Watson-Crick 链。由于 PNA 不带电荷, 中性骨架间无排斥力, 分子内部残基间形成氢键, 因此具有很高的化学稳定性, 不易被核酸酶降解, 而且只需极短的序列(3 bp ~ 19 bp)以及极低的浓度($IC_{50} = 0.9 \text{ nmol/L}$)即可发挥良好的反义抑制作用, 是目前很有前途的端粒酶抑制分子。

核酶是一类具有核酸内切酶活性的小分子 RNA, 可特异性地封闭靶基因 RNA 并切割 RNA, 使其失去生物功能。

Yokoyama 等^[5]设计了针对 hTR 不同序列区的锤头形核酶(hammerhead ribozyme, TeloRZ), 实验证实 TeloRZ 对人工合成的端粒酶 RNA 组分有专一的切割活性, 在肿瘤细胞内能降低端粒酶活性。此外, 对 hTR 模板区实行定点突变, 或改变 hTR 空间构象, 均可影响端粒酶的活性。

1.2 靶向端粒酶逆转录酶(hTERT)

除了 hTERT 基因序列的反义核酸以及针对 hTERT 基因设计的锤头形核酶能够有效抑制端粒酶活性以外^[5], Sogawa 等^[6]还在一种海洋微藻类细胞中提取出微藻类多糖, 它可以抑制 K562 细胞 hTERT 的表达, 进而抑制端粒酶活性。Ducresc 等^[7]发现人类第 3 号染色体上存在着调控 hTERT 活性的基因, 将正常的 3 号染色体导入人乳腺癌细胞系 21NT 中, 可抑制端粒酶活性, 引起细胞衰老。

1.3 其它策略

一些核苷类似物如 7-脱氮-dGTP、7-脱氮-dATP、叠氮脱氧胸苷(AZT)等作为逆转录酶抑制剂, 能和正常单核苷酸竞争与模板区 hTR 结合, 抑制端粒酶活性。二甲亚砜、维甲酸、TPA 等细胞分化诱导剂, 在诱导细胞分化过程中可使端粒酶活性下调, 提示分化诱导剂可作为端粒酶抑制剂, 来研究端粒酶活性调节及其在肿瘤治疗中的作用。其它靶向端粒酶活性的抑制剂, 包括端粒酶抗体、与 G-四联体结构相互作用的化合物、癌基因与抑癌基因、蛋白激酶 C 抑制剂、一些抗肿瘤药物等, 对端粒酶活性也有下调作用, 这些方面文献已有较多报道, 不再赘述。

2 利用肿瘤细胞端粒酶活性为靶向的策略

将抗肿瘤基因导入到肿瘤细胞内并有效控制基因的表达, 达到杀灭肿瘤细胞的目的, 需要一个肿瘤特异性表达系统来保证整个治疗计划的安全性和有效性。现已有为数不少的组织或细胞特异启动子被鉴定并用于基因表达的调控, 如靶向结直肠癌的 CEA 启动子、靶向乳腺癌的 MUC1 启动

子、靶向肝癌的 AFP 启动子以及靶向鼻咽癌的 EB 病毒启动子等。用上述启动子调控外源基因的表达可获得相对特异的肿瘤靶向作用,但缺点也比较明显。首先,这些启动子只针对有限的组织起源的肿瘤细胞,不能广泛应用于大多数肿瘤的治疗;其次,与常用的病毒启动子相比,这些启动子所介导的基因表达量低。最近,人们采用 hTERT 基因启动子驱动抗肿瘤基因高效表达,靶向端粒酶阳性的肿瘤细胞,而对端粒酶阴性的正常细胞则不起作用。因此, hTERT 启动子赋予了基因表达载体系统很高的肿瘤靶向特异性,由此进行的基因治疗是一项非常有前途的肿瘤治疗策略。

2.1 诱发凋亡策略

肿瘤的细胞凋亡被阻断,使其具有了无限增殖的能力,因此,重建肿瘤细胞的凋亡程序可能是肿瘤基因治疗的一项有意义的策略^[8-12]。Gu 等^[11]证实, hTERT 启动子核心序列控制 LacZ 基因,在肺癌、肠癌、宫颈癌共 5 种肿瘤细胞中均有高水平表达,在正常细胞中几乎未检测到阳性表达,两者比值超过 500 倍。可见 hTERT 启动子介导抗肿瘤基因进行肿瘤的靶向治疗,不仅能保证目的基因的高效表达,而且靶向肿瘤细胞的特异性也很好。将 hTERT 启动子驱动的 Bax 基因通过腺病毒载体转染肿瘤细胞,进行体内外实验,结果同样证实 hTERT 启动子能介导 Bax 基因在肿瘤细胞系中高效表达,并诱发肿瘤细胞出现明显的凋亡,小鼠模型显示肿瘤生长抑制、成瘤能力下降,没有发生肝毒性反应。Koga 等^[12]在端粒酶活性及 hTERT mRNA 均为阳性的前列腺癌、恶性胶质瘤、恶性黑色素瘤、乳腺癌、膀胱癌共 10 种肿瘤细胞系中,以 hTERT 启动子驱动 Caspase-8 基因表达,诱导细胞发生高水平凋亡,其效果与对照 SV40 启动子所驱动基因载体相差无几。在无端粒酶活性的 2 株正常纤维母细胞系中,SV40 启动子驱动 Caspase-8 基因表达仍然诱导细胞发生较高水平的凋亡,其凋亡指数与肿瘤细胞系接近,但 hTERT 启动子控制的 Caspase-8 基因载体,在正常细胞系中则未检测到基因表达及细胞凋亡。在小鼠移植瘤中局部注射 hTERT 启动子控制的 Caspase-8 基因载体,肿瘤生长明显受到抑制,与注射前相比瘤体缩小至 58%,肿瘤组织中大量细胞发生凋亡。实验证明 hTERT 启动子介导的抗肿瘤基因治疗具有良好的肿瘤靶向特异性与安全高效性。

2.2 自杀基因策略

Majumdar 等^[13]以携带 HSV-tk 基因并由 hTERT 启动子调控的表达质粒(hTERTp/tk)转染细胞系, RT-PCR 检测 HSV-tk 基因在端粒酶阳性的骨肉瘤细胞系 143B、纤维肉瘤细胞系 HT1080 和永生化的 293 正常细胞系中高度表达,在端粒酶阴性的纤维母细胞系 BJ、WI38 和视网膜色素上皮细胞系 RPE 中阴性表达。所有端粒酶阳性的肿瘤细胞系和永生细胞对 GCV 敏感,在 GCV 处理后 5~7 d 细胞被破坏或杀灭,而 GCV 对端粒酶阴性的正常细胞没有影响。将转染了 hTERTp/tk 质粒的 143B 细胞注射到裸鼠体内,10 d 后给予 GCV 处理,可观察到肿瘤的生长完全受到抑制。将 hTERTp/tk 质粒的表达盒重组到腺病毒载体中,并以 CMV 启动子

调控 HSV-tk 基因的腺病毒载体(CMVp/tk)为对照,实验表明两者均可感染 143B 细胞及其小鼠移植瘤细胞,使其对 GCV 处理产生细胞毒性反应,引起肿瘤生长抑制,小鼠荷瘤生存期延长,但与 CMVp/tk 相比, hTERTp/tk 腺病毒载体对 BJ 正常细胞系几乎不产生影响,而且荷瘤小鼠也没有肝脏毒性作用。

2.3 抗血管生成策略

在抗肿瘤新生血管形成的治疗过程中,人们发现了多种血管生成抑制剂,其中以抑制血管内皮细胞增殖的血管抑素和内皮抑素最受重视。采用血管抑素或内皮抑素基因逆转录病毒载体介导 2 个基因的表达,可以在白血病和黑色素瘤动物模型的肿瘤中产生血管生成抑制和瘤细胞生长抑制的抗肿瘤效果^[14]。到目前为止,尚未见到有关采用 hTERT 启动子构建肿瘤特异性增殖病毒、调控血管抑素和内皮抑素基因进行抗肿瘤血管治疗的研究报道。我们在这一方面已经进行了一系列研究,取得了初步的研究结果。首先,我们构建 hTERT 启动子核心序列驱动的血管抑素和内皮抑素基因表达质粒,再进一步重组产生肿瘤特异性增殖腺病毒载体。该病毒在端粒酶阳性的大多数肿瘤细胞中均有明显增殖复制,并介导目的基因高效表达,在裸鼠肿瘤模型中足以产生较强的抗肿瘤血管生成的效果。

3 存在问题与展望

在以端粒酶为靶点的肿瘤基因治疗研究中,还有许多问题需要认真对待。首先,约有 10% 左右的人类肿瘤没有端粒酶活性,其中一部分是依靠非端粒酶依赖机制维持端粒长度^[15-16],因此针对端粒酶的肿瘤治疗方案对这些肿瘤或细胞群体不起作用;其次,在人类生殖细胞、造血干细胞等正常细胞中也可检出端粒酶活性,以端粒酶为靶点的肿瘤治疗可能会给这些细胞造成毒副作用;最后,迄今为止绝大多数靶向端粒酶的抗肿瘤研究还都停留在体外细胞和动物模型上,尚未过渡到临床,其抗肿瘤的临床远期效果还仅在推论当中。

针对上述问题,我们进行了认真的思索和研究。第一,在所有肿瘤的治疗方案中,没有一项是可以针对所有肿瘤的,以端粒酶为靶点的治疗可以靶向 85% 以上的各种肿瘤,是目前最为广谱的肿瘤基因治疗方案。第二,通过选择合适的治疗策略,可以提高肿瘤的治疗效果,如以端粒酶 hTERT 启动子控制的增殖性腺病毒载体,携带抗肿瘤基因,靶向端粒酶阳性的肿瘤细胞并杀灭肿瘤细胞,其介导的抗癌基因高效表达,可以同时周围端粒酶阴性的肿瘤细胞群体起抑制作用。这种联合病毒与基因的治疗策略,对晚期播散性肿瘤的治疗尤其显示出独特的优势。第三,生殖细胞、造血干细胞等正常细胞的分裂能力明显低于肿瘤细胞,其端粒长度较肿瘤细胞为长,端粒酶活性也远不如肿瘤细胞高^[17],因此以端粒酶活性抑制为目标的基因治疗方案可以设计为在正常细胞端粒耗尽前终止,之后其端粒酶活性可得以恢复。而在端粒酶激活为目标的治疗方案中,选择性增殖病毒载体在较低端粒酶活性的正常细胞中复制的程度很低,对正常细胞的

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0224-03

血管生成素及其在肿瘤血管新生中的作用

朱洪新 综述, 李锦军, 万大方 审阅 (上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032)

[摘要] 血管生成素是新近发现的一个与血管新生密切相关的蛋白家族,其共同受体是 Tie2。由于 Ang1 和 Ang2 在体内具有与 VEGF 共同调节生理性和病理性血管新生的功能,其研究进展受到广泛关注。本文综述了血管生成素家族中主要成员 Ang1, Ang2, Ang3, Ang4 等在克隆、生化性质,血管生成素受体 Tie2 在信号转导中的作用,血管生成素在生理发育和血管新生中的作用等方面的研究进展。

[关键词] 血管生成素; 肿瘤; 血管新生; Tie2

[中图分类号] R730.23 [文献标识码] A

血管新生的一种方式是在原始血管丛或已存在血管的基础上以发芽的方式形成新生血管的过程,受多种因子的调控。血管生成素(angiopoietin, Ang)是近年来发现的一个与血管新生密切相关的家族,现已发现 4 个成员,即 Ang1,

Ang2, Ang3 和 Ang4。由于相对于 Ang3 和 Ang4,目前 Ang1 和 Ang2 的功能研究比较深入,因此本文主要就 Ang1 和 Ang2 的生化性质、受体及信号转导及其在肿瘤血管新生中的作用作一综述。

损害很微弱。

[参 考 文 献]

[1] Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT) [J]. *Gene*, 2001, 269(1-2): 1-12.

[2] Feng J, Funk WD, Wang SS, *et al.* The RNA component of human telomerase [J]. *Science*, 1995, 269(5228): 1236-1241.

[3] Fu W, Begley JG, Killen MW, *et al.* Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(11): 7264-7271.

[4] Norton JC, Piatszek MA, Wright WE, *et al.* Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(5): 615-619.

[5] Yokoyama Y, Takahashi Y, Shinohara A, *et al.* The 5'-end of hTERT mRNA is a good target for hammerhead ribozyme to suppress telomerase activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(1): 316-321.

[6] Kim MM, Rivera MA, Botchkina IL, *et al.* A low threshold level of expression of mutant-template telomerase RNA inhibits human tumor cell proliferation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(14): 7982-7987.

[7] Ducrest AL, Amacker M, Mathieu YD, *et al.* Regulation of human telomerase activity: Repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(20): 7594-7602.

[8] Zhang Y, Herman B. Ageing and apoptosis [J]. *Mech Ageing Dev*, 2002, 123(4): 245-260.

[9] Canote R, Du Y, Carling T, *et al.* The tumor suppressor gene RIZ in cancer gene therapy [J]. *Oncol Rep*, 2002, 9(1): 57-60.

[10] Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, *et al.* Treatment of malignant gli-

oma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5796-5802.

[11] Gu J, Kagawa S, Takakura M, *et al.* Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5359-5364.

[12] Koga S, Hirohata S, Kondo Y, *et al.* A novel telomerase-specific gene therapy: Gene transfer of caspase-8 utilizing the human telomerase catalytic subunit gene promoter [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(10): 1397-1406.

[13] Majumdar AS, Hughes DE, Lichtsteiner SP, *et al.* The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters [J]. *Gene Ther*, 2001, 8(7): 568-578.

[14] Scappaticci FA, Smith R, Pathak A, *et al.* Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity *in vitro* and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice [J]. *Mol Ther*, 2001, 3(2): 186-196.

[15] Aragona M, Maisano R, Panetta S, *et al.* Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17(5): 981-989.

[16] Reddel RR, Bryan TM, Colgin LM, *et al.* Alternative lengthening of telomeres in human cells [J]. *Radiat Res*, 2001, 155(1 Pt 2): 194-200.

[17] Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, *et al.* Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow [J]. *Stem Cells*, 1996, 14(2): 239-248.

[收稿日期] 2002 - 3 - 15

[修回日期] 2002 - 05 - 20

1 血管生成素的克隆及生化性质

1996年 Davis等^[1]在寻找 Tie2 的配体时获取了人和小鼠的 Ang1 cDNA。分析表明:人和小鼠 Ang1 基因的开放阅读框均编码 498 个氨基酸,两者有 97.6% 的同源性。N 端有一疏水的分泌信号肽和一个卷曲(Coiled-Coil)结构域, C 端包含一纤维蛋白原样(Fibrinogen)结构域。从氨基酸序列计算出的 Ang1 的分子量为 55 kD,而分泌的 Ang1 分子量为 70 kD,可能是翻译后修饰的结果, Ang1 氨基酸序列中含有几个糖基化位点。人 Ang1 基因位于染色体 8q22.3~23。

Maisonpierre等^[2]用小鼠 Ang1 cDNA 为探针,在低严谨度的条件下筛选人和小鼠的 cDNA 文库,获得了人和小鼠的 Ang2 cDNA。Ang2 蛋白由 496 个氨基酸构成,有一分泌信号肽。人和小鼠 Ang2 的氨基酸序列有 85% 的同源性,与 Ang1 均有 60% 的同源性。其 N 端和 C 端同样存在卷曲结构域和纤维蛋白原样结构域。Ang1 中 9 个半胱氨酸中的 8 个在 Ang2 中是保守的,只有卷曲结构域和纤维蛋白原样结构域之间的一个半胱氨酸在 Ang2 中缺少。人 Ang2 基因位于染色体 8p23.1。

Ang4 是 1999 年从人的胎盘获得的一种分泌蛋白,同一因子在小鼠则称为 Ang3。Ang4 和 Ang3 基因分别编码 503 和 509 个氨基酸。Ang3 和 Ang4 氨基酸仅有 54% 的同源性,因此该基因的种属分化较其他血管生成素基因更明显^[3]。Ang4 基因位于染色体 20p13。

在成年鼠, Ang1 在多种组织中广泛表达,而 Ang2 仅在卵巢,胎盘和子宫等发生血管重塑的组织中表达。在胚胎组织, Ang1 在心房及心室的心肌层,间质和多数血管的平滑肌细胞含量丰富, Ang2 在背主动脉及主要的动脉分支表达高,特别是血管内皮细胞下的平滑肌层,而在发育中的心脏未能检出^[2,4]。Ang1 和 Ang2 这种相似但不相同的表达谱提示在血管发育过程中, Ang2 调节 Ang1 的功能。VEGF、bFGF、瘦素(leptin)、缺氧等促进 Ang2 的表达^[5,6]。

2 受体与信号转导

血管生成素的受体是内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体。现已证实 Ang1 和 Ang2 诱导 Tie-2 受体磷酸化由 Fibrinogen 样结构域介导。Jones等^[7]用酵母双杂交系统寻找与磷酸化 Tie2 受体相结合的分子,结果发现 Grb2, Grb7, Grb14, Shp2 和 PI3 激酶的 p85 亚单位可以通过 SH2 结构域与 Tie2 结合,并依赖于磷酸酪氨酸。研究还揭示 Tie2 羧基端存在一个多底物的 docking 位点。将该位点突变可破坏体内 Grb2, Grb7 与 Tie 的结合,该位点是 Grb7 和 P85 酪氨酸磷酸化所必需。进一步的研究表明 Ang1 刺激 Tie2 表达细胞使 Tie2 及 PI3 激酶的 P85 亚单位磷酸化, PI3 激酶的活性增强,并成剂量依赖关系。PI3 激酶特异性抑制剂 Wortmannin 和 LY294002 能够阻断 Ang1 的抗凋亡作用^[8]。另一项研究表明 Ang1 通过 PI3 激酶进一步使 Akt 的 473 位点的丝氨酸磷酸化,从而上调凋亡抑制因子 Survivin 的表达^[9]。以上结果提示 Ang1 可能通

过 PI3/Akt/Survivin 通路抑制内皮细胞凋亡,维持血管新生过程中血管的稳定性。

关于 Ang3 和 Ang4 的信号转导知之甚少, Ang3 似乎起拮抗作用,而 Ang4 起激活作用^[3]。

3 血管生成素在生理情况下的作用

在体外, Ang1, Ang2 对内皮细胞的增殖均无明显作用。Ang1 能够促进内皮细胞的迁移和分化,而 Ang2 无此作用,但 Ang2 可拮抗 Ang1 的作用, Ang1 具有抗内皮细胞凋亡的作用^[1,2,10]。还有报道 Ang1 和 Ang2 促进整合素介导的细胞黏附^[11]。但这不是血管生成素在体内的主要生物学作用。

在胚胎发育过程中,血管形成及 Ang 的作用可概括为: ① VEGF 和 VEGFR2 结合诱导中胚层细胞分化为内皮细胞并增殖。② 随着胚胎的进一步发育, VEGF 和内皮细胞 VEGFR1 结合,促进原始血管的形成。③ Ang1 和内皮细胞 Tie2 结合,诱导其磷酸化,吸引血管周细胞和平滑肌细胞,并与其相互作用,维持血管稳定性。用同源重组方法敲除小鼠 Ang1 基因, 9.5 d 就出现胚胎心脏发育缺陷,心内膜不成熟,折叠异常,心室内仅有内皮细胞衬而缺少心肌小梁。11 d 胚胎开始表现异常, 12.5 d 胚胎死亡^[4]。Ang1 转基因小鼠则表现为血管管腔增大,灌注量升高,基底膜更完整,血管能够耐受炎症刺激^[12]。④ Ang1 的拮抗剂 Ang2 阻断 Tie2 受体的磷酸化,破坏内皮细胞与其周围细胞的相互作用,使内皮细胞处于激活状态。在 VEGF 存在的情况下,内皮细胞增殖、侵袭、迁移、形成新生血管;在无 VEGF 的条件下,激活的内皮细胞发生凋亡,血管新生受到抑制。Ang2 的转基因小鼠在 9.5~10.5 d 死亡,其异常的血管发育类似于 Ang1 基因敲除小鼠^[2]。可见, Ang1 的主要作用是诱导 Tie2 磷酸化,吸引周细胞及血管平滑肌细胞与内皮细胞相互作用,促进血管成熟,维持血管稳定性。而 Ang2 竞争性的抑制 Ang1,如同时存在 VEGF,则促进血管新生,否则血管退化。

用小鼠角膜血管新生实验模型发现 Ang1 和 Ang2 在成年鼠具有类似的生物学功能。VEGF 可引起角膜缘血管新生,而单独 Ang1 和 Ang2 均无此作用。与 VEGF 引起的新生血管相比, Ang1 和 VEGF 联合引起的新生血管管腔较大,灌流量较高,毛细血管密度增高,而角膜缘基底动脉管径增大。Ang2 和 VEGF 联合诱导的新生血管则较长,在新生血管边缘常有分离的内皮细胞。可溶性的 Tie2-Fc 对 VEGF 诱导的新生血管形态没有明显影响,但能够消除 Ang1 及 Ang2 对血管新生的调节作用^[13]。

4 血管生成素在肿瘤血管新生中的作用

4.1 血管生成素在肿瘤组织中的表达

Tsnaka等^[14]用 RT-PCR 方法检测血管生成素 mRNA 在 23 例肝癌标本中的表达结果表明: Ang1 在肝癌和癌旁肝组织中的表达无明显差异,而 Ang2 在肝癌组织中表达明显增高。在 12 例富血管肝癌组织中,有 10 例 Ang2 表达,而在 11 例少血管肝癌中仅 2 例呈现 Ang2 的表达,而正常肝组织持

续表达的 Ang1 在肿瘤细胞的表达明显下降。Wurbach 等^[15]发现多数前列腺癌肿瘤细胞和腺内基质细胞表达 Ang1 和 Ang2。Ang1 和 Ang2 在肿瘤毛细血管也有表达。此外, Ang2 在肿瘤血管平滑肌细胞也表达,但正常的前列腺组织不表达血管生成素。原发性非小细胞性肺癌组织的血管 Ang2 表达明显升高,且和肿瘤细胞 VEGF 的表达相关。胃癌和恶性角质瘤组织 Ang2 表达增高^[16-17],而直肠癌 Ang1 和 Ang2 的表达均增加^[18]。上述结果提示血管生成素尤其是 Ang2 在多种肿瘤的血管新生中可能起着重要作用。

4.2 血管生成素在肿瘤血管新生中的作用机理

以往认为,肿瘤生长开始不依赖于血管新生,只有在直径大于 2 mm³ 的情况下,才发生血管新生。其机理如下:① VEGF, bFGF 和缺氧使肿瘤 Ang2 表达上调,破坏了 Ang1 和 Ang2 之间的平衡;② 增高的 Ang2 阻断 Ang1 对 Tie2 的激活,从而破坏内皮细胞与周细胞,平滑肌细胞之间的相互作用;③ 内皮细胞失去与微环境正常的相互作用后,处于激活状态,在肿瘤细胞分泌的血管新生因子(如 VEGF)的刺激下发生增殖,迁移,浸润,形成血管结构;④ 肿瘤细胞及间质细胞产生的 Ang1 与 Ang2 参与维持肿瘤新生血管的结构^[19]。

目前存在的另一种观点则认为:① 至少有一部分肿瘤在开始时就共选择(coopt)已存在的宿主血管,形成一个富血管的肿瘤小块,但肿瘤细胞不表达 VEGF。② 可能是由于宿主存在的防御机制,肿瘤块内血管 Ang2 的表达显著上调,通过拮抗 Ang1 的作用破坏内皮细胞和周围细胞的作用,使内皮细胞处于激活状态,但是由于缺少 VEGF,内皮细胞发生凋亡,血管破坏,导致大量的肿瘤细胞死亡。③ 这时,残存的肿瘤细胞开始分泌 VEGF(这是肿瘤血管新生的早期标记),从而刺激部分激活的内皮细胞发生迁移,增殖,形成新生血管。④ 相对于上调的 Ang2, Ang1 的表达在肿瘤发展的过程中并无明显变化,因此肿瘤新生血管渗漏性增高。上述机理已在恶性胶质瘤, C6 胶质瘤模型, 乳腺腺癌模型, Lewis 肺癌转移瘤模型中得到证实^[20]。

5 展望

综上所述,血管生成素在肿瘤血管新生过程中起着复杂而重要的作用,现在已有可用可溶性的血管生成素受体 Tie2 抑制肿瘤血管新生,肿瘤发展的报道^[21]。相信随着对血管生成素信号转导,基因表达调控等方面的深入研究,在不久的将来,血管生成素有望为肿瘤的临床治疗提供一种新途径。

[参考文献]

[1] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning [J]. *Cell*, 1996, 87: 1161-1169.

[2] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 277: 55-60.

[3] Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, *et al.* Angiopoietins 3 and

4: Diverging gene counterparts in mice and humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1904-1909.

[4] Suri c, Jones PF, Patan S, *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis [J]. *Cell*, 1996, 87: 1171-1180.

[5] Oh H, Takagi H, Suzuma K, *et al.* Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 15732-15739.

[6] Cohen B, Barkan D, Levy Y, *et al.* Leptin induces angiopoietin-2 expression in adipose tissues [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 7697-7700.

[7] Jones N, Master Z, Jones J, *et al.* Identification of Tek/Tie2 binding partners [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 30896-30905.

[8] Kim I, Kim HG, So JN, *et al.* Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway [J]. *Circ Res*, 2000, 86: 24-29.

[9] Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, *et al.* Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/Survivin pathway [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 9102-9105.

[10] Witzensbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, *et al.* Chemotactic properties of angiopoietin-1 and 2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 18514-18521.

[11] Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, *et al.* Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 26516 - 26525.

[12] Thurston G, Suri C, Smith K, *et al.* Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1 [J]. *Science*, 1999, 286: 2511-2514.

[13] Asahara T, Chen D, Takahashi T, *et al.* Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization [J]. *Circ Res*, 1998, 83: 233-240.

[14] Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, *et al.* Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103: 341-345.

[15] Wurbach JH, Hammerer P, Sevinc S, *et al.* The expression of angiopoietins and their receptor Tie-2 in human prostate carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20: 5217-5220.

[16] Eton T, Inoue H, Tanaka S, *et al.* Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 1245-1253.

[17] Koga K, Todaka T, Motohiro M, *et al.* Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 6248-6254.

[18] Ahmad SA, Liu W, Jung YD, *et al.* The effects of angiopoietin-1 and 2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 1255-1259.

[19] Lauren Juha, Gunji Y, Alitalo K. Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis? [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153: 1333-1339.

[20] Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF [J]. *Science*, 1999, 284: 1994-1998.

[21] Lin P, Polverini P, Denhirst M, *et al.* Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie-2 in pathologic vascular growth [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100: 2072-2078.