

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0297-03

肿瘤坏死因子在肿瘤研究和治疗领域中的新进展

陆琰君¹, 曹 伟¹综述, 喻德洪²审阅 (1. 上海赛达生物药业研究中心, 上海 201203; 2. 第二军医大学附属长海医院, 上海 200433)

[摘要] TNF- α 引发受体诱导的信号传导中的细胞凋亡是其抗肿瘤的分子机理。NF- κ B 活化与 TNF- α 毒副作用有关。TNF- α 在临床前的研究中发现有抗新生血管形成作用。另外, 本文还介绍了临床研究中用隔离性肢体器官灌注法导入 TNF- α 治疗实体瘤的进展; 以及近期国内外 TNF- α 变构体研究的进展。

[关键词] 肿瘤坏死因子; 细胞凋亡; 抗新生血管; 肢体器官灌注法; TNF- α 变构体

[中图分类号] R730.3 **[文献标识码]** A

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α), 是迄今发现的抗肿瘤活性最强的细胞因子。然而, 八十年代初在欧美展开用 TNF- α 治疗实体肿瘤的临床试验结果却是令人失望的。严重的毒副作用使 TNF- α 抗肿瘤效果大打折扣。但是, 近年来, Eggerment^[1] 和 Lejeune^[2] 为首的 2 个临床研究小组分别对不能手术切除的 II ~ IV 级软组织肉瘤病人和转移性黑色素瘤病人, 用 TNF- α 联合抗肿瘤药物美法伦或者 γ -干扰素, 进行隔离性肢体灌注治疗后, 治疗效果分别达到了 (CR + PR) 90% 和 70%。如此成果在生物治疗肿瘤历史上是前所未闻的。

由此在 1999 年第 35 届美国临床肿瘤年会上专家们指出: (1) TNF- α 被重新确认, 肯定它对肿瘤治疗具有明显的疗效。(2) TNF- α 是具有潜力的抗肿瘤药物, 今后对 TNF- α 的研究和治疗给予更多支持。同时, 欧洲药物审评委员会 (EMA) 重新登记和接纳了 TNF- α 作为抗肿瘤药物。另外, 美国的 FDA 批准了美国国立肿瘤研究院 (NCI) 主导的 TNF- α 作为转移性黑色素瘤患者治疗药物的临床 III 期研究方案^[3]。从此 TNF- α 在肿瘤治疗和肿瘤研究的领域中掀起了新篇章。

1 TNF- α 在肿瘤基础研究领域中的现状

1.1 TNF- α 抗肿瘤的分子机理

1.1.1 受体引发的信号传导 研究表明 TNF- α 抗肿瘤的机理主要是由其受体引发的细胞毒反应。TNF- α 的活性三聚体趋化细胞表面的 3 个受体共同参加反应, 然后通过细胞内一系列的接头蛋白 (adaptor protein) 参与反应^[4]。细胞中的 TRADD (TNF receptor-associated death domain) 接头蛋白, 首先被活化聚集在 TNF- α 受体的胞内部分, 然后再活化另外 3 个接头蛋白 FADD (Fas-associated death domain), RIP (receptor-interacting protein), 以及 TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2)^[5]。其中 FADD 通过活化 caspase-8 引发细胞凋亡。而 TRAF2 的作用是双重的: 它既可以激活 cIAP (inhibitor of apoptosis), 引发细胞抗凋亡的反应; 又可以激活细胞的 JNK

途径, 通过 c-Jun 调节核内与细胞凋亡相关基因的表达, 引发细胞凋亡产生细胞毒反应。RIP 则活化一种蛋白激酶-IKK 复合物, 作用于 NF- κ B 使 NF- κ B 上的 I κ B 基团游离, NF- κ B 分子量因此变小进而能穿过核膜进入核内调控各种基因。其结果是抑制细胞凋亡和促进炎症反应。NF- κ B 活化也是 TNF- α 产生毒副作用的分子机理。有实验证明 NF- κ B 诱导基因表达, 导致同肌肉形成和损伤修复关联基因 MyoD 的 mRNA 丢失。这一结果揭示了 TNF- α 的毒副作用诸如恶质素中的剧烈体重减轻和肌肉消耗的分子机理^[6]。近期的研究还发现, TNF- α 所诱导的 JNK 途径和 NF- κ B 途径具有协同性, 即如果抑制 NF- κ B 途径则可以增强 JNK 的细胞凋亡反应, 反之亦然^[7]。

1.1.2 TNF- α 诱导细胞内氧自由基的产生 氧自由基是细胞在生长代谢中产生的代谢物, 它过量产生能引发细胞凋亡。有学者认为 TNF- α 活化氧自由基的作用在临床上的意义超过受体诱导的细胞毒反应。关于这一机理的肿瘤细胞特异性学说有新的发展^[8]: TNF- α 通过诱导氧自由基来调节细胞的存活因子。细胞中存活因子和凋亡因子是一对平衡, 而肿瘤快速生长和缺乏 G₀ 期使细胞中的存活因子相对处于弱势, 因此肿瘤细胞比正常细胞更敏感于 TNF- α 所诱导产生的氧自由基, 更易引发细胞凋亡。

2 TNF- α 在临床前研究中抗肿瘤的作用机理

TNF- α 在动物模型中的抗肿瘤机理如下:

2.1 TNF- α 除了对肿瘤细胞本身具有细胞毒性之外, 它也能摧毁实体瘤周围的血管上皮组织, 并且通过血栓的形成, 阻断肿瘤的血液营养供应, 最终导致肿瘤的出血性坏死、消退或消失^[9]。

2.2 超过一定浓度的 TNF- α 具有明显的抗新生血管形成作用。有报道显示 TNF- α 对形成不超过 9 d 的新生血管组织抑制作用更强烈。TNF- α 联合其他药物能在分子水平上抑制整合素 (integrin) α v β 3 的活性 (这种整合素在肿瘤的新血管形成中起重要作用), 进而引发肿瘤血管上皮细胞的解体

和凋亡,这种作用不伤害周围正常血管上皮组织。由此说明 TNF- α 是选择性地抑制肿瘤血管上皮组织的^[10]。

2.3 一般肿瘤周围血管组织是没有规则和不完善的,有些实体瘤本身发生就是缺氧下选择性克隆产生,远离血管,所以化疗药物很难预期达到这些肿瘤周围并发挥作用。而 TNF- α 能明显降低实体瘤周围间隙组织的压力,扩大肿瘤周围上皮组织的间隙,并改变肿瘤周围血管的通透性,使联用的化疗药物到达这些靶组织周围,而且 TNF- α 能延长药物在肿瘤周围的持续时间,更好的发挥抗肿瘤作用^[11-12]。

2.4 TNF- α 是一种细胞因子,它对人体免疫系统具有调节作用。TNF- α 对树突状细胞具有催熟作用,能激活和刺激 T 细胞。另外, TNF- α 通过对核内基因的调控,促进肿瘤抑制基因 p53 的表达,从而加强机体自身的抗肿瘤作用^[13]。

3 TNF- α 在临床研究中的现状和展望

3.1 TNF- α 为主导的联合用药隔离性器官灌注法

3.1.1 隔离性肢体灌注法

隔离肢体灌注法(ILP):是由 Lienard^[2]和 Eggermont^[1]率先创导的。就是用止血带先绑住肢体循环部分的根部,把肢体的血液从全身循环中分隔开来,再用叠套法把肢体血管连接到体外的心肺机中,加入 TNF- α 为主导的联合化疗药物美法伦或 γ -干扰素循环灌注在肢体血液中达 1 h 左右。结果表明,用这种方法治疗后的瘤部周围的 TNF- α 的峰值浓度可达到全身给药途径时的 50 倍,且无明显的副作用,治疗效果显著。选择周围血管丰富的肿瘤对这种治疗会更加敏感。如肢体性软组织肉瘤和骨瘤,其治疗效果达到了 90% 和 70%,替代了截肢,提高了病人的生活质量^[1-2]。目前,这种方法还用在治疗转移性黑色素瘤,效果达到了 85%^[14]。

TNF- α 同美法伦或阿霉素联合使用的效果十分强烈,其作用机理为:TNF- α 摧毁了肿瘤周围的血管上皮组织,使瘤体暴露在药物的攻击之下,而且还使药物在瘤体周围的浓度增加了 3~6 倍,治疗结果为 90%^[15]。而单独使用美法伦治疗转移性黑色素瘤的有效率低于 1%^[16]。

3.1.2 隔离性肝脏灌注法

肝脏是肿瘤高发性的器官,用 TNF- α 为主导联合用药进行隔离性肝脏灌注法(IHP)目前已经在临床研究的 II 期,有报道对转移性肝脏肿瘤治疗共有 60 例:术后死亡 6 例(大部分为由于灌注引起的血栓死亡的)。CR:2 例;PR:34 例;MR:6 例;有效率为 60%。战绩依然倍受注目^[17]。

具体方法:把肝区循环从全身循环系统中隔离出来,用心肺机体外循环肝区,再用 TNF- α 联合美法伦或者阿霉素对肝脏进行灌注。副作用为灌注后 18~24 h 后肝的 GOT, GPT 可逆性升高。停止处理 30 d 恢复正常。除了肝脏之外, IHP 法还可以用在肺、肾等器官。

3.1.3 低氧性隔离肝脏灌注法

隔离性肝脏灌注法(IHP)带来的最大问题是剖腹手术给患者带来的压力,影响了生活质量。Eggermont 首创的低氧性隔离肝脏灌注法(IHHP)将会是今后 TNF- α 用于临床治

疗实体肿瘤的的方向。IHHP 法,主要是通过血管造影术将气囊管插入肝区相应的血管,再用 TNF- α 加化疗药物对肝肿瘤部分作灌注。IHHP 法的优势在于:无需剖腹手术,提高了病人的生活质量。方法简便,对临床基地的要求也较低,而且可以重复操作。低氧性隔离性肝脏灌注术目前正在用于临床前的动物试验阶段^[18]。

3.2 TNF- α 的变构体

用“随机突变法”和“定位突变法”把 TNF- α 的 157 个氨基酸上的每一段甚至每一个氨基酸通过缺失和更换的手段来检测它在功能上的作用。TNF- α 活性三聚体的沟是由近 N 端和 C 端的极性基团及中部的疏水基团所组成的,而这些亚单位之间的沟是 TNF- α 与其受体结合的部位。实验表明, C 端上最后一个氨基酸 Leu¹⁵⁷ 改变成 Phe, met 或者 Glu, 能提高其活性 18 倍左右,因为这种改变使疏水性的 TNF- α 亚单位之间的结构变得更紧凑,从而提高了 TNF- α 同受体结合的效率。另外,缺失 1~7 个 N 端的氨基酸,增加了 TNF- α 的碱性度,提高了和受体的亲和力,活性增加了 5 倍。不仅如此, N 端的 8, 9, 10 和 17 个氨基酸变成碱性氨基酸,使某些对野生型 TNF- α 不敏感的肿瘤细胞变得敏感了,扩大了 TNF- α 的疗效范围,而且还增强了其抗肿瘤的活性^[19]。

细胞水平和动物试验上的实验数据展示了这些变构体不仅提高了同受体结合的能力,还增加了其摧毁肿瘤周围血管上皮组织的能力。另外,变构体引起的毒副作用也要比野生型 TNF- α 低 18 倍。

中国国内对于 TNF- α 变构体的研究起步虽然较晚,但是效率很高。国内学者现有研究 TNF- α 变构体有 7 家机构^[20]。目前,已有数家机构的 TNF- α 变构体已经上了临床研究阶段,而且疗效显著,进程顺利,相信不久 TNF- α 的变构体会在中国正式面市,造福于肿瘤患者。

[参考文献]

- [1] Eggermont AMM, Schreffordt KH, Lienard D, *et al.* Isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ and melphalan for nonresectable extremity soft tissue sarcomas: A multicenter trial[J]. *Clin Oncol*, 1996, 14: 2653-2665.
- [2] Lienard D, Ewalenko P, Delmotte JJ, *et al.* High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma[J]. *Clin Oncol*, 1992, 10: 52-60.
- [3] Eggermont AMM. TNF registered in Europe: Does TNF get a second chance? [J]. *J Immunotherapy*, 2000, 23: 505-506.
- [4] Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway [J]. *Science*, 2002, 296: 1634-1635.
- [5] Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, *et al.* NF- κ B antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation[J]. *Science*, 1998, 281: 1680-1683.
- [6] Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, *et al.* NF- κ B-induced loss of MyoD messenger RNA: Possible role in muscle decay and cachexia[J]. *Science*, 2000, 289: 2363-2365.
- [7] Kyriaks JM. Life-or-death decisions[J]. *Nature*, 2001, 414: 265-266.
- [8] Schulz A, Bauer G. Selective effect of tumor necrosis factor on transformed Versus Nontransformed cells: Nonselective signal recognition but differential target cell response[J]. *Anticancer Res*,

2000, 20: 3435-3442.

- [9] Shimpamura K, Manda T, Mukumoto S, *et al.* Recombinant human tumor necrosis factor- α : Thrombus formation is a cause of anti-tumor activity[J]. *Int J Cancer*, 1988, 41: 243-247.
- [10] Ruegg C, Yimaz A, Bieler G, *et al.* Evidence for the involvement of endothelial cell integrin α V β 3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN- γ [J]. *Nat Med*, 1998, 4: 408-414.
- [11] Kristensen CA, Nozue M, Boucher Y, *et al.* Reduction of interstitial fluid pressure after TNF- α treatment of three human melanoma xenografts[J]. *Br J Cancer*, 1995, 74: 533-536.
- [12] Folli S, Pelegrin A, Chalandon Y, *et al.* Tumor necrosis factor can enhance radio-antibody uptake in human colon carcinoma xenografts by increasing vascular permeability[J]. *Int J Cancer*, 1993, 53: 829-836.
- [13] Vassalia P, *et al.* The pathophysiology of tumor necrosis factors [J]. *Annu Rev Immunol*, 1992, 10: 411-452.
- [14] Lienard D, Eggermont AMM, Schreffordt KH, *et al.* Isolated perfusion of the limb with high-dose tumor necrosis factor- α , interferon- γ and melphalan for melanoma stage III. Results of a multi-centre pilot study[J]. *Melanoma Res*, 1994, 4: 21-26.

- [15] Van der Veen AH, de Wilt JH, Eggermont AMM, *et al.* TNF- α augments intratumoral concentrations of doxorubicin in TNF- α based isolated limb perfusion in rat sarcoma models and enhances anti-tumor effects[J]. *Br J Cancer*, 2000, 82: 973-980.
- [16] de Wilt JH, Manusama ER, Wan Tiel AT, *et al.* Prerequisites for effective isolated limb perfusion using Tumor necrosis factor- α and melphalan in rats[J]. *Br J Cancer*, 1999, 80: 161-166.
- [17] Nakamoto T, Inagawa H, Takagi K, *et al.* A new method of antitumor therapy with a high dose of TNF perfusion for unresectable liver tumors[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20: 4087-4096.
- [18] Van Ijken MEG, *et al.* Isolated hypoxic hepatic perfusion with tumor necrosis factor, melphalan and mitomycin C using balloon-catheter technique: A pharmacokinetic study in pigs[J]. *Ann Surg*, 1998, 288: 763-770.
- [19] Nakamura S, Kato A, Masegi T, *et al.* A novel recombinant tumor necrosis factor mutant with increased anti-tumor activity and lower toxicity[J]. *Int J Cancer*, 1991, 48: 744-748.
- [20] 张英起. 新型人肿瘤坏死因子突变体. 中国专利申请号: 96118830.8

[收稿日期] 2002-06-18

[修回日期] 2002-07-29

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0299-01

共刺激分子在人胃癌组织中的原位表达及意义

陈晓黎¹, 王一理², 曹旭东³, 王康敏¹, 康安静¹, 苏宝山¹(1. 西安交通大学第二医院病理科, 西安 710004; 2. 西安交通大学医学院免疫病理研究室; 3. 新疆石河子大学医学院医学系, 石河子 832002)

肿瘤免疫主要由细胞免疫介导, 肿瘤细胞具有免疫原性并能引起机体的抗肿瘤免疫应答, 已是事实。越来越多的证据表明, 淋巴细胞的特异性激活需要双信号刺激, 一个是 T 细胞受体与同 MHC 结合的抗原肽复合物相互作用产生的特异性信号, 另一个是共刺激分子同其配体结合产生的第二信号, 即共刺激信号, 协同淋巴细胞的激活。如果缺乏第二信号, 可导致 T 淋巴细胞耐受或无能而不能活化, 而且不同共刺激信号对激活功能各异的淋巴细胞亚群有至关重要的作用。因此, 研究肿瘤局部浸润淋巴细胞共刺激分子的表达及其生物学意义, 将有助于开辟肿瘤免疫治疗的新途径。

本研究以人胃癌为研究对象, 观察共刺激分子 B7-1, B7H1, B7H2 和受体分子 ICOS 在胃癌局部微环境中的表达情况, 并对肿瘤局部 ICOS-B7h 共刺激信号的作用及生物学意义进行初步探讨, 以期揭示肿瘤逃逸机体免疫监视机制提供理论依据。

本研究根据寡核苷酸探针设计的原则, 应用 Primer 3 软件设计针对 mRNA 的寡核苷酸探针, 并经同源性分析, 确定其特异性后, 由上海博亚生物技术有限公司合成, 其序列分别是: B7-1 5'-CAT GAA GCT GTG GTT GGT TG-3'; B7H1 5'-TGC TTG TCC AGG TGA CTT CG-3'; B7H2 5'-CCA TCG CTC TGA CTT CCT TC-3'; ICOS 5'-TTC AGC TGG CAA CAA AGT TG-3'。采用地高辛标记的寡核苷酸探针, 原位杂交技术检测了 17 例人胃癌组织中 B7-1, B7H1, B7H2 和 ICOS mRNA 的原位表达情况, 探讨胃癌组织中共刺激信号分子的表达及其与胃癌组织学分级、淋巴结转移的关系, 用均数加减标准差表示阳性细胞积分指数, 所得数据均经 SPSS 10.0 统计软件处理, 采用 *t* 检验进行差异显著性分析。设

阳性对照(扁桃体组织)及阴性对照(不加寡核苷酸探针)。

本研究结果显示, 胃癌组织局部 B7H1, B7H2 和 ICOS mRNA 均呈高表达, 且阳性细胞以肿瘤浸润淋巴细胞为主, 部分癌细胞也有不同程度的表达。B7-1 mRNA 表达于肿瘤细胞及肿瘤浸润淋巴细胞, 但强度较弱。B7H1, B7H2 和 ICOS mRNA 表达水平与 B7-1 mRNA 的表达水平比较, 差异有高度显著性($P < 0.005$), 推测 B7H1, B7H2 和 ICOS mRNA 高表达与肿瘤微环境中 Th2 型因子占优势有关。而 B7-1 mRNA 在胃癌组织表达水平较低, 结合文献报道(体外实验), 其可能仅是为 ICOS-B7h 发挥作用提供基础。B7-1, B7H1, B7H2 和 ICOS mRNA 表达水平与胃癌组织学分级无关, 与淋巴结转移也无明显关系。

已有的研究表明, ICOS-B7h 共刺激可通过不同途径刺激 T 细胞增殖, 诱导 Th2 型因子的产生, 下调 Th1 型细胞功能, 使机体处于免疫抑制状态, 肿瘤细胞得以逃避机体的免疫监视而继续生长。因此, 我们推测对大多数肿瘤来说, 机体免疫反应之所以不能排除肿瘤, 并非是不能被机体免疫系统识别, 而主要是刺激 Th2 型细胞反应, 也可能还存在其它调节机制。本实验结果提示, 胃癌局部微环境可能存在着功能各异的共刺激通路, 而 ICOS-B7H 共刺激通路在胃癌局部占主导地位, 发挥负性共刺激作用。本研究在一定程度上为揭示肿瘤免疫逃逸机制的研究积累了一些资料, 并为胃癌的有效免疫治疗提出了方向。

[关键词] 胃癌; 原位杂交; 共刺激信号; 肿瘤免疫

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] D

[收稿日期] 2002-06-19

[修回日期] 2002-07-20