

[文章编号] 1007-385X(2003)01-

内皮抑素的研究进展

欣 坚 综述, 屠曾宏, 郑维君 审阅 (中国科学院上海药物研究所 新药研究国家重点实验室, 上海 200031)

[摘 要] 一种能特异性抑制血管内皮细胞生长的抑制因子—内皮抑素(Endostatin), 可以抑制内皮细胞的增殖和迁移, 在体内具有良好的抗肿瘤效果。内皮抑素的抗肿瘤效果可能与诱导凋亡, 以及与原肌球蛋白、黏附受体整合蛋白以及基质金属蛋白酶等重要因子有关。

[关键词] 内皮抑素; 原肌球蛋白; 黏附受体整合蛋白; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R73-36+2 [文献标识码] A

侵袭是指恶性肿瘤细胞离开原发生长部位, 突破基底膜和细胞外基质构成的屏障, 侵入毗邻的正常组织。侵袭、转移是恶性肿瘤最本质的特性之一。肿瘤转移的巨大危害性是使局部病变扩散成全身多灶性、弥漫性分布的疾病。对于快速增殖、多灶性分布、异质性生长的转移瘤, 目前的手术、放射治疗和化学治疗等手段常遭失败, 最终患者死亡。侵袭、转移是恶性肿瘤致命性的症结所在, 防治肿瘤的侵袭、转移是降低肿瘤死亡率的重要途径之一。

90 年代初, Folkman 等^[1]发现实体肿瘤及其转移瘤的生长、维持必须依赖于新血管的形成。为了刺激血管的生成, 肿瘤上调一系列血管形成因子的分泌, 包括: 成纤维生长因子(aFGF 和 bFGF), 血管内皮生长因子(VEGF)等^[2]。然而, 许多恶性的肿瘤也分泌血管生成抑制因子, 包括: 血管抑素(angiostatin)^[3]和血小板凝血酶敏感蛋白(thrombospodin)^[4]。人们认识到血管生成受到正负两方面因子的调控: 血管生成刺激因子和血管生成抑制因子。一些血管抑制因子与肿瘤无关, 包括: 血小板因子 4(PF4)^[5], INF- α , INF 诱导蛋白 10^[6], 催乳素 N 端 16 kD 片段^[7]。1994 年, O'Reilly 和 Folkman 从小鼠 Lewis 肿瘤细胞中分离出特异性抑制血管内皮细胞增殖的血管抑制因子血管抑素(angiostatin)^[1,3]。1997 年, 他们又从小鼠内皮细胞瘤中分离到一种新的 20 kD, 能特异性抑制血管内皮细胞生长的抑制因子—内皮抑素(Endostatin)^[8]。

1 内皮抑素的基本生物学功能

1.1 内皮抑素的血管生长抑制作用

O'Reilly 使用鸡胚尿囊膜血管生成试验证明内皮抑素抑制了血管的形成。体内的基底膜蛋白抽提物(Matrigel)试验也证明了它的抗血管生成作用。Blezinger 等^[9]证实直接肌肉注射内皮抑素表达质粒, 对碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导的小鼠角膜血管生长有抑制作用。

1.2 内皮抑素抑制血管内皮细胞增殖以及诱导凋亡的作用
内皮抑素特异性的抑制小牛毛细血管内皮细胞的增殖

并且呈剂量依赖性关系^[8]。对于牛肺动脉内皮细胞(C-PAE), 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖也有抑制作用。而对非血管内皮细胞系, 如: 牛动脉平滑肌细胞, 3T3 成纤维细胞, 肺上皮细胞, Lewis 肺癌细胞等无增殖抑制作用。在 bFGF 存在的条件下, 内皮抑素的增殖抑制作用更加明显。

据 Dhanabal 等^[10]报道, 牛肺动脉血管内皮细胞在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的内皮抑素的作用下, 细胞变圆, 从基质上脱落并且细胞膜上出现小泡。这些现象在细胞处于对数生长期且向里面添加了 bFGF 时更加明显。在凋亡开始后, 通过用荧光素 FITC 标记钙结合蛋白 annexin-v 检测到磷脂酰丝氨酸(PS)由细胞膜内层翻转至胞膜外。他们还发现细胞内的 caspase-3 的活性增加。TUNEL 法也测到核内 DNA 的断裂。通过 Western blot 发现, 细胞内的 Bcl-2, Bcl-XL 蛋白含量也下降, 但是 Bax 的含量不受影响。

1.3 内皮抑素对内皮细胞迁移的影响

在体外内皮细胞有向 bFGF, VEGF 等生长因子迁移的能力。不同浓度内皮抑素下测定人脐静脉内皮细胞穿透重组基底膜 Matrigel 的能力, 可以证明内皮抑素抑制这种迁移。并且这种抑制呈剂量依赖关系^[11-12]。

1.4 内皮抑素对肿瘤的抑制作用

O'Reilly 等^[8]将 Lewis 肺癌移植入小鼠背部形成肿瘤模型。每天皮下注射内皮抑素, 在 2.5 mg/kg 剂量时肿瘤的生长被抑制 53%, 10 mg/kg 时抑制达 97%, 当给药 20 mg/kg 时肿瘤生长几乎被完全抑制。皮下注射 0.3 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹ 时, Lewis 肺癌的转移瘤可被完全抑制。对于其它恶性肿瘤各类如: B16F10 黑色素瘤、T241 纤维肉瘤和 EOMA 血管内皮细胞瘤, 内皮抑素也能抑制它们在小鼠体内的生长。持续的给药维持肿瘤处于休眠状态。停药后 5 ~ 14 d 内肿瘤复发, 血管生长, 最终导致小鼠死亡。

除了直接注射之外, 肌肉注射内皮抑素表达质粒也能够抑制肿瘤的生长与转移^[9]。注射之后, 从肌肉中产生内皮抑素蛋白, 进入血液循环并且能达到生物活性浓度。而且, 这个过程可持续长达 2 周。内皮抑素在血液中的浓度以及它

的持续时间足够抑制肿瘤及其转移瘤的生长。

虽然重复注射重组内皮抑素并不引起获得性抗药性^[13]。但是,这样用药毕竟不方便,而且非常昂贵。而使用肌肉注射抗血管生成基因的治疗法将会使肿瘤的治疗更加便利。

2 抗肿瘤作用的可能机制

一般认为内皮抑素特异性的抑制内皮细胞的增殖,其中的机制可能与内皮细胞凋亡的增加^[10]或细胞周期的改变有关,而不是直接作用于肿瘤细胞的生长。因为在内皮抑素的作用下肿瘤细胞的增殖并不受影响。内皮抑素通过抑制肿瘤血管的生长,导致肿瘤缺氧,再加上其它可能的间接细胞毒作用,从而使肿瘤细胞坏死、凋亡,肿瘤收缩^[15]。内皮抑素的生物学功能也可能是通过直接或间接改变其它与生长相关的分子的表达而实现的。如下调促进血管生长的分子。但是肿瘤细胞、内皮细胞本产生促进或抑制血管生长的因子,而且许多生长因子也可以被细胞外基质激活,因此由内皮抑素引起的这些因子表达的改变很难进行检测。如对 VEGF 的影响,Kirsch 等人^[16]得出的结果与 Ivan Ding 等人^[15]的结果截然相反。

虽然有关内皮抑素的抗肿瘤作用的分子机制目前尚不完全清楚,但是科学家们已经取得一定的进展。Entremed 公司的科学家们发现一种多肽 E37,它的抗原决定簇与人的原肌球蛋白中的一部分相吻合。E37 在体内可以抑制内皮抑素的肿瘤抑制活性达 87%。原因是 E37 与原肌球蛋白竞争结合 Endostatin。因此他们认为内皮抑素与原肌球蛋白的结合破坏了微丝结构的完整性,从而导致细胞运动功能的丧失,诱导凋亡,最终抑制肿瘤^[17]。

由于内皮细胞的增殖是锚定依赖性的,因此由黏附受体整合蛋白家族(Integrin)所介导的信号在新血管的生长过程中可能起很重要的作用。在新生成的血管内皮细胞中高度表达的 $\alpha v \beta 3$ 整合蛋白,其抑制剂可以通过抑制血管生长从而抑制肿瘤。除了 $\alpha v \beta 3$ 整合蛋白之外, $\alpha 5 \beta 1$ 整合蛋白在血管生成中也发挥重要功能。它的抑制剂也可以抑制由多种生长因子诱导的血管生长。在动物模型中可以抑制血管生成,引起肿瘤萎缩。Marko 等人^[18]发现内皮抑素可以在人脐静脉内皮细胞表面与 $\alpha v, \alpha 5$ 整合蛋白结合,从而发挥生物学功能。固定的内皮抑素促进内皮细胞的迁移、存活。相反,可溶性的内皮抑素却起着相反的作用。因而,他们认为整合蛋白是内皮抑素的潜在作用位点。

还有一种理论认为内皮抑素的作用机制与基质金属蛋白酶(MMPs)有关。金属蛋白酶是一类含锌指结构的内源性多肽,在新血管生成和肿瘤转移的过程中有重要作用。它们可以选择性降解胞外基质,这是新血管生成开始阶段内皮细胞的迁移和侵入所必需的。间质胶原酶(MMP-1)和 MMP-7 在头颈表皮样癌的浸润细胞和相邻基质细胞中表达,在人前列腺癌和乳腺癌中表达也得到增强。在临床诊断中发现多种恶性肿瘤表达高水平的明胶酶(type IV collagenase),但在正

常组织或良性组织中明胶酶表达很少或不表达。在一些正常组织中存在一类天然的基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs),这种大分子物质参与调节组织中基质金属蛋白酶的活性。实验证明重组 TIMPs 能抑制 B16-F10 小鼠黑色素瘤细胞的体外侵袭能力和体内肺转移能力。由于内皮细胞可以产生 MMP-1,-2,-9 和 MT1-MMP,而且 Young-Mi 等人^[11]发现内皮细胞中分泌的金属蛋白酶原 2 的激活和其催化活性可以被内皮抑素所抑制。而且,MMP-2 缺陷型小鼠新血管的生成大大降低。因此,内皮抑素的抑制血管和抗肿瘤的活性可能与此相关。

总之,内皮抑素的作用机制是非常复杂的,其中涉及到很多生长调控因子、酶和受体。说明它很可能与多个信号传导通路有关,通过多种途径发挥其生物学功能。

3 临床试验情况

内皮抑素的首次临床试验于 1999 年末在 Dana-Farber/Partners Cancer Care (DFPCC) 开始,并有 Dana-Farber Cancer Institute,Brigham and Women's hospital 和 Beth Israel Deaconess Medical Center 参加。随后的临床试验在德克萨斯州休斯顿 MD Anderson Cancer Center 和威斯康星州麦迪逊市威斯康星大学 Comprehensive Cancer Center 两地展开,这两处的试验由国家癌症研究所指定、在新药开发申请局(IND)的指导下进行。目前一期临床试验已经结束,正在进行二期临床试验。

尽管一期临床试验的结果并不如理想中的那么良好,但是人们推测内皮抑素不是治愈肿瘤的唯一药物,而是与其它药物联合使用来稳定病情和作为一种重要的抑制肿瘤生长的辅助药物。抗血管生成治疗可能需要连续用药以维持肿瘤处于休眠状态。

4 展望

抗侵袭、转移药物的研究在近 10 年里取得了显著的进展。出现了许多有苗头的药物。早期的抗侵袭、转移的药物主要针对已经获得侵袭能力的肿瘤,阻断侵袭、转移过程中的关键步骤,以抑制肿瘤转移的发展。肿瘤侵袭、转移的分子机理还未完全明了,其防治药物的研究历史较短,很难指望在短期内即有成熟的抗侵袭、转移的药物用于临床。但针对肿瘤转移各个靶点的药物研究已经展开,并取得了令人鼓舞的实验结果。

1998 年期间,世界各种媒体大量报道了两种新的内源性抗血管生成因子:内皮抑素和血管抑素。这引起了各国科学家和医学工作者的极大关注,也为肿瘤的治疗开辟了新的途径。虽然该药还不成熟,它对人的实体瘤的确切疗效,长期用药有何毒副作用,是否产生耐药性等问题尚不完全清楚。而且内皮抑素生产成本较高,治疗时必须长期大剂量使用,这可能是其成为被普遍采用的抗肿瘤药的另一大障碍。但是它为治疗恶性肿瘤提供了一条全新的道路,很可能成为人类攻克肿瘤的一个强有力的手段。

[参 考 文 献]

- [1] Folkman J, Watson K, Ingber D, *et al.* Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia [J]. Nature, 1989, 339(6219): 58-62.
- [2] Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, *et al.* Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma [J]. Cell, 1991, 66(6): 1095-1021.
- [3] O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, *et al.* Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma [J]. Cell, 1994, 79(2): 315-328.
- [4] Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, *et al.* A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(17): 6624-6627.
- [5] Maione TE, Gray GS, Petro J, *et al.* Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides [J]. Science, 1990, 247(4938): 77-82.
- [6] Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, *et al.* Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis *in vivo* [J]. J Exp Med, 1995, 182(1): 155-159.
- [7] Clapp C, Martial JA, Guzman RC, *et al.* The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis [J]. Endocrinology, 1993, 133(3): 1292-1296.
- [8] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. Cell, 1997, 88(2): 277-285.
- [9] Blezinger P, Wang J, Gondo M, *et al.* Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(4): 343-349.
- [10] Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, Lu H, Knebelmann B, Segal M, and Sukhatme VP. Endostatin induces endothelial cell apoptosis [J]. J Biol Chem, 1999, 274: 11721-11726.
- [11] Young-mi K, Jin-Wook J, Ok-Hee J, *et al.* Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic of matrix metalloproteinase 2 [J]. Cancer Res, 2000, 60: 5410-5413.
- [12] Mohanraj D, Ramani R, Ruediger V, *et al.* Endostatin: Yeast production, mutant, and antitumor effect in renal cell carcinoma [J]. Cancer Res, 1999, 39: 189-197.
- [13] Boehm T, Folkman J, Browder T, *et al.* Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [J]. Nature, 1997, 390(6658): 404-407.
- [14] Dhanabal M, Volk R, Ramchandran R, *et al.* Cloning, expression, and *in vivo* activity of human endostatin. Biochem. Biophys [J]. Res Commun, 1998, 258: 5673-5677.
- [15] Ivan D, Jian-Zhong S, Bruce F, *et al.* Intratumoral administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in Mca-4 murine mammary carcinomas [J]. Cancer Res, 2001 61: 526-531.
- [16] Kirsch M, Strasser J, Allende R, *et al.* Angiostatin suppress malignant glioma growth *in vivo* [J]. Cancer Res, 1998, 58: 4654-4659.
- [17] Nicholas JM, Wanda YS, David LN, *et al.* Endostatin binds tropomyosin a potential modulator of antitumor activity of endostatin [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 25190-25196.
- [18] Marko R, Tanja V, Eola Kukk-Valdre, *et al.* Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(3): 1024-1029.
- [收稿日期] 2002 - 09 - 13 [修回日期] 2002 - 11 - 15