

[文章编号] 1007-385X(2008)03-S5-04

抗肿瘤血管治疗与肿瘤血管及微环境的正常化

Antiangiogenesis therapy and normalization of tumor vasculature and microenvironment

黄桂春 综述, 陈龙邦* 审阅 (南京大学医学院 临床学院 南京军区 南京总医院 肿瘤内科, 南京 210002)

[摘要] 抗肿瘤血管治疗的最初提出是由于发现肿瘤的生长有赖于肿瘤血管提供营养物质。然而临床研究发现单纯抗肿瘤血管治疗的疗效并不确定,但是将其与化疗或放疗序贯地联合应用,可以明显提高临床疗效。随着对肿瘤血管生成机制认识的加深,目前已认识到异常的肿瘤血管及肿瘤微环境是促血管生成因子和血管生成抑制因子平衡发生偏斜的结果。研究者提出抗肿瘤血管治疗可以使得肿瘤间质促血管生成因子和血管生成抑制因子恢复平衡,从而使肿瘤血管及其微环境发生暂时的正常化。在这种正常化的状态下,肿瘤血管抗转移的能力增强,肿瘤细胞的供血、供氧增加,并且对放化疗的敏感性增强。肿瘤血管及其微环境发生正常化的理论,提升了抗肿瘤血管治疗的临床地位,为制定更合理的抗肿瘤治疗方案提供理论依据。

[关键词] 抗肿瘤血管治疗;肿瘤血管生成;肿瘤微环境

[中图分类号] R730.2; R730.54 [文献标志码] A

抗肿瘤血管治疗这一概念的提出已有 30 多年的历史,临床应用取得了一定的疗效,迄今国内外已有 20 种以上的抗肿瘤血管药物在进行临床期的评价。最近研究者提出一个有悖于传统的观点,抗肿瘤血管药物能够使得肿瘤血管及其微环境由原来的结构和功能紊乱状态向正常状态转变,使得肿瘤细胞从乏氧的状态中解脱出来,从而对放、化疗的敏感性增强。本文就此作一综述。

1 抗肿瘤血管治疗的历史

自 Folkman^[1]提出抗肿瘤血管生成治疗的构想后,各学科在肿瘤血管形成机制及抑制肿瘤血管生成方面进行大量研究,试图寻找抗肿瘤血管生成行之有效的方法。起初,人们发现一些传统药物有抗肿瘤血管的作用,如可的松、尼可刹米、沙利度胺^[2-3]等。后来也发现了一些化疗药物在不引起肿瘤细胞毒性的剂量下,可以抑制血管的生成^[4]。随着免疫学及分子生物学的进步,研究者试图通过直接或间接抑制促血管生成因子或其信号转导通路达到抑制肿瘤生长的目的。临床研究表明血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的特异性单克隆抗体对肿瘤生长有明显的抑制作用^[5-7]。IL-12 可以通过下调 VEGF 及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)的表达抑制荷瘤免疫缺陷鼠的肿瘤生长^[8]。一些内源性血管生成抑制因子,如血小板反应素-1(thrombospondin-1, TSP-1)、血管内皮抑素(endostatin)、肿瘤停滞因子(tumstatin)^[9-11]也获得广泛的研究。有证据表明提高这些内源性物质可以抑制肿瘤血管^[12]。Ling 等^[13]发现恩度(国内已获 SFDA 批准的

重组人内皮抑素)可拮抗 VEGF 的促血管生成作用,并且能够抑制肿瘤血管的生成。

2 肿瘤血管生成机制

肿瘤的血管形成方式包括 4 个方面:肿瘤细胞与血管的共选择(co-option)、血管新生(angiogenesis)、血管发生(vasculogenesis)、血管套叠(intussusception)^[14]。血管生成是从肿瘤细胞与血管的共选择开始的,随着肿瘤的生长,肿瘤细胞压迫血管并且使得血管结构破坏,血管发生衰亡,肿瘤血液灌注减少,肿瘤微环境缺氧,部分肿瘤细胞死亡。尚存的肿瘤细胞在环境刺激下(如缺氧、pH 值下降、低血糖等)分泌多种血管生成因子,包括 FGF、VEGF、促血管生成素-1(angiopoietin-1, Ang-1)、PDGF 等^[15];正常的血管内皮细胞在这些分子的诱导下发生增殖和迁移^[16],同时分泌一些蛋白裂解酶,降解基质蛋白,释放血管生成因子,进一步促进血管生成。这一过程称之为血管新生(angiogenesis)。另一方面,骨髓来源的血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells)和造血干/祖细胞(haematopoietic stem/progenitor cells)在肿瘤分泌的促血管生成因子的作用下,在肿瘤定植并向肿瘤内部迁移,形成新血管,称之为血管发生(vasculogenesis)^[17-18]。血管套叠是指肿瘤血管在间质内迁移并插入已形成的其他

[基金项目] 江苏先声药业恩度研究基金资助项目(Endo-20071122)。Supported by Xiansheng Yaoye Endu Programme of Jiangsu Province(Endo-20071122)。

[作者简介] 黄桂春,男,(1983-),江苏省南京市人,博士研究生,主要从事临床肿瘤学方面的研究。

* Corresponding author. E-mail: chenlongbang@yeah.net

血管,目前尚不十分明确。肿瘤血管的形成应是这些方式综合的结果。

在分子水平上,血管生成基本上受两大类因子的调控,分别为促血管生成因子(pro-angiogenesis factor)和血管生成抑制因子(anti-angiogenesis factor)^[19]。促血管生成因子中,VEGF 和 Ang-1、FGF 一起诱导血管内皮细胞的增殖、迁移^[15, 20-21]。过去血管生成抑制因子受到比较密切的关注,发现了很多血管抑制因子,并且已被临床应用^[22]。目前对血管内皮抑素的研究较为透澈,它是 XVIII 型胶原的一个片段,可与多种细胞表面蛋白作用,调节细胞的黏附和迁移。肿瘤停滞因子是 IV 型胶原的一个 28 000 的片段,通过作用于整合素 $\alpha V\beta 3$ 达到抑制血管生成的作用。TSP-1 是第 1 个被发现的内源性血管生成抑制因子,储存于血小板的 α 颗粒,其作用受体为 CD36。

在肿瘤不断生长过程中,肿瘤血管不断出现新生和凋亡,但这一动态过程基本上都是在促血管生成因子占绝对优势的条件下进行的。这样所生成的血管在形态和功能上与正常血管度明显不同^[23]。正常微血管是由动脉、毛细血管网和静脉有机地组织起来,有着完备的调节功能。而肿瘤血管却表现为空间分布的异质性,形态变化比较明显,可表现为扩张、囊状或曲折。正常血管表现为两枝分叉,而肿瘤血管的分支没有规律,且血管直径不均匀;血管壁的结构出现异常表现,如巨大内皮细胞间连接、内皮细胞窗的增多、微泡结构的增加和基底膜的缺陷。

3 肿瘤微环境的概念

在肿瘤组织中,VEGF 通过作用于酪氨酸激酶受体 VEGFR-3,促进淋巴管生成,VEGFR-3 的功能障碍会导致淋巴水肿^[24]。但是因为缺乏理想的表面标志,对于实体肿瘤内部是否存在淋巴管的争议比较大^[25]。由于淋巴管压力偏低,管壁薄弱,即使存在,也会因为肿瘤实质内部的压力升高而压缩。但是可以肯定的是,肿瘤周边的淋巴管出现明显的增生,这与促血管生成因子的提高不无关系。实性肿瘤的这一特点,决定了肿瘤内部组织液引流不畅,加之肿瘤细胞的快速生长,肿瘤内部间质压力(interstitial fluid pressure, IFP)明显升高^[26]。这一特点对于肿瘤的淋巴源性转移很有意义,因为肿瘤中心于外周的压力差过大会促使肿瘤细胞进入淋巴管。同时由于压力的缘故,肿瘤血管内外液体的交换由对流转为渗透,肿瘤细胞生长所需的营养物质供应不足,肿瘤细胞特别是处于肿瘤中心的肿瘤细胞总是处于一种缺氧状态,肿瘤化疗时药物也不能很好地在组织内分布。所以在此基础上提出了肿瘤微环

境(tumor microenvironment)的概念^[23]。所谓的肿瘤微环境就是指肿瘤在生长过程中,由肿瘤细胞及细胞外间质相互作用后形成的肿瘤细胞生长的特殊环境,这一环境具有肿瘤组织内血供不平衡、间质压力较正常组织高、营养物质相对缺乏的特点。而形成这些特点的主要因素就是促血管生成因子和血管生成抑制因子的平衡失调并向前者偏斜。

4 抗肿瘤血管治疗的新旧观点

根据肿瘤血管形成机制,目前针对抗肿瘤血管形成的分子靶向药物主要有以下途径:抑制血管外基质降解^[27];抑制促血管生成因子^[28];抑制促血管生成因子的细胞表面受体^[29];提高内源性或外源性血管生成抑制因子的浓度^[11-13, 30]。传统观点认为,肿瘤的生长依赖于肿瘤内血管的生成,肿瘤的血管生成是肿瘤迅速增殖及血行转移的前提,抑制肿瘤的血管生成就会使得肿瘤的生长得不到足够的营养物质,随后肿瘤的生长受到抑制^[1]。但在理论上,抑制肿瘤血管的生成则会导致实体肿瘤细胞缺氧,使得其对放疗、化疗敏感性下降,所以肿瘤的抗血管生成治疗与肿瘤的放、化疗在某种程度上来说处于对立的位置^[31]。

然而,最近一些研究探讨了将肿瘤的抗血管生成治疗与肿瘤的放疗、化疗联合进行抗肿瘤治疗后所产生的效果。研究结果提示肿瘤的抗血管生成治疗对于放、化疗而言有协同作用^[26, 32-35], Weichselbaum^[33] 比较了 VEGF-2 特异性抗体(DC101)、 γ 射线放疗及两者的联合使用对神经胶质瘤荷瘤裸鼠的作用,结果发现在 DC101 处理后 4~6 d 行 γ 射线放射治疗可产生明显的协同作用,但是如果两者的顺序或者时间间隔不理想,就不会出现这一效应。对于产生这一现象的原因,有学者提出一种解释:抗血管生成的药物可以使得肿瘤血管及微环境正常化^[36-38],使得血管结构变得规则、血管基底膜完整、血管周围支持细胞增多,从而,血管供应营养物质能力增强,抗侵蚀能力增强,化疗药物更容易作用于肿瘤,肿瘤细胞对放疗更加敏感。

5 肿瘤血管及微环境正常化的构想

临床试验中也出现了与上述实验类似的结果, Kabbirava 等^[26]将不适合依立替康治疗的转移性结肠癌患者随机分为两组,对照组接受一线 5-氟尿嘧啶 + 甲酰四氢叶酸 + 安慰剂,试验组接受 5-氟尿嘧啶 + 甲酰四氢叶酸 + Avastin(bevacizumab, VEGF 特异性抗体),随访发现试验组无进展生存期与对照

组相比明显延长。Jain 等^[35]提出将 Avastin 与细胞毒性化疗方案联合使用,可以改善初治结肠癌和肺癌患者的总生存期,同样的结果也发生在已接受过治疗的结肠癌患者身上。这些与传统观念矛盾的研究结果提示存在着潜在的机制。

现在流行的观点是,肿瘤的血管生成及微环境的异常是由于局部微环境中促血管生成因子和血管生成抑制因子之间的平衡向前者发生偏斜的结果^[36]。如图 1 所示,两者在正常情况下是平衡的,但在肿瘤组织特殊的环境中,促血管生成因子明显增高,于是血管内皮细胞及淋巴管内皮细胞在这些促进因子的作用下,不断增殖、迁移。但是这样形成的脉管系统在形态及功能方面是有缺陷的。所有的抗肿瘤血管治疗,都归结到恢复这两者平衡关系这一目标上来。阻断促血管生成因子或其信号通路、补充外源性血管生成抑制因子是目前比较流行的两大方法。当两者的平衡恢复后,肿瘤内异常微血管逐渐凋亡,新生血管在这种平衡下能够达到类似正常化的状态。这一假说目前已初步得到实验数据的支持^[38]。但研究发现,这种状态使得肿瘤细胞的氧供增加,从而对放疗敏感性增强的效果只在有限的一段时间内出现。于是提出了“时间窗”(normalization window)概念^[31-35],是指抗肿瘤血管治疗时肿瘤血管的正常化的时间段。在 Weichselbaum^[33]实验中,时间窗在 4~6 d,只有在用 DC101 处理后的这一段时间内进行放疗才会出现协同作用。

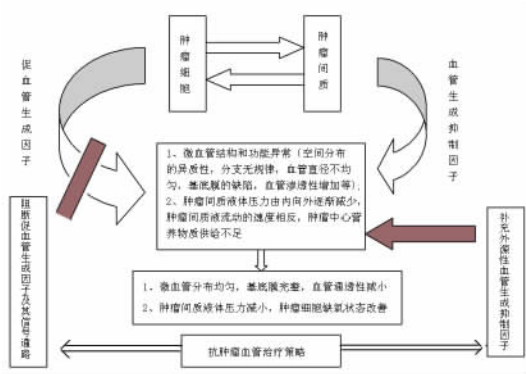


图 1 肿瘤血管形成的特点及抗肿瘤血管治疗的策略

6 肿瘤血管及微环境正常化的意义

肿瘤血管的正常化对于肿瘤治疗而言非常重要。上面已经提到,肿瘤的血管分布存在异质性,肿瘤细胞的供血必然不均匀,部分肿瘤细胞处于缺氧状态,对化疗药物敏感性下降,这一特点限制了抗肿瘤化疗药物

的疗效。最有效的抗肿瘤化疗要使得每一个肿瘤细胞都能充分接触细胞毒性药物并且产生最大的细胞毒效应。从这一方面来讲,肿瘤血管的正常化可以增加抗肿瘤细胞毒性药物的疗效。

另外,肿瘤的转移是目前肿瘤治疗的一个难点,主要原因是肿瘤血管抗侵蚀能力不强,肿瘤间质液体压力升高,促使肿瘤细胞进入血管或淋巴管,从而发生血行或淋巴道转移。肿瘤血管的正常化,理论上就可以改善肿瘤血管壁的结构及其外周细胞的功能,有能力抵御肿瘤细胞的侵袭。这些积极意义可以体现在抗血管生成治疗联合化疗后,肿瘤患者的临床预后得到改善。同样的道理,抗血管生成治疗联合放疗也会增强放疗的抗肿瘤作用。肿瘤微环境趋向正常化后,肿瘤间质压力下降,驱使肿瘤细胞淋巴转移的动力因素解除,使肿瘤患者能够得到临床获益。

Jain^[19]在 2007 年 ASCO 会议上提出建立在肿瘤血管正常化基础上的抗肿瘤治疗目前面临三大难题:第一,要确定是否还有其他直接或间接抗血管生成治疗能够使肿瘤血管正常化,理论上讲,任何一种可以恢复促血管生成因子和抑制血管生成因子平衡的治疗度可引起血管的正常化;第二,寻找合适的与肿瘤血管正常化的相一致的标记,结合影像学的方法,能够明确时间窗的界限,指导合理的联合应用抗血管生成治疗和放疗;第三,在分子及细胞水平上了解小肿瘤血管正常化的机制。随着对肿瘤血管机制认识的加深,抗肿瘤血管治疗的方法会越来越合理。

[参 考 文 献]

[1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication[J]. N Engl J Med,1971, 285(21): 1182-1186.

[2] Tseng JE, Glisson BS, Khuri FR, et al. Phase II study of the antiangiogenesis agent thalidomide in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Cancer,2001, 92 (9):2364-2373.

[3] Lee K, Erturk E, Mayer R, et al. Efficacy of antitumor chemotherapy in C3H mice enhanced by the antiangiogenesis steroid, cortisone acetate[J]. Cancer Res,1987, 47(19):5021-5024.

[4] Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D, et al. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine[J]. Blood, 1999, 94 (12): 4143-4155.

[5] Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer[J]. Nat Med, 2004,10(2):145-147.

[6] Im SA, Gomez-Manzano C, Fueyo J, et al. Antiangiogenesis treatment for gliomas: transfer of antisense-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth in vivo[J]. Cancer res,1999, 59 (4): 895-900.

[7] Im SA, Kim JS, Gomez-Manzano C, et al. Inhibition of breast cancer growth in vivo by antiangiogenesis gene therapy with adeno-

- virus-mediated antisense-VEGF[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(9): 1252-1257.
- [8] Duda DG, Sunamura M, Lozonchi L, *et al.* Direct *in vitro* evidence and *in vivo* analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4):1111-1116.
- [9] Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *J Cell Mol Med*, 2002, 6(1): 1-12.
- [10] Shichiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin[J]. *FASEB J*, 2001, 15(6):1044-1053.
- [11] Hamano Y, Kalluri R. Tumstatin, the NCI domain of $\alpha 3$ chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(2): 292-298.
- [12] Sund M, Hamano Y, Sugimoto H, *et al.* Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(8):2934-2939.
- [13] Ling Y, Yang Y, Lu N, *et al.* Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(1):79-84.
- [14] Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, *et al.* Angiogenesis in brain tumors[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(8): 610-622.
- [15] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 249-257.
- [16] Arkudas A, Tjiawi J, Bleiziffer O, *et al.* Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate angiogenesis in the AV loop model[J]. *Mol Med*, 2007, 13(9-10):480-487.
- [17] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. *EMBO J*, 1999, 18(14): 3964-3972.
- [18] Rafii S, Lyden D, Benezra R, *et al.* Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy[J]? *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(11):826-835.
- [19] Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy[J]. *Science*, 2005, 307(5706): 58-62.
- [20] Celec P, Yonemitsu Y. Vascular endothelial growth factor-basic science and its clinical implications[J]. *Pathophysiology*, 2004, 11(2): 69-75.
- [21] Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization[J]. *EMBO J*, 1998, 17(11): 3005-3015.
- [22] Tabruyn SP, Griffioen AW. Molecular pathways of angiogenesis inhibition[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(1): 1-5.
- [23] Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization[J]. *Microvasc Res*, 2007, 74(2-3): 72-84.
- [24] Stacker SA, Achen MG, Jussila L, *et al.* Lymphangiogenesis and cancer metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(8):573-583.
- [25] Baldwin ME, Stacker SA, Achen MG. Molecular control of lymphangiogenesis[J]. *Bioessays*, 2002, 24(11):1030-1040.
- [26] Kabbinnavar FF, Schulz J, McCleod M, *et al.* Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) to prolong progression-free survival in first-line colorectal cancer (CRC) in subjects who are not suitable candidates for first-line CPT-11[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(14Suppl): 3516.
- [27] Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(3):178-193.
- [28] Lin J, Yan XJ, Chen HM. Fascaplysin, a selective CDK4 inhibitor, exhibit anti-angiogenic activity *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007, 59(4): 439-445.
- [29] Rini BI. Vascular endothelial growth factor-targeted therapy in renal cell carcinoma: current status and future directions[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(4):1098-1106.
- [30] Zhang X, Lawler J. Thrombospondin-based antiangiogenic therapy[J]. *Microvasc Res*, 2007, 74(2-3):90-99.
- [31] O'Reilly MS. Radiation combined with antiangiogenic and antivascular agents[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2006, 16(1): 45-50.
- [32] Rofstad EK, Henriksen K, Galappathi K, *et al.* Antiangiogenic treatment with thrombospondin-1 enhances primary tumor radiation response and prevents growth of dormant pulmonary micrometastases after curative radiation therapy in human melanoma xenografts[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(14):4055-4061.
- [33] Weichselbaum RR. How does antiangiogenic therapy affect brain tumor response to radiation[J]? *Nat Clin Pract Oncol*, 2005, 2(5):232-233.
- [34] Senan S, Smit EF. Design of clinical trials of radiation combined with antiangiogenic therapy[J]. *Oncologist*, 2007, 12(4):465-477.
- [35] Jain RK, Duda DG, Clark JW, *et al.* Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2006, 3(1):24-40.
- [36] Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, *et al.* . Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3731-3736.
- [37] Winkler F, Kozin SV, Tong RT, *et al.* Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases[J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(6): 553-563.
- [38] Preda A, Novikov V, Möglich M, *et al.* MRI monitoring of avastin antiangiogenesis therapy using B22956/1, a new blood pool contrast agent, in an experimental model of human cancer[J]. *J Magn Reson Imaging*, 2004, 20(5): 865-873.

[收稿日期] 2008 - 02 - 28

[修回日期] 2008 - 04 - 15

[本文编辑] 郁晓路