

## DLL4 在抗肿瘤新生血管治疗中作用的研究进展 Anti-angiogenesis effect of DLL4 in tumors: recent progress

张煜辉 综述, 岳志健\* 审阅(第二军医大学附属长海医院 神经外科, 上海 200433)

[摘要] 抗新生血管治疗是实体肿瘤治疗中的有效策略,近年来抗 VEGF-A 和 VEGF-R2 受体治疗出现了耐药现象。Notch 信号转导是一种细胞间信号通路,在肿瘤新生血管生成中起重要作用。在 Notch 通路中,Delta 样配体 4(Delta-like ligand 4, DLL4)在影响肿瘤新生血管生成方面起着重要的作用,它能抑制新生血管分支形成,促进新生血管的成熟;阻断 DLL4 能增加无功能新生血管数量,加剧恶性肿瘤缺血缺氧,抑制肿瘤的生长。对 DLL4 蛋白的深入研究为肿瘤新生血管分子靶向治疗提供新的策略和新的靶标,DLL4 有可能成为继 VEGF 后肿瘤血管分子靶向治疗的重要靶点。

[关键词] Delta 样配体 4(DLL4); 血管生成; 肿瘤; 靶向治疗

[中图分类号] R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)06-0588-03

抗新生血管治疗是肿瘤治疗中的有效策略,目前抗新生血管治疗的主要靶标是 VEGF-A 和 VEGF-R2 受体,临床显示有一定的疗效<sup>[1]</sup>。然而近年来抗 VEGF-A 和 VEGF-R2 受体治疗出现了耐药现象<sup>[2]</sup>。DLL4-Notch 信号转导通路能促进血管成熟、抑制新生血管分支形成,抑制血管的过度增生<sup>[3-8]</sup>。阻断 Delta 样配体 4(Delta-like ligand 4, DLL4)促进了肿瘤新生血管的生成,但这些新生血管管腔塌陷,输送血氧能力弱,不能保障肿瘤的供血和供氧,从而延缓了肿瘤的生长<sup>[5,9-10]</sup>,因此 DLL4 有可能成为继 VEGF 后肿瘤血管分子靶向治疗的重要靶点。本文对其研究进展进行综述。

### 1 DLL4 及其 Notch 受体

#### 1.1 Notch 受体途径

Notch 受体信号转导属于细胞间信号转导<sup>[11]</sup>,Notch 受体及其配体可分布于体内各种细胞的细胞膜。Notch 受体可分为 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch 4 等 4 种亚型,其配体可分为 Jagged1、Jagged2、DLL1、DLL2 和 DLL4。每一种配体和受体结合后发生的下游反应尚有待于进一步研究。目前已知 Notch 途径的激活能促进 Hes/E(spl) 和 Hesr/Hey 家族基因的转录。Notch 信号转导在新生血管生成中起重要作用。Notch1、Notch4、Jagged-1、DLL1、DLL4、Hes1、Hey1 和 Hey2 在血管内皮细胞中均有显著表达。伴皮质下梗死和白质脑病的常染色体显性遗传性脑动脉病(CADASIL 病)和先天性肝内胆管发育不良征(Alagille 综合征)就是由于 Notch3 和 Jagged1 突变造成的。小鼠在胚胎早期会由于缺乏 Notch1 或 Jagged1 引起胚胎、卵黄囊静脉发育不良和动静脉分化障碍而死亡<sup>[12-13]</sup>。此外 Notch 途径能通过下调 p21cip1 和激活 Bcl-2 抑制血管内皮细胞增殖。Notch 途径对动静脉的分化也起着很

大的作用。阻断 Hey1 和 Hey2 的转录能抑制血管向动脉的分化<sup>[13]</sup>,通过 COUP-TFII 抑制 Notch 途径能促进血管向静脉的分化。

#### 1.2 血管特异性配体 DLL4

DLL4 是由 685 个氨基酸组成的 I 型单次跨膜蛋白,基因定位于染色体 15q14。DLL4 蛋白在进化过程中较保守,人和小鼠的蛋白序列相同比例达 87%。人 DLL4 蛋白在膜外段有 8 个表皮生长因子(EGF)样的重复肽段,4 个潜在的糖基化位点和 1 个由 45 个氨基酸组成的 DSL 位点,这些结构有助于 DLL4 与 Notch1、Notch4 的结合。DLL4 的胞内段在 DLL4 与 Notch 结合后可被剪切,调节基因的转录<sup>[14]</sup>。

在 Notch 通路中,DLL4 在影响新生血管生成方面起着重要的作用。DLL4 存在于新生血管的内皮细胞及胸腺、视网膜、脑、神经管和造血组织中。生理状态下,DLL4 只存在于毛细血管和向动脉分化的血管内皮中,并未在静脉内皮细胞中发现 DLL4<sup>[15]</sup>。病理状态下,很多实体肿瘤血管中可见 DLL4 的上调<sup>[16-17]</sup>。

血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(bFGF)、白细胞介素 6(IL-6)、缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ )等均能促进 DLL4 的表达。在大多数内皮细胞中,VEGF-A 能使 DLL4 表达上调<sup>[17-18]</sup>,而用 SU5416(选择性 VEGF-R2 抑制剂)抑制斑马鱼的 VEGF 通路却不能降低 DLL4 的表达,表明只有进化水平较高的动物体内的 VEGF 才能促进 DLL4 的表达<sup>[8]</sup>。

低氧是恶性肿瘤的一个特征,是诱导新生血管生成的重要因子<sup>[19]</sup>。研究显示血管内皮细胞内的低氧

[作者简介] 张煜辉(1979-),男,江苏省丹阳市人,博士,主要从事脑胶质瘤临床和基础的研究

\* Corresponding author. E-mail: yuezhj638@163.com

状态能诱导 DLL4 的表达<sup>[20]</sup>,但其机制尚不明确,可能是直接也可能是间接(如通过 VEGF 通路等)促进了 DLL4 的表达<sup>[7]</sup>。Foxc1 和 Foxc2(两种相关的转录因子)也能促进小鼠和人 DLL4 蛋白的表达<sup>[21]</sup>。

## 2 DLL4 对新生血管的作用

DLL4 信号转导通路调节 VEGF 的下游通路,抑制血管发出新分支,抑制新生血管的生成。

### 2.1 DLL4 不足导致新生血管形成障碍

小鼠胚胎体内研究表明 DLL4 等位基因的敲除将导致小鼠胚胎的死亡<sup>[22]</sup>,对其胚胎的解剖显示:小鼠胚胎的死亡是由于血管形成障碍造成的,包括主动脉狭窄、主动脉分支形成障碍,偶见动脉退化,同时还能观察到心包囊的扩大和卵黄囊血管形成障碍。另外还能观察到畸形静脉(尚不能排除静脉畸形是动脉畸形引起的结果),同时还能观察到动静脉瘘<sup>[22]</sup>。适度的 DLL4 对于新生血管的形成起关键的作用。同时,过度的 DLL4 表达会促进小鼠胚胎新生血管的生成,减缓新生血管的成熟化过程<sup>[27]</sup>。

### 2.2 DLL4 能抑制新生血管分支形成

在血管新生过程中,内皮细胞移行的分子学机制目前尚不明确。由于 Notch 信号转导为细胞间信号转导,血管内皮细胞的生长接触抑制现象提示:Notch 信号通路可能参与了血管新生的过程。体外研究证实抑制 Notch 信号通路能引起血管内皮细胞的增殖,促进新生血管分支的形成<sup>[23]</sup>。Suchting 等<sup>[4]</sup>证实 DLL4 + / - 小鼠的主动脉弓组织在体外培养能诱发出更多的血管分支,DLL4 在体外新生血管分支形成中起重要作用。Dufraigne 等<sup>[25]</sup>的研究显示:抑制 DLL4 能促进无功能新生血管的生成。DLL4 可能是诱导血管内皮细胞增殖后向血管成熟化发展的关键因素<sup>[26]</sup>。

小鼠视网膜模型是研究 DLL4 参与新生血管的作用的理想模型。刚出生时小鼠视网膜无新生血管,出生后 1 周内新生血管从视神经盘附近发出,向颞侧呈放射状生长。在这个模型中,DLL4 很容易在内皮细胞中被检测到,并受到 VEGF 的调节<sup>[7,10]</sup>。Suchting 等<sup>[4]</sup>的研究提示 DLL4 在其他组织(如后脑)中的新生血管生成过程中也有着类似的作用。给野生型小鼠予以 DLL4-Fc 和 DLL4 中和抗体的研究显示:抑制 Notch 通路能引起视网膜血管形成过多的血管分支和过度的血管吻合。该研究进一步证实了 DLL4 能抑制新生血管分支的形成,同时也提示 Notch 通路能调节血管间吻合的形成<sup>[7,9,11]</sup>。

在 Notch 通路对血管管腔形成的作用目前存在争议。早期的研究显示阻断 Notch 通路会导致血管管腔的塌陷,但仍存在腔隙,提示即使阻断 Notch 通路,血

管内皮细胞也能发生极化<sup>[23]</sup>。然而,后期的研究显示 DLL4 的缺乏能显著地导致血管管腔塌陷<sup>[11]</sup>。虽然 Notch 通路与动静脉分化有关,但其在动静脉分化过程中的作用也存在争议。DLL4 + / - 狗模型的视网膜动静脉在形态和遗传上均提示正常<sup>[9]</sup>。

## 3 DLL4 是肿瘤血管治疗的新靶标

DLL4 在成人的正常血管结构中含量较少,在肾、膀胱和乳腺等部位肿瘤中被诱发,促进肿瘤新生血管成熟<sup>[17]</sup>。然而,体内实验中的肿瘤细胞过度表达 DLL4 并不能促进肿瘤的生长<sup>[6,10]</sup>。这可能与细胞种类有关,U87 胶质母细胞瘤体内实验却显示:高表达 DLL4 能促进肿瘤的生长。小鼠肉瘤细胞株 S180 植入 DLL4 + / - 小鼠的研究提示低表达的 DLL4 能促进无功能新生血管的生成<sup>[6]</sup>。在野生型小鼠中用 Notch 和 DLL4 通路阻滞剂也能观察到相似的现象<sup>[6,10-11]</sup>。这些研究也都显示阻断 DLL4-Notch 通路能抑制肿瘤的生长。阻断 DLL4 通路有多种方法,均获得了较好的效果<sup>[6,10-11]</sup>。阻断 DLL4 能增加新生血管数量,然而这些新生的血管输送血氧能力较弱,导致肿瘤供血供氧不足,生长缓慢。特异的 DLL4 阻滞剂加剧了瘤内缺氧,对瘤周细胞的血氧供应也明显减少<sup>[6,17]</sup>,促进了肿瘤坏死<sup>[6,10]</sup>。与其他药物(γ 分泌酶抑制剂)相比,其他药物在某些器官(如肠)肿瘤的治疗中有较强的不良反应,而抗 DLL4 药物却只有较少的不良反应<sup>[11]</sup>。

虽然抗 VEGF 和抗 DLL4 治疗都能延缓肿瘤的生长,抗 DLL4 治疗除了能增加新生血管数目外,对肿瘤血管微环境也有重要作用<sup>[24]</sup>,能减少肿瘤血管微环境中的成熟血管构筑,减少肿瘤的血液灌注<sup>[28]</sup>。抗 DLL4 治疗可能会抑制血管基底膜的形成和血管周边细胞的聚集。基底膜的缺失与肿瘤细胞的生物学行为有重要的关系。然而,一旦停止抗 DLL4 治疗,肿瘤将发生何种改变,仍需行进一步研究。

单一药物的血管分子靶向治疗(如抗 VEGF)往往会由于肿瘤的耐受性增强而导致耐药。研究发现对于抗 VEGF 耐药的肿瘤采用抗 DLL4 治疗获得了较好的效果<sup>[10]</sup>。抗 DLL4 药物与抗 VEGF 药物联用有协同作用。当联用抗 VEGF 和抗 DLL4 时,肿瘤没有出现耐药现象<sup>[11]</sup>。虽然这些数据很激动人心,但是仍需要进一步研究以制定联用药物的种类、用量,和合适的疗程。抗 DLL4 治疗也可与其他抗血管或常规肿瘤化疗药物联合使用。采用抗 DLL4 药物与其他药物联用的"鸡尾酒疗法"有望于不仅能使每一种药物的用量减少,还能减少不良反应。因为抗 DLL4 治疗能导致肿瘤缺氧,肿瘤细胞在缺氧状态下对化疗更敏感,增加化疗的敏感性。

#### 4 结 语

近年来,抗肿瘤血管治疗联合常规化疗和放疗在肿瘤的综合治疗中已经逐渐普及。然而,可用的抗肿瘤血管治疗靶点却很有限。DLL4-Notch 通路参与了肿瘤新生血管的生成,提供了抗肿瘤血管治疗的新靶点。近年的研究显示,抗 DLL4 治疗能通过增加无功能血管数量来延缓肿瘤的生长。但是抗 DLL4 治疗作用于内皮细胞和血管周边细胞的机制如何、其治疗的药代动力学如何、停用抗 DLL4 药物后肿瘤将发生何种改变等一系列问题仍有待于进一步研究。总之, DLL4 有可能成为继 VEGF 后肿瘤血管分子靶向治疗的重要靶点。抗 DLL4 治疗是一种很有前景的抗肿瘤血管治疗方式<sup>[28]</sup>。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target[ J ]. *Nature*, 2005, 438( 7070 ): 967-974.
- [ 2 ] Ton NC, Jayson GC. Resistance to anti-VEGF agents[ J ]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10( 1 ): 51-64.
- [ 3 ] Suchting S, Freitas C, le Noble F, *et al.* The Notch ligand delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104( 9 ): 3225-3230.
- [ 4 ] Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries[ J ]. *Nature*, 2007, 445( 7129 ): 781-784.
- [ 5 ] Seehnet JS, Jiang W, Kumar SR, *et al.* Inhibition of DLL4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion[ J ]. *Blood*, 2007, 109( 11 ): 4753-4760.
- [ 6 ] Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, *et al.* Delta-like ligand 4 ( DLL4 ) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting[ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104( 9 ): 3219-3224.
- [ 7 ] Leslie JD, Ariza-McNaughton L, Bermange AL, *et al.* Endothelial signalling by the notch ligand delta-like 4 restricts angiogenesis [ J ]. *Development*, 2007, 134( 5 ): 839-844.
- [ 8 ] Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, *et al.* DLL4 signalling through notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis [ J ]. *Nature*, 2007, 445( 7129 ): 776-780.
- [ 9 ] Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, *et al.* Blockade of DLL4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis[ J ]. *Nature*, 2006, 444( 7122 ): 1032-1037.
- [ 10 ] Ridgway J, Zhang G, Wu Y, *et al.* Inhibition of DLL4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis[ J ]. *Nature*, 2006, 444( 7122 ): 1083-1087.
- [ 11 ] Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex[ J ]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7( 9 ): 678-689.
- [ 12 ] Karsan A. The role of notch in modeling and maintaining the vasculature[ J ]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005, 83( 1 ): 14-23.
- [ 13 ] Fischer A, Schumacher N, Maier M, *et al.* The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development [ J ]. *Genes Dev*, 2004, 18( 8 ): 901-911.
- [ 14 ] Ikeuchi T, Sisodia SS. The notch ligands, delta1 and Jagged2, are substrates for presenilin-dependent " gamma-secretase " cleavage [ J ]. *J Biol Chem*, 2003, 278( 10 ): 7751-7754.
- [ 15 ] Benedito R, Duarte A. Expression of DLL4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles[ J ]. *Gene Expr Patterns*, 2005, 5( 6 ): 750-755.
- [ 16 ] Patel NS, Dobbie MS, Rochester M, *et al.* Up-regulation of endothelial delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer[ J ]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12( 16 ): 4836-4844.
- [ 17 ] Patel NS, Li JL, Generali D, *et al.* Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function[ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 19 ): 8690-8697.
- [ 18 ] Williams CK, Li JL, Murga M, *et al.* Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function [ J ]. *Blood*, 2006, 107( 3 ): 931-939.
- [ 19 ] Harris AL. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth[ J ]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2( 1 ): 38-47.
- [ 20 ] Diez H, Fischer A, Winkler A, *et al.* Hypoxia-mediated activation of DLL4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate[ J ]. *Exp Cell Res*, 2007, 313( 1 ): 1-9.
- [ 21 ] Seo S, Fujita H, Nakano A, *et al.* The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development[ J ]. *Dev Biol* 2006, 294( 2 ): 458-470.
- [ 22 ] Duarte A, Hirashima M, Benedito R, *et al.* Dosage-sensitive requirement for mouse DLL4 in artery development[ J ]. *Genes Dev*, 2004, 18( 20 ): 2474-2478.
- [ 23 ] Sainson RC, Aoto J, Nakatsu MN, *et al.* Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis[ J ]. *FASEB J*, 2005, 19( 8 ): 1027-1029.
- [ 24 ] Nikolova G, Strlic B, Lammert E. The vascular niche and its basement membrane[ J ]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17( 1 ): 19-25.
- [ 25 ] Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms[ J ]. *Oncogene*, 2008, 27( 38 ): 5132-5137.
- [ 26 ] Harrington LS, Sainson RC, Williams CK, *et al.* Regulation of multiple angiogenic pathways by DLL4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells[ J ]. *Microvasc Res*, 2008, 75( 2 ): 144-154.
- [ 27 ] Trindade A, Kumar SR, Seehnet JS, *et al.* Overexpression of delta-like 4 induces arterIALIZATION and attenuates vessel formation in developing mouse embryos[ J ]. *Blood*, 2008, 112( 5 ): 1720-1729.
- [ 28 ] Segarra M, Williams CK, Sierra Mde L, *et al.* DLL4 activation of Notch signaling reduces tumor vascularity and inhibits tumor growth [ J ]. *Blood*, 2008, 112( 5 ): 1904-1911.

[ 收稿日期 ] 2008 - 08 - 08

[ 修回日期 ] 2008-12-01

[ 本文编辑 ] 王莹