

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.05.024

新型肿瘤血管生成抑制剂 hexastatin 的研究进展

Advances of a new inhibitor of tumor angiogenesis: hexastatin

温 镭, 贺 欣, 赵启仁 综述, 宋娜玲* 审阅(中国医学科学院 北京协和医学院 放射医学研究所, 天津 300192)

[摘要] 肿瘤的生长和转移离不开新生血管的形成。Hexastatin 是一种新型的肿瘤血管生成抑制剂, 它来源于细胞外基质, 是IV型胶原蛋白 $\alpha 6$ 链的非胶原区 NC1, 相对分子质量为 25 000。Hexastatin 的分布具有明显的组织特异性。Hexastatin 可以通过一种 RGD 非依赖方式与整合素分子 $\alpha_v \beta_3$ 结合, 调节内皮细胞的黏附和迁移, 并且剂量依赖性地抑制内皮细胞的增殖, 对抑制血管生成起到显著的作用。Hexastatin 能抑制80% ~ 90% 的经 bFGF 刺激的鸡胚绒毛膜血管的生成, 抑制 90% 的人脐静脉内皮细胞的迁移, Hexastatin 还能有力地(大约 60%)抑制 CS1 黑素瘤细胞的生长。在已建立的肿瘤小鼠模型中, Hexastatin 能抑制小鼠肺癌移植瘤生长。在癌细胞浸润过程中, $\alpha 6$ (IV) 链经常会在癌细胞巢穴周围的基底膜区域中缺失, 使得 Hexastatin 在癌组织中含量下调, 从而成为诊断肿瘤浸润的重要指标。Hexastatin 作为新型的肿瘤血管生成抑制剂在肿瘤的防治中具有重要的研究和应用前景。

[关键词] Hexastatin; 血管生成抑制剂; 内皮细胞; 肿瘤生物治疗

[中图分类号] R979.1; R730.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)05-0537-04

血管发生对于生物体内很多正常的生理过程来说是至关重要的, 它是从已有的血管中形成新生的管道。同样, 各种病理现象的产生和发展, 如糖尿病视网膜病变、风湿性关节炎以及肿瘤的生长和转移等, 也与血管发生有着重要的联系^[1-4]。研究^[5-8]发现血管发生过程的开启是由上调血管产生的刺激因子及下调血管形成的抑制因子共同作用的结果。通常情况下, 人体内存在一个血管生成的屏障, 血管发生的诱导过程是受到抑制的, 而当需要产生新生血管时, 这个屏障便被破坏, 诱导过程刺激产生新的血管。早在 1971 年, Folkman^[9]便提出肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的生成, 氧气从血管中扩散的最大限值是 150 μm , 如果阻断了血流, 肿瘤细胞便因为从血管中得不到赖以生存的氧气及营养而发生凋亡。此学说的提出为肿瘤的生物治疗提供了新的方法, 寻找内源性的血管生成抑制因子逐渐成为研究的热点。

细胞外基质是血管外周组织的主要成分, 它对胚胎形成、组织修复、伤口愈合、新生血管生成及肿瘤入侵都起着重要的作用。有研究^[10]表明, 细胞外基质形态的改变对新生血管形成和迁移的速度起着调控作用。近些年的研究^[11]陆续发现了一系列内源性血管生成抑制因子, 它们大多是细胞外基质中大分子蛋白的片段, 其中有一大类来源于胶原蛋白, 被称为胶原来源的抗血管生成因子(collagen-derived antiangiogenesis factors, CDAFs)。诸如源于VIII型胶原的内皮抑素(endostatin), 源于V型胶原的休眠蛋白(restin), 以及源于IV型胶原的arresten[$\alpha 1$ (IV)NC1]、血管能抑素(canstatin)[$\alpha 2$ (IV)NC1]和肿瘤抑素(tumstatin)($\alpha 3$ (IV)NC1)等。本文中介绍的 hexastatin[$\alpha 6$ (IV)NC1]同样

来源于IV型胶原, 研究表明它也是一种强有力的新生血管生成和肿瘤生长的抑制剂。

1 Hexastatin 的命名、结构及分布

1.1 Hexastatin 的命名

Hexastatin 早在 1993 年便由 Zhou 等^[12]首先克隆发现, 它是IV型胶原蛋白 $\alpha 1$ - $\alpha 6$ 链中 $\alpha 6$ 链的一部分。人们对IV型胶原蛋白的各条链都进行了结构、生物活性等方面的研究, 但是早期研究的热点主要集中在 $\alpha 1$ (IV)、 $\alpha 2$ (IV)和 $\alpha 3$ (IV)链上, 并陆续提出这些链的 NC1 区结构域具有抑制新生血管生成和肿瘤生长的活性, 分别将它们命名为 arresten、canstatin 和 tumstatin, 而对于 $\alpha 6$ (IV)链活性的研究相对较少。Karagianis^[13]和 Mundel 等^[14]先后明确指出 $\alpha 6$ (IV)NC1 同样具有抑制新生血管生成和肿瘤生长的活性, 并将其命名为 hexastatin。

1.2 Hexastatin 的结构

血管基底膜的组装依赖于IV型胶原蛋白网络的聚集。编码IV型胶原蛋白的共有 6 种不同的基因。这些基因以头-头相连的方式在 3 种不同的染色体上成对排列。其中 COL4A1 和 COL4A2 位于染色体 13q34 上, COL4A3 和 COL4A4 位于染色体 2q36 上, 而 COL4A5 和 COL4A6 位于性染色体 Xq22 上^[15]。COL4A6 表达

[基金项目] 天津市自然科学基金资助项目(No.043610211)。Supported by the National Natural Science Foundation of Tianjin (No.043610211)

[作者简介] 温镭(1984-), 女, 四川乐山人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤新生血管生成抑制剂的分子生物学研究

* 通信作者(Corresponding author)。E-mail: naling702000@yahoo.com.cn

的 $\alpha 6$ 链单体由3个区域组成:含21个氨基酸残基的N端7S区信号肽,1417个氨基酸的中间胶原区以及228个氨基酸的C端非胶原区NC1。Hexastatin便是 $\alpha 6$ (IV)链的非胶原区NC1,它的相对分子质量约为25000。通过与IV型胶原蛋白的其它链进行同源性比对后发现,Hexastatin与 $\alpha 2$ (IV)NC1及 $\alpha 4$ (IV)NC1最具有相似性。另外,Zhou等^[16]指出 $\alpha 6$ (IV)链在第427、515、516、558、945和1097位氨基酸的位置,分别存在1个RGD、2个GRD及3个GDR序列,它们都很可能是细胞结合位点。

1.3 Hexastatin 的分布

基底膜是由细胞外基质分子所形成的特殊网络,它对多细胞动物的发育起着重要作用。除了能提供结构支持,还具有调节细胞活动的作用。Hexastatin不像 $\alpha 1$ (IV)和 $\alpha 2$ (IV)链分布那样广泛,后者几乎出现在所有组织的基底膜中,Hexastatin多与 $\alpha 5$ (IV)链形成 $[\alpha 5$ (IV)]₂ $\alpha 6$ (IV)三聚体,分布具有组织特异性。它主要分布在乳腺管及小叶基膜、皮肤表皮及皮肤附属物基膜、前列腺基膜、平滑肌细胞、膀胱上皮基膜以及消化道上皮基膜中^[17-21]。在正常人肾组织中,Hexastatin的分布局限在某些部位,它不存在于肾小球基底膜中,而存在肾鲍氏囊基底膜中。而有趣的是 $\alpha 5$ (IV)链却在肾小球基底膜中含量丰富,这表明了hexastatin和 $\alpha 5$ (IV)链并不一定在所有组织中共同表达^[22]。

2 Hexastatin 的生物活性

2.1 抑制血管生成

内皮细胞的增殖和迁移对于新生血管的形成是至关重要的。增殖细胞表面受体整合素分子 $\alpha_v\beta_3$ 已在很多动物模型中被证实能调节新生血管生成,内皮细胞与特殊的 $\alpha_v\beta_3$ 结合位点之间的相互作用,对于体内的血管生成起到了调节作用。Petitclerc等^[23]指出hexastatin不是靠典型的RGD三肽结构与 $\alpha_v\beta_3$ 相识别,而是借助一种RGD非依赖的 $\alpha_v\beta_3$ 结合位点。Hexastatin能通过特殊的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素依赖途径,调节内皮细胞的黏附和迁移,起到显著的抑制血管生成的作用。Petitclerc在研究中用bFGF刺激鸡胚绒毛膜的血管生成,24h后注入一定量的重组hexastatin蛋白,结果发现hexastatin能抑制80%~90%的血管形成。Karagiannis等^[13]在研究hexastatin对人脐静脉内皮细胞迁移的影响中发现,相比加入VEGF的对照组,Hexastatin能抑制90%的细胞迁移,并且其活性呈现出双阶段的效应,在一个中间浓度时hexastatin的活性最高,以后随着浓度的升高,活性又逐渐降低。同样,在血管生成的过程中,内皮细胞的增殖也被认为是新生血管形成所必须的。Mundel等^[14]发现,Hexastatin能剂量依赖性

地抑制内皮细胞的增殖,其抑制经10%血清刺激的小牛肺动脉内皮细胞的半数有效剂量(ED₅₀)为5 μ g/ml,人脐静脉内皮细胞的增殖也能被剂量依赖性抑制。另外,在正常C57Bl/6小鼠中进行的Matrigel栓子试验中,在bFGF存在的情况下,浓度为1mg/kg的hexastatin使得血管的数量减少了50%。

2.2 抑制肿瘤生长和转移

在对hexastatin抑制实体瘤生长的研究中,Petitclerc^[23]等将CS1黑素瘤的单细胞悬液引入鸡胚绒毛膜,24h后注入hexastatin,结果发现hexastatin能有力地(大约60%)抑制CS1黑素瘤细胞的生长。在已建立的肿瘤小鼠模型中,相比安慰剂而言,Hexastatin能抑制小鼠肺癌移植瘤生长,这种肿瘤生长的抑制效应与肿瘤组织中微血管密度的显著减少是相关的^[14]。另外,研究^[24-27]发现在癌细胞浸润过程中, $\alpha 6$ (IV)经常会在癌细胞巢穴周围的基底膜区域中缺失,而 $\alpha 6$ (IV)阴性的肿瘤患者比 $\alpha 6$ (IV)阳性患者的无瘤存活期及总存活期显著地缩短。Baba等^[24]指出,在胃黏膜下肿瘤中, $\alpha 6$ (IV)与 $\alpha 5$ (IV)链的表达水平与肿瘤组织学上的非典型等级密切相关, $\alpha 6$ (IV)与 $\alpha 5$ (IV)链的缺失与肿瘤细胞的生长活性存在重要的联系,可以作为胃黏膜下肿瘤发生癌变的诊断指标。另外,研究^[25]发现 $\alpha 6$ (IV)与 $\alpha 5$ (IV)链还可能作为判断食管鳞状上皮细胞癌患者肿瘤特征的有用指标,起到提前预警的作用。实验采用siRNA的方法,从转录水平下调了食管癌TE13中 $\alpha 6$ (IV)的表达量,结果发现肿瘤细胞的浸润量相比对照组有少量但不可忽略的增加。Skovbjerg等^[28]在研究中发现, $\alpha 6$ (IV)在结肠癌组织中的mRNA含量相比正常组织减少了5倍,并认为 $\alpha 6$ (IV)含量的下调可能是肿瘤组织获得浸润性的重要因素。

3 Hexastatin 的作用机制

Hexastatin的抗瘤活性部分是依赖其抗血管生成活性而完成的,然而有报道^[25]称hexastatin也能直接作用于肿瘤细胞上,阻断肿瘤细胞中NC1区的相互作用。目前对hexastatin作用机制的研究在不断深入,已知的主要有以下几方面:(1)Hexastatin通过RGD非依赖方式与细胞表面受体整合素分子 $\alpha_v\beta_3$ 结合发挥作用。整合素家族细胞表面受体主要介导细胞与细胞、细胞与胞外基质之间的相互黏附,并介导细胞与胞外基质之间的双向信号转导,对细胞的黏附、增殖、分化、转移和凋亡起着重要的调控作用。在血管生成阶段,内皮细胞必须互相黏附并与胞外基质黏附以构成并扩充新生微血管,其间整合素分子起着重要的桥梁作用。Hexastatin与整合素分子的结合可中断内皮细胞或肿

瘤细胞与基底膜之间的信息联系,引起内皮细胞或肿瘤细胞的凋亡,从而抑制新生血管的形成。有研究^[29-31]表明,肿瘤抑素[$\alpha 3(IV)NC1$]与 $\alpha_2\beta_3$ 的结合可抑制FAK、PI3K、PKB/AKT信号通路的活化,Hexastatin是否也通过类似的分子机制发挥作用,目前仍需要实验证实。(2)基底膜的屏障作用。基底膜能作为一个阻挡上皮癌细胞入侵的生理屏障,基底膜结构的破坏被认为是癌细胞入侵和转移的第一步。在基底膜结构中含有 $\alpha 5(IV)/\alpha 6(IV)$ 链,它们在癌细胞巢穴周围形成了一个生理屏障,阻挡癌细胞的浸润。由于 $\alpha 5(IV)/\alpha 6(IV)$ 链被认为与基底膜的机械压力及张力密切相关,具有稳定基底膜结构中IV型胶原网络的作用,因此, $\alpha 6(IV)$ 链的缺失使得基底膜成为了不稳定的屏障,从而导致癌细胞的早期浸润^[24-25]。至于 $\alpha 6(IV)$ 链在癌细胞巢穴周围基底膜中缺失的具体机制,现在仍无定论,有研究^[26]指出其基因启动子区域的超甲基化是导致 $\alpha 6(IV)$ 链丢失,进而引起癌细胞浸润中基底膜重塑的重要原因,也有研究认为这是癌细胞调节作用的结果。

4 Hexastatin 的应用前景

Folkman^[9]早在1971年便提出了实体瘤的抗血管疗法,通过抑制肿瘤新生血管生成,使肿瘤细胞因缺血、缺氧而大部分死亡。近些年来,人们将研究的热点集中在寻找安全有效的血管生成抑制剂上,成效也很突出,先后发现了内皮抑素、arresten、血管能抑素和肿瘤抑素等多种胶原来源的血管抑制剂,其中内皮抑素率先通过了临床研究,并于2005年9月12日在我国获准上市。Hexastatin作为IV型胶原的 $\alpha 6$ 链的NC1区,同样已被研究证实具有抑制新生血管生成和抗肿瘤的活性。由于 $\alpha 6$ 链在多种实体瘤浸润早期都出现了丢失的情况,这使得有关研究较少,目前仍有许多需要进一步探究的问题,诸如其是否也像肿瘤抑素一样存在多个活性域,其抑制血管生成的具体分子机制是什么,以及它与其它同源的血管生成抑制剂活性大小有何差异等。相信随着研究的深入,人们会一步步揭开hexastatin的神秘面纱,为肿瘤的抗血管疗法提供新途径。

[参考文献]

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease [J]. Nat Med, 1995, 1(1): 27-31.
- [2] Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases [J]. Semin Oncol, 2001, 28(6): 536-542.
- [3] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 407(6801): 249-257.
- [4] Jain RK, Carmeliet PF. Vessels of death or life [J]. Sci Am, 2001, 285(6): 38-45.
- [5] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000, 100(1): 57-70.
- [6] Volpert OV, Pili R, Sikder HA, et al. Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1 [J]. Cancer Cell, 2002, 2(6): 473-483.
- [7] Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 401-410.
- [8] Mundel TM, Kalluri R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors [J]. Microvasc Res, 2007, 74(2-3): 85-89.
- [9] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [10] Bauer AL, Jackson TL, Jiang Y. Topography of extracellular matrix mediates vascular morphogenesis and migration speeds in angiogenesis [J]. PLoS Comput Biol, 2009, 5(7): e1000445.
- [11] Assadian S, Teodoro JG. Regulation of collagen-derived antiangiogenic factors by p53 [J]. Expert Opin Biol Ther, 2008, 8(7): 941-950.
- [12] Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, et al. Deletion of the paired $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$ collagen genes in inherited smooth muscle tumors [J]. Science, 1993, 261(5125): 1167-1169.
- [13] Karagiannis ED, Popel AS. Identification of novel short peptides derived from the $\alpha 4$, $\alpha 5$, and $\alpha 6$ fibrils of type IV collagen with anti-angiogenic properties [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(2): 434-439.
- [14] Mundel TM, Yliniemi AM, Maeshima Y, et al. Type IV collagen $\alpha 6$ chain-derived noncollagenous domain 1 ($\alpha 6(IV)NC1$) inhibits angiogenesis and tumor growth [J]. Int J Cancer, 2008, 122(8): 1738-1744.
- [15] Sugimoto M, Oohashi T, Ninomia Y. The genes COL4A5 and COL4A6, coding for the basement membrane collagen chains $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$, are located head-to-head in close proximity on human chromosome Xq22 and COL4A6 is transcribed from two alternative promoters [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(24): 11679-11683.
- [16] Zhou J, Ding M, Zhao ZH, et al. Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, $\alpha 6(IV)$. Isolation of the cDNAs for $\alpha 6(IV)$ and comparison with five other type IV collagen chains [J]. J Biol Chem, 1994, 269(18): 13193-13199.
- [17] Simoneau A, Herring-Gillam FE, Vachon PH, et al. Identification, distribution, and tissular origin of the $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$ collagen chains in the developing human intestine [J]. Dev Dyn, 1998, 212(3): 437-447.
- [18] Borza DB, Bondar O, Ninomiya Y, et al. The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, and $\alpha 6$ chains in smooth muscle basement membranes [J]. J Biol Chem, 2001, 276(30): 28532-28540.
- [19] Sato H, Naito I, Momota R, et al. The differential distribution of type IV collagen α chains in the subepithelial basement membrane of the human alimentary canal [J]. Arch Histol Cytol, 2007, 70(5): 313-323.
- [20] Hasegawa H, Naito I, Nakano K, et al. The distributions of type

- IV collagen α chains in basement membranes of human epidermis and skin appendages [J]. Arch Histol Cytol, 2007, 70(4): 255-265.
- [21] Oka Y, Naito I, Manabe K, *et al.* Collagen type IV and human colorectal cancer. Distribution of collagen type IV α 1-6 chains in human normal colorectum and colorectal cancer demonstrated by immunofluorescence staining using chain-specific epitope-defined monoclonal antibodies [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2002, 17(9): 980-986.
- [22] Peissel B, Geng L, Kalluri R, *et al.* Comparative distribution of the α 1(IV), α 5(IV), and α 6(IV) collagen chains in normal human adult and fetal tissues and in kidneys from X-linked alport syndrome patients [J]. J Clin Invest, 1995, 96(4): 1948-1957.
- [23] Petitclerc E, Boutaud A, Prestayko A, *et al.* New functions for non-collagenous domains of human collagen: type IV novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth *in vivo* [J]. J Biol Chem, 2000, 275(11): 8051-8061.
- [24] Baba Y, Iyama K, Ikeda K, *et al.* Differential expression of basement membrane type IV collagen α chains in gastric intramucosal neoplastic lesions [J]. J Gastroenterol, 2007, 42(11): 874-880.
- [25] Baba Y, Iyama K, Ikeda K, *et al.* The expression of type IV collagen α 6 chain is related to the prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15(2): 555-565.
- [26] Ikeda K, Iyama K, Ishikawa N, *et al.* Loss of expression of type IV collagen α 5 and α 6 chains in colorectal cancer associated with the hypermethylation of their promoter region [J]. Am J Pathol, 2006, 168(3): 856-865.
- [27] Misumi S, Iyama K, Honda Y, *et al.* Differential expression of basement membrane type IV collagen α 1, α 2, α 5 and α 6 chains among the histological subtypes of adenoid cystic carcinoma [J]. Virchows Arch, 2004, 445(1): 54-62.
- [28] Skovbjerg H, Anthonsen D, Lothe IM, *et al.* Collagen mRNA levels changes during colorectal cancer carcinogenesis [J]. BMC Cancer, 2009, 9: 136.
- [29] Pasco S, Monboisse JC, Kieffer N. The alpha 3(IV)185-206 peptide from non collagenous domain 1 of type IV collagen interacts with a novel binding site on the beta 3 subunit of integrin alphaV-beta₃ and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation [J]. J Biol Chem, 2000, 275(42): 32999-33007.
- [30] Maeshima Y, Sudhakar A, Lively JC, *et al.* Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis [J]. Science, 2002, 295(5552): 140-143.
- [31] Cooke VG, Kalluri R. Molecular mechanism of type IV collagen-derived endogenous inhibitors of angiogenesis [J]. Methods Enzymol, 2008, 444: 1-19.
- [收稿日期] 2009-05-30 [修回日期] 2009-08-19
[本文编辑] 韩丹

· 简讯 ·

国际癌症生物治疗学会主席 Bernard A. Fox 教授参观我刊编辑部

2009年10月14日,肿瘤免疫治疗领域著名专家、国际癌症生物治疗学会(International Society for the Biological Therapy of Cancer, iSBTC)主席、美国俄勒冈州健康科学大学医学中心 Bernard A. Fox 教授造访第二军医大学免疫学研究所和《中国肿瘤生物治疗杂志》编辑部,并为第二军医大学师生做了一场题为“Composition immunotherapy of translational and preclinical strategies into patients with cancer”的学术演讲。

Bernard A. Fox 教授除担任国际癌症生物治疗学会主席一职,目前还是 *Cellular Immunology*、*Current Molecular Medicine*、*Expert Opinion on Biological Therapy* 和 *Journal of Immunotherapy* 等多个杂志的编委。Bernard A. Fox 教授一直致力于肿瘤免疫治疗的基础和临床研究,着力促进肿瘤免疫治疗基础研究成果向临床的转化。本次中国之行,旨在推动肿瘤生物治疗领域的国际交流和合作。讲座中, Bernard A. Fox 教授结合他们实验室最近的科研工作,介绍了肿瘤免疫治疗的概况和最新进展,其严谨的实验设计、充分详实的数据、生动精彩的讲演给在场师生留下了深刻的印象。

在《中国肿瘤生物治疗杂志》主编曹雪涛院士陪同下, Bernard A. Fox 教授参观了杂志编辑部,并与编辑部全体人员合影。编辑部向 Fox 教授介绍了近年来杂志坚持专家办刊、强化学术创新、努力向精品期刊迈进的奋斗历程和丰硕成果。本刊作为中国肿瘤生物治疗领域唯一的高级学术刊物,目前已成为反映中国肿瘤生物治疗创新成果的重要窗口、促进广大肿瘤防治工作者学术交流的重要平台。Bernard A. Fox 教授对本刊在中国肿瘤生物治疗领域做出的贡献和取得的成绩表示赞许,肯定了编辑部在期刊质量建设和数字化发展方面的工作;鼓励我刊积极开展国际交流,不断提升在肿瘤生物治疗领域的学术地位和国际影响力。此外, Bernard A. Fox 教授还与编辑部成员探讨了肿瘤生物治疗领域的前沿和进展,以及肿瘤学专业期刊的发展方向,希望今后进一步加强中国期刊与国际癌症生物治疗学会的交流与合作。

(本刊编辑部)