

- [6] Yazici Z, Yazici B, Parlak M, et al. Treatment of nasolacrimal duct obstruction with polyurethane stent placement: long-term results. [J]. AJR, 2002, 179(2): 491-494.
- [7] Janessen AG, Mansour K, Bos JJ, et al. Abscess of the lacrimal sac due to chronic or subacute dacryocystitis: treatment with temporary stent placement in the nasolacrimal duct [J]. Radiology, 2000, 215(1): 300-304.
- [8] Pulido-Duque JM, Reyes R, Carreira JM, et al. Treatment of complete and partial obstruction of the nasolacrimal system with polyurethane stents: initial experience [J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 1998, 21(1): 41-44.
- [9] Zhang ZH, Xiao MY. Success with stents puts epiphora cure in sight [J]. Diagnostic Imaging Asia Pacific, 2000, 6(1): 29-31.
- [10] Pinto IT, Paul L, Grande C. Nasolacrimal polyurethane stent: complications with CT correlation [J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 1998, 21(6): 450-453.
- [11] Yazici B, Yazici Z, Parlak M. Treatment of nasolacrimal duct obstruction in adults with polyurethane stent [J]. Am J Ophthalmol, 2001, 131(1): 37-43.
- [12] Paul L, Pinto I, Vicente JM, et al. Nasolacrimal stents in the treatment of epiphora: long-term results [J]. J Vasc Interv Radiol, 2002, 13(1): 83-88.
- [13] 杨家学, 王志学, 李西梅. 鼻泪管阻塞的介入治疗(附 12 例报告) [J]. 实用放射学杂志, 2002, 18(10): 898-899.
- [14] Lanciego C, De Miguel S, Perea M, et al. Nasolacrimal stents in the management of epiphora: medium-term results of a multicenter prospective study [J]. J Vasc Interv Radiol, 2001, 12(6): 701-710.
- [15] Perena MF, Castillo J, Medrano J, et al. Nasolacrimal polyurethane stent placement: preliminary results [J]. Eur J Ophthalmol, 2001, 11(1): 25-30.
- [16] Pabon IP, Diaz LP, Grande C, et al. Nasolacrimal polyurethane stent placement for epiphora: technical long-term results [J]. J Vasc Interv Radiol, 2001, 12(1): 67-71.
- [17] Kuchar A, Steinkogler FJ. Antegrade balloon dilatation of nasolacrimal duct obstruction in adults [J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(2): 200-204.
- [18] Chiesi C, Guerra R, Longanesi L, et al. Congenital nasolacrimal duct obstruction: therapeutic management [J]. J Pediatr Ophthalmol Strabismus, 1999, 36(6): 326-330.
- [19] Schaudig U, Maas R. The polyurethane nasolacrimal duct stent for lower tear duct obstruction: long-term success rate and complications [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2000, 238(9): 733-737.
- [20] Lueder GT. Treatment of nasolacrimal duct obstruction in children with trisomy 21 [J]. J AAPOS, 2000, 4(4): 230-232.

(2003-06-10 收稿)

内皮抑制素的研究进展

• 综述 •

钱银锋 综述 余永强 审核

【中图分类号】R730.5 【文献标识码】A 【文章编号】1000-0313(2003)11-0847-03

传统的肿瘤治疗手段主要是针对肿瘤实质细胞进行杀灭,但疗效并不令人满意,手术一般难以彻底清除肿瘤,而放疗及化疗由于受到对人体毒性的限制,再加上可诱导抗药性的产生,因此大多数肿瘤疗效较差,病死率高。自从十九世纪七十年代 Folkman 通过试验证实实体瘤及其转移物的生长、维持需要新的血管生成以来,肿瘤血管生成在肿瘤治疗中的作用逐渐突出,寻找高效低毒的血管生成抑制因子便成为肿瘤研究的热点之一。直到 1990 年 Folkman 等才成功合成了高效低毒的 α -烟曲霉醇(简称 TNP-470),但随着剂量的加大,其表现出一定的神经毒性。1997 年 Ó Reilly 等^[1]发现了内皮抑制素(endostatin, ES),从而显示了血管生成抑制剂在临床应用的美好前景。

内皮抑制素的结构

Ó Reilly 等^[1]发现鼠内皮细胞瘤细胞的条件培养液具有血管内皮细胞增殖抑制作用,将该培养液过赖氨酸葡聚柱后,其

抑制活性并不存在于结合物质,而在流穿部分中,表明该抑制活性不是由血管抑制素(angiotatin)引起。将该活性物质纯化到单一电泳纯后,得到一种新的蛋白质,相对分子量为 22kD,能特异抑制内皮细胞的增殖和血管生成,被命名为内皮抑制素(endostatin)。序列分析发现其与胶原 XVIII 的 G-末端具有相同的氨基酸序列^[2],正常人体内含有的内皮抑制素只是作为胶原的一部分存在于血管中。肝脏是重要的胶原 XVIII 的产生器官^[3],编码胶原 XVIII 的基因位于人的 21 号染色体,在小鼠则位于第 10 号染色体。胶原 XVIII 有二种存在形式,一种 N 端区域为 303 个氨基酸,另一种为 493 个氨基酸残基,分别为基底膜存在形式及血浆存在形式^[4]。胶原 XVIII 的 G-末端即是稳定的内皮抑制素区域,胶原通过水解作用释放出有活性的内皮抑制素。内皮抑制素含 183 个氨基酸残基,内部的两个二硫键使其形成高度折叠的紧密结构,其表面有一富含精氨酸区域的肝素结合位点,后者可拮抗血管生长因子结合肝素的能力^[5]。内皮抑制素单体通过非邻近的氨基酸残基可结合一个 Zn^{2+} 离子,这一位点的存在对内皮抑制素的活性具有重要作用,但也有作者持相反观点。

内皮抑制素对内皮细胞和血管生成的抑制作用

内皮抑制素对血管内皮细胞的增殖有特异的抑制作用,使

* 安徽省教育厅科研基金资助课题(2001-kj137)
作者单位: 230022 合肥, 安徽医科大学第一附属医院放射科
作者简介: 钱银锋(1973~), 男, 安徽无为, 主治医师, 主要从事神经影像研究工作。

内皮细胞的增殖受阻于 G_1 期,而对非血管内皮细胞系细胞则无增殖抑制作用^[1],这种抑制作用在含血管形成促进因子——碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblastic growth factor, bFGF)时更为明显。Joki 等^[6]的研究表明内皮细胞的增殖可被内皮抑制素抑制 67.2%。内皮抑制素对内皮细胞的作用机制及其受体至今尚不十分清楚。对糖蛋白 G 和血小板因子 IV 的研究证明,它们的肝素结合区域与活性相关,提示可能与 bFGF 竞争其蛋白多糖受体,同样内皮抑制素也有很强的肝素亲和性^[5],提示其作用机制可能也是与 bFGF 竞争。支持这一假说的证据有:①内皮抑制素的血管内皮细胞抑制作用在有 bFGF 存在的情况下更为明显;②内皮抑制素的作用浓度为 100~300ng/ml^[7],符合竞争抑制所需要的高浓度;③在人乳腺癌组织中,内皮抑制素和 bFGF 的结合位点相一致^[8]。然而,也有一些研究证明,并非只有肝素结合区参与抑制活性的形成,这提示内皮抑制素作用机制的复杂性,有待进一步研究。

内皮抑制素的抗血管生成作用的另一方面是抑制内皮细胞的迁移。正常情况下,内皮细胞的迁移由血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)所诱导,而内皮抑制素通过诱导一氧化氮合成酶的 1177 位丝氨酸去磷酸化而抑制这一过程^[9]。此外,内皮抑制素能明显地减少抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-XL 的含量,但并不影响促凋亡蛋白 Bax 的水平,从而诱导内皮细胞凋亡^[10],Shb 受体蛋白也参与了这一过程。Rehm 等^[11]发现可溶性内皮抑制素能结合 α_v 和 α_5 整合素,从而抑制整合素的功能,而后者对内皮细胞的存活至关重要。

内皮抑制素通过抑制血管内皮细胞的增殖、迁移,并诱导其凋亡等作用特异性地抑制血管生成^[12]。O'Reilly 证实大肠杆菌生产的内皮抑制素及杆状病毒产生的重组内皮抑制素均有抑制鸡胚血管生成的作用^[1]。Blezniger 等^[13]发现,直接肌肉内注射内皮抑制素表达质粒可以降低肿瘤的血管形成 3 倍以上,可抑制 65% 的实验性角膜新生血管诱导生长。

内皮抑制素的抗肿瘤作用

动物实验研究表明内皮抑制素对原发性种植肿瘤具有抑制作用。O'Reilly 用重组的复性或非复性的内皮抑制素在小鼠中几乎完全抑制种植已达 100~200mm³ 大小的 Lewis 肺癌、T241 纤维肉瘤、Eoma 血管内皮细胞瘤、B16F10 黑色素瘤的生长,肿瘤消退至显微镜可见的休眠期。免疫组化证实肿瘤血管形成被阻断,肿瘤细胞的凋亡指数提高 7 倍。内皮抑制素的抗肿瘤作用具有广谱性,由于内皮细胞在肿瘤之间并无差异,因此内皮抑制素对实体瘤的抗肿瘤作用具有普遍意义,已有的研究表明,内皮抑制素对肺癌、肾细胞癌、黑色素瘤和胶质瘤等均有抑制作用。此外,内皮抑制素对转移瘤和肿瘤的远处转移同样具有抑制作用^[14,15]。血管的生长是肿瘤转移的重要条件,新生的血管为肿瘤细胞提供了离开原发灶进入血流的通道,而且转移瘤的生长同样依赖于血管生成,内皮抑制素通过抑制血管生成来抑制肿瘤的转移和转移瘤的生长。Blezniger 等^[13]对接种肾细胞癌 BALB/c 小鼠直接肌肉注射内皮抑制素的表达质粒,发现肺部转移瘤的数量明显减少,肺重量减少 32%。而且对已生

成的转移灶也有作用。

肿瘤对内皮抑制素没有抗药性^[7,16]。抗药性一直是癌症治疗中的一个主要问题,由于内皮细胞具遗传性、稳定性、同质性和低突变率的特点,因此抑制内皮细胞增殖的抗血管生成疗法是克服抗药性产生的一个有效方法。用内皮抑制素治疗小鼠 Lewis 肺癌后,肿瘤缩小,停止给药至肿瘤恢复到原来大小;再用内皮抑制素治疗,肿瘤再次缩小,如此 6 次循环治疗后,内皮抑制素治疗仍然有效。到目前为止,没有观察到内皮抑制素治疗期间肿瘤产生抗药性。内皮抑制素的另一个优点是没有剂量相关的毒性,患者能够忍受高达 300mg/m² 的剂量而未出现毒性反应^[17]。

内皮抑制素的抗肿瘤作用具有浓度和剂量依赖性。Black 等^[18]发现用内皮抑制素治疗小鼠肿瘤时,在治疗过程中肿瘤局部的内皮抑制素浓度进行性升高,一直到这个浓度足够抑制血管生成。推测其在低浓度时可能被沉积于细胞外基质中,从而使肿瘤局部的浓度提高 5~50 倍。吴景文等^[19]在小鼠皮下胶质瘤的内皮抑制素治疗研究中发现,5mg/kg/d、10mg/kg/d 和 20mg/kg/d 3 种剂量的肿瘤生长抑制率分别为 34.5%、76.1% 和 80.2%,O'Reilly 等^[1]也观察到相似的结果。这表明内皮抑制素的抗肿瘤作用具有剂量依赖性,但剂量达到一定程度后,抗肿瘤作用则无明显差异。

由于在肿瘤治疗中具有无可比拟的优点,内皮抑制素已进入 II 期临床实验。一组 25 例患者的初步研究结果表明,内皮抑制素能减少肿瘤的血流和代谢,活检发现肿瘤细胞和血管内皮细胞凋亡明显增加^[20],但对肿瘤的抑制作用明显小于临床前研究结果,表明内皮抑制素的临床应用尚需进一步研究。

内皮抑制素的给药方式

目前研究中使用的内皮抑制素主要有 2 种:重组人内皮抑制素和重组小鼠内皮抑制素,两者的同源性为 80%,这可能是各研究者报道的内皮抑制素抗肿瘤结果不完全一致的部分原因。无论是那一种内皮抑制素,其给药方式有 3 种^[20-22]:直接皮下注射、重组载体(质粒)肌肉注射和瘤内注射,但也有作者报道静脉内给药的方式^[18]。由于血管生成最丰富的区域为肿瘤的边缘区域,而瘤内的高压状态使注入瘤内的重组载体表达的内皮抑制素难以有效的扩散到肿瘤边缘,因此瘤内注射可能并非最佳选择。Blezniger 等^[13]给小鼠肌肉注射 240 μ g 的表达质粒,注射后第 3d,血循环中的内皮抑制素水平达 3 μ g/ml,第 7d 最高达 8 μ g/ml,至 14d 后降至 4 μ g/ml。但多数研究发现皮下注射的抑瘤效果优于重组载体注射,而且基因重组技术的临床应用尚有技术上的困难。

内皮抑制素研究中的几个问题

内皮抑制素的抗肿瘤作用已很明确,但尚有几个问题需要明确。①内皮抑制素对肿瘤血管的生成具有抑制作用,但其对正常的血管生成有无作用尚不肯定,能否识别和如何识别肿瘤性血管生成与正常血管生成尚需进一步研究。②肿瘤血管生成只是肿瘤的一个重要特征,抑制肿瘤血管生成只是治疗肿瘤

的手段之一,单纯应用血管生成抑制剂难以治愈肿瘤。Bello 等^[23]用血管生成抑制剂重组人基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和小剂量化疗药联合治疗鼠胶质瘤,肿瘤体积明显减小,疗效明显优于单独应用 MMP-2 或化疗,且无任何不良反应,其它研究亦有类似发现。内皮抑制素治疗如何与手术和放、化疗等治疗手段结合将是未来研究的重点。③血管生成抑制剂并不能治愈肿瘤,可以想象抗血管生成治疗将是长期的和终身的,长期、大剂量使用内皮抑制必将带来沉重的经济负担,如何提高生物技术以降低价格成为需要关注的问题。④功能性多肽性质不稳定,难以长期保存,可能需用外源性内皮抑制素基因转染宿主细胞从而在肿瘤周围产生高效内皮抑制素以治疗肿瘤,但这需要解决技术上的困难。⑤同样由于治疗的长期性,目前的给药方式都不易被接受,能否口服给药和如何长期保持药物性能也是有待解决的问题。

展望

内皮抑制素由于其特异性抑制内皮细胞增殖和肿瘤血管生成决定了它在肿瘤的临床治疗方面具有重要的作用和广阔的应用前景。到目前为止,还没有观察到它对机体的毒副作用,且不会出现抗药性,更重要的是它有效地抑制了肿瘤的转移和转移瘤的生长,与其它治疗手段的联合应用更能有效的抑制肿瘤。这些特点给肿瘤的临床治疗展示了美好的未来。随着对内皮抑制素研究的进展和有效治疗方案的确定,肿瘤的治疗将不再棘手,肿瘤患者的预后亦将得到明显改善。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, et al. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XVIII: comparison to endostatin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 255(3): 735-739.
- [3] Schuppan D, Cramer T, Bauer M, et al. Hepatocytes as a source of collagen type XVIII endostatin[J]. Lancet, 1998, 352(9131): 879-880.
- [4] Saarela J, Rehn M, Oikarinen A, et al. The short and long forms of type XVIII collagen show clear tissue specificities in their expression and location in basement membrane zones in humans[J]. Am J Pathol, 1998, 153(2): 611-626.
- [5] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364.
- [6] Joki T, Machluf M, Atala A, et al. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy[J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(1): 35-39.
- [7] Kisker O, Becker CM, Prox D, et al. Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model[J]. Cancer Res, 2001, 61(20): 7669-7674.

- [8] Chang Z, Choon A, Friedl A. Endostatin binds to blood vessels in situ independent of heparan sulfate and does not compete for fibroblast growth factor-2 binding[J]. Am J Pathol, 1999, 155(1): 71-76.
- [9] Urbich C, Reissner A, Chavakis E, et al. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin[J]. FASEB J, 2002, 16(7): 706-708.
- [10] Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 1721-1726.
- [11] Rehn M, Veikkola E, Konerding MA, et al. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 1999, 99(13): 1653-1655.
- [12] Moulton KS, Heller E, Konerding MA, et al. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Circulation, 1999, 99(13): 1653-1655.
- [13] 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): 343-348.
- [14] Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, et al. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells[J]. Nat Biotech, 2001, 19(1): 29-34.
- [15] Bergers G, Javaherian K, Lo KM, et al. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice[J]. Science, 1999, 284(5415): 808-812.
- [16] 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.
- [17] Black WR, Agner RC. Tumor regression after endostatin therapy[J]. Nature, 1998, 391(6666): 450.
- [18] 章翔, 吴景文, 费舟, 等. 人内皮抑素基因的克隆与表达及其抑瘤作用的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(13): 783-787.
- [19] Herbst RS, Mullani NA, Davis DW, et al. Development of biologic markers of response and assessment of antiangiogenic activity in a clinical trial of human recombinant endostatin[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(18): 3804-3814.
- [20] Feldman AL, Restifo NF, Alexander HR, et al. Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice[J]. Cancer Res, 2000, 60(6): 1503-1506.
- [21] Read TA, Farhadi M, Bjerkvig R, et al. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(18): 6830-6837.
- [22] Bello L, Carrabba G, Giussani C, et al. Low-dose chemotherapy combined with an antiangiogenic drug reduces human glioma growth in vivo[J]. Cancer Res, 2001, 61(20): 7501-7506.

(2003-04-22 收稿 2003-06-19 修回)