

内皮抑素及内皮抑素基因抗肿瘤的分子影像学进展

张贺诚 综述 陈正光 审校

【中图分类号】R814.42 【文献标识码】A 【文章编号】1000-0313(2009)12-1380-03

人体的许多生理过程都必须有新生血管形成,恶性实体瘤的生长和转移依赖于周围新生血管的生成,通过抑制肿瘤血管的生成,切断肿瘤细胞获得营养以及生长因子的途径,可达到抑制肿瘤生长和转移的目的。因此,这种抗肿瘤血管生成治疗的休眠疗法(dormancy therapy)已成为当今肿瘤治疗的热门研究领域之一^[1]。传统影像检查技术只能对一些与血管相关的物理和功能参数进行直接或间接评价,而无法对肿瘤新生血管做出早期的定量分析;而分子影像技术则为肿瘤血管成像提供了新手段,为研究肿瘤提供了新的思路和方法。对内皮抑素及内皮抑素基因抗肿瘤的分子影像学研究已成为科研人员与临床医生关注的焦点。

内皮抑素的结构、理化特征和生物学功能

1997年,哈佛大学医学院的科研人员首先从小鼠的血管内皮细胞瘤培养液中提取出一种新的血管生成抑制因子:内皮抑素(endostatin, ES)。

1. 结构及理化特征

内皮抑素是细胞外基质胶原蛋白 XVIII 羧基末端非胶原(NC)1区片段,一级结构共有184个氨基酸,并由含11个精氨酸残基的碱性区构成了肝素的结合位点。ES多聚体由二硫键连接而成,它与单体具有同样的生物活性^[1]。通过粘合与生长因子信号传输有关的类肝素硫酸盐蛋白聚糖,内皮抑素可抑制血管发生。在ES的立体结构中,N端能与Zn结合的结构域对ES的抗肿瘤活性起主要作用,当Zn结合区氨基酸序列失去后ES失去抗肿瘤和抗转移活性,但仍具有抗血管渗透活性^[2]。

2. 作用机制及生物学功能

内皮抑素蛋白分子表面有硫酸肝素的结合位点,因此内皮抑素可能竞争性抑制血管生成促剂与细胞表面硫酸肝素糖蛋白(HSPGs)结合。ERK1/2的脱磷酸化是血管新形成的重要信号,而ES能够通过蛋白质磷酸酶调节ERK1/2激酶^[3]。内皮细胞表面有一种糖蛋白是内皮抑素的低亲和力的受体,可调节内皮抑素的活性^[4]。这为内皮抑素活性的受体说提供了依据。另外,不同的细胞外基质蛋白影响ES抗血管生成的不同分子机制^[5]。MacDonald等^[6]发现内皮抑素与原肌球蛋白作用后扰乱了微丝的完整性,导致细胞凋亡,最终抑制肿瘤生长。ES与其它抗肿瘤药物联合应用具有明显的协同作用,可以明显增加化疗、放疗的效果而不增加毒副作用^[7]。

经过多年的实验动物研究和临床试验证明^[8],内皮抑素在具有有效阻碍血管内皮细胞增殖和游走的作用的同时,还可以促使肿瘤细胞的凋亡,从而抑制肿瘤的生长和转移,具有很强

的抗肿瘤特性。

内皮抑素抗肿瘤作用的研究

1. 内皮抑素对原发及转移肿瘤的抑制作用

肿瘤的血管生成主要包括:毛细血管基底膜降解、血管内皮细胞迁移增殖、形成管状结构、基底膜形成、血流贯通等步骤。内皮抑素抑制肿瘤血管生成则主要包括以下方式:抑制血管生长、诱导内皮细胞凋亡、抑制血管内皮细胞增殖等。

实验证实,ES对肿瘤血管内皮细胞生长具有强烈的抑制作用,从而抑制肿瘤的生长和转移而没有毒副作用^[9],是目前最好的肿瘤血管生成抑制因子。有学者报道^[10]膀胱癌血清中的ES表达高于正常,是个有一定指导意义的癌症标记物。应用鼠重组内皮抑素可有效抑制小鼠Lewis肺癌、黑色素瘤(K1735)、骨肉瘤、肝癌、卵巢癌^[11-13]原发灶肿瘤的生长,在体外实验中ES能抑制结肠直肠癌肝转移^[14]。还有报道称ES对肾脏恶性组织中的抗血管作用不象膀胱和前列腺肿瘤中那么强烈,说明ES治疗抗肿瘤血管作用有选择性^[15]。

恶性胶质瘤具有典型的血管源性,它可特征性的表现出内皮细胞的过度增生。胶质瘤组织内源性血管生成抑制剂-内皮抑素的表达的实验结果证实,在胶质瘤中,组织内皮抑素的水平与恶性程度成正相关。在过度增生的肿瘤血管附近可释放内皮抑素,从而来削弱、抵消恶性胶质瘤的血管源性刺激素。

内皮抑素对肿瘤不仅有治疗作用,还有预防肿瘤发生的作用。美国Yokoyama等^[16]利用转基因鼠模型研究了鼠内皮抑素在自发性乳腺腺癌中的作用。在这个研究中,Yokoyama等^[16]研究了内皮抑素在雌鼠乳腺腺癌自发形成和有患前列腺癌倾向的雄鼠生存期中的作用,得到的数据显示鼠内皮抑素在延迟自发性肿瘤的发生和发展上具有显著疗效,他们还发现ES在人卵巢癌鼠模型的治疗中也有一定的疗效。

内皮抑素能抑制内皮细胞增生及血管形成,而且内皮抑素剂量的不同也会造成实验结果的差异。ES对有病理性血管增生的血管瘤也有疗效,在植入血管瘤样损害人血管细胞的免疫缺陷小鼠模型中,使用ES治疗可以显著减轻血管细胞的损害。内皮抑素还能使内皮细胞发生凋亡,并对小鼠内皮抑素引起凋亡的机制作了进一步研究。这也是内皮抑素对内皮细胞有特异性作用的另一证据。

与传统的细胞毒类抗肿瘤药物相比,内皮抑素治疗肿瘤具有多方面的优势:①不易产生耐药性;②毒副作用小,内皮抑素对肿瘤血管内皮有选择性抑制作用,对正常组织不良反应极小,而化疗对正常细胞产生的毒副作用较大;③对原发肿瘤和继发肿瘤的血管生成抑制效果相似,而化疗药物的治疗反应结果差别较大。

2. 基因治疗方面的研究

作者单位:100016 北京,清华大学第一附属医院放射科

作者简介:张贺诚(1976-),男,黑龙江齐齐哈尔人,硕士,医师,主要从事医学影像诊断工作。

尽管内皮抑素有很强的抗肿瘤作用,但由于天然内皮抑素来源有限,不存在于正常机体,另外内皮抑素在体内代谢速度快,在体外结构不稳定等,使内皮抑素难以满足实验研究和临床应用的需要。这就使研究人员注意到了基因工程产品的研发,即从单纯的直接注射给药转向基因治疗,利用载体把内皮抑素基因导入体内,通过在体内表达内皮抑素来进行治疗作用。国内不少学者从事重组人内皮抑素的研究,并发现利用大肠杆菌表达和基因转染技术获取 rhES 是经济有效可行的获取方法^[17]。目前用于基因治疗的内皮抑素基因载体有质粒、脂质体、腺病毒、腺病毒相关病毒、逆转录病毒等。

基因治疗有体外(ex vivo)和体内(in vivo)两种方式。体外方式是将含有外源基因的载体在体外导入细胞,再经体外细胞扩增后输入机体。这种方法易于操作,由于在细胞扩增过程中对外源的添加物经大量稀释易于清除。但是这种方法不易形成工业化大规模生产。体内方式是采用各种基因的导入系统,将外源基因装配于特定的真核细胞表达载体直接导入体内。这种载体主要有病毒类或非病毒类载体,甚至可以是裸 DNA。这种方法有利于大规模工业生产。非病毒类载体主要是脂质体。目前,腺病毒载体因其基因转移效率高、稳定性好等优点而成为临床基因治疗研究中应用最为广泛的载体之一,内皮抑素的基因传输系统多采用腺病毒载体。许多试验已证明腺病毒载体在一定的剂量范围内对机体的损害是有限的,同时可以使携带的基因能达到较高的表达水平,从而使肿瘤消退。

有研究报道将转导了 ES 与其它血管抑制剂联合基因的质粒通过瘤内注射入人颅内恶性胶质瘤鼠模型,可以明显的抑制肿瘤生长^[18]。内皮抑素基因治疗可以与其它治疗肿瘤方法起协同作用,如提高放疗在 Lewis 肺癌中的疗效,起到增效剂的作用^[19]。还有研究报道将内皮抑素基因与紫杉醇联合使用用来治疗小鼠的乳腺癌及转移瘤,进一步证明了内皮抑素基因可以显著提高化疗药的治疗效果^[20]。

内皮抑素在分子影像学方面的研究

尽管内皮抑素基因治疗有着诱人的前景,但由于很难早期确切监测其治疗效果,严重阻碍了其进一步的发展和研究。所以,如何能在活体的细胞和分子水平实时成像,从而用清晰的图像显示出肿瘤的微转移、内皮抑素基因体内表达和治疗效果等,已成为国际相关研究的重要课题。

分子影像学是采用无创伤的影像技术在活体的分子水平上研究细胞功能代谢,以达到对疾病早期特异性诊断、疗效观察和制定治疗计划。与其它医学影像检查方法相比,分子影像具有高特异性和高灵敏度等特点,能够真正实现在分子水平进行无创伤的临床诊断,提供以解剖结构为基础的分子水平的疾病信息。

分子成像中关键因素之一是分子靶点的寻找与选择,从肿瘤血管形成机制和肿瘤血管结构来说,肿瘤血管分子成像分子靶点的寻找可以从以下几个方面着手:①肿瘤血管内皮细胞,有许多促血管生长因子特异作用于这些内皮细胞;②血管内皮细胞受体及细胞外基质的黏附分子;③基底膜及蛋白酶系统。

而内皮抑素则是目前用于分子成像的主要分子靶之一^[21]。分子影像方法在近些年中才逐步应用于活体成像,其中主要包括光学成像、MRI、SPECT、PET 和近红外线成像等。

Wang 等^[22]对近红外标记的内皮抑素在小鼠体内肿瘤的成像进行了研究。其目的是确定利用近红外探针(Cy5.5)标记的内皮抑素能否在小动物体内被检测到,以及它是否能够选择性的局限于肿瘤组织。内皮抑素被注入荷有 Lewis 肺癌(350mm²)的小鼠体内。结果显示,未经标记的内皮抑素或 Cy5.5 染料单独注射小鼠体内,并不会产生信号,而注射内皮抑素-Cy5.5 后存在有剂量反应。为了确定内皮抑素在肿瘤内的结合位点,研究人员对肿瘤标本进行了荧光免疫检测,证明了内皮抑素可结合于肿瘤血管,并与血小板/内皮细胞等粘附分子共同存在。这项研究论证了内皮抑素共价结合 Cy5.5 可以从腹腔内注射位点迁移到肿瘤。这些数据表明,内皮抑素-Cy5.5 适用于未损伤试验性小动物肿瘤的选择性成像。

光学成像是一种较高性价比的方法,它能够在小动物中对内皮抑素及其基因表达进行实时监测。国内有学者应用分子影像学方法,建立表达绿色荧光蛋白(GFP)的肿瘤模型,无需处死动物,利用荧光活体成像系统即可对其进行活体光学成像,进而动态观察移植肿瘤的生长情况及内皮抑素对肿瘤生长的影响。这种 GFP 标记肿瘤细胞建立的活细胞标记和动物模型,能够利用分子影像学动态直观地观察体内肿瘤生长及肿瘤微血管形成的实际过程,为研究血管生成抑制剂等抗肿瘤新方法和新药物的筛选与疗效评估提供了一种新的手段^[23,24]。

在各种分子影像方法中,核医学成像是分子影像学中应用最早、最为广泛的一种方法,PET 或 SPECT 具有独特的优势。正电子放射性核素包括¹¹C、¹⁸F、¹²⁴I 等都能用于标记化学受体、转运体及酶底物,因此探针的范围很广。Fomatti 等^[25]在狗乳腺癌模型中,利用放射免疫显像技术,发现在肿瘤周围抗体高度浓聚,这与免疫组化检测到结果一致:肿瘤周围血管丰富。

MRI 具有高的空间分辨力和多序列成像的优点,可以反映组织的多个理化指标,可以确定多个测量参数。MRI 是小动物成像中应用最成熟的,目前 MR 成像能检出的最小体素已达 0.1 mm×0.1 mm×0.1 mm。MRI 技术的主要优点是空间分辨率高,但要取得强的 MRI 信号仍存在许多条件限制。因此,MRI 做为一种监测基因表达成像的技术目前还不能很好的应用于临床。

内皮抑素在分子影像学方面的应用前景

尽管对内皮抑素研究还存在着许多问题,但作为抗新生血管形成的药物,它为肿瘤治疗提供了一个更新的研究领域。综合现在的实验表明,内皮抑素可能会阻断多种依赖新生血管生成的病理过程,它有望用于任何病理的血管生成。相信随着科学的发展和研究的不断深入,通过局部基因治疗或研究一种更加高效、稳定、具有肿瘤靶向性内皮抑素基因传输系统,在人体内表达治疗水平的内皮抑素基因,使肿瘤长期接触高浓度的内皮抑素,采用内皮抑素及其基因治疗配合常规的外科手术、放疗、化疗和免疫疗法,必定会大大提高抗肿瘤的疗效。

分子影像利用分子探针显示肿瘤代谢关键酶的活性和肿瘤细胞表面分子靶点分布情况的优势,指导患者进行个体化的抗肿瘤治疗,在肿瘤诊断和个体化治疗中的作用越来越重要。对内皮抑素及内皮抑素基因的分子影像学研究,旨在用清晰、直接的分子影像来揭示、研究活体内皮抑素及内皮抑素基因对肿瘤的生物学过程,为研究肿瘤提供了新的思路和方法。

参考文献:

- [1] Zheng XW, Li Y, Tang FA, et al. In Vivo Antitumor Effect of Canstatin Gene on Human Esophageal Carcinoma Xenografts in Nude Mice[J]. *Ai Zheng*, 2009, 28(4): 350-355.
- [2] Wei DM, Gao Y, Cao XR, et al. Soluble Multimer of Recombinant Endostatin Expressed in *E. Coli* has Anti-angiogenesis Activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(4): 1398-1404.
- [3] Annette S, Daniela W, Irmgard T, et al. Endostatin Influences Endothelial Morphology Via the Activated ERK1/2-kinase Endothelial Morphology and Signal Transduction[J]. *Microvasc Res*, 2006, 71(6): 152-162.
- [4] Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, et al. Cell Surface Glypican are Low-affinity Endostatin Receptors[J]. *Mol Cell*, 2001, 7(4): 811-822.
- [5] Delaney CE, Weagant BT, Addison CL. The Inhibitory Effects of Endostatin on Endothelial Cells are Modulated by Extracellular Matrix[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(8): 2476-289.
- [6] MacDonald NJ, Shivers WY, Narum DL, et al. Endostatin Binds Trypomyosin. A Potential Modulator of the Antitumor Activity of Endostatin[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(27): 25190-25196.
- [7] Wu Y, Yang I, Hu B, et al. Synergistic Anti-tumor Effect of Recombinant Human Endostatin Adenovirus Combined with Gemcitabine[J]. *Anticancer Drugs*, 2005, 16(12): 551-557.
- [8] Skovseth DK, Veuger MJ, Sorensen DR, et al. Endostatin Dramatically Inhibits Endothelial Cell Migration, Vascular Morphogenesis, and Perivascular Cell Recruitment in Vivo[J]. *Blood*, 2005, 105(7): 1044-1051.
- [9] Folkman J. Antiangiogenesis in Cancer Therapy-endostatin and its Mechanisms of Action[J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(19): 594-607.
- [10] Fiala R, Stejskal D, Vidlar A, et al. Evaluation of Five Potential Tumour Markers for Urinary Bladder Cancer-endostatin, Midkine, Survivin, Livin and E-fabp[J]. *Eur Urol Suppl*, 2006, 5(2): 253.
- [11] Dutour A, Monteil J, Paraf F, et al. Endostatin cDNA/cationic Liposome Complexes as a Promising Therapy to Prevent Lung Metastases in Osteosarcoma; Study in a Human-like Rat Orthotopic Tumor[J]. *Mol Ther*, 2005, 11(10): 311-319.
- [12] Li G, Sham J, Yang J, et al. Potent Antitumor Efficacy of an E1B 55 kDa-deficient Adeno-virus Carrying Murine Endostatin in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2005, 113(11): 640-648.
- [13] Subramanian IV, Ghebre R, Ramakrishnan S. Adeno-associated Virus-mediated Delivery of a Mutant Endostatin Suppresses Ovarian Carcinoma Growth in Mice[J]. *Gene Ther*, 2005, 12(1): 30-38.
- [14] Velde EA, Reijkerker A, Brandsma D, et al. Early Endostatin Treatment Inhibits Meta-static Seeding of Murine Colorectal Cancer Cells in the Liver and Their Adhesion to Endothelial Cells [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(6): 729-735.
- [15] Ozgur E, Heidenreich A, Ohlmann CH, et al. Differential Endostatin Binding to Bladder, Prostate and Kidney Tumour Vessels [J]. *Eur Urol Suppl*, 2005, 4(1): 128.
- [16] Yokoyama Y, Green JE, Sukhatme VP, et al. Effect of Endostatin on Spontaneous Tumorigenesis of Mammary Adenocarcinomas in a Transgenic Mouse Model[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(12): 4362-4365.
- [17] Liang ZH, Wu JX, Huang JL, et al. Bioactivity and Stability Analysis of Endostatin Purified from Fermentation Supernatant of 293 Cells Transfected with Ad/rhEndo[J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 56(3): 205-211.
- [18] John RO. Combinatorial Antiangiogenic Gene Therapy by Nonviral Gene Transfer Using the Sleeping Beauty Transposon Cause Tumor Regression and Improves Survival in Mice Bearing Intracranial Human Glioblastoma, Mol [J]. *Ther*, 2005, 11(16): 778-788.
- [19] Luo X, Slater JM, Gridley DS. Enhancement of Radiation Effects by pXLG-mEndo in a Lung Carcinoma Model[J]. *J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 10(13): 553-564.
- [20] Li J, Dong XS, Xu ZZ, et al. Endostatin Gene Therapy Enhances the Efficacy of Paclitaxel to Suppress Breast Cancers and Metastases in Mice[J]. *J Biomedical Science*, 2008, 15(9): 99-109.
- [21] Miller JC, Pien HH, Sahani D, et al. Imaging Angiogenesis: Applications and Potential for Drug Development[J]. *J Natl Cancer Institute*, 2005, 97(3): 172-187.
- [22] Wang KZ, Wang K, Li WH, et al. Characterizing Breast Cancer Xenograft Epidermal Growth Factor Receptor Expression by Using Near-Infrared Optical Imaging[J]. *Acta Radiol*, 2009, 11(2): 1-9.
- [23] Citrin D, Lee AK, Scott T, et al. In Vivo Tumor Imaging in Mice with Near-infrared Labeled Endostatin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(1): 481-488.
- [24] Shen BZ, Wang ZF, Li RF, et al. Molecular Imaging Research on the Effect of Endostatin on Mice GFP-expressing Lewis Lung Carcinoma[J]. *Chin J Radiol*, 2004, 4(3): 423-427.
- [25] Zhu LP, Yin Y, Xing J, et al. Therapeutic Efficacy of Bifidobacterium Longum-mediated Human Granulocyte Colony-stimulating Factor And/or Endostatin Combined with Cyclophosphamide in Mouse-transplanted Tumors [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(10): 1986-1990.

(收稿日期: 2009-08-27)