肿瘤抗血管生成疗法及相关药物的研究进展

江波,张仲苗 (浙江大学医学院附属第二医院临床药学研究室,杭州 浙江 310009)

摘要:目的 介绍肿瘤抗血管生成疗法的作用机制及近年抗血管生成药物研究进展。方法 根据国内外的文献资料,进行整理归纳。结果 肿瘤血管生成主要与生长因子、溶解酶及炎症细胞特异性分子表达增加有关。研究证明许多天然或人工合成化学分子通过作用于上述血管增生反应中的特异性分子发挥抗肿瘤效应。结论 抗血管生成药物有望成为新一代抗肿瘤药。

关键词:抗血管生成;血管生成抑制剂;肿瘤;分子机制

中图分类号:R458.900.53 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2005)05-0374-04

Progress in anti-angiogenesis cancer therapy and anti-angiogenesis drugs

JIANG Bo, ZHANG Zhong-miao (*Department of Clinical Pharmacy, 2nd Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China*)

ABSTRACT: OBSTRUCTIVE To introduce mechanism of anti-angiogenesis cancer therapy and recent advances in anti-angiogenesis drugs. **METHOD** Settle and conclude according to the relevant domestic and international literature. **RESULTS** Growth fac-

tors, lytic enzymes and inflammatory cells were main molecular mediators in cancer angiogenesis and were proved to be target of many natural or synthetic chemically molecules in cancer therapy. **CONCLUSION** The development of anti-angiogenesis drugs can be a promising approach for the treatment of tumor.

KEY WORDS: anti-angiogenesis; angiogenesis inhibitors; tumor; molecular mechanism

研制和开发抗肿瘤药物一直是国内外研究热点。长期以来,肿瘤生物学研究主要集中在肿瘤细胞生长的异常调控上,包括癌基因、抑癌基因等。传统的化学药物治疗方法也主要针对异常增殖的肿瘤细胞。随着对肿瘤血管生成以及对新生血管与肿瘤发展、恶变、转移关系的逐步认识,肿瘤新生血管已成为一个新的抗癌药物作用靶点。目前认识比较一致的肿瘤血管生成促进剂有生长因子、溶解酶、炎症细胞、抑制剂有血管抑制素和内皮抑制素等。在肿瘤生长过程中,肿瘤的发展和转移与上述因子作用失衡密切相关。笔者拟对肿瘤新生血管形成调控以及肿瘤血管生成抑制剂的研究进展作一介绍。

1 促进肿瘤血管生成的调控机制

1.1 生长因子

恶性肿瘤形成依赖于促进血管生成的一系列生长因子,主要有血管内皮生长因子家族(VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D),酸性和碱性成纤维细胞生长因子(aFGF, bFGF),肝细胞生长因子、散射因子(hepatocyte growth factor/scatter factor, HGF/SF),转化生长因子- α 和 β (TGF- α and β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-8(IL-8)和血管生成素。其他还有促血细胞生成素(angiopoietins), Tie受体家族的配体^[1]。

VEGF是主要的血管生成因子。研究发现 VEGF家族及其受体[FLT-1(VEGFR1), KDR/Flk-1(VEGFR3), Flt-4(VEGFR3)],是血管生成、淋巴管生成和血管渗透性的重要调节剂。在血管增生性实体瘤和血液系统恶性肿瘤中,VEGF-VEGF受体系统过度表达是预后差和低生存率的普遍标志^[2]。在形成新毛细血管过程中,VEGF发挥另一重要作用,即加强血管渗透性,使纤维蛋白原渗出血管外,形成纤维蛋白网,作为管道形成的框架。因此,VEGF又称血管渗透性因子。

1.2 溶解酶 (lytic enzymes)

内皮细胞浸润是血管生成中的关键步骤,包括基底膜和膜下间质降解。内皮细胞首先降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM),使形成新血管的细胞移动。血管源性刺激能引起大量溶解酶产生,消化特异性基质成分,为细胞浸润创造条件。在溶解酶中,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)和尿激酶型纤溶酶原(urokinase type-plasminogen, uPA)系统最重要。

血管基底膜的消化与MMP-2和9过度表达有密切联系,这些酶在浸润性肿瘤上常有过度表达^[3]。MMP-2缺乏小鼠,肿瘤血管生成明显减少。MMP-9缺乏小鼠,产生骨形成缺陷,同时伴有血管生成缺失。这两种明胶酶除降解ECM外,还参与TNF- α 等血管生成因子的释放。MMP-9还参与

内源性血管抑制因子 tumstatin的生成, MMP-9的缺乏使血液中的 tumstatin减少,加速血管生成和肿瘤生长,显示了 MMP系统调控血管生成的复杂性^[4]。

另一个促进肿瘤发展的蛋白酶家族是丝氨酸蛋白酶的尿激酶家族。尿激酶能催化纤溶酶原转化为活性纤溶酶。和 MMPs一样,尿激酶过度表达造成浸润肿瘤。很多癌症中,高水平明胶酶和尿激酶是预后差的标志。

1.3 炎症细胞

研究表明炎症细胞能够阻止或促进肿瘤生长^[5]。局部非特异性免疫因子聚集和活化(如巨噬细胞和多形核中性粒细胞激活),与肿瘤排斥反应密切相关。由 T细胞和 B细胞介导的特异性免疫反应能引起有效的抗肿瘤免疫反应。然而,炎症条件也有利于肿瘤生长和传播。由环境和生物因素引起的慢性炎症(细菌和病毒感染),能极大地提高一些癌症发生危险性。研究发现浸润性白细胞能释放炎症介质和促血管生成因子,引起促肿瘤生长的自分泌和旁分泌途径激活。单核细胞和粒细胞也能释放血管生成过程中所需的基质金属蛋白酶(MMP-2, MMP-9, MMP-8)^[6]。

肿瘤能诱导激活外周循环血中单核细胞成为肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages, TAMs),释放趋化因子,增强单核细胞和多形核白细胞(PMN)的化学趋化性和浸润性。PMN和单核细胞进一步释放趋化因子和 VEGF,使内皮细胞聚集和新的浸润细胞活化,引起血管生成。如果动物体内 PMN缺失,由 CXCR2配体引起的强血管生成反应就不存在。另外,炎症分子也能诱导血管生成反应,有力地证明了此“级联反应机制”^[7]。

2 肿瘤的抗血管生成治疗策略及血管生成抑制药物

阻止新生血管形成中的任何一步均可抑制肿瘤生长。针对此理论,抗血管生成疗法的策略包括:阻断血管生成因子的合成及释放并拮抗其作用;阻断内皮细胞降解周围基质的能力;阻断内皮细胞表面整合素作用;直接抑制内皮细胞增殖和(或)诱导其调亡。近来,有学者提出一种假设,以肿瘤血管增生为靶向的有效肿瘤化学阻滞药物称为“血管阻滞(angio prevention)”^[8]。越来越多动物实验验证天然或人工合成化学分子具有抗肿瘤效应,所有这些化合物都作用于血管增生反应中的特异性分子。然而,通过对这些抗血管生成药物的作用分子研究发现,这些药物都作用在血管增生调控的少数几个环节中。

2.1 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)

抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸是体内肿瘤生长和转移早期的有效抑制剂。NAC抑制肿瘤血管生成途径有:清除反应性氧自由基(ROS);抑制 COX-2表达;抑制 MMPs(通过与这些蛋白酶竞争锌原子);抑制肿瘤细胞分泌 VEGF等^[8]。

2.2 多酚化合物 (polyphenolic compound) 和 黄酮类化合物

多酚化合物能与反应性氧自由基结合作为抗氧化剂,还能与金属离子结合,作为金属螯合剂。黄酮类化合物不仅具有抗氧化作用,还有雌激素样活性。在这些化合物中,表没食子儿茶素盐 (epigallocatechin gallate, EGCG) 和金雀异黄酮 (genistein) 被发现具有抗血管增生活性。EGCG 是绿茶中所含的主要黄酮,在消耗中等量绿茶的消费者中测到的量为 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{mol}$ 。研究表明,此范围内,EGCG 能抑制 MMP-2、MMP-9 和 MMP-14 的活性^[9],这和抗血管活性有联系。此外,EGCG 即使在浓度低于 IC_{50} 的时候也能抑制中性粒细胞弹性蛋白酶的活性。EGCG 对中性粒细胞的抑制能阻滞中性粒细胞介导的血管增生^[10]。EGCG 还能通过阻断 VEGF 诱导途径抑制 HT29 结肠癌细胞系的体内生长和血管生成^[11]。EGCG 的其它作用途径还包括抑制尿激酶型纤溶酶原激活剂 (uPA) 和升高抗血管生成因子 IL-12 等。

2.3 非甾体类抗炎药物 (NSAIDs)

在体外内皮细胞模型及大鼠模型中研究均表明,NSAIDs 具有抗血管生成作用。肿瘤细胞过度表达 COX-2 往往导致促血管生成因子释放^[12],内皮细胞凋亡抑制^[13]和 MMPs 和 uPA^[14]等激活,引起内皮细胞增殖,肿瘤血管生成。因此,NSAIDs 通过抑制环氧合酶 COX-1 和其诱导型 COX-2 发挥抗血管生成效应。COX-2 选择性抑制剂,NS-398 对肿瘤具有明显治疗作用,同时仅有轻微不良反应。

2.4 类固醇 甲状腺激素核受体超家族天然或人工合成配体

视黄醛 (retinoids) 类化合物,过氧化物酶增殖因子活化受体 γ (peroxidase proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ) 和维生素 D 通过与特异性核受体结合调节靶基因表达发挥作用。这些特异性核受体在上述因子的作用下,聚合成二聚体,通过与 DNA 上结合位点的结合发挥转录调节作用。

研究表明,视黄素的抗血管生成活性对一些特殊类型的癌症有效。全反式维甲酸 (all-trans-retinoic acid, atRA) 能影响肿瘤引起的内皮细胞迁移和血管增生反应。在肿瘤诱导血管生成的实验模型中,13-cis-RA 和 9-cis-RA 能与干扰素协同作用抑制血管生成。atRA 能抑制 VEGF,基质降解酶 (stromelysin) 和胶原酶基因表达水平,并且刺激内皮细胞表达 TIMP-1 (MMPs 天然抑制剂家族-1) 和 TIMP-2。和 NAC 和 NSAID 一样,视黄醛类化合物也能影响 COX-2 活性。实际上,在口腔磷状上皮癌细胞,atRA,13-cis-RA 和 9-cis-RA 不仅能降低 COX-2 的基础水平,还能抑制 EGF 诱导 COX-2 水平。在合成的视黄醛类化合物中,选择性 RXR 配体 LGD1069 和 N-(4-羟苯基)维胺脂 (4HPR) 的抗肿瘤效应都与抑制肿瘤血管生成有关^[15]。

近来,PPAR γ 在抗肿瘤血管生成中的作用受到重视。PPAR γ 由类花生酸类物质 (prostanoid 15D-PGJ₂) 激活。在人脐静脉内皮细胞模型中,由 15D-PGJ₂ 激活的 PPAR γ 表现出有效的抗血管生成活性。此外,15D-PGJ₂ 通过 PPAR γ 依赖和 caspase 依赖的途径能直接诱导内皮细胞凋亡。

天然维生素 D 和其类似物 (deltanoid) 在前列腺癌和乳腺癌细胞系中的抗肿瘤活性在探索中。在 VEGF 过度表达的 MCF7 (乳腺癌细胞株) 肿瘤细胞中,维生素 D 的活性形式,1 α ,25-二羟基维生素 D₃ 明显抑制 VEGF 诱导的内皮细胞萌芽和血管形成。研究表明,活性维生素 D 在体外能减少 Lewis 肺癌细胞 MMP-2, MMP-9 和 VEGF 表达,抑制 bFGF 诱导的小鼠肿瘤血管生成^[16]。维生素 D 的类似物钙泊三醇 (calcipotriol) 在 Kaposi's 肉瘤患者中表现出抗肿瘤活性,目前和其它维生素 D 类似物一起,在临床验证其抗肿瘤作用。

2.5 其他

近年研究表明,克拉霉素、沙立度胺 (反应停)、三羧基喹啉等均具有抑制血管增生的作用,但具体机制尚在进一步研究中。其中,有致畸作用的反应停目前已用于多种恶性血液病治疗,特别是难治性多发性骨髓瘤的治疗取得了令人鼓舞的结果^[17]。人参皂苷 Rg₃ 是我国研制的一类新药,是从植物中提取的天然药物。研究表明其具有抗肿瘤作用,Rg₃ 本身无细胞毒作用,增强机体免疫功能,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤新生血管形成是其主要的抗肿瘤机制。研究表明,Rg₃ 能体外抑制肺癌细胞新生血管形成,抑制肺癌细胞诱导的血管内皮细胞增殖,人体实验表明 Rg₃ 还能抑制人胃癌血管生成。在对荷卵巢癌大鼠的研究中发现,人参皂苷 Rg₃ 通过下调肿瘤 VEGF mRNA 及蛋白的表达量,阻滞肿瘤血管生成从而抑制肿瘤生长和转移^[18]。近年研究还表明三氧化二砷 (As₂O₃) 可有效治疗一些恶性肿瘤,可能的抗肿瘤机制为抑制肿瘤组织中新生血管生成^[19]。上述药物对肿瘤血管生成均有明显抑制作用,提示在肿瘤和其它疾病的抗血管生成治疗有一定价值。

3 结语

血管生成抑制剂的出现为肿瘤的治疗提供了一个全新的思路,抗血管生成是对传统化疗的有益补充。目前,大约有 20 余种抗血管生成抑制剂正用于临床 I ~ III 实验研究中。但仍有许多问题值得进一步研究。首先,血管生成抑制剂主要抑制新生血管的生成,阻止肿瘤的生长和转移,但是直径小于 1 mm 的肿瘤即使没有血管也能存活,这时血管生成抑制剂将无能为力。因此,血管生成抑制剂能很好的控制肿瘤,但能否真正消除肿瘤还需进一步研究。抗血管生成药物和细胞毒药物以及其它生物药共同治疗也将是今后研究方向。另外,抗血管生成治疗的目的是为了抑制病理性血管增生,如肿瘤。但同时也会影响到机体一些生理过程,如伤口愈合、组织修复等。因此,需开展以炎症细胞、巨噬细胞和粒细胞为作用靶点抗血管生成药物的开发和研究。还有,我们需要对肿瘤血管生成的基因调控方式继续深入研究,比较它与正常血管生成过程之间的特性差别,以寻求新的药物作用靶点和具有高度选择性的药物。

参考文献

- [1] Jones N, Iljin K, Dumont DJ, *et al*. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(4): 257.

- [2] Aoki Y, Tosato G. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in the pathogenesis of primary effusion lymphomas [J]. *Leuk Lymphoma*, 2001, 41 (3-4): 229.
- [3] Stemlich M, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 463.
- [4] Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, *et al.* Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alpha V beta3 integrin [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(6): 589.
- [5] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*, 2002, 420(6917): 860.
- [6] Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, *et al.* The neutrophil as a cellular source of chemokines [J]. *Immunol Rev*, 2000, 177: 195.
- [7] Beneli R, Momi M, Carrozzino F, *et al.* Neutrophils as a key cellular target for angiotensin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation [J]. *FASEB J*, 2002, 16(2): 1371.
- [8] Tosetti F, Ferrari N, de Flora S, *et al.* Angioprevention: angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents [J]. *FASEB J*, 2002, 16(1): 2.
- [9] Dell'Aica I, Dona M, Sartor L, *et al.* (-) Epigallocatechin-3-gallate directly inhibits MT1-MMP activity, leading to accumulation of non-activated MMP-2 at the cell surface [J]. *Lab Invest*, 2002, 82(12): 1685.
- [10] Dona M, Dell'Aica I, Calabrese F, *et al.* Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation and associated angiogenesis and pulmonary fibrosis [J]. *J Immunol*, 2003, 170(8): 4335.
- [11] Lamy S, Gingras D, Beliveau R. Green tea catechin inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(2): 381.
- [12] Kase S, Osaki M, Honjo S, *et al.* Expression of cyclooxygenase is correlated with high intratumoral microvessel density and low apoptotic index in human esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Virchows Arch*, 2003, 442(2): 129.
- [13] Ma L, del Soldato P, Wallace JL. Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: Shifting the angiogenic balance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(20): 13243.
- [14] Yao M, Kargman S, Lam EC, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (3): 586.
- [15] Ribatti D, Raffaghello L, Marimpietri D, *et al.* Fenretinide as an anti-angiogenic agent in neuroblastoma [J]. *Cancer Lett*, 2003, 197(1-2): 181.
- [16] Nakagawa K, Sasaki Y, Kato S, *et al.* 22-oxa-1{ alpha }, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2005 [in press]
- [17] 朱世论, 孙致信. 反应停联合地塞米松治疗多发性骨髓瘤临床观察 [J]. *河南医学*, 2004, 15(7): 30.
- [18] 潘子民, 叶大风, 谢幸, 等. 人参皂甙 Rg3对荷卵巢癌的严重联合免疫缺陷鼠的抗肿瘤血管生成作用的研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2002, 37(4): 227.
- [19] 夏俊, 陈俊霞, 于丽华, 等. 三氧化二砷抑制小鼠 B16黑色素瘤生长作用及其机制 [J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(9): 1054.