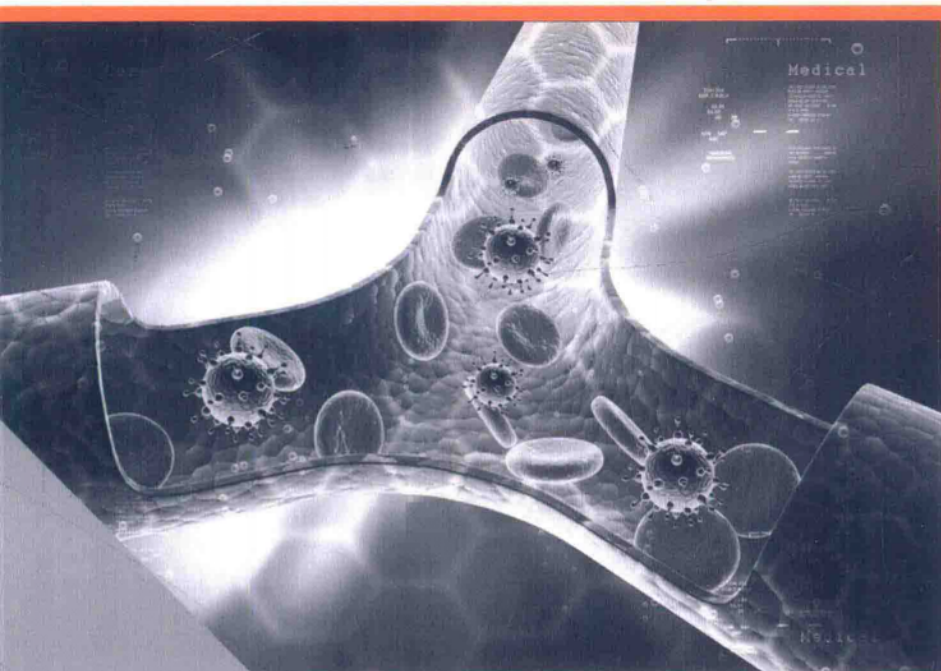


重组人血管内皮抑素

R h - E n d o s t a t i n

徐根兴 华子春 · 主编



东南大学出版社
SOUTHEAST UNIVERSITY PRESS

重组人血管内皮抑素 (Rh-Endostatin)

编 著 徐根兴 华子春

编著者单位 南京大学生命科学学院



东南大学出版社
SOUTHEAST UNIVERSITY PRESS

• 南京 •

图书在版编目 (CIP) 数据

重组人血管内皮抑素 / 徐根兴, 华子春主编. —南京: 东南大学出版社, 2016.11

ISBN 978 - 7 - 5641- 6805 - 6

I. ①重… II. ①徐… ②华… III. ①抗癌药 - 研究
IV. ① R979.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 247403 号

重组人血管内皮抑素

出版发行 东南大学出版社

出 版 人 江建中

社 址 南京市四牌楼 2 号

邮 编 210096

经 销 全国各地新华书店

印 刷 虎彩印艺股份有限公司

开 本 787 mm × 1092 mm 1/16

印 张 9

字 数 230 千字

版 次 2016 年 11 月第 1 版

印 次 2016 年 11 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978 - 7 - 5641 - 6805 - 6

定 价 36.00 元

(本社图书若有印装质量问题, 请直接与营销部联系, 电话: 025-83791830)

前言

人类战胜癌症需要不断创新

根据从 2014 年和 2015 年第 1 期《中国肿瘤》发表的全国肿瘤登记中心收集的全国 2010—2011 年肿瘤数据,分析我国恶性肿瘤发病与死亡情况及趋势。截至 2014 年 6 月,国家癌症中心共收到全国 234 个肿瘤登记处提交的 2011 年肿瘤登记资料,2011 年全国新发恶性肿瘤病例约 3 372 175 例,2011 年全国恶性肿瘤死亡病例 2 113 048 例。全国恶性肿瘤发病率每十万人有 250.28 例(男性 277.77/10 万,女性 221.37/10 万)。城市地区发病率为 261.38/10 万,农村地区发病率为 238.60/10 万。全国恶性肿瘤死亡率为 156.83/10 万。肺癌、女性乳腺癌、胃癌、肝癌、结直肠癌、食管癌、宫颈癌、胰腺癌、卵巢癌是我国主要的恶性肿瘤,约占全部新发病例的 75%。肺癌、肝癌、胃癌、食管癌、结直肠癌、女性乳腺癌、胰腺癌、脑瘤、宫颈癌和白血病是主要的肿瘤死因,约占全部肿瘤死亡病例的 84%。

2010 年全国癌症新发病例 3 093 039 例,其中男性 1 807 921 例,女性 1 285 118 例。城市发病例数占 54.95%,农村占 45.05%,东、中、西部比例分别为 41.55%、32.57%、25.88%。2010 年全国恶性肿瘤死亡病例 1 956 622 例,肿瘤发病率每十万人有 235.23 例。其中肺癌、女性乳腺癌、胃癌、肝癌、食道癌、结直肠癌和宫颈癌是主要常见恶性肿瘤。

按照上述数据,不到 10 秒全国就有 1 人得癌症。与 2010 年比较,2011 年发病率和死亡率水平基本持平,但发病和死亡人数有所增加。陈万青等在 CA-Cancer J Clin 发布了《2015 年中国癌症统计》,该研究分析结果提示,2015 年中国预计有 429.2 万例新发肿瘤病例和 281.4 万例死亡病例。肺癌是发病率最高的肿瘤,也是癌症死因之首。胃癌、食管癌和肝癌是紧随其后的我国发病率和死亡率较高的常见肿瘤。

恶性肿瘤发病率在 0~39 岁处于较低水平,40 岁后开始快速升高,75~80 岁年龄组达高峰。根据世界卫生组织下属国际癌症研究所发布的 Globocan 2012 年数据,全球恶性肿瘤新发病例数达 1 400 万,预测到 2025 年将达到 1 900 万,到 2035 年将达到

2 400 万。而新增恶性肿瘤病例数大部分在亚洲,中国增长也比较快。但是,与世界水平比较,北美、欧洲、澳大利亚、新西兰等癌症发病率较高,中国癌症发病率与世界平均水平接近。近年数据显示,肺癌已经取代消化系统成为发病第一位的恶性肿瘤,肺癌是首位恶性肿瘤死因,约占恶性肿瘤死亡总数的 22.7%。生存分析结果表明我国肿瘤总体 5 年生存率较低,仅为 30.9%,而肺癌总体 5 年生存率仅为 15%~17%,包括早期癌症的发现等与发达国家相比还有不小的差距。根据 2014 年《美国癌症诊疗现状报告》,美国现今有 1 370 万例癌症患者生存。全世界患癌症生存数是一个比较大的群体,部分已经生存时间长达几十年。从美国 1971 年签署《美国国家癌症法案》后 40 多年的抗癌历程中,美国耗费了 900 多亿美元的抗癌大战,终于使少数肿瘤的发病率有所下降,5 年生存率少数癌症有部分提高。并且 5 年生存率总体而言比中国高。但是人类战胜癌症仍然任重道远,癌症的预防和治疗仍然任务艰难,需要不断创新,突破常规,综合防治,从各种不同的途径和方法进行探索,与癌症做斗争是一场艰苦长期的战争。

本书是基于作者在 1997 年申请的发明专利——人血管内皮抑制素(简称内皮抑素, Endostatin, 发明专利号 ZL97107112.8),经过十多年的与江苏吴中实业股份有限公司合作,完成了国家一类生物制品临床前和一至三期临床研究,希望能尽早面世广泛用于癌症病人的抗血管生成治疗。同时也介绍了 1998 年申请的另外的发明专利——转内皮抑素基因双歧杆菌(发明专利号 ZL98111517.9)的研究,介绍了内皮抑素的拓宽应用和新适应证,包括用于递送 RNA 干扰药物抑制肿瘤相关基因(发明专利号 ZL201110125216.7)的研究。系统综述了内皮抑素在肿瘤治疗中的广泛应用,其中引用了作者的研究生相关论文和相关文献。文献综述系统介绍了内皮抑素的作用机理、临床前研究和临床研究情况,有部分临床研究综述了不同氨基酸序列和产生的抗体种类也不一样的内皮抑素(恩度)的文献报道和美国同样不一致的酵母表达的内皮抑素临床研究的文献报道,并且在书中已经注明区别,有助于让读者较全面了解内皮抑素基因在临床上的应用前景。

癌症预防与治疗同样重要,因此这里将著名肿瘤防治专家孙燕院士在血管内皮抑素(苏粒佳)三期临床研究期间在江苏吴中实业股份有限公司作报告时提出的防癌十条转引在此:

1. 全民重视防控;
2. 重视健康教育,从儿童抓起;
3. 像控制酒驾那样控烟;
4. 谁造成的环境污染谁治理;
5. 远离可能导致癌症的病因;
6. 像汽车年检那样有效地每年健康检查;
7. 处理癌前病变;
8. 改变不良生活习惯;
9. 适当锻炼增强体质;
10. 保持乐观情绪,身心健康。

目 录

第一章 内皮抑素作用机理与抗血管生成理论.....	1
第二章 内皮抑素动物实验和临床标志物检测.....	26
第三章 内皮抑素(苏粒佳)抑制肿瘤临床前研究	30
第四章 内皮抑素抑制肿瘤的临床研究.....	62
第五章 不同类型内皮抑素研究.....	88
第六章 内皮抑素拓展应用研究.....	111
附录 I 内皮抑素相关专利检索	121
附录 II 非小细胞肺癌其他临床研究文献综述	128
附录 III 缩略语	134

第一章 内皮抑素作用机理与 抗血管生成理论

1 抗血管生成疗法

健康成人的血管结构通常是相对静止的,在伤口愈合、器官再生以及女性生殖系统排卵和月经期则需要短暂的新血管生成,但是不会出现血管生成异常不受控制的状况。

病理性血管生成 (pathological angiogenesis) 是关节炎、糖尿病视网膜病变和肿瘤等多种临床疾病发生发展的关键机制。1971 年,美国 Folkman 博士提出了通过抑制肿瘤血管生成从而可以“饿死”肿瘤的假说。他认为肿瘤血管的生成被抑制后会导致大部分肿瘤细胞由于缺血和缺氧而死亡,从而减缓晚期肿瘤的生长速度,延长肿瘤患者的带瘤生存期,抑制肿瘤的生长和推迟肿瘤的复发。

肿瘤血管的新血管生成中会出现异常不受控制的状况,这是因为肿瘤血管内皮细胞大量增殖过程受血管内皮细胞生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子 (Fibroblast Growth Factor, FGF)、促血管生成素 -1 (Angiopoietin-1, Ang-1) 和肝细胞生长因子 (Hepatocyte Growth Factor, HGF) 等多种促血管生成因子的调控。这些促血管生成因子通过与内皮细胞表面特异性受体结合,激活胞内促增殖信号、促进细胞增殖分裂、抑制内皮细胞凋亡,并在内皮细胞的迁移、分化等过程中发挥重要的调控作用。内皮细胞增殖过程还受内皮细胞增殖抑制因子的调控,这些抑制因子可负调控血管内皮细胞的增殖及血管生成。血管生成正、负调节因子间的动态平衡关系才是调控内皮细胞增殖及血管新生的决定性因素 (何金蕾, 2014)。

肿瘤的发展可以分为无血管期和血管期。在无血管阶段,血管生成正、负调节因子间处于动态平衡阶段,肿瘤组织主要通过周围组织的弥散作用来获取所需要的营养物质和氧气,生长缓慢,因此体积大都不超过 $1\sim 2\text{ mm}^3$ 。当血管生成正、负调节因子间由于种

种原因处于失衡阶段时,在促血管生成因子的诱导下,肿瘤发展进入血管生成期后,血管为肿瘤提供了生长所需要的营养物质、运走代谢产物,还提供了各种肿瘤生长因子等,为肿瘤组织提供了适宜生长的微环境,肿瘤生长十分迅速,并且更容易转移。

通过肿瘤血管发生过程研究发现,肿瘤血管发生主要原因有两方面,一方面是由于肿瘤细胞释放出促血管生成因子,促血管生成因子能够激活血管内皮细胞,从而促进了内皮细胞的增殖和迁移;另一方面是由于内皮细胞能够旁分泌一些血管生长因子,这些血管生长因子刺激了肿瘤细胞的生长。一旦促血管生长因子及抗血管生长因子出现失衡,将导致内皮细胞的迁移与增殖。异常增多的内皮细胞及周细胞使肿瘤血管出现扭曲、膨胀、囊状扩张等血管异常化,导致肿瘤血管的渗透性增高。并且由于血管周围癌细胞的压迫,阻碍了血液供应,导致血管网在时间及空间上出现异常。此外,由于血管的高渗透性导致间质压升高,进而影响氧气扩散,导致低氧环境的产生,从而使肿瘤组织内的血管系统结构紊乱,导致肿瘤血管分布不均,血管以膨胀、迂曲、囊状为特点存在,在接头处及分支处无固定形态。由于肿瘤细胞和基质细胞对血管的挤压导致血管管径不均匀,肿瘤血管内皮细胞形态不规则且排列无序,重叠生长,突入管腔,周细胞连接松散甚至缺失,基膜不完整、厚薄不均(Goel, 2011)。这种肿瘤血管的特点导致肿瘤组织血流紊乱,呈现时间和空间的不均一性,无效循环增加,血管壁屏障功能异常,导致血管内外液体微环境失衡,血液输送功能受损,主要以缺氧、酸中毒和组织间隙液压升高为特点。因此,正常人的血管内皮细胞和肿瘤血管内皮细胞在形态、结构和功能上都有明显差别,这种差异化的存在就产生了抗肿瘤血管生成理论的基础。

简单总结一下肿瘤血管的特点,有以下几点(王耀焱, 2015):

(1) 肿瘤血管内皮细胞形态异常,增生活跃,促血管因子表达上调。

(2) 肿瘤血管内皮细胞与正常血管内皮细胞在基因表达上差异明显,其中有报道认为有 79 个基因表达差异,其中上调的有 46 个基因表达增加,有的基因在正常血管内皮细胞或胚胎血管内皮细胞均不表达或表达甚低,形成了肿瘤血管特有的基因表达谱。

(3) 肿瘤血管结构异常,血管形态以膨胀、迂曲、囊状为特点存在,周细胞形态异常,管壁细胞间隙增宽,在接头处及分支处无固定形态,基膜不完整、厚薄不均,并且缺乏神经支配和不受控制增长。

(4) 肿瘤血管形成后不再进一步分化为相应的动静脉,也无平滑肌成分,无收缩功能。

(5) 肿瘤血管的渗透性增高,并且由于血管周围癌细胞的压迫,阻碍了血液供应,导致血管网时间及空间上的异常,进而影响氧气扩散,导致低氧环境的产生。局部血流紊乱,无效循环增加,血管壁屏障功能缺失导致局部血液渗漏,进而使间质压(IFP)升高,肿瘤组织血流灌注进一步受到阻碍,氧、营养物质及代谢产物的递送受到抑制,形成肿瘤细胞低氧、低 pH、高 IFP 的肿瘤微环境。高 IFP 干扰药物在肿瘤细胞中的弥散;低 pH 值环境能诱导血管内皮细胞生长因子的表达,低氧亦可上调各种血管生长因子,两者综合作用,进一步加重促血管生成因子与血管生成抑制因子间的失衡,形成恶性循环。低氧环境可诱发缺氧诱导因子(HIF-1 α)表达增加,被激活的基因可重新调整肿瘤细胞代谢,导致氧耗减少,糖酵解增加,出现耐低氧、高转移细胞,细胞表型发生转化,恶性程度

增高,使其对放化疗敏感性降低,导致肿瘤细胞更具有侵袭性和转移性;HIF-1 α 还可诱导转移相关基因的转录,可降低 E-钙黏蛋白的表达,促进上皮-间质转化,促进肿瘤浸润和转移(Krishnamachary, 2006)。

(6) 肿瘤血管的异质性不仅表现为肿瘤血管与非肿瘤血管之间存在差异性,还表现为不同肿瘤之间、同种肿瘤不同生长演进阶段之间、同种肿瘤不同个体之间存在差异性(卞修武, 2006)。这种差异性包括:血管形成参与情况、血管生成相关性病变与结局、淋巴管生成情况、血管结构的成熟度、内皮细胞的分子遗传学改变、内皮细胞增殖活性和基底膜特点等(Aird, 2012; 杨巧丽, 2014)。

针对肿瘤血管的特点, Folkman 博士提出的肿瘤抗血管生成理论,俗称饥饿疗法或饿死肿瘤疗法,可以简单概括为以下几点:

(1) 大部分实体瘤可以长期处于无血管生成的休眠期,肿瘤依靠简单被动扩散获得营养,因此生长缓慢,体积大都不超过 $1\sim 2\text{ mm}^3$ 。

(2) 肿瘤细胞产生促血管生长因子,同体内的抗血管生长因子失衡时,触发肿瘤血管生成。

(3) 周围血管在促血管生长因子诱导和肿瘤周围环境影响下,通过芽生方式生成血管,并且进入肿瘤组织,从而促使肿瘤疯长,肿瘤血管结构开始紊乱。

肿瘤血管生成方式包括内皮依赖性血管、马赛克血管(Mosaic Vessel, MV)和血管生成拟态(Vasculogenic Mimicry, VM)三类(乐晓峰, 2014)。内皮依赖性血管是血管内壁由分化成熟的内皮细胞衬覆,肿瘤细胞不参与血管壁的构成,包括出芽式血管生成(Sprouting angiogenesis)和套入式血管生成(Instussusceptive angiogenesis),这种类型的肿瘤血管是本书主要论述的内皮抑素治疗的主要靶点。马赛克血管由肿瘤细胞和血管内皮细胞相间排列在肿瘤血管壁上,共同围成肿瘤的血管腔,随着肿瘤组织中内皮细胞的不断分裂增殖,部分肿瘤细胞逐渐被内皮细胞所代替,形成马赛克血管,内皮抑素对这类血管也有治疗作用,但是疗效没有内皮依赖性血管好。血管生成拟态现象是 1999 年 Maniotis 等在做人眼葡萄膜黑色素瘤微循环研究时首次发现的一种不依赖内皮细胞的全新的肿瘤供血方式,即恶性黑色素瘤细胞在特定微环境中可模拟内皮细胞功能形成由肿瘤细胞围成的可输送血浆和红细胞的管道结构,目前已经发现多种肿瘤类型含有 VM,有 VM 的肿瘤一般具有高度侵袭性、去分化、生长迅速、转移率高以及易发生血道转移等特点,存在 VM 的肿瘤组织微血管密度相对较低。在发现 VM 的病人中,总生存期相对更短,内皮抑素等抗血管生成治疗对这类肿瘤治疗效果可能较差。血管生成抑制剂主要针对的是血管内皮细胞,而内皮细胞遗传上相对稳定,因此,我们过去认为这类药物很难产生耐药性。随着血管生成抑制剂的广泛运用和深入研究,逐渐认识到这些药物虽然取得了一定疗效,但是单独使用疗效并不令人满意。许多研究表明肿瘤能够适应血管生成抑制剂的存在,逃避抗血管生成治疗,即肿瘤对血管生成抑制剂产生了耐药现象,这种耐药现象与肿瘤细胞对化疗药物耐药机理不同,在抗血管生成治疗中,还没有发现肿瘤细胞有类似对化疗药物耐药所产生的类似耐药基因出现,一部分肿瘤病人对抗血管生成出现耐药现象,很有可能就是肿瘤血管生成拟态出现而使肿瘤逃避抗血管生成治疗。但是这方面的文献报道很少,还没有充足的依据来证明。

抗血管生成除了抑制肿瘤血管新生外,还可以使原有肿瘤血管正常化,在其他药物和治疗措施配合下控制或杀死肿瘤细胞,单独的抗血管生成疗法只能控制或缩小肿瘤到无血管状态,不能彻底清除全部肿瘤细胞,需要配合其他疗法。因此,对抗血管治疗提出的另一理论就是使原有的肿瘤血管正常化。已经有一部分文献报道,在药物破坏肿瘤血管前,合理地运用抗血管生成药物可以使原来扭曲异常的肿瘤血管趋于正常,血管结构变得规则、血管基底膜转为完整、血管周围支持细胞增多、血管供应营养物质能力增强,能更有效地输送氧和药物到肿瘤细胞,增强化疗或放疗及其他治疗措施的效果(王耀焜, 2015),这就是后面提及的为什么内皮抑素与化疗药物或放疗联合使用在临床上更有效抑制肿瘤生长的一个理论基础。目前针对肿瘤血管靶向治疗的研究主要集中在研究肿瘤血管生成抑制剂(Tumor Angiogenesis Inhibitor, TAI)和肿瘤血管靶向制剂(Vascular Targeting Agent, VTA)两个方面。

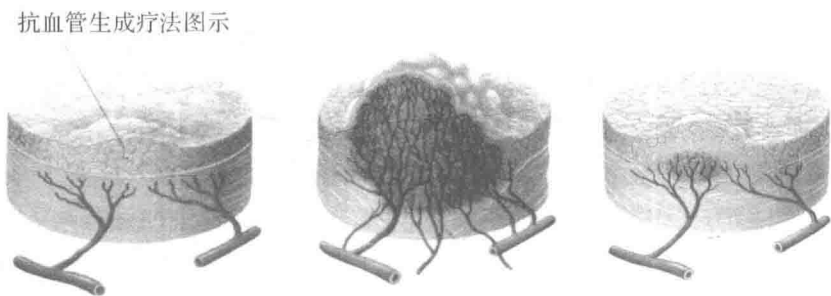


图 1.1 抗血管生成疗法示意图,从左到右分别为肿瘤休眠期,肿瘤血管生成期和抗血管治疗后肿瘤萎缩期

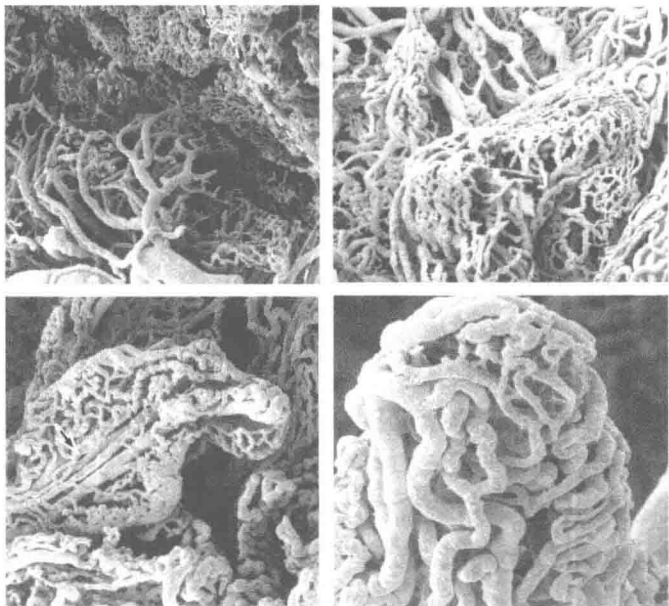


图 1.2 手术切除男性患者膀胱癌不同的肿瘤血管三维扫描电镜血管结构图 (Miodonski, 1998)

肿瘤血管生成抑制剂主要是通过抑制血管的新生来阻止肿瘤的生长,在肿瘤新生长血管的过程中,阻断其中一个或者是某几个步骤来达到治疗目的:①阻断促血管生长因子的表达,同时提高血管生长抑制因子的表达;②通过抑制血管新生刺激因子、血管生长因子与其相应受体的结合,从而干扰细胞间信号的传递;通过抑制血管新生激活因子抑制内皮细胞的增殖;③以基质金属蛋白酶为治疗靶点,来抑制细胞外基质和基底膜的降解;④抑制微管的形成,从而阻止内皮细胞的迁移;⑤使原有肿瘤血管正常化,为联合化疗或放疗等综合治疗措施提供了治疗的时间窗口,提高和增强了肿瘤综合治疗效果。

肿瘤血管靶向制剂类药物根据药物的作用方式的不同可分为小分子类和生物类肿瘤血管靶向制剂。主要作用机理是调节上述人体中促血管生成因子及抗血管生成因子间的平衡,使肿瘤组织中过多的肿瘤血管退化,达到正常组织中的血管密度,从而切断肿瘤细胞过度生长所需氧气及其他营养物质的供应途径;对原有的存活的肿瘤血管通过调节上述人体中促血管生成因子及抗血管生成因子间平衡后达到血管正常化,降低肿瘤组织间压力,改善化疗药物向肿瘤组织内的传送,提高放、化疗效果。它们的主要作用特点是抑制肿瘤新生血管的生成,从而持续抑制肿瘤细胞的生长和转移。

抗血管生成疗法的重要靶向细胞是肿瘤血管内皮细胞(EC)。内皮细胞的基因型比肿瘤细胞要保守,差异性小于肿瘤细胞。但是,肿瘤血管也同肿瘤细胞类似,具有异质性,表现为肿瘤血管与非肿瘤血管之间存在差异性,还表现为不同肿瘤之间、同种肿瘤不同生长演进阶段之间、同种肿瘤不同个体之间存在差异性(卞修武, 2006)。这种差异性包括:促血管生长因子及抗血管生长因子的失衡程度、血管形成参与情况、血管生成相关性病变与演变、淋巴管生成情况、血管结构的成熟度、内皮细胞的分子遗传学改变、内皮细胞增殖活性和基底膜特点等。肿瘤间质中新生微血管的密度、形态、结构及其随肿瘤演进在肿瘤组织内的三维分布等肿瘤微血管构筑表型存在差异。因此,目前血管正常化是临床肿瘤治疗及其他血管异常性疾病和再生医学研究领域的热点。肿瘤血管正常化可以减少血管渗透性及水肿,血浆蛋白不再渗漏到组织间隙,胶体渗透压降低,组织间隙液压力降低,水肿减轻。肿瘤血管正常化可以阻止血管渗漏,可以减少肿瘤细胞脱落入血管,阻止肿瘤的血运转移途径。肿瘤血管的正常化能改善肿瘤微环境,使抗血管生成疗法可以配合各种放化疗等其他肿瘤治疗达到最佳作用。因此,这就是目前大部分抗血管生成治疗都采用联合治疗的一个主要原因。

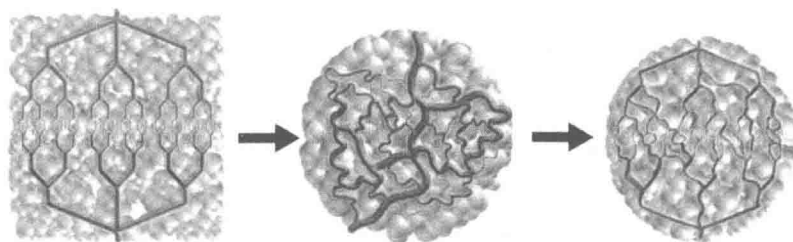


图 1.3 血管正常化理论,左:正常组织血管分布示意图,中:肿瘤组织和血管异常分布示意图,右:通过抗血管生成治疗后使肿瘤组织原有血管正常化,并且抑制新生血管再生,抗血管生成治疗进一步联合放化疗等综合治疗措施,抑制肿瘤血管生长和抑制肿瘤生长

2 抗血管生成治疗与传统放化疗的优缺点比较

肿瘤细胞的基因很不稳定,随时间的变异和对化疗药物的耐药特性使肿瘤细胞对大部分化疗或者免疫治疗产生逃逸。肿瘤细胞的不均一性及肿瘤细胞基因组的高度不稳定性,使得对化疗耐药的肿瘤细胞得以生存,肿瘤组织血管的结构异常及介质压力升高,使治疗药物到达肿瘤细胞变得非常有限,局部药物浓度过低,影响治疗效果。

内皮细胞具有很稳定的基因,变异率低。肿瘤诱导的血管内皮细胞至少为肿瘤细胞提供了 20 多种不同的生长因子和抗凋亡因子,每个内皮细胞控制大约 50~100 个肿瘤细胞的生长,肿瘤诱导的内皮细胞是肿瘤治疗的第二个重要靶细胞。这种治疗不易产生耐药性,除了出现肿瘤血管生成拟态和阻断单一血管生成因子导致其他生成因子替代作用所产生的获得型耐药等特殊情况下,相比较肿瘤细胞对化疗药物出现的耐药性,抗血管生成治疗所产生上述耐药性的概率要低得多。

成熟正常组织毛细血管内皮细胞处于相对静止状态,而肿瘤血管内皮细胞增殖活跃,较多的生长因子和受体表达远高于成熟正常组织,针对这类物质作为靶点的抗血管生成治疗副作用小,对正常组织细胞的毒性作用比化疗药物小。目前已经有文献报道,内皮抑素在治疗过程中对伤口愈合没有影响,这就是差别化靶向治疗的一种特征。

肿瘤血管内皮细胞为靶细胞,内皮抑素等抗血管生成药物进入靶细胞更容易在局部形成较高浓度,并且肿瘤血管依赖性为肿瘤共性。因此,抗血管生成治疗更具有广谱性特点,目前已经有内皮抑素针对许多不同种实体肿瘤进行临床研究或临床治疗的报道。

抗血管生成治疗的疗效目前没有达到大家理想中的疗效,主要还是由于肿瘤的复杂性和异变性,抗血管生成治疗的疗效评价体系照搬化疗药物等的方法,没有单独的抗血管生成治疗的疗效评价体系,并且抗血管生成治疗往往联合治疗或综合治疗效果更理想。而研究抗血管生成治疗血管正常化的时间窗口和与其他合适治疗进行联合治疗的最佳方案目前仍不足,相信“饿死”肿瘤和杀死肿瘤联合治疗的最佳组合的不断临床探索一定能大大提高治疗效果,为晚期癌症病人提供更多治疗措施和方法的选择,多一种疗法,多一分生存机会。

3 内皮抑素的发现

1994 年, O' Reilly 等将 Lewis 肺癌细胞移植到小鼠体内,发现小鼠的血浆和尿液能特异性地抑制血管内皮细胞的增生。他们将血浆经过肝素亲和层析、凝胶层析和 3 次 C4 高效液相反相层析分离,提纯出分子量为 38 KD 的蛋白,并命名为血管抑素(Angiostatin)。1997 年, O' Reilly 等发现小鼠血管内皮瘤(EOMA)细胞系的培养液能够抑制血管内皮细胞的增殖。通过分离纯化得到一种新的蛋白质,命名为鼠的

Endostatin, 后来翻译成血管内皮抑制素(简称内皮抑素)。1997年9月10日,我们申请了人内皮抑素的发明专利(ZL97107112.8),这是国际上最早获得授权的内皮抑素专利之一。我们通过大肠杆菌表达了人内皮抑素基因,是人胶原蛋白十八基因1503~2055表达的蛋白活性片段,分子量20KD,184个氨基酸,与小鼠内皮抑素氨基酸序列有85.33%的同源性。

一种人实体肿瘤血管内皮细胞增殖抑制因子(human endostatin)
cDNA 核苷酸序列

The nucleotide sequence of human endostatin cDNA

	ATGCACAGCCACCGGACTTCCAGCCGGTGTCCACCTGGTTGGCTCAACAGCCCCCTGTGAGGCGGCATG
Human	M H S H R D F Q P V L H L V A L N S P L S G G M
Mouse	T Q T
	CGGGGCATCCGCGGGCCGACTTCCAGTGCTTCCAGCAGGCGCGGCCGTGGGGCTGGCGGGCACCTTCCGCGCC
Human	R G I R G A D F Q C F Q Q A R A V G L A G T F R A
Mouse	S
	TTCTGTCTCTCGGCTGACAGGACCTGTACAGCATCGTGCGCGTGCCGACCGCGAGCCGTGCCATCGTCAAC
Human	F L S S R L Q D L Y S I V R R A D R A A V P I V N
Mouse	G S
	CTCAAGGACGAGCTGCTGTTCCAGCTGGGAGGCTCTGTTCTCAGGCTCTGAGGTCGCGTGAAGCCCGGGCA
Human	L K D E L L F P S W E A L F S G S E G P L K P G A
Mouse	V S D S Q Q V Q
	CGCATCTTCTCCTTTGACGGCAAGGACGTCTGAGGCACCCACCTGGCCCCAGAGAGCGTGTGGCATGCTCTG
Human	R I F S F D G K D V L R H P T W P Q K S V W H G S
Mouse	R A
	GACCCCAACGGCGCAGGCTGACCGAGAGCTACTGTGAGACGTGGCGGACGGAGCTCCCTCGGCCACGGGCCAG
Human	D P N G R R L T E S Y C E T W R T E A P S A T G Q
Mouse	S M T T G
	GCCTCTCGCTGCTGGGGGAGGCTCCTGGGGCAGAGTGCCGAGCTCCATCAGCCTACATCGTGTCTGTG
Human	A S S L L G G R L L G Q S A A S C H H A Y I V L C
Mouse	S E K N S
	ATTGAGAACAGCTTCATGACTGCCTCCAAGTGA
Human	I E N S F M T A S K
Mouse	S(F)

* Human (人), Mouse (小鼠)

图 1.4 中国发明专利 ZL97107112.8 中人内皮抑素与鼠内皮抑素核苷酸和氨基酸序列比较图, 1997 年 9 月 10 日申请, 2000 年 12 月 20 日授权。已经完成三期临床研究的内皮抑素序列同上相同

4 内皮抑素的结构和性质

我们用基因工程大肠杆菌表达的内皮抑素包括起始密码的甲硫氨酸在内含有 184 个氨基酸, 具有 16 个酸性氨基酸, 29 个碱性氨基酸, 4 个半胱氨酸, Cys163—Cys204、Cys265—Cys295 在其链内可形成两对二硫键。单体含有 7 个 β -折叠、2 个 α -螺旋及铰链区, 氨基末端含有 1 个锌原子配基, 由 2、4、12 位组氨酸及 77 位天门冬氨酸组成,

研究表明如果锌的配体发生突变,如锌不能结合于内皮抑素或者使用 EDTA 去除 Zn^{2+} ,就会严重影响内皮抑素的生物学活性(Boehm, 1998)。疏水氨基酸比例为 42%。N 末端的 27 个氨基酸残基的表面有一个碱性区域,由 11 个氨基酸残基组成,该区域是肝素高亲和的结合位点,决定了内皮抑素对肝素具有高度的亲和能力(Kreuger 2002)。

Ding 等(1998)获得人内皮抑素的晶体,研究发现 H132、H142、H134、Asp207 参与内皮抑素与锌离子的结合,而且以多聚体形式存在围绕锌离子,因此结合锌离子可能与维持其立体结构有关。Yamaguchi 等(1999)在使用基因修饰方法去除锌离子结合位点的研究中表明,内皮抑素具有抑制内皮细胞的迁移以及抑制肿瘤生长的作用,但此过程并不依赖锌离子结合位点。因此推测内皮抑素结合锌可能主要作用于两个方面:一是锌离子的结合有助于内皮抑素维持有活性的构象,从而使内皮抑素保持活性;二是锌离子的结合保护了内皮抑素的 N 末端不被蛋白酶分解,从而防止内皮抑素在体内失活。Standker 等(1997)从人血液中分离到 N 末端缺失 12 个氨基酸的人内皮抑素,并且证明这种内皮抑素对内皮细胞没有抑制作用,这可能是内皮抑素代谢分解中的一种没有活性的副产物,也证明了 N 末端完整是内皮抑素重要的活性结构保证。

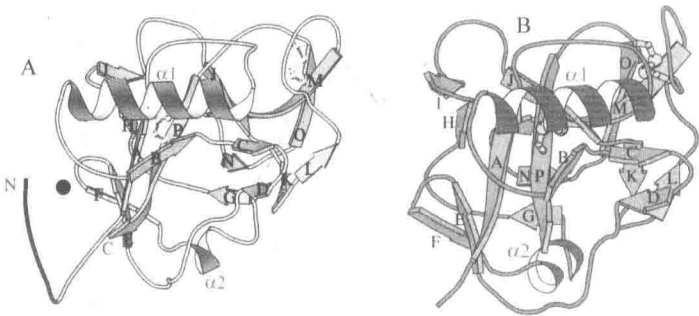


图 1.5 A 为人内皮抑素的三维立体图(Ding, 1998), A~P 为 β -折叠, $\alpha 1 \sim 2$ 为 α -螺旋,附近的黑点代表锌结合位点。B 为小鼠内皮抑素的三维立体图(Hohenester, 1998), A~P 为 β -折叠, $\alpha 1 \sim 2$ 为 α -螺旋

5 内皮抑素的分布

内皮抑素在体内是由胶原蛋白 XVIII 通过两步酶解过程降解产生的, Felbor 等(2000)研究发现参与酶解的可能有弹性蛋白酶(它通过切割丙氨酸、组氨酸从而产生内皮抑素)、组织蛋白酶(Cathepsin L)和基质外金属蛋白酶(MMP)。Ferrerar 等(2000)用 12 种不同的蛋白酶在体外对胶原蛋白 XVIII NC1 片段进行酶解试验,发现其中有 11 种酶可以切出和内皮抑素具有同样 N 端 15 肽的片段,说明该区段对蛋白酶比较敏感。这 11 种酶中有一些还可进一步降解内皮抑素,这可能与内皮抑素的产生和代谢机制有关。Sasaki 等(1998)报道 XVIII 型胶原经组织蛋白酶 L 和弹性蛋白酶依次酶切产生内

皮抑素, Wen 等(1999)认为内皮抑素的生成需要经过早期依赖金属离子的蛋白酶,后期依赖弹性蛋白酶两步切断十八型胶原 Ala-His 之间的肽键。

Sasaki 等(1998)用内皮抑素多克隆抗体进行免疫组化实验,结果表明,内皮抑素分布在发育胚胎中的皮肤、大脑、血管基底膜、肾、肺基底膜和肺包膜上;而在成体组织分布在基底膜、肝细胞、肾基质上,在脑、骨髓肌、心、肾、睾丸、肝等组织含有内皮抑素,且以肝脏最多。Miosge 等(1999)通过对成年小鼠组织进行免疫组化分析发现,内皮抑素主要分布在组织中一些管腔壁和基底膜上,而其中主要是分布在一些主动脉和大动脉上的多层弹性膜,染色较深的位于弹性纤维部位。内皮抑素有少量分布在静脉血管管壁上,小动脉管壁、毛细血管壁则没有分布,说明内皮抑素是组成血管管壁弹性纤维的一种成分,在动脉内膜、中膜中也提纯到大量的内皮抑素。研究发现循环系统状态的内皮抑素可能是由组织(特别是肝细胞)产生,而且可能在血管生成中起调节器的作用。此外,内皮抑素被证实也可从外周血与全血中分离得到(Wen, 1999)。血清中的内皮抑素含量低于组织,表明血清中的内皮抑素可能是由组织中的内皮抑素或者是其前体物质通过某种方式释放到血清中。

Standker 等(1997)从人体循环系统中提取了人源内皮抑素,与鼠源内皮抑素有 85% 以上的同源性,其中包含了 4 个保守的半胱氨酸,但比鼠源内皮抑素在 N 端少 12 个氨基酸和一个潜在的糖基化位点,实验证明,天然提取的这种人源内皮抑素无抑制内皮细胞增生的活性,推测可能与 N 端缺失了 12 个氨基酸有关。何志勇等(2000)从中国人肝细胞中克隆了人内皮抑素基因,经序列分析发现有 5 个碱基与文献报道不一样,蛋白序列中有 3 个氨基酸残基不同,说明内皮抑素存在氨基酸或核苷酸序列差异或单核苷酸的多态性(SNP)。

6 内皮抑素的生物学功能

6.1 内皮抑素抑制内皮细胞增殖、迁移

内皮抑素主要通过抑制促血管生成信号、调控细胞周期和诱导细胞凋亡来抑制内皮细胞的增殖。通过基因工程方法分离纯化得到的内皮抑素能够明显抑制多种不同来源的内皮细胞的增殖作用,而对平滑肌细胞、视网膜色素上皮细胞、EOMA 细胞以及 3T3 成纤维细胞等非内皮细胞没有抑制作用。

O'Reilly 等(1997)最早研究表明,大肠杆菌表达系统中分离纯化得到的重组鼠内皮抑素可以有效地抑制血管内皮细胞在碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导下的细胞增殖、迁移,并能够诱导血管内皮细胞的凋亡,这种抑制作用呈现剂量依赖性。在内皮抑素浓度达到 600 ng/ml 时,达到最大抑制率。

6.2 内皮抑素对新生血管生成的抑制作用

在鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)模型、脉络膜(CNV)模型、斑马鱼模型等多种实验模型中通过实验证明内皮抑素具有抑制新生血管生成的作用。

内皮抑素还可以使内皮细胞表现为形成血管结构时的形态,内皮抑素培养时结合在固体表面可以维持内皮细胞的贴壁伸展形态。Kim 等(2006)研究发现内皮抑素可以抑制人脐静脉内皮细胞穿透人工基底膜的能力,并呈现剂量依赖性。内皮抑素通过抑制血管生成阻止肿瘤的进一步生长,但是血管生成也是一个多步骤的过程。首先,内皮抑素可能促进内皮细胞的凋亡,使肿瘤组织周围不能形成新的血管;其次,内皮抑素可能干扰胞内相关信号传导,阻止内皮细胞运动而抑制血管的形成。另外,内皮抑素可能下调某些基因的表达使得内皮细胞失去迁移能力,从而抑制血管生成。此外,内皮抑素还可能抑制某些在血管生成过程中起重要作用的酶和蛋白质的成熟和活性。

6.3 内皮抑素对肿瘤生长和转移的抑制作用,促进肿瘤细胞凋亡

许多国内外学者利用重组内皮抑素蛋白或者通过内皮抑素基因治疗实验表明,内皮抑素对原发性肿瘤和转移性多种实体瘤的生长和转移都能产生抑制作用。

美国 Folkman 博士在 2006 年一篇综述中汇总了内皮抑素可以明显抑制 65 种不同肿瘤或不同的肿瘤细胞的生长或转移(详见见原始文献),到目前为止,已经有上百种不同的肿瘤或肿瘤细胞被证明内皮抑素对其有抑制效果,多种肿瘤的疗效也已经在临床研究中得到验证。

6.4 内皮抑素能克服或避免肿瘤的抗药性

Boehm 等(1998)用鼠内皮抑素治疗小鼠的 Lewis 肺癌、T241 纤维肉瘤和 B16F10 黑色素瘤,当肿瘤消退后立即停止用药,待肿瘤重新生长到一定大小时再继续治疗,如此分别经过 6、4 或 2 个治疗周期循环后,发现肿瘤生长停止且处于休眠状态。解剖后发现,所有的肿瘤都退化到无需血管也能存活的休眠状态,试验中肿瘤未表现任何抗药性。相比之下,化疗药物经过 3~4 个治疗周期就往往会产生抗药性,几乎丧失了抑瘤作用。但是也有报道认为,内皮抑素治疗中可能出现肿瘤血管生成拟态或导致其他血管生成因子替代作用的获得型耐药,相比较肿瘤细胞对化疗药物出现的耐药性,抗血管生成所产生的上述耐药性概率比较低。有临床病例 10 多个月连续使用内皮抑素也未见耐药现象产生。

表 1.1 重组内皮抑素蛋白抑制鼠和人肿瘤的生长(文献报道研究所用的肿瘤类型目录)

肿瘤类型	参考文献
1. 鼠肿瘤(Murine tumors)	
卵巢癌(Ovarian carcinoma)	(Yokoyama, 2005)
急性髓系白血病(Acute myelogenous leukemia)	(Schuch, 2005)
大肠癌(Colorectal carcinoma)	(Velde, 2005)
乳腺癌(Spontaneous mammary carcinoma, Transplantable mammary carcinoma)	(Yokoyama, 2002; Plum, 2003)
黑色素瘤(B-16 melanoma)	(Cho, 2004)

续表 1.1

肿瘤类型	参考文献
肝癌 (Hepatoma)	(Yue, 2003)
肺癌 (Lung adenocarcinoma, Lewis lung carcinoma)	(Xia, 2003; Huang, 2001)
大鼠脑胶质瘤 (Rat glioma in brain)	(Sorensen, 2002)
小鼠大肠癌肝转移 (Murine colorectal liver metastases)	(Velde, 2002)
SCID 鼠人髓系白血病 (Human myeloid leukemia in SCID rats)	(Iversen, 2002)
大鼠致癌物诱导的乳腺癌 (Rat carcinogen induced mammary cancer)	(Perletti, 2000)
胰岛细胞瘤 (Pancreatic insulinoma)	(Bergers, 1999)
2. 移植到小鼠的人肿瘤 (Human tumors in mice)	
喉鳞状细胞癌 (Laryngeal squamous cell carcinoma)	(Yao, 2004)
胶质母细胞瘤 (Glioblastoma, U87)	(Schmidt, 2004)
前列腺癌 (Prostate carcinoma, PC3)	(Abdollahi, 2003)
神经母细胞瘤 (Neuroblastoma)	(Kuroiwa, 2003)
睾丸癌 (Testicular carcinoma)	(Abraham, 2003)
乳腺癌 (Breast carcinoma)	(Beck, 2003)
头颈部鳞状细胞癌 (Head and neck squamous cell carcinoma)	(Wilson, 2003)
卡波西氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma)	(Mallery, 2003)
胰腺癌 (Pancreatic carcinoma)	(Prox, 2003)
人非小细胞肺癌 (Human non-small-cell lung cancer)	(Boehle, 2001)
脑肿瘤 (Brain tumors, U87)	(Joki, 2001)
非霍奇金淋巴瘤 (Non-Hodgkin lymphoma)	(Bertolini, 2000)
肾细胞癌 (Renal cell cancer)	(Dhanabal, 1999)
膀胱癌 (Bladder cancer)	(Du, 2000)
肺腺癌 (Lung adenocarcinoma)	(Xia, 2003)
恶性胸腔积液淋巴管生成 (Lymphangiogenesis of Malignant Pleural Effusion)	(Ma, 2012)
多发性骨髓瘤 (mutiply myeloma)	(薛英姿, 2012)
人骨肉瘤细胞 9901 (osteosarcoma)	(王东, 2006)

表 1.2 内皮抑素基因治疗抑制的肿瘤类型 (文献报道研究所用的肿瘤类型目录)

肿瘤类型	参考文献
1. 小鼠原发性肿瘤	
肾细胞癌 (Renal cell carcinoma)	(Yoon, 1999)