

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.15.044

重组人血管内皮抑制素(恩度)临床机制的研究进展*

韩楠楠 姜秋颖[△] 李里 滕冲 吕艳菊

(哈尔滨医科大学附属第二医院肿瘤内科 黑龙江 哈尔滨 150000)

摘要:重组人血管内皮抑制素(Endostar,恩度)是由我国科学家自主研发的血管内皮抑制素类抗肿瘤药物,是一种大肠杆菌工程菌发酵产品,在临床上常被用作血管靶向治疗,具有靶向精准、低毒性、不产生耐药等优点。恩度能够抗血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡,然而只应用抗血管生成药物治疗肿瘤患者,并不能使其得到明显的生存获益,恩度联合化疗/放疗具有增敏作用,从而取得显著的疗效。本文对恩度的作用机制进行探讨,以便于为更好的应用于临床提供有益的参考信息。

关键词:重组人血管内皮抑制素;恩度;抗血管生成;凋亡;增敏

中图分类号:R730.5;R979.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)15-2993-03

Advance in the Clinical Mechanism of Recombinant Human Endostatin*

HAN Nan-nan, JIANG Qiu-ying[△], LI Li, TENG Chong, LV Yan-ju

(The second affiliated hospital of Harbin medical university, Harbin, Heilongjiang, 150000, China)

ABSTRACT: Recombinant human endostatin (Endostar) is an endostatin-based antitumor drugs developed independently by Chinese scientists. It is a fermentative product of *Escherichia coli* engineering bacteria and is often used clinically as a vascular targeted therapy, with the advantages of targeted precision, low toxicity, not producing resistance and so on. Endostar is capable of anti-angiogenesis and inducing apoptosis of tumor cells; however, only the application of anti-angiogenic drugs in the treatment of patients with cancer is not able to make them gain significant survival benefit. Endostar combined with chemotherapy/radiotherapy has a sensitizing effect, so as to achieve a one-plus-one-is-greater-than-two effect. This article discusses the mechanism of Endostar, in order to better apply to clinic.

Key words: Recombinant human endostatin; Endostar; Anti-angiogenesis; Apoptosis; Sensitization

Chinese Library Classification(CLC): R730.5; R979.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)15-2993-03

前言

无限制侵袭生长和远处转移是恶性肿瘤的两大特征。早在1971年,Folkman^[1]教授首次指出肿瘤的生长及远处转移与新生血管的生成有着紧密关系,并开始通过抗肿瘤新生血管生成,从而抑制肿瘤的生长及转移的研究。现有的血管靶向药物大致分为四类:①血管内皮生长因子(VEGF)中和性抗体;②阻断VEGF及其受体之间的相互作用;③应用小分子药物针对性干扰血管内皮生长因子受体(VEGFR)酪氨酸激酶的功能;④血管内皮抑制剂,如血管内皮抑制素(endostatin, ES)。血管内皮抑制素是于1997年由O'Reilly MS等^[2]从培养的鼠血管内皮瘤培养液中提取并发现的。2005年,我国自主研发的恩度正式予以批准上市,用于临床靶向治疗^[3]。随后,其联合化疗/放疗的治疗方法使患者显著获益,本文就其机制进行综述,以供临床研究参考。

1 恩度抗血管生成作用

肿瘤血管生成是实体瘤发展、转移的至关重要步骤,正性调节因子与负性调节因子之间的“力量”对比是其分子学基础。肿瘤血管的生成则是正性调节因子增多和/或负性调节因子

减少的结果,抗血管生成药物则能够调整因子表达,扭转失衡状态^[4]。VEGF是促进肿瘤血管形成最重要的正性调节因子之一,有助于促使内皮细胞进行增殖分化及迁移,使血管的通透性增加,同时对促使淋巴内皮细胞生长有一定作用,这些都为肿瘤的生存奠定了基础。恩度作用于VEGFR,使VEGF和内皮细胞的结合受阻,从而导致VEGF失去作用;除此之外,恩度还可以使VEGF的mRNA和蛋白表达下调,从而使VEGFR不能发挥信号转导作用^[5]。这样以来,恩度便发挥了其抑制血管的内皮细胞增生、迁移的作用,切断肿瘤的养料供应;降低了血管内皮细胞与周围接触的机会,从而抑制肿瘤的发展及转移^[6,7]。随着对恩度的深入研究,又有学者表示恩度并非通过最大程度的抑制血管生成发挥作用,而是使肿瘤血管的生长趋于正常化。刘妍等^[8]研究显示恩度作用于人脐静脉内皮细胞(HUVEC)后,刚贴壁及对数生长期细胞的表面分子标志物CD105的表达随恩度浓度及作用时间下调。说明恩度能够抑制血管内皮活化,使其进入停滞状态,从而抑制新生血管形成。

2 恩度诱导肿瘤细胞凋亡

研究证实恩度还能促使一些肿瘤细胞的凋亡^[9]。细胞凋亡在生物体生存方面具有至关重要的作用^[10]。主要涉及的蛋白类

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81702464)

作者简介:韩楠楠(1989-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤学,电话:17743487114, E-mail: 757512390@qq.com

△ 通讯作者:姜秋颖(1963-),女,主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向:肿瘤学, E-mail: jiangqiuying@medmail.com.cn

(收稿日期:2018-11-23 接受日期:2018-12-18)

分子有:Bcl-2、凋亡蛋白酶(caspases)、凋亡抑制蛋白(IAPs)^[11]。正常调控下的细胞凋亡可起到维持机体稳定的作用,当凋亡机制异常时,便导致疾病的发生。Bcl-2在细胞凋亡的抑制过程中起着重要作用,其低表达可促使肿瘤的凋亡。姜等^[12]发现Bcl-2这种抑制细胞凋亡的基因在乳腺癌的发生、进展过程中有所参与,恩度与紫杉醇联合治疗乳腺癌能够使bcl-2的表达降低,从而诱导肿瘤细胞凋亡。Bax隶属于Bcl基因族,其本身不能发挥诱导凋亡作用,需通过加速细胞信号的传导激发细胞凋亡,Bcl/Bax的比值决定细胞是否进入凋亡,其比值降低则诱导凋亡,此外,CyclinD1的过度表达也是使肿瘤细胞增殖的重要原因之一^[13],因此CyclinD1低表达可使肿瘤细胞死亡。孙等^[14]研究显示恩度作用于ER(雌激素受体)阳性的人乳癌细胞MCF-7时存在时间和浓度依赖性,当时间延长、浓度增加时对肿瘤细胞的抑制作用增强,结果显示恩度使Bcl-2表达下降、Bax表达增加,使得Bcl-2/Bax的比率降低而发挥作用,该项研究还显示恩度亦可通过降低CyclinD1蛋白表达发挥抗肿瘤作用。许多研究证实,Caspases蛋白经一系列活化后参与肿瘤细胞凋亡^[15-17]。IAPs可与caspases等结合进而在细胞的凋亡过程中起作用,研究表明,Livin属于IAPs的一员^[18-20],肺癌A549细胞经恩度作用后,Western blot结果表明,Livin蛋白的表达较作用前有所下降;随着恩度浓度的增大,Caspases-9蛋白得到明显活化。这表明恩度对肺癌A549细胞的作用可能得益于恩度能使Livin蛋白表达下降、增强Caspases-9的活化程度,也进一步推测通过降低Livin蛋白的表达,使得IAP解除了对Caspase-9的抑制,从而使Caspase-9得到激活发挥作用。但其他凋亡蛋白是否也参与其中,尚需进一步探究^[21]。

3 恩度联合化疗的增敏作用

我国学者们积极开展恩度联合化疗治疗多种恶性肿瘤的研究,进一步证实恩度联合化疗对肺癌、乳腺癌、胃癌、黑色素瘤等多种肿瘤的疗效优于单一化疗^[22,23],且未观察到化疗毒副作用增加,还能有稳定病情,延长生存时间,改善患者生活质量的优势^[24]。使得肿瘤病人明显延长生存获益,值得在临床上广泛应用^[25]。研究表明恩度可通过改善细胞内供氧情况,从而使肿瘤细胞间质的压力降低,使得化疗药物更均匀的渗透到肿瘤内部,起到与化疗协同抗肿瘤的作用。孙相辉^[26]将恩度与不同化疗方法联合应用于92例晚期肿瘤患者,临床治疗有效率达38.04%,采用二线的化疗方法治疗有效率(48.39%)高于一线(15.38%)和三线(17.65%);治疗前患者血清VEGF表达水平平均值为(396.76±113.91)pg/mL,治疗后患者血清VEGF表达水平平均值为(196.77±63.75)pg/mL,治疗前后患者VEGF表达水平差异具有统计学意义,该研究结果表明恩度与不同化疗方法联合应用于恶性肿瘤患者,能够显著降低患者血清VEGF表达水平,可有效控制肿瘤患者病情进展。细胞周期分为G0期(静止期)、G1期(DNA合成前期)、S期(DNA合成期)、G2期(DNA合成后期)和M期(有丝分裂期),研究发现^[27]恩度联合化疗很有可能促进了G1/M期细胞的凋亡,恩度与紫杉醇热化疗间存在协同作用,恩度得以发挥效应与热作用有关,该研究结果提示:43℃的热作用下恩度与480nmol/L的紫杉醇联合作用于人胃癌SGC7901细胞株1小时,其抑制增殖作用在各组中最强。刘少平等^[28]研究提示,恩度联合化疗能够降低VEGF和成纤维细胞生长因子(bFGF)在肿瘤组织中的表达,使非小细胞

肺癌患者血清中的VEGF和bFGF表达水平降低,从而发挥更好的疗效。

4 恩度联合放疗的增敏作用

4.1 诱导DNA损伤

近来研究表明,恩度可促使肿瘤血管趋于正常化生长,降低组织间的压力,提高放疗效果,恩度联合放疗具有增敏作用^[29]。恩度联合放疗用于Lewis肺癌细胞移植瘤的相关实验证实二者联合比单纯放疗疗效好,其放疗增敏机制可能是由于诱导DNA损伤所引起。还有一些研究表明二者联合发挥增敏作用的可能机制包括调整肿瘤细胞内的乏氧状况及细胞周期,调节促血管生成因素。

4.2 改善乏氧及调整细胞周期

实体瘤细胞中常发生乏氧,当肿瘤直径大于1-2mm时,胞内产生乏氧,而乏氧状态下会诱导血管形成,增加肿瘤的转移几率,从而影响放疗的有效性。恩度联合放疗能够使瘤内的乏氧状况得以改善,使肿瘤无序生长的血管出现暂时的“有序化”,在这个正常化时间窗期提高了放射线的杀伤率^[30]。Peng等^[31]发现恩度与放疗联合,增强了鼻咽癌转移瘤对放疗的敏感程度,这可能是由于恩度可改善细胞的乏氧环境,使得血管趋于有序生长,在使用恩度后5-7天出现血管正常化时间窗,此时应用放疗可取得显著疗效。当细胞处于不同周期时,其对放疗的敏感程度也不同。对放疗最敏感的细胞周期是G2/M期。Zhang^[32]和Jiang^[33]等研究发现恩度可通过影响A549肺癌细胞的细胞周期,进而发挥放疗增敏作用,即肿瘤细胞经恩度处理后,导致G2/M期细胞明显增加,推断出恩度可能通过阻滞肿瘤的细胞周期,使得细胞停留在G2/M期,进而使A549细胞的放射敏感程度提高。

4.3 调节血管生成因子

恩度联合放疗还可通过调节促血管生成因子发挥增敏作用,如VEGF、缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor, HIF-1)等。袁智勇等^[34]研究表明,恩度与放疗联合发挥增敏作用与VEGF、基质金属蛋白酶-2(MMP)和微血管密度(MVD)的表达情况发生变化有关。研究显示肿瘤细胞中HIF-1表达普遍增高,其在肿瘤血管生成过程中起着至关重要的作用,并可影响其他因子水平,能够稳定VEGF的mRNA,在乏氧状态下,HIF-1能够与VEGF启动区结合,促使新生血管生成^[35]。李等^[36]指出恩度能够诱导肝脏HepG2细胞凋亡,其机制可能与HIF-1的表达被下调有关。我们推测,恩度可通过下调这些促血管生成因子水平,增强肿瘤对放疗的敏感性。

5 小结与展望

肿瘤是机体在各种因素刺激下,调控基因对细胞的生长失去控制,导致细胞发生异常增殖的新生物。肿瘤的发生、发展离不开新生血管的滋养,如何将抗血管生成药物与化疗、放疗联合应用的疗效发挥到最大,且副作用最小,仍是今后研究的方向。恩度作为一种新型抗肿瘤药物现已广泛应用于临床,其优点已在基础及相关临床研究中得到证实,但与其联合应用的详细机制尚需进一步探究,是否肿瘤还有其他途径促使血管生成,是否恩度对其他凋亡蛋白起作用仍需考量,是否恩度还可治疗除肿瘤外的其他疾病等问题亟待解决,此前大量的研究已为今后的前行开辟了道路,也为临床实践提供了宝贵的资料,

相信在此基础上,精准医疗下的大数据模型必将为临床提供更精确的指导,以造福患者。

参考文献(References)

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implication [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186
- [2] 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
- [3] Hu Y, Hu MM, Shi GL, et al. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin correlates with the prognosis of operable non-small cell lung cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2014, 40 (9): 1136-1142
- [4] Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, et al. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drugs penetration in tumors[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3731-3736
- [5] Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, et al. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy?[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(12): 942-956
- [6] Versleijen-Jonkers YM, Vletterie M, van de Luijngaarden AC, et al. Anti-angiogenic therapy, a new player in the field of sarcoma treatment[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014, 91(2): 172-185
- [7] Ranieri G, Ammendola M, Marech I, et al. Vascular endothelial growth factor and tryptase changes after chemoembolization in hepatocarcinoma patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21 (19): 6018-6025
- [8] Liu Yan, Zhang Chuan-gui, Li Kai. The effect of rh-endostatin on phenotype of HUVECs at different activating levels [J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2009, 36(23): 1370-1373
- [9] 王晓利,王晓成,徐晓明,等.联合应用重组人血管内皮抑素与紫杉醇对乳腺癌细胞株 SK-BR-3 诱导凋亡作用研究[J].*河北医学*, 2017, 23(7): 1091-1094
- [10] 买买提艾力·哈斯木,江仁兵,白靖平,等.二膦酸盐对人骨肉瘤细胞诱导凋亡作用的实验研究 [J]. *重庆医学*, 2016, 45 (27): 3757-3759+3762
- [11] 郭燕子,符健.肿瘤细胞凋亡及常用检测方法[J].*中国热带医学*, 2017, 17(04): 413-417
- [12] 姜秋颖,金英华,张冉冉,等.重组人血管内皮抑素联合紫杉醇化疗对人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞抗凋亡基因 Bcl-2 的影响[J].*中国医药导报*, 2016, 13(35): 92-95
- [13] Yang Yong-zhi, Wang Feng, Shi Chen-zhang, et al. Cyclin D1 G870A polymorphism contributes to colorectal cancer susceptibility: evidence from a systematic review of 22 case-control studies[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36813-36821
- [14] 孙富家,刘欣,陈林林,等.恩度对雌激素受体阳性的人乳腺癌细胞生长的抑制作用及其分子机制的研究[J].*烟台大学学报: 自然科学与工程版*, 2013, 26(2): 267-273
- [15] Zhang ZY, FU SL, XU SQ, et al. By downregulating ku80, hsa-mir-526b suppresses non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(3): 1462-1477
- [16] LEV-ARI S, STARR A, KATZBURG S, et al. Curcumin induces apoptosis and inhibits growth of orthotopic human non-small cell lung cancer xenografts[J]. *Nutr Biochem*, 2014, 25(8): 843-850
- [17] Yang T, THAKUR A, CHEN T, et al. MicroRNA-15a induces cell apoptosis and inhibits metastasis by targeting bcl2 in non-small cell lung cancer[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(6): 4357-4365
- [18] Zhang S, Zheng X, Huang H, et al. Afatinib increases sensitivity to radiation in non-small cell lung cancer cells with acquired egfr t790m mutation[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 5832-5845
- [19] Xu Dong-xu, Chen Da, Ye Bo, et al. Curcumin induces the apoptosis of non-small cell lung cancer cells through a calcium signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35(6): 1610-1616
- [20] Kyung Mi Yang, Byeong Mo Kim, Jin-Byung Park. ω -Hydroxyundec-9-enoic acid induces apoptosis through ros-mediated endoplasmic reticulum stress in non-small cell lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 448(3): 267-273
- [21] 苏莹,柳江,陈茹.重组人血管内皮抑制素注射液抑制非小细胞肺癌细胞 A549 增殖及诱导凋亡研究[J].*新疆医科大学学报*, 2017, 40 (8): 1065-1068+1073
- [22] Rong BX, Yang SY, Li W, et al. Systematic review and meta-analysis of Endostar (rh-endostatin) combined with chemotherapy versus chemotherapy alone for treating advanced non-small cell lung cancer [J]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10(3): 170
- [23] Li Xiao-chen, Liu Xian-sheng, Xu Yong-jian, et al. Klf5 promotes hypoxia-induced survival and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer cells via hif-1 α [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(4): 1507-1514
- [24] Ready NDA, Wang XF. et al. CALGB 30306: a phase II study of cis-platin(C), Irinotecan(i)and bevacizumab(B)for untreated extensive stage small cell lung cancer(ES-SCLC)[J]. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology*, 2007, 400S
- [25] 邢锬元,郝学志,胡兴胜,等.重组人血管内皮抑制素在晚期肺鳞癌治疗中的临床应用[J].*中国肺癌杂志*, 2016, 19(10): 670-674
- [26] 孙相辉. 恩度联合化疗治疗多种晚期恶性肿瘤的临床效果及对 VEGF 的影响分析[J].*中外医疗*, 2016, 35(2): 64-65
- [27] 洪雷,魏素菊,刘巍,等.恩度联合紫杉醇热化疗对人胃癌 SGC7901 细胞株增殖抑制及凋亡影响[J].*河北医药*, 2014, 36(8): 1128-1131
- [28] 刘少平,钱文军,茅卫东.恩度对晚期非小细胞肺癌患者血清 VEGF 和 bFGF 的影响[J].*郑州大学学报(医学版)*, 2013, 48(01): 144-146
- [29] 张或,邹春芳.恩度联合化疗对初诊晚期非小细胞肺癌的效果[J].*齐鲁医学杂志*, 2016, 31(1): 13-14, 17
- [30] Meng MB, Jiang XD, Deng L, et al. Enhanced radioresponse with a novel recombinant human endostatin protein via tumor vasculature remodeling: experimental and clinical evidence [J]. *Radiother Oncol*, 2013, 106(1): 130-137
- [31] Peng Fang, Xu Zu-min, Wang Jin, et al. Recombinant Human Endostatin Normalizes Tumor Vasculature and Enhances Radiation Response in Xenografted Human Nasopharyngeal Carcinoma Models[J]. *Plos One*, 2012, 7(4): e34646
- [32] Zhang Ling, Ge Wei, Hu Ke, et al. Endostar down-regulates HIF-1 and VEGF expression and enhances the radioresponse to human lung adenocarcinoma cancer cells[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (1): 89-95
- [33] Jiang Xiao-dong, Qiao Yun, Dai Peng, et al. Enhancement of recombinant human endostatin on the radiosensitivity of human pulmonary adenocarcinoma A549 cells and its mechanism [J]. *Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 301931
- [34] 袁智勇,秦培燕,庄洪卿,等.恩度不同给药时相对肺癌裸鼠移植瘤辐射增敏效应研究[J].*中国肿瘤临床*, 2012, 39(10): 648-651
- [35] Ellis L, Hammers H, PiLi R. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors[J]. *Cancer Lett*, 2009, 280(2): 145-453
- [36] 李丽娜,南克俊,徐瑞.恩度联合吉西他滨对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用及对 HIF-1 α 、VEGF 表达的影响[J].*现代肿瘤医学*, 2013, 21 (8): 1703-1707