

·述 评 Comment·

内皮抑素及其介入法应用

官泳松, 邹立群, 贺庆

【摘要】 血管生成涉及机体的许多生理和病理活动,包括肿瘤的发生、维持和进展。血管生成的具体情况取决于促血管生成因子与抗血管生成因子之间的动态平衡。血管生成抑制剂可特异性抑制内皮细胞增殖、迁移和管道形成,其中之一是内皮抑素。内皮抑素具有强烈的抑制血管生成作用,作用范围广,对多血管肿瘤有治疗作用。本文根据内皮抑素的作用机制、结构和生物学功能,推荐抗肿瘤治疗的具体方法和产品,指出其在介入放射学领域中应用时需注意的问题。科研和临床工作中必须认真设计科学、严格的使用方案。只有与有效破坏肿瘤组织的方法联合应用,争取协同、加强作用,才能得到显著的客观疗效。

【关键词】 血管生成; 内皮抑素; 肿瘤; 治疗; 介入给药

中图分类号:R73-36 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2009)-04-0241-03

Endostatin and its interventional application GUAN Yong-song, ZOU Li-qun, HE Qing. Department of Oncology, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, West China Medical School, Sichuan University, Chengdu 610041, China

【Abstract】 Angiogenesis, i.e. neovascularization from preexisting vasculature, is involved in a variety of physiological and pathological processes of the body, including the initiation, maintenance and progression of tumors. The process of angiogenesis depends on the dynamic balance between the activities of pro-angiogenic and anti-angiogenic factors. Angiogenesis inhibitors specifically prevent endothelial cells from proliferation, migration and tube formation. One of the inhibitors is endostatin, which is of wide spectrum and possesses profound angiogenesis inhibition and therapeutic effects on tumors with rich vasculature. This paper aims to explain the mechanism of the action, structure and biological function of endostatin, and to discuss its application in anti-neoplastic therapies and the issues in the field of interventional radiology. The authors point out emphatically that the application scheme must be designed strictly and scientifically. Only when combination use of endostatin with other therapeutics which can effectively destroy tumor tissues is carried out to gain synergistic and intensified effect, can marked objective efficacy be obtained. (J Intervent Radiol, 2009, 18: 241-243)

【Key words】 angiogenesis; endostatin; tumor; therapy; interventional administration

在使用介入方法应用基因治疗肿瘤时,有一类药物正逐渐受到重视,即血管生成抑制剂,如血管生成抑制因子(angiotatin)、凝血酶敏感蛋白(thrombospondin)、白细胞介素类、蛋白裂解产物等。1997年O'Reilly等^[1]从小鼠血管内皮瘤上清液中得到一种内源性多肽,能特异性抑制内皮细胞增殖,具有强烈的抑制血管生成作用,而且作用范围广,命名为内皮抑素(endostatin),对富血管肿瘤有治疗作用,近年来受到了较广泛和深入的研究^[2,3]。

1 内皮抑素的作用机制

内皮抑素的作用机制目前尚未完全阐明,但可以初步地解释为通过调节体内某些蛋白水平,从而抑制内皮细胞的生物学功能。这种调节通常是负调节,即降低受调节蛋白的生物学活性。而内皮细胞受抑制的直接后果就是细胞周期停滞、生长受阻、迁移障碍和细胞凋亡。有人假定血管生成受某“开关”调控,肿瘤生长需要打开这个开关,而正常生理情况下这个开关则处于关闭状态。目前需要在成年人体内阐明,当该开关关闭时,究竟是抗血管生成因子的量远远超过促血管生成因子的量,还是两者的活动之间处于某种微妙的平衡^[4,5]。

作者单位:610041 四川大学华西医院肿瘤科,四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室

通信作者:官泳松

2 内皮抑素的结构和生物学功能

2.1 结构特点

内皮抑素是胶原 XVIII 的降解产物,为其 C 端的一部分,分子量 20×10^3 u。氨基酸序列分析显示共 184 个氨基酸残基。有 3 个主要结构域:分子量为 5 000 u 的 N 端区域,中间蛋白酶敏感绞链区域和 C 端内皮抑素区域。近 N 端有一锌离子。内皮抑素具有独特的肝素结合位点,其抑制血管生成既有依赖肝素也有不依赖肝素的机制^[6]。

2.2 生物学功能及临床意义

组织、器官维持正常生理活动,肿瘤生长、侵袭和转移都需要形成新的微血管。内皮抑制通过抑制内皮细胞增殖、抑制血管生成而抑制肿瘤生长。

2.2.1 抑制血管内皮细胞 体内外实验均证明,内皮抑素能特异地抑制内皮细胞的增殖,并通过抑制细胞周期蛋白 D1 诱导其凋亡。血管生成抑制剂是机体内天然产物,以正常内皮细胞为靶点,因而不容易产生耐药性^[7]。

2.2.2 抑制血管生成 内皮抑素能干扰某些生长因子的促血管生成作用,如碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)。而某些多血管肿瘤如恶性神经胶质瘤则产生 VEGF^[3]。肿瘤如果没有血管供给营养和运走代谢产物,最多只能长到数立方毫米,因此内皮抑素能阻止肿瘤进入临床表现期^[7]。

2.2.3 抑制肿瘤生长和转移 血管生成是一受调节的过程,取决于促血管生成因子和抗血管生成因子之间在局部的动态平衡,发生向血管生成一方的转变,乃是肿瘤进展的关键一步。内皮抑素可干扰这一平衡,通过消除肿瘤血管而使肿瘤完全停止生长。已经发现内皮抑素能抑制 60 多种肿瘤的进展,在多种人类肿瘤的小鼠模型上抑制肿瘤转移^[8]。

3 抗肿瘤血管生成治疗

可以直接使用重组内皮抑素蛋白,但因其为活性蛋白,极不稳定,易失活,体内半衰期短(仅 10.7 h 左右),效果呈剂量依赖关系,用于抗血管生成治疗时需要反复输入高浓度的药物,费用高,在临床应用上受到限制。重组内皮抑素基因工程表达系统主要有大肠埃希菌表达系统、酵母表达系统、哺乳动物细胞表达系统等^[9]。

通过载体转导内皮抑素基因,如重组人内皮抑素腺病毒的肿瘤局部血管基因治疗,能抑制肿瘤新生血管形成而有效抑制肿瘤生长和转移。但有人认

为局部转基因治疗只对肿瘤的生长有作用,提出全身应用可溶性好、活性强的内皮抑素才能防止肿瘤发生^[10]。

用藻酸盐制成微胶囊,包裹分泌内皮抑素的重组细胞,再将微胶囊植入体内,可以长期持续分泌内皮抑素蛋白^[11]。

4 在介入放射学领域的应用

应用血管生成抑制剂治疗,可使肿瘤细胞停止在 G1 期,但不能直接破坏肿瘤组织,称为休眠治疗^[2]。只有与有效破坏肿瘤组织的方法联合应用,争取协同、加强作用,才能得到显著的客观疗效。而介入放射学是公认的治疗肿瘤的有效方法,具有微创性、可重复性强、定位准确、疗效好、见效快等特点。由于血管生成是受局部调节而不是全身调节,所以内皮抑素以局部应用为好。

国内已有市售蛋白产品重组人血管内皮抑制素注射液(商品名 Endostar, 恩度),适应证为与长春瑞滨和顺铂联合用于初治或复治的 III/IV 期非小细胞肺癌。静脉滴注每天 1 次,每次 7.5 mg/m^2 ($1.2 \times 10^5 \text{ u/m}^2$),连续给药 14 d 为 1 个周期。恩度采用大肠埃希菌表达和纯化,其抗血管生成作用主要是影响 VEGF 信号通路。体外实验证明,恩度抑制 VEGF 所激发的脐静脉内皮细胞的增殖、迁移和血管形成。动物实验证明恩度能阻止大鼠主动脉环萌生微血管^[12]。

另外,贝伐珠单抗(Bevacizumab, 商品名 Avastin)为重组人类单克隆 IgG1 抗体,也具抑制人 VEGF 的生物学活性,美国 FDA 批准上市,用于联合与 5-Fu 为基础的化疗方案一线治疗晚期结肠、直肠癌^[13]。

5 问题和展望

内皮抑素治疗肿瘤需要长期使用,而长期使用蛋白产物会造成免疫反应;生产成本高,技术复杂,使广泛应用受到限制。有人提出用微泵持续给药能以较低剂量获得更大疗效^[14]。用介入法导入基因可以在局部持续表达高浓度的蛋白,既提高局部治疗肿瘤的效果,又避免了全身免疫反应,还能降低治疗费用。虽然正常内皮细胞不对内皮抑素产生耐受性,但长期使用可能对血液循环中的内皮细胞产生动员作用,使之向肿瘤迁徙。有的肿瘤还可能上调促侵袭分子的水平,加快沿血管的浸润性生长^[3]。为尽快让该药进入临床使用,要求我们进一步研究肿瘤

对抗血管生成治疗产生耐受的机制。

必须认真设计科学、严格的使用方案。在需要促血管生成的情况下,如合并糖尿病、冠状动脉疾病的患者,则要慎用这类抗血管生成药物。而这类患者体内的抗血管生成因子已经处于很高水平,其调节机制也与正常人不同^[15]。寻找具有高度选择性的给药系统也有应用前景。把载有内皮抑素基因的青春双歧杆菌注入患肿瘤小鼠的尾静脉,结果只在肿瘤内找到青春双歧杆菌,在正常组织中却没有。说明这种细菌只在肿瘤内繁殖,可以作为高效率的基因载体^[16]。联合使用 2 种以上的抗血管生成基因也有希望获得更好的治疗效果。如同时转导血管生成抑制因子和内皮抑素 2 种基因可获得协同作用,对肿瘤的抑制作用十分明显^[17]。

[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: 277 - 285.
- [2] Dell'Eva R, Pfeffer U, Indraccolo S, et al. Inhibition of tumor angiogenesis by angiostatin: from recombinant protein to gene therapy[J]. *Endothelium*, 2002, 9: 3 - 10.
- [3] Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas [J]. *Lancet Neurol*, 2008, 7: 1152 - 1160.
- [4] Sato Y. Update on endogenous inhibitors of angiogenesis [J]. *Endothelium*, 2006, 13: 147 - 155.
- [5] Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 3967 - 3979.
- [6] Zetterstrom UK, Felbor U, Fukai N, et al. Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis[J]. *Cell Struct Funct*, 2000, 25: 97 - 101.
- [7] Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB, et al. Endostatin: current concepts about its biological role and mechanisms of action[J]. *Biochemistry*, 2007, 72: 235 - 246.
- [8] Neskey DM, Ambesi A, Pumiglia KM, et al. Endostatin and anastellin inhibit distinct aspects of the angiogenic process[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 27: 61.
- [9] Huang X, Wong MK, Zhao Q, et al. Soluble recombinant endostatin purified from *Escherichia coli*: antiangiogenic activity and antitumor effect[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 478 - 481.
- [10] Schaffhauser B, Veikkola T, Strittmatter K, et al. Moderate antiangiogenic activity by local, transgenic expression of endostatin in Rip1Tag2 transgenic mice [J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80: 669 - 676.
- [11] Zhang Y, Wang W, Xie Y, et al. Optimization of microencapsulated recombinant CHO cell growth, endostatin production, and stability of microcapsule in vivo[J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008, 84: 79 - 88.
- [12] Ling Y, Yang Y, Lu N, et al. Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361: 79 - 84.
- [13] Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333: 328 - 335.
- [14] Kurosaka D, Yoshida K, Yasuda J, et al. The effect of endostatin evaluated in an experimental animal model of collagen-induced arthritis[J]. *Scand J Rheumatol*, 2007, 36: 434 - 441.
- [15] Sodha NR, Boodhwani M, Clements RT, et al. Increased antiangiogenic protein expression in the skeletal muscle of diabetic swine and patients[J]. *Arch Surg*, 2008, 143: 463 - 470.
- [16] Li X, Fu GF, Fan YR, et al. Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth [J]. *Cancer Gene Ther*, 2003, 10: 105 - 111.
- [17] Uesato M, Gunji Y, Tomonaga T, et al. Synergistic antitumor effect of antiangiogenic factor genes on colon 26 produced by low-voltage electroporation[J]. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11: 625 - 632.

(收稿日期:2009-01-12)

作者: 官泳松, 邹立群, 贺庆
作者单位: 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 四川大学华西医院肿瘤科, 610041
刊名: 介入放射学杂志 **ISTIC PKU**
英文刊名: JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY
年, 卷(期): 2009, 18(4)
被引用次数: 1次

参考文献(17条)

1. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Cell, 1997, 88:277-285.
2. Dell'Eva R, Pfeffer U, Indraccolo S, et al. Inhibition of tumor angiogenesis by angiostatin: from recombinant protein to gene therapy[J]. Endothelium, 2002, 9:3-10.
3. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas[J]. Lancet Neurol, 2008, 7:1152-1160.
4. Sato Y. Update on endogenous inhibitors of angiogenesis[J]. Endothelium, 2006, 13:147-155.
5. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis[J]. Cancer Res, 2005, 65:3967-3979.
6. Zetterstrom UK, Felbor U, Fukai N, et al. Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis[J]. Cell Struct Funct, 2000, 25:97-101.
7. Digtyar AV, Pozdnyakova NV, Feldman NB, et al. Endostatin: current concepts about its biological role and mechanisms of action[J]. Biochemistry, 2007, 72:235-246.
8. Neskey DM, Ambesi A, Pumiglia KM, et al. Endostatin and anastellin inhibit distinct aspects of the angiogenic process[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2008, 27:61.
9. Huang X, Wong MK, Zhao Q, et al. Soluble recombinant endostatin purified from Escherichia coli: antiangiogenic activity and antitumor effect[J]. Cancer Res, 2001, 61:478-481.
10. Schaffhauser B, Veikkola T, Strittmatter K, et al. Moderate antiangiogenic activity by local transgenic expression of endostatin in Rip1Tag2 transgenice[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80:669-676.
11. Zhang Y, Wang W, Xie Y, et al. Optimization of microencapsulated recombinant CHO cell growth, endostatin production, and stability of microcapsule in vivo[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008, 84:79-88.
12. Ling Y, Yang Y, Lu N, et al. Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDB/Flk-1 of endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361:79-84.
13. Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 333:328-335.
14. Kurosaka D, Yoshida K, Yasuda J, et al. The effect of endostatin evaluated in an experimental animal model of collagen-induced arthritis[J]. Scand J Rheumatol, 2007, 36:434-441.
15. Sodha NR, Boodhwani M, Clements RT, et al. Increased antiangiogenic protein expression in the skeletal muscle of diabetic swine and patients[J]. Arch Surg, 2008, 143:463-470.
16. Li X, Fu GF, Fan YR, et al. Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for

[cancer gene therapy:selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth\[J\].Cancer Gene Ther, 2003, 10: 105-111.](#)

17. [Uesato M, Gunji Y, Tomonaga T, et al. Synergistic antitumor effect of antiangiogenic factor genes on colon 26 produced by low-voltage electroporation\[J\]. Cancer Gene Ther, 2004, 11: 625-632.](#)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 [苗新普. 李建生. 师晓天. 食管鳞癌中鸟氨酸脱羧酶mRNA、内皮抑素mRNA表达和血管生成相关性研究 - 中华消化杂志 2004, 24 \(11\)](#)

目的研究鸟氨酸脱羧酶(ODC)mRNA、内皮抑素mRNA和微血管密度(MVD)在食管鳞癌中的表达及相关关系,探讨ODC在食管鳞癌血管生成中的可能作用,及其与肿瘤浸润和转移的关系.方法用半定量RT-PCR法测定41例食管鳞癌患者癌组织(T)和相应癌旁组织(N)中的ODC mRNA和内皮抑素mRNA表达,求得各自T/N值;同时用免疫组化方法测定癌组织和癌旁正常组织MVD的T/N值.结果在41例患者中,39例ODC mRNA的T/N值>1.0,占95.1%;40例MVD的T/N值>1.0,占97.6%.36例内皮抑素mRNA的T/N值>1.0,占87.8%.ODC mRNA、内皮抑素mRNA和MVD与食管鳞癌的肿瘤大小、浸润深度和淋巴结转移有关,ODC mRNA、内皮抑素mRNA表达与肿瘤分化程度有关.ODC mRNA的T/N值与MVD的T/N值呈正相关,与内皮抑素mRNA的T/N值呈负相关,内皮抑素 mRNA的T/N值与MVD的T/N值呈负相关.结论 ODC与食管鳞癌血管生成和肿瘤浸润转移密切相关.ODC过表达可能是通过抑制内皮抑素而促进血管生成,从而促进食管鳞癌的浸润和转移.

2. 学位论文 [张德新. 内皮抑素、Mig和血管抑素的克隆、表达、纯化及初步活性鉴定 1999](#)

血管生成指从已存在的血管产生新血管的过程,它是哺乳动物个体生长、发育和许多生理和病理过程的重要组成部分.生理状况下,正常成人仅在某些特定时期,如伤口愈合和女性的月经期和妊娠期,血管生成处于活跃状态.此时血管生成刺激因子合成增加同时伴有血管生成抑制因子合成减少.这种血管生成是一个受到严密调控的过程,经过短暂的增殖期后,血管内皮细胞很快回到正常的静止状态.但在一些疾病状态下,如糖尿病性视网膜疾病、关节炎和其它一些炎症中,由于正常的血管生成调控机制失控,血管生成又变得十分活跃并促使和维持这些疾病状态的延续和发展.特别指出,实体肿瘤的生长不仅具有血管依赖性,而且在肿瘤转移传播和生长过程中,血管生成也起着至关重要的作用.体内血管生成受到血管生成刺激因子和血管生成抑制因子两方面的调节,当二者之中的某一方面或两方面都出现变化时,就可能使血管生成表型出现转换.内源性血管生成抑制因子是一组由于多种细胞分泌的或由较大的蛋白分子降解后产生的多肽分子.血管抑素和内皮素是两个最新发现的小鼠内源性血管生成抑制因子.二者都具有强烈抑制小鼠原发肿瘤和转移瘤生长的功能.但至今还没有有关人内皮抑素血管生成抑制活性的报道.Mig是一个具有血管生长抑制活性的ELR'→CXC趋化因子家族成员,但它的血管生成抑制机制还不清楚.结果表明,在杆状病毒表达系统中所表达的分泌型小鼠Mig、血管抑素和内皮抑素具有生物活性.该课题用实验首次证明,小鼠Mig蛋白在分泌后具有分子量大小的多样性,推测可能由全长蛋白降解产生.小鼠Mig可以引起活化T细胞内钙离子浓度的增加,但对毛细血管内皮细胞增殖没有影响.Mig可能通过其它机制抑制体内血管生成.

3. 期刊论文 [王建交. 杨立庄. 刘福生. 金贵善. 柴奇. WANG Jian-jiao. YANG Li-zhuang. LIU Fu-sheng. JIN Gui-shan. CHAI Qi. 内皮抑素和血管生成抑素融合基因的裂解病毒对C6胶质瘤的实验研究 - 中华神经外科杂志 2008, 24 \(1\)](#)

目的 探讨重组单纯疱疹病毒介导的内皮抑素和血管生成抑素(Endo-Angio)融合基因对C6胶质瘤的疗效.方法 构建含有Endo-Angio融合基因的重组单纯疱疹病毒,四唑蓝比色法(MTT法)体外观察其C6细胞的裂解作用;Western-blot观察Endo-Angio融合蛋白的表达.建立大鼠C6模型,当肿瘤体积≥2mm³时,治疗组瘤腔内注射107 pfu(10⁴ i.u.)病毒,对照组注射等剂量生理盐水.MRI动态观察肿瘤体积变化,组织病理行微血管计数,并记录荷瘤鼠生存时间.结果 体外实验示:当感染率(MOI)=1000时,99%的C6细胞死亡;头部MRI发现治疗组胶质瘤生长减慢;荷瘤鼠存活时间:对照组(20.3±0.45)d,治疗组(38.3±0.96)d,中位生存期延长(P<0.01);HE染色见瘤细胞分散,体积较小,无出血坏死;病理染色示:治疗组和对组新生血管均值分别为(5.3±1.7)/HP和(15.6±2.8)/HP(P<0.01).结论 重组单纯疱疹病毒介导的Endo-Angio融合基因不仅通过抑制肿瘤的新生血管生成,而且通过裂解肿瘤细胞双重作用治疗颅内胶质瘤.

4. 期刊论文 [刘凡. 刘运生. 王小宜. 廖伟华. 吴光勇. 垂体腺瘤血管生成与VEGF、bFGF和内皮抑素的关系探讨 - 国际神经病学神经外科学杂志 2006, 33 \(3\)](#)

目的检测垂体腺瘤组织中的血管内皮细胞生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和内皮抑素蛋白的表达,探讨其与垂体腺瘤血管生成的关系及临床意义.方法采用免疫组化化学技术检测了46例垂体腺瘤标本中VEGF、bFGF和内皮抑素的蛋白表达,以VⅢ因子相关抗原(FⅢ-Rag)血管内皮细胞标记法作为血管密度(MVD)计数的方法,分析上述血管生成相关因子与垂体腺瘤血管生成的关系.结果VEGF、bFGF蛋白表达与MVD之间呈显著正相关(P<0.05),内皮抑素蛋白表达和MVD之间无显著相关性(P>0.05).结论垂体腺瘤血管生成与促血管生成因子VEGF、bFGF蛋白水平表达的上调有关.

5. 学位论文 [苗新普. 食管鳞癌中鸟氨酸脱羧酶mRNA、内皮抑素mRNA的表达和血管生成相关性研究 2004](#)

背景与目的:食管鳞癌中内皮抑素、ODC和血管生成的关系如何,目前尚未见报道.该文拟对ODC mRNA、内皮抑素mRNA和MVD在食管鳞癌中的表达及相关性予以探讨,以寻找可用食管癌诊断的肿瘤标记物,研究ODC过表达引起食管鳞癌的发生发展、浸润及转移机制,为食管鳞癌的临床诊治提供理论依据和治疗靶位.方法:研究对象为41例经手术和病理证实的食管鳞癌患者,用RT-PCR方法测定每例患者癌组织(T)和相应癌旁正常组织(N)的ODC mRNA和内皮抑素mRNA表达,以β-actin mRNA做内参照求得各自T/N值;用免疫组化方法测定CD34抗原得到癌组织和相应癌旁正常组织的MVD,求得T/N值.结论:1、ODC的表达与食管鳞癌的发生发展、浸润和转移密切相关,可以作为食管鳞癌诊断的指标之一.2、内皮抑素和MVD与食管癌发生发展、外膜浸润和淋巴转移相关,可作为判断食管癌生物学行为的指标.3、ODC与内皮抑素负相关,与MVD正相关;提示ODC过表达通过抑制内皮抑素而促进血管生成,这可能是其促使血管生成的机制之一.

6. 期刊论文 [尚卫华. 王康. SHANG Wei-hua. WANG Kang. 内皮抑素在直肠癌中的表达与血管生成的关系 - 现代肿瘤医学 2007, 15 \(8\)](#)

目的:探讨内皮抑素(Endostatin)在直肠癌中的表达及其与血管生成的关系.方法:利用免疫组化S-P法,对40例直肠癌组织中的Endostatin表达进行研究.结果:Endostatin定位于癌组织中血管内皮细胞胞浆及胞膜,部分癌细胞胞浆也存在阳性表达,直肠癌组织中的Endostatin表达阳性率与正常直肠组织无明显差异(P>0.05),Endostatin表达与直肠癌临床病理中的分化程度、浸润深度无关(P>0.05),而与淋巴转移、Dukes分期相关(P<0.05).结论:Endostatin在直肠癌的血管生成调控中具有重要作用.

7. 学位论文 [范晓东. 微血管密度、VEGF和内皮抑素在I期肾癌的研究 2003](#)

背景和目的:血管生成(Angiogenesis)是新血管从业已存在的成熟血管网中的芽生,对实体肿瘤的生长和转移起关键作用.透明细胞肾癌是一种高度血管化肿瘤,研究证实其可以在体内外表达血管内皮细胞生长因子(VEGF).内皮抑素(Endostatin)是一种内源性血管生成抑制因子,能特异抑制血管内皮细胞增殖和血管生成,其抗肿瘤活性在小鼠肿瘤模型得到证实.该实验目的是研究血管生成及其调控因子,包括VEGF和内皮抑素,在早期透明细胞肾癌发病中的作用及预后价值.所有肾肿瘤组织标本甲醛固定、石蜡包埋,4μm切片,冯·威利布兰德因子(vonWillebrandFactor,vWF)免疫组化染色.肿瘤病理分级依Fuhrman系统标准.肿瘤微血管密度(MVD)检测在不知晓相关病人临床病理资料情况下完成.低倍光镜(×100)下浏览整个切片视野,选取血管密度最高的区域,即染色结构密度最高的视野,然后转换高倍镜(×400)对该视野进行仔细观察计数.任何棕褐色染色内皮细胞或内皮细胞簇,且与邻近微血管、肿瘤细胞

以及其它结缔组织成份明显分离,均被认为是有效阳性染色,可计为一个微血管.同法顺序计数10个高倍镜视野 (HPF),取平均值,最终结果表示为每高倍视野平均微血管数.血清VEGF浓度由酶联免疫吸附测定 (ELISA) 获得,血清内皮抑素浓度由竞争性酶免检测 (Competitive enzyme immunoassay) 获得.原发肿瘤体积根据术后病理检查报告计算.组间均数比较采用Mann-Whitney U检验,相关性分析采用Spearman秩和相关分析,P值小于0.05被认为有显著意义.结论:肾肿瘤MVD对早期肾癌预后价值不大.早期透明细胞肾癌病人高表达内源性血管生成抑制剂内皮抑素和血管生成刺激因子VEGF,内皮抑素和VEGF表达水平显著相关,二者均是透明细胞肾癌相关重要血管生成调控因子,具有潜在的预后价值.内皮抑素和VEGF者本质关系的阐明可以帮助我们加深对肾癌血管生成调控机制的认识,进而发现新的治疗靶点和策略.

8. 期刊论文 [唐维强, 何守志. TANG Wei-Qiang. HE Shou-Zhi 血管生成抑素、K-5和内皮抑素抑制眼新生血管的研究进展 -眼科新进展2006, 26\(7\)](#)

血管生成抑素、K-5和内皮抑素均是内源性新生血管抑制因子,结构上分别是纤维蛋白溶酶原和胶原XVIII的酶解片段.基因治疗眼新生血管方面的研究不断取得进展,本文对其进行了综述.

9. 期刊论文 [潘静坤, 赵卉, 田磊, 崔忻, 高宇红, 薛毅珑. Pan Jing-kun, Zhao Hui, Tian Lei, Cui Xin, Gao Yu-hong, Xue Yi-long 体外培养下可持续分泌人血管抑素和内皮抑素基因工程细胞对血管生成的抑制效应 -中国组织工程研究与临床康复2009, 13\(20\)](#)

背景:以往实验构建了可持续分泌人血管抑素和内皮抑素的基因工程细胞,即人血管抑素/293细胞和人内皮抑素293细胞,并已证明可持续分泌人血管抑素蛋白和人内皮抑素蛋白.但尚不了解其分泌物是否能发挥血管生成的抑制作用.目的:观察以基因工程技术构建的人血管抑素/293细胞和人内皮抑素/293细胞对鸡胚尿囊膜血管新生的抑制效应.设计、时间及地点:随机对照动物实验,于2006-0612007-01在解放军总医院老年医学研究所细胞生物学研究室完成.材料:Hek/293细胞为人胎肾细胞,由解放军军事医学科学院提供.人血管抑素/293细胞和人内皮抑素/293细胞由课题组前期构建.SPF级鸡胚购自北京维通利华实验动物有限公司.方法:将鸡胚消毒后,置于37℃无菌恒温箱中孵育5 d,在距胚头1 cm两条卵黄静脉之间的卵壳投影部位磨切暴露尿囊膜,制成假气室,用无菌滤纸封闭窗口.制成鸡胚尿囊膜模型.备用.用灭菌蒸馏水配制体积分数为0.5%甲基纤维素溶液,制成甲基纤维素小杯.卵壳开窗后第3天,分别吸取浓缩的293细胞、人血管抑素/293细胞、人内皮抑素/293细胞培养上清液各20 μL.或人血管抑素/293细胞和人内皮抑素/293细胞培养上清液各10 μL,加于甲基纤维素小杯中,将其置于鸡胚尿囊膜的两条大血管之间的无血管区.主要观察指标:观察尿囊膜血管生成的变化.结果:共培养9 d时,与单纯293细胞上清液组相比,人血管抑素/293细胞上清液或人内皮抑素/293细胞上清液组,甲基纤维素小杯内及邻近区的鸡胚尿囊膜血管明显发育不良,血管分布稀疏,数量明显减少,其一级血管数量虽未明显减少,但其管径较细,而二级血管和二级以下的血管数量明显减少、管径明显变细,伸入尿囊膜边缘区的血管数量减少,管径明显变细.与人血管抑素/293细胞组或人内皮抑素/293细胞组相比,人血管抑素/293细胞+人内皮抑素/293细胞组的一级血管数量和管径未见明显变化,而其二级血管和三级以下血管数量明显减少,血管树消失.结论:人血管抑素/293细胞和人内皮抑素/293细胞的分泌物对鸡胚尿囊膜的血管新生均具有明显的抑制作用,且联合用药抑制作用增强.

10. 学位论文 [曹瑞华 内皮抑素基因腺病毒载体表达系统治疗小鼠黑色素瘤的实验研究 2005](#)

新生血管形成对一定大小肿瘤的生长具有重要意义.抗肿瘤血管生成治疗的作用对象是遗传相对稳定的内皮细胞,不易产生耐药,因此抑制血管生成成为肿瘤治疗研究的重要热点之一.在目前发现的40多种抗肿瘤血管生成抑制剂中,内皮抑素的作用最强.尽管已证实它的重组蛋白形式治疗可完全抑制动物肿瘤的的生长和转移,但由于需要长期应用,体外性质不稳定,大量生产困难等因素限制了其重组蛋白形式的广泛应用.基因治疗提供了一种替代途径可解决上述问题,而腺病毒是目前应用最广泛的载体之一.

该实验获得了内皮抑素基因腺病毒载体表达系统,观测了它对黑色素瘤的作用效果,以期为高度恶性、易转移的黑色素瘤提供新的治疗方向.

目的

- 一.检测含全长小鼠内皮抑素基因和绿色荧光蛋白基因的腺病毒载体表达系统的体外生物学活性,并进一步探讨内皮抑素的作用机理;
- 二.检测内皮抑素基因腺病毒载体表达系统的体内转染效率,选择合适的基因治疗皮肤黑色素瘤的条件;
- 三.观测内皮抑素基因腺病毒载体表达系统对小鼠的平均成瘤时间、成瘤率等的影响;
- 四.观测内皮抑素基因腺病毒载体表达的内皮抑素对黑色素瘤的治疗作用,并进一步探讨其抗肿瘤机理.

内容和方法

一.在HEK293细胞内扩增腺病毒,利用GFP的特性评估小量扩增的腺病毒滴度;经CsCl密度梯度浓缩及50%组织培养感染剂量法测定大量扩增的腺病毒滴度.

二.不同MOI(感染复度)的Ad-GFP感染ECV304细胞(人血管内皮细胞)和B16F10黑色素瘤细胞,荧光显微镜下观察腺病毒载体体外对细胞的转染效率.用RT-PCR法和WesternBlot法分别检测Ad-mES转染靶细胞后内皮抑素基因的mRNA表达、培养上清中内皮抑素蛋白表达,并进一步用ELISA检测试剂盒测定其表达量.

三.MTT法检测内皮抑素腺病毒载体转染靶细胞后细胞增殖的变化,检测Ad-mES转染内皮细胞后对内皮细胞生长刺激因子VEGF的阻断作用.用流式细胞术检测内皮抑素腺病毒表达载体对细胞周期影响和致凋亡效应,并进一步用AnnexinV-FITC法检测细胞早期凋亡变化.

四.根据肿瘤组织冰冻切片上GFP阳性细胞的计数,评估了内皮抑素基因腺病毒载体表达系统的体内转染效率.

五.随机将24只C57BL/6小鼠均分为3组.即mES、GFP(接种MOI=500时,Ad-mES、Ad-GFP分别转染的B16F10细胞)和瘤细胞组(接种未转染的B16F10细胞),接种细胞数均为106/ml,种于背部右侧.观察肿瘤生成时间及体积变化并HE染色观察肿瘤组织病理.

六.观测Ad-mES对小鼠黑色素瘤的治疗效果.建立小鼠黑色素瘤模型,肿瘤细胞接种两周后体积长到200-300mm3随机分为治疗组和对照组.治疗组分Ad-mES单剂组和重组组(各20只);对照组分PBS组、Ad-GFP组(各10只);基因治疗方法:Ad-mES单剂组、PBS组、Ad-GFP组分别瘤内缓慢注射

3.16×1010pfu/mlAd-mES、PBS和3.98×1010pfu/ml的Ad-GFP各0.1ml/只,每只小鼠一次;Ad-mES重组组每隔7天瘤内注射上述滴度的Ad-mES.免疫组化检测内皮抑素蛋白肿瘤组织原位表达,WesternBlot法观测注射后蛋白表达持续时间,ELISA试剂盒检测循环中内皮抑素蛋白表达水平.应用CD31和CD105两种抗原标记免疫组化作肿瘤血管密度计数,观察治疗后肿瘤血管密度变化.

七.观察内皮抑素腺病毒载体对小鼠肿瘤生长和转移的影响,生存率变化,并进行生存分析.

八.电镜观察治疗后肿瘤细胞凋亡情况,初步分析内皮抑素抗肿瘤的机理.

研究结果

一.制备腺病毒的滴度:小量扩增3.25×107pfu/ml;大量扩增的Ad-mES为3.16×1010pfu/ml,Ad-GFP为3.98×1010pfu/ml.

二.腺病毒载体可有效转染肿瘤细胞和内皮细胞.MOI为10,20,50,100,200,500的Ad-GFP在B16F10细胞和ECV304细胞的转染率分别为15.6%、35%、73%、88%、95.2%、97%和19%、35%、80%、90%、97%、98.5%.MOI=100时,RT-PCR法在Ad-mES转染的B16F10和ECV304细胞内均检测到了内皮抑素mRNA;WesternBlot法在上述细胞的培养上清中均检测到了内皮抑素蛋白表达;ELISA试剂盒测定Ad-mES转染B16F10和ECV304细胞后的培养上清中内皮抑素蛋白浓度分别达3170±486ng/ml、2008±381ng/ml.上述法在病毒和PBS对照的结果均为阴性.

三.Ad-mES可明显抑制ECV304细胞的增殖,相对于PBS组和GFP组,MOI=10、100时,抑制率最高分别为52.41%、50.4%和80.53%、79.72%.而对B16F10肿瘤细胞的增殖没有抑制效果.

四.MOI=100时,Ad-mES作用的ECV304实验组在不同的时相均有凋亡峰出现,其中转染后12小时即出现凋亡,48小时最明显,位于G1期的细胞增多,S期和G2M期细胞减少,同时亚G1期细胞(凋亡细胞)增多,与两对照组相比具有统计学差异(P<0.05).对照病毒载体Ad-GFP与PBS组无统计学差异(P>0.05).Ad-mES对B16F10的细胞周期无明显影响(P>0.05).AnnexinV-FITC法检测发现Ad-mES转染后24h就可诱导ECV304细胞的凋亡,凋亡率为18.6±3.2%,至48小时平均至49.2±6.5%,这种作用随时间延长逐渐增强(P<0.05),最长达75.19%;而空载体组、PBS作用ECV304组及Ad-mES、空载体组、PBS作用B16F10组则没有明显的凋亡.

五.应用Ad-mES治疗小鼠黑色素瘤时,取MOI=500、瘤内注射和间隔7天后给药Ad的体内转染率最高,可达到37.33%.

六.在该系统对黑色素瘤成瘤作用的实验研究中发现,瘤细胞组、GFP组和mES组小鼠平均成瘤时间分别为7.87±0.64、8.00±0.76和

10.25±2.55,mES组分别与前2组比较,P=0.018、0.025;mES组与瘤细胞组、GFP组相比,小鼠荷瘤第5天、10d、15d时,P值均<0.05,在小鼠荷瘤5天、10天、15天,相对于瘤细胞组、GFP组,mES组的抑瘤率分别为41.7%、36.5%;39.5%、58.7%;42.3%、42.5%.普通病理光镜下瘤细胞组和IGFP组肿

瘤细胞增殖旺盛，血管丰富，尤肿瘤边缘区域更为明显。mES组肿瘤血管不规则，扭曲并可见坏死区，管腔口径不一，有的腔内可见红细胞，组织内少量炎症细胞存在。

七. 基因治疗结果，对照组 I、II 在治疗后16天、18天始有小鼠死亡；治疗组 I、II 小鼠均在治疗后20天始有死亡。内皮抑素腺病毒载体注射后一周免疫组化显示黑色素瘤组织内ES强阳性表达，对照组则呈阴性或痕量表达。WesternBlot显示单次Ad-mES组内皮抑素表达可持续一个月。ELISA试剂盒检测治疗一周后内皮抑素就可达到640±230ng/ml，两周后为1120±360ng/ml，一月后降到与基础量相当水平。

八. 透射电镜下观察治疗后两周小鼠的肿瘤组织，内皮抑素基因治疗组微血管内皮细胞出现典型凋亡表现，另外肿瘤细胞也有凋亡，但对照组没有靶细胞的明显凋亡。治疗组 I、II 和对照组 I、II 肿瘤组织血管经CD31抗体标记的平均血管密度(MVD)分别为171.6±42.6，165.4±37.4，39.3±7.4和17.4±3.7，经CD105抗体标记的平均血管密度分别为43.6±4.8、39.7±5.6、17.5±3.8和9.5±4.2。治疗组和对照组比较统计学差异显著，空病毒对照组与PBS阴性对照组无统计学意义。

- 实验结论
- 一. 小鼠内皮抑素基因腺病毒载体表达系统可在体内、体外高效表达分泌型的有生物学活性的内皮抑素蛋白。
 - 二. 内皮抑素基因腺病毒载体表达系统可高效转染内皮细胞和肿瘤细胞。体外转染可使ECV304细胞G1期阻滞并诱导其凋亡，从而抑制其增殖，且能阻断血管内皮细胞生长因子的作用；对肿瘤细胞无影响。
 - 三. 瘤内注射内皮抑素腺病毒载体后可显著延长小鼠的平均成瘤时间，抑制黑色素瘤生长，减少转移，延长生存时间。
 - 四. 内皮抑素作用于黑色素瘤的新生血管，显著减少黑色素瘤微血管密度。
 - 五. 内皮抑素基因腺病毒载体表达系统抗黑色素瘤的作用机理是间接诱导肿瘤细胞凋亡，抑制其新生血管生成致肿瘤缺血，停止生长。

引证文献(1条)

1. [俞进友](#). [颜庭华](#). [朱建军](#). [何峰](#). [袁琳](#) 联合靶向治疗中晚期原发性肝癌的临床观察[期刊论文]-[实用医学杂志](#) 2010(2)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200904001.aspx
授权使用: qknfy(qknfy), 授权号: 5bfa3fb2-e615-4bbb-b827-9df601623d0f

下载时间: 2010年9月19日