

文章编号: 1004-0374(2009)02-0286-05

靶向抑制 VEGF 在肺癌治疗中的应用前景

郭丽杰¹, 江其生^{2*}

(1 辽宁医学院, 锦州 121000; 2 第二炮兵总医院中心实验室, 北京 100088)

摘要 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是介导肿瘤血管生成最重要因子, 与肺癌细胞增殖、转移及预后密切相关。靶向沉默 VEGF 基因及抑制其受体表达在肺癌治疗中具有光明的应用前景。本文就此进行综述。

关键词: 血管内皮生长因子; 肺癌; 靶向治疗

中图分类号: R734.2; R730.51 **文献标识码:** A

Application prospect of targeting VEGF in lung cancer

GUO Li-jie, JIANG Qi-Sheng*

(1 Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, China; 2 General Hospital of the Second Artillery, Beijing 100088, China)

Abstract: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the best characterized mediator of tumor angiogenesis. The expression of VEGF greatly correlates with the proliferation and metastasis of lung cancer. Studies of targeting VEGF or VEGFR have demonstrated increasing promise in the treatment of lung cancer and will be discussed in this review.

Key words: vascular endothelial growth factor (VEGF); lung cancer; targeting therapy

肺癌是最常见的恶性肿瘤,其死亡率位居全世界癌症之首,目前尽管手术、化疗药物等不断发展完善,但肺癌患者五年生存率仍不足15%。近年来,随着肿瘤生物学的不断发展,靶向沉默与肿瘤发生、发展相关基因的治疗模式受到广泛关注,研究表明小于2mm³的肿瘤组织主要靠扩散作用获得氧及营养支持,肿瘤进一步增殖及向远处转移则依赖于新血管生成。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是介导肿瘤新血管生成最重要的因子^[1],与肺癌细胞增殖、转移及预后密切相关。而VEGF在正常成人组织(创伤愈合期与女性生理期除外)几乎无表达。因此,靶向VEGF基因不会对正常组织造成损伤,在肿瘤治疗中发挥重要作用。

1 VEGF 家族及其受体

VEGF是血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)家庭成员,可由正常细胞和肿瘤细胞产生和分泌。VEGF家族由VEGF-A(又称

血管通透因子)、-B、-C、-D、-E和胎盘生长因子(placenta growth factor, PIGF)组成。它们都是同源二聚体糖蛋白,具有相似的空间结构,其同源受体有酪氨酸激酶受体VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3等多种类型。VEGF通过与其特异性VEGFR结合,引起一系列的信号转导,释放多种细胞因子与生长因子,刺激血管内皮细胞增殖和迁移,促进新血管、淋巴管生成。VEGF-A、VEGF-B和PIGF也可与非酪氨酸激酶受体neuropilin-1和neuropilin-2结合。neuropilin-1和neuropilin-2不直接参与信号转导,但可能通过促进VEGF-A、VEGF-B、PIGF与VEGFR-1/2的结合而发挥促肿瘤生长和转移作用。我们通常所说的VEGF是指VEGF-A。

收稿日期: 2008-10-14; 修回日期: 2009-02-15

基金项目: 国家自然科学基金(30271479)

*通讯作者 Tel: 010-66343283; E-mail: jqs598@sina.com

2 VEGF 的生物学活性

2.1 增加血管的通透性,促进肿瘤细胞转移

VEGF可诱导上皮细胞间隙出现及开窗现象,激活内皮细胞,活化上皮细胞的胞质小泡及细胞器;通过增加血管通透性使血浆蛋白包括纤维蛋白原释放,形成纤维素网络,为肿瘤生长、发展和转移提供了良好的基质;降解基底膜(extracellular matrix ECM),促进肿瘤细胞在基质中迁移、增殖;由VEGF诱导生成的肿瘤组织微血管基底膜不完整,血管壁缺乏平滑肌支持,血管壁很薄,易于通透,使肿瘤细胞易穿透到血管内顺血流向远处转移,形成微小转移灶。

2.2 抑制肿瘤细胞凋亡 许多研究表明,VEGF还是细胞存活因子,能够诱导细胞表达抗凋亡因子Bcl-2、Survivin和XIAP等,提高细胞存活能力,抑制肿瘤细胞凋亡。有研究发现,VEGF在肿瘤血管生成过程中发挥的内皮细胞抗凋亡作用依赖于其诱导的Survivin表达上调,上调的Survivin抑制了各种指向Caspase的凋亡机制,从而保护内皮细胞逃避凋亡。VEGF还可通过诱导Bcl-2表达,作用于Caspase-3的上游,抑制细胞色素C等从线粒体,释放发挥抗凋亡作用,促进肿瘤生长。

2.3 抑制树突细胞(dendritic cell, DC)成熟,使肿瘤细胞逃避免疫监视 DC是机体内功能最强大的抗原提呈细胞,在抗肿瘤免疫反应中发挥重要作用,但只有成熟的DC才可活化T细胞增殖,不成熟DC则可诱导免疫耐受。大量研究表明,VEGF抑制了CD34⁺造血前体细胞(hemopoietic progenitor cell, HPC)的分化以及不成熟DC的功能性成熟,从而使肿瘤细胞发生免疫逃逸。HPC中存在VEGFR-1和VEGFR-2的mRNA表达,VEGF能与初分离的CD34⁺细胞上VEGFR-1特异性结合,抑制NF- κ B与其抑制物I- κ B的解离,影响NF- κ B激活,NF- κ B的亚基rel-B为DC发育成熟所必需,从而导致DC功能缺陷。当HPC发育为成熟DC后,其表面VEGF结合位点则显著下降,VEGF对其无任何作用。Toshihiro等^[2]将转染了VEGF特异性siRNA的MCA205细胞与DC前体共培养,与对照组相比,VEGF表达减少,DC前体分化为成熟DC增多。

2.4 促进肿瘤淋巴管生成 VEGF-C、-D可与肿瘤淋巴管内皮细胞上VEGFR-3特异性结合,促进肿瘤淋巴管内皮细胞的迁移和增殖^[3]。研究表明,VEGF-A也可促进淋巴管生成^[4-6],但其机制尚不清楚。

Cursiefen等^[4]认为VEGF-A通过诱导炎症巨噬细胞释放VEGF-C发挥作用。Svendensen等^[7]发现利用VEGFR-3特异性抗体阻断VEGF-C/VEGFR-3信号后并不能抑制VEGF-A促淋巴管生成作用,故认为VEGF-C信号在VEGF-A促淋巴管生成中不起决定性作用。

3 VEGF 表达与肺癌关系

无论是在体外培养的肺癌细胞中,还是在肺癌细胞接种裸鼠形成荷瘤动物模型的肿瘤细胞中,或是在人体肺癌组织中均有VEGF的高表达。董强刚等^[8]研究表明,VEGF在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)患者血浆中的含量与健康人及肺良性疾病患者有显著差异($P<0.05$),且与肺癌病期进展有关。谢兰艳等^[9]对68例NSCLC患者采用免疫组织化学方法进行VEGF检测,结果表明阳性表达率为66.78%,VEGF在NSCLC组织中的表达与TNM(tumor node metastasis)分期、淋巴结转移、肿瘤组织的分化程度及临床分期均相关,而与肿瘤组织学类型无显著相关。朱志华等^[10]检测217例NSCLC组织中VEGF表达发现:45例低表达,169例高表达,与年龄、血型、病理类型、TNM分期无相关性。Saglam等^[11]对40名新诊断为肺癌(31名NSCLC患者,9名SCLC患者)血清中VEGF表达情况研究发现:肺癌患者血清中VEGF水平(345.16 ± 159.36 pg/mL)远高于对照组(230.36 ± 47.87 pg/mL) ($P<0.001$),血清VEGF水平与患者年龄、性别、组织学类型、TNM分期、远端转移等均无相关。

肺癌患者体内VEGF表达水平增高,可能与肺癌组织缺氧状态有关。缺氧是诱导VEGF表达的重要因素,将培养的肿瘤细胞暴露于缺氧状态几分钟后,VEGF mRNA水平就显著升高,当氧供正常后VEGF mRNA水平回到基线。同样,阻断鼠的肺灌注致缺氧环境,鼠肺组织内VEGF mRNA及VEGF受体水平均升高^[7]。肿瘤细胞在缺氧状态时缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor, HIF-1 α)表达升高,VEGF调节区有HIF-1结合部位,从而上调肿瘤组织VEGF mRNA表达;另一方面缺氧时VEGF mRNA的半衰期从30—40 min延长至6—8h。由于肺癌细胞生长快速,癌细胞处于缺氧状态,故VEGF表达多升高。而且VEGF表达与肺癌预后密切相关^[12-14],VEGF阳性肺癌患者较阴性表达者预后差。Mineo等^[14]通过对42名IB—IIA期行肿瘤根治性切除术的非小细胞肺癌患者肿瘤标本免疫组化

染色: VEGF 表达与肿瘤血管侵袭密切相关($P=0.04$), 且 VEGF 高表达患者总体生存时间短。对肺癌患者研究发现, 有淋巴结转移的原发病灶 VEGF 表达水平高于无转移者。在转移淋巴结中 VEGF 表达高于原发灶, 显示 VEGF 可能通过增加新生血管和淋巴管导致肺癌细胞转移。此外, VEGF 主要通过与其血管内皮细胞上 VEGFR-2 结合, 从而发挥生物学效应, 研究发现 VEGFR-2 在大多数肿瘤组织的血管和血管内皮细胞中呈不同浓度的阳性反应, 其中肺癌 VEGFR-2 阳性率为 77%。

4 目前靶向 VEGF 疗法研究进展

4.1 抗 VEGF/VEGFR 单克隆抗体 应用 VEGF/VEGFR 单克隆抗体, 可封闭已分泌的 VEGF/VEGFR, 阻止 VEGF/VEGFR 诱发的内皮信号转导, 抑制血管的形成。Brekken 等^[15] 采用单克隆抗体阻断 VEGF 与 VEGFR 的结合, 从而阻断了 VEGF 导致的血管通透性的增加, 并抑制肿瘤的生长。这表明 VEGF 抗体不是直接抑制肿瘤细胞增殖, 而是通过抑制肿瘤血管的形成来实现的。肿瘤血管形成被抑制后, 肿瘤的营养来源和转移途径被阻断, 可以达到治疗肿瘤的目的。VEGF 中和抗体贝伐单抗(Bevacizumab)于 2004 年被 FDA 批准上市, 在治疗肺癌中与化疗一起运用, 可提高患者的生存率, 特别是对 VEGF 高表达的患者疗效较好。贝伐单抗联合化疗的大样本、多中心 II 期临床试验 ECOG-E4599 (The Eastern Cooperative Oncology Group) 结果公布: 自 2001 年 7 月至 2004 年 4 月, Sandler 等^[16] 统计了 878 例诊断晚期非小细胞肺癌的患者 (stage III B 或 IV)。其中, 444 位患者被随机分配到卡铂+紫杉醇组; 434 位患者被分配到卡铂+紫杉醇+贝伐单抗组。结果: 在卡铂+紫杉醇+贝伐单抗的组中, 中位生存期为 12.3 个月。与之对比, 在单用卡铂+紫杉醇方案组中, 中位生存期为 10.3 个月($P=0.003$)。中位进展期在两组中分别为 6.2 及 4.5 个月($P<0.001$), 对应的反应率分别为 35% 和 15% ($P<0.001$)。但贝伐单抗可能诱发肺出血等严重不良反应, 且较多发生于肺鳞状细胞癌, 故此类型患者应尽量避免应用^[17-19]。目前贝伐单抗联合 5-氟尿嘧啶在美国被作为治疗 NSCLC (鳞状细胞癌除外) 的一线药物。

4.2 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂 VEGFR 抑制物是通过与其相对应 VEGF 受体结合, 抑制 VEGF/VEGFR 信号转导, 从而发挥抗肿瘤血管生成活性。目前研究的 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂包括

PTK787、CP-547、ZD6474 和 ZD4190 等, 其中 ZD6474 是一种新型 VEGFR-2 酪氨酸激酶抑制剂, I 期临床研究显示了对肺癌的客观疗效及其良好的耐受性, 可使 NSCLC 患者的瘤细胞衰退^[20], 目前该药正在进行 II 期临床试验。Cao 等^[21] 利用 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂 AZD2171 联合放疗对接种肺癌 H460 裸鼠进行治疗, 以单纯接受放疗组为对照: 联合治疗组较对照组肿瘤生长延迟, Ki67 (反应肿瘤增殖的标记物) 指数显示肿瘤增殖明显降低 (>4 fold), 瘤内细胞凋亡增多。Herbst 等^[22] 用 ZD6474 联合放疗治疗非小细胞肺癌也得到相似结果。Laurie 等^[23] 报道了 20 例卡铂 (AUC=6)+紫杉醇 (200mg/mL) 联合 AZD2171 治疗初治的 III b 和 IV 期 NSCLC 的试验结果, 9 例 AZD2171 剂量为 30mg, 11 例 AZD2171 剂量为 45mg。在 15 例可评估的患者中 6 例获得部分缓解, 8 例疾病稳定, 1 例疾病进展。较常见的 2 度以上不良反应是肝功能异常、高血压、粒细胞下降和黏膜炎, 其他常见的毒性反应为乏力、厌食、腹泻等, 20 例患者中无咯血发生。也有研究表明靶向多个 VEGFR 的酪氨酸激酶抑制剂较单一受体抑制剂效果更好。Sini 等^[24] 比较了 PTK/ZK (靶向 3 个 VEGFRs) 与单一靶向 VEGFR-2 及 VEGF-A 单克隆抗体在治疗专一性黑色素细胞瘤中作用: 尽管所有抑制剂均能有效抑制原发肿瘤生长, 但只有 PTK/ZK 可明显抑制肿瘤淋巴转移发生。提示靶向抑制多个 VEGFRs 表达在抑制肿瘤转移中可更好地发挥作用。

4.3 可溶性 VEGF 受体 可溶性 VEGFR 仅具有与 VEGF 结合能力, 却无信号转导功能。据此应用可溶性 VEGFR 结合循环中的 VEGF, 耗竭肿瘤细胞分泌的 VEGF, 以抑制其诱导的生物学活性, 从而抑制肿瘤新血管生成, 阻断已形成的脉管系统^[25]。该方法治疗铂耐药的 NSCLC 正处于 II 期临床前研究阶段。

4.4 基因治疗 基因疗法是通过基因敲除技术, 使 VEGF 或 VEGFR 表达减少, 或阻断其信号转导通路, 从而抑制两者发挥生物学活性。有研究将反义 VEGF-cDNA 真核表达载体转染鼠的 C6 神经胶质瘤细胞, 可阻断 VEGF 和 VEGFR 的旁分泌道路, 使 VEGF 表达水平明显下降, 将转染后的 C6 细胞种植于裸鼠皮下, 发现转染后细胞的成瘤率、瘤重和肿瘤内血管密度明显低于非转染组。近年来兴起的 RNA 干扰 (RNAi) 被认为是最有效、特异性高的基因靶向沉默技术, 为靶向基因疗法应用临床带来希望

的曙光。RNAi 是指将外源性或内源性双链 RNA (dsRNA) 导入细胞后引起与该段 RNA 同源的 mRNA 产生特异性降解, 使其相应的基因表达受到抑制。Mulkeen 等^[26]在将 VEGF-siRNA 转染结肠癌 RKO 细胞后, VEGF 的表达下降了 95%, 同时结肠癌细胞本身的增殖也下降了 67%。

4.5 靶向治疗 肿瘤靶向治疗是将化疗药物、生物毒素或放射性核素等结合到靶向载体上, 使之伴随载体一起进入肿瘤组织, 以增强对肿瘤细胞的选择性杀伤作用, 降低对正常细胞的毒性影响。某些受体在特定细胞表面有特异性分布, 因而能够利用受体的配体作为导向载体。VEGF 的两个主要受体 VEGFR-1 和 VEGFR-2 在肿瘤血管内皮细胞中过度表达, 而在相邻正常组织血管内皮中几乎不能检出。因此, 以 VEGF 作为靶抗原进行导向治疗, 具有较好临床应用前景。

5 展望

目前手术及放化疗仍是治疗肺癌的主要手段, 但研究发现手术及放疗后患者体内 VEGF 水平均升高^[27, 28], 这可能是引起肺癌治疗失败的因素之一。因此, 靶向 VEGF 基因疗法在改善肺癌患者预后中具有较好的应用前景; 但其存在问题同样不容忽视: (1) 肿瘤在小于 2mm³ 时, 其对新生血管依赖性不强, 使得抗 VEGF 药物应用受限; (2) 抗血管治疗药物仅能抑制新血管生成, 而对癌细胞无直接杀伤作用, 一旦停药肿瘤细胞又可恢复增殖; (3) 各种蛋白质分子制剂在动物实验虽已有明显效果, 但在人体中是否会出现变态反应尚需更深入研究; (4) 引起肺癌发生、生长、转移的因素极为复杂, 单一抑制 VEGF 基因往往不能获得理想疗效, 需要联合其他疗法进行综合治疗。我们相信随着对肺癌与 VEGF 关系研究深入, 基因靶向敲除技术的不断发展, 靶向 VEGF 基因疗法在临床肺癌综合治疗应用中会发挥更大的作用。

[参 考 文 献]

- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Clin Oncol*, 2005, 23(5): 1011-27
- Toshihiro S, Makoto M, Marimo S, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation using RNAi system to downregulation VEGF secretion of tumor cells. *AAO Meeting Abstracts*, 2004: 161
- Su JL, Yang PC, Shih JY, et al. The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cell. *Cancer Cell*, 2006, 9: 209-23
- Cursiefen C, Chen L, Borges LP, et al. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *Clin Invest*, 2004, 113(7): 1040-50
- Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, et al. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Exp Med*, 2005, 201: 1089-99
- Björndahl MA, Cao R, Burton JB, et al. Vascular endothelial cell growth factor-A promotes peritoneal lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res*, 2005, 65: 9261-8
- Svensen MN, Werther K, Nielsen HJ, et al. VEGF and tumor angiogenesis. Impact of surgery, wound healing, inflammation and blood transfusion. *Scand J Gastroenterol*, 2002, 37(4): 373-9
- 董强刚, 冯久贤, 黄进肃, 等. 血管内皮生长因子对非小细胞肺癌血道转移的影响. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24: 142-6
- 谢兰艳, 陈平, 蒋云生, 等. HIF-1 和 VEGF 在非小细胞肺癌组织中的表达度其与肿瘤血管生成的关系. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(7): 1017
- 朱志华, 戎铁华, 曾灿光, 等. I-II 非小细胞肺癌组织中 VEGF 的表达和微血管密度与预后的关系. *癌症*, 2005, 24(7): 865
- Saglam DA, Ursavas A, Karadag M. The evaluation to relationship between serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level, metastases and other tumor markers in patients with lung cancer. *Tuberk Toraks*, 2008, 56(1): 50-5
- Seto T, Higashiyama M, Funai H, et al. Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its fit-1 and KDR receptors in stage I non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2006, 53(1): 91-6
- Sadasivan C, Medendorp S, Sreedhar R, et al. Prognostic role of VEGF, EGFR, Cerb-B2 and ER- α in stage I non-small cell lung cancer. *ASCO Meeting Abstract*, 2007, 25: 7696
- Mineo TC, Ambrogio V, Baldi A, et al. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. *Clin Pathol*, 2004, 57: 591-7
- Brekken RA, Overhoiser JP, Stastny VA, et al. Selective inhibition of VEGF receptor 2 activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor in mice. *Cancer Res*, 2000, 60(18): 5117-8
- Sandier A, Gray R, Perry PC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small cell lung cancer. *Engl Med*, 2007, 356(3): 318
- Jain RK, Duda DG, Clark JW, et al. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2006, 3(1): 24-40
- Dowlati A, Gray R, Sander AB, et al. Cell adhesion molecules, vascular endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab - an Eastern Cooperative Oncology Group study. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 1407-12
- Shinbunya K, Konaki R, Shintan T. Targeted therapy against VEGFR and EGFR with ZD6474 enhances the therapeutic efficacy of irradiation in an orthotopic model of human non-

- small-cell lung cancer. *Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 69(5): 1534-43
- [20] Minami H, Ebi H, Tahara M, et al. A Phase I study of an oral VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD6474, in Japanese patients with solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 2003, 22: 194
- [21] Cao C, Albert JM, Geng L, et al. Vascular endothelial cell growth factor tyrosine kinase inhibitor AZD2171 and fractionated radiotherapy in mouse models of lung cancer. *Cancer Res*, 2006, 66: 11409-15
- [22] Herbst RS, O'Neill VJ, Fehrenbacher L, et al. Phase II study of efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy or erlotinib compared with chemotherapy alone for treatment of recurrent or refractory non-small-cell lung cancer. *Clin Oncol*, 2007, 25: 4743-50
- [23] Laurie SA, Arnold A, Gauthier I, et al. Final results of a phase I study of daily oral AZD2171, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), in combination with carboplatin+paclitaxel (T) in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG). *Clin Oncol*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings, 24(188): 3054
- [24] Sini P, Samarzija I, Baffert F, et al. Inhibition of multiple vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR) blocks lymph node metastases but inhibition of VEGFR-2 is sufficient to sensitize tumor cells to platinum-based chemotherapeutics. *Cancer Res*, 2008, 68: 1581-92
- [25] Huang J, Frischer JS, Serur A, et al. Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 7785-90
- [26] Mulkeen AL, Silva T, Yoo PS, et al. Short interfering RNA mediated gene silencing of vascular endothelial growth factor: effects on cellular proliferation in colon cancer cells. *Arch Surg*, 2006, 141(4): 367-74
- [27] Brieger J, Kattwinkel J, Berres M, et al. Impact of vascular endothelial cell growth factor release on radiation resistance. *Oncol Rep*, 2007, 18(6): 1597-601
- [28] 刘颖, 周清华, 陆艳蓉, 等. 非小细胞肺癌患者手术前后血清内皮抑素和 VEGF 水平变化及相关性研究. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12(10): 1441-4