科 学 通 报
第42卷 第19期 Chinese Science Bulletin 1997年10月

【专题评述】

以肿瘤血管为靶的抗体导向治疗

李建生* 阎锡蕴
(中国科学院微生物研究所,北京 100080. * 同济医科大学博士研究生,现在中国科学院微生物研究所学习)

关键词 抗体导向 肿瘤血管 单链抗体

抗体导向治疗是肿瘤综合治疗的重要组成部分. 成功的抗体导向治疗取决于两个关键因素:一是抗体及与其偶联物的性能. 二是特定靶抗原的选择. 理想的抗体应至少满足4个条件:(ⅰ)对肿瘤细胞有高度特异性;(ⅱ)能与细胞毒素牢固结合,而又不影响其与靶抗原的结合;(ⅲ)不引发机体对抗体的免疫反应;(ⅳ)必须有效浓集于肿瘤区[1]. 自1975年杂交瘤技术问世以来,人们利用单克隆抗体(单抗)识别抗原的高度特异性,针对肿瘤细胞特异或相关抗原进行了大量抗体导向治疗研究,期望这种"魔弹"能特异杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞无害. 经过20多年的实践,以传统单抗为载体的抗体导向治疗虽然在动物体内取得了成功,而临床效果并不理想. 其主要原因是鼠源性单抗在人体反复应用后会引起人抗鼠抗体反应,使临床疗效减弱或消失;由于肿瘤间质高压,使大分子量的完整抗体难以穿透到肿瘤内部[1,2],放射性核素示踪研究表明注入体内的抗体仅有0.01%~0.1%到达肿瘤部位[3];另外,肿瘤细胞抗原的异质性,肿瘤细胞的遗传不稳定性所导致的抗药性[4],亦给针对肿瘤细胞的抗体导向治疗增添了困难.

为了克服抗体导向治疗所遇到的困难,近年来所采取的措施主要归纳为两方面:一是新型载体的研制. 二是以肿瘤血管为靶的导向治疗新策略. 在载体研究方面,80年代以来,人们用基因工程技术对鼠抗体进行人源化改造,制备了人鼠嵌合抗体和改型抗体,或者直接从噬菌体抗体库筛选人抗体,这不仅克服了鼠源单抗的免疫源性问题,而且改善了抗体的效应功能[5,6]. 由重组抗体基因在原核和真核表达系统产生具有抗原结合活性的小分子抗体片段,如Fab'和单链抗体(single-chain variable fragment, 简称scFv)等,增强了抗体向肿瘤内部的穿透能力. scFv已成功地用于临床免疫显象诊断,在导向治疗方面亦具有广阔的应用前景[7]. 在靶抗原的选择方面,为了解决以肿瘤细胞为靶的抗体导向治疗所遇到的问题,在深入了解肿瘤血管生成机制以及结构和功能的基础上,开展了以肿瘤血管为靶的抗体导向治疗,并取得了令人瞩目的进展[8~11]. 有关抗体方面的研究进展,我们最近已作了介绍[12]. 本文重点综述以血管为靶抗体导向治疗肿瘤的新进展.

1 以血管为靶抗体导向治疗的策略和优越性

肿瘤血管导向治疗是通过阻断实体肿瘤的血液供应而抑制肿瘤的生长和转移,或使其完全消退. 所采取的策略有两种[9]:一是抗血管生成疗法(anti-angiogenesis therapy),即防止和抑制肿瘤新血管形成,其作用是防止小肿瘤和微转移灶向血管生成表型转换,阻止肿瘤增大,这是目前研究最多的方法; 二是抗血管疗法(anti-vasculature therapy),即直接或间接破坏已经形成的肿瘤血管结构,导致肿瘤血管塌陷和血栓闭塞,使肿瘤因缺血坏死而消退. 这两种疗法亦可联合应用.

与传统的以肿瘤细胞为靶的导向治疗相比，以肿瘤血管为靶的新策略具有多种优点[8]：(ⅰ)血液循环中的抗体能直接作用于肿瘤血管内皮细胞，无需穿透到肿瘤深部；(ⅱ)具有广谱抗肿瘤作用，因为不同类型实体瘤的生存和生长均需要血液供应，其血管结构也大致相同；(ⅲ)肿瘤血管内皮细胞仍属正常二倍体细胞，因而不会像肿瘤细胞那样易于对治疗药物产生耐药突变；(ⅳ)具有放大效应，因为成千上万个肿瘤细胞依赖于一条毛细血管获取氧和营养物质，即使是血管结构的不完全破坏，亦会造成血栓形成，导致大量肿瘤细胞缺血死亡.

2 抗血管生成疗法

2.1 血管生成与肿瘤生长和转移的关系

血管生成(angiogenesis)是指在原有微血管(毛细血管和小静脉)的基础上通过"出芽"方式形成新的毛细血管[13]. 1971年，Folkman首先提出"肿瘤生长依赖于血管生成"的概念[14]，并得到大量实验结果的证实[15,16]，目前这一概念已经形成共识[9]. 如果没有血管生成，实体肿瘤的生长直径不会超过2 mm，而这正是血流中氧和营养物质通过弥散作用所能达到的距离. 血管生成亦是肿瘤转移过程的关键环节[16,17]. 首先原发癌诱导血管生成，癌细胞侵入血管，通过血液循环，定植于转移靶器官，并诱导新一轮血管生成. 无血管期的肿瘤没有转移能力. 已有实验表明一些重要的血管生成因子的拮抗剂或血管生成抑制因子，在体外对肿瘤细胞无抑制作用，但在体内能抑制肿瘤的生长或使其消退，证明了肿瘤生长对血管生成的依赖性[16]. 大量临床-病理研究表明各种常见实体瘤的新生血管数量明显增多，且与肿瘤复发和转移直接相关，为预后不良的独立预测因素[18].

2.2 血管生成的基本过程和调节因素

新血管生成是一个十分复杂的过程，涉及血管细胞成分和细胞外基质的一系列形态学和生化改变. 形态学改变主要包括以下几个基本步骤[13,16]：(ⅰ)微血管周细胞(pericyte)变得稀少或消失；(ⅱ)血管基底膜溶解；(ⅲ)内皮细胞移出血管；(ⅳ)内皮细胞增生，出芽；(ⅴ)增生的内皮细胞形成管腔、管襻和血管网；(ⅵ)新的基底膜形成；(ⅶ)周细胞复原. 根据不同的肿瘤类型和实验系统，新血管生成的速度为0.23～0.8 mm/d. 与形态学相伴的是一系列生化改变，如内皮细胞产生纤溶酶原激活物和Ⅰ型胶原酶显著增加，基底膜成分如纤维粘连蛋白，层粘连蛋白和Ⅳ型胶原随着血管成熟逐渐增多，粘附分子如选择素E和整合素$\alpha_v\beta_3$亦参与新血管生成[19,20]. 肿瘤新生血管内皮细胞还产生一些静止内皮细胞所没有的新标志物，而这些正是抗体导向治疗的理想靶目标.

血管生成受到许多正负调节因子的严密调控. 正常成人的血管系统是相对静止的(女性生殖系统周期性变化除外)，在任一即定时间，血管内皮细胞仅有0.01%处于分裂周期，内皮细胞更新周期达数百天[21]. 而在肿瘤血管生成时，内皮细胞的更新周期可缩短至5天，与骨髓细胞的更新周期相同[16]. 这是因为肿瘤细胞、间质细胞和Z细胞外基质成分能产生多种血管生成因子和抑制因子(表1). 正性调节因子增多和/或负性调节因子减少，可促使肿瘤向血管生成表型转换[21]. 从理论上讲，血管生成的每一个步骤和所涉及的调节因子，都有可能作为抗血管生成治疗的干预环节. 因此，抗肿瘤血管生成治疗的策略可以包括以下方面[23]：(ⅰ)阻断血管生成因子的合成或释放；(ⅱ)阻断血管生成因子的活性，如中和抗体；(ⅲ)阻断内皮细胞对血管生成因子的反应，如抑制受体；(ⅳ)诱导产生血管生成抑制物；(ⅴ)抑制蛋白降解酶类，如胶原酶；(ⅵ)抑制分化的血管网的形成.

表 1　血管生成的正负调节因子[16]

正性调节因子	负性调节因子
碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)	血小板因子 4
酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)	血栓海绵蛋白(thromspondin)
血管生成素(angiogenin)	金属蛋白酶组织抑制物(TIMP)
转化生长因子 α(TGF-α)	催乳素 16 kDa 片段
转化生长因子 β(TGF-β)a)	血管抑制素(angiostatin)
肿瘤坏死因子 α(TNF-α)	bFGF 可溶性受体
血管内皮细胞生长因子(VEGF)	转化生长因子 β(TGF-β)
血小板源内皮细胞生长因子(PD-ECGF)	α 干扰素(IFN-α)
粒细胞集落刺激因子(G-CSF)	胎盘增殖蛋白相关蛋白
胎盘生长因子(PGF)	内皮细胞抑制素(endostatin)[22]
白细胞介素 8(IL-8)	
肝细胞生成因子(HGF)	
增殖蛋白(proliferin)	

a) TGF-β 在体外抑制内皮细胞增生，而在体内刺激血管生成

2.3　血管生成因子中和抗体的抑瘤作用

(1) VEGF 中和抗体.　血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，简称 VEGF)能够与血管内皮细胞相应受体特异结合，刺激内皮细胞分裂、增生和移动；VEGF 也是已知的作用最强的血管通透剂，能引起血管渗透性增加，促使纤维蛋白沉积于细胞外基质，促进血管生成[24,25]. 常见的人类肿瘤如食管癌[26]、胃癌[27]、结肠癌[28]、原发性肝癌[29,30]、肺癌[31]、乳腺癌[32]、卵巢癌[33]和脑肿瘤[34]等，均有 VEGF 高水平表达. 并且这种过度表达与肿瘤微血管密度及不良预后密切相关. 免疫组织化学研究表明肿瘤细胞分泌的 VEGF 主要聚集于肿瘤血管，非常有利于抗体导向治疗. 1993 年，Kim 等人[35]首先报告特异性 VEGF 中和抗体能抑制移植于小鼠体内肿瘤的新血管生成和肿瘤生长，而这种抗体在体外对肿瘤细胞无抑制作用，为实体瘤生长依赖于血管生成理论提供了首例直接证据. 他们随后又发现 VEGF 抗体还能抑制实验性转移瘤的发生[36]. 其他作者亦报道了相似的结果[37~39]. 最近，Borgstrom 等人[40]利用活体内电视显微镜原位观察技术，观察 VEGF 抗体对移植于小鼠体内的微小肿瘤的作用. 结果显示 VEGF 抗体能完全抑制肿瘤诱发的血管生成和肿瘤生长，使肿瘤体积$<1\ mm^3$，处于"休眠"状态. 用 VEGF 抗体治疗的小鼠生存期延长，未观察到抗体的副作用. 这些结果表明：VEGF 在肿瘤血管生成、肿瘤生长和转移过程中均发挥关键作用，仅仅阻断 VEGF 的生物学活性即能抑制肿瘤生长，防止肿瘤转移，是抗体导向治疗的重要靶目标.

(2)其他血管生成因子的中和抗体.　碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor，简称 bFGF)亦是重要的血管生成因子. Hori 等人[41]用 bFGF 基因转染鼠成纤维细胞，建立了 bFGF 依赖性小鼠肿瘤模型. 他们用特异性 bFGF 中和抗体治疗荷瘤小鼠，并发现该抗体能抑制肿瘤血管生成，延缓肿瘤生长. 另外，抗血管生成素抗体早期应用亦能显著延迟或防止小鼠移植瘤的生长，但晚期应用效果不佳[42].

2.4　阻断血管内皮细胞受体反应

血管内皮细胞上存在多种血管生成因子的受体，阻断受体与配体的结合或干扰其介导的细胞内信号传导过程，能阻断血管生成因子的促血管生成作用. 理想的靶受体应仅存在于肿瘤血管内皮细胞，或者在肿瘤血管内皮细胞高表达. VEGF 受体(VEGFR)最符合这一标准. 两种高亲和力的 VEGFR，FLT-1 和 KDR/FLK-1，主要存在于血管内皮细胞，正常成人血管仅

有低水平表达或不表达，而在生长发育以及成人的生理和病理性血管生成时表达量增高[43]. 许多人类肿瘤血管内皮均有 VEGFR 高表达，并与肿瘤血管生成、肿瘤生长和转移密切相关[28,33,44]. 肿瘤细胞分泌的 VEGF 以及肿瘤内部的缺氧环境，也能诱导肿瘤血管 VEGFR 大量表达[45]. Millauer 等人[46,47]利用显性-阴性技术亦证明了 VEGFR 在肿瘤血管生成中的重要作用. 他们将突变的 FLK-1 基因导入荷瘤小鼠的血管内皮细胞，突变的 FLK-1 蛋白与内源性野生型 FLK-1 形成异二聚体，阻断其信号传导功能，抑制了肿瘤血管生成和肿瘤生长. 这些均说明了 VEGFR 在肿瘤血管生成中发挥重要作用.

目前，针对 VEGFR 的抗体导向研究较少，仅见多克隆兔抗 FLK-1 抗血清用于受体-配体结合及信号传导的研究[48].

利用 VEGF 能与 VEGFR 特异性结合的特点，将 VEGF 与细胞毒素结合进行受体导向治疗，亦为一有效途径. 实验证明 $VEGF_{165}$ 与缺乏受体结合区的白喉毒素的结合物（$VEGF_{165}$-DT385），能特异性地抑制 FLK-1 阳性内皮细胞的增殖，而对 FLK-1 阴性内皮细胞无作用；鸡胚绒毛尿囊膜实验证明 $VEGF_{165}$-DT385 能抑制血管生成[49].

Kendall 等人[50]从人脐静脉内皮细胞 cDNA 文库分离出两个编码可溶性 VEGFR FLK（sFLK）的 cDNA 克隆，表达的 sFLK 具有信号肽序列，但缺乏穿膜和细胞内激酶结构域. 这种分泌型受体能与 VEGF 高亲和力结合，并能与内皮细胞膜上 VEGFR 形成二聚体，阻断 VEGF 促进内皮细胞分裂的功能.

2.5 针对内皮细胞粘附分子的抗体导向治疗

粘附分子是一类介导细胞与细胞和细胞与细胞外基质间粘附作用的膜表面糖蛋白，具有广泛的生物学活性. 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 主要表达于内皮细胞，是多种细胞外基质成分的受体，如纤维粘连蛋白、层粘连蛋白和胶原蛋白等，对内皮细胞在血管生成中的粘附、移动、增殖和生存具有重要作用. Brooks 等人[20]发现人伤口肉芽组织新生血管表达整合素 $\alpha_v\beta_3$，而正常皮肤则不表达；鸡胚绒毛尿囊膜实验表明血管生成时整合素 $\alpha_v\beta_3$ 表达量增加 4 倍. 抗整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗能阻断 bFGF 和 TNF-α 诱导的血管生成，但对已经形成的血管则无影响. Brooks 等人[51]进一步研究表明，抗整合素 $\alpha_v\beta_3$ 单抗能抑制移植于鸡胚绒毛尿囊膜的肿瘤诱导的血管生成，导致肿瘤迅速消退，其作用机理是选择性地诱导表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的增殖血管细胞发生凋亡. 因此，整合素 $\alpha_v\beta_3$ 是肿瘤新生血管的标志，是抗体导向治疗的又一理想靶目标. 目前已经开始在晚期癌症病人进行抗整合素 $\alpha_v\beta_3$ 药物的前期临床试验.

选择素 E 的表达主要局限于活化的内皮细胞，其配体是涎酸化 $Lewis^x$（SLe^x）和 $Lewis^a$（SLe^a）相关的寡聚糖，介导白细胞与内皮细胞的粘附与移出血管. 最近，Nguyen 等人[19]发现选择素 E 及其配体在血管生成中亦发挥重要作用. 抗 SLe^x 和 SLe^a 以及选择素 E 的单抗能抑制牛毛细血管内皮细胞形成毛细血管样结构. 由于肿瘤衍生的粘附分子特异性地聚积于肿瘤血管[52]，研究针对肿瘤血管内皮细胞特异性粘附分子的抗体导向治疗，无疑具有重要的临床意义.

2.6 针对肿瘤血管基底膜的抗体导向治疗

肿瘤血管无论在形态或功能上都与正常血管有明显差别，如肿瘤新生血管往往是薄壁的毛细血管或血窦样结构，因内皮细胞稀少而暴露出基底膜和血管周围结缔组织，肿瘤血管的渗透性亦明显增加[1,10,11]. 利用肿瘤血管的这些特点，针对其基底膜成分进行抗体导向治疗，亦是一条可行的途径. 纤维粘连蛋白是细胞外基质中的一种大分子糖蛋白，是许多粘附分子

的配体，在细胞分化、移动和粘附过程中起重要作用．研究发现含 ED-B 异构型纤维粘连蛋白(bFn)主要存在于肿瘤新生血管[53]．Epstein 等人[3]用特异性抗 bFn 单抗 TV-1 与 IL-2 结合，在荷瘤小鼠进行抗体导向试验．先用 TV-1 将 IL-2 导向肿瘤血管，使肿瘤血流量增加，血管通透性增强，使随后注射的肿瘤细胞抗原特异性^{125}I 标记单抗在肿瘤的聚集量显著增多，而正常组织不受影响．肿瘤:器官放射性比值达 25:1～500:1，并且与肿瘤的血管化程度成正比．Epenetos[54]用^{99m}Tc 标记特异性 bFn 单抗 BC-1，在 10 例肿瘤病人作显象研究，结果显示在 60％的病人可检查出原发或转移病灶．他们又将 BC-1 单抗构建成 scFv 与毒素融合，正在进行肿瘤血管的抗体导向治疗试验．

3　抗血管疗法

Thorpe 研究小组在抗血管导向治疗方面进行了大量的实验研究，取得了令人鼓舞的进展[8,9,55～57]．他们首先建立了使肿瘤血管特异性表达靶抗原的动物模型[55]．用鼠 γ 干扰素基因转染成神经细胞瘤并移植于裸鼠，肿瘤细胞分泌的 γ 干扰素诱导肿瘤血管内皮细胞表达 MHC Ⅱ类抗原，而后者在正常组织血管不表达．免疫组织化学研究表明，静脉注射的MHCⅡ抗体特异性地定位于肿瘤血管内皮细胞[55]．他们又制备了 MHCⅡ抗体-蓖麻毒素 A 链免疫毒素，给荷瘤小鼠单次静注 40 μg 后，发现所有肿瘤均显著退缩，平均缩小 3/4，有些几乎完全消退．肿瘤组织学观察显示，注射免疫毒素后 2 h 开始出现内皮细胞破坏，血小板聚集；6 h，许多肿瘤血管被纤维蛋白血栓闭塞，但肿瘤细胞本身尚无形态学改变；24 h，所有血管均被成熟血栓闭塞，周围的肿瘤细胞出现核固缩；48 h，大量肿瘤细胞变性，自溶[56]．最近，Thorpe 小组又将抗 MHC Ⅱ单抗的 Fab'与抗组织因子(tissue factor, TF)单抗的 Fab'构建成双特异性抗体，将其与失去膜结合区的重组 TF(rTF)相连，对肿瘤血管进行抗体导向治疗，以期引发肿瘤血管内的凝血过程，使肿瘤坏死消退．给荷瘤小鼠静脉注射抗体-rTF 复合物能选择性地引起肿瘤血管内血栓形成，效果较免疫毒素更为理想．注射后 30 min，整个肿瘤的所有血管均有血栓形成；4 h，肿瘤细胞分散，出现核固缩；24 h，整个肿瘤呈均匀一致的大块坏死．在 21 只接受治疗的荷瘤小鼠中有 8 只(38％)肿瘤完全消退，并持续 4 月以上；5 只(24％)肿瘤体积缩小 50％以上．抗体-rTF 复合物或游离的 rTF 对正常组织血管没有影响[57]．

这些结果表明抗血管导向治疗肿瘤是行之有效的途径，具有光明的临床应用前景．但在真正进入临床应用之前，仍有许多重要问题亟待解决，其中最重要的是寻找肿瘤血管内皮细胞的特异性标志物(抗原和受体)．Thorpe 小组是向肿瘤细胞转入表达特定产物的基因，而这在病人则难以实施．针对血管内皮细胞制备的单抗仅少数对肿瘤血管特异性较强[58～60]．幸运的是，与肿瘤血管生成有关的一些特异性靶分子不断被发现，除了前述的 VEGF 和 VEGFR，整合素 $\alpha_v\beta_3$，选择素 E 和 bFn 以外，尚有 endoglin 样分子[60]和 endosialin[61]等．另外，用完整血管内皮细胞直接从大容量噬菌体抗体库筛选内皮细胞特异性人抗体，不需要纯化抗原，而且方便快捷，是获得抗内皮细胞抗体的新方法[62]．作者利用经肝癌细胞培养上清激活的人脐静脉内皮细胞，对重组噬菌体人单链抗体库进行数轮“结合-洗脱-扩增”筛选，ELISA 检测阳性克隆再与多种正常人非内皮细胞进行消减筛选，获得几株内皮细胞特异性噬菌体抗体，免疫细胞化学鉴定这些抗体能与内皮细胞膜特异性反应．

4　血管导向治疗与其他疗法的联合应用

抗血管生成疗法能够抑制肿瘤生长，使其处于“休眠”状态[63,64]．但不能使肿瘤完全消

退[35~42,51]. 尽管 Thorpe 研究小组成功地用抗血管导向治疗荷瘤小鼠,使 38% 的小鼠肿瘤完全消退,并持续 4 个月以上. 而在那些没有完全治愈的小鼠肿瘤组织中,虽然肿瘤中心形成大块坏死,但处在肿瘤边缘与宿主交界的 5~10 层瘤细胞仍能存活[56,57]. 这些残存的瘤细胞不依赖肿瘤血管供应,而是从宿主血管床获得营养,是肿瘤复发的根源. 由于残存的瘤细胞分裂旺盛,对化疗和放疗仍然敏感,因而血管导向治疗可与常规化疗和放疗联合应用,进一步提高疗效,缩短疗程,防止肿瘤复发,动物实验结果表明抗血管生成药与化疗或放疗联合应用,比单用化疗或放疗能显著延迟肿瘤生长,荷瘤动物存活期亦明显延长[65,66]. 直接针对肿瘤细胞的抗体导向治疗与抗血管疗法联合应用,亦可提高疗效. Burrows 等人[56]的实验中,两种疗法联用的 8 只小鼠有 5 只肿瘤完全消退并不再复发,明显优于单用抗血管治疗者. 血管导向治疗也可以与血管生成抑制因子联合应用. 动物实验表明血管抑制素[67]和内皮细胞抑制素[22]能强烈抑制肿瘤生长和转移,促使肿瘤消退. 血管抑制素能使生长到 400 mg(约占小鼠体重的 2%)的肿瘤缩小至显微镜下可见的微小瘤灶. 内皮细胞抑制素的抑瘤作用更强,当停止治疗肿瘤复发后,恢复治疗同样有效,可如此反复 6 次之多,并且无副作用.

5 展望

以血管为靶的肿瘤抗体导向治疗在动物实验已经获得令人鼓舞的进展,这种治疗肿瘤的新方法不久也将会进入临床试验,为恶性肿瘤的治疗提供又一新手段. 但是,人体肿瘤的生长时间远远长于实验动物移植瘤的生长时间,其血管情况亦可能与实验性肿瘤的血管有很大不同,例如,人体肿瘤血管可能更为复杂,与实验性肿瘤相比对抗血管治疗可能较不敏感等. 因此,抗血管治疗在人体的疗效能否象动物实验那样理想,还要看今后几年大量临床试验的结果.

致谢 作者感谢田波教授对本文的审阅和指导. 本工作为国家"八六三"计划基金(批准号:102-09-0204)资助项目.

参 考 文 献

1 Dvorak H F, Nagy J A, Dvorak A M. Structure of solid tumors and their vasculature: implications for therapy with monoclonal antibodies. Cancer Cells, 1991, 3(3): 77~85

2 Jain K. Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. Cancer Metastasis Rev, 1990, 9(3): 253~266

3 Epstein A L, Khawli L A, Hornick J L, et al. Identification of a monoclonal antibody, TV-1, directed against the basement membrane of tumor vessel, and its use to enhance the delivery of macromolecules to tumors after conjugation with interleukin 2. Cancer Res, 1995, 55(12): 2 673~2 680

4 Kerbel R S. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. BioEssays, 1991, 13(1): 31~36

5 Winter G, Griffiths A D, Hawkins R E, et al. Making antibodies by phage display technology. Annul Rev Immunol, 1994, 12: 433~455

6 Irving R A, Hudson P J, Goding J W. Construction, screening and expression of recombinant antibodies. In: Goding J W ed. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. 3rd ed, London: Academic Press, 1996. 424~464

7 Huston J S, George A J T, Adams G P, et al. Single-chain Fv radioimmunotargeting. Quart J Nucl Med, 1996, 40(3): 320~333

8 Thorpe P. Antibody-directed targeting of tumor vasculature. Proc Am Assoc Cancer Res, 1996, 37: 668

9 Barinaga M. Designing therapies that target tumor blood vessels. Science, 1997, 275(5299): 482～484

10 Denekamp J. Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer. Cancer Metastasis Rev, 1990, 9(3): 267～282

11 Denekamp J. Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. Br J Radiol, 1993, 66(783): 181～196

12 阎锡蕴, 田 波. 人抗体库技术, 科学通报, 1997, 42(12): 1 242～1 248

13 Battegay E J. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. J Mol Med, 1995, 73(7): 333～346

14 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1 182～1 186

15 Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. N Engl J Med, 1995, 333(26): 1 757～1 763

16 Folkman J. Tumor angiogenesis. In: Holland J F, et al eds. Cancer Medicine, 4th ed, Vol. 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1997. 181～204

17 Fidler I J, Ellis L M. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. Cell, 1994, 79(2): 185～188

18 Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. Am J Pathol, 1995, 147(1): 9～19

19 Nguyen M, Strubel N A, Bischoff J. A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. Nature, 1993, 365(6443): 267～269

20 Brooks P C, Clark R A F, Cheresh D A. Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. Science, 1994, 264(5158): 569～571

21 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell, 1996, 86 (3): 353～364

22 O'Reilly M S, Boech T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell, 1997, 88(2): 277～285

23 Bicknell R, Harris A L. Anticancer strategies involving the vasculature: vascular targeting and the inhibition of angiogenesis. Sem Cancer Biol, 1992, 3: 399～407

24 Senger D E, van de Walter L, Brown L F, et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. Cancer Metastasis Rev, 1993, 12(3/4): 303～324

25 Claffey K P, Robinson G S. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. Cancer Metastasis Rev, 1996, 15(2): 165～176

26 Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, et al. Vascular endothelial growth factor expressionin primary esophageal equamous cell carcinoma: association with angiogenesis and tumor progression. Cancer, 1997, 79(2): 206～213

27 Maeda K, Chung Y-S, Ogawa Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. Cancer, 1996, 77(5): 858～863

28 Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana C D, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. Cancer Res, 1995, 55(18): 3 964～3 968

29 Mise M, Arii S, Higashituji H, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor. Hepatology, 1996, 23(3): 455～464

30 Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, et al. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. Cancer Res, 1996, 56(13): 3 004～3 009

31 Mattern J, Koomagi R, Volm M. Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumor cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. Br J Cancer, 1996, 73(7): 931～934

32 Toi M, Kondo S, Suzuki H, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. Cancer, 1996, 77(6): 1 101～1 106

33 Abu-Jawdeh G M, Faix J D, Niloff J, et al. Strong expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in ovarian borderline and malignant neoplasms. Lab Invest, 1996, 74(6): 1 105～1 115

34 Takano S, Yoshii Y, Kondo S, et al. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of

brain tumor patients. Cancer Res, 1996, 56(9): 2 185～2 190

35 Kim K J, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*. Nature, 1993, 362(6423): 841～844

36 Melnyk O, Shuman M A, Kim K J. Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. Cancer Res, 1996, 56(4): 921～924

37 Asano M, Yukita A, Matsumoto T, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor$_{121}$. Cancer Res, 1995, 55(22): 5 296～5 301

38 Warren R S, Yuan H, Matli M R, et al. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. J Clin Invest, 1995, 95(4): 1 789～1 797

39 Yuan F, Chen Y, Dellian M, et al. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(25): 14 765～14 770

40 Borgstom P, Hillan K J, Sriramarao P, et al. Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. Cancer Res, 1996, 56(17): 4 032～4 039

41 Hori A, Sasada R, Matsutani E, et al. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. Cancer Res, 1991, 51(22): 6 180～6 184

42 Olson K A, French T C, Vallee B L, et al. A monoclonal antibody to human angiogenin suppresses tumor growth in athymic mice. Cancer Res, 1994, 54(17): 4 576～4 579

43 Hewett P W, Murray J C. Coexpression of flt-1, flt-4 and KDR in freshly isolated and cultured human endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 221(3): 697～702

44 Brown L F, Berse B, Jackman R W, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinoma of gastrointestinal tract. Cancer Res, 1993, 53(19): 4 727～4 735

45 Brogi E, Schatteman G, Wu T G, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. J Clin Invest, 1996, 97(2): 469～476

46 Millauer B, Shawver L K, Plate K H, et al. Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative FLK-1 mutant. Nature, 1994, 367(6463): 576～579

47 Millauer B, Longhi M P, Plate K H, et al. Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*. Cancer Res, 1996, 56(7): 1 615～1 620

48 Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, et al. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem, 1994, 269(43): 26 988～26 995

49 Ramakrishnan B, Olson T A, Bautch V L, et al. Vascular endothelial growth factor-toxin conjugate specifically inhibits KDR/flk-1-positive endothelial cell proliferation *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. Cancer Res, 1996, 56(6): 1 324～1 330

50 Kendall R L, Thomas K A. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(22): 10 705～10 709

51 Brooks P C, Montgomery A M P, Rosenfeld M, et al. *Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.* Cell, 1994, 79(7): 1 157～1 164

52 Akaogi K, Okabe Y, Sato J, et al. Specific accumulation of tumor-derived adhesion factor in tumor blood vessels and in capillary tube-like structures of cultured vascular endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(16): 8 384～8 389

53 Carnemolla B, Balza E, Siri A, et al. A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors. J Cell Biol, 1989, 108(3): 1 139～1 148

54 Epenetos A A. Targeting cancer angiogenesis and neovasculature. IBC's 7th Annual International Conference on Antibody Engineering, Coronado, USA, December 2～4, 1996

55 Burrows F J, Watanabe Y, Thorpe P E. A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors. Cancer Res, 1992, 52(21): 5 954～5 962

科 学 通 报
第42卷 第19期 Chinese Science Bulletin 1997年10月

【特邀论文】

大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因克隆及其原核表达载体构建、表达

任圣俊 蒋惠秋 顾健人*
(上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室,上海 200032. *联系人)

摘要 通过PCR方法克隆出大肠杆菌株H-30的胞嘧啶脱氨酶(CD, cytosine deaminase, EC 3.5.4.1)基因,并将其起始密码子GTG突变为ATG,构建了CD基因的原核重组表达载体pBV220-CD,通过测定胞嘧啶脱氨酶活性筛选出CD高表达活性克隆H-30-CD-11, 5-氟胞嘧啶(5-FC, 5-fluorocytosine)对CD活性克隆有杀灭毒性. DNA序列分析显示CD高表达活性克隆H-30-CD-11较基因文库中所报道的CD基因存在16个位点碱基改变,引起肽链中氨基酸改变的位点有5个.

关键词 胞嘧啶脱氨酶基因 原核表达载体 SDS-PAGE分析 酶活性分析 CD高表达活性克隆

胞嘧啶脱氨酶(CD, cytosine deaminase EC 3.5.4.1)能够使5-氟胞嘧啶(5-FC, 5-fluorocy-

56 Burrows F J, Thorpe P E. Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(19): 8 996～9 000
57 Huang X M, Molena G, King S, et al. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. Science, 1997, 275(5299): 547～550
58 Hagameier H-H, Vollmer E, Goerdt S, et al. A monoclonal antibody reacting with endothelial cells of budding vessels in tumors and inflammatory tissues, and nonreactive with normal adult tissues. Int J Cancer, 1986, 38(4): 481～488
59 Clarke M S F, Kiff R S, Kumar S, et al. The identification of proliferation-related proteins in human endothelial cells as a possible target in tumor therapy. Int J Radiat Biol, 1991, 60(1/2): 17～23
60 Wang J M, Kumar S, Pye D, et al. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. Int J Cancer, 1993, 54(3): 363～370
61 Retting W J, Garin-Chesa P, Healey J H, et al. Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(22): 10 832～10 836
62 de Kruif J, van der Vuurst de Vries A-R, Cilenti L, et al. New perspectives on recombinant human antibodies. Immunol Today, 1996, 17(10): 453～455
63 Holmgren L. Antiangiogenesis restricted tumor dormancy. Cancer Metastasis Rev, 1996, 15(2): 241～245
64 Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, et al. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs *de novo* tumor growth. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(5): 2 002～2 007
65 Teicher B A, Sotomayor E A, Huang Z D. Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease. Cancer Res, 1992, 52(22): 6 702～6 704
66 Teicher B A, Holden S A, Ara G, et al. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by TNP-470 alone and with other anti-angiogenic agents. Int J Cancer, 1994, 57(6): 920～925
67 O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. Cell, 1994, 79(2): 315～328

(1997-06-06收稿)