肿瘤血管新生抑制因子的研究进展

杨霞, 杨中汉, 周倜, 齐炜炜, 高国全*

中山大学中山医学院生化教研室, 广州 510080

* 联系人, E-mail: gaogq@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2020-07-06; 接受日期: 2020-08-01; 网络版发表日期: 2020-10-15

摘要 血管新生是肿瘤发生发展中一个重要的病理特征, 抗血管新生已经成为肿瘤治疗研究的一大热点. 目前抗血管新生的策略主要是应用血管新生刺激因子拮抗剂或血管新生抑制因子, 以抑制肿瘤异常增加的血管新生. 相比于血管新生刺激因子拮抗剂, 内源性血管新生抑制因子展现出更好的治疗前景, 但是其分子机制还有待进一步阐明. 内源性血管新生抑制因子包括两类, 一类是前体蛋白的水解片段, 如人纤溶酶原K5(plasminogen kringle 5, K5)、血管抑素(angiostatin/kringle 1~4)、内皮抑素(endostatin)等; 另一类是细胞分泌性的蛋白质, 如色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)、激肽释放酶结合蛋白(kallikrein-binding protein, KBP)、抗凝血酶(antithrombin)等. 本文主要以本课题组研究的PEDF, KBP和K5为例, 分别介绍其生物学功能、抗肿瘤血管新生机制及应用前景等方面的研究进展, 希望这些研究能够为未来肿瘤抗血管新生治疗提供借鉴.

关键词 肿瘤, 血管新生, 内源性血管新生抑制因子

1 内源性血管新生抑制因子及平衡失调假说

1.1 血管新生

血管新生(angiogenesis)是指从已经存在的毛细血管网上再大量生成新生血管的过程, 包括血管基膜和血管外基质的降解, 内皮芽孢的生成、增殖和迁移, 以及血管管腔的形成和动静脉分化, 最后形成毛细血管的过程. 目前普遍将血管新生分为芽生型血管新生(sprouting angiogenesis, SA)和套叠型血管新生(intussusceptive angiogenesis, IA)两类^[1](图1), 在血管网形成的过程中, 两种类型的血管新生同时发生. IA无需内皮细胞的增殖, 形成新生血管的速度比SA更快, 因此胚

胎发育和大多数肿瘤需要通过这种方式快速形成血管^[2]. 在生理情况下, 血管新生常常发生在子宫内膜增生、胎盘形成和伤口愈合等过程中, 对恢复血供和促进伤口愈合起到积极作用. 在病理情况下, 如在肿瘤进程中, 当肿瘤体积增长到一定程度时, 即2~3 mm^[3], 肿瘤内部就会有新生血管的生成. 大量文献表明, 持续的血管新生是肿瘤的基本特征之一, 增殖活跃的肿瘤倾向于激活血管新生表型, 以满足其对氧气和营养物质的需求^[3,4]. 此外, 新生的内皮细胞还为肿瘤组织生长提供促进因子, 如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)等. 同时, 新生血管结构和功能的不完整, 更是肿瘤细胞广泛浸润、转移和复发

引用格式: 杨霞, 杨中汉, 周倜, 等. 肿瘤血管新生抑制因子的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1055–1067

Yang X, Yang Z H, Zhou T, et al. Research progress of tumor angiogenesis inhibitors (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 1055–1067, doi: 10.1360/SSV-2020-0032

图1 血管新生类型示意图。A: 静息状态的血管; B: 芽生型血管新生及Dll4/Notch介导的Tip cell/Stalk cell分化; C: 套叠型血管新生示意图

Figure 1 Schematic diagram of angiogenic type. A: Resting blood vessel; B: sprouting angiogenesis and Dll4/Notch-mediated Tip cell/Stalk cell differentiation; C: intussusceptive angiogenesis

的基础^[5,6]。肿瘤血管新生存在异质性,除了在已有血管基础上依赖于内皮细胞形成血管腔的血管新生,还存在通过肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)来源形成的新生血管,导致对靶向血管内皮细胞药物的耐药。综上,血管新生是肿瘤发生发展中一个重要的病理特征,抗血管新生已经成为肿瘤治疗研究的一大热点。

1.2 内源性血管新生抑制因子

内源性血管新生抑制因子包括以下两类:一类是细胞分泌性的蛋白质,如色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)^[7]、激肽释放酶结合蛋白(kallikrein-binding protein, KBP)^[8]、血小板反应蛋白(thrombospondin 1 and 2, TSP-1 and -2)^[9,10]、抗凝血酶(antithrombin)、血小板因子4(platelet factor 4)^[11]、血管抑制因子(vasohibin)^[12]、软骨调节素(chondromodulin)^[13]。另一类是前体蛋白的水解片段,例如纤溶酶原(plasminogen)水解后可产生的小分子片

段——血管抑素(angiostatin/kringle 1~4)和人纤溶酶原K5(plasminogen kringle 5, K5),其均具有抑制血管新生的活性^[14];基质来源的多肽片段,如内皮抑素(endostatin)是胶原蛋白XVIII的水解多肽^[15],肿瘤抑素(tumstatin)是胶原蛋白IV的水解多肽^[16]。本文主要以本课题组研究的PEDF, KBP和K5为例,介绍其生物学功能、抗肿瘤血管新生机制等方面的研究进展。

1.3 平衡失调假说

1971年,美国外科医生Folkman^[17]提出“肿瘤的生长和转移均依赖于新生血管的形成”,如果能抑制血管新生,便可“饿死肿瘤”,并且首次提出“血管新生是促血管生成因子与血管生成抑制因子失衡所导致的”,且该平衡失调假说已被大量研究所证实^[3,18],为血管新生的研究和治疗奠定了基础(图2)。常见的内源性刺激因子有血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)等,以及低氧状态下HIF-1 α 转录上调的血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、金属蛋白酶家族(metal matrix proteinase, MMPs)等;常见的内源性抑制因子见上文(1.2节)。刺激因子和抑制因子之间的平衡,精细地调控血管新生。在生物发育的早期,组织器官的形成需要大量的新生血管为其提供营养,此时血管新生刺激因子在平衡中占主导地位;发育完全以后,除了伤口愈合、女性月经周期等生理情况外,血管处于静息状态,血管新生抑制因子与刺激因子处于平衡,也可能存在抑制因子高表达的情况;但是在某些病理情况下,如糖尿病视网膜病、直径>3 mm的肿瘤,会出现局部缺氧,包括本课题组在内的研究已证实^[19],低氧(hypoxia)会诱导血管内皮生长因子VEGF等血管新生刺激因子高表达,同时减少PEDF的生成,平衡被打破从而出现病理性的血管新生。几乎所有的新生血管丰富的实体瘤(solid tumor)都有VEGF及其受体的高表达;在实验性角膜、视网膜血管增生动物模型和相应的病人中均检测到VEGF的高表达和内源性抑制因子PEDF、KBP的低表达^[19]。血管新生抑制因子的研究对于防治肿瘤生长转移及其他血管增生相关疾病有重要的临床转化意义。

图 2 血管新生刺激因子与抑制因子平衡示意图

Figure 2 Schematic diagram of angiogenesis stimulators and inhibitors

2 内源性血管新生抑制因子通常在肿瘤组织中表达下调

2.1 色素上皮衍生因子(PEDF)

PEDF是丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine proteinase inhibitor, Serpins)家族成员, 于1999年首次被发现具有抗血管新生的活性^[7], 在人体大部分器官及血浆中均有表达^[19], 尤其在脂肪细胞及成人肝脏中表达较多^[20]. 在肿瘤研究领域, PEDF被认为可通过直接抑制肿瘤细胞和间接抑制血管新生两种方式抑制多种肿瘤组织的生长^[21]. 对大多数肿瘤而言, PEDF通过抑制肿瘤血管新生间接抑制肿瘤生长. PEDF对宫颈癌、结肠癌、胰腺癌、黑色素瘤及前列腺癌等多种肿瘤组织中的血管新生具有较强的抑制作用^[22]. 已有研究表明, 在多数肿瘤组织中PEDF表达水平明显降低^[21,23].

2.2 组织激肽释放酶结合蛋白(KBP)

KBP(在人体又称kallistatin)是组织激肽释放酶结合蛋白, 具有独特的丝氨酸蛋白酶抑制剂活性, 参与高

血压、炎症、血管生成、肿瘤等多种疾病的发生和发展过程^[8,24]. KBP主要通过抑制肿瘤血管新生发挥抗肿瘤作用, 其抗血管新生的主要机制是: (i) 与VEGF、bFGF竞争性结合内皮细胞表面的受体硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG), 阻断血管生成信号转导通路促进凋亡. (ii) 通过与激肽释放酶结合抑制其发挥作用. 在肝癌和胃癌中, 本课题组^[25,26]发现, 与PEDF的机制类似, KBP能够直接诱导内皮细胞凋亡和抑制肿瘤细胞分泌VEGF的旁分泌作用. 本课题组^[27]最近的研究发现, KBP通过激活Fas/FasL/caspase-8通路直接诱导结肠癌细胞凋亡. 本课题组^[28]最近的研究表明, kallistatin在胃癌病人癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织, 胃癌病人血浆kallistatin的含量明显高于正常人, 且与胃癌的淋巴结分期呈负相关关系, 揭示了kallistatin和胃癌淋巴结转移的关系. 另外还有报道提出, kallistatin在结直肠癌组织中的表达水平显著低于癌旁正常组织, 且肿瘤组织中kallistatin的水平与浸润深度、淋巴结侵犯程度、远处转移和American Joint Committee on Cancer(AJCC)分期呈显著负相关关系, kallistatin也可作为评估结直肠癌无疾病生存期(disease-free survival, DFS)和总生存期(overall survival, OS)的独立预后指标^[29].

2.3 血管内皮抑素

1997年, O'Reilly等人^[15]发现, 血管内皮抑素能够通过特异性作用于新生血管内皮细胞而直接抑制内皮细胞的增殖, 并诱导其凋亡. 目前关于endostatin在肿瘤中表达情况的报道不尽相同. 一方面, endostatin在肿瘤中的表达下调, 如肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)病人的肿瘤组织中endostatin的表达水平明显低于癌旁非肿瘤组织^[23]. 另一篇报道显示, 在HCC病人中, 癌旁非肿瘤组织的endostatin, TSP-1和TIMP-2的表达水平明显高于肿瘤组织^[30]. 另一方面, 许多文献报道, 血清endostatin水平在多种肿瘤(肝癌、膀胱癌、肺癌、颈部肿瘤、结直肠癌)患者中明显升高^[15,31], 且与多种临床指标相关, 已被广泛用于评价恶性肿瘤. Endostatin在肿瘤患者血清中水平的上调可能与其在肿瘤发生中的调节作用有关, 血管新生抑制剂比血管新生促进因子的半衰期长, 在血液循环中的时间较长^[32]. 此外, 切除原发肿瘤的病人血浆内皮抑素水平降低, 这有助于继发肿瘤的血管生成. 因此, 原发

肿瘤可能通过分泌血管新生抑制因子(如内皮抑素)来维持继发肿瘤的休眠状态^[33]。

2.4 其他内源性血管抑制因子

(1) 血管抑制素. 血管抑制素是纤溶酶原的一个38 kD的片段, angiostatin的表达可在多种肿瘤被检测出, 如子宫内膜癌、卵巢癌和非小细胞肺癌^[34,35]。一篇文献报道显示, 在143例非小细胞肺癌病人的组织样本中, 有34例angiostatin为阳性(24%), angiostatin阳性的患者比阴性患者有更长的无病生存期(disease-free survival)^[35]。

(2) 血小板反应蛋白. 血小板反应蛋白1(TSP-1)是一类具有抗血管新生活性的分泌蛋白, 在1978年由Lawler等人从凝血酶处理后的血小板中分离而得, 故也被称为“凝血酶敏感蛋白”。有研究报道, TSP-1在处于低分化的口腔黏液表皮样癌肿瘤组织中的表达概率显著小于高分化的组织, 且TSP-1的表达水平与微血管密度呈负相关关系^[36]。最近的研究表明, 血浆内TSP-1水平的降低在确诊为胰腺导管腺癌的一年前就会出现, 并能明显提高CA199的诊断效能, 有望运用于临床^[37]。此外, 我国的研究学者发现, 随着前列腺疾病的进展, 血浆TSP-1有着不同的变化, 呈“正常机体-前列腺增生-前列腺癌”逐步下降的趋势, 而且有转移的前列腺癌较非转移的前列腺癌血浆TSP-1浓度明显降低^[38]。同时, TSP-1对前列腺癌的敏感度和特异性均比前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)高, 有望将来运用于前列腺癌的诊治环节^[39]。

(3) 血管抑制因子. Vasohibin-1(VASH-1)最早在2004年由Watanabe等人^[12]报道, 是截至目前唯一的由VEGF诱导, 内皮细胞分泌的负反馈血管调节蛋白。有报道指出, 在口腔、食管鳞状细胞癌、肝癌和乳腺癌等癌症中, VASH-1在肿瘤组织的表达水平均明显高于癌旁组织, 且与预后不良和恶性程度等临床指标相关^[40]。

3 内源性血管新生抑制因子具有抑制肿瘤内皮细胞来源的血管新生的作用

内源性血管新生抑制因子因其靶向作用于增殖的血管内皮细胞, 且对已有的正常血管无影响、副作用小、抗血管活性强、不易产生耐药性等优点而备受关

注。在上文(1.2节)提到的内源性血管新生抑制因子中, 血管抑素、内皮抑素等在20世纪90年代初被发现, 并成功用于肿瘤生长抑制实验研究并进入临床试验^[12]。重组人血管内皮抑素(Endostar, 恩度)成为我国针对肿瘤血管新生的第一个上市的药物。恩度主要是通过特异性地诱导内皮细胞凋亡, 从而抑制肿瘤血管新生和肿瘤生长, 其疗效还需要临床上进一步观察和确定。后来发现的PEDF, KBP和K5等内源性血管新生抑制因子拥有更高效的抗血管生成活性, 展现出潜在的抗肿瘤血管新生的前景。

3.1 PEDF抑制肿瘤血管内皮细胞的作用机制

PEDF发挥抗血管新生作用的主要靶点为血管内皮细胞, 且其需要与受体结合发挥功能(表1)。目前已报道的PEDF结合蛋白或受体主要有脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)^[41]、层黏连蛋白受体(laminin receptor, LR)^[42]、ATP合成酶的F1亚基(F1ATPase)^[43]和低密度脂蛋白相关受体蛋白(low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP6)^[44], 这些蛋白能与PEDF以高亲和力结合并介导PEDF的生物学功能。关于PEDF靶向内皮细胞抗血管新生的机制主要有以下两种。

(1) PEDF对内皮细胞的直接作用。PEDF能够激活P38/MAPK信号通路抑制内皮细胞迁移和JNK通路诱导内皮细胞凋亡^[45], 激活的P38通过上调胞质磷脂酶A2 α (phospholipase A2 α , PLA2 α), 进而上调PPAR γ , PPAR γ 作为转录因子促进了促凋亡因子P53的表达, 最终诱导内皮凋亡。PEDF还能通过激活NF- κ B上调FasL进而引发外源性凋亡^[46,47]。PEDF选择性地促进重构血管的内皮细胞发生凋亡, 而不影响已经存在的成熟血管。机制可能是静息的内皮细胞低表达CD95L, 血管重构中活化的内皮细胞膜表面CD95L表达增加, 因此PEDF处理后能够促进增殖的内皮细胞通过死亡受体信号通路发生凋亡^[46]。此外, PEDF还能够增加 γ 分泌酶介导的对VEGFR1和VEGFR2的切割, 并促进VEGFR的降解, 同时PEDF能够抑制VEGF诱导的VEGFR磷酸化和激活^[48,49]。本课题组^[50]研究发现, PEDF能够靶向抑制内皮细胞增殖, 通过激活死亡受体信号通路促进内皮细胞凋亡, 注射PEDF重组蛋白能够抑制视网膜母细胞瘤、胃癌的血管新生。

(2) PEDF下调肿瘤细胞VEGF-A的表达和分泌。本

表 1 内源性血管新生抑制因子**Table 1** Endogenous angiogenesis inhibitors

名称	作用机制
PEDF	激活P38/MAPK信号通路抑制内皮细胞迁移; 下调VEGF抑制内皮祖细胞趋化迁移
	激活JNK通路诱导内皮细胞凋亡
	激活NF- κ B, 上调FasL引发内皮细胞外源性凋亡通路
	增加 γ 分泌酶对VEGFR1和VEGFR2的切割, 促进VEGFR的降解
KBP	下调肿瘤细胞VEGF-A的表达和分泌; 促进Fas膜转位
	与VEGF、bFGF竞争性结合内皮细胞表面的受体硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG), 阻断血管生成的信号转导通路, 促进凋亡
K5	直接诱导血管和淋巴管内皮细胞凋亡; 抑制肿瘤细胞分泌VEGF-A、VEGF-C的旁分泌作用; 调节巨噬细胞炎症因子分泌和型别转换
	通过调控VEGF/PEDF平衡抑制肿瘤和糖尿病视网膜血管新生
	与视网膜Müller细胞膜上VDAC结合抑制VEGF表达
	和受体VDAC之间存在“VDAC1-AKT-GSK3 β -VDAC1”正反馈调节环路诱导内皮细胞凋亡

课题组^[51-53]研究发现, PEDF具有抑制内皮细胞和下调肿瘤细胞表达和分泌VEGF-A的双重作用. PEDF通过直接诱导内皮细胞凋亡及促进HIF-1 α 降解下调肿瘤细胞旁分泌VEGF-A抑制血管新生, 从而抑制视网膜母细胞瘤、宫颈癌、鼻咽癌和结肠癌肿瘤生长.

3.2 KBP抑制肿瘤血管内皮细胞的作用机制

KBP主要通过抑制肿瘤血管新生发挥抗肿瘤作用(表1), 其抗血管新生的主要机制是: (i) 与VEGF、bFGF竞争性结合内皮细胞表面的受体硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG), 阻断血管生成信号转导通路促进凋亡^[8]. (ii) 与PEDF的机制类似, KBP能够直接诱导内皮细胞凋亡和抑制肿瘤细胞分泌VEGF-A的旁分泌作用^[26]. (iii) KBP通过抑制kallikrein的活性从而阻滞MMP-2和MMP-9的激活, MMP-2/9与肿瘤的转移密切相关^[54].

3.3 K5抑制肿瘤血管内皮细胞的作用机制

K5能够在血管新生的多个环节发挥抗血管新生的作用(表1). Ji等人^[55]证实, K5可选择性地抑制处于增殖状态下的内皮细胞迁移, 但对静止期及正常内皮细胞的迁移则没有影响. 与血管抑素一样, K5可特异性地抑制内皮细胞的增殖, 使细胞周期停滞, 诱导其凋亡^[56]. 与之类似, 本课题组^[57]的研究显示, K5特异性地抑制视网膜微血管内皮细胞的生长, 而对非内皮细胞来源的视网膜周细胞、正常肝细胞、肝癌细胞的生长无明显作用, 显示K5具有细胞特异性地抑制内皮细胞

生长的作用. 在肝癌小鼠和裸鼠模型上, K5展现了通过抗血管新生抑制肿瘤生长的效应.

K5与受体结合才能发挥功能, 目前已报道的K5结合蛋白或受体主要是位于血管内皮细胞或肿瘤细胞表面的电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)^[58-60]. VDAC主要位于线粒体外膜, 通过其通道的开放或关闭调控线粒体凋亡途径. 近年研究发现, VDAC也可转位到线粒体以外的膜结构, 包括细胞膜^[58-60]和内质网膜^[61]等. 文献报道, K5通过与细胞膜上的VDAC结合抑制人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)的增殖^[60], 本课题组^[62]以往的研究也发现, K5通过与视网膜Müller细胞膜上VDAC结合介导其抑制VEGF表达的作用.

本课题组^[63]的研究揭示了K5和受体VDAC之间存在“VDAC1-AKT-GSK3 β -VDAC1”正反馈调节环路诱导内皮细胞凋亡. K5通过与细胞膜受体VDAC结合激活AKT-GSK3 β 通路, 磷酸化VDAC抑制其泛素化降解, 上调的VDAC转位到细胞膜和线粒体膜, 一方面进一步增强和放大与膜上VDAC的结合; 另一方面线粒体膜上的VDAC与Bax结合, 增加线粒体膜通透性, 导致线粒体内Cyt c的释放, 启动凋亡程序.

3.4 其他内源性血管新生抑制因子的作用机制

TSP-1可靶向肿瘤血管内皮细胞抑制血管新生, 其可通过结合CD148和CD36受体, 抑制内皮细胞的增生, 促进其凋亡^[64], 也可通过与钙网蛋白的相互作用抑制

内皮细胞的迁移及管腔形成. VASH-1作为内皮细胞分泌的负反馈血管调节蛋白, 可能参与调节内皮细胞的凋亡^[65]和HIF-1 α 的降解^[66]过程. Tumorstatin对肿瘤血管新生和肿瘤生长的抑制作用与肿瘤内皮细胞上黏附受体 $\alpha v\beta_3$ 整合素的表达相关^[67]. 血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶家族(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)广泛参与血管生物学和心血管病理生理学过程. 有研究报道, ADAMTS家族中许多成员(如ADAMTS-1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 12, 13, 15)被证实具有抑制血管生成和肿瘤生长的作用. 而ADAMTS-3则被报道通过结合辅助因子CCBE-1, 参与蛋白酶激活VEGF-C, 促进血管新生和淋巴管新生^[68,69]. 金属蛋白酶组织抑制因子3(tissue inhibitor of metalloproteinase 3, TIMP-3)是主要的内源性基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的主要抑制因子, 可以抑制血管新生和肿瘤生长、侵袭和转移^[70]. 此外还有在软骨组织中表达的蛋白, 如肌钙蛋白, 对体内和体外血管新生的过程也具有抑制作用^[71](表2).

4 内源性血管新生抑制因子对肿瘤干细胞来源血管新生的作用

肿瘤中新生血管的形成除了在已有血管基础上依赖于内皮细胞形成血管腔的血管新生, 还存在多种通过CSCs来源形成新生血管的方式. CSCs是肿瘤组织中具有干细胞特征的细胞群, 具有自我更新、无限增殖、多潜能分化、体内成瘤等特征^[72]. 大量研究认为, CSCs和肿瘤血管有密切关系, CSCs既可以在血管发

生中分化为内皮祖细胞和内皮细胞, 也可以通过自身塑性形成与宿主血管相通的血管拟态(vasculogenic mimicry, VM)^[73].

4.1 肿瘤干细胞分化来源的血管细胞

CSCs的分化能力对于肿瘤组织中非宿主血管内皮来源的肿瘤血管新生具有重要作用. Ricci-Vitiani等人^[74]发现, 将CD133⁺胶质母细胞瘤细胞在促血管生成培养基中培养, 其可分化为具有内皮细胞表型和功能的细胞. 这些细胞不仅可表达CD31, Tie-2等内皮细胞特异性标记蛋白, 还具有形成管状结构并摄取低密度脂蛋白的内皮细胞特异性功能. Bussolati等人^[75]在乳腺癌研究中发现, 乳腺癌干细胞在VEGF诱导下可以表达内皮细胞标记分子, 并在动物模型中形成人性质的血管网, 参与构成肿瘤组织的微循环结构. 在肾癌研究中发现, CD105⁺肿瘤细胞表达nestin, Oct4, Nanog等干细胞标记分子, 具有很强的干细胞样特性, 并可以在动物模型中分化为血管内皮细胞^[76]. 从卵巢癌或者结直肠癌细胞中分离CSCs, 将其接种在肿瘤小鼠模型, 均能发现肿瘤组织中存在能表达人内皮细胞特异性分子CD34, CD144, VEGFR2的细胞^[77,78]. 以上的研究均表明, CSCs在特定条件下可能转分化为肿瘤干细胞来源的内皮细胞, 且这一现象在多种肿瘤中具有普遍性.

使用贝伐单抗等经典抗血管新生靶向药物可以抑制内皮祖细胞向成熟内皮细胞分化, 但是对于CSCs直接转分化的内皮细胞并不起作用, 这一结果也提示, 临床上抗血管生成治疗效果欠佳很可能归因于肿瘤组织血管内皮细胞的异质性^[79]. CSCs分化形成的血管内皮

表 2 其他内源性血管抑制因子
Table 2 Other endogenous angiogenesis inhibitors

名称	作用机制
TSP1	通过结合CD148和CD36受体, 抑制内皮细胞的增生, 促进其凋亡 通过钙网蛋白的相互作用抑制内皮细胞的迁移及管腔形成
Vasohibin	可能参与调节内皮细胞的凋亡和HIF-1 α 的降解过程
Tumorstatin	对肿瘤血管新生和肿瘤生长的抑制作用与肿瘤内皮细胞上黏附受体 $\alpha v\beta_3$ 整合素的表达相关
ADAMTS1	通过结合FGF-2, 阻断VEGF165以及TS-1,2蛋白水解释放抗血管新生底物来促进抗血管新生
ADAMTS2	降低内皮细胞的增殖能力和毛细管状结构形成
TIMP3	通过caspase非依赖性细胞死亡途径和FAK依赖性生存途径介导内皮细胞凋亡
Troponin	通过抑制bFGF, 从而抑制毛细管内皮细胞的增殖

细胞既表现肿瘤干细胞特性,也具有内皮细胞特性.因此,如果能使用抗肿瘤干细胞药物联合抗血管新生靶向治疗,或许能解决该类细胞引起的抗血管生成治疗失败的问题,但尚需进一步研究.

4.2 内源性血管新生抑制因子抑制肿瘤干细胞形成拟态血管

VM是最早于1999年由Maniotis等人^[80]在研究高度恶性的黑色素瘤时报道的一种不依赖血管内皮细胞的新型肿瘤微循环模式,已在黑色素瘤^[80]、恶性胶质瘤^[81]、乳腺癌^[82]、肝癌^[83]、前列腺癌^[84]等高侵袭肿瘤中发现.这是一种全部由高侵袭性的肿瘤细胞通过塑性自身围成的管道,管壁没有内皮细胞的参与^[85].因此,靶向血管内皮细胞的抗新生血管药物可能对VM无效^[86].本课题组研究发现,抗新生血管药物索拉菲尼在乳腺癌中疗效不佳是因为VM的存在,并且VM使肿瘤细胞直接暴露在循环血流中,更容易发生脱落和转移,具有严重的危害性.

自从VM的概念被提出后,其形成机制也成为热点.有学者认为,恶性程度高的CSCs之所以能自身构成血管样的通道,是因为其表达了内皮细胞黏附分子(VE-cadherin),从而具有了内皮细胞特性^[87].VE-cadherin是一种表达于血管内皮细胞上的跨膜蛋白,是第一个被公认的介导VM形成的关键作用分子^[88].Liu等人^[89]在三阴乳腺癌中的研究发现,CD133⁺CSCs可以分化为具有内皮细胞功能并能形成VM结构的细胞,其可表达VE-cadherin等与胚胎时期血管发育密切相关的分子,但并不表达CD31、CD34等成熟内皮细胞相关分子,提示这些CSCs仅模拟了胚胎时期的血管管道,而并没有转分化为成熟的内皮细胞.此外,有研究表明,CSCs也可分化为周细胞.通过谱系特异性荧光报告基因实验分析人类胶质母细胞瘤标本,结果表明,大多数周细胞来源于肿瘤细胞.这些CSCs通过CXCL12/CXCR4信号通路被招募到内皮细胞周围,并通过TGF- β 分化为周细胞^[90].

目前,关于内源性抑制因子与肿瘤干细胞形成的VM关系的研究较少,且具体是由何种CSCs诱导形成VM的机制也尚未明晰,但VEGF/VEGFR2和Nodal/Notch通路可能参与该过程^[91].本课题组研究发现,乳腺癌干细胞形成的VM高表达血管周细胞标志物 α -SMA(alpha-smooth muscle actin),并发现

PEDF能通过下调 α -SMA从而抑制乳腺癌VM形成,为临床乳腺癌的抗血管生成治疗提供了新的候选药物.

5 内源性血管新生抑制因子具有抑制淋巴管新生的作用

肿瘤的转移方式包括直接蔓延、血管转移、种植转移和淋巴结转移.其中,淋巴结转移是胃癌、结直肠癌、食道癌等的主要转移方式^[92].因此,防止淋巴结转移是这些肿瘤治疗过程中至关重要的内容.已有研究证实,肿瘤诱导的淋巴管新生在肿瘤淋巴结转移过程中起着明显的促进作用,肿瘤内部及周边的淋巴管密度(lymphatic vessel density, LVD)与肿瘤的恶化及肿瘤患者的预后不佳密切相关^[93].

淋巴管新生是淋巴系统生理性发育、成熟及病理性扩增的一个过程.它与胚胎发育、伤口愈合、炎症转归和肿瘤转移密切相关^[94].过往研究证实,淋巴管新生和淋巴管腔的扩大有利于癌细胞进入淋巴管进而通过淋巴管转移到远端器官^[95].淋巴管管腔的扩增涉及淋巴内皮细胞(lymphatic endothelial cells, LECs)的增殖和淋巴管平滑肌细胞(lymphatic-associated vascular smooth muscle cells, LVSMCs)的改变,而淋巴管新生则通过淋巴内皮细胞的增殖、分泌基质酶和迁移等环节实现.当接受VEGF-C等因子的刺激信号时,淋巴管内皮细胞会增殖、迁移和成管,进而形成新的淋巴管道^[96].淋巴管内皮细胞特异地表达Prox-1, podoplanin, VEGFR-3和LYVE-1等分子,这些因子和受体可以参与到淋巴管新生的调控过程,同时,人们也将它们作为特异的marker去分离或者鉴定淋巴内皮细胞.在众多调控淋巴管新生的信号通路中,VEGF-C/VEGFR-3和VEGF-D/VEGFR-3信号途径起重要作用,而前者的作用更为普遍且重要^[97,98].

虽然以往的研究已经确定了许多刺激淋巴管生长的因素,但对淋巴管生成抑制剂知之甚少.本课题组^[28,99]研究发现,内源性血管新生抑制因子KBP除了经典的抗血管新生作用,还具有抑制淋巴管新生作用.KBP一方面可以通过影响AKT和ERK信号通路直接作用于淋巴内皮细胞抑制其增殖、迁移和成管,并促进其凋亡,从而达到抑制淋巴管新生的效果;另一方面,可以通过抑制NF- κ B信号通路显著地降低胃癌

细胞旁分泌VEGF-C, 从而抑制胃癌淋巴管新生。此外, 膜I型基质金属蛋白酶(membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP)也被报道与淋巴管新生相关, MT1-MMP可直接切割淋巴内皮细胞上的LYVE-1, 抑制LYVE-1介导的淋巴血管新生过程。此外, MT1-MMP介导的PI3K δ 信号可抑制促淋巴管新生的巨噬细胞的NF- κ B信号的激活, 从而减少其产生的VEGF-C^[100]。另外有研究表明, 一种肝素结合物(LHbisD4)可以通过阻断VEGF-C信号通路, 从而抑制淋巴管新生和远处转移的发生, 提示其可能可以作为一种口服活性淋巴管新生抑制剂用于抑制肿瘤淋巴转移过程^[101]。

6 总结与展望

自从2004年美国食品和药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准第一种血管生成抑制剂(贝伐单抗)治疗转移性结直肠癌以来, 血管新生已成为一个具有癌症治疗前景的靶点。迄今为止, 已有大量的血管新生和淋巴管新生抑制剂被发现和开发, 其中大多靶向VEGF/VEGFR通路, 从单克隆抗体、内源性肽到有机小分子和microRNAs, 许多已经进入临床试验, 或获得临床使用的批准^[102]。虽然肿瘤抗血管新生治疗已经取得了一定的进展, 但出现了效果不持久、耐药, 增强肿瘤缺氧和减少化疗药物的传递, 甚至可能诱发肿瘤转移的报道。原因可能是多方面的: (i) 肿瘤的异质性, 肿瘤干细胞的存在, 以及缺氧耐受或血管非依赖性的肿瘤细胞的出现; (ii) 肿瘤微环境下血管、内皮结构与功能均不正常; (iii) 肿瘤发生血管拟态; (iv) 其他血管新生信号通路代偿。针对抗肿瘤血管新生治疗的局限性, 目前提高其抗肿瘤疗效的治疗思路和策略有: (i) 多靶点治疗与联合治疗, 如许多文献所报道的抗血管新生疗法分别与免疫抑制疗法和化疗相联合的临床研究^[103,104]。(ii) 血管正常化, 肿瘤血管内皮结构功能不正常, 导致血管通透性增加, 以及抗肿瘤药物无法有效运输进而出现的耐药情况。血管正常化旨在将肿瘤血管从异常表型恢复到更像正常组织的表型, 以恢复促血管生成因子和抗血管生成因子之间的平衡, 提高抗肿瘤疗效。(iii)

其他血管新生调节因子, 如FGF/FGFR通路。在抗VEGF治疗出现耐药时, 可考虑抗FGF/FGFR通路的联合治疗, 其中包括小分子酪氨酸激酶抑制剂(tyrosine kinase inhibitors, TKIs)、抗FGFR抗体和一些细胞外FGF配体。(iv) 缺氧特性, 靶向低氧细胞和抑制HIF通路也逐渐成为癌症生物学中的重要治疗策略。(v) 靶向内皮细胞代谢, 内皮细胞代谢对维持内皮细胞基础功能和促血管新生信号通路的激活具有重要作用, 研究表明, 即使肿瘤对抗血管新生治疗产生耐药, 靶向内皮细胞代谢通路仍可抑制内皮细胞促血管新生的过程^[91]。

面对抗肿瘤血管新生治疗的局限性, 除上述的治疗思路和策略外, 内源性血管新生抑制因子具有显著的抗血管生成活性和多重作用, 较好的特异性和较小的宿主细胞免疫反应性和副作用, 也展现出良好的治疗前景。2005年, PEDF腺病毒载体(AdGVPEDF.11D)治疗年龄相关的“湿性”黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)被FDA批准进行I期临床试验, 但未公布临床试验结果。PEDF已在多种癌症中被报道有抑癌作用, 其作为潜在肿瘤治疗靶点具有重要的应用前景。有研究报道, 一类已经过FDA批准的磷铂化合物RRD2, 可显著提高PEDF表达水平, 提示其可作为肿瘤治疗的化疗药物^[105]。此外, 还有endostar, 一种改良的重组人内皮抑素, 已被批准为中国的抗癌药物, 对非小细胞肺癌、鼻咽癌和HER2阴性转移性乳腺癌都具有较好的治疗效果。最近的研究也表明, endostar可显著抑制卵巢癌细胞的血管新生, PD-L1的表达水平以及STAT3的磷酸化。其他内源性血管新生抑制因子, 像ADH-1和Rh-angiostatin, 仍处于临床试验阶段。目前, 许多内源性血管新生抑制因子的具体作用机制和在人体中的整体生理作用尚未明晰, 且口服药物的生物利用率不高, 蛋白稳定性和免疫原性效应低下, 使得临床上将其转化为可行的临床药品, 以及应用于癌症治疗的临床试验的过程受阻^[102], 因此有必要进行进一步的研究探索。另外, 新的更有效和特异的血管新生抑制因子也需要进一步去发现。通过关键靶点或多靶点抑制血管新生结合靶向治疗、化疗、放疗和免疫治疗等^[106,107], 抗肿瘤血管新生策略有望为人类治疗肿瘤做出重要贡献。

参考文献

- 1 Herbert S P, Stainier D Y R. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 551–564
- 2 Burri P H, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn*, 2004, 231: 474–488
- 3 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, 86: 353–364
- 4 Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 2005, 438: 932–936
- 5 Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995, 1: 27–30
- 6 Wang S J, Mi L Z. BMP9/ALK1/Endoglin signaling regulates the angiogenesis and vascular homeostasis (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2018, 48: 640–649 [王淑娟, 米立志. BMP9/ALK1/Endoglin信号通路参与调节血管形成与稳态维持. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 640–649]
- 7 Dawson D W, Volpert O V, Gillis P, et al. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 1999, 285: 245–248
- 8 Miao R Q, Agata J, Chao L, et al. Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Blood*, 2002, 100: 3245–3252
- 9 Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med*, 2002, 6: 1–12
- 10 Streit M, Riccardi L, Velasco P, et al. Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 14888–14893
- 11 Bikfalvi A, Gimenez-Gallego G. The control of angiogenesis and tumor invasion by platelet factor-4 and platelet factor-4-derived molecules. *Semin Thromb Hemost*, 2004, 30: 137–144
- 12 Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J Clin Invest*, 2004, 114: 898–907
- 13 Hiraki Y, Inoue H, Iyama K, et al. Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. *J Biol Chem*, 1997, 272: 32419–32426
- 14 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: 315–328
- 15 O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, 88: 277–285
- 16 Soff G A. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev*, 2000, 19: 97–107
- 17 Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med*, 2006, 57: 1–18
- 18 Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*, 2005, 65: 3967–3979
- 19 Gao G, Li Y, Zhang D, et al. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett*, 2001, 489: 270–276
- 20 Filleur S, Nelius T, de Riese W, et al. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein. *J Cell Biochem*, 2009, 106: 769–775
- 21 Ek E T H, Dass C R, Choong P F M. PEDF: a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities. *Trends Mol Med*, 2006, 12: 497–502
- 22 Ek E T H, Dass C R, Choong P F M. Pigment epithelium-derived factor: a multimodal tumor inhibitor. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5: 1641–1646
- 23 Filleur S, Volz K, Nelius T, et al. Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer. *Cancer Res*, 2005, 65: 5144–5152
- 24 Wang C R, Chen S Y, Wu C L, et al. Prophylactic adenovirus-mediated human kallistatin gene therapy suppresses rat arthritis by inhibiting angiogenesis and inflammation. *Arthritis Rheum*, 2005, 52: 1319–1324
- 25 Zhu B, Lu L, Cai W, et al. Kallikrein-binding protein inhibits growth of gastric carcinoma by reducing vascular endothelial growth factor production and angiogenesis. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 3297–3306
- 26 Lu L, Yang Z, Zhu B, et al. Kallikrein-binding protein suppresses growth of hepatocellular carcinoma by anti-angiogenic activity. *Cancer Lett*, 2007, 257: 97–106
- 27 Yao Y, Li L, Huang X, et al. SERPINA3K induces apoptosis in human colorectal cancer cells via activating the Fas/FasL/caspase-8 signaling pathway. *FEBS J*, 2013, 280: 3244–3255
- 28 Ma C, Luo C, Yin H, et al. Kallistatin inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis of gastric cancer by downregulating VEGF-C

- expression and secretion. *Gastric Cancer*, 2018, 21: 617–631
- 29 Sun H M, Mi Y S, Yu F D, et al. SERPINA4 is a novel independent prognostic indicator and a potential therapeutic target for colorectal cancer. *Am J Cancer Res*, 2016, 6: 1636–1649
- 30 Yu D, Chen J, Sun X, et al. Mechanism of endothelial progenitor cell recruitment into neo-vessels in adjacent non-tumor tissues in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 2010, 10: 435
- 31 Walia A, Yang J F, Huang Y H, et al. Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850: 2422–2438
- 32 Lee T Y, Tjin Tham Sjin R M, Movahedi S, et al. Linking antibody Fc domain to endostatin significantly improves endostatin half-life and efficacy. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 1487–1493
- 33 Guba M, Cernaianu G, Koehl G, et al. A primary tumor promotes dormancy of solitary tumor cells before inhibiting angiogenesis. *Cancer Res*, 2001, 61: 5575–5579
- 34 Yabushita H, Noguchi M, Obayashi Y, et al. Angiostatin expression in ovarian cancer. *Oncol Rep*, 2003, 10: 1225–1230
- 35 Volm M, Mattern J, Koomagi R. Angiostatin expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 3236–3240
- 36 Zhao C, Yang S, Peng W, et al. Correlation between TSP-1 gene expression and tumor differentiation in oral mucoepidermoid carcinoma (in Chinese). *West Med*, 2015, 27: 1638–1640+1643 [赵聪, 杨森, 彭为, 等. TSP-1基因在口腔粘液表皮样癌中的表达与肿瘤分化的相关性. *西部医学*, 2015, 27: 1638–1640+1643]
- 37 Jenkinson C, Elliott V L, Evans A, et al. Decreased serum thrombospondin-1 levels in pancreatic cancer patients up to 24 months prior to clinical diagnosis: association with diabetes mellitus. *Clin Cancer Res*, 2016, 22: 1734–1743
- 38 Yang W D, Pan Y P. Current clinical research on anti-tumor angiogenesis of TSP-1 (in Chinese). *Guangdong Med*, 2016, 37: 3772–3775 [杨文德, 潘运龙. TSP-1抗肿瘤血管生成的临床研究现状. *广东医学*, 2016, 37: 3772–3775]
- 39 Lu J C. Application of thrombospondin-1 in the auxiliary diagnosis of prostate cancer (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Shanghai: Fudan University, 2013 [陆建成. 血小板反应蛋白-1在前列腺癌辅助诊断中的应用. 硕士学位论文. 上海: 复旦大学, 2013]
- 40 Wang Q, Tian X, Zhang C, et al. Upregulation of vasohibin-1 expression with angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative surgery. *Med Oncol*, 2012, 29: 2727–2736
- 41 Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar J D, et al. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem*, 2006, 281: 38022–38037
- 42 Bernard A, Gao-Li J, Franco C A, et al. Laminin receptor involvement in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem*, 2009, 284: 10480–10490
- 43 Notari L, Arakaki N, Mueller D, et al. Pigment epithelium-derived factor binds to cell-surface F1-ATP synthase. *FEBS J*, 2010, 277: 2192–2205
- 44 Park K, Lee K, Zhang B, et al. Identification of a novel inhibitor of the canonical Wnt pathway. *Mol Cell Biol*, 2011, 31: 3038–3051
- 45 Konson A, Pradeep S, D'Acunto C W, et al. Pigment epithelium-derived factor and its phosphomimetic mutant induce JNK-dependent apoptosis and p38-mediated migration arrest. *J Biol Chem*, 2011, 286: 3540–3551
- 46 Volpert O V, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med*, 2002, 8: 349–357
- 47 Biyashev D, Veliceasa D, Kwiatek A, et al. Natural angiogenesis inhibitor signals through Erk5 activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem*, 2010, 285: 13517–13524
- 48 Cai J, Jiang W G, Grant M B, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem*, 2006, 281: 3604–3613
- 49 Ablonczy Z, Prakasam A, Fant J, et al. Pigment epithelium-derived factor maintains retinal pigment epithelium function by inhibiting vascular endothelial growth factor-R2 signaling through γ -secretase. *J Biol Chem*, 2009, 284: 30177–30186
- 50 Yang H, Cheng R, Liu G, et al. PEDF inhibits growth of retinoblastoma by anti-angiogenic activity. *Cancer Sci*, 2009, 100: 2419–2425
- 51 Li L, Yang J, Wang W W, et al. Pigment epithelium-derived factor gene loaded in cRGD-PEG-PEI suppresses colorectal cancer growth by targeting endothelial cells. *Int J Pharm*, 2012, 438: 1–10
- 52 Xu Z, Fang S, Zuo Y, et al. Combination of pigment epithelium-derived factor with radiotherapy enhances the antitumor effects on nasopharyngeal carcinoma by downregulating vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Cancer Sci*, 2011, 102: 1789–1798

- 53 Yang J, Chen S, Huang X, et al. Growth suppression of cervical carcinoma by pigment epithelium-derived factor via anti-angiogenesis. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9: 967–974
- 54 Wolf W C, Evans D M, Chao L, et al. A synthetic tissue kallikrein inhibitor suppresses cancer cell invasiveness. *Am J Pathol*, 2001, 159: 1797–1805
- 55 Ji W R, Barrientos L G, Llinás M, et al. Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 247: 414–419
- 56 Lu H, Dhanabal M, Volk R, et al. Kringle 5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258: 668–673
- 57 Yang X, Cheng R, Li C, et al. Kringle 5 of human plasminogen suppresses hepatocellular carcinoma growth both in grafted and xenografted mice by anti-angiogenic activity. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5: 399–405
- 58 Gonzalez-Gronow M, Kaczowka S J, Payne S, et al. Plasminogen structural domains exhibit different functions when associated with cell surface GRP78 or the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem*, 2007, 282: 32811–32820
- 59 Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson C E, et al. The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells. *J Biol Chem*, 2003, 278: 27312–27318
- 60 Lawen A, Ly J D, Lane D J R, et al. Voltage-dependent anion-selective channel 1 (VDAC1)—A mitochondrial protein, rediscovered as a novel enzyme in the plasma membrane. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37: 277–282
- 61 Shoshan-Barmatz V, Israelson A. The voltage-dependent anion channel in endoplasmic/sarcoplasmic reticulum: characterization, modulation and possible function. *J Membrane Biol*, 2005, 204: 57–66
- 62 Ma J, Li C, Shao C, et al. Decreased K5 receptor expression in the retina, a potential pathogenic mechanism for diabetic retinopathy. *Mol Vis*, 2012, 18: 330–336
- 63 Li L, Yao Y C, Gu X Q, et al. Plasminogen kringle 5 induces endothelial cell apoptosis by triggering a voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) positive feedback loop. *J Biol Chem*, 2014, 289: 32628–32638
- 64 Hamano Y, Sugimoto H, Soubasakos M A, et al. Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression. *Cancer Res*, 2004, 64: 1570–1574
- 65 Suzuki Y, Kobayashi M, Miyashita H, et al. Isolation of a small vasohibin-binding protein (SVBP) and its role in vasohibin secretion. *J Cell Sci*, 2010, 123: 3094–3101
- 66 Kozako T, Matsumoto N, Kuramoto Y, et al. Vasohibin induces prolyl hydroxylase-mediated degradation of hypoxia-inducible factor-1 α in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett*, 2012, 586: 1067–1072
- 67 Eikesdal H P, Sugimoto H, Birrane G, et al. Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 15040–15045
- 68 Zhong S, Khalil R A. A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) family in vascular biology and disease. *Biochem Pharmacol*, 2019, 164: 188–204
- 69 Sun Y, Huang J, Yang Z. The roles of ADAMTS in angiogenesis and cancer. *Tumor Biol*, 2015, 36: 4039–4051
- 70 Huang H L, Liu Y M, Sung T Y, et al. TIMP3 expression associates with prognosis in colorectal cancer and its novel arylsulfonamide inducer, MPT0B390, inhibits tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Theranostics*, 2019, 9: 6676–6689
- 71 Schmidt K, Hoffend J, Altmann A, et al. Troponin I overexpression inhibits tumor growth, perfusion, and vascularization of Morris hepatoma. *J Nucl Med*, 2006, 47: 1506–1514
- 72 Morrison S J. Stem cell biology. *Nature*, 2001, 412: 380–381
- 73 Li S, Li Q. Cancer stem cells and tumor metastasis. *Int J Oncol*, 2014, 44: 1806–1812
- 74 Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*, 2010, 468: 824–828
- 75 Bussolati B, Grange C, Sapino A, et al. Endothelial cell differentiation of human breast tumour stem/progenitor cells. *J Cell Mol Med*, 2009, 13: 309–319
- 76 Grange C, Tapparo M, Collino F, et al. Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*, 2011, 71: 5346–5356
- 77 Alvero A B, Fu H H, Holmberg J, et al. Stem-like ovarian cancer cells can serve as tumor vascular progenitors. *Stem Cells*, 2009, 27: 2405–2413

- 78 Wei B, Han X Y, Qi C L, et al. Coaction of spheroid-derived stem-like cells and endothelial progenitor cells promotes development of colon cancer. [PLoS ONE](#), 2012, 7: e39069
- 79 Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. [Nature](#), 2010, 468: 829–833
- 80 Maniotis A J, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: Vasculogenic mimicry. [Am J Pathol](#), 1999, 155: 739–752
- 81 El Hallani S, Boisselier B, Peglion F, et al. A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. [Brain](#), 2010, 133: 973–982
- 82 Shirakawa K, Tsuda H, Heike Y, et al. Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. [Cancer Res](#), 2001, 61: 445–451
- 83 Sun T, Zhao N, Zhao X L, et al. Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry. [Hepatology](#), 2010, 51: 545–556
- 84 Sharma N, Seftor R E B, Seftor E A, et al. Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: Role in vasculogenic mimicry. [Prostate](#), 2002, 50: 189–201
- 85 Folberg R, Maniotis A J. Vasculogenic mimicry. [APMIS](#), 2004, 112: 508–525
- 86 Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. [Nat Rev Cancer](#), 2008, 8: 592–603
- 87 Hendrix M J, Seftor E A, Kirschmann D A, et al. Molecular biology of breast cancer metastasis—Molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells. [Breast Cancer Res](#), 2000, 2: 417–422
- 88 Paulis Y W J, Soetekouw P M M B, Verheul H M W, et al. Retraction to: “Signaling pathways in tumor vasculogenic mimicry”. [Biochem Moscow](#), 2013, 78: 678
- 89 Liu T J, Sun B C, Zhao X L, et al. CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. [Oncogene](#), 2013, 32: 544–553
- 90 Cheng L, Huang Z, Zhou W, et al. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. [Cell](#), 2013, 153: 139–152
- 91 Ronca R, Benkheil M, Mitola S, et al. Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications. [Med Res Rev](#), 2017, 37: 1231–1274
- 92 Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis. [Science](#), 2011, 331: 1559–1564
- 93 Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: The next generation. [Cell](#), 2011, 144: 646–674
- 94 Yoshimatsu Y, Miyazaki H, Watabe T. Roles of signaling and transcriptional networks in pathological lymphangiogenesis. [Adv Drug Deliv Rev](#), 2016, 99: 161–171
- 95 Hirakawa S. From tumor lymphangiogenesis to lymphovascular niche. [Cancer Sci](#), 2009, 100: 983–989
- 96 He Y, Rajantie I, Pajusola K, et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. [Cancer Res](#), 2005, 65: 4739–4746
- 97 Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen M J, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. [Cancer Res](#), 2001, 61: 1786–1790
- 98 Karnezis T, Shayan R, Caesar C, et al. VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. [Cancer Cell](#), 2012, 21: 181–195
- 99 Ma C, Yin H, Zhong J, et al. Kallistatin exerts anti-lymphangiogenic effects by inhibiting lymphatic endothelial cell proliferation, migration and tube formation. [Int J Oncol](#), 2017, 50: 2000–2010
- 100 Wong H L X, Jin G, Cao R, et al. MT1-MMP sheds LYVE-1 on lymphatic endothelial cells and suppresses VEGF-C production to inhibit lymphangiogenesis. [Nat Commun](#), 2016, 7: 10824
- 101 Choi J U, Chung S W, Al-Hilal T A, et al. A heparin conjugate, LHbisD4, inhibits lymphangiogenesis and attenuates lymph node metastasis by blocking VEGF-C signaling pathway. [Biomaterials](#), 2017, 139: 56–66
- 102 Lin Z, Zhang Q, Luo W. Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer: Challenges and future directions. [Eur J Pharmacol](#), 2016, 793: 76–81
- 103 Hameed S, Bhattarai P, Dai Z. Nanotherapeutic approaches targeting angiogenesis and immune dysfunction in tumor microenvironment. [Sci China Life Sci](#), 2018, 61: 380–391
- 104 Sun M, Qian Q, Shi L, et al. Amphiphilic drug-drug conjugate for cancer therapy with combination of chemotherapeutic and antiangiogenesis

- drugs. *Sci China Chem*, 2020, 63: 35–41
- 105 Belkacemi L, Zhang S X. Anti-tumor effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF): implication for cancer therapy. A mini-review. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 4
- 106 Yamakawa M, Doh S J, Santosa S M, et al. Potential lymphangiogenesis therapies: Learning from current antiangiogenesis therapies—A review. *Med Res Rev*, 2018, 38: 1769–1798
- 107 Esteva F J, Hubbard-Lucey V M, Tang J, et al. Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer. *Lancet Oncol*, 2019, 20: e175–e186

Research progress of tumor angiogenesis inhibitors

YANG Xia, YANG ZhongHan, ZHOU Ti, QI WeiWei & GAO GuoQuan

Department of Biochemistry, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Angiogenesis is one of the most important pathological characteristics in the development of tumor growth. Hence, antiangiogenesis is a hot topic in the field of cancer research. The current strategy for antiangiogenesis therapy of tumors is restoration of the angiogenic balance via either blockage of proangiogenic factors or application of angiogenic inhibitors. Endogenous angiogenic inhibitors show more promising prospects compared with proangiogenic factor antagonists. However, the underlying mechanisms of angiogenic inhibitors remain to be thoroughly elucidated. There are two types of endogenous angiogenic inhibitors. The first are hydrolyzed fragments of precursor proteins, such as plasminogen kringle 5 (K5), angiostatin/kringle 1–4, and endostatin, and the other are secreted proteins, such as pigment epithelium-derived factor (PEDF), kallikrein-binding protein (KBP/kallistatin), and antithrombin. Here we summarized research progress on the biological functions underlying mechanisms of tumor angiogenesis and application prospects of K5, PEDF, and KBP, so as to provide insights into the antiangiogenic therapies of tumor in the future.

tumor, angiogenesis, endogenous angiogenesis inhibitor

doi: [10.1360/SSV-2020-0032](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSV-2020-0032)