[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510004159.1

[45] 授权公告日 2007 年 8 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 1332713C

[22] 申请日 2000.1.26
[21] 申请号 200510004159.1
分案原申请号 00805997.7
[30] 优先权
[32] 1999. 2. 1 [33] US [31] 60/118126
[32] 2000. 1.21 [33] US [31] 09/489391
[73] 专利权人 洛杉矶儿童医院
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 W·E·劳格
审查员 王大鹏

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜

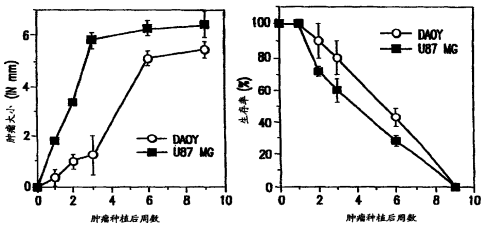
权利要求书 1 页 说明书 28 页 附图 14 页

[54] 发明名称

抑制脑肿瘤生长的方法

[57] 摘要

本发明描述了应用整合素 $\alpha_v\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_5$ 的拮抗剂，抑制脑部肿瘤生长的方法。本发明中的整合素拮抗剂可抑制脑肿瘤组织的血管生成。他们还能抑制脑肿瘤细胞中玻连蛋白和腱生蛋白介导的黏附和迁移。他们还能进一步地诱导出直接的脑肿瘤细胞死亡。



1. 整合素拮抗剂在制备用于抑制宿主脑肿瘤生长的药物中的用途，其中所述整合素拮抗剂选自：抗$\alpha_v\beta_3$抗体、抗$\alpha_v\beta_5$抗体及分别抗$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的抗体的组合。
2. 权利要求1的用途，其中所述拮抗剂为$\alpha_v\beta_3$的免疫特异性单克隆抗体。
3. 权利要求2的用途，其中所述单克隆抗体具有名为LM-609的单克隆抗体的免疫反应特征。
4. 权利要求1的用途，其中所述分别抗$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的抗体的组合为$\alpha_v\beta_3$的免疫特异性单克隆抗体和$\alpha_v\beta_5$的免疫特异性单克隆抗体的组合。
5. 权利要求4的用途，其中所述$\alpha_v\beta_3$的免疫特异性单克隆抗体具有名为LM-609单克隆抗体的免疫反应特征，并且所述$\alpha_v\beta_5$的免疫特异性单克隆抗体具有名为P1-F6单克隆抗体的免疫反应特征。

抑制脑肿瘤生长的方法

本申请是2000年1月26日提交的申请号为00805997.7一案的分案申请。

相关申请

本申请要求系列号为60/118,126的临时申请的优先权，该临时申请于1999年2月1日递交，在此引入作为参考。

技术领域

本发明总体而言涉及肿瘤生长的抑制，特别是脑肿瘤的抑制。

背景技术

本申请全文中的各参考文献见括号中。本申请在此引入所有上述出版物作为参考，以便更充分地描述本发明所属领域的现状。所有上述参考文献的全部文献目录见本申请文末，权利要求之前。

与其他实体瘤一样，脑肿瘤需要不断增长的血液供应以维持其持续生长超过1-2mm^3(1,2)。这要通过血管生成才能实现。血管生成是一种对肿瘤细胞释放的内皮生长因子的反应过程。该过程包括：在静止的微脉管系统中诱导内皮细胞增殖；新生内皮向肿瘤床迁移；最后成熟形成新的毛细血管网（3）。脑肿瘤是所有人类新生物中血管生成最活跃的。在胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤患者组织切片进行的原位杂交或特异抗体试验证明，主要的血管生成因子是血管内皮生长因子（VEGF）和碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）（4-7）。胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤是最常见的恶性脑肿瘤。实际上，神经胶质瘤中的VEGF表达和微血管密度与其恶性特征的程度及总体预后直接相关（8-9）。

新近的证据表明，血管生成受内皮细胞整合素活性的调节。整合素是一个跨膜受体家族，可引导细胞通过与氨基酸序列Arg-Gly-Asp(RGD)（10）结合黏附到细胞外基质（ECM）蛋白上。在bFGF和VEGF的作用下，内皮细胞中整合素$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的表达分别上调（11-13）。胶质母细胞瘤及其相关的血管内皮中发现有整合素$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的表达（14,15）。整合素介导的黏附导致细胞内信号传播，从而促进细胞的生存、增殖、运动及毛细血管的生成（16,17）。这些整合素与配体结合失败将导致内皮细胞凋亡（18,19）。基质中的糖蛋白－玻连蛋白，由恶性

胶质瘤的侵袭边缘（the leading invasive edge）产生，作为整合素$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的配体（15,20）。同时，这些发现还说明在肿瘤细胞、脑ECM和内皮细胞整合素之间存在一种复杂的旁分泌相互作用，以维持持续的血管生成和恶性脑肿瘤的生长。

应用抗-$\alpha_v\beta_3$抗体LM-609或可阻断内皮素-ECM相互作用的$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$RGD环肽拮抗剂进行的研究证明，在小鸡的尿囊绒膜（CAM）和小鼠嵌合体模型中存在抗血管生成反应（21-23）。其他作用于血管生成通路选择性位点的因子，如VEGF抗体或其酪氨酸激酶受体配体，也可有效抑制血管生成（24,25）。

现有研究显示，乳腺癌、黑色素瘤和HT29-D4结肠腺癌细胞与玻连蛋白的黏附分别依赖α_v、$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$（51-53）。由肿瘤和内皮细胞所产生的玻连蛋白可被$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$所识别，同时也是在肿瘤侵袭及新血管形成位点发现的一种ECM蛋白。除能通过α_v连接及血管生成支持内皮细胞生存之外，玻连蛋白的表达还能进一步加强肿瘤和表达$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$整合素的内皮细胞之间的黏附，从而促进肿瘤的侵袭性。在应用乳腺癌SCID小鼠/人嵌合体模型进行的一项研究中，肿瘤的侵袭性在应用抗-$\alpha_v\beta_3$抗体LM－609后明显降低，这说明通过阻断$\alpha_v\beta_3$可直接影响肿瘤细胞的生物学特性。

由于具有高度的侵袭性和血管生成，脑肿瘤为进一步研究整合素在肿瘤进展过程中的重要性提供了一种极好的模型。多项研究显示，微血管密度与星形细胞瘤的恶性程度及预后相关（57-59）。血管生成抑制剂如TNP-470、血小板刺激素-1及血小板因子-4，已被用于实验性脑肿瘤，并显示出对肿瘤生长的抑制作用（60-62）。然而，直至今日，尚无研究检测过针对整合素的拮抗作用对脑肿瘤侵袭性和血管生成的影响。因此，有必要研究该影响并因而提供一种治疗脑肿瘤的新方法。

发明内容

本发明基于以下惊人发现：针对整合素的靶向性拮抗作用，特别是对$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$，能在体内显著地抑制脑肿瘤的生成。脑肿瘤的微环境对肿瘤行为及决定其对上述生物靶向治疗的反应性非常关键。针对整合素的拮抗作用能起到抗肿瘤生成的作用，此作用不依赖于抗血管生成作用，可能协同性地阻止肿瘤的生长。例如，本发明的一项发现表明，针对整合素的拮抗作用可直接诱导脑肿瘤细胞死亡。

因此，本发明一方面是提供一种抑制宿主脑部肿瘤生长的方法。该方法包括，对需要上述抑制作用的宿主应用治疗有效量的整合素拮抗剂。

在本发明的一个实施方案中，整合素可为$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$。拮抗剂可能是α_v的多肽拮抗剂、抗-$\alpha_v\beta_3$的抗体、抗-$\alpha_v\beta_5$的抗体或分别抗$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$的抗体的合剂。

本发明的另一方面是提供一种宿主脑部肿瘤组织中血管生成的方法。该方法包括，对宿主应用一种包含血管生成抑制剂量α_v整合素拮抗剂的组合物。

在本发明的一个实施方案中，整合素为$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$。拮抗剂是α_v的多肽拮抗剂、抗-$\alpha_v\beta_3$的抗体、抗-$\alpha_v\beta_5$的抗体或分别抗$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$的抗体的合剂。

本发明的另一方面是提供一种抑制生长于宿主脑部的脑肿瘤细胞ECM依赖性细胞黏附的方法。该方法包括，对宿主应用治疗有效量的α_v整合素拮抗剂，即$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$整合素。在本发明的一个实施方案中，拮抗剂是α_v的多肽拮抗剂或分别抗$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$的抗体的合剂。

本发明的另一方面是提供一种抑制生长于宿主脑部的脑肿瘤细胞中玻连蛋白依赖性细胞迁移的方法。该方法包括，对宿主应用治疗有效量的α_v整合素拮抗剂。

在本发明的一个实施方案中，拮抗剂是α_v的多肽拮抗剂或抗-$\alpha_v\beta_3$的抗体。

本发明的另一方面是提供一种在生长于宿主脑部的肿瘤细胞中诱导凋亡的方法。该方法包括，对宿主应用治疗有效量的整合素拮抗剂。

在本发明的一个实施方案中，整合素可为$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$。拮抗剂可为α_v的多肽拮抗剂。

本发明中的方法非常适合用于体内脑肿瘤治疗。本发明提供了一种治疗脑肿瘤的新型治疗途径。

附图说明

通过参考以下说明及相关的图，本发明上文提到的与其他特征及获得这些特征的方法将变得十分明显，同时也非常容易理解。这些图例只是描述了本发明的典型实施方案，但并不限制其范围。具体特点及细节如下：

图 1a 和 1b 显示 α_v拮抗剂对 CAM 上血管生成（a）和肿瘤生长（b）的抑制作用。

图 2 显示脑内注射 DAOY 和 U87MG 细胞后的肿瘤大小（A）和小鼠生存情况（B）。

图 3a 和 3b 显示每日用无活性（A）肽或有活性肽（B-D）治疗的常位注射脑肿瘤细胞 DAOY（a）和 U87MG（b）的组织病理学。对照动物中可见巨大脑内肿瘤（箭头所指）（A），而 α_v拮抗剂治疗动物中无肿瘤或仅在显微镜下可见残余肿瘤（箭头所指）（C 和 D）。

图 4 显示常位种植脑肿瘤的小鼠接受有活性或无活性肽治疗后的生存情况。

图 5 显示 α_v拮抗剂对常位（脑）和异位（皮下组织）种植 DAOY 细胞的作用。

图 6a-6d 显示整合素的分布曲线及 α_v拮抗剂对脑肿瘤细胞和脑毛细血管内皮细胞在玻连蛋白上的黏附（b）、迁移（c）及存活能力（d）的作用。

图 7 显示环五肽对肿瘤细胞在 ECM 蛋白上黏附能力的影响。

图 8 显示黏附抑制作用的影响，导致脑肿瘤细胞和脑毛细血管细胞中的细胞死亡（凋亡）。这种影响只限于 ECM 玻连蛋白和腱生蛋白。

图 9 显示移植到裸小鼠前脑并接受活性（抗-α_v）或对照肽治疗的 U87 肿瘤细胞的免疫组织化学结果。

发明详述

本发明一方面是提供一种抑制宿主脑部肿瘤生长的方法，包括对需要上述抑制作用的宿主应用治疗有效量的整合素拮抗剂。

由于脑部肿瘤的生长需要整合素与其配体的相互作用，本发明的方法可用于治疗任何生长于脑部的肿瘤。这类肿瘤的实例包括，但不仅限于：胶质母细胞瘤、髓母细胞瘤（星形细胞瘤、其他原始的神经外胚层和脑干恶性胶质瘤）。因本发明的目的起见，优选肿瘤生长定位于宿主脑部的大脑内。宿主可为任何哺乳动物，包括但不仅限于：大鼠和人类。如果生长遭到治疗的损害，肿瘤生长就受到抑制。

因本发明的目的起见，整合素可为特定的同源异二聚体（heterodimeric）跨膜受体家族中的任一成员。受体通过与氨基酸序列 Arg-Gly-Asp(RGD)结合而引导细胞黏附。受体在肿瘤细胞和正常细胞上

均可表达。在本领域中整合素的特性已有充分了解和清楚描述，描述细节见引用参考文献（1,2），有关内容在此引入作为参考。整合素的实例包括但不仅限于：α_v家族如$\alpha_v\beta_3$、$\alpha_v\beta_5$、$\alpha_v\beta_1$、$\alpha_v\beta_6$、$\alpha_v\beta_8$等。

整合素拮抗剂是一种通过抑制作为受体的整合素与其配体的结合，从而阻断或抑制整合素生理学和药理学活性的分子。整合素的配体为各种基质蛋白，包括但仅不限于：玻连蛋白、腱生蛋白、纤维结合素及胶原蛋白I。在本发明的一个实施方案中，整合素的拮抗剂可为整合素$\alpha_v\beta_3$或整合素$\alpha_v\beta_5$的拮抗剂。优选的整合素拮抗剂既可是单克隆抗体，也可以是单克隆抗体的片段，或是肽。

例如，$\alpha_v\beta_3$的拮抗剂可为能抑制$\alpha_v\beta_3$与其多个配体之一，即玻连蛋白或腱生蛋白结合的任何因子。$\alpha_v\beta_3$拮抗剂的实例在PCT出版物WO 96/37492和WO 97/45137中已有阐述,相关内容在此引入作为参考。

同样，$\alpha_v\beta_5$的拮抗剂可为能抑制$\alpha_v\beta_5$与其配体，即玻连蛋白结合的任何因子。$\alpha_v\beta_5$拮抗剂的实例在PCT出版物WO 97/06791中已有阐述,相关内容在此引入作为参考。

在本发明的一个实施方案中，拮抗剂为α_v的一种多肽拮抗剂，即$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的多肽拮抗剂。该多肽最好是含有Arg-Gly-Asp(RGD)的多肽。在一个实施方案中，多肽拮抗剂为α_v的RGD环五肽拮抗剂。

根据本发明的另一实施方案，拮抗剂可为$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$的免疫特异性单克隆抗体。另外，它也可是分别抗$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$抗体的合剂。在一个实施方案中，$\alpha_v\beta_3$的免疫特异性单克隆抗体具有被称为LM-609的单克隆抗体的免疫反应特征。在本发明的另一实施方案中，$\alpha_v\beta_5$的免疫特异性单克隆抗体具有被称为P1-F6的单克隆抗体的免疫反应特征。LM-609和P1-F6抗体在本行业众所周知，并可向美国加利福尼亚Temecula的Chemicon商购。

因本发明的目的起见，拮抗剂可单独或联合用于本发明抑制脑内肿瘤生长的方法中。

治疗有效量是指在对宿主进行治疗时，足以对宿主脑内肿瘤生长产生可测量抑制作用的拮抗剂剂量。对肿瘤生长的抑制作用可通过在此进行描述的染色后显微镜测量法、小鼠脑MRI扫描或本领域技术人员所熟悉的3H-胸腺嘧啶掺入法进行测定。

在整合素拮抗剂可采取包含RGD的肽、抗$\alpha_v\beta_3$的单克隆抗体及其

片段、抗$\alpha_v\beta_5$的单克隆抗体及其片段或抗$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$单克隆抗体的合剂等形式的情况下，应该意识到“治疗有效量”的效力和表现都可以是不同的。然而，如本分析方法所显示，本领域的技术人员可以很容易地评价本发明候选拮抗剂的效力。

拮抗剂的效力可通过多种方法进行测量，包括但不仅限于：在此进行描述的CAM分析中的血管生成抑制、体内脑肿瘤分析及对天然配体与整合素如$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$之间结合抑制作用的测量等分析法。

拮抗剂应用的剂量范围取决于拮抗剂的种类及其对特定整合素的效力。参考本发明所公开的内容，本领域技术人员无需过多实验即可找到特定拮抗剂的合适剂量。该剂量应该足够大，以产生所想得到的抑制脑内肿瘤生长的作用。该剂量也不应过大，导致引起不良反应，如脑水肿或脑肿瘤中细胞因子迅速释放导致kachexia，例如本发明中的一种整合素拮抗剂以多肽形式应用时。每公斤体重剂量范围为1-20mg，每天应用一次或多次，应用一天或数天或长期应用。当本发明中的一种整合素拮抗剂以单克隆抗体形式应用时，剂量范围为1-20mg/kg，每日一次到每周两次长期应用。

本发明中的多肽或单克隆抗体通过注射或在一定时间内缓慢输注进行胃肠道外给药。虽然组织经常通过腹膜内或皮下给药接受治疗，但是本发明中的拮抗剂还可以通过眼内、静脉内、肌肉内、腔内和透皮途径给药，另外还可以通过peristaltic方式给药。

组合物以一种剂量制剂可配伍的方式及治疗有效量给药。给药的剂量和时间取决于接受治疗的对象、对象系统利用活性组分的能力以及预期想达到的治疗效果的程度。需要应用的活性组分的精确剂量依赖于医师的判断，每个个体各不相同。然而，系统应用的适当剂量范围将在此进行公开，该剂量范围依赖于给药的途径。适当的给药方案也各不相同，但典型的方案是先进行一次初始给药，然后通过连续的注射或其他方式重复给药，每隔一小时或数小时给药一次。

依照本发明的一个实施方案，本发明还为实施在此所阐述的治疗方法提供一种有用的药物组合物。该组合物包含本发明中的一种拮抗剂和一种药剂学可接受的载体。在此所用的短语“药剂学可接受的（pharmaceutically acceptable）”、“生理学上可耐受的（physiologically tolerable）”以及提到组合物、载体、稀释物和试剂时的语法变化，都可

以互换使用，用于描述这些物质可以用于哺乳动物而不会引起不可预料的生理学作用。

本发明的肽或抗体肠道外应用制剂包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳剂。非水溶剂的实例包括丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油及注射用有机酯如油酸乙酯。水性载体包括水、酒精/水溶液、乳剂或悬浮液，包括盐和缓冲介质。肠道外载体包括氯化钠溶液、Ringer's(林格氏)葡萄糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂（如基于林格氏葡萄糖的溶液）等。也可有防腐剂和其他添加剂，如杀菌剂、抗氧化剂、螯合剂及惰性气体等。

本发明的另一方面是提供一种抑制宿主脑内肿瘤组织中血管生成的方法。该方法包括对宿主应用一种包含血管生成抑制剂量整合素抑制剂的组合物。

如背景部分中所讨论的，血管生成是在宿主原有血管的基础上新血管网的形成，对于肿瘤生长超过 1-2mm^3 是必要的。对于本发明而言，如果血管生成和由血管生成介导的疾病症状得到改善，血管生成将受到抑制。

在本发明的一个实施方案中，肿瘤组织位于宿主脑部的大脑内。该宿主可是任何哺乳动物。宿主的实例包括但不仅限于小鼠、大鼠和人类。

拮抗剂的应用剂量范围取决于拮抗剂的形式和它对于特定整合素的效力。参考本发明所公开的内容，本领域技术人员无需过多实验即可确定特定拮抗剂的合适剂量。剂量应该足够大，以产生预期的效果，使血管生成和由血管生成介导的疾病症状得到改善。该剂量也不应过大，导致引起不良反应，如因肿瘤溶解引起细胞因子释放或出血导致的脑水肿。

在本发明的一个实施方案中，整合素的拮抗剂可为整合素 $\alpha_v\beta_3$ 或 $\alpha_v\beta_5$ 的拮抗剂。优选整合素拮抗剂可为单克隆抗体或肽。在本发明的一个实施方案中，拮抗剂为整合素 α_v 的多肽拮抗剂、整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 的多肽拮抗剂。其中多肽优选包含 Arg-Gly –Asp(RGD)的多肽。在本发明的一个实施方案中，多肽拮抗剂为整合素 α_v 的 RGD 环五肽拮抗剂。

依照本发明的另一实施方案，拮抗剂可为整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的抗体和分别

抗 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 的抗体的合剂。

治疗有效量是指能在被治疗组织中产生可检测的血管生成抑制作用的拮抗剂剂量，即血管生成抑制剂量。血管生成抑制可通过在此所述的免疫组织化学方法或其他本领域技术人员所熟悉的方法进行原位检测。

依照本发明的一个实施方案，本发明还为在此所述的治疗方法提供一种有用的药物组合物。该组合物包含本发明的一种拮抗剂和药剂学可接受的载体。

本发明在另一方面提供了一种抑制宿主脑内脑肿瘤细胞间 ECM 依赖性细胞黏附的方法，包括对宿主应用治疗有效量的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 拮抗剂。

对于本发明而言，ECM 依赖性细胞黏附包括任何依赖 ECM 及由整合素 α_v 介导的细胞黏附。这种黏附的实例包括但不仅限于：玻连蛋白依赖性细胞黏附和腱生蛋白依赖性细胞黏附。本发明的一个发现是人脑肿瘤可产生玻连蛋白和腱生蛋白，这些 ECM 通过与整合素相互作用，在肿瘤细胞的黏附和迁移中起到重要作用。对于本发明而言，如果肿瘤细胞对 ECM 的黏附降低就表示达到了抑制作用。

在此所用短语“治疗有效量”是指足以使 ECM 介导的肿瘤细胞黏附降低的拮抗剂剂量。细胞黏附可通过在此所述的方法和本领域所熟悉的方法进行检测。

依照本发明的一个实施方案，拮抗剂可为整合素 α_v 的多肽拮抗剂或分别抗 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 的抗体的合剂。例如，拮抗剂可为整合素 α_v 的 RGD 环五肽拮抗剂或被称作 LM-609 和 P1-F6 的单克隆抗体的合剂。

本发明在另一方面提供了一种抑制宿主脑内脑肿瘤细胞玻连蛋白依赖性细胞迁移的方法，包括对宿主应用治疗有效量的 $\alpha_v\beta_3$ 拮抗剂。

对于本发明而言，如果肿瘤细胞迁移减少就表示达到了抑制作用。

在此所用短语“治疗有效量”是指足以使细胞玻连蛋白依赖性肿瘤细胞迁移减少的拮抗剂剂量。细胞迁移可通过在此所述的方法和本领域所熟悉的方法进行检测。

依照本发明的一个实施方案，拮抗剂可为整合素 α_v 的多肽拮抗剂或具有抗 $\alpha_v\beta_3$ 免疫反应的单克隆抗体。例如，拮抗剂可为整合素 α_v 的 RGD 环五肽拮抗剂或被称为 LM-609 的单克隆抗体。

本发明还提供了一种诱导宿主脑内肿瘤细胞凋亡的方法。该方法包

括对宿主应用治疗有效量的整合素拮抗剂。

对于本发明而言，如果应用拮抗剂后脑内观察到的脑肿瘤细胞凋亡数增多就表示诱导出了脑肿瘤细胞的凋亡。治疗有效量是指在接受治疗的宿主脑内足以产生可检测的肿瘤细胞凋亡的拮抗剂剂量。脑内肿瘤细胞凋亡可通过在此所述的方法或本领域所熟悉的方法进行检测。

依照本发明的一个实施方案，整合素可为α_v、$\alpha_v\beta_3$或$\alpha_v\beta_5$。拮抗剂可为α_v的多肽拮抗剂。

实例

材料和方法

材料：由德国达姆施塔特市 Merck KgaA 公司 A. Jonczyk 博士提供的活性环 RGD 五肽 EMD 121974，环(Arg-Gly-Asp-D-Phe-[N-Me]-Val)及无活性对照肽 cRAD(EMD 135981)。单克隆抗体 LM609 和 P1F6 已有叙述（13）。脑肿瘤细胞系 DAOY 和 U87MG 购自 ATCC Rockville 博士。人脑毛细血管内皮细胞基本培养液由美国洛杉矶儿童医院的 M. Stins 博士提供（49）。人玻连蛋白购自美国威斯康星州麦迪逊市 Promega 公司。

FACS 分析：采用 FACScan 细胞计数仪（Becton-Dickinson, San Jose）。条件如前人所述（43）。一抗为 1:100 的 LM609 和 P1F6，二抗为 1:250 的 FITC 标记羊抗鼠 IgG。按照厂家(美国加利福尼亚州 Palo Alto 的 Clontech 公司，Apo Alert 膜联蛋白 V-FITC 细胞凋亡试剂盒）的说明书来确定凋亡。

黏附：试验条件如前人所述（15）。用非组织培养液处理过的板孔与玻连蛋白在 4℃下一起孵育过夜（1-20μg/ml PBS），用热变性的 1%的 BSA PBS 溶液冲洗和封闭 30 分钟，之后用 PBS 冲洗。与试验物质（20μg/ml）在黏附缓冲液中 37℃下预先孵育了 30 分钟的对照和试验细胞被加入到板孔中（5×10^4个细胞/孔），37℃下孵育 1 小时。用黏附缓冲液轻柔冲洗板孔后，黏附的细胞被固定并染成紫色，染料溶解于甲醇，OD 为 600°A。

迁移：Transwell 聚碳酸酯滤器（8μm 孔径）与玻连蛋白 PBS 溶液（顶部为 1μg/ml，底部为 10μg/ml）在 37℃下孵育 30 分钟，用 1%热变性的 BAS 封闭 30 分钟并用 PBS 冲洗。试验细胞（5×10^5/孔）被加入包含试验指示物质（20μg/ml）的黏附缓冲液中，与含有黏附缓冲液的

底层小室在37℃下孵育4小时。用棉签移走上层小室的细胞，滤器底部的细胞被固定并染成紫色，通过计数确定迁移细胞的数量。

凋亡：黏附条件如上所述，除此之外，12孔板用玻连蛋白覆盖，5×10^5个细胞/孔加入黏附缓冲液中。37℃下孵育30分钟后，移去黏附缓冲液，加入含20μg/ml活性cRAD肽的缓冲液并进一步孵育4小时。附着细胞进行胰蛋白酶化处理，与上清液中的游离细胞一起用Apo Alert膜联蛋白V-FITC细胞凋亡试剂盒进行凋亡细胞检测。

CAM分析：鸡卵提供者与制剂前人已有描述（23）。肿瘤细胞悬于50μl PBS中，DAOY细胞系浓度为4×10^6个细胞/卵，U87MG细胞系浓度为3.5×10^6个细胞/卵。细胞在7天内生长成肿瘤，在无菌条件下收获，修整为相似大小，接种到10天大小胚胎的CAM上。接下来向CAM的静脉中注射活性或非活性肽（100μg/卵）。生长7天后对肿瘤进行原位摄像，然后收获、称重并用4%的缓冲福尔马林固定后石蜡包埋。连续切片，切片用苏木精和伊红进行染色。

脑肿瘤模型：我们以前曾对模型的细节进行过阐述（31）。在所提到的坐标处进行肿瘤细胞（10^6/10μl）脑内注射。在种植U87MG 3天后及种植DAOY 10天后开始用活性cRGD或无活性cRAD肽（100μg/50μl/小鼠）进行腹膜内治疗，以后每日重复治疗，直至出现恶液质和/或垂死状态。随后用CO_2麻醉处死动物，切除脑组织并用液氮进行速冻，或用缓冲福尔马林进行固定，石蜡包埋后切片进行苏木精-伊红染色。

皮下肿瘤生长：皮下肿瘤生长是在脑内注射后立即在小鼠右肩垫下方的皮下注射肿瘤细胞（10^6/小鼠）。

动物试验：动物试验依照NIH指导方针进行，并得到了地方动物保护委员会的许可。

试验

CAM上的血管生成

为了评估α_v拮抗作用对脑肿瘤相关血管生成的影响，在小鸡的尿囊绒膜（CAMs）接种DAOY和U87MG人脑肿瘤细胞。在肿瘤被切除和重新种植到新鲜CAMs上之前，允许肿瘤生长7天。移植后24小时，向CAM静脉中注射活性cRGD肽和对照肽（cRAD）。肿瘤继续生长6天后进行称重及血管生成分析。通过立体显微镜检查，接受对照肽的肿瘤显示有广泛的血管生成，而用α_v拮抗剂治疗的肿瘤显示明显的血管生成

抑制（图 1a）。肿瘤生长也受到α_v拮抗剂的抑制。与对照肿瘤相比，对照肿瘤重量增加 80%，而α_v拮抗剂治疗的肿瘤重量减少 30%（图 1b）。这些数据显示，α_v拮抗剂对肿瘤生长的抑制是肿瘤相关血管生成受到干扰所致。

图 1a 和图 1b 显示α_v拮抗剂对血管生成（a）和在 CAM 上肿瘤生长的抑制。将生长在 CAMs 上的肿瘤收获并修整成相同大小后置于 10 天大小鸡蛋的新鲜 CAMs 上。接下来，向小鸡静脉中注射 100μg 活性α_v拮抗剂或对照肽，继续生长 6 天。接受对照肽的鸡蛋表现出显著的血管生成（a）（DAOY = A，U87MG = C），而接受活性肽的鸡蛋中观察到显著的新血管生成抑制（DAOY = B，U87MG = D）。在试验开始和结束时，对位于 CAM 上的肿瘤进行称重（b）。两种肿瘤用对照肽进行治疗的，重量均增加了 80%(左，n = 8),而用活性肽治疗的重量仅增加了 30%(右，n = 8）。

原位（orthotopic）肿瘤模型

DAOY 和 U87MG 细胞（10^6/小鼠）在立体定向下注射到 nu/nu 小鼠的右额叶皮质中，以期建立能概括脑微环境的系统。该方法可建立一个高重现性的人脑肿瘤生成模型并能检测肿瘤的生长和使用α_v拮抗剂前的小鼠生存情况（图 2a 和 2b）。图 2 显示在脑内注射 DAOY 和 U87MG 细胞后，肿瘤的大小（A）和小鼠的生存情况（B）。U87MG 细胞生长迅速，6 周内达到 6mm 左右的状态，而 DAOY 细胞生长较为缓慢，9 周内达到 5.5mm 直径（A）。所有动物在 9 周前死亡（B）。每个时间点的 n = 5 或 6。

为了检测此模型中 cRGD 肽的作用，肿瘤首先生长 7 天（DAOY）或 3 天（U87MG）后，每日腹腔注射α_v拮抗剂（100μg/小鼠）或无活性对照肽 3 周。在处死动物的时候（肿瘤共生长 4 周），对照小鼠中有非常明显的脑肿瘤生长，平均大小为 3mm（DAOY）和 5.5mm（U87MG）。治疗组小鼠无肿瘤生长或仅在显微镜下发现脑室或硬脑膜表面有极少量肿瘤细胞残留（图 3a 和 3b）。图 3a 和 3b 显示原位（orthotopically）注射的脑肿瘤细胞 DAOY（a）和 U87MG（b）每天用无活性（A）或活性肽（B-D）治疗的组织病理学表现。对照动物（A）中可见巨大脑内肿瘤（箭头所指），而α_v拮抗剂治疗的动物（C-D）中无肿瘤（B）或仅有显微镜下残留肿瘤（箭头所指）。

治疗小鼠体重还保持基线水平 21g，而 DAOY 和 U87MG 对照小鼠体重分别为 16g 和 15g，比基线水平下降了 5-6g（见表 1）。对照组发生神经病学症状的平均时间为：U87MG 组小鼠 2.5 周，DAOY 组小鼠 4.5 周，而治疗组小鼠在任何时间均未表现出神经病学症状。

表 1

细胞系		肿瘤大小（mm）		小鼠肿瘤（g）
		脑	皮下组织	
DAOY	对照肽	3.0 ± 0.71	18 ± 1.41	16 ± 1.3
	活性肽	NM	17 ± 0.84	21 ± 0.89
U87MG	对照肽	5.5 ± 0.55	20 ± 1.0	15 ± 0.45
	活性肽	NM	19 ± 0.77	20 ± 0.71

NM = 不可测量

另外还对小鼠进行了生存测试。测试在因小鼠处于垂死状态而需要进行处死时进行。所有对照组的动物都在肿瘤生长 6 周之前处死，两对照组中大多数（>50％）在 3-4 周内处死（图 4）。图 4 显示原位（orthotopical）种植脑肿瘤的小鼠，U87MG 组从第三天开始，DAOY 组从第七天开始，接受活性或非活性肽腹腔注射治疗（100μg/小鼠/天）后的生存情况。DAOY 对照组和 U87MG 对照组的样本数（n）均为 16 只小鼠，DAOY 治疗组为 32 只小鼠，U87MG 治疗组为 24 只小鼠。图 4 显示，治疗组动物中无一需要处死，目前，自注射肿瘤细胞以来，DAOY 治疗组小鼠已存活了 24 周，U87MG 治疗组小鼠已存活了 15 周。治疗组动物无一发生任何神经病学症状，所有动物仍继续症状生长。

异位肿瘤模型

为阐明微环境对受 α_v 拮抗作用控制的肿瘤生长的影响，我们在治疗开始前在小鼠皮下注射相同的人脑肿瘤细胞（10^6 细胞/裸小鼠），注射肿瘤细胞后第三天（U87MG）和第七天（DAOY）开始用活性和对照肽进行治疗（100μg/小鼠/天，腹腔注射）。在这些条件下，肿瘤生长未被活性肽抑制，6 周后治疗组和非治疗组在肉眼和显微镜水平表现相同，均出现广泛的血管生成（数据未显示）。这说明被检测的脑肿瘤细胞的固有特性不足以使其对 cRGD 肽拮抗剂敏感，必须在独特的脑微环境下才能起到抑制作用。

为进一步研究这一发现，我们于治疗开始前同时在脑内和皮下注射

DAOY 和 U87MG 细胞，肽治疗与原位模型中所述相同。图 5 显示 α_v 拮抗剂对原位（脑）和异位（皮下）种植 DAOY 细胞的影响。肿瘤细胞（10^6）被注射到脑内和皮下，并在第七天开始用非活性（a）或活性（b）肽进行治疗。4 周时进行摄影。接受非活性（a）或活性（b）肽的动物皮下肿瘤的大小（A）和血管化程度（B）相似。在两种情况下，皮下肿瘤生长至下面的肌肉层（箭头所指）（C）。相反，对照组发生巨大脑肿瘤（箭头所指），而接受活性肽治疗的小鼠无脑肿瘤或仅有镜下残余肿瘤（D）。因此，图 5 显示对照组和治疗组的皮下肿瘤均生长至平均 $18mm^3$ 大小，并有明显的广泛血管生成（图 5）。对照组小鼠还发生巨大脑肿瘤，大小与先前在原位肿瘤模型中所观察到的相似，并有神经病学损害的临床证据（表 1）。相反，接受活性肽治疗的小鼠存活，并无神经病学症状，尸检无脑内肿瘤生长或仅有显微镜下肿瘤细胞簇（图 5）。但是，该组小鼠的皮下肿瘤侵袭生长，需在 10 周时处死。这证明了生长于脑内的肿瘤对环 RGD 肽治疗有反应，而生长于皮下的同类肿瘤则无。

整合素的表达

玻连蛋白是一种基质蛋白，可影响脑内和皮下区域中的多种生物学反应，富含于神经系统外组织中，但在胶质和神经元组织中很少产生（15,20）。但是，恶性胶质瘤细胞可合成玻连蛋白，这对其附着和播散都是非常重要的（15）。换句话说，玻连蛋白可促进内皮细胞的黏附和向肿瘤床迁移，因此可增强血管的生成。由于细胞对玻连蛋白的附着是由整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 介导的，我们进行了 FACS 分析来确定人 DAOY 髓母细胞瘤、UU87MG 胶质母细胞瘤和原代培养的人脑内皮细胞是否表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$（图 6a）。

图 6a-6d 显示整合素的概况（a）、α_v 拮抗剂对脑肿瘤和脑毛细血管内皮细胞与玻连蛋白黏附的影响（b）、对脑肿瘤和脑毛细血管内皮细胞在玻连蛋白中迁移的影响（c）及对脑肿瘤和脑毛细血管内皮细胞在玻连蛋白中生存力的影响（d）。DAOY 和 U87MG 肿瘤细胞及脑毛细血管内皮细胞均表达整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$（a）。与玻连蛋白的黏附明显受到活性肽的抑制，活性肽与 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 的抗体合用时也是如此，但是对照肽或 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 的特异性抗体单独使用时均无明显作用。细胞在玻连蛋白梯度中的迁移被 $\alpha_v\beta_3$ 抗体和 α_v 拮抗剂完全破坏，而对照肽和 $\alpha_v\beta_5$ 抗体对其无抑制作用。用以下方法进行细胞生存力检测：令细胞与玻

连蛋白附着 1 小时后，分别使其暴露于对照肽或 α_v 拮抗剂（20 μg/ml）（d）4 小时，将附着细胞和漂浮细胞混合，用 FITC 标记的抗膜联蛋白 V 和碘化丙锭通过 FACS 进行凋亡检测。在暴露于对照肽（d，左）的培养物中很少观察到细胞凋亡，而脑毛细血管内皮细胞和 DAOY 细胞均显示有大量的凋亡细胞（d，右）。

图 6a-6d 显示 U87MG 细胞中 $\alpha_v\beta_3$ 的表达水平高于 DAOY 细胞，但是后者的 $\alpha_v\beta_5$ 表达水平较高。生长于含 VEGF 培养基中的 HBEC 细胞表达高水平的 $\alpha_v\beta_5$，而在短期培养中，50%的细胞表达 $\alpha_v\beta_3$。在包被玻连蛋白的培养板上培养 2 天后，这些细胞也进行 FACS 分析。在这些情况下，$\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 的表达无改变（数据未显示）。

玻连蛋白黏附

为了确定 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 是否能调节 DAOY、U87MG 和 HBEC 对玻连蛋白的黏附，细胞被置于玻连蛋白包被的板孔中，在有或没有 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 阻断受体（LM-609 和 P1-F6）或 cRGD 肽存在的情况下进行黏附。P1-F6 最小限度地抑制 DAOY 细胞的附着，LM-609 对任何细胞的附着均无影响。当 P1-F6 和 LM-609 共孵育或 cRGD 肽单独孵育时，所有细胞的黏附都受到显著的抑制（图 6）。这些数据说明，单独阻断任何一种整合素都是不够的，要明显抑制玻连蛋白依赖的细胞黏附，就必须进行 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 双重阻断。

玻连蛋白迁移

为了了解 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 是否能调节不依赖于黏附的在玻连蛋白上的迁移，我们在存在阻断抗体或 cRGD 的情况下，在 Boyden 小室中玻连蛋白包被的膜上对相同的细胞进行了检测。P1-F6 不影响迁移，LM-609 和 cRGD 明显抑制所有三种细胞的迁移（图 6c）。因为 LM-609 在缺乏 P1-F6 的情况下不能阻断黏附，所以这种抗迁移作用一定是通过其他不依赖于对黏附反应能力的通路进行的。另外，LM-609 与 cRGD 同样能阻断迁移，说明 $\alpha_v\beta_3$ 介导的细胞信号传递是受试的脑肿瘤和肿瘤内皮细胞迁移测定中的关键组成部分。

凋亡

高级别的星形细胞瘤在最前方的侵袭边缘产生玻连蛋白，说明这种蛋白质在脑肿瘤细胞的附着、迁移甚至是生存中起到重要的作用（15）。我们之前已经展示了，脑肿瘤或毛细血管细胞与 cRGD 肽或抗 $\alpha_v\beta_3$ 和

$\alpha_v\beta_5$抗体预先共孵育，可阻止细胞与玻连蛋白的黏附。在同样的对与基质蛋白质的整合素依赖性附着的抑制作用得到证明之后，内皮和黑色素瘤细胞凋亡也已经得到证明（26-28）。为了确定α_v拮抗剂是否能在这些细胞从玻连蛋白上解附着之后诱导其凋亡。DAOY 细胞和原代 HBEC 细胞被种植于玻连蛋白包被板孔（1μg/ml）上的黏附缓冲液中，在 37℃下附着 30 分钟。随后缓冲液置换为含 cRGD 或 cRAD 肽（对照）、浓度为 20μg/ml 的缓冲液，然后孵育 4 小时。附着细胞在胰蛋白酶化后于漂浮细胞混合，用抗膜联蛋白 V-FITC 抗体和碘化丙锭（Clontech Apo alert 膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒）通过 FACS 确定凋亡细胞数。暴露于对照肽 cRAD 的细胞凋亡很少，cRGD 处理过的 DAOY 盒 HBEC 细胞都有显著的凋亡（图 6d）。这些数据说明 cRGD 肽不仅能将细胞从玻连蛋白上解附着，还可以诱导其进一步凋亡。

五肽对脑肿瘤细胞与不同 ECM 底物黏附的影响

图 7 显示环五肽对肿瘤细胞与 ECM 蛋白质黏附的影响。非组织培养盘与玻连蛋白、腱生蛋白、纤维结合素或胶原蛋白 I（10μg/ml）在 37℃下共孵育 1 小时，然后用 PBS 冲洗。冲洗之后，注入培养板中，5×10^5个细胞/孔，在 37℃下孵育 16 小时。冲洗该培养物，并加入含 20μg/ml 环五肽或对照肽的黏附缓冲液，再孵育 2-24 小时。再用黏附缓冲液冲洗该培养物两次，并用水晶紫染色进行 OD600 检测。黏附细胞越多，OD 值越高。数据代表孵育 8 小时后的黏附细胞。U87=胶质母细胞瘤，DAOY＝髓母细胞瘤。

如图 7 中所说明，从玻连蛋白和腱生蛋白上解附着的细胞，其黏附由α_v整合素介导，而从胶原蛋白和纤维结合素上解附着的则不是，他们与非α_v整合素相互作用。在脑毛细血管细胞中也获得相似数据（未显示）。

细胞解附着对细胞生存的影响

图 8 显示生长于 ECM 上并暴露于五肽的脑肿瘤和毛细血管细胞的凋亡。除了解附着细胞和黏附细胞在胰蛋白酶化后混合外，测试条件如图 7。冲洗这些细胞，悬于 50μl PBS 中，在有盖玻片的载玻片中离心（cytospin）。用 4%低聚甲醛固定后，用 Boehringer 凋亡试剂盒对细胞进行凋亡染色。结果表示凋亡细胞在细胞总数中所占比例。试验在与肽共孵育 24 小时之后进行。

细胞解附着对细胞存活的影响见图 8。如图所示，暴露于活性肽达 24 小时并在玻连蛋白或腱生蛋白上生长的细胞与对照组细胞相比，死细胞数增多。相反，五肽不会改变在胶原蛋白 I 或纤维结合素上生长的细胞的存活情况。所有种类的肿瘤细胞和脑毛细血管细胞均可见细胞生存减少。相似数据在细胞进行表达于细胞表面的细胞死亡早期标记染色时获得（Annexin-V，数据未显示）。

人脑肿瘤中 ECM 蛋白质的产生

如上所述，脑肿瘤能在人体中产生玻连蛋白和腱生蛋白，据猜想这些底物可改善肿瘤细胞的生存并增强其侵袭性。我们在我们的脑肿瘤模型中检测这些蛋白质的生成。

图 9 显示 U87 脑肿瘤移植到裸小鼠前脑中并用活性（抗 α_v 抗体）或对照肽进行治疗后的免疫组织化学表现。小鼠接受肿瘤细胞注射（10^6 细胞/小鼠），并在注射后第七天开始用活性或非活性肽（100 μg/小鼠/天）治疗。治疗 2 周后切除肿瘤，用缓冲福尔马林固定，石蜡包埋，进行 5 μm 切片。用大鼠抗小鼠单克隆抗体（Phamingen）、鼠抗人玻连蛋白单克隆抗体（Sigma）、鼠抗人腱生蛋白抗体（Neo-Marker）对切片进行 CD31（毛细血管细胞标记）表达检测，并用 Boehringer 凋亡试剂盒进行死细胞检测。CD31=毛细血管标记，VN = 玻连蛋白，TN = 腱生蛋白，APO = 凋亡。

如图 9 所示，脑肿瘤确实产生玻连蛋白和腱生蛋白，且其在肿瘤细胞中的来源用人蛋白质特异抗体得到了证实。活性五肽的应用对这些蛋白质的合成物影响。另外，我们还能证明脑肿瘤细胞在组织培养中产生这些蛋白质（数据未显示）。因而，我们的小鼠模型可以模拟人脑肿瘤的情况。

五肽的抗血管生成作用见图 9 顶部，我们对组织切片进行了名为 CD31 的毛细血管细胞特异标记染色。用对照肽治疗的肿瘤有许多此标记染色阳性的血管，而在用活性五肽治疗的肿瘤中很少看到这种血管（$p<0.05$），说明存在毛细血管生长抑制。图 9 底部显示凋亡（死亡）细胞染色。方法如图 8 中所述。用活性五肽治疗的肿瘤与用对照肽治疗的肿瘤相比，死细胞明显增多（$p<0.02$）。对胶质母细胞瘤 U87 进行摄影，髓母细胞瘤 DAOY 中也有相似数据获得（未显示）。

细胞死亡与肿瘤细胞凋亡之间的联系

为了证明这种细胞死亡的增加时由于直接肿瘤细胞凋亡而不是对毛细血管生长抑制的结果，我们在小鼠脑内种植了黑色素瘤细胞，该细胞表达（M21L α_v阳性）或不表达（M21L α_v阴性）α_v整合素。如果接受α_v阳性细胞种植并用活性五肽治疗的小鼠生存期长于用对照肽治疗的小鼠，则直接肿瘤细胞凋亡应该是其原因。

表2显示负荷$\alpha_v\beta_3$阴性和阳性肿瘤的小鼠用RGDfV治疗的存活情况。肿瘤细胞（10^6）被注射到6周龄裸小鼠的前脑中，并在第三天开始用活性或非活性肽（100μg/小鼠/天）进行治疗。当出现恶液质时处死小鼠，通过尸体解剖证明肿瘤的存在。

表2

细胞系	存活期（天）	
	RGDfV（活性）	RADfV（对照）
M21L α_v阴性	15.7±3.8	15.3±3.3
M21L α_v阳性	36.5±2.9	17.3±1.9

如表2所示，接受α_v阴性黑色素瘤细胞种植的小鼠存活15天，与所接受的治疗无关。相反，负荷α_v阳性肿瘤小鼠的存活期在接受活性五肽治疗时增加到36天，而接受对照肽治疗的小鼠存活17天。这说明直接肿瘤细胞凋亡应该是肿瘤细胞死亡的原因。

总之，以上讨论的数据支持环五肽诱导直接肿瘤细胞死亡的假设。

讨论

脑肿瘤具有高度的血管生成，同时其持续生长依赖于新血管的生成。因此，抗血管生成可能是针对这些恶性肿瘤的重要治疗策略。由于在血管生成过程中，整合素$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$在血管内皮上的表达被激活，因此它们是候选的抗血管生成靶点（12,13）。它们在血管生成中的作用已被以往的研究所证明，这些研究显示在CAM中由bFGF和TNF-α诱导的血管生成可被$\alpha_v\beta_3$阻断抗体LM-609或$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的拮抗剂环五肽所抑制（21，23）。在任一情况下，抗血管生成作用被认为是通过阻止必要的α_v-基质蛋白质结合的相互作用，进而诱导内皮细胞凋亡实现的（28-30）。在本研究中，我们采用类似于特异RGD环肽的$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的拮抗剂（EMD121974），证明其对两个人脑肿瘤细胞系DAOY和U87MG在CAM中诱导的血管生成的抑制能力。cRGD治疗不仅能抑制CAM的血管生成，还能进一步导致肿瘤坏死和肿瘤萎缩。

为了证明是否能在一个反映脑部微环境的模型中得到相似的反应，脑肿瘤细胞通过立体定位注射到裸小鼠前脑中。由于在 CAM 分析中对肽的反应性及其以往体内试验所证明的广泛侵袭性和血管生成，U87MG 胶质瘤和 DAOY 髓母细胞瘤细胞被选用于研究（31，32）。在此原位模型中，cRGD 再次显著地抑制了 U87MG 和 DAOY 脑肿瘤的生长。对照小鼠屈服于肿瘤的进展并发现有平均体积大于 $3mm^3$ 的高侵袭性肿瘤。用 cRGD 治疗的小鼠存活且无发病的证据，除了沿着种植位点有残余的细胞或在脑室和硬脑膜表面有小的细胞簇外，未能检测到有活力的肿瘤。所有聚集在治疗组的残余肿瘤均小于 1 mm^3，因此并未获得宿主血管生成反应。可供选择的血管生成抑制剂，如血小板反应素-1、TNP-470 及血小板因子 4，也显示出对实验性脑肿瘤生长的抑制作用，但是这些抑制作用中大多数在皮下移植瘤中受限，或者需要通过立体定位注射直接将药物输送到肿瘤床（32-34）。在 SCID 小鼠/大鼠 Leydig 细胞皮下肿瘤模型中，在腹腔内应用 $\alpha_v\beta_3$ 的肽拮抗剂后，显示出可抑制肿瘤 80％的生长（35）。血管他汀，一种抗血管生成剂，通过一种不明的作用机制，也显示出对脑内 C6 和 9L 大鼠胶质瘤移植物有相当强的抑制作用（36）。与我们的研究不同的是，在肿瘤细胞种植后立即开始用血管他汀（1mg/小鼠/天）或肽类似物拮抗剂（2mg/小鼠/天）进行治疗。我们的研究显示，已成活的肿瘤移植物几乎被全部消除，同时也是第一次显示通过整合素拮抗机制对脑肿瘤生长和血管生成的抑制作用。

有趣的是，在我们的研究中，同时在皮下生长的 DAOY 和 U87MG 肿瘤显示对 cRGD 治疗无反应或反应很低。这一现象强调了细胞外环境在调节宿主-肿瘤-细胞整合素反应中的重要性。血管他汀显示对 s.c.和 i.c.注射的脑肿瘤细胞同样有抑制作用，说明这种化合物是通过与 RGD 肽不同的机制抑制血管生成（36）。cRGD 对肿瘤生长抑制作用差异的一种可能解释是皮下的内皮细胞可能与 CNS 微血管系统中的内皮细胞具有本质性差异，前者的血管生成对整合素拮抗机制的敏感性较差。最近的发现支持这一假设，在 α_v 高表达的小鼠中，只有脑和肠的毛细血管细胞异常，而其他循环系统均正常（37）。换句话说，作为内皮细胞整合素配体的基质蛋白质可被肿瘤细胞优先表达，但是要依赖于是原位肿瘤还是异位肿瘤。例如，皮下种植的人胶质母细胞瘤细胞未发现产生玻连蛋白，但是将其置于脑微环境，则可诱导玻连蛋白基因的表达（15）。当受到

胶质瘤细胞侵袭时，正常脑组织似乎可改变ECM蛋白质的表达（38）。不象神经系统外位点，玻连蛋白正常存在于脑组织中，这种蛋白质在CNS中的微小变化可深刻影响细胞反应。研究显示内皮细胞的移动力依赖于玻连蛋白的浓度和细胞-基质接触点之间的距离，后者允许细胞的移动（39,40）。

在我们的研究中，肽的抗肿瘤生成作用通常高于其他抗血管生成剂。由于许多肿瘤也表达$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$整合素（包括U87MG和DAOY），整合素拮抗剂的作用不会限于宿主内皮，尽管特异整合素在肿瘤细胞反应中的重要性尚不清楚（41）。先前的研究已经显示，胶质瘤、乳腺癌、黑色素瘤和HT29-D4结肠腺癌细胞与玻连蛋白的附着依赖于α_v整合素（42-45）。玻连蛋白由肿瘤和基底细胞产生，在肿瘤侵袭和新血管生成的部位含量丰富，包括恶性脑肿瘤（46,47）。因此，玻连蛋白除了支持内皮细胞生存之外，对增强表达$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的肿瘤细胞的黏附和侵袭也很关键。在SCID小鼠/人乳腺癌嵌合模型中，应用抗$\alpha_v\beta_3$抗体LM-609后肿瘤的侵袭明显降低，说明$\alpha_v\beta_3$阻断剂对肿瘤有非血管生成依赖的直接抑制作用。

为了阐明这个问题，我们利用DAOY、U87MG和分离的原代人脑内皮细胞（HBEC），在存在α_v拮抗剂的情况下，检测了在玻连蛋白上的细胞黏附和迁移（49）。抗$\alpha_v\beta_3$抗体LM-609抑制U87MG、DAOY和HBEC在玻连蛋白上的迁移，与抗$\alpha_v\beta_5$抗体P1-F6合用抑制这些细胞对玻连蛋白的黏附。cRGD单独使用可显著抑制所有三类细胞对玻连蛋白的黏附及在玻连蛋白上的迁移。在相似的研究中，黑色素瘤细胞侵袭被玻连蛋白所增强，被RGD肽所阻断（50）。最后，cRGD治疗不仅导致HBEC细胞中凋亡增加，而且在DAOY和U87MG肿瘤细胞中也是如此。这些结果提示，除了抗血管生成功能以外，cRGD可直接抑制肿瘤缺陷和增殖。

我们的资料进一步显示，环五肽可抑制脑肿瘤细胞与不同ECM底物如玻连蛋白或腱生蛋白的黏附。这种对黏附的抑制作用可在脑肿瘤细胞和脑毛细血管细胞中导致细胞死亡（凋亡）。这种作用局限于ECM玻连蛋白和腱生蛋白。我们还证明细胞死亡的增加是由于直接细胞凋亡而不是由于抑制毛细血管生长的结果。换句话说，本发明的发现之一是环五肽诱导直接肿瘤细胞死亡。

总之，该研究证明针对整合素尤其是$\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$的靶向拮抗作用，能基本抑制体内脑肿瘤生成，因此提供了一种治疗脑肿瘤的重要新方法。我们的结果还提示，微环境对肿瘤行为和决定其对此类直接生物治疗的反应性非常关键。最后我们显示整合素拮抗作用能起到非抗血管生成依赖的抗肿瘤生成作用，可增强阻碍肿瘤生长的作用。

上述的内容旨在说明而非限定本发明的范围。实际上，鉴于本文的教导本领域技术人员无需过多实验即可设想和提出其它实施方案。

参考文献

1. Folkman, J., 血管生成在肿瘤生长中的作用, *Sem. Cancer Biol.*, 3:65- 71, 1992.

2. Plate, K.H., Risau, W., 恶性胶质瘤中的血管生成., *Glia.*, 15:339-347, 1995.

3. Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., Hanahan, D., 从增生到肿瘤生成过程中血管生成的诱导, *Nature*, 339:58-61, 1989.

4. Chan, A.S., Leunng, S.Y., Wong, M.P., Yuen, S.T., Cheung, N., Fan, Y.W., Chung, L.P., 血管内皮生长因子及其受体在星形细胞瘤、少突神经胶质瘤和室管膜细胞瘤恶性变过程中的表达, *Am. J. Surg. Pathol.*, 22:816-826,1998.

5. Takano, S., Yoshii, Y., Kondo, S., Suzuki, H., Maruno, T., Shirai, S., Nose, T., 血管内皮生长因子在脑肿瘤患者血清和脑组织中的浓度, *Cancer Res.*, 56:2185-2190, 1996.

6. Brem, S., Tsanaclis, A.M., Gately, S., Gross, J.L., Herblin, W.F., 碱性(basic)成纤维细胞生长因子在人脑肿瘤微血管系统中的免疫定位, *Cancer*, 70:2673-2680, 1992.

7. Li,V.W., Folkerth, R.D., Watanabe, H., Yu, C., Rupnick, M., Barnes, P., Scott, R.M., Black, P.M., Sallan, S., Folkman, J., 脑肿瘤儿童患者中微血管计数和脑脊液碱性成纤维细胞生长因子, *Lacet*, 344:82-86, 1994.

8. Abulrauf, S.I., Edvardsen, K., Ho K.L., Yang, X.Y., Rock, J.P., Rosenblum, M.L., 血管内皮生长因子表达和血管密度作为低分级星形细胞瘤患者生存预后的标志, *J. Neurosurg.*, 88:513-520, 1998.

9. Leon, S.P., Folkerth, R.D., Black, P.M., 微血管密度是星形神经胶质脑肿瘤患者的预后指标，77:362-372, 1996.

10. Hynes, R.O., 整合素: 一个细胞表面受体家族, *Cell*, 48:455-459, 1987.

11. Rusnati, M., Tanghetti, E., Dell'Era, P., Gualandris, A., Presta, M., $\alpha_v\beta_3$ 整合素介导培养内皮细胞中的细胞黏附能力和碱性成纤维细胞生长因子（FGF-2）的生物学活性，*Mol. Biol. Cell*, 8:2449-2461, 1997.

12. Varner, J.A., 血管细胞 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 整合素在血管生成中的作用，*EXS*, 79:361-390, 1997.

13. Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A., Cheresh, D.A., 不同 α_v 整合素的两种血管生成通路的确定，*Science*, 270:1500-1502, 1995.

14. Gladson, G.L., $\alpha_v\beta_3$ 整合素在胶质母细胞瘤小血管中的表达，*J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55:1143-1149, 1996.

15. Gladson, C.L., Wilcox, J.N., Sanders, L., Gillespie, G.Y., Cheresh, D.A., 脑微环境影响玻连蛋白基于在星形细胞瘤中的表达，*J. Cell Sci.*, 108:947-956, 1995.

16. Longhurst, C.M., Jennings, L.K., 整合素介导的信号传导，*Cell Mol. Life Sci.*, 54:514-526, 1998.

17. Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K., Juliano, R.L., 整合素信号传导与细胞生长控制，*Curr. Opin. Cell Biol.*, 10:220-231, 1998.

18. Malik, R.K., 整合素受体对细胞凋亡的调节，*J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 19:541-545, 1997.

19. Scatena, M., Almeida, M., Chisson, M.L., Fausto, N., Nicosia, R.F., Giachelli, C.M., NF-kappaB介导$\alpha_v\beta_3$整合素诱导的内皮细胞生存，*J. Cell Biol.*, 141-1083-1093, 1998.

20. Gladson, C.L., Cheresh, D.A., 胶质母细胞瘤的玻连蛋白及$\alpha_v\beta_3$整合素表达. 变形胶质细胞的黏附机制，*J. Clin. Invest.*, 88:1924-1932, 1991.

21. Brooks, P.C., Clark, R.A., Cheresh, D.A., 血管生成需要$\alpha_v\beta_3$整合素，*Science*, 264:569-571, 1994.

22. Christofidou-Solomidou, M., Bridges, M., Murphy, G.F., Abelda, S.M., DeLisser, HM., 在人皮肤/SCID 小鼠嵌合模型创伤诱导的人血管生成中内皮细胞α_v整合素受体的表达及功能，*Am. J. Pathol.*, 151:975-983, 1997.

23. Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., Cheresh, D.A., $\alpha_v\beta_3$整合素拮抗剂通过诱导新生血管的凋亡促进肿瘤退化，*Cell*, 79:1157-1164, 1994.

24. Molema, G., Griffioen, A.W., 通过攻击肿瘤的血管供应来动摇实体瘤的基础，*Immunol. Today*, 19:392-394, 1998.

25. Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N., 抑制血管内皮生长因子诱导的血管生成可在体内抑制肿瘤的生长，*Nature*, 362-841-844, 1993.

26. Re, F., Zanetti, A., Sironi, M., Polentarutti, N., Lanfrancone, L., Dejana, E., Colotta, F., 在培养人内皮细胞中抑制锚定点依赖性细胞的播散可触发凋亡，*J. Cell Biol.*, 127:537-546, 1994.

27. Montgomery, A.M., Reisfffeld, R.A., Cheresh, D.A.,
$\alpha_v\beta_3$整合素能使三维皮肤胶原中的黑色素瘤细胞免于凋亡, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:8856-8860, 1994.

28. Isik, F.F., Gibran, N.S., Jang, Y., Sandell, L., Schwartz, S.M.,
玻连蛋白减少微血管内皮细胞凋亡, *J. Cell Physiol.*, 173:149-155, 1998.

29. Germer, M., Kanse, S.M., Kirkegaard, T., Kioler, L.,
整合素依赖性细胞在玻连蛋白上黏附的动力学分析. 血纤维蛋白溶酶原活化剂的抑制剂-1及RGD肽的抑制作用, *Eur. J. Biochem.*, 253:669-674, 1998.

30. Ruoslahti, E., Reed, J.C., 锚定点依赖性、整合素及凋亡, *Cell*, 77:477-478, 1994.

31. MacDonald, T.J., Tabrizi, P., Shimada, H., Zlokovic, B.V., Laug, W.E.,
通过增强的绿荧光蛋白质体内检测脑肿瘤的侵袭和微转移, *Neurosurgery*, 43:1437-1443, 1998.

32. Hsu, S.C., Volpert, O.V., Steck, P.A., Mikkelsen, T., Polverini, P.J., Rao, S., Chou Bouck, N.P., 10号染色体的 throbospondin-1 诱导对人胶质母细胞瘤中血管生成的抑制, *Cancer Res.*, 56:5684-5691, 1996.

33. Taki, T., Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Saitoh, Y., Izumoto, S., Mori, K., Hayakawa, T., TNnP-470 在体内对人恶性胶质瘤的抗增殖作用: 对肿瘤血管生成的有效抑制, *J. Neurooncol.*, 19:251-258, 1994.

34. Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D.W., Fine, H.A.,
病毒载体介导的修饰血小板因子4 cDNA转导可抑制血管生成及肿瘤生长, *Nat. Med.*, 3:437-442, 1997.

35. Carron, C.P., Meyer, D.M., Pegg, J.A., Engleman, V.W., Nickols, M.A., Settlel, S.L., Westlin, W.F., Ruminski, P.G., Nickols, G.A., $\alpha_v\beta_3$整合素肽类似物拮抗剂抑制 Leydig 细胞肿瘤生长及恶性肿瘤高钙血症的发展, *Cancer Res.*, 58:1930-1935, 1998.

36. Kirsch, M., Strasser, J., Allende, R., Bello, L., Zhang, J., Black, P.M., 血管他汀抑制恶性胶质瘤在体内的生长, *Cancer Res.*, 58:4654- 4659, 1998.

37. Bader, B.L., Rayburn, H., Crowley, D., Hynes, R.O., 在缺乏所有α_v整合素的小鼠中广泛的脉管形成、血管生成和器官形成领先于致死性, *Cell*, 95:507-519, 1998.

38. Knott, J.C., Mahesparan, R., Garcia-Cabrera, I., Bolge, T.B., Edvardsen, K., Ness, G.O., Mark, S., Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R., 侵袭性胶质瘤细胞对正常脑组织中细胞外基质组分的刺激, *Int. J. Cancer*, 75:864-872, 1998.

39. Seger, D., Gechtman, Z., Shaltiel, S., 酪蛋白激酶 II 对玻连蛋白的磷酸化.位点的鉴定及其对细胞黏附及迁移的促进, *J. Biol. Chem.*, 273:24805-24813, 1998.

40. Woodard, A., Garcia-Cardera, G., Leong, M., Madri, J., Sessa, W., Languino, L., $\alpha_v\beta_3$整合素于 PDGF 受体的协同活性促进细胞迁移, *J. Cell Sci.*, 111:469-478, 1998.

41. Sanders, R.J., Mainiero, F., Giancotti, F.G., 肿瘤生成与转移中整合素的作用, *Cancer Invest.*, 16:329-344, 1998.

42. Treasurywala, S., Berens, M.E., 胶质瘤细胞中的迁移抑制依赖于α_v整合素亚单位, *Glia.*, 24:236-243, 1998.

43. Won, N.C., Mueller, B.M., Barbas, C.F., Ruminski, P., Quaranta, V., Lin, E.C., Smith, J.W., α_v整合素介导乳腺癌细胞系的黏附与迁移，*Clin. Exp. Metastasis*, 16:50-61, 1998.

44. Van Leeuwen, R.L., Yoshinaga, I.G., Akasaka, T., Dekker, S.K., Vermeer, B.J., Byers, H,R., 黑色素瘤细胞在玻连蛋白上的附着、延展与迁移. $\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$整合素的作用，*Exp. Dermatol.*, 5:308-315, 1996.

45. Lehmann, M., El Battari, A., Abadie, B., Martin, J.M., Marvalldi, J., $\alpha_v\beta_5$和$\alpha_v\beta_6$整合素糖基化在结肠腺癌细胞系黏附中的作用，*J. Cell Biochem.*, 61:266-277, 1996.

46. Kost, C., Benner, K., Stockmann, A., Linder, D., Preissner, K.T., 黏附蛋白质作为形态调节和血管他汀结合因子的特征，*Eur. J. Biochem.*, 236:682- 688, 1996.

47. Maenpaa, A., Kovanen, P.E., Paetau, A., Jaaskelainen, J., Timonen, T., 胶质瘤和正常脑组织中淋巴细胞黏附分子配体和细胞外基质蛋白质: VCAM-1在胶质瘤中的表达，*Acta. Neuropathol.*, 94:216-225, 1997.

48. Brooks, P.C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F.H., Cheresh, D.A., 抗$\alpha_v\beta_3$抗体阻断人乳腺癌生长及人皮肤中的血管生成，*J. Clin. Invest.*, 96:1815-1822, 1995.

49. Stins, M.F., Gillesl, F., Kim, K.S., 黏附分子在人脑微血管内皮细胞上的选择性表达，*J. Neuroimmunol.*, 76:81-90, 1997.

50. Bafetti, L.M., Young, T.N., Itoh, Y., Stack, M.S.,
完整的玻连蛋白诱导基质金属蛋白酶-2 及金属蛋白酶-2 组织抑制剂的表达并加强黑色素瘤细胞对细胞的侵袭, *J. Biol. Chem.*, 273:143-149, 1998.

51. Wong, N.C., Mueller, B.M., Barbas, C.F., Ruminski, P., Quaranta, V., Lin, E.C., Smith, J.W., α_v整合素介导乳腺癌细胞系的黏附与迁移, *Clin. Exp. Metastasis*, 16:50-61, 1998.

52. Van Leeuwen, R.L., Yoshinaga, I.G., Akasaka, T., Dekker, S.K., Vermeer, B.J., Byers, H.R., 黑色素瘤细胞在玻连蛋白上的附着、延展和迁移. $\alpha_v\beta_3$和$\alpha_v\beta_5$整合素作用, *Exp. Dermatol.*, 5:308-315, 1996.

53. Lehmann, M., El Battari, A., Abadie, B., Martin, J.M., Marvaldi, J., $\alpha_v\beta_5$和$\alpha_v\beta_6$整合素糖基化在结肠腺癌细胞系(HT29-D4)黏附中的作用, *J. Cell Biochem.*, 61:266-277, 1996.

54. Gladson, C.L., Cheresh, D.A., 胶质母细胞瘤中玻连蛋白和整合素的表达, *J. Clin. Invest.*, 88:1924-1932, 1991.

55. Jaskiewicz, K., Chasen, M.R., Robson, S.C., 肝细胞癌和慢性肝病中细胞外基质蛋白质和整合素的差异性表达, *Anticancer Res.*, 13:2229-2237, 1993.

56. Brooks, P.C., Stromblad, S., Klemke, R., Visseher, D., Sarkar, F.H., Cheresh, D.A., 抗$\alpha_v\beta_3$抗体阻断人乳腺癌生长及人皮肤中的血管生成, *J. Clin. Invest.*, 96:1815-1822, 1995.

57. Leon, S.P., Folkerth, R.D., Black, P.M., 微血管密度是星形胶质脑肿瘤患者的预后指标, *Cancer*, 77:362-372, 1996.

58. Wesseling, P., Van Der Laak, J.A., Link, M., Teepen, H.L., Ruiter, D.J., 在恶性分级增高的播散星形细胞瘤中微血管数量分析发生变化, *Hum. Pathol.*, 29:352-358, 1998.

59. Li, V.W., Folkerth, R.D., Watanabe, H., Yu, C., Rupnick, M., Barnes, P., Scott, M., Black, P.M., Sallan, S., Folkman, J., 在脑肿瘤儿童患者中的微血管计数及脑脊液碱性成纤维细胞生长因子, *Lancet*, 344:82- 86, 1994.

60. Taki, T., Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Saitoh, Y., Izumoto, S., Mori, K., Hayakawa, T., TNP-470 在体内对人恶性胶质瘤的抗增殖作用: 对肿瘤血管生成的有效抑制, *J. Neurooncol.*, 19:251-258, 1994.

61. Hsu, S.C., Volpert, O.V., Steck, P.A., Mikkelsen, T., Polverini, P.J., Rao, S., Chou Bouck, N.P., 10 号染色体的 thrombospondin-1 诱导对人胶质母细胞瘤中血管生成的抑制, *Cancer Res.*, 56:5684-5691, 1996.

62. Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D.W., Fine, H.A., 病毒载体介导的修饰血小板因子 4 cDNA 转导可抑制血管生成及肿瘤生长, *Nat. Med.*, 3:437-442, 1997.



图 1a

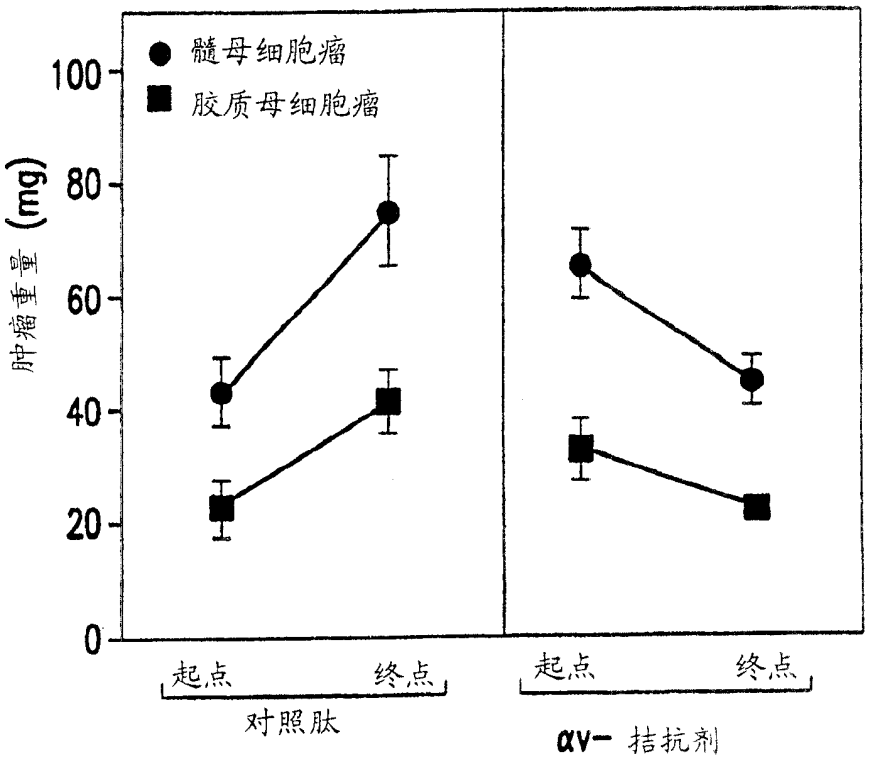


图 1b

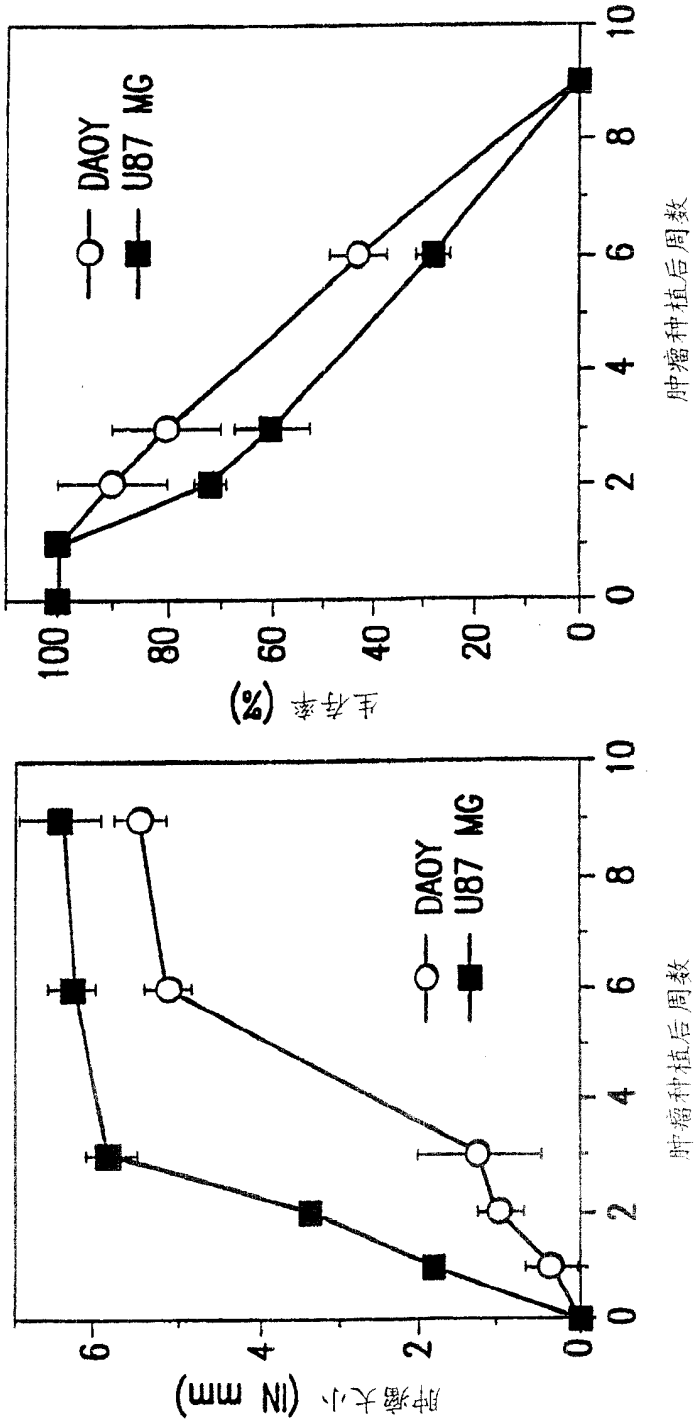


图 2b

图 2a

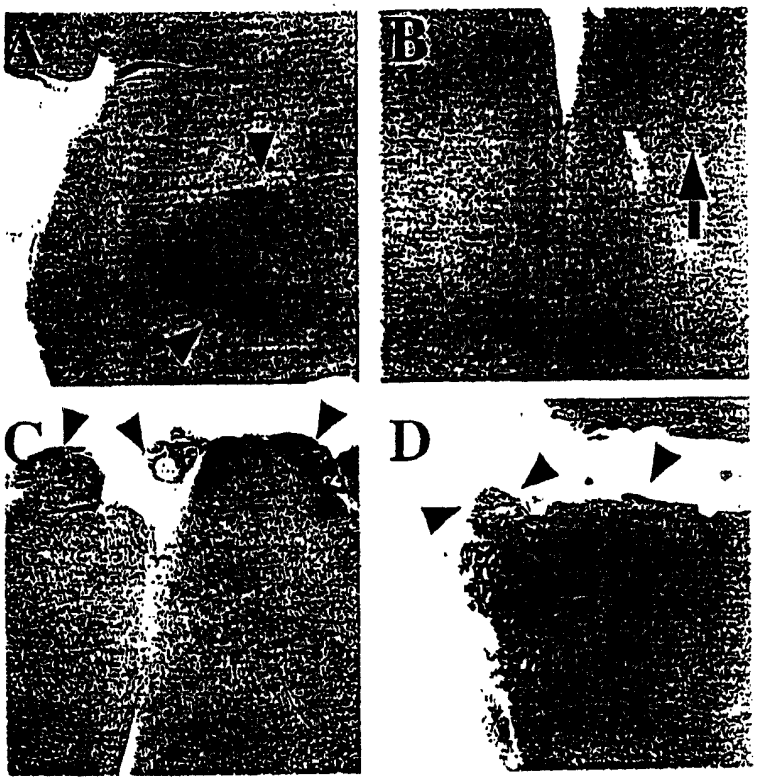


图 3a

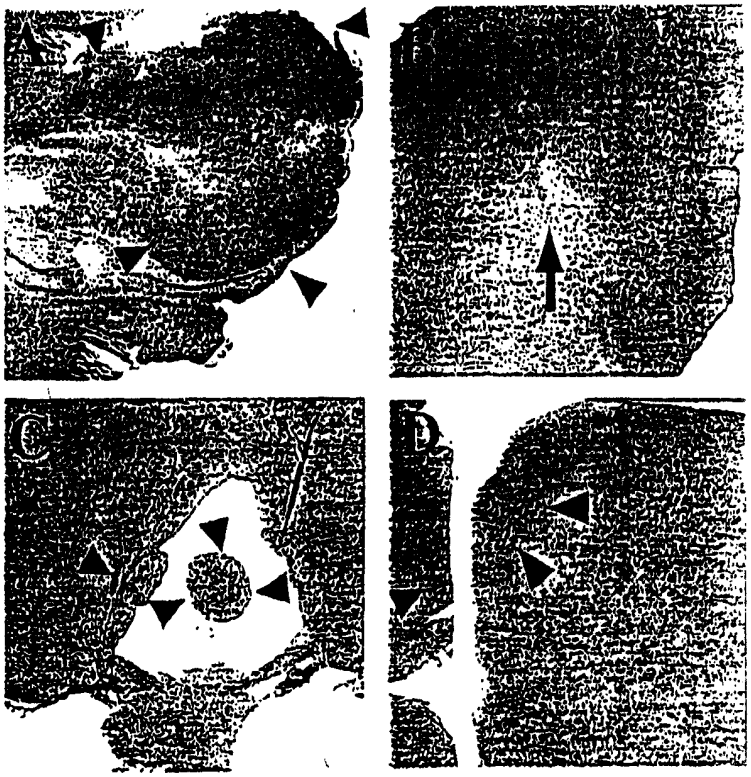


图 3b

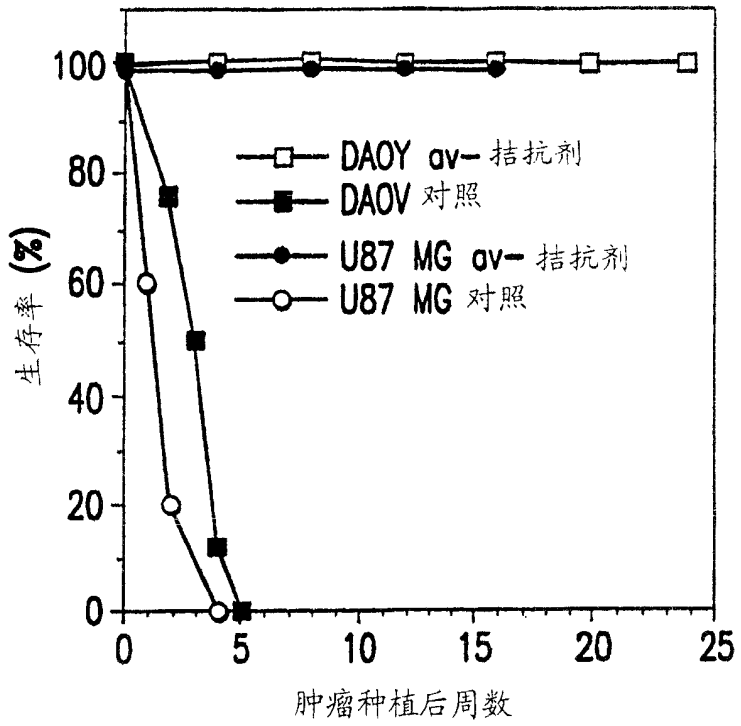

100
80
60
40
20
0
生存率 (%)
0
5
10
15
20
25
肿瘤种植后周数
DAOY av- 拮抗剂
DAOV 对照
U87 MG av- 拮抗剂
U87 MG 对照

图 4

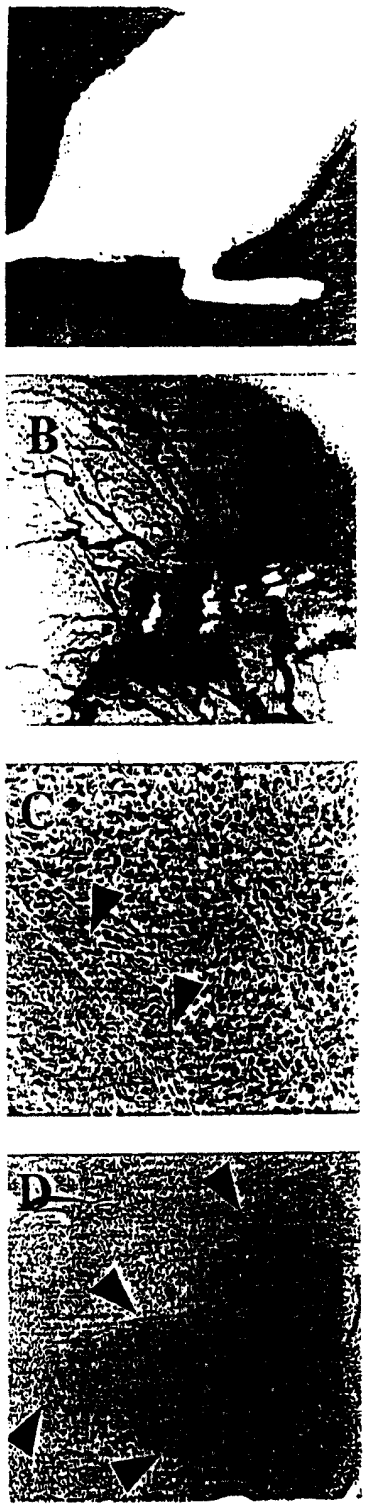


图 5a

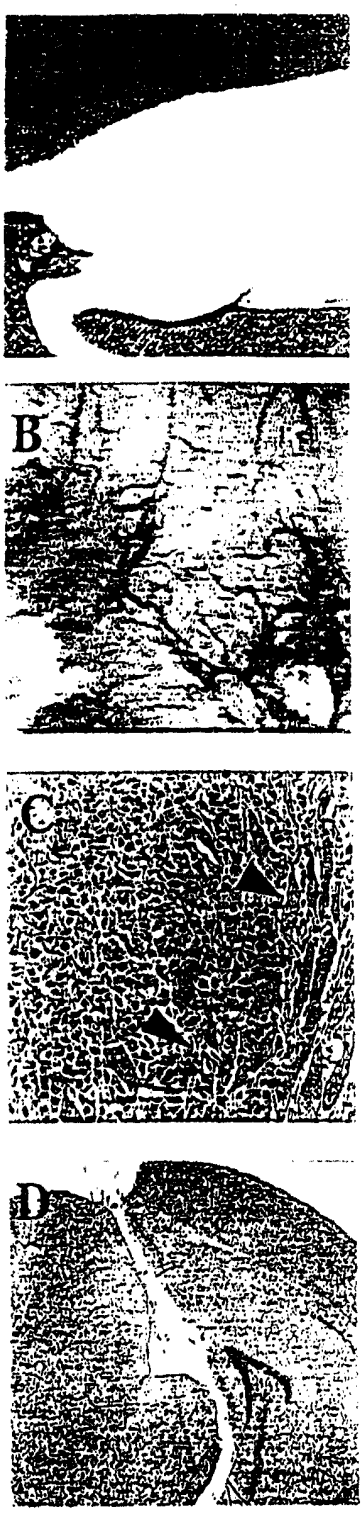


图 5b

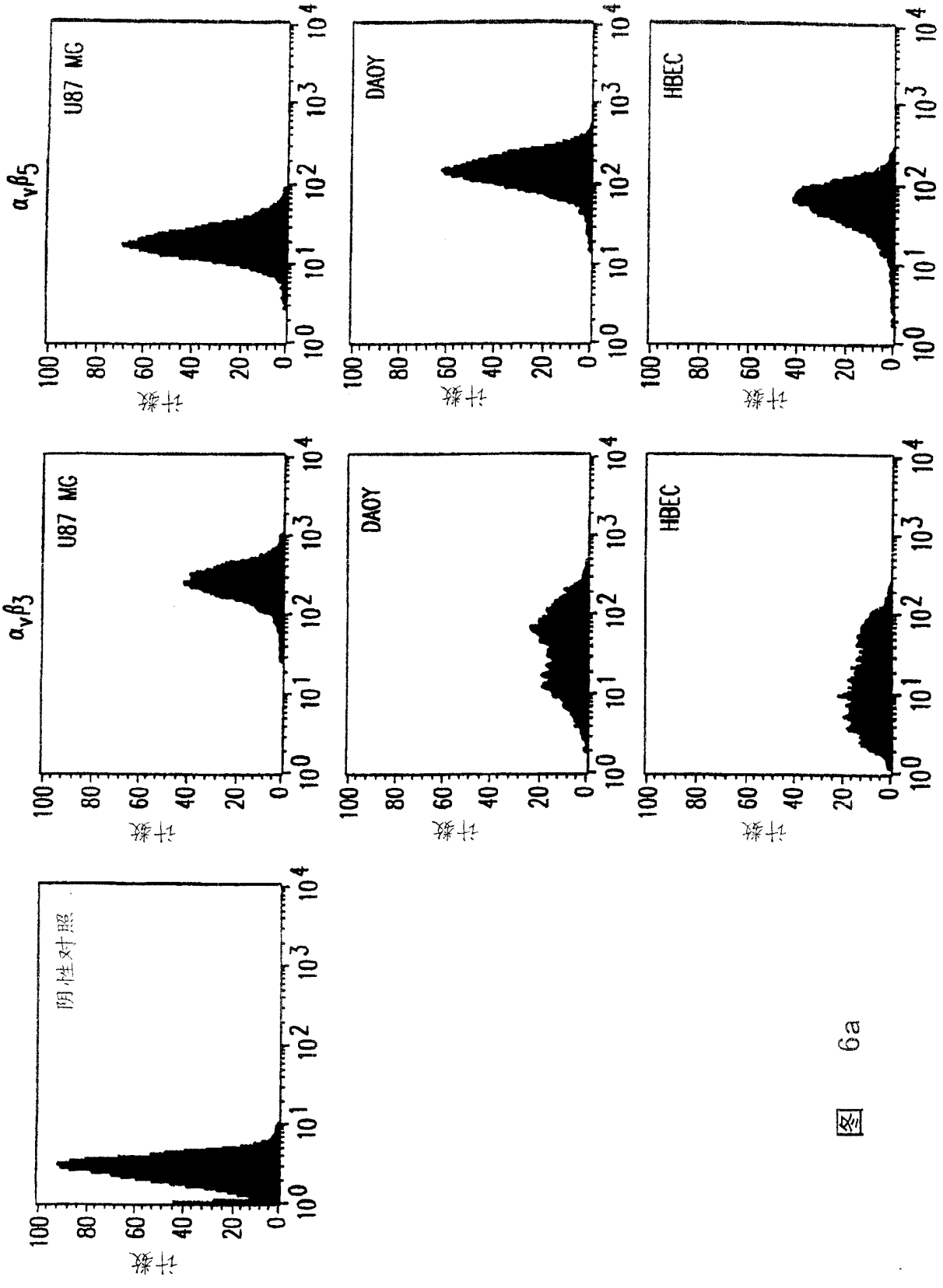

$\alpha_v\beta_5$
U87 MG
DAOY
HBEC
$\alpha_v\beta_3$
U87 MG
DAOY
HBEC
阴性对照
计数

图 6a

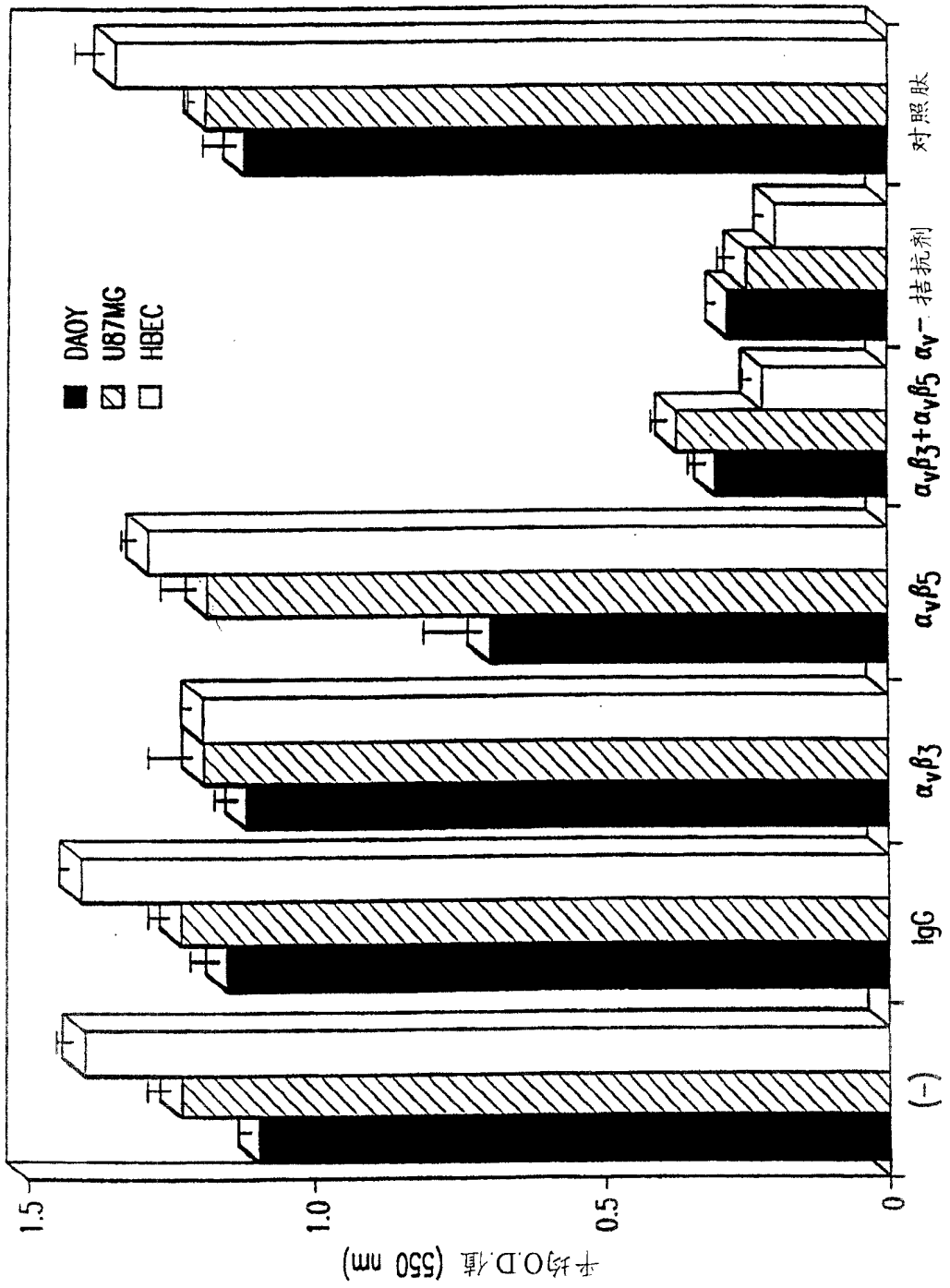

DAOY
U87MG
HBEC
平均O.D.值 (550 nm)
1.5
1.0
0.5
0
(-)
IgG
$\alpha_v\beta_3$
$\alpha_v\beta_5$
$\alpha_v\beta_3+\alpha_v\beta_5$
α_v- 拮抗剂
对照肤
治疗

图 6b

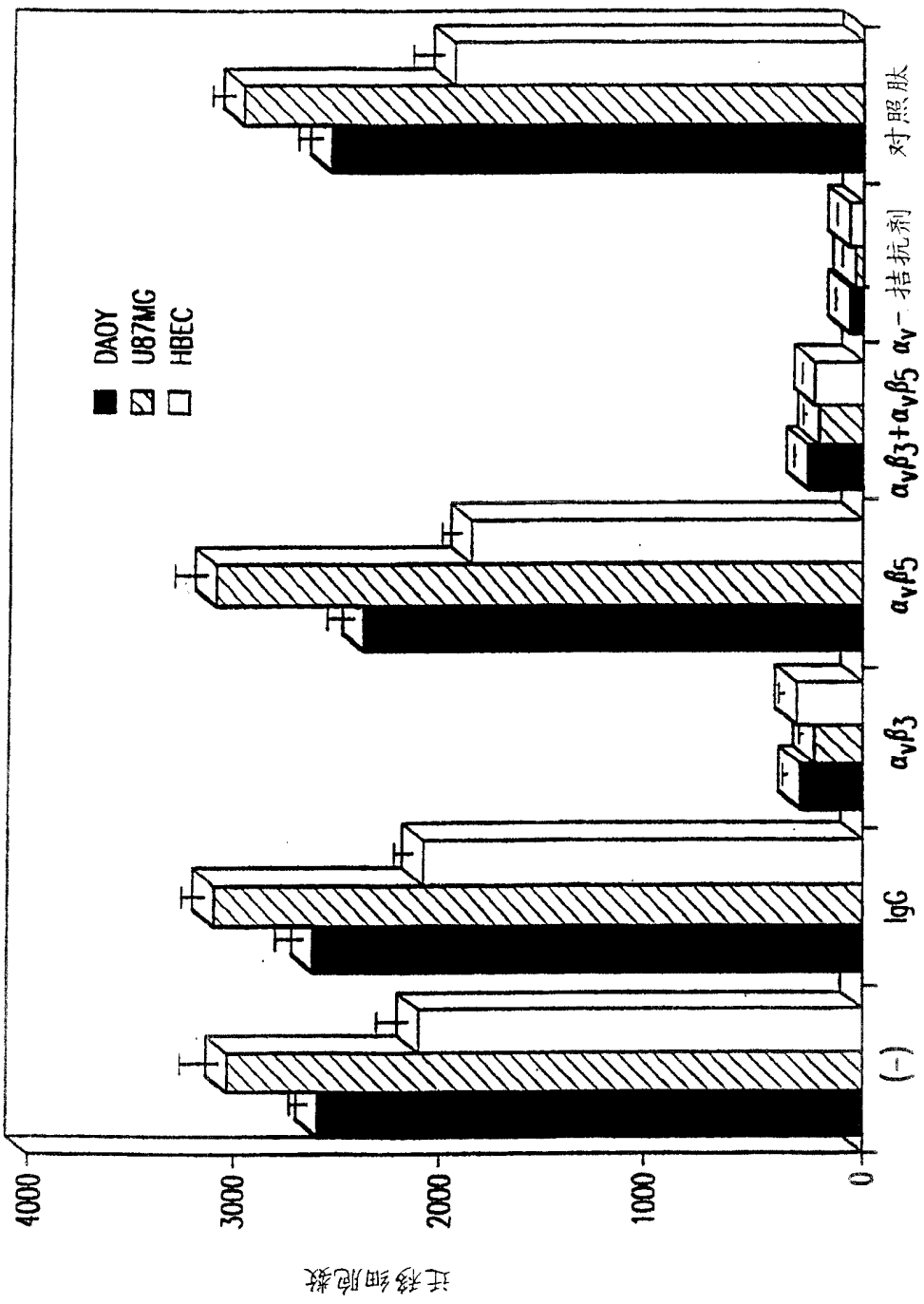

DAOY
U87MG
HBEC
迁移细胞数
4000
3000
2000
1000
0
(-)
IgG
$\alpha_v\beta_3$
$\alpha_v\beta_5$
$\alpha_v\beta_3+\alpha_v\beta_5$
α_v- 拮抗剂
对照肽
治疗

图 6c

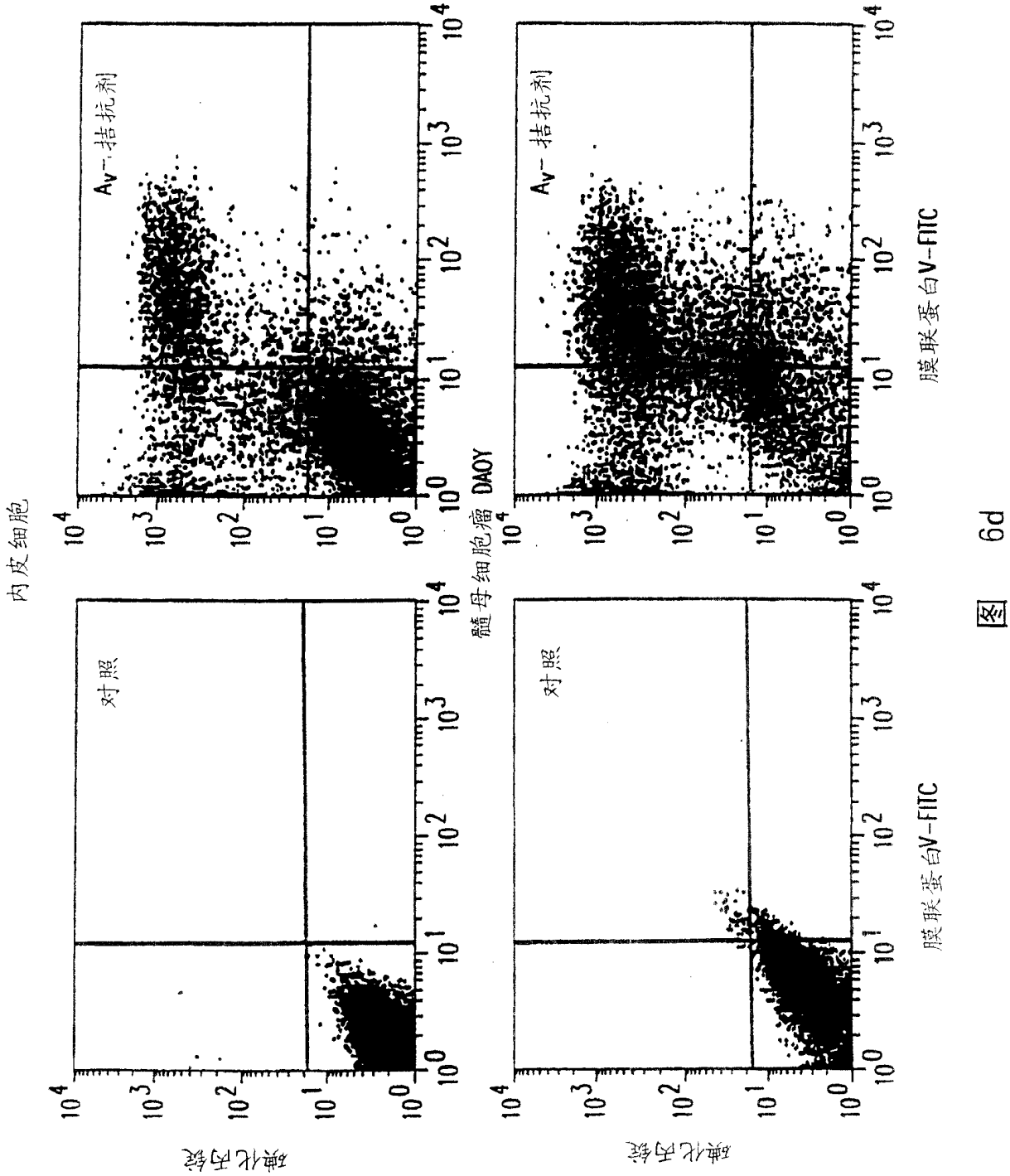


图 6d

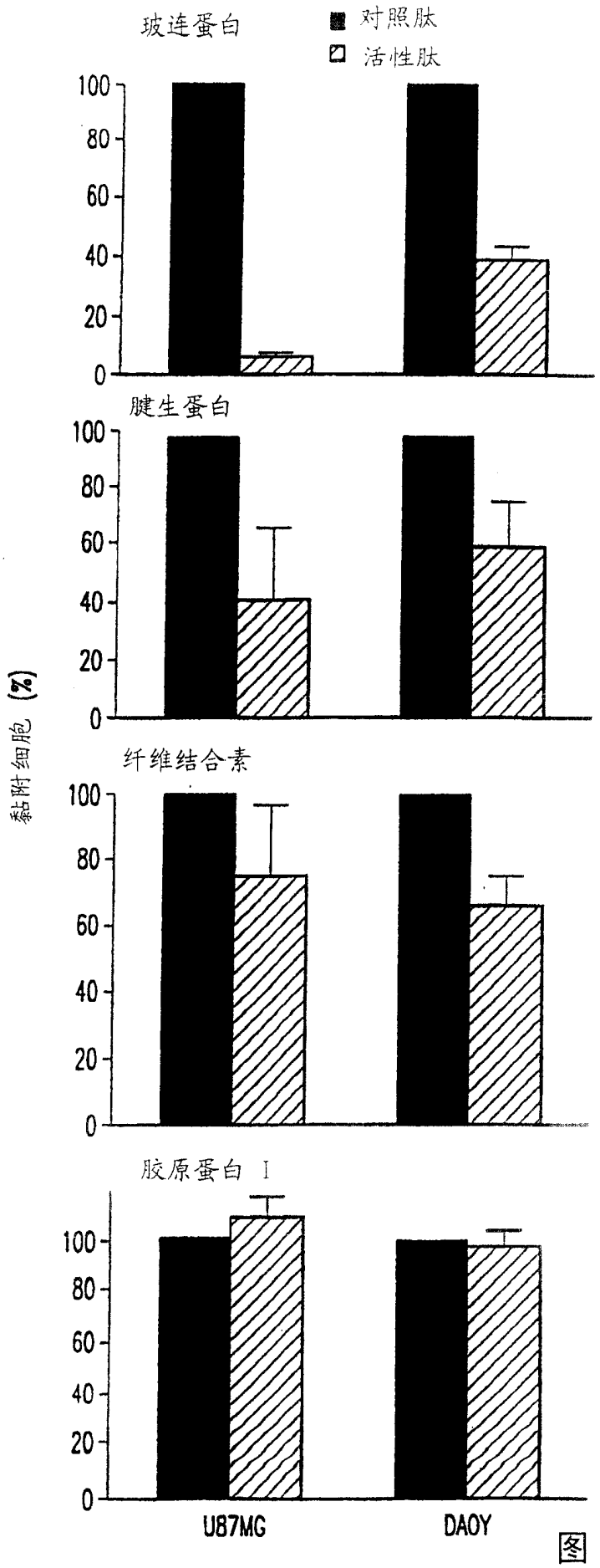


图 7

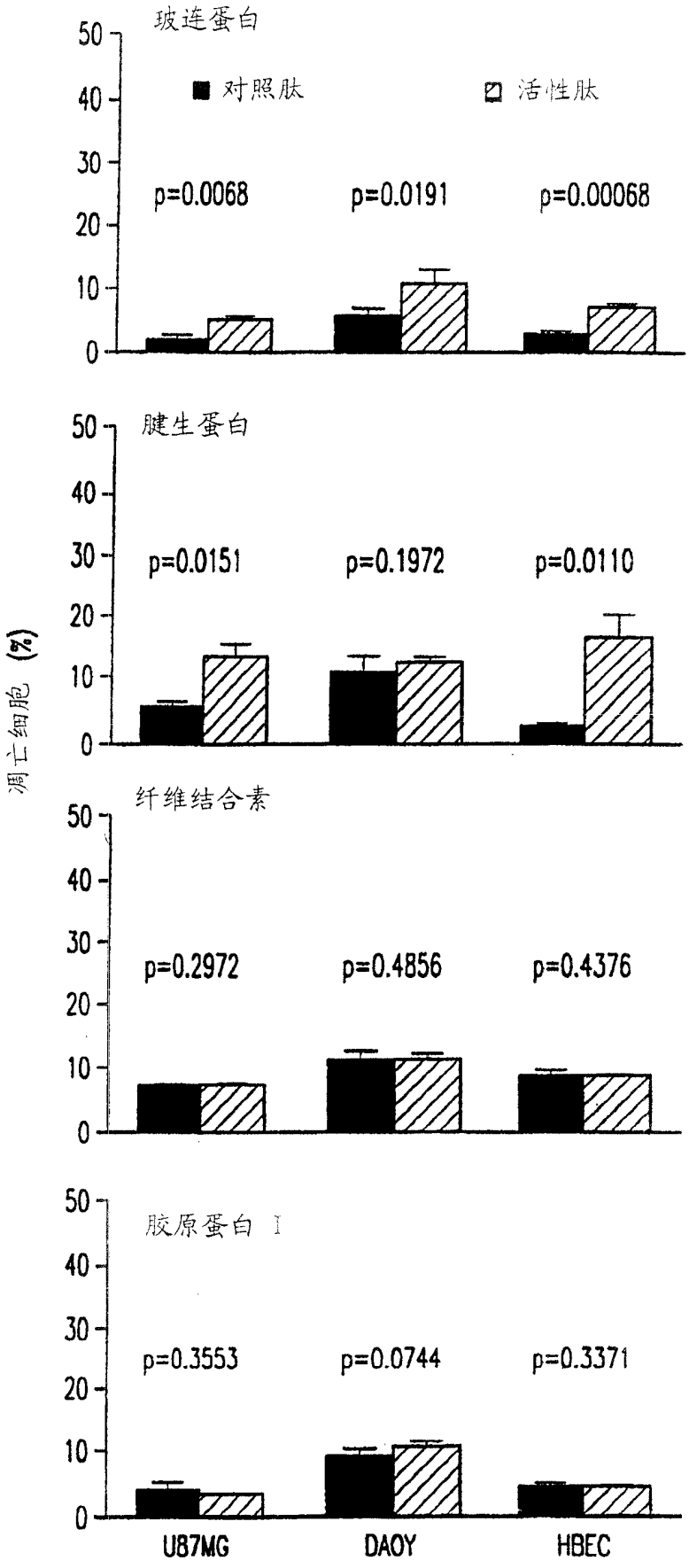

玻连蛋白
对照肽
活性肽
p=0.0068
p=0.0191
p=0.00068
腱生蛋白
p=0.0151
p=0.1972
p=0.0110
纤维结合素
p=0.2972
p=0.4856
p=0.4376
胶原蛋白 I
p=0.3553
p=0.0744
p=0.3371
凋亡细胞 (%)
0
10
20
30
40
50
U87MG
DAOY
HBEC

图 8

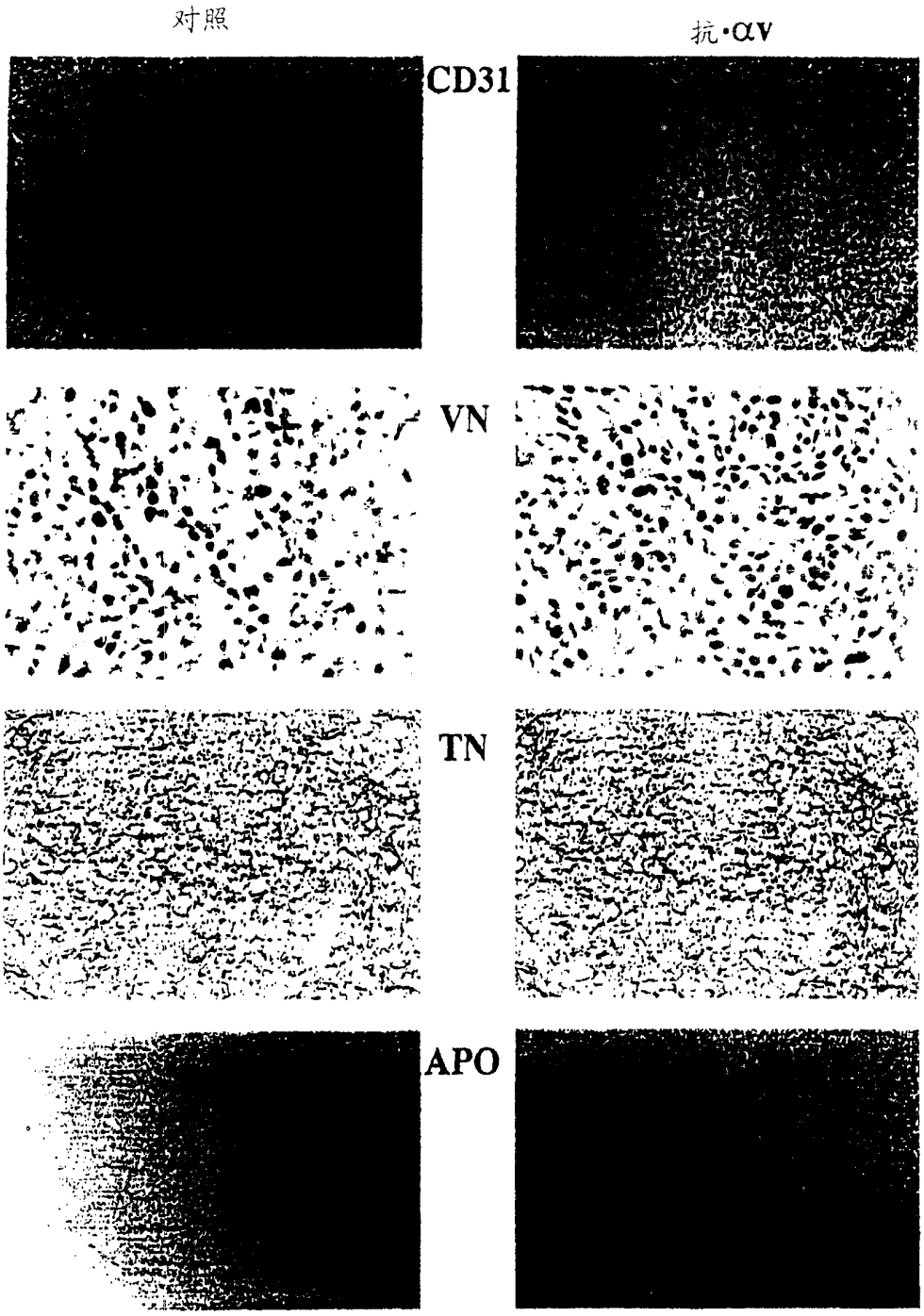


图 9