

· 综 述 ·

TPO 模拟肽类血小板生长因子研究进展*

王 崧 综述, 许 杨, 王军平[△] 审校, 开 丽

(第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室/全军复合伤研究所/

创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038)

关键词: 血小板; 血小板生成素; TPO 模拟肽

中图分类号: R558.2; R459.9

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)04-0477-03

1994 年 TPO 被成功克隆及纯化。此后人们开始研制 rhTPO 和 PEG-rhMGDF, 并在多种血小板减少性疾病中进行了广泛临床研究。然而一些接受 PEG-rhMGDF 治疗的健康受试者产生了与内源性 TPO 存在交叉中和反应的自身抗体, 导致血小板减少, PEG-rhMGDF 和 rhTPO 的开发被迫停止。随着第 1 代血小板生长因子临床实验的失败, 人们开始致力于研制具有类似 TPO 一样的促血小板生成活性, 而又不会诱导产生 TPO 中和性抗体的新型血小板生长因子。截止目前, 已经有 TMP、TPO 非肽模拟物和 TPO 激动型抗体等多种类型的新一代血小板生长因子被发现并受到充分关注^[1-2]。

TMP 最早由 Cwirala 等通过肽库筛选发现, 仅由 14 个氨基酸组成, 可与 TPO 受体高亲和力结合, 与 TPO 无序列同源性。在体外实验中证实, 通过化学合成的该肽能够刺激 TPO 依赖细胞株 (Ba/F3/c-Mpl) 增殖与分化, 与 rhTPO 等效。随后的研究提示该模拟肽不会诱导产生与人 TPO 有交叉反应的抗体。然而, 此线性多肽分子量很小, 在循环中很容易被降解, 体内疗效不明显。因此人们对该多肽进行了相关修饰或与其他活性结构相融合, 以充分发挥其在体内的生物学活性^[1]。现对 TMP 类血小板生长因子的研究进展阐述如下。

1 主要 TPO 模拟肽类血小板生长因子

1.1 聚乙二醇化 TMP 聚乙二醇化是增加短肽类分子半衰期的一种有效途径^[3]。因此在获得 TMP 后人们就对该分子及其二聚体进行了聚乙二醇化修饰。动物实验结果表明, 聚乙二醇化的 TMP 分子在犬体内平均半衰期可达 56h, 与单纯 TMP 分子相比, 其半衰期明显延长。同时当给予小鼠和兔注射聚乙二醇化的 TMP 分子后, 动物体内不会产生 TPO 中和性抗体。在人体试用时发现单支剂量聚乙二醇化 TMP 分子即可明显促进体内血小板的生成, 提示 TMP 在体内同样可发挥促进巨核细胞增殖、分化和血小板生成的作用^[4]。但由于聚乙二醇化之前要首先通过化学法合成制备 TMP 二聚体分子, 不仅其均一性较差, 而且成本较高, 使其临床推广应用受到一定限制。

1.2 TMP-IgG1Fc 叶祥忠等^[5]将前述由 14 个氨基酸组成的 TMP 分子连接至不同长度人 IgG1Fc 的 N 端, 得到 3 种 TMP-Ig G1Fc 融合蛋白。3 种融合蛋白均可在体外维持 TPO 依赖细胞 (Ba/F3-Mpl) 生长。在卡铂致血小板减少症小鼠模型中, 3 种融合蛋白均能明显升高血小板计数及缩短血小板恢复时间, 且对白细胞和红细胞无明显影响。分别用 3 种融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 均未产生抗 TMP 抗体。但其促血小板生成作用较 rhTPO 和聚乙二醇化 TMP 二聚体低。为了进一

步提高 TMP-IgG1Fc 融合蛋白的生物学活性, 近年来叶祥忠等^[5]在此基础上又尝试应用毕赤酵母对其进行表达与制备。

1.3 SMP 人干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 和 TPO 均为巨核细胞增生和造血过程中的关键细胞因子^[6]。Lin 等^[7]将上述 TMP 单体或二聚体连接到 SCF 的 C 末端, 获得融合蛋白 SMP。初步研究显示, 该融合蛋白在体外可明显增强 Mo7e 细胞增殖, 促进单核细胞 (Mononuclear cells, MNC) 集落形成。但融合 TMP 单体或二聚体的 SMP 在体外实验中的效果差异并无统计学意义, 这可能是由于该融合蛋白采用的 GGG 桥接肽缺乏柔性, 降低了每个单体 TMP 与 TPO 受体的结合能力; 也可能是由于 SCF 连接与 TMP 的 N 末端, 破坏了 TMP 二聚体的对称性, 从而严重影响了其结合受体的能力。

1.4 rTMP-hGH 有研究提示人生长激素 (human growth hormone, hGH) 在促巨核细胞增殖和血小板生成方面有明显的疗效^[8-9], 但缺乏特异性。许杨等^[10]将上述 TMP 分子与人生长激素进行融合, 得到重组融合蛋白 rTMP-hGH。通过融合, 不仅可以增大 TMP 分子量, 使其体内半衰期延长; 同时还可利用 TMP 靶向巨核细胞的作用, 提高 hGH 在促血小板生成方面的生物利用度。体外实验证实该融合蛋白可明显促进巨核细胞集落形成, 并能上调巨核细胞增殖分化调控因子-球蛋白转录因子 1 (globin transcription factor 1, GATA-1) 的表达。体内动物实验表明, 该融合蛋白能够偏向分布于小鼠的骨髓组织^[11], 且不会诱导形成抗 TPO 的自身抗体^[12]。在用于急性放射损伤所致血小板减少症小鼠后发现, 该融合蛋白具有明显的升血小板疗效, 而且无明显不良反应。

1.5 Fab 59 Frederickson 等^[13]将 2 个上述 TMP 分子分别插入全长人 Fab 的重链互补决定域 3 (HC-CDR3) 和轻链 CDR2 获得了一种 TPO 模拟肽 (Fab 59)。Fab 59 在刺激 TPO 依赖细胞系生长中与 rhTPO 等效, 在给小鼠注射后体内没有形成抗 TPO 的自身抗体, 但是其增加血小板计数的活性仅为 rhTPO 的 1/30, 这可能是由于人与鼠 TPO 受体的差异所致。

1.6 AMG 531 AMG 531 是另一种 TMP 类血小板生长因子, 由 2 个人 IgG1κ-HC 恒定区 (一段 Fc 片断) 通过二硫键结合, 每个 Fc 片断上再通过多聚甘氨酸结合 2 个相同的 TMP 序列^[14-15]。该肽序列也是通过肽库筛选得到的与人 TPO 完全不同源的序列, 且拥有一个可结合并激活人 TPO 受体的 3 级结构。其中 Fc 片段有效延长了该分子在循环中的半衰期。在体外 AMG 531 可与 rhTPO 竞争结合人 TPO 受体, 使 TPO 依赖细胞株内 JAK2 和 STAT5 磷酸化, 促进巨核细胞增殖和

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2007AA02Z152), 全国博士学位论文作者专项资金资助项目 (200362); 新药创制科技专项 (2008ZXJ09003-011)。△ 通讯作者, 电话: (023)68752283; E-mail: wangjunp@yahoo.com。

成熟^[16]。在恒河猴的研究中,AMG 531 具有剂量依赖性的升血小板作用,且未见血小板减少个例发生,也没有形成抗 TPO 抗体。

2 TPO 模拟肽类血小板生长因子的临床研究

到目前为止,TPO 模拟肽类血小板生长因子中只有 AMG 531 完成了 I~III 期的临床研究,已完成的临床研究主要在骨髓细胞构成正常的特发性血小板减少性紫癜 (idiopathic thrombocytopenic purpura, ITP) 或肝病血小板减少患者中进行。目前又开展了对骨髓异常增生综合征 (myelodysplastic syndrome, MDS) 和化疗导致血小板减少的临床研究,但实验结果尚不明确。

在 AMG 531 对 ITP 患者进行的研究中,入选患者多数血小板计数低于 $30 \times 10^9/L$,且之前至少有一种疗法失败。I 期研究中,12 例患者中 7 例在 3、6、10 $\mu g/kg$ 剂量 2 次给药后血小板计数翻倍,且增长超过 $50 \times 10^9/L$ 。血小板计数呈剂量依赖峰值,3、6、10 $\mu g/kg$ 组分别为 163、309、746 $\times 10^9/L$ 。II 期研究中,予 AMG 531 (1、3 $\mu g/kg$) 或安慰剂按每周 1 次连续注射 6 周给药,16 例应用 AMG 531 治疗患者中 12 例血小板计数翻倍,且增长超过 $50 \times 10^9/L$ 。1、3 $\mu g/kg$ 剂量组和安慰剂组比较,血小板计数平均峰值分别为 135、241、81 $\times 10^9/L$ ^[22]。最近对 AMG 531 完成了 2 项多中心安慰剂随机对照 III 期临床试验。Kuter 等^[17] 研究显示,在 62 例未切脾的慢性 ITP 患者(血小板计数平均值为 $18.3 \times 10^9/L$) 中 AMG 531 持续有效率 (24 周疗程后 8 周内血小板计数大于或等于 $50 \times 10^9/L$,且持续时间大于或等于 6 周) 为 61%,明显高于安慰剂组 (4.8%, $P < 0.0001$),总有效率(持续有效率加短期有效率)也明显优于安慰剂组(分别为 87.8%、14.3%)。AMG 531 组需给予其他治疗的比例为 17.1%,安慰剂组为 61.9% ($P = 0.0004$)。实验过程中无严重不良事件发生,未检测到抗-TPO 和抗-AMG 531 中和性抗体。Gernsheimer 等^[18] 试验结果显示,63 例慢性 ITP 患者脾切除后应用 AMG 531 总有效率为 78%,持续有效率为 38%,发生血栓 1 例,出现骨髓网状纤维化 1 例;安慰剂组均无效。

Bussel 等^[19] 完成了一项共 136 例患者入组的 AMG 531 长期安全性和有效性试验。AMG 531 起始剂量均为 $1 \mu g/kg$,根据血小板反应调整剂量。其中 22 例给药超过 96 周,最长 1 例为 122 周。常见不良反应有头痛、乏力、腹泻、鼻出血、鼻咽炎和关节痛等,发生率与剂量无明显关系。发生严重不良事件 11 例,其中骨髓网状纤维化 4 例,停药后网状纤维增生减退;血栓 3 例,其中 1 例为颅内血栓伴视乳头水肿和一过性失明;1 例出现抗-AMG 531 中和性抗体,但与 TPO 无交叉反应,停药 4 个月后转阴。总有效率(血小板计数大于或等于 $50 \times 10^9/L$,且较基础值升高至少 1 倍) 为 82% (112 例),中位起效时间 2 周。其他合用药物大多停用或减量。

此外,邵波等^[12] 报道最近开展了一项双盲安慰剂对照的聚乙二醇化 TMP 药代动力学、药效动力学和安全性研究。该研究中 40 例受试者分为 5 个平行组,采取不同浓度聚乙二醇化 TMP 单次静脉注射给药。研究表明, $\geq 0.75 \mu g/kg$ 剂量时,血小板计数相对于安慰剂组呈剂量依赖性升高,且没有证据显示有抗体形成。2.5、3.0 $\mu g/kg$ 组还能增加红细胞系爆式集落形成单位和普通集落形成单位计数,提示其对相同谱系具有一定作用。目前该药物已获准进入 II 期临床研究。

3 结 论

尽管利用肽库检索获得的 TMP 可与天然 TPO 受体结合

并刺激 TPO 依赖细胞株增殖与分化,且与 TPO 完全不同源,不会产生与人 TPO 交叉反应的中和性抗体,但该线性分子在体内易被肾脏滤过、半衰期短、且难以通过基因工程方法制备等问题限制了其直接应用。通过将 TMP 与其他活性结构融合或聚乙二醇化的方法,在保留促血小板生成活性的同时,有效延长了其在循环中的半衰期,也使通过基因工程方法大量制备成为可能。该类药物升血小板作用明显,不产生与 TPO 存在交叉反应的中和性抗体,且长期给药安全性较好,是一类开发应用前景良好的升血小板药物。

参考文献:

- [1] Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors[J]. *Blood*, 2007, 109: 4607.
- [2] 赵永强. 第 2 代促血小板生成剂临床研究现状[J]. *内科理论与实践*, 2008, 3(2): 85.
- [3] Cerneus D, Brown K, Harris R, et al. Stimulation of platelet production in healthy volunteers by a novel pegylated peptide-based thrombopoietin (TPO) receptor agonist[J]. *Blood*, 2005, 106: 1249a.
- [4] Liem-Moolenaar M, Cerneus D, Molloy MJ, et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the novel thrombopoietin mimetic peptide RWJ-800088 in humans[J]. *Clinical pharmacology and Therapeutics*, 2008, 84(4): 481.
- [5] 叶祥忠, 郭强, 李朝, 等. TPO 模拟肽与人 IgG1Fc 融合蛋白在毕赤酵母中的表达及活性鉴定[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 25.
- [6] Drayer AL, Boer AK, Los EL, et al. Stem cell factor synergistically enhances thrombopoietin-induced STAT5 signaling in megakaryocyte progenitors through JAK2 and src kinase[J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 240.
- [7] Su L, Chen SS, Yang KG, et al. Cloning and expression of human stem cell factor fused with thrombopoietin mimetic peptide in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28: 857.
- [8] Hanley MB, Napolitano LA, Mccune JM. Growth hormone-induced stimulation of multilineage human hematopoiesis[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(8): 1170.
- [9] Carlo-Stella C, Di-Nicola M, Milani R, et al. Age- and irradiation-associated loss of bone marrow hematopoietic function in mice is reversed by recombinant human growth hormone[J]. *Exp Hematol*, 2004, 32(2): 171.
- [10] 许杨, 王军平, 赵景宏, 等. 重组融合蛋白 rTMP-hGH 对体外培养巨核细胞增殖的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(1): 1.
- [11] 邵波, 艾国平, 王军平, 等. 新型升血小板因子静脉注射在小鼠体内的靶向性实验研究[J]. *重庆医学*, 2006, 35(18): 1679.
- [12] 邵波, 艾国平, 王军平, 等. 新兴升血小板因子的免疫原性实验研究[J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(6): 471.
- [13] Frederickson S, Renshaw MW, Lin B, et al. A rationally designed agonist antibody fragment that functionally mimics thrombopoietin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 14307.
- [14] Wang B, Nichol JL, Sullivan JT. Pharmacodynamics and

- pharmacokinetics of AMG 531, a novel thrombopoietin receptor ligand[J]. Clin Pharmacol Ther, 2004, 76: 628.
- [15] Bussel J, Kuter DJ, George JN, et al. Effect of a thrombopoiesis-stimulating protein (AMG-531) in chronic immune thrombocytopenic purpura [J]. N Engl J Med, 2006, 355: 1.
- [16] Broudy VC, Lin NL. AMG531 stimulates megakaryopoiesis in vitro by binding to Mpl[J]. Cytokine, 2004, 25: 52.
- [17] Kuter DJ, Bussel JB, Senecal FM, et al. Evaluation of AMG 531 in nonsplenectomized patients with chronic immune thrombocytopenic purpura in a randomized placebo-controlled phase 3 study[J]. Blood, 2007, 110: 173a.

- [18] Gersheimer TB, Pullarkat V, Senecal FM, et al. Evaluation of AMG 531 efficacy in splenectomized patients with chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP) in a randomized placebo-controlled phase 3 study[J]. Blood, 2007, 110: 8a.
- [19] Bussel JB, Kuter DJ, de Wolf JT, et al. Long-term dosing of AMG 531 in thrombocytopenic patients with immune thrombocytopenic purpura: 2-year update [J]. Blood, 2007, 110: 174a.

(收稿日期: 2009-02-09 修回日期: 2009-04-14)

· 综 述 ·

胃癌转移机制研究新进展

王肖泽 综述, 王继见[△] 审校

(重庆医科大学附属第二医院普外科 400010)

关键词: 胃癌; 转移; 侵袭

中图分类号: R735.2; R73-37

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)04-0479-03

胃癌是世界上最高发肿瘤之一^[1], 晚期转移是胃癌患者死亡的主要原因, 针对转移的具体机制国内外做了大量研究, 总的来说肿瘤转移及侵袭可定义为恶性肿瘤细胞脱离原发灶, 通过直接蔓延, 血液循环或淋巴系统等播散到其他部位, 形成具有同原发病灶相同特性的新病灶。这是一个复杂过程并涉及多个基因的变化, 包括肿瘤细胞从原发灶脱落, 突破周围基质屏障, 侵入血管或淋巴管, 迁移、黏附于适宜部位, 诱导肿瘤血管形成, 逃避宿主抗肿瘤反应和对抗宿主抗肿瘤免疫, 最终在远处形成转移灶, 并具有原发灶组织细胞的一定特性等。针对各个环节, 近年来学者们做了大量研究, 以期阐明胃癌转移及侵袭的具体机制及相关因素, 以便针对各个环节采取一些相关措施预防及治疗胃癌, 降低胃癌转移及复发率, 提高患者生存率。现将最近大量有关胃癌转移机制的研究进展及成果综述如下。

1 癌细胞突破基底膜的相关因素

1.1 基质金属蛋白酶(MMPs) MMPs 最早由 Jerome Gross 和 Charles Lapiere (1962 年) 在观察蝌蚪尾巴退化过程中三股落选胶原降解时提出, 是一类锌依赖性核酸内切酶, 由前导区、催化区及铰链区三组肽链组成^[2]。MMPs 能降解血管基底膜和上皮细胞外基质, 使上皮细胞从血管壁上脱落, 形成新生血管, 促进肿瘤生长、浸润与转移, 故抑制 MMPs 能抑制肿瘤血管生成。有资料表明 MMPs 与 MMPs 抑制剂的产生与激活失衡是肿瘤侵袭、转移的关键^[3]。

1.2 肝素酶(Hpa) Hpa 最初是在鼠转移性 B16 黑色素瘤细胞中发现的一种能够降解硫酸乙酰肝素(HS)的糖苷内切酶, 并将之命名为 heparanase(HS)。HS 是糖胺聚糖(GAG)家族中的一个成员, 是一种线性多聚糖, 几条 HS 链与核心蛋白共价结合组成 HSPGs。HSPGs 是一类广泛存在于细胞表面、细

胞外基质(ECM)和 BM 中的糖蛋白。HSPGs 不仅与维持 BM 和 ECM 的完整性、膜的稳定性和屏障功能有关, 其功能还牵涉到细胞的黏附、转移、分化和增殖。与结构蛋白如纤维连接蛋白、胶原蛋白相互结合, 构成细胞外基质的框架, 维持细胞膜的稳定性和完整性; 其他如细胞因子、脂蛋白、蛋白酶等, 多黏附于细胞表面和 ECM 中, HS 能调节这些分子的生物学活性, 保护其免受蛋白水解酶的裂解和灭活。近年来多名学者对其进行了研究, 发现在胃癌组织中呈高表达, 并充分证实了它与胃癌发生与转移高度关联。

2 胃癌细胞的黏附作用机制

2.1 大量研究表明整合素家族在胃癌的转移中起至关重要的作用。整合素 B1 的表达与胃癌细胞的分化程度、侵袭性以及淋巴转移有关。胃癌细胞中整合素 B1 的表达明显强于邻近正常胃黏膜, 并且分化较差者和穿透浆膜层者分别强于分化较好者和未穿透浆膜层者。首先整合素使胃癌同质性黏附下降。同质性黏附是指同种细胞与细胞之间的黏附, 主要由存在于表面的黏附分子(CAM)所介导。同质性黏附下降促使肿瘤细胞易于从瘤体上脱落。Jin 等^[4]通过实验发现刺激整合素 B1 能降低同质性胃癌细胞上的 ICAM-1 表达, 使同质性胃癌细胞间黏附能力下降, 有利于其进入血流后形成细胞团, 抵御免疫细胞的杀伤。其次整合素使胃癌异质性黏附增强, 异质性黏附是指肿瘤细胞与宿主非肿瘤细胞之间的黏附。整合素分子细胞主要是通过识别并结合 ECM 配体上特殊氨基酸片段来介导细胞与细胞和细胞与基质间的黏附, 从而导致肿瘤与周围组织黏附。有研究显示细胞表面蛋白多糖作为 ECM 的黏附受体参与了这种细胞与基质的相互作用, 而整合素是主要介导者^[5]。

2.2 Tamura 和 Denen^[6]利用细胞株研究了 PTEN 和 FAK 在

[△] 通讯作者, E-mail: wjj1963@163.com。