

基质衍生的血管生成抑制剂研究进展 *

刘 锦 孙 立 袁胜涛[△]

(中国药科大学新药筛选中心 江苏 南京 210009)

摘要 血管的生成与肿瘤密切相关,抑制肿瘤血管生成可以调节肿瘤的生长。体内存在着内源性的促血管生成因子和抑制因子的平衡,当促血管形成因子增强就会产生新生血管供肿瘤生长,而当抑制因子增强则会抑制肿瘤的生长。本文即对细胞外基质衍生的内源性血管生成抑制因子 TSP、内皮他丁、Arresten、Canstatin、Endorepellin、Fibulin、Tumstatin 等的特性、应用和作用机制等作一总结。

关键词 肿瘤血管生成 细胞外基质 抑制因子

中图分类号 R730.231 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)05-978-04

The development of Matrix-derived Angiogenesis inhibitor*

LIU Jin, SUN Li, YUAN Sheng-tao[△]

(New drug screening center of China Pharmaceutical University, Nanjing, 210009, China)

ABSTRACT: Angiogenesis is closely related with tumor, inhibit tumor angiogenesis could regulate tumor growth. There is a balance between pro-angiogenesis and antiangiogenesis, when the pro-angiogenesis express amount, would generate new blood vessel for tumor growth, while antiangiogenesis would inhibit tumor growth. We now have a summary with the characteristics, applications and mechanisms of matrix-derived endogenous inhibitors of angiogenesis such as TSP, Endostatin, Arresten, Canstatin, Endorepellin, Fibulin, Tumstatin and so on.

Key words: Tumor Angiogenesis, ECM, Inhibitor factor

Chinese Library Classification(CLC): R730.231 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)05-978-04

血管生成是指从已经存在的血管通过发芽、桥联或套叠的方式生长出新血管的过程, 1971 年 Folkman^[1]首先观察到当肿瘤体积超过 1~2mm³, 需要形成新血管才能继续生长, 提出通过调控血管生成控制肿瘤生长的假说。Folkman 建立了一个理论, 即实体瘤占有了多数活跃的肿瘤细胞想拥有的有限的资源, 增加的肿瘤间质压力也抑制了对于肿瘤细胞至关重要的代谢物和营养物质的扩散。这种环境引起肿瘤细胞诱导既定的血管芽殖出新的脉管系统, 从而创造出肿瘤的血管系统, 以保证肿瘤细胞能够获得足够的氧和营养物质后得以生长和扩增^[2]。后来, Hanahan 等提出的“血管生成的开关假设”认为, 肿瘤血管形成过程受到开关的调节, 当血管形成因子的浓度上升或抑制因子浓度下降, 血管生成开关处于开放状态, 新生血管大量形成, 肿瘤则持续生长^[3]。因此, 破坏血管生成在癌症研究中占据重要的地位。内源性的血管生成抑制因子是体内形成的一类抑制血管形成的蛋白质或蛋白质碎片, 由于其靶向性强, 抗原性弱, 有着比人工血管生成抑制剂更好的优势。多数内源性的血管生成抑制因子是细胞外基质(ECM)分子的碎片, 这些碎片经细胞外基质和血管基底膜蛋白质的酶解而释放, 如基质金属蛋白酶(MMPs)、组织蛋白酶类和弹性蛋白酶^[4]。ECM 蛋白酶解片段的一系列分子已成为一个重要的调节肿瘤血管生成的途

径, 本文即对细胞外基质衍生的内源性血管生成抑制因子的性质、作用作一综述。

1 血小板反应素(TSP)

TSP-1 是第一个发现的抑制血管生成的天然产物, 它是一种 450kD 的三聚体肝素结合蛋白, 储存在细胞外基质中, 可以抑制不同组织血管内皮细胞的增殖^[5]。

TSP-1 的抗血管生成作用是通过拮抗血管内皮生长因子(VEGF)来实现的, 它可以通过抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的激活, 从而抑制了细胞外基质 VEGF 的活化^[6]。另外, TSP-1 还介导了对于 VEGF 的吸收和清除^[7]。Zhang^[8]等研究发现, TSP-1 基因缺失的大鼠 VEGF 受体 2 的磷酸化以及 VEGF 引起的血管通透都显著降低, 而用 TSP-1 复合物治疗野生型大鼠时, VEGF 受体 2 的磷酸化以及 VEGF 引起的血管通透也显著降低, 且 TSP-1 受体 CD36 与 $\beta 1$ 整合蛋白与 VEGF-R2 结合而发挥作用。据此推测, 内皮细胞膜上有一个平台同时集合着对于血管生成有利和不利信号通路, 而这个复杂的系统具有分子开关的作用, 调节着血管的生成和内皮细胞的行为。而 Sukhbir 等证实, TSP-1 抑制 VEGF-R2 就是通过其受体 CD47 抑制 NO 信号通路, 进而影响 VEGF-R2, 达到对其

* 基金项目 国家自然科学基金(81071841), 十一五科技重大专项 重大新药创制(NO.2009zx09302-002);

抗肿瘤转移候选药麦冬皂苷 DT-13 的研究(NO.2009zx09103-308)

作者简介 刘锦(1984-) 女, 硕士研究生, 研究方向 肿瘤药理学, E-mail liujin1130@hotmail.com

[△]通讯作者 袁胜涛 男, 博士, 副研究员 E-mail yuanst2@yahoo.com.cn

(收稿日期 2010-11-19 接受日期 2010-12-13)

的抑制作用^[9]。在肿瘤细胞生长、生成血管之前,有一个浸润、转移的过程。TSP-1 同样作用于肿瘤细胞浸润的过程。肿瘤细胞通过金属蛋白酶类(MMPs)侵入基底膜和其他潜在的连接组织进入小血管脉管和淋巴结,产生聚集。研究证实,TSP-1 可以上调 MMP-1 和 MMP-9 的水平^[10]。但 Anitha^[11]等用 TSP-1 作用于人乳腺癌和前列腺癌的细胞系时发现 TSP-1 可以显著增加人乳腺癌和前列腺癌细胞中金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)的表达,而且随着 TSP-1 浓度的增加,其表达也会增加。推断 TSP-1 应该是通过控制 MMPs 和其抑制剂 TIMPs 的平衡从而达到作用于肿瘤细胞浸润的。生长抑素受体 2(sst2)在胰腺癌发生时被其配体激动而产生抑制肿瘤的作用,其机制就是通过 P13K 途径增加了 TSP-1 的分泌。鸡绒毛尿囊膜体外实验表明,TSP-1 是 sst2 肿瘤抑制和抗血管生成的最关键因素,TSP-1 抑制肿瘤细胞诱导的血管新生是由于直接隔离血管生成因子 VEGF,同时钝化内皮细胞 VEGF-R 磷酸化引起的血管新生^[12]。同时,TSP-1 可以作为肿瘤预后的诊断标志,TSP-1 的阳性表达在侵袭性的胰管内乳头状粘液性肿瘤(IPMN)中远远高于非侵袭性 IPMN,因此,间质 TSP-1 表达可以作为 IPMN 的预后诊断指标^[13]。粘液性表皮癌患者的 TSP-1 水平与临床表现是相关的,病人有高的 TSP-1 阳性表达,就有更高的存活机会^[14]。

TSP-2 是 TSP 家族的一种,它可以抑制内皮细胞的迁移和脉管的形成,同时可以通过自身结构中 N 末端 80kD 的片段增加内皮细胞特异性的细胞凋亡^[15]。它通过与 CD36 受体的相互作用以及极低密度脂蛋白(VLDL)受体介导抗血管生成作用^[16]。TSP-2 有着比 TSP-1 更好的抗肿瘤血管生成活性,对于乳腺癌的生长及转移均具有很好的抑制作用^[17]。

2 内皮他丁

内皮他丁(Endostatin)是 O'Reilly1997 年从血管内皮细胞瘤分离纯化的一种血管生成抑制剂,它是一个 20-22kD 的胶原蛋白 18 的 C 末端片段^[18]。内皮他丁可以抑制血管内皮细胞的增殖和迁移,诱导细胞凋亡以及内皮细胞在 G1 期的阻滞。

内皮他丁抗血管生成主要是抑制了 MMP-2 的活性,从而阻止了 VEGF165 和 VEGF121 与 VEGF 受体 2 的结合;还可以稳定细胞与细胞间、细胞与基质的粘附力,阻止了这些节点的松弛,这是血管生成所需要的条件^[19]。整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 也是内皮他丁的一个靶点,内皮他丁可以竞争性地抑制乳腺癌细胞与腹膜壁的结合和肿瘤细胞的扩散,同时可以增加腹膜内表达内皮他丁的几率来降低复发^[20]。在抑制肿瘤的生长方面,当内皮他丁与化疗药物 5-FU、甲氨蝶呤、环磷酰胺等合用治疗人 QGY 肝肿瘤和大鼠 H22 肝肿瘤时,效果会优于单用其中的一种药物^[21]。Gaelle^[22]等用致癌剂诱导可以超表达内皮他丁的转基因 J4 小鼠产生皮肤瘤,但与对照组相比,J4 小鼠皮肤瘤的发病率并没有降低,也未见乳头瘤向恶性鳞状细胞癌转化率有差异。但是,在早期皮肤癌的发展过程中,伴随着内皮他丁浓度的上升,乳头状瘤和鳞状细胞癌淋巴管有显著的减少,对 J4 小鼠淋巴结转移也有抑制作用。进一步研究表明,肿瘤浸润肥大细胞会大量表达 VEGF-C,而这些细胞的蓄积在 J4 小鼠的肿瘤中却显著地下降。而且内皮他丁可以在体外抑制大鼠 MC/9 细胞

在纤维连接蛋白的附着和迁移。因此,表明内皮他丁可以通过抑制肥大细胞的附着和迁移降低肿瘤 VEGF-C 的水平从而抑制淋巴管,同时也可以看出内皮他丁的生物学效应不仅仅局限在内皮细胞,它还可以调节与肿瘤相关的炎症、分化。Tatyana^[23]等观察到,当细胞表达过多的雄激素(AR)受体时,内皮他丁就会显著地降低生长因子、酪氨酸激酶和蛋白酶,认为这个下调效应是由 Ras 和 RhoA 通路以及 AR 独立的 MAPK/ERK 通路介导的。肿瘤血管的生成的调节是刺激因子和抑制因子的一种平衡,所以在作为血管抑制因子的内皮他丁也可以作为肿瘤病人的诊断标志。KIM 等^[24]就利用免疫组化法检测出骨肉瘤(OSA)病人的内皮他丁表达会增加,可以把内皮他丁作为 OS-A 预后诊断标准之一。目前已有重组体的内皮他丁用于治疗肿瘤血管生成,但其半衰期较短,使用不便,Jing^[25]等用腺病毒编码内皮他丁和绿色荧光蛋白(EGFP)转染到间质干细胞(MSC)成为 MSC-EN 细胞,MSC-EN 细胞和肿瘤细胞 SKOV3 共同培养 48 小时,与对照组细胞发生迁移相比,MSC-EN 细胞分泌内皮他丁使一部分肿瘤细胞凋亡,绝大多数肿瘤细胞则聚集在 G0/G1 期,表明利用 MSC 可以大量的分泌内皮他丁用于治疗肿瘤。

3 Arresten

Arresten 是源于 I 型胶原非胶原区 $\alpha 1$ 链的羧基末端的一个 26kD 的分子^[26]。它能特异性的抑制内皮细胞的增殖和迁移,诱导内皮细胞的凋亡,阻滞内皮细胞管腔化和新生血管生成;抑制血管成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)依赖的细胞增殖和内皮管形成,在小鼠转移瘤模型中,抑制 VEGF 激动引起的血管生成以及肿瘤生长、迁移^[27,28]。

龙森云^[29]等用脂质体将 Arresten 基因转染对人结肠癌 LO-VO 细胞形成的裸鼠实验性结肠癌肝转移,结果显示有明显的抑制作用。这些结果表明,Arresten 因子在体外可以通过减少抗凋亡因子 Bcl 家族的 Bcl-1 和 Bcl-xL 增加内皮细胞的凋亡。尽管体外实验发现 Arresten 的促凋亡作用为内皮细胞专有,但在肿瘤小鼠模型中,Arresten 在内皮细胞及肿瘤细胞中均发挥此作用,抑制肿瘤细胞的凋亡应该是由抑制肿瘤生长而产生的间接效应。Arresten 通过 $\alpha 1 \beta 1$ 整合素与微血管内皮细胞连接,整对新生血管基质层和缺乏 $\alpha 1$ 整合素的微血管内皮细胞 Arresten 无诱导凋亡的作用,在敲除了 $\alpha 1$ 受体的肿瘤鼠模型中,宿主内皮细胞没有整合素 $\alpha 1$ 表达,Arresten 也不能发挥抑制肿瘤作用^[30]。Arresten 还可以通过抑制 MMP-2 的激活,抑制碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)诱导的小鼠视网膜内皮细胞的增殖、迁移^[31]。

4 Canstatin

Canstatin 是 I 型胶原 $\alpha 2$ 链的一个 26kD 的分子,它在体外表现出抗血管生成的作用,抑制内皮细胞的增殖、迁移,在体内则可以减少异种移植肿瘤在小鼠体内的增殖^[32]。

He^[33]等用 Canstatin 治疗移植胰腺癌的裸鼠,Canstatin 组的肿瘤瘤体积与对照组相比显著减小,对肿瘤的抑制作用在一定范围内呈剂量依赖性。对于口服鳞状表皮癌模型,Canstatin 可以使瘤体积与正常组相比减小 44%^[34]。郑香伟^[35]用 Canstatin

基因治疗人食管鳞状细胞癌移植瘤裸鼠模型 6 天的抑瘤率达到了 61% ,Canstatin 通过增加肿瘤组织中细胞凋亡蛋白酶 -3(caspase-3)的表达加速了肿瘤细胞的凋亡 ,通过抑制内皮细胞生长因子 -1(Flk-1)和 VEGF 降低了微血管密度。

5 Tumstatin

Tumstatin 是 Ⅰ型胶原 $\alpha 3$ 链的 C 端非胶原区域 1(NCI)的一个 28kD 的分子 ,它可以诱导增殖内皮细胞的凋亡^[36]。

Tumstatin 的活性部位是位于 54-132 氨基酸区域的 Tum-5 , Tum-5 可以抑制基质胶内皮管聚集、诱导内皮细胞在 G1 期静止 ,还可以抑制裸鼠人前列腺癌细胞的增殖和血管生成^[37]。YANG[38]等认为 ,超表达的 Tumstatin 使血管内皮细胞停留在 G1 期是因为其降低了细胞周期蛋白 D1(cyclin D1)的表达 ,且使用 Tumstatin 的基因疗法治疗肿瘤是一个很好的策略。Hans^[39]等研究表明 ,Tumstatin 是通过 $\alpha v\beta 3$ 整合素连接到内皮发挥抗血管生成作用 ,不作用于 VEGF 受体 ,当合用 VEGF 受体抑制剂时会增强抗肿瘤作用。

6 Endorepellin

Endorepellin 是源于基底膜蛋白多糖羧基末端层粘连蛋白样区域的 85kD 的类肝素硫酸蛋白聚糖 ,它可以有效地抑制内皮细胞迁移和血管生成^[40]。

Gregory^[41]等用 Endorepellin 对鳞状癌小鼠和肺癌小鼠全身给药 ,Endorepellin 可以通过 $\alpha 2\beta 1$ 整合素共定位与血管周围 ,特异性地作用于肿瘤脉管系统产生抗肿瘤血管生成的作用 ,且 Endorepellin 在体外对于正常的以及肿瘤细胞衍生的内皮微血管形态发生都具有抑制作用。另有研究发现^[42] ,caspase-3 的激活可以触发组织蛋白酶 L(CathL)裂解出 EndorepellinC 的末端片段 (LG3) ,LG3 可以增加 Bcl-xL 的表达而产生抗内皮细胞凋亡的作用 ,加速内皮细胞的增殖、迁移。

7 其他

纤维连接蛋白的片段 anastellin 可以抑制移植肿瘤在小鼠体内的转移 ,减少肿瘤细胞的增殖和血管生成^[43]。在肿瘤血管生成时会大量表达纤维连接蛋白的受体 $\alpha 5\beta 1$,抑制 $\alpha 5\beta 1$ 在体外可以抑制内皮细胞功能 ,在体内则具有抗肿瘤血管生成作用^[44]。

8 小结

内源性的血管生成抑制因子是维持血管生成平衡的重要因素 ,在生理和病理上都影响着新生血管的形成。在过去 30 年内很多的促血管生成因子以及抗血管生成因子被发现 ,它们共同构成了人们认为的“血管生成的鸡尾酒”^[45]。当用血管生成抑制剂和抗肿瘤病毒药在临床上合用时 ,会大大降低化疗药的副作用 ,同时能更好地抑制肿瘤生长、扩散 ,延长病人的生命。以上这些基质衍生的分子在都具有抑制血管生成的作用 ,对于此类新药的开发可以有两个方向 ,一是对上述小分子结构进行修饰 ,使其能成为药物级蛋白质 ,利于病人的吸收。二是对这些抑制因子的作用机制进行更深入的研究 ,发现更多诱导增加这些内源性因子的释放的因素。

参考文献(References)

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis :therapeutic implications [J].New England J Med, 1971,285(21):1182-1186
- [2] R. K. Jain.Transport of molecules in the tumor interstitium:a review [J].Cancer Research, 1987,47(12): 3039-3051
- [3] Moserle L,Amadori A,Indraco S. The angiogenic switch: implications in the regulation of tumor dormancy[J].Curr Mol Med, 2009,9(8):935-941
- [4] Sund M, Xie L, Kalluri R.The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to mechanics of tumor angiogenesis[J].APMIS,2004,112(7-8): 450-462
- [5] Taraboletti G, Roberts D, Liotta LA, Giavazzi R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor[J].J Cell Biol,1990,111(8):765-72
- [6] Rodriguez-Manzanque, J. C., Lane, T. F,et al.Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor[J].Proc. Nat. Acad. Sci., 2001, 98(22): 12485-12490
- [7] Greenaway, J., Lawler, J., Moorehead, R, et al. Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1)[J].J. Cell.Physiol.,2007,210(3):807-818
- [8] Xuefeng Zhang, Shideh Kazerounian, Mark Duquette, et al. Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level [J]. The FASEB Journal,2009,23(10): 3368-3376
- [9] Sukhbir Kaur,Gema Martin-Manso,Michael L. Pendrak,et al.Thrombospondin-1 inhibits vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47 [J].2010,285(46): 1-11
- [10] Qian, X.Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells.Exp. Cell Res,1997,235(33):403-412
- [11] Anitha S. John, Xioulung Hu,Vicki L. Rothman,et al. Thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) production in human tumor cells: Exploring the functional significance in tumor cell invasion [J]. Experimental and Molecular Pathology,2009,87(3):184-188
- [12] Hanane Laklai,Severine Laval, Laurent Dumartin,et al.Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer[J].Cell Biology,2009,106(42): 17769-17774
- [13] Ken-Ichi Okada, Kenichi Hirabayashi, Toshihide Imaizumi,et al. Stromal thrombospondin-1 expression is a prognostic indicator and a new marker of invasiveness in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas[J]. Biomedical Research,2010,31(1):13-19
- [14] S. Yang, L.-J. Guo, X.-F. Tang, K. Tan,et al. The alteration of Id-1 and TSP-1 expression in mucoepidermoid carcinoma associated with its clinical features and prognosis [J].Int J Oral Maxillofac. Surg, 2010,39(10):29-35
- [15] Noh YH, Matsuda K, Hong YK, Kunstfeld R,et al.An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration

- in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo [J]. *J Invest Dermatol*, 2003, 121(6): 1536-1543
- [16] Paul Bornstein. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis[J]. *J Cell Commun. Signal*, 2009, 3(3-4): 189-200
- [17] Manuel Koch, Fadi Hussein, Andreas Woeste, et al. CD36-mediated activation of endothelial cell apoptosis by an N-terminal recombinant fragment of thrombospondin-2 inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2010, 124(1): 1-10
- [18] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell*, 1997, 88(2): 277-285
- [19] Domenico Ribatti. Endogenous inhibitors of angiogenesis A historical review[J]. *Leukemia Research*, 2009, 33(5): 638-644
- [20] Yumi Yokoyama, Gerald Sedgewick, S. Ramakrishnan. Endostatin Binding to Ovarian Cancer Cells Inhibits Peritoneal [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(22): 10813-10822
- [21] Li-Ping Zhu, Jing Xing a, Qing-Xiao Wang, et al. Therapeutic efficacy of recombinant human endostatin combined with chemotherapeutics in mice-transplanted tumors [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2009, 617(1-3): 23-27
- [22] Gaele Brideau, Markus J. Makinen, Harri Elamaa, et al. Endostatin Overexpression Inhibits Lymph angiogenesis and Lymph Node Metastasis in Mice[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(24): 11528-11535
- [23] Tatyana Isayeva, Lakisha D. Moore, Diptiman Chanda, et al. Tumor-istatic Effects of Endostatin in Prostate Cancer Is Dependent on Androgen Receptor Status[J]. *The Prostate*, 2009, 69(3): 1055-1066
- [24] HYUN-SOO KIM, SUNG-JIG LIM, YONG-KOO PARK. Anti-angiogenic factor endostatin in osteosarcoma[J]. *APMIS*, 2009, 117(10): 716-23
- [25] Jing Jiang, Wei Chen, Rujin Zhuang, et al. The effect of endostatin mediated by human mesenchymal stem cells on ovarian cancer cells in vitro[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(6): 873-881
- [26] Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, et al. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(9): 2520-2526
- [27] Sundaramoorthy M, Meiyappan M, Todd P, et al. Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 31142-31153
- [28] Sudhakar A, Nyberg P, Keshamouni VG, Mannam AP, et al. Human alpha1 type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by alpha1 beta1 integrin[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115: 2801-2810
- [29] Long MY, Li HH, Xu JY, et al. Inhibitory effects of transfection of arrestin gene on liver metastasis from colorectal cancer in nude mice[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2008, 27(10): 1039-1043
- [30] Nyberg P, Xie L, Suqimoto H, et al. Characterization of the anti-angiogenic properties of arrestin Suoazill beta1 integrin-dependent collagen-derived tumor suppressor [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(18): 3292-3305
- [31] Chandra Shekar Boosani, Narasimharao Nalabothula, Nader Sheibani, et al. Inhibitory Effects of Arrestin on bFGF-induced Proliferation, Migration, and Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Mouse Retinal Endothelial Cells [J]. *Current Eye Research*, 2010, 35(1): 45-55
- [32] Kamphaus GD, Colorado PC, Panka H, Hopfer H, et al. Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(2): 1209-1215
- [33] Xiao-Ping He, Zhao-Shen Li, Ren-Min Zhu, et al. Effects of recombinant human canstatin protein in the treatment of pancreatic cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(41): 6652-6657
- [34] Jeon Hwang-Bo, Ki Hyun Yoo, Han-Sin Jeong, et al. Recombinant canstatin inhibits tumor growth in an orthotopic AT-84 oral squamous cell carcinoma model [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(2): 189-194
- [35] Xiang-wei Zheng, Yin Li, Fu-Ai Tang, et al. In vivo antitumor effect of canstatin gene on human esophageal carcinoma xenografts in nude mice[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2009, 28(4): 350-355
- [36] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane[J]. *J Biol Chem* 2000, 275(28): 21340-21348
- [37] Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, et al. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin[J]. *J Biol Chem* 2001, 276(18): 15240-15248
- [38] YANG Ya-pei, XU Chun-xiao, HOU Guo-sheng, et al. Effects of eukaryotic expression plasmid encoding human tumstatin gene on endothelial cells in vitro[J]. *Chinese Medical Journal*, 2010, 123(16): 2269-2273
- [39] Hans Petter Eikesdal, Hikaru Sugimoto, Gabriel Birrane, et al. Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity [J]. *PNAS*, 2008, 105(39): 15040-15045
- [40] Mongiat M, Sweeney SM, San Antonio JD, Endorepellin, et al. A novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(6): 4238-4249
- [41] Gregory Bix, Remedios Castello, Michelle Burrows, et al. Endorepellin In Vivo: Targeting the Tumor Vasculature and Retarding Cancer Growth and Metabolism [J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2006, 98(22): 1634-1646
- [42] Jean-François Cailhier, Isabelle Sirois, Patrick Laplante, et al. Caspase-3 Activation Triggers Extracellular Cathepsin L Release and Endorepellin Proteolysis [J]. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2008, 283(40): 27220-27229
- [43] Yi M, Ruoslahti E. A bronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis and metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 620-624
- [44] Lee BH, Ruoslahti E. Alpha 5beta1 integrin stimulates Bcl-2 expression and cell survival through Akt, focal adhesion kinase, and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(6): 1214-1223
- [45] Thomas M. Mundel, Raghu Kalluri. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors [J]. *Microvascular Research*, 2007, 74(2-3): 85-89