

PL2 การรักษาโรคมะเร็งด้วยวิธียับยั้งการสร้างเส้นเลือด

รองศาสตราจารย์นายแพทย์ นรินทร์ วรวิทย์

หน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาของอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนที่จำเป็นในการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของโรคมะเร็งคือการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดมาเลี้ยงก้อนมะเร็ง¹⁻³ มะเร็งที่มีขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร สามารถรับสารอาหาร และออกซิเจนโดยวิธีซึมผ่าน (diffusion) มาจากเส้นเลือด ของสารเหล่านี้โดยตรงแต่ มะเร็งมีขนาดโตกว่า 0.5 มิลลิเมตร อยู่ไกลเกินกว่าที่สารอาหารจะซึมผ่านมาถึงเซลล์มะเร็งได้จึง ต้องอาศัยเส้นเลือดและเซลล์เยื่อบุผนังเส้นเลือด (endothelial cell) ในการส่งผ่านสารอาหารและ ออกซิเจนมาสู่เซลล์มะเร็ง² ขบวนการสร้างเส้นเลือดประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ หลายขั้นตอนที่เป็นอิสระต่อกันและต่อเนื่อง เริ่มต้นจากการทำลายชั้นพื้นฐาน (basement membrane) ที่ล้อมรอบเส้นเลือดจิว (capillaries) ติดตามด้วยการลุกลามของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดเข้าไปใน เนื้อเยื่อ (stroma) เมื่อได้รับสัญญาณกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดการเดินทางของเซลล์เยื่อบุผนัง หลอดเลือดรวมกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ดังกล่าว และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลายเป็น เส้นเลือดใหม่ที่เชื่อมต่อกันเป็นร่างแห เพื่อนำสารอาหารและออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์มะเร็งในที่สุด

สารช่วยสร้างและยับยั้งการสร้างเส้นเลือด

จุดเริ่มต้นของการสร้างเส้นเลือดเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสมดุลระหว่างสารช่วย สร้างและสารที่ยับยั้งการสร้างเส้นเลือด^{1,5} (ตารางที่ 1) สารเหล่านี้กระตุ้นขบวนการสร้างเส้นเลือด หลายขั้นตอนและอาจมีผลต่อการทำงานของเซลล์หลายชนิดไม่จำกัดเฉพาะเซลล์ที่สร้างเส้นเลือด เท่านั้น นิยามที่เหมาะสมสำหรับสารช่วยสร้างเส้นเลือดคือปัจจัยที่ออกฤทธิ์จำเพาะในการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์บุผนังหลอดเลือดและโครงสร้างของเส้นเลือด ได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ของเส้นเลือด และเซลล์ pericytes เป็นต้น แต่ไม่มีผลต่อหน้าที่ของเซลล์อื่นๆ

ปัจจัยกระตุ้นการเจริญเติบโตและการซึมซาบของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (vascular endothelial grow factor-vascular permeability factor, VEGF/VPF) ค้นพบครั้งแรกในสารที่ หลั่งจากเซลล์มะเร็งในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์และน้ำในช่องท้อง (ascitic fluid) ในร่างกาย⁶ เป็น โปรตีนที่จับกับเฮพาริน (heparin-binding protein) มีขนาดอนุ 34 ถึง 42 กิโลดาลตัน เรียก ชื่อย่อว่า VPF ต่อมาพบว่าสาร VPF นี้สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์บุผนังหลอดเลือดได้ มีผู้ค้นพบโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์บุผนังหลอดเลือดที่เพาะเลี้ยงและมีฤทธิ์ที่จำเพาะในการกระตุ้น การแบ่งเซลล์บุผนังหลอดเลือด เรียกชื่อย่อว่า VEGF^{8,9} เมื่อเปรียบเทียบวิเคราะห์กรดอะมิโน

และลำดับของดีเอ็นเอของ VEGF และ VPF พบว่าเป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน¹⁰ ต่อมานิยมเรียกปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดชนิดนี้ว่า VEGF มากกว่าชื่อ VPF

VEGF เป็นกลัยโคโปรตีนที่จับกับเฮพารินเป็น Homodimer มีโครงสร้าง (isoform) อย่างน้อย 4 ชนิด ขึ้นอยู่กับการสลับลำดับ (alternative splicing) ของ messenger RNA (mRNA) ระหว่างการถ่ายทอดรหัส (transcript) ในการสร้างโปรตีน โปรตีน 4 รูปแบบที่พบคือ VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ และ VEGF₂₀₅ ตามจำนวนกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของโปรตีน¹⁰ การกระตุ้นการซึมซาบผ่านผนังเส้นเลือด (vascular permeability) โดย VEGF แรงเป็น 50,000 เท่าของสารฮีสตามีนซึ่งเป็นสารมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบการซึมซาบ (permeability)¹¹ การกระตุ้นการซึมซาบโดย VEGF ช่วยให้โปรตีนซึมผ่านจากเส้นเลือดไปสู่เนื้อเยื่อโดยรอบ (interstitium) ซึ่งเซลล์บุผนังหลอดเลือดเคลื่อนที่ไป ในระหว่างการสร้างเส้นเลือด

ตารางที่ 1 Proangiogenic Growth Factors

Factor	Receptor
Vascular endothelial growth factor vascular permeability factor ¹⁴	Flk-1/KDR (VEGFR-2), Flt-1 (VEGFR-1) (both present on activated endothelium)
Placental growth factor ¹⁴⁹	Flt-1 (VEGFR-1)
Basic fibroblast growth factor ^{149,150} (bFGF/FGF-2)	FGF-R1-4
Acidic fibroblast growth factor ^{149,150} (aFGF/FGF-1)	FGF-R1-4
Fibroblast growth factor3 ^{149,150} (FGF-3/int-2)	FGF-R1-4
Fibroblast growth factor4 ^{149,150} (FGF-4/hst/K-FGF)	FGF-R1-4
Transforming growth factor- α ¹⁵¹ (TGF- α)	Epidermal growth factor-R
Edidermal growth factor ¹⁵² (EGF)	Epidermal growth factor-R
Hepatocyte growth factor/scatter factor ¹⁵³ (HGF/SF)	C-Met
Transforming growth factor- β ¹⁵⁴ (TGF- β)	Transforming growth factor- β -RI, II, III
Tumor necrosis factor- α ¹⁵⁵ (TNF- α)	TNF-R55
Platelet-derived growth factor ¹⁵⁶	Platelet-derived growth factor-R
Granulocyte colony-stimulating factor ¹⁵⁷	Granulocyte colony-stimulating factor
Interleukin-8 ⁴⁸	Interleukin-8R presence on endothelial cells remains uncertain
Pleiotropin ¹⁵⁸	Proteoglycan
Thymidine phosphorylase (TP)-platelet-derived endothelial cell growth factor ³⁸ (PD-ECGF)	Unknown
Angiogenin ⁴⁷	170-kD angiogenin receptor
Proliferin ¹⁵⁹	Unknown

เซลล์บุผนังหลอดเลือดมีตัวรับ VEGF (VEGF receptor) แต่อาจพบตัวรับ VEGF ในเซลล์ชนิดอื่นๆ ได้บ้างแต่พบเป็นส่วนน้อย ได้แก่ เซลล์ที่เกิดจากเซลล์ประสาท เซลล์มะเร็ง Kaposi's sarcoma เซลล์ตัวอ่อนของเม็ดเลือด^{12,13} ตัวรับ VEGF (VEGFR) มี 3 ชนิด ดังต่อไปนี้

1. (VEGFR-1) (Flt-1 receptor) มีชื่อเต็มว่า fms-like tyrosine kinase receptor เป็นตัวรับที่จับ VEGF/VPF ได้อย่างแน่นหนา ประกอบด้วยส่วนนอกเซลล์ (extracellular domain) ที่มีส่วนคล้ายอิมมูโนโกลบูลิน 7 ส่วน (immunoglobulin-like domain) และส่วนในเซลล์ที่เป็นเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (intracellular tyrosine kinase domain)⁸ Flt-1 receptor มีความสำคัญในการสร้างเส้นเลือด (vasculogenesis) รวมทั้งสรีรวิทยาของการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis)
2. VEGFR-2 (Flk-1/KDR receptor) มีชื่อเต็มว่า fetal liver kinase1/kinase insert domain-containing จับ VEGF/VPF อย่างแน่นหนา เช่นเดียวกัน Flk-1 มีบทบาทสำคัญในการสร้างเส้นเลือดเช่นเดียวกับ Flt-1 receptor แต่มีความสำคัญในการสร้างเส้นเลือดในโรคมะเร็งมากกว่า เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นการทำงานของ VEGF/VPF ได้เต็มที่⁸ สารประกอบหลายชนิดที่พัฒนาขึ้นเพื่อยับยั้งการทำงานของ VEGF/VPF ผ่านทาง Flk/KDR สามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดในสัตว์ทดลองได้¹⁴
3. VEGFR-3 (Flt-4) receptor เป็นตัวรับ (receptor) สำหรับ VEGF-C ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดน้ำเหลือง (lymph angiogenesis)¹⁴

สำหรับ VEGF มีอย่างน้อย 5 ชนิด ประกอบด้วย VEGF-A VEGF-B VEGF-C และ VEGF-D สำหรับ VEGF-A และ VEGF-B มีความสำคัญในการสร้างเส้นเลือดแต่มีหน้าที่อย่างอื่นด้วย ได้แก่ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด^{14,15} VEGF-C เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดน้ำเหลือง (lymph angiogenesis) เมื่อไม่นานมานี้พบว่า VEGF-C เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดของโรคมะเร็งด้วย¹⁶⁻¹⁹ VEGF-C จับกับ VEGFR-3 บทบาทของ VEGF-D ไม่ทราบแน่ชัด แต่โปรตีนนี้อาจจับกับ VEGFR-2 และ VEGFR-3 และกระตุ้นการสร้างเส้นเลือด^{20,21} VEGF-E จับกับ VEGFR-2 และสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์บุผนังหลอดเลือด และการสร้างเส้นเลือด^{22,23}

Angiopoietin (Ang) เป็นอนุที่เกี่ยวกับเซลล์บุผนังหลอดเลือดในการสร้างเส้นเลือด ในปัจจุบันนี้พบ 4 ชนิดคือ Ang-1 Ang-2 Ang-3 และ Ang-4 พบว่า Ang-1 และ Ang-2 จับกับ tyrosine kinase receptor (Tie-2) อย่างจำเพาะที่ผิวของเซลล์บุผนังหลอดเลือด Ang-1 ออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดพัฒนาการของเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell differentiation) และเกิดเสถียรภาพของเซลล์²⁴ (endothelial cell stabilization) ในทางตรงกันข้าม Ang-2 จับกับ Tie-2 receptor และยับยั้งการจับของ Ang-1 กับตัวรับ (receptor) นี้²⁵ การจับกันดังกล่าวนำไปสู่ความไม่มีเสถียรภาพของเซลล์บุผนังหลอดเลือดและเส้นเลือดฝ่อ (vascular regression)²⁶ ถึงแม้จะพบ Tie-1 receptor แล้วก็ตามแต่ยังไม่พบว่าตัวจับ (ligand) ของตัวรับ (receptor) นี้คือสารใด

การศึกษาหน้าที่ของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดทำได้โดยศึกษาในเหล่านีในหนูทดลองเล็กที่ยีนถูกยับยั้งหน้าที่ (knockout mice) ถ้ายับยั้งยีนทั้ง 2 alleles (homozygous knockout) ของยีน VEGF หรือ VEGF receptor พบว่าหนูทดลองเสียชีวิตตั้งแต่เป็นตัวอ่อน (embryo) ในครรภ์²⁷ การวิเคราะห์ในตัวอ่อนที่เสียชีวิตเหล่านี้พบว่าการพัฒนาของเส้นเลือดผิดปกติ ในทำนองเดียวกันยีน Ang-1 Ang-2 Tie-1 และ Tie-2 ทำให้หนูทดลองเสียชีวิตเช่นเดียวกันและการพัฒนาของเส้นเลือดในหนูดังกล่าวผิดปกติ^{28,29} ดังนั้นยีนเหล่านี้มีหน้าที่ในการสร้างเส้นเลือดในภาวะปกติ และน่าจะมียับยั้งบทบาทสำคัญในการสร้างเส้นเลือดในโรคมะเร็งด้วยเช่นกัน

นอกจากนี้ยังมีอีกหลายชนิดที่มีผลไม่เฉพาะต่อการเจริญเติบโตของเซลล์บุผนังหลอดเลือดแต่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์อื่นๆ ด้วย เช่น fibroblast growth factors (FGF) ทั้งชนิด acidic และ basic transforming growth factor- α (TGF- α) epidermal growth factor (EGF) platelet-derived growth factor (PDGF) platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) angiostatin และ CXC chemokines interleukin-8 (IL-8) macrophage inflammatory protein-1 (MIP) platelet factor-4 (PF-4) และ growth-related oncogene- α (GRO- α)³⁰

การสร้างเส้นเลือดเป็นกระบวนการที่สลับซับซ้อนและต่อเนื่อง จากการศึกษาพบว่าขั้นตอนทั้งหมดของการสร้างเส้นเลือดควบคุมโดยปัจจัยสร้างเส้นเลือดหลายชนิดแตกต่างกัน³¹ ตัวอย่างเช่น basic FGF (bFGF) เป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตของเจริญเติบโตบุผนังหลอดเลือดที่แรงที่สุดติดตามด้วย VEGF และ PD-ECGF VEGF และ bFGF เป็นตัวกระตุ้นที่แรงที่สุดในการมีชีวิตรอดของเซลล์บุผนังหลอดเลือด อย่างไรก็ตาม bFGF เป็นตัวกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดร่วมกับการเพิ่มการทำงานของเอ็นซัยม์ย่อยสลายผนังเส้นเลือดและเนื้อเยื่อ hepatocyte growth factor เพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือดมากกว่าปัจจัยอื่นๆ ที่ศึกษา การที่พบว่า Ang-1 และ Ang-2 เกี่ยวข้องกับความมีชีวิตของเซลล์บุผนังหลอดเลือดแสดงว่าน่าจะมียับยั้งบทบาทสำคัญในการอยู่รอดของเซลล์บุผนังหลอดเลือด²⁶

การสร้างเส้นเลือดโดย lymphocyte

การสร้างเส้นเลือดถูกควบคุมโดย lymphoid cells เช่น T lymphocytes macrophages และ mast cells³²⁻³⁵ ปฏิกริยาอักเสบเฉพาะที่จากเซลล์ T lymphocytes และ macrophages มักเกิดร่วมกับโรคมะเร็งเซลล์สีของผิวหนังระยะลุกลาม (invasive cutaneous melanoma) และภาวะการอักเสบที่เป็นมากเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นของการแพร่กระจายโรคมะเร็ง แสดงว่าการสร้างเส้นเลือดที่ถูกกระตุ้นโดยการอักเสบอาจทำให้โรคมะเร็งเซลล์สีลุกลามและแพร่กระจาย

กลไกทางภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดนำไปสู่การหายของบาดแผล³³ การที่ยาเคมีบำบัดทำให้แผลหายช้าอาจเกี่ยวข้องกับการที่ยายับยั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันส่วนที่จะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดหรือไม่นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด³⁶ มีการศึกษา

ถึงความสัมพันธ์ระหว่างผลของภูมิคุ้มกันต่อการสร้างเส้นเลือดและการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในสัตว์ทดลอง พบว่าเซลล์มะเร็งเซลล์สีบี16 (B 16 melanoma) เมื่อนำไปฉีดเข้าในหนูทดลองที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องกลับมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าในหนูปกติ³⁵

การศึกษาพบว่าการศึกษาที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องจะลดการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งและการสร้างเส้นเลือดในหนูทดลองโดยการนำหนูทดลองที่ได้รับยาเคมีบำบัด doxorubicin มาก่อน แล้วฉีดเซลล์ของมะเร็งปอดก่อนฉีดเซลล์มะเร็งพบว่าหนูทดลองดังกล่าวมีก้อนมะเร็งที่เจริญเติบโตไม่ต่างกลุ่มควบคุม³⁵ แม้แต่ในหนูทดลองที่ไม่มีต่อมไทมัส (athymic nude mice) ก็ได้ผลการทดลองแบบเดียวกัน แสดงว่าเส้นเลือดที่สร้างใหม่ในก้อนมะเร็งในหนูทดลองที่ได้รับยาเคมีบำบัด adriamycin มาก่อน และให้เซลล์ของมะเร็งปอดเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกัน แสดงว่าไม่ได้เกิดจาก T lymphocyte โดยตรง การแก้ไขภูมิคุ้มกันบกพร่องจากยาเคมีบำบัด adriamycin โดยให้เซลล์ของมะเร็งปอดในหนูทดลองทำให้การสร้างเส้นเลือดที่ก้อนมะเร็ง B16 melanoma เพิ่มขึ้น ผลการทดลองเหล่านี้กล่าวข้างต้นชี้บ่งว่ายาเคมีบำบัดที่ยับยั้งภูมิคุ้มกันสามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดได้ และสนับสนุนความเชื่อที่ว่ามะเร็งที่กำลังเจริญเติบโตสามารถเปลี่ยนแปลงกลไกการควบคุมการทำงานของร่างกายเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อเซลล์มะเร็งเอง³⁷

บทบาทของเซลล์ปกติที่แทรกซึมปะปนในก้อนมะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์พบการเพิ่มขึ้นของ PD-ECGF โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ macrophages และ lymphocytes ในขณะที่เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่เองกลับพบ PD-ECGF เพียงเล็กน้อย³⁸ ความเข้มข้นของการย้อมติด PD-ECGF ในเซลล์ที่ปะปนกับเซลล์มะเร็งมีความสัมพันธ์กับจำนวนเส้นเลือดที่มาเลี้ยงก้อนมะเร็ง แสดงว่าเซลล์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดของมะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์

เป็นที่ทราบมานานแล้วว่าเซลล์ macrophage เกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือดใหม่^{32,33} โดยมีบทบาทหลายประการต่อการเจริญเติบโตของเส้นเลือดจืดที่เกิดขึ้นใหม่ ดังนี้

1. macrophage สร้างปัจจัยที่กระตุ้นการทำหน้าที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด การศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่า macrophage สร้างปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ และวิวัฒนาการของเซลล์บุผนังหลอดเลือดมากกว่า 20 ชนิด³² และกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดในร่างกาย
2. macrophage ปรับแต่งขบวนการสร้างเส้นเลือดโดยการเปลี่ยนแปลงสารโครงสร้างนอกเซลล์ (extracellular matrix) ส่วนประกอบของสารโครงสร้างนอกเซลล์มีอิทธิพลต่อรูปร่างและลักษณะของเซลล์บุผนังหลอดเลือดและอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของหลอดเลือดจืด³⁹ macrophage ออกฤทธิ์โดยการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของสารโครงสร้างนอกเซลล์ และสร้างเอนไซม์ proteases ย่อยสลายปรับแต่งโครงสร้างและส่วนประกอบของสารโครงสร้างนอกเซลล์³³
3. macrophage สร้างปัจจัยยับยั้งการสร้างเส้นเลือด thrombospondin-1 (TSP-1) เมื่อรักษาด้วยยาป้องกันมะเร็ง retinoic acid³⁹⁻⁴¹

การสร้าง angiostatin โดยเซลล์มะเร็งปอดสาย Lewis Lung Carcinoma⁴² ต้องประกอบด้วยเซลล์ macrophages และการสร้างเอ็นไซม์ metalloproteinase⁴³ ตัวอย่างเช่นถ้าใส่ plasminogen ในเซลล์เพาะเลี้ยง Lewis Lung carcinoma ไม่พบว่ามีการสร้าง angiostatin แต่ถ้าใส่ plasminogen ร่วมกับเซลล์ macrophage ในเซลล์เพาะเลี้ยง Lewis Lung carcinoma จะกีดการสร้าง angiostatin เอ็นไซม์ elastase เพิ่มขึ้นโดย granulocyte-macrophage-stimulating factor (GM-CSF) หลังจากเซลล์มะเร็ง Lewis Lung carcinoma ซึ่งกระตุ้นการสร้างและหลั่งเอ็นไซม์ elastase จากเซลล์ macrophage และเพิ่มการสร้าง angiostatin จาก plasminogen⁴³ ข้อมูลเหล่านี้แสดงว่า elastase ซึ่งหลั่งมาจากเซลล์ macrophage ที่แทรกซึมปะปนกับเซลล์มะเร็ง เกี่ยวข้องกับการสร้าง angiostatin ในมะเร็งระบบนี้ และเกี่ยวข้องกับบทบาทการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดของเซลล์ macrophage

การควบคุมการสร้างปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดในก้อนมะเร็ง

เซลล์มะเร็งสามารถสร้างปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดได้เองหรือจากการกระตุ้นให้สร้างจากภายนอกตัวกระตุ้นจากภายนอกที่แรงที่สุดคือภาวะขาดออกซิเจน^{44,45} (hypoxia) ภาวะขาดออกซิเจนเป็นผลจากการที่เนื้อเยื่อขาดเลือดมาเลี้ยง และแสดงถึงการตอบสนองของเซลล์ที่พยายามจะมีชีวิตรอด ภาวะขาดออกซิเจนเพิ่มการสร้างปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดโดยการเหนี่ยวนำสัญญาณเพิ่มการสร้าง VEGF และทำให้ mRNA Transcript มีเสถียรภาพ ปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดอื่นๆ ได้แก่ angiogenin PD-ECGF และ IL-8 ถูกกระตุ้นด้วยภาวะขาดออกซิเจนเช่นเดียวกัน⁴⁶⁻⁴⁸ ปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ ที่เพิ่มการตอบสนองของการสร้างเส้นเลือด ได้แก่ cytokines และ growth factors insulin-like growth factor-1 insulin like growth factor-2 EGF hepatocyte growth factor IL-1 และ PDGF เพิ่มการสร้าง VEGF⁴⁹⁻⁵¹ การรักษาด้วยการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดอาจทำได้โดยการยับยั้งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ นอกเหนือไปจากการยับยั้งที่ปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดโดยตรง^{52,53} นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนจากยีนต้านมะเร็ง Van Hippel-Lindau (VHL) หรือยีน p53 สามารถควบคุมการสร้างเส้นเลือดได้เช่นเดียวกัน^{54,55}

ปัจจัยยับยั้งการสร้างเส้นเลือดจากภายใน

โปรตีนหลายชนิดสามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดได้ เช่น TSP-1^{56,57} interferon (IFN- α , - β และ - γ)^{58,59} 16-k D fragment ของ prolactin⁶⁰ angiostatin⁴² endostatin⁶¹ vascular endothelial cell growth inhibitor⁶² vasostatin⁶³ METH-1 และ METH-2⁶⁴ ผลิตภัณฑ์ของ platelet factor 4⁶⁵ หรือ antithrombin III⁶⁶ (ตารางที่ 2) โปรตีนเหล่านี้บางชนิดเป็นชิ้นส่วนของโปรตีนซึ่งในสภาพครบสมบูรณ์จะไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือด⁶⁷ ตัวอย่างเช่น ส่วนที่ออก

ฤทธิ์ของ angiostatin เป็นส่วนประกอบของ plasminogen⁴² และ endostatin เป็นส่วนประกอบของ collagen ชนิด X V III⁶¹

ตารางที่ 2 ปัจจัยยับยั้งการสร้างเส้นเลือดในร่างกาย

Thrombospondin-1 และชิ้นส่วนของ thrombospondin 1⁵⁷

Angiostatin⁴²

Endostatin⁶¹

Vasostatin⁶³

Vascular endothelial growth factor inhibitor⁶²

ชิ้นส่วนของ platelet factor-4⁶⁵

ชิ้นส่วนของ prolactin⁶⁰

Restin¹⁶⁰

Proliferin-related protein¹⁵⁹

SPARC cleavage product⁶⁴

Osteopontin cleavage product¹⁶¹

Interferon- α - β ⁵⁹

METH-1⁶⁴ และ METH-2¹⁶¹

Angiopoietin-2^{25,162}

Antithrombin III fragment⁶⁶

Interferon-inducible protein-10¹⁶³

ในปัจจุบันเชื่อว่า การเริ่มต้นการสร้างเส้นเลือดเป็นผลมาจากสมดุลระหว่างตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งการสร้างเส้นเลือด⁵ เมื่อสัดส่วนนี้ต่ำการสร้างเส้นเลือดจะถูกยับยั้งและเกิดขึ้นน้อย ในทางตรงกันข้ามถ้าสัดส่วนนี้สูงการสร้างเส้นเลือดจะเกิดขึ้น มีหลักฐานหลายอย่าง que แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของโรคมะเร็งและการสร้างเส้นเลือด Dameron และคณะ⁵⁶ พบว่าเมื่อยีนต้านมะเร็ง p53 สูญเสียการทำงานไปจะทำให้ยีนยับยั้งการสร้างเส้นเลือดชื่อ TSP ไม่ทำงาน ยีนมะเร็งบางชนิดเกี่ยวข้องกับการสร้างเส้นเลือด เช่น ยีนมะเร็ง ras หรือ src โดยเพิ่มการสร้างปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือด เช่น VEGF^{52,68,69}

การประยุกต์ใช้ทางคลินิก

ความรู้เรื่องการสร้างเส้นเลือดของมะเร็งสามารถประยุกต์ใช้ในการพยากรณ์โรคมะเร็งเพื่อทำนายการดำเนินโรคของผู้ป่วยและพัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งได้

การพยากรณ์โรคจากการสร้างเส้นเลือดของมะเร็ง

เนื้องอกไม่ร้ายแรงมีเส้นเลือดมาเลี้ยงน้อยและโตช้า ในขณะที่เนื้องอกมะเร็งมีเส้นเลือดมาเลี้ยงมากและเจริญเติบโตเร็ว^{1,2,4} จำนวนเส้นเลือดที่มาเลี้ยงก้อนมะเร็งที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้มะเร็งแพร่กระจายไปสู่ส่วนอื่นๆ ของร่างกายได้ง่ายขึ้น³ การตรวจนับจำนวนเส้นเลือดที่มาเลี้ยงมะเร็งเต้านมในผู้ป่วยด้วยการย้อม factor VIII ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในการห้ามเลือดและอยู่บนผิวเซลล์หลอดเลือด พบว่าจำนวนความหนาแน่นเส้นเลือดในก้อนมะเร็งที่ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการแพร่กระจาย และมีความสัมพันธ์กับการรอดชีวิตของผู้ป่วย กล่าวคือถ้าตรวจพบเส้นเลือดหนาแน่นในก้อนมะเร็งเต้านมผู้ป่วยมีโอกาสรอดชีวิตที่โรครุนแรงมากขึ้นและมีอัตราและมีอัตราการรอดชีวิตสั้นลง

การศึกษาส่วนใหญ่พบการเพิ่มความหนาแน่นของเส้นเลือดในตำแหน่งที่มีการสร้างเส้นเลือดมากในก้อนมะเร็งเป็นดัชนีพยากรณ์โรคอิสระในมะเร็งเต้านมระยะแรก⁷⁰⁻⁸⁰ การศึกษาในมะเร็งอื่นๆ เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งเซลล์สีของผิวหนัง มะเร็งรังไข่ มะเร็งกระเพาะอาหาร และมะเร็งลำไส้ใหญ่ยืนยันข้อสรุปที่ว่า ดัชนีการสร้างเส้นเลือดในก้อนมะเร็งเป็นปัจจัยพยากรณ์โรคที่มีประโยชน์⁸¹⁻⁸⁶ อย่างไรก็ตามการคาดหวังว่าดัชนีการสร้างเส้นเลือดในก้อนมะเร็งสามารถทำนายถึงการแพร่กระจายโรคนั้นไม่เป็นความจริงเสมอไปด้วยเหตุผลต่างๆ หลายประการดังนี้⁸⁷

1. โรคมะเร็งมีความหลากหลาย (heterogenous) ประกอบด้วยเซลล์ต่างๆ ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน⁸⁸⁻⁹² เมื่อไม่นานมานี้มีรายงานถึงความแตกต่างของอนุที่สร้างเส้นเลือดที่แตกต่างกันในโรคมะเร็งไตและมะเร็งลำไส้ใหญ่^{93,94}
2. ขบวนการแพร่กระจายของโรคมะเร็ง เป็นลำดับและขั้นตอนที่จำเพาะที่เกี่ยวข้องกันแต่เป็นอิสระต่อกัน^{89,92} การที่โรคมะเร็งจะแพร่กระจายได้เซลล์มะเร็งต้องผ่านขบวนการต่างๆ จนครบถ้วนเซลล์มะเร็งที่สามารถกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดได้ แต่ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ในกระแสเลือดได้หรือไม่สามารถจะเจริญเติบโตในอวัยวะที่แพร่กระจายไปได้ จะไม่สามารถแพร่กระจายโรคได้สำเร็จ^{89,92} เช่นเดียวกับขั้นตอนอื่นๆ ในการแพร่กระจายโรคมะเร็งการสร้างเส้นเลือดเป็นขั้นตอนที่จำเป็นแต่ไม่เพียงพอสำหรับพยากรณ์กำเนิดของการแพร่กระจายโรคมะเร็ง
3. ถึงแม้ว่าเซลล์มะเร็งที่มีการสร้างเส้นเลือดมาเลี้ยงมากจะมีการแพร่กระจายโรคเสมอไป การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งที่ตำแหน่งต้นกำเนิดโรคมะเร็งและตำแหน่งที่โรคแพร่กระจายไป ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการแพร่กระจายของโรคมะเร็งได้^{42,61,67}

การศึกษาการสร้างเส้นเลือดในชิ้นเนื้อมะเร็งต้องอาศัยการตรวจทางพยาธิวิทยาตามมาตรฐานในการวิเคราะห์ชิ้นเนื้อมะเร็งทำได้โดยการแยกเซลล์บุผนังหลอดเลือดจากเซลล์อื่นๆ ด้วยการย้อมพิเศษด้วย antibody ที่จำเพาะ antibody ที่ใช้ ได้แก่ factor VIII - RA (F VIII - RA) CD31/PECAM CD34 CD36 TEC-11 และ ulex europaeus (UEA) ปัจจุบันนี้

antibodies ที่นิยมใช้คือ F VIII – RA CD31 และ CD34 antibodies เมื่อเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อการตรวจเรียบร้อยแล้วจำเป็นต้องมีการนับจำนวนเส้นเลือดภายในก้อนมะเร็ง ควรวิเคราะห์การสร้างเส้นเลือดแบบเป็นระบบ ตัวอย่างเช่น เลือกตำแหน่งที่มีเส้นเลือดมาเลี้ยงมากที่สุดโดยตรวจหาด้วยเลนส์กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำก่อน และนับจำนวนเส้นเลือดด้วยเลนส์กำลังขยายสูง ในมะเร็งบางชนิดเช่นมะเร็งลำไส้ และมะเร็งกระเพาะอาหาร จำเป็นต้องกำหนดตำแหน่งของก้อนมะเร็งที่นับเส้นเลือด เนื่องจากการนับที่ตำแหน่งของก้อนมะเร็งอาจแตกต่างจากการนับบริเวณที่อยู่ห่างจากขอบก้อนมะเร็ง^{82,83} จำนวนเส้นเลือดที่นับได้ในก้อนมะเร็งแต่ละก้อนสามารถนับจำนวนในเลนส์กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงเพียงตำแหน่งเดียวหรือเฉลี่ยจำนวนจากหลายตำแหน่งก็ได้

นอกเหนือจากการนับจำนวนเส้นเลือดในเลนส์กำลังขยายสูง อาจให้คะแนนจำนวนเส้นเลือดตั้งแต่ 0 ถึง 3+ โดยที่คะแนน 3+ แสดงถึงจำนวนเส้นเลือดมากที่สุด แน่ใจว่าวิธีนี้ขึ้นกับคนตรวจวัด และอาจมีปัญหาที่นับได้ไม่เหมือนกันในผู้ตรวจสอบแต่ละคน วิธีการตรวจนับจำนวนเส้นเลือดในก้อนมะเร็งอีกวิธีหนึ่งที่ใช้อยู่คือ การย้อมเซลล์บุผนังหลอดเลือดด้วย antibody ที่จำเพาะและนับจำนวนเส้นเลือดที่ย้อมติดสีโดยการวิเคราะห์ภาพด้วยคอมพิวเตอร์ (computer image analysis) อาศัยเลนส์กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์วิธีที่สามที่ใช้วัดจำนวนเส้นเลือดคือการนับจำนวนแขนงของเส้นเลือด ภายในก้อนมะเร็งและวิธีที่นิยมมากในยุโรปคือวิธี Chalkley-Grid⁹⁶ วิธีนี้ใช้เลนส์ที่เป็นตารางเพื่อบันทึกจำนวนเส้นเลือดในก้อนมะเร็งที่ย้อมติดสีด้วย antibody ที่จำเพาะต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดยนับบริเวณที่เซลล์บุผนังหลอดเลือดตัดกับตาราง และผลรวมของบริเวณที่ตรวจด้วยเลนส์กล้องจุลทรรศน์กำลังสูงดังนั้น คิดเป็นคะแนน (Chalkley score)

การที่ผู้ป่วยมะเร็งมีดัชนีการสร้างเส้นเลือดสูงอาจเกิดการแพร่กระจายโรคในอนาคต แสดงว่าผู้ป่วยดังกล่าว น่าจะได้ประโยชน์จากการรักษาเสริมหลังการผ่าตัด ในผู้ป่วยมะเร็งปอดระยะเป็นมาเฉพาะที่ การรักษาเสริมได้ประโยชน์ในการเพิ่มการรอดชีวิต ของผู้ป่วยในรายที่มีจำนวนเส้นเลือดมากแต่ไม่ได้ผลในรายที่จำนวนเส้นเลือดในก้อนมะเร็งต่ำ⁹⁷ อย่างไรก็ตามข้อสังเกตที่ว่าผู้ป่วยที่มีจำนวนเส้นเลือดในก้อนมะเร็งมากจะได้ประโยชน์จากการรักษาเสริมไม่จริงเสมอไป ในการศึกษาหลายรายงานในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมที่กระจายเข้าต่อมน้ำเหลือง ที่รักษาด้วยการรักษาเสริมหลังผ่าตัดด้วยยาเคมีบำบัดหรือฮอร์โมนบำบัด รายที่มีความหนาแน่นของเส้นเลือดมากกลับมีการพยากรณ์โรคที่แย่กว่า ผู้ป่วยที่มีความหนาแน่นของเส้นเลือดน้อย^{98,99} การศึกษาอีก รายงานพบว่าผู้ป่วยที่มี VEGF ต่ำมีการพยากรณ์โรคดีกว่าต่อการรักษาเสริม¹⁰⁰ มะเร็งที่มีดัชนีการสร้างเส้นเลือดสูง อาจมีการดำเนินโรคที่รุนแรงทำให้การรักษาเสริมไม่ได้ประสิทธิภาพ อาจเป็นไปได้ว่าการรักษายังยั้งการสร้างเส้นเลือดอาจมีความจำเป็นในผู้ป่วยดังกล่าว ควรออกแบบการศึกษาวิจัยทางคลินิกที่ควบคุมอย่างดี เพื่อประเมินประสิทธิภาพของยายับยั้งการสร้างเส้นเลือด ในการรักษาเสริมสำหรับผู้ป่วยมะเร็งที่มีเส้นเลือดมาเลี้ยงมาก

หลักการยับยั้งการสร้างเส้นเลือด

ยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดที่ใช้ในทางคลินิกในปัจจุบันนี้ แบ่งได้เป็นหลายชนิดตามคุณสมบัติทางชีววิทยา ดังนี้

1. Metalloproteinase inhibitors ยับยั้งการย่อยชั้นพื้นฐานของเส้นเลือด ยาในกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่อยู่ระหว่างการศึกษทางคลินิกระยะที่ 1 (phase I) พบว่าผลข้างเคียงส่วนใหญ่ คือ อาการปวดกล้ามเนื้อ กระตุก และข้อเนื่องจากการปรับโครงสร้างคอลลาเจน (collagen remodelling)

2. ยายับยั้งหน้าที่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด ได้แก่ TNP-470 thalidomide squalamine ยา combrestatin A-4 prodrug และ endostatin กลไกออกฤทธิ์ทางชีววิทยา น้อยกว่ายาในกลุ่มแรก การศึกษทางคลินิกส่วนใหญ่อยู่ระหว่างการศึกษาระดับ 1 และ 2 ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ายาในกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดในร่างกายอย่างไรในขณะนี้ อาจเป็นไปได้ที่การศึกษทางคลินิกที่ออกแบบดีอาจช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่มนี้

3. ยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดที่ออกฤทธิ์จำเพาะต่อปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ยายับยั้งเอนไซม์ tyrosine kinase ของตัวรับ (receptor) ของปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือด เช่น VEGF bFGF และ PDGF antibodies ต่อตัวรับปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือด หรือต่อปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดอยู่ระหว่างการศึกษวิจัยทางคลินิก หรืออยู่ระหว่างขั้นตอนของการพัฒนาสำหรับการวิจัยทางคลินิกการศึกษาก่อนคลินิกในสัตว์ทดลองพบว่ายาเหล่านี้ ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้แต่ส่วนน้อยเท่านั้นที่ทำให้ก้อนมะเร็งเล็กลง แสดงว่าการวัดผลการตอบสนองต่อการรักษาของยาด้วยการวัดการเล็กลงของก้อนมะเร็ง ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัด อาจเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมกับการประเมินผลการรักษาด้วยยายับยั้งการสร้างเส้นเลือด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการนิยามการวัดผลการรักษาสำหรับการรักษาทางชีวภาพ

เมื่อไม่นานมานี้พบว่า การมีชีวิตของเซลล์บุผนังหลอดเลือดเป็นลักษณะสำคัญของการพัฒนาของเส้นเลือดใหม่ที่มาเลี้ยง ดังนั้นจึงเริ่มมีการนำยาที่ออกฤทธิ์ต่อปัจจัยการมีชีวิตของเซลล์บุผนังหลอดเลือดมาศึกษาทางคลินิก ยาเหล่านี้ได้แก่ ยาต้าน integrin ซึ่งอยู่ที่ผิวเซลล์บุผนังหลอดเลือด VEGF เป็นทั้งปัจจัยมีชีวิตของเซลล์ผนังหลอดเลือดและเป็นปัจจัยสร้างเส้นเลือด ดังนั้นยายับยั้ง VEGF อาจมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ผนังหลอดเลือดของเซลล์มะเร็ง เซลล์หลอดเลือดของมะเร็งแตกต่างจากเซลล์หลอดเลือดปกติ

การค้นพบตัวรับปัจจัยกระตุ้นการสร้างเส้นเลือด (VEGF receptor) และการเพิ่มปริมาณมากขึ้นในเส้นเลือดที่สร้างใหม่ เป็นความแตกต่างที่สำคัญระหว่างเส้นเลือดที่เจริญเติบโตเต็มที่และไม่แบ่งตัว กับเส้นเลือดใหม่ที่กำลังสร้างขึ้นใหม่ ความแตกต่างดังกล่าวทำให้ยาต้านการสร้างเส้นเลือดไม่มีผลข้างเคียงต่อเส้นเลือดปกติทำให้ดัชนีการรักษา (therapeutic index) ปลอดภัยเพียงพอ ลักษณะที่แตกต่างระหว่างเซลล์หลอดเลือดมะเร็งและเซลล์ปกติเป็นที่ทราบดี รวมทั้งการเพิ่มจำนวนของ integrins avb3 และ avb5^{101,102} ในมะเร็งเต้านมการยับยั้งเซลล์หลอดเลือดด้วย

antibody ต่อ avb3 จะติดเฉพาะเส้นเลือดของมะเร็งเป็นส่วนใหญ่ เส้นเลือดปกติกลับยอมไม่ติด avb3 แสดงว่า avb3 เป็นเครื่องหมายที่แสดงถึงเซลล์หลอดเลือดที่ถูกกระตุ้น (activated endothelium)¹⁰³

ความสำคัญของการใช้ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดขึ้นอยู่กับความจริงที่ว่า เซลล์หลอดเลือดของมะเร็ง แต่ละตำแหน่งและของมะเร็งต่างชนิดกัน อาจมีลักษณะที่แตกต่างกัน เซลล์หลอดเลือดของมะเร็งมีความหลากหลายในความสามารถในการจับกับลำดับ peptide ที่จำเพาะ¹⁰⁴ สิ่งอื่นๆ ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์หลอดเลือดที่ถูกกระตุ้น ได้แก่ adhesion molecules เช่น E selectin¹⁰⁵ endoglin¹⁰⁶ กลัยโคโปรตีน เช่น prostate-specific membrane antigen¹⁰⁷ ED-B domain ของ fibronectin¹⁰⁸ และเอนไซม์ proteases ชนิดต่างๆ¹⁰⁹ ลักษณะที่เฉพาะตัวของเซลล์หลอดเลือดมะเร็งมีประโยชน์ไม่ใช่ แต่ในการใช้เป็นเป้าหมายของการรักษา แต่ยังใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งด้วยวิธีการทางรังสีวินิจฉัยได้อีกด้วย

การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดโดยอินเตอเฟียร์รอน

อินเตอเฟียร์รอนแบ่งเป็น 3 ชนิด และมีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละ species ประกอบด้วย อินเตอเฟียร์รอนอัลฟา สร้างโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว อินเตอเฟียร์รอนเบต้าสร้างโดยเซลล์พังพืด (fibroblast) และอินเตอเฟียร์รอนแกมมาสร้างจากเซลล์ภูมิคุ้มกันถึงแม้ว่าอินเตอเฟียร์รอนอัลฟา และ เบต้า มีตัวรับประกัน (type I IFN receptor) และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดรูปแบบการตอบสนองของเซลล์แบบเดียวกัน ปฏิกริยาของเซลล์บางชนิดถูกกระตุ้นโดยอินเตอเฟียร์รอนเบต้าเท่านั้นเนื่องจากการเติมกลุ่มฟอสเฟต (phosphorylation) ของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับตัวรับอินเตอเฟียร์รอน ทำให้เกิดการตอบสนองที่จำเพาะต่ออินเตอเฟียร์รอนเบต้าดังกล่าว¹¹⁰ นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านไวรัสของอินเตอเฟียร์รอนที่ทราบกันดีแล้ว อินเตอเฟียร์รอนยังควบคุมการทำงานของชีววิทยาหลายประการ ได้แก่ การเจริญเติบโตของเซลล์¹¹¹ การวิวัฒนาการของเซลล์¹¹² การทำงานของยีนมะเร็ง¹¹³ ภูมิคุ้มกันของร่างกาย¹¹⁴ และการเกิดมะเร็ง¹¹⁵⁻¹¹⁷ อินเตอเฟียร์รอนสามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือดหลายขั้นตอน อินเตอเฟียร์รอนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง^{118,119} ผลดังกล่าวพบเช่นเดียวกันต่อการแบ่งตัวของเซลล์หลอดเลือดในร่างกาย อินเตอเฟียร์รอนอัลฟายับยั้ง การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์หลอดเลือดโดย fibroblast growth factor¹²⁰ อินเตอเฟียร์รอนแกมมาสามารถยับยั้ง การแบ่งตัวของเซลล์หลอดเลือดได้เช่นเดียวกัน¹²¹ อินเตอเฟียร์รอนอัลฟา และเบต้า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์หลอดเลือดขนาดเล็กของชั้นผิวหนัง¹²² และเซลล์หลอดเลือดหัวใจของมนุษย์

การใช้ยาอินเตอเฟียร์รอนที่ผลิตโดยวิธีพันธุวิศวกรรมศาสตร์ (recombinant IFNs) สามารถยับยั้งการสร้างเส้นเลือดในโรคต่างๆ อย่างไรก็ดี ได้แก่ เนื้องอกเส้นเลือด รวมทั้งเนื้องอกเส้นเลือดในทารก (infantile hemangioma)^{59,124,125} มะเร็ง Kaposi's sarcoma¹²⁶ เนื้องอกเซลล์ยักษ์ของขากรรไกร (giant cell tumor of the mandible)¹²⁷ และมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ¹²⁸ เนื้อ

งอกเหล่านี้สร้างปัจจัยการกระตุ้นการสร้างเส้นเลือด bFGF จำนวนมากตรวจพบได้บ่อยในน้ำปัสสาวะหรือเลือดของผู้ป่วย^{129,130} อินโดเพิรอนอัลฟาและเบต้า แต่ไม่ใช่อินโดเพิรอน-แกมมา สามารถลดการสร้าง mRNA และโปรตีนของ bFGF ในเซลล์มะเร็งของมนุษย์ได้⁸ ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าการฉีดอินโดเพิรอนอัลฟาสามารถลดการสร้าง bFGF ลดความหนาแน่นของเส้นเลือด และยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งกระเพาะปัสสาวะที่ปลูกเลี้ยงในหนูทดลองเล็ก (nude mice)¹³¹

การรักษาโดยการยับยั้งการสร้างเส้นเลือด

ความเข้าใจถึงการที่การสร้างเส้นเลือดในโรคมะเร็งมีความจำเป็นต้องการเจริญเติบโตของก้อนเนื้ออกและการแพร่กระจายโรคได้นำไปสู่การค้นพบสารประกอบหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือด หนึ่งจำเป็นต้องเข้าใจว่าการสร้างเส้นเลือดไม่ได้เกิดเฉพาะในชบวนการเกิดโรค แต่เกิดในภาวะปกติเช่นเดียวกัน การสร้างเส้นเลือดในภาวะปกติจำเป็นในการสืบพันธุ์ การหายของแผล การมีรอบเดือน รวมทั้งโรคของเส้นเลือดหลายชนิด เช่นโรคเส้นเลือดหัวใจ โรคเส้นเลือดส่วนปลาย (peripheral vascular disease) ดังนั้นการรักษาโรคมะเร็งด้วยการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดจึงต้องสร้างสมดุลระหว่างการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดของมะเร็ง และผลข้างเคียงที่อาจเกิดกับร่างกายผู้ป่วย

นอกเหนือจากผลข้างเคียงของการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดที่อาจเกิดต่อร่างกายแล้ว การรักษาวิธีนี้เป็นการรักษาแบบเรื้อรัง เนื่องจากการรักษาด้วยการยับยั้งเส้นเลือดออกแบบเพื่อยับยั้งการสร้างเส้นเลือดใหม่ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนิยามจุดหมายปลายทางที่วัดความสำเร็จของการรักษา ในการวัดการตอบสนองต่อยาเคมีบำบัดวิธีหนึ่งที่เป็นมาตรฐานคือ การวัดขนาดของก้อนมะเร็งที่ลดลงเกินร้อยละ 50 ภายในระยะเวลาไม่เกินเดือนที่รักษา อย่างไรก็ตามการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดมักให้ผลการตอบสนองแบบคงที่ (stable disease) ซึ่งในการรักษาด้วยยาเคมีบำบัดอาจถือว่าเป็นผลการรักษาที่ไม่ดีพอ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกำหนดหลักการทางคลินิก หรือทางห้องปฏิบัติการในการวัดประสิทธิภาพของการรักษาแบบยับยั้งการสร้างเส้นเลือด

การที่การรักษาแบบยับยั้งการสร้างเส้นเลือด อาจไม่ลดขนาดของก้อนมะเร็งให้เล็กลงเหมือนที่พบในการรักษาโรคมะเร็งด้วยยาเคมีบำบัด ดังนั้นจึงต้องให้การรักษาแบบต่อเนื่องเรื้อรัง ดังนั้นยาที่ใช้การบริหารยาได้ง่าย เช่น ในรูปยารับประทาน และมีผลข้างเคียงระยะยาวต่ำ การวัดประสิทธิภาพของยายับยั้งเส้นเลือดต้องใช้ระยะเวลาติดตามประเมินผลยาวนานกว่ายาเคมีบำบัด เนื่องจากการตอบสนองแบบคงที่อาจบอกได้ยากถ้าติดตามผลการรักษาในระยะเวลาสั้น

แน่นอนว่ามีรายงานการตอบสนองต่อยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดแบบสมบูรณ์ (complete remission) กล่าวคือก้อนมะเร็งหายหมดหลังการรักษาในสัตว์ทดลอง^{61,132} อย่างไรก็ตามผลการตอบสนองแบบสมบูรณ์พบได้น้อยมาก และการศึกษาส่วนใหญ่พบว่ายายับยั้งการสร้างเส้นเลือดนำไปสู่การยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็ง^{133,134} ดังนั้นผู้อ่านจึงควรวิเคราะห์

และแปลผลการศึกษาต่างๆ อย่างเหมาะสม และระวังการสร้างความคิดหวังที่ไม่เป็นจริง ตัวอย่างเช่น ตำแหน่งที่ฉีดเซลล์มะเร็งในการทดลองการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดของมะเร็งมีความสำคัญในการแปลผลการทดลองเซลล์หลอดเลือดในอวัยวะต่างๆ มีลักษณะแตกต่างกัน¹⁰⁴ และการรักษาที่ได้ผลที่อวัยวะหนึ่งอาจไม่ได้ผลในตำแหน่งอื่นๆ ยิ่งไปกว่านี้ยังพบว่าลักษณะการเจริญเติบโตของมะเร็งในการทดลองขึ้นกับตำแหน่งที่ฉีดเซลล์มะเร็งเข้าไป¹³⁵ ดังนั้นแบบของการศึกษาประเมินผลการยับยั้งการสร้างเส้นเลือดจึงควรเป็นแบบ orthotopic ซึ่งมะเร็งเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมของสัตว์ทดลอง นอกจากนี้การออกแบบการทดลองหรืออ่านจากวารสารจำเป็นต้องพิจารณาว่าการศึกษาดทดลอง การรักษาแบบยับยั้งเส้นเลือดนั้นเป็นแบบไหน ได้แก่

1. ยาป้องกันมะเร็ง (chemopreventive agent) ให้ยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดก่อนฉีดเซลล์มะเร็งเข้าไปในสัตว์ทดลอง
2. การรักษาเสริม (adjuvant therapy) ให้ยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดในสัตว์ทดลองที่มีปริมาณเซลล์มะเร็งเพียงเล็กน้อย เช่น ให้ยาทันทีหลังการฉีดเซลล์มะเร็งเข้าไปในสัตว์ทดลอง
3. การรักษา (therapeutic modality) เป็นการศึกษาทดลองวัดผลของยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดในสัตว์ทดลองที่เซลล์มะเร็งที่ฉีดเข้าไปเจริญเติบโตเป็นก้อนมะเร็งเรียบร้อยแล้ว

การศึกษากการตอบสนองต่อการรักษาแบบยับยั้งการสร้างเส้นเลือดจำเป็นต้องกำหนดจุดหมายปลายทาง (end points) ของการรักษาก่อนจะเริ่มต้นการศึกษา นิยมวัดขนาดของก้อนมะเร็งก่อนการให้ยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดและเมื่อการศึกษาสิ้นสุด การวัดผลระหว่างทำการศึกษาศาสามารถตัดสินเนื้อมะเร็งที่ได้รับยามาตรวจวิเคราะห์นับจำนวนเส้นเลือด

ข้อมูลการศึกษาก่อนคลินิกพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัดเมื่อใช้ร่วมกับยายับยั้งการสร้างเส้นเลือด¹³⁶ การศึกษาทางคลินิกในปัจจุบันนี้มักออกแบบการศึกษาผลของยาเคมีบำบัดเปรียบเทียบกับการใช้ยาเคมีบำบัดร่วมกับยายับยั้งการสร้างเส้นเลือด ความสำเร็จของการศึกษาการใช้ยายับยั้งยีนมะเร็ง her-2 ในมะเร็งเต้านมที่ชื้อยา herceptin ร่วมกับยาเคมีบำบัดในผู้ป่วยมะเร็งเต้านมระยะที่เป็นมาก¹³⁷ ทำให้เป็นแนวคิดในการศึกษาการใช้ยาเคมีบำบัดร่วมกับยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดในโรคมะเร็ง การศึกษาการใช้ยาร่วมกันแบบนี้ทำให้สามารถวัดประสิทธิภาพของยาเคมีบำบัด เช่น การยุบตัวเล็กลงของก้อนมะเร็ง และเพิ่มการมีชีวิตของผู้ป่วยทำให้สามารถวัดผลของยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดได้รวดเร็วขึ้น (ตารางที่ 3)

วิธีการอื่นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งอาจทำได้โดยพัฒนาที่มีเป้าหมายยับยั้งเส้นเลือดโดยตรง (antivascular targeting strategies) ตัวอย่างเช่น ยายับยั้งการจับ tubulin (tubulin-binding agents)¹³⁸ เช่นยา combrestatin A-4^{139,140} antibodies ที่จับ tissue factor ของเส้นเลือดที่สร้างใหม่ ทำให้เกิดการแข็งตัวเป็นลิ่มเลือดในเส้นเลือดนั้นๆ¹⁴¹ ยาทำลายเซลล์หลอดเลือดที่สร้างใหม่ด้วยกลไกต่างหลายวิธี¹³⁹ มีผลทำให้เส้นเลือดฝ่อและเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงโดยเส้นเลือด เหล่านี้ตายไปด้วยเพราะขาดเลือดมาเลี้ยง วิธีดังกล่าวต้องแก้ปัญหาที่ยาอาจมีพิษหรือผล

ตารางที่ 3 ตัวอย่างยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดมะเร็งที่อยู่ในระหว่างการวิจัยทางคลินิก

กลไกการยับยั้งการสร้างเส้นเลือด	การออกฤทธิ์จำเพาะ	รายละเอียด
ยายับยั้งการสลาย matrix Marimastat ยายับยั้งเซลล์หลอดเลือดโดยตรง Thalidomide Squalamine Endostatin TNP - 40 ยายับยั้งตัวกระตุ้นการสร้างเส้นเลือด SU 5416 SU 6668 Interferon - alpha C 225 Anti - VEGF antibody	ยับยั้งเอนไซม์ matrix metalloproteinase ทุกชนิด ไม่ทราบแน่นอน ยับยั้ง NHE 3 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนออกซิเจนและไฮโดรเจน ยับยั้งโปรตีนที่ต่อต้านการตายของเซลล์ Bcl - 2 และ Bcl - X _L ยับยั้งเอนไซม์ methionine aminopeptidase - 2 ทำให้ วัฏจักรของเซลล์หยุดในเซลล์หลอดเลือด ยับยั้งสัญญาณจาก VEGF ยับยั้งสัญญาณจากตัวรับ VEGF FGF และ PDGF กระตุ้นเซลล์ NK ลดการสร้าง bFGF และ VEGF ยับยั้งตัวรับ epidermal growth factor (EGFR) ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดทางอ้อม จับและยับยั้ง VEGF	ยาที่ได้จากการสังเคราะห์ สังเคราะห์จากกรดกลูตามิคสารสกัดจากตับปลาหมา (dog fish) (ปัจจุบันสังเคราะห์ได้แล้ว) แยกมาจากเซลล์เนื้องอกเส้นเลือดของหนู murine hemangioendothelioma cell) สามารถผลิตจากยีสต์ Pichia Pastori ได้โดยวิธีพันธุวิศวกรรมศาสตร์ ได้จาก Fumagillin Tyrosine kinase inhibitor Tyrosine kinase inhibitor ผลิตจากเซลล์เม็ดเลือดขาวเพาะเลี้ยงที่กระตุ้นด้วยไวรัส Monoclonal antibody Monoclonal antibody

ตัวย่อ : VEGF vascular endothelial growth factor

FGF fibroblast growth factor

PDGF platelet - derived growth factor

NK natural killer

BFGF basic fibroblast growth factor

EGFR epidermal growth factor re

ข้างเคียงต่อเส้นเลือดปกติ¹⁴¹ วิธีที่อาจได้ประโยชน์ คือการใช้วิธีการทางและอนุชีววิทยา ศึกษา ค้นหายีนที่จำเพาะต่อเซลล์หลอดเลือดที่สร้างใหม่ในก้อนมะเร็งและใช้เป็นเป้าหมายในการรักษา เช่น ผลิต antibody ที่จำเพาะที่ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ

ยาเคมีบำบัดมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดในร่างกาย ในสัตว์ทดลองทำได้ง่ายโดยตัดชิ้น เนื้อมาตรวจและวัดความเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิด ได้แก่ จำนวนของเส้นเลือด ลักษณะของเส้น เลือดการมีชีวิตของเซลล์หลอดเลือด หรือการตาย (apoptosis) ของเซลล์หลอดเลือด เครื่อง หมายแสดงการสร้างเส้นเลือด เช่น VEGF bFGF และ IL-8 การตัดชิ้นเนื้อตรวจเป็นระยะๆ ใน ผู้ป่วยอาจทำได้ลำบากหรือไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจอย่างอื่นที่วัดผลของยา ยับยั้งเส้นเลือดในผู้ป่วย ได้แก่ การตรวจทางรังสีวินิจฉัย เช่น การตรวจสนามแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic resonance imaging) และการตรวจคลื่นเสียงสะท้อนแรงสูง (doppler ultrasound) เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลง เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของเส้นเลือดที่มาเลี้ยงก้อนมะเร็ง โครงสร้างของ เส้นเลือด และการซึมซาบ (permeability) ของหลอดเลือด วิธีต่างๆ เหล่านี้อาจมีประโยชน์ในการ วัดประสิทธิภาพของยายับยั้งการสารเส้นเลือด¹⁴²⁻¹⁴⁵

ผลข้างเคียงของการรักษาระยะยาวด้วยยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดอาจไม่ปรากฏใน ระหว่างการศึกษาทางคลินิกหรือในสัตว์ทดลองในระยะแรก แต่อาจปรากฏในภายหลังเมื่อให้ยา เป็นเวลายาวนานก็ได้ตัวอย่างเช่น การพบการเกิดการเกร็งของแขนขา (spastic diplegia) ในเคส ที่เป็นโรคเนื้องอกของเส้นเลือดของทารก (infantile hemangioma) ที่รักษาด้วยยาอินเดอเพียรอน อัลฟานานกว่าหนึ่งปี¹⁴⁶ การพบความสัมพันธ์ระหว่างระบบแข็งตัวและสลายตัวของลิ่มเลือดและ การสร้างเส้นเลือด⁶⁶ ทำให้อาจเป็นไปได้ที่ยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดอาจมีผลต่อระบบแข็งตัวหรือ สลายตัวของลิ่มเลือด ทำให้อาจเกิดผลข้างเคียงเลือดแข็งตัวผิดปกติหรือเลือดออกง่ายก็ได้และ อาจทำให้ผู้ป่วยที่มีโรคหัวใจและหลอดเลือดกำเริบได้โดยเฉพาะในผู้ป่วยสูงอายุ ผลในผู้ป่วย มะเร็งที่รักษาด้วยยายับยั้งการสร้างเส้นเลือด อาจร้ายกว่าปกติ การสร้างเส้นเลือดของระบบสืบ พันธุ์ผิดปกติไป เช่น การพัฒนาของ corpus luteum ในผู้หญิง และการสร้างเส้นเลือดของทารกใน ครรภ์ผิดปกติการเจริญเติบโตของเด็กที่รักษาด้วยยายับยั้งการสร้างเส้นเลือดอาจมีผิดปกติ¹⁴⁷ ดังนั้นจึงควรพัฒนายายับยั้งการสร้างเส้นเลือดที่จำเพาะต่อเส้นเลือดของมะเร็ง โดยอาศัยหลักการที่ ว่าลักษณะโครงสร้างของเส้นเลือดมะเร็งแตกต่างจากเส้นเลือดปกติ

การใช้การยับยั้งการสร้างเส้นเลือดรวมกับการรักษาโรคมะเร็งอื่น ๆ

การใช้ยายับยั้งการสร้างเส้นเลือด เช่น TNP- 470 ร่วมกับยาเคมีบำบัด เช่น ยาซีสพลา- ดิน พาคลิแทกเซล และ ซียคลอเฟอสฟาไมด์ สามารถเสริมฤทธิ์รักษาโรคมะเร็งของยาเคมีบำบัด¹³⁶ ประสิทธิภาพของการรักษาร่วมกันยังพบได้ในการใช้ยาร่วมกับรังสีรักษา

วิธีการพัฒนาการรักษาโรคมะเร็งวิธีใหม่คือค้นหาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในการเจริญ เติบโตของเซลล์มะเร็ง การสร้างเส้นเลือดเป็นเพียงขั้นตอนหนึ่งในการเจริญเติบโตและแพร่

กระจายของโรคมะเร็งควรค้นหาการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การป้องกันการตายของเซลล์มะเร็ง และการลุกลามแพร่กระจายโรค เพื่อพัฒนาใช้เป็นเป้าหมายในการรักษาโรค การค้นพบการวิเคราะห์ยีนด้วยเทคโนโลยี genechip ทำให้การศึกษาความแตกต่างระหว่างเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติโดยวิเคราะห์ รอยนิ้วมือ (fingerprint) ของดีเอ็นเอ ได้สะดวกและรวดเร็ว และใช้พัฒนาวิธีการรักษาโรคมะเร็งที่จำเพาะเจาะจงต่ออณูที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งโดยตรง ย้ายยีนการสร้างเส้นเลือดอาจเป็นวิธีการรักษาทางชีวบำบัดวิธีหนึ่งร่วมกับการรักษาอื่นๆ เช่น การรักษาโรคโดยการยับยั้งปัจจัยกระตุ้นการเจริญเติบโตของมะเร็ง (anti-growth factor therapy) หรือยาที่กระตุ้นการตาย (apoptosis) ของเซลล์มะเร็งและเซลล์หลอดเลือดของมะเร็ง

บทสรุป

การสร้างเส้นเลือดเป็นขบวนการที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของก้อนมะเร็งต้นกำเนิด (primary tumor) และมะเร็งที่แพร่กระจาย รวมทั้งมะเร็งของเม็ดเลือดความเข้าใจถึงหลักการพื้นฐานทางชีววิทยาของการสร้างเส้นเลือด นำไปสู่การพัฒนาวิธีการพยากรณ์โรค tumor markers เทคนิคทางรังสีวินิจฉัย และวิธีการรักษาโรคมะเร็งต่างๆ ความท้าทายของเรื่องนี้อยู่ที่การรวบรวมผสมผสานความรู้เหล่านี้ไปสู่การดูแลผู้ป่วยมะเร็งทุกชนิดในระยะต่างๆ ของโรค ความเข้าใจถึงพื้นฐานทางชีววิทยาของการสร้างเส้นเลือดและชีววิทยาโรคมะเร็ง จะนำไปสู่วิธีใหม่ๆ ในการรักษาโรคมะเร็ง

References :

1. Fidler IJ, Ellis L.M. The implications of angiogenesis to the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994;79:185.
2. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1995;1:27.
3. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 1991;64:327.
4. Anerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther* 1994;63:265.
5. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353.
6. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983.
7. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;84:1470.
8. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cell secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;84:1470.
9. Gospodarowicz D, Abraham JA, Schilling J. Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7311.
10. Thomas KA. Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 1996;271:603.
11. Dvorak HF, Nagy JA, Berse B, et al. Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. *Ann NY Acad Sci* 1992;667:101.
12. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, et al KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells, *Science* 1999;285:1553.
13. Ferrer FA, Muller LJ, Lindquist R, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in human prostate cancer. *Urology* 1999;53:567.
14. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000;60:203.
15. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:11709.
16. Tsurusaki T, Kanda S, Sakai H, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* 1999;80:309.
17. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors, and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9:211.
18. Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, et al. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J pathol* 1998;153:103.
19. Lymboussaki A, Partanen TA, Olofsson B, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor C receptor VEGFR-3 in lymphatic endothelium of the skin and in vascular tumors. *Am J Pathol* 1998;153:395.
20. Marconcini L, Marchio S, Morbidelli L, et al. c-Fos-induced growth factor / vascular endothelial growth factor D induces angiogenesis in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9671.
21. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9671.
22. Meyer M, Clasuss M, Lepple-Wienhues A, et al. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signaling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1(Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999;18:363.
23. Ogawa S, Oku A, Suwano A, et al. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:31273.
24. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, et al. Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* 1999;79:213.
25. Davis S, Yancopoulos GD. The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1999;237:173.

26. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooperation, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF, *Science* 1999;284:1994.
27. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999;13:1055.
28. Patan S, TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* 1998;56:1.
29. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE 2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171.
30. Moore BB, Arenberg DA, Addison CL, Keane MP, Strieter RM. Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines. *J Lab Clin Med* 1998;132:92.
31. Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, Fidler IJ. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol* 1998;12:749.
32. Polverini PJ, Leibovich JS. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. *Lab Invest* 1984;51:635.
33. Sunderkotter C, Steinbring K, Goebeler M, et al. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994;55:410.
34. Leek RD, Harris AL, Lewis CE. Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 1994;56:423.
35. Gutman M, Singh RK, Yoon S, et al. Leukocyte-induced angiogenesis and subcutaneous growth of B13 melanoma. *Cancer Biother* 1994;9:163.
36. Noh R, Karp GI, Devereaux DF. The effect of doxorubicin and mitoxanthrone on wound healing. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991;29:141.
37. Fidler IJ. Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis (Editorial). *J Natl Cancer Inst* 1995;84:1588.
38. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, et al. Platelet derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1146.
39. Polverini PJ. How the extracellular matrix and macrophages contribute to angiogenesis dependent diseases. *Eur J Cancer* 1996;32A:2430.
40. DiPietro LA, Polverini PJ. Angiogenic macrophages product the angiogenic inhibitor thrombospondin I. *Am J Pathol* 1993;143:678.
41. Lingen MW, Polverini PJ, Bouck N. Retinoic acid induces cells cultured from oral squamous cell carcinomas to become antiangiogenic. *Am J Pathol* 1996;149:249.
42. O'Reilly MS, 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.
43. Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997;88:801.
44. Shweiki D, Itin A, Stoffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843.
45. Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 1995;270:13333.
46. Griffiths L, Dachs GU, Bicknell R, Harris AL, Stratford IJ. The influence on oxygen tension and pH on the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor-thymidine phosphorylase in human breast tumor cells grown in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997;57:570.
47. Hartmann A, Kunz M, Kostlin S, et al. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1999;59:1578.
48. Desbaillets I, Diserens AC, Trobolet N, Hamou MF, Meir EGV. Upregulation of interleukin 8 by oxygen-deprived cells in glioblastoma suggests a role in leukocyte activation, chemotaxis, and angiogenesis. *J Exp Med* 1997;186:1201.
49. Akagi Y, Liu W, Wie K, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I. *Cancer Res* 1998;58:4008.
50. Akagi Y, Liu W, Xie K, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1. *Br J Cancer* 1999;80:150b.
51. Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY. Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J Neurosurg* 1995;82:864.

52. Ellis LM, Staley CA, Liu W, et al. Downregulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src. *J Biol Chem* 1998;273:1052.
53. Bouvet M, Ellis LM, Nishizaki M, et al. Adenovirally mediated wild-type p53 gene product inhibits vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathway. *J Biol Chem* 1997;272:27509.
54. Pal S, Claffey KP, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. The von Hippel-Lindau gene product inhibits vascular permeability factor-vascular endothelial growth factor expression in renal cell carcinoma by blocking protein kinase C pathway. *J Biol Chem* 1997;272:27509.
55. Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Hypoxia-induce protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *J Biol Chem* 1996;271:25492.
56. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouk N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994;265:1502.
57. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, et al. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 1993;122:497.
58. Singh RK, Gutman M, Bucana CD, et al. Interferons alpha and beta downregulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4562.
59. Ezekowitz RAB, Mulliken JB, Folkman J. Interferon alpha-2a therapy for life-threatening hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 1992;326:1456-1463.
60. Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 1993;133:1292.
61. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277.
62. Zhai Y, Ni, Jiang GW, et al. VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo. *FASEB J* 1999;13:181.
63. Pie SE, Yao L, Jones KD, et al. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 1998;188:2349.
64. Vasquez F, Hastings G, Ortega MA, et al. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angiogenic activity. *J Biol Chem* 1999;274:23349.
65. Gupta SK, Hassel T, Singh JP. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7799.
66. O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the Serpin antithrombin III. *Science* 1999;285:1926.
67. Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol Med* 1995;1:120.
68. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1995;55:4575.
69. Vitoria-Petit AM, Rak J, Hung MC, et al. Neutralizing antibodies against EGF and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases downregulate VEGF production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 1997;151:1523.
70. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast cancer. *N Engl J Med* 1991;324:1.
71. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, et al. Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12:454.
72. Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875.
73. Toi M, Dashitani J, Tominaga T. Tumor angiogenesis is an independent prognostic indicator in primary breast carcinoma. *Int J Cancer* 1993;55:371.
74. Obermair A, Czerwenka K, Kurz al, Kaider A, Sevela P. Tumoral vascular density in breast tumors and their effect on recurrence-free survival. *Chirurg* 1994;65:611.
75. Visscher DW, Smilantetz S, Drozdowicz S, Wykes SM. Prognostic significance of image morphometric microvessel enumeration on breast carcinoma. *Anal Quant Cytol. Histol* 1993;15:88.

76. Horak ER, Leek R, Dlenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as an indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992;340:1120.
77. Bosari S, Lee AKC, DeLellis RA, et al. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992;23:755.
78. Axelsson K, Ljung BM, Moore DH 2nd, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;87:997.
79. Hall N, Fish D, Hunt N, et al. Is the relationship between angiogenesis and metastasis in breast cancer real? *Surg Oncol* 1992;1:223.
80. Van Hoef ME, Knox WF, Dhesi SS, Howell A, Schor AM. Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993;29A:1141.
81. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Flumenfeld W, Folkman J, Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993;143:401.
82. Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, et al. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:1679.
83. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 1995;55:3964.
84. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1995;72:319.
85. Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Meriono MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995;147:33.
86. Graham CH, Rivers J, Derbel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (<0.75 mm) malignant melanomas. *Am J Pathol* 1994;145:510.
87. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and breast cancer metastasis. *Lancet* 1995;346:388.
88. Fidler IJ. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 1978;38:2651.
89. Fidler IJ. Critical factor in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* 1990;50:6130.
90. Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 1982;217:998.
91. Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation [Review]. *Cancer* 1991;51L5054s.
92. Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1979;283:139.
93. Kitadai Y, Ellis LM, Takahashi Y, et al. Multiparametric in situ mRNA hybridization analysis to detect metastasis-related genes in surgical specimens of human colon carcinomas. *Clin Cancer Res* 1995;1:1095.
94. Singh RK, Bucana CD, Gutman M, et al. Organ site-dependent expression of basic fibroblast growth factor in human renal cell carcinoma cells. *Am J Pathol* 1994;145:365.
95. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996;32A:2474.
96. Makris A, Powles TJ, Kakolyris S, et al. Reduction in angiogenesis after neoadjuvant chemoendocrine therapy in patients with operable breast carcinoma. *Cancer* 1999;85:1996.
97. Angeletti CA, Lucchi M, Fontanini G, et al. Prognostic significance of tumoral angiogenesis in completely resected late stage lung carcinoma (stage IIIA-N2): impact of adjuvant therapies in a subset of patients at high risk of recurrence. *Cancer* 1996;78:409.
98. Viens P, Jacquemier J, Bardou VJ, et al. Association of angiogenesis and poor prognosis in node-positive patients receiving anthracycline-based adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 1999;54:205.
99. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995;13:765.
100. Gasparini G, Toi M, Miceli R, et al. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in patients with node-positive breast cancer treated with either adjuvant chemotherapy or hormone therapy. *Cancer J Sci Am* 1999;5:101.

101. Brooks PC, Toi M, Miceli R, et al. Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994;79:1157.
102. Stromblad S, Cheresh DA. Cell adhesion and angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1996;6:462.
103. Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, et al. Bascular integrin $\alpha_v\beta_3$: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4:2625.
104. Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 1996;380:364.
105. Bischoff J. Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends Cell Biol* 1995;5:69.
106. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PI, et al. Upregulation of endoglin vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1995;1:1623.
107. Chang SS, Recuter VE, Heston WD, et al. Five different anti-prostate-specific membrane antigen (PSMA) antibodies confirm PSMA expression in tumor-associated neovasculature. *Cancer Res* 1999;59:3192.
108. Neri D, Carmemolla B, Nissim A, et al. Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nat Biotechnol* 1997;15:1271.
109. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998;95:365.
110. Uze G, Lutgalla G, Morgensen KE. α and β Interferons and their receptors and their friends and relations. *J Interferon Cytokine Res* 1995;15:3.
111. Tamm I, Lin SL, Pfeffer LM, et al. Interferons α and β as cellular regulatory molecules. In: Gresser I, ed. *Interferon* 9 London: Academic Press, 1987:13.
112. Rossi G. Interferons and cell differentiation. In: Gresser I, ed. *Interferon* 6 London: Academic Press, 1985:31.
113. Reznitzky D, Yarden A, Zipori D, et al. Autocrine β -related interferon controls c-myc suppression and growth arrest during hematopoietic cell differentiation. *Cell* 1986;46:31.
114. Strander H. Interferon treatment of human neoplasia: effects on the immune system. *Adv Cancer Res* 1986;46:36.
115. Ferrantini M, Proietti E, Santodonato L, et al. α 1-Interferon gene transfer into metastatic Friend leukemia cells abrogated tumorigenicity in immunocompetent mice: antitumor therapy by means of interferon-producing cells. *Cancer Res* 1993;53:1107.
116. Gresser I, Belardelli F, Maury C, et al. Injection of mice with antibody to interferon enhances the growth of transplantable murine tumors. *J Exp Med* 1983;158:2095.
117. Gutterman JU. Cytokine therapeutics: lessons from interferon α *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1198.
118. Johns TG, Mackay IR, Callister KA, et al. Antiproliferative potencies of interferons on melanoma cell lines and xenografts; higher efficacy of interferon- β *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1185.
119. Sica G, Gabbroni L, Castagnetta L, et al. Antiproliferative effect of interferons on human prostate carcinoma cell lines. *Urol Res* 1989;17:111.
120. Heyns AP, Eldor A, Vlodavsky I, et al. The antiproliferative effect of interferon and the mitogenic activity of growth factors are independent cell cycle events. *Exp Cell Res* 1985;161:297.
121. Friesel R, Komoriya A, Maciag T. Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma interferon. *J Cell Biol* 1987;104:689.
122. Ruszczak Z, Detmar M, Imcke E, Imcke E, et al. Effects of rIFN- α , β , γ On the morphology, proliferation, and cell surface antigen expression of human dermal microvascular endothelial cells in vitro. *J Invest Dermatol* 1990;95:693.
123. Hicks C, Breit SN, Penny R. Response of microvascular endothelial cells to biological response modifiers. *Immunol Cell Biol* 1989;67:271.
124. Orchard PJ, Smith GM, Woods WG. Treatment of hemangioendothelomas with interferon- α . *Lancet* 1989;2:565.
125. White CW, Sondheimer HM, Crouch EC, et al. Treatment of pulmonary hemangiomatosis with recombinant interferon α -2a *N Engl Med* 1989;320:1197.
126. Mitsuyasu RT. Interferon α in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Br J Haematol* 1991;79:69.
127. Kaban LB, Muliken JB, Ezekowitz RA, et al. Antiangiogenic therapy of a recurrent giant cell tumor of the mandible with interferon α -2a. *Pediatrics* 1999;103:1145.

128. Stadler WM, Kuzel TM, Raghavan D, et al. Metastatic bladder cancer: advances in treatment. *Eur J Cancer* 1997;33:23.
129. Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, et al. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:356.
130. Nanus DM, Schmitz-Drager BJ, Motzer RJ, et al. Expression of basic fibroblast growth factor in primary human renal tumors: correlation with poor survival. *J Natl Cancer Inst* 1994;85:1597.
131. Dinney CPN, Bielenberg DR, Reich R, et al. Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res* 1998;58:808.
132. Lode HN, Moehler T, Xiang R, et al. Synergy between an antiangiogenic integrin alpha antagonist and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;95:1789.
133. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 1995;95:1789.
134. Shaheen RM, Davis DW, Liu W, et al. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:5412.
135. Takahashi Y, Mai M, Wilson MR, et al. Site-dependent expression of vascular endothelial growth factor, angiogenesis and proliferation in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 1996;8:701.
136. Teicher BA. Potentiation of cytotoxic cancer therapies by antiangiogenic agents. In: Teicher BA, ed. *Antiangiogenic agents in cancer therapy*. Totowa, NJ: Humana Press, 1999;277.
137. Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, et al. Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p 185HER2/neu monoclonal antibody plus cis-platin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 1998;16:2659.
138. Chaplin DJ, Pettit GR, Parkins CS, Hill SA. Antivascular approaches to solid tumour therapy: evaluation of tubulin binding agents. *Br J Cancer* 1996;74(Suppl 27):S86.
139. Dark GG, Hill SA, Prise VE, et al. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res* 1997;57:1829.
140. Iyer S, Chaplin DJ, Rosenthal DS, et al. Induction of apoptosis in proliferating human endothelial cells by the tumor-specific antiangiogenesis agent combretastatin A-4. *Cancer Res* 1998;58:4510.
141. Huang X, Molema G, King S, et al. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science* 1997;275:547.
142. Frouge C, Guinebretiere JM, Contesso G, Di Paola R, Blery M. Correlation between contrast enhancement in dynamic magnetic resonance imaging of the breast and tumor angiogenesis. *Invest radiol* 1994;29:1043.
143. Cohen FM, Kuwatsuru R, Shames DM, et al. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging estimation of altered capillary permeability in experimental mammary carcinomas after X-irradiation. *Invest Radiol* 1994;29:970.
144. Pham CD, Roberts TP, van Bruggen N, et al. Magnetic resonance imaging detects suppression of tumor vascular permeability after administration of antibody to vascular endothelial growth factor. *Cancer Invest* 1998;16:225.
145. Wu CC, Lee CN, Chen TM, et al. Incremental angiogenesis assessed by color Doppler ultrasound in the tumorigenesis of ovarian neoplasms. *Cancer* 1994;73:1251.
146. Barlow CF, Priebe CJ, Mulliken JB, et al. Spastic diplegia as a complication of interferon alfa-2a treatment of hemangiomas of infancy. *J Pediatr* 1998;132:527.
147. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999;126:1149.
148. Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, et al. Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumor therapy. *Nature* 1998;394:287.
149. Baird A, Klagsbrun M. The fibroblast growth factors, proteins with a broad spectrum of biological activities. *Neurol Res* 1994;16:313.
150. Gimenez-Gallego G, Cuevas P. Fibroblast growth factors. *Cancer Cells* 1991;3:239.

151. Schmitt FC, Soares R, TGF-7a and angiogenesis. *Am J Surg Pathol* 1999;23:358.
152. Mooradian DL, Diglio CA, Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-B1 on rat heart endothelial cell anchorage-dependent and independent growth *Exp Cell Res* 1990;186:122.
153. Lamszus K, Laterra J, Westphal M, Rosen EM, Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) content and function in human gliomas. *Int J Dev Neurosci* 1999;17:517.
154. Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:21.
155. Yoshida S, Ono M, Shono T, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997;17:4015.
156. Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M, et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl acad Sci U S A* 1995;92:4606.
157. Bussolino F, Ziche M, Wang JM, et al. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colon-stimulating factors. *J Clin Invest* 1991;87:986.
158. Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Ziche M, Bicknell R, An angiogenic role for the neurokinin midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res* 1997;57:1814.
159. Jackson D, Volpert OV, Bouck N, Linzer DI. Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science* 1994;266:1581.
160. Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, et al. Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:735.
161. Sage EH, Pieces of eight: bioactive fragments of extracellular proteins as regulators of angiogenesis. *Trends Biol Sci* 1999;7:182.
162. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55.
163. Moore BB, Arenberg DA, Addison CL, Keane MP, Strieter RM, Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines. *J Lab Clin Med* 1998;132:97.
164. Dedhar S, Hannigan GE, Rak J, Kerbel RS. Extracellular environment and cancer. In: Tannock I, Hill RP (eds). *Basic science of oncology*. New York: McGraw-Hill, 1998;197.