

血管生成因子 VEGF 研究进展

王彦敏

【关键词】 血管生成诱导剂;血管内皮生长因子;肿瘤

【中图分类号】 R 73 【文献标识码】 A 【文章编号】 1002-7386(2010)11-1456-03

肿瘤是一种超过正常限度生长的组织,其发生发展及转移受到多种因素的影响。血管生成在肿瘤生长和转移中具有重要意义。肿瘤血管生长可分为前血管期及血管期。在前血管期,肿瘤细胞主要依靠弥散供养及排泄废物。虽肿瘤细胞增殖迅速,但增殖与凋亡处于动态平衡,肿瘤大小一般不超过 1~2 mm,可保持数月或数年不发生转移。肿瘤细胞一旦转变成血管生成表型,诱导血管生成进入血管期肿瘤获得血液供应,凋亡明显减少,肿瘤迅速增大并发生转移^[1]。肿瘤细胞必须具有血管生成表型后才能启动血管生成。其首要环节是肿瘤血管生成因子产生过多,使之与抑制因子失衡^[2]。目前发现的肿瘤血管生成因子及血管生成抑制因子有 40 余种。血管生成因子包括血管内皮细胞生成因子(VEGF/VPF),酸性及碱性成纤维细胞生成因子(aFGF、bFGF),血小板源性内皮细胞生成因子(PD-EGF),胎盘生成因子(PIGF),表皮生成因子(EGF),血管生成素(angiotensin),肿瘤坏死因子(TNF- α),白介素-8(IL-8),基质金属蛋白酶(MMP)等。主要由肿瘤细胞、巨噬细胞、纤维母细胞分泌。其中最主要的是 VEGF。

1 VEGF 生物学特征

1.1 VEGF 由 Leung 等首先从牛垂体滤泡细胞 cDNA 文库中用多克隆杂交系列分析克隆。它由某些肿瘤细胞分泌,通过与血管内皮上的相应受体结合促进内皮细胞增殖,同时可增加血管通透性使内皮细胞迁移,诱导肿瘤血管生成,维持肿瘤的继续生长,是目前发现的最强烈的血管生成因子,与诸多生理及病理过程有关。

1.2 VEGF 的结构与功能 人 VEGF 基因定位于染色体 6p21.3,为单一基因,全长 14 kb,由 8 个外显子、7 个内显子组成。编码产物为 34~45 kD 的同源二聚体糖蛋白。VEGF 经过转录水平的剪切,可产生 5 种异构体,根据氨基酸的长短依次命名为 VEGF145, VEGF165, VEGF121, VEGF189 和 VEGF206。其中 VEGF121 是一种弱酸性多肽,不与肝素结合;VEGF165 是碱性蛋白,与肝素的亲和力低,二者是以可溶性、自由扩散的形式被分泌的,易于到达靶细胞;而 VEGF145, VEGF165 和 VEGF206 则与肝素具有很高的亲和力,分泌后结合于细胞表面或细胞基质中,属于细胞相关性异构体。目前已证实 VEGF 是内皮细胞选择性有丝分裂原,除能增加内皮细胞胞浆内 Ca^{2+} 的浓度及使微血管(主要是毛细血管后静脉及小静脉)对大分子物质的通

透性增高外,尚能从多种途径使内皮细胞形态呈细长状并刺激其复制,刺激葡萄糖转运入内皮细胞,促使内皮细胞、鼠单核细胞和胎牛成骨细胞移位,能改变内皮细胞基因激活的模式,上调纤维蛋白溶解酶原激活剂(包括尿激酶型及组织型)及其抑制剂 PAI-I 的表达,诱导其他内皮细胞蛋白酶,间质胶原酶和组织因子的表达^[3]。VEGF 介导了许多生理性和病理性的血管生成,在组织血管增生时,其表达也增强。胚胎发育的组织处于分化状态下的细胞其表达高于成年和已分化完全的细胞。生理状态下,VEGF 可高水平地表达于胎盘,许多胚胎组织和一些有生理性血管增生的成人正常组织(如增生期子宫内膜)。此外,在动物和成人的正常肾小球细胞、心肌细胞、前列腺上皮、精液及肾上腺皮质和肺的某些上皮细胞也有低水平表达^[4]。病理状态下,在愈合中的皮肤伤口、银屑病、迟发性过敏反应、类风湿性关节炎的滑膜层细胞中均有 VEGF 的过度表达。

1.3 VEGF 受体 VEGF 的生物活性是与受体结合后发挥的,目前发现的 VEGF 受体有 5 种:VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(KDR/Krk-1), VEGFR-3(Flt-4), NP-1 和 NP-2。Flt-1, KDR, Flt-4 均是受体酪氨酸蛋白激酶(receptor tyrosine kinase, PTK),前两者主要在血管内皮细胞上表达,后者主要存在于淋巴管内皮细胞。NP-1 和 NP-2 为非酪氨酸蛋白激酶跨膜受体,含有长的胞外段和短的胞内段,不仅在内皮细胞表达,在某些肿瘤细胞内也有表达^[5]。VEGF 的主要生物学功能是通过 VEGFR-2 实现的。VEGFR-2 和 VEGF 结合后发生二聚体化且胞内的酪氨酸残基自身被磷酸化。VEGFR-2 已有 6 个自身被磷酸化位点被证实, Tyr-1054, Tyr-951, Tyr-996, Tyr-1059, Tyr-1175, Tyr-1214。这些位点的大部分功能未明,但已证实 Tyr-951 与 src 同源区-2 蛋白(src homology 2, SH2)结合有关, Tyr-1175 是磷酸酶 C- γ (PLC- γ)结合点^[6]。

1.4 VEGF 受体的信号通路与生物学效应

1.4.1 VEGF 提高血管通透性的信号通路:VEGF 最早是作为能提高血管通透性的细胞因子而被发现的。其机制是 VEGF 促进细胞膜上对小分子溶质有高通透性的小孔形成,但其信号通路仍不清楚。提高血管通透性,有利于纤维蛋白原和其他血浆蛋白外渗,沉淀于细胞质形成纤维凝胶,成为形成肿瘤基质和新生毛细血管网的基础。NO 和前列腺素(PGI₂)对调节血管通透性也很重要^[7]。环加氧酶(COX)和内皮细胞一氧化氮合酶(eNOS)抑制剂可以降低 VEGF 诱导的血管通透性增加。

1.4.2 VEGF 促进内皮细胞迁移的信号通路:基膜的降解对内皮细胞迁移非常必要,并且是病理性血管增生启动的关键环节。VEGF 能诱导 MMP 的表达,MMP 对 VEGF 诱导内皮细胞迁移起必要作用。此外 VEGF 尚可促进纤溶酶原激活剂及其蛋白质分解酶的释放,从而降解毛细血管基底膜,有利于受其刺激而增生内皮细胞迁移和趋化,诱使汇聚的微血管内皮细胞侵入纤维凝胶,形成管样结构或已存在的血管以发芽形式形成新生血管^[8]。一方面 VEGF 诱导大量新生毛细血管可为肿瘤的生长提供营养和带走代谢产物,另一方面 VEGF 可直接促进肿瘤细胞的生长。同时由于新生血管不成熟,管壁仅有一层内皮细胞,缺乏基底膜,内皮细胞间常有裂隙。再加上 VEGF 本身可提高血管通透性,并刺激内皮细胞释放胶原酶使肿瘤细胞与肿瘤组织分离脱落,为肿瘤的转移创造了条件。

1.4.3 VEGF 促进内皮细胞增殖的信号通路:VEGF 刺激内皮细胞 DNA 合成作用,主要是通过 VEGF-2 有效激活细胞外信号调节激酶(external-signal regulated kinase, ERK)。但是研究表明 VEGF 激活 ERK1/2 并不是按 Ras- Raf-1-MEK-ERK 的常规通路,而是通过不依赖的 Ras 蛋白激酶 C(PKC)-ERK 旁路途径介导细胞增殖^[9]。VEGF 引起磷脂酶 C- γ (PLC- γ)酪氨酸磷酸化,导致二脂酰甘油(DG)和三磷酸肌醇(IP3)的产生,从而激活 PKC 和钙动员。PKC 通过 Raf-1 和 MEK 调节 ERK1/2。VEGF 是通过不依赖 Ras 的通路激活 ERK,因此 PKC 的抑制剂可以抑制 VEGF 诱导 ERK1/2 和 MEK 激活。

1.4.4 VEGF 促进内皮细胞存活作用与抗凋亡作用的信号通路:VEGF 有促进内皮细胞存活作用与抗凋亡作用。其作用机制可能是 VEGF 通过磷脂酰肌醇-3 激酶(PI-3K)通路激活抗凋亡激酶 Akt/PKB 而发挥抗凋亡作用^[10]。VEGF 能诱导抗凋亡蛋白 Bcl-2(B-cell lymphoma/leukemia-2)及其家族成员 A1 的表达,并能抑制半胱天冬蛋白酶(caspase)家族的上游通路。

2 VEGF 与肿瘤血管形成

大量研究证实,实体肿瘤的进一步生长、浸润及血行转移有赖于肿瘤新生血管的形成。肿瘤血管生成是一个非常复杂的过程,大致分为三个步骤:(1)血管周围细胞外基质的降解;(2)内皮细胞的迁移、增殖;(3)毛细血管的分化吻合。VEGF 对血管生成的多个环节,如血管内皮细胞增殖、分化、迁移和管腔状结构的形成,血管内皮基底膜的降解等均有明显的促进作用。VEGF 提高血管通透性,有利于纤维蛋白原和其他血浆蛋白外渗,沉淀于细胞基质,形成纤维凝胶,成为形成肿瘤基质和新生毛细血管网络的基础。此外,VEGF 尚可促进纤溶酶原激活剂及其蛋白质分解酶的释放,从而降解毛细血管基底膜有利于受其刺激而增生的内皮细胞迁移和趋化,最后可诱使汇聚的微血管内皮细胞侵入纤维凝胶,形成管样结构或已存在的血管以发芽形式形成新生血管。一方面 VEGF 诱导大量新生毛细血管为肿瘤生长提供营养和带走代谢产物,另一方面 VEGF 尚可直接促进肿瘤细胞的生长。同时由于新生血管不成熟,管壁仅有一层内皮细胞,缺乏基底膜,内皮细胞间有裂隙,再加上 VEGF 本身尚可提高血管通透性,并刺激内皮细胞释放胶原酶使肿瘤细胞与肿瘤组织分离、脱落,为肿瘤转移创造了条件。

VEGF 及其受体的表达还受到 bFGF 的调控,bFGF 在体内外均能诱导 VEGF 的合成,还能上调 VEGF 受体 FLK-1 的表达。VEGF 及其受体在黑色素瘤、肺癌、乳腺癌等多种实体瘤中均高表达,与血管生成及肿瘤恶性程度相关,在血液系统的肿瘤中,VEGF 及其受体也与肿瘤血管生成密切相关。

3 肿瘤血管生成的研究方法

目前主要是利用抗血管内皮某些成分的单克隆抗体如抗细胞黏附因子、CD₃₄、CD₃₁及抗 FVIII-RA 的抗体来染色肿瘤内微血管并进行计数,现常用的是 CD₃₄,它能染色更多的血管,更有特异性。肿瘤血管生成具有异质性,主要发生在肿瘤原位或转移灶的周边部位。体内实验方法,一般是利用微血管丰富的组织,如兔角膜、仓鼠颊囊、鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)为实验材料来观察肿瘤血管生成;体外实验一般用细胞计数方法分析内皮细胞增殖,或在胶原和人工三维基底膜上接种内皮细胞以观察微血管形成。

4 以 VEGF 及其受体为靶点的抗肿瘤血管生成抑制剂

鉴于 VEGF 在肿瘤生长血管生成中的重要作用,以 VEGF 及其受体信号转导通路为靶点的血管生成抑制剂已有报道,部分药物已进入临床实验。通过抑制 VEGF 的分泌或阻断相应受体信号转导通路,可抑制内皮细胞的增生、迁移和血管生成。

4.1 反义核酸或干扰性 RNA 新近开展的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)技术和传统的反义核酸技术(Angiozyme)都可抑制 VEGF 的分泌,这项策略已成功的运用于神经胶质瘤、黑色素瘤等模型^[11]。

4.2 抗 VEGF 及其受体的单克隆抗体 应用 VEGF 及其受体的单克隆抗体,可封闭已分泌的 VEGF,阻断生长因子与其受体结合,抑制肿瘤血管生成和肿瘤生长^[12]。

4.3 可溶性受体 由于 sVEGFR 不具备跨膜区和细胞内酪氨酸激酶结构域,因此它与 VEGF 结合后不能产生信号传导,可运用 sVEGFR 竞争性结合循环 VEGF,消耗肿瘤细胞产生的 VEGF,阻断 VEGF 功能受体的信号转导,从而抑制 VEGF 诱导的生物学功能^[13]。

4.4 VEGF 片段 分离出来自于 VEGF 外显子 6 的含 12 个氨基酸的肽段,能够阻断 VEGF 与其受体 KDR 的结合,抑制 VEGF 对 MAPK 系统的激活,因而显示了抑制血管生成的活性^[14]。

4.5 小分子抑制剂 随着对 VEGFR 介导的信号转导通路的深入研究,出现了一些针对其信号转导的小分子抑制剂,在体内外都明显的抑制血管形成及肿瘤生长,SU5416 是 VEGFR2 磷酸化作用的抑制剂,可抑制肿瘤转移、微血管生成、增加肿瘤细胞凋亡。SU6618 是 VEGFR2 和 FGFR 的酪氨酸激酶抑制剂,动物实验证明,它能明显延长荷瘤小鼠的生存时间,使肿瘤组织微血管密度显著降低^[15]。

理论上,抗血管生成治疗只能控制肿瘤生长,并不能消灭肿瘤。因此需联合应用传统的化疗、放疗。如何合理联合应用这些治疗措施,有待进一步探讨。总之,血管生成是肿瘤生长转移过程中的关键步骤,血管生成因子又在其中起了重要作用。抗血管生成治疗作为抗肿瘤治疗的新方法具有广阔应用

前景。但目前仍面临许多问题,需进一步深入研究和探讨。

参考文献

- 1 许明月,赵发. VEGF 与肿瘤淋巴转移. 现代中西医结合杂志, 2008, 17:277-302.
- 2 李晓娟,纪淑红. VEGF 的结构特征及生物学功能. 中华临床医学研究杂志, 2007, 13:388-388.
- 3 宋鸿涛,耿敬妹,程慧. VEGF 及其受体 KDR 在胃癌组织新生血管中的作用. 实用肿瘤学杂志, 2006, 20:47-52.
- 4 项锋钢,沈毅. 肺癌血管内皮生长因子(VEGF)及其受体 KDR, Flt-1 的表达与患者预后的关系. 中国肺癌杂志, 2006, 9:257-259.
- 5 杨新杰,雷德林,张圃,等. CD147 和 MMP-2、VEGF 在腺样囊性癌侵袭转移中的作用. 实用口腔医学杂志, 2009, 25:372-375.
- 6 沙丹,何友兼. VEGF 及其受体 Flt-1、KDR 在鼻咽癌组织中的表达及意义. 癌症, 2006, 25:165-168.
- 7 韦华,郝晓柯,苏明权,等. 前列腺癌细胞株 VEGF 及其受体 KDR 的表达及意义. 现代肿瘤医学, 2006, 14:655-657.

- 8 倪效,燕敏. VEGF 受体功能研究进展. 生命科学, 2006, 20:26-28.
- 9 赵忠泽. 血管内皮生长因子(VEGF)及其受体在胶质瘤血管生成及侵袭中的作用. 中国医药导报, 2008, 5:113-115.
- 10 李佳宇,滕月娥,刘云鹏. 血管内皮生长因子及其受体表达与乳腺癌淋巴转移的相关性研究. 临床实验医学杂志, 2007, 9:332-336.
- 11 郑素军,林汝仙,王升启. 血管内皮生长因子受体-2 及其信号转导作用的研究进展. 国外医学药学分册, 2005, 32:161-180.
- 12 庄洪军,张全安,赵伟. 血管内皮生长因子及其受体与肝癌治疗的研究进展. 肿瘤研究与临床, 2008, 6:1618-1621.
- 13 何立丽,苏航,张伟京,等. 血管内皮细胞生长因子与抗肿瘤转移治疗的研究. 国外医学药学分册, 2006, 33:2118-2121.
- 14 何振辉,梁念慈. 以 VEGF 和 bFGF 及其受体为靶点的抗肿瘤血管治疗. 国外医学生理病理科学与临床分册, 2004, 24:162-166.
- 15 周忠江,叶海燕. 血管内皮生长因子靶向基因治疗. 国外医学心血管病分册, 2006, 29:1298-1301.

(收稿日期:2010-01-20)

· 综述与讲座 ·

葡萄糖逆转蛋白和 2 型糖尿病

张华 高怀林

【关键词】 糖尿病, 2 型; 葡萄糖逆转蛋白

【中图分类号】 R 587.1 【文献标识码】 A 【文章编号】 1002-7386(2010)11-1458-03

胰岛素抵抗和胰岛细胞功能障碍是 2 型糖尿病的病理生理特征,造成胰岛素抵抗的机制至今尚不清楚,可能与胰岛素的信号传导缺陷有关,尤其是葡萄糖逆转蛋白(GLUT4)的潜在缺陷, GLUT4 潜在的缺陷包括: GLUT4 转位受阻, GLUT4 的囊泡不能与细胞膜融合,隐蔽的 GLUT4 不能暴露于细胞外环境,以及囊泡虽融合但 GLUT4 活性下降等^[1],多种因素可以影响 GLUT4 的分布、含量、激活与功能^[2]。研究显示糖尿病小鼠 GLUT4 表达失常导致了胰岛素抵抗;在 DB/DB 大鼠模型中 GLUT4 过多表达可以明显改善糖尿病症状。国外一些研究证实了脂肪组织中 GLUT4 的表达增多可以改善全身的胰岛素抵抗状态^[3],因此 GLUT4 的研究对于揭示糖尿病的发病机制,寻找治疗糖尿病新出路有着非常重要的指导意义。

1 GLUT4 的结构分布

到目前为止,在哺乳动物组织中已经发现了 15 个分别由不同的基因编码的 GLUT 蛋白, GLUT4 是一种膜蛋白,分子量约 45~55 kU,基本结构由 12 个跨膜片段(M1-M12)组成,并且氨基端羧基端都朝向细胞内,中间有一段肽链相连,人类与大鼠 GLUT4 约有 95% 以上的核苷酸序列是相同的,提示 GLUT4 在进化上的保守性和功能上的重要性。 GLUT4 多存在于骨骼肌、心肌和脂肪组织中^[4],在这些组织中 GLUT4 主要对于胰岛素刺激后的葡萄糖的吸收起作用,并在运动时介导葡萄糖进入细胞。 GLUT4 在肌肉和脂肪组织的循环是独一无二的,在未受

胰岛素刺激的细胞中,90% GLUT4 分布在细胞内,如微粒体、高尔基复合体、管型囊等囊泡样结构中,即 GLUT4 储存囊泡 GS-Vs。当缺血、胰岛素治疗、压力负荷和缺氧等条件下,产生一系列信号传导至 GSV, GSV 被运至细胞膜并与细胞膜融合,释放 GLUT4^[5]。

2 GLUT4 在胰岛素信号转导通路中的地位和调节因素

2 型糖尿病胰岛素信号转导障碍可以发生在受体前水平、受体水平以及受体后水平三个不同的层次,以受体后水平的变化最为多见。胰岛素传导通路以 PI3K 途径为主,胰岛素经血液循环到达相应靶组织后,与其上的胰岛素受体(InsR)α 亚单位相结合,激活其 β 亚单位的内在激酶活性,导致 InsR 自磷酸化。磷酸化的 InsR 一方面为其它信号分子提供结合位点,另一方面其磷酸激酶可致胰岛素受体底物-1(IRS-1)磷酸化。IRS-1 被磷酸化后即暴露出特异性结合位点,能募集并激活含有 SH2 区域的蛋白质激酶磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K),使信号以激酶链式反应下传。IRS-1 通过激活 PI3K 激酶导致磷酸肌醇依赖的蛋白激酶(PDK1)的激活,后者可使蛋白激酶 B(PKB)磷酸化,PKB 被认为在胰岛素刺激 GLUT4 转位中起直接的作用,磷酸化的 PKB 可导致 GLUT4 的合成、分泌、移位等发生变化。 GLUT4 是直接影响葡萄糖入胞的细胞因子,对血糖的调节极其重要。 GLUT4 与葡萄糖转运缺陷、糖尿病慢性并发症、肥胖等疾病的发生及治疗关系密切^[6]。

3 GLUT4 和 2 型糖尿病的关系

3.1 GLUT4 和 2 型糖尿病发病率的关系 2 型糖尿病的发病

作者单位: 050091 石家庄市,河北以岭医院内分泌科