

血管内皮生长因子血管通透作用研究进展

邱彦, 芮耀诚(第二军医大学药学院药理教研室, 上海 200433)

摘要 目的:介绍近年来血管内皮生长因子血管通透作用机制研究的进展。方法:检索国内外文献资料并进行汇总、综述。结果:血管内皮生长因子与体内多种病理及正常生理过程有关。其血管通透作用机制与 Ca^{2+} 依赖性通道、血小板活化因子的合成、诱导内皮细胞穿孔、NO及前列环素、内皮细胞膜表面小凹介导等有关。结论:血管内皮生长因子可引起血管通透性升高,在心血管疾病机制研究及治疗方面具有广阔的开发和应用前景。

关键词 血管内皮生长因子;通透作用

中图分类号:R963

文献标识码:B

文章编号:1006-0111(2002)04-0228-04

最早认为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor)是一种由肿瘤细胞分泌并确实能引起血管通透性增加的蛋白^[1],这种蛋白后来被单独克隆,因其对内皮生长的有丝分裂原作用而被命名为血管内皮生长因子^[2],也称血管通透因子(VPF)或促血管素。最近的研究表明,VEGF不仅在血管发生、维持血管内皮完整性和通透性,而且在胚胎发育、创伤愈合、侧枝循环的建立及肿瘤发展中均有重要病理生理作用。尽管有许多证据表明血管通透先于或伴随着血管生长^[3],但VEGF/VPF在这方面的研究较少,本文将重点讨论VEGF的血管通透作用。

1 VEGF的结构

VEGF的结构具有高度保守性。它是一种由亚基内及亚基间二硫键交联形成的同型二聚体糖蛋白,分子量在34000~45000之间。它与血小板衍生生长因子有一定的同源性。最近研究发现,VEGF至少有3种形式:VEGF-A, B, C^[4]。其中对VEGF-A了解最多,通过对VEGF-A mRNA的差异剪接,可产生四种不同大小的VEGF多肽链,它们在人类细胞中氨基酸数分别为121、165、189及206(在鼠类相应为120、164、188及205)。其中,以165a VEGF单体在体内最为丰富且对其功能了解也最透彻。在人类,VEGF基因位于第六对染色体长臂上^[5,6],其基因组含有8个外显子,VEGF-121由外显子1至5及8等部分编码,VEGF-165另含有外显子7的编码,VEGF-189还含有外显子6部位的编码,VEGF-206则含有另一段插入编码区。它们的未成熟多肽链具有一段疏水的前导序列,因此可分泌到细胞外^[7]。

VEGF-189与VEGF-206有很强的肝素亲和力,这与他们所含的6、7编码序列有关,VEGF-121无肝素亲和力,而VEGF-165仅有较弱的肝素亲和力,所以VEGF-121到细胞外后呈可溶的游离状态,而VEGF-189和VEGF-206分泌出细胞后主要呈基质结合状态,VEGF-165的性质则介于两者之间。

2 病理生理

从VEGF/VPF的名称上来看,它最少有两种功能:①促进血管生长 ②提高血管通透性。近年来通过大量研究发现,其表达的增高与体内一系列病理及正常生理过程有关。

2.1 创伤愈合

微血管对血浆蛋白高渗是创伤愈合的一个主要特征。血管高渗起初仅发生在伤口边缘,随着角质形成细胞迁移覆盖到剥脱的创伤表面,高渗也发展到皮下肉芽组织,这种高渗在2-3d内达到最大值,并可持续7d。用免疫组化和原位杂交的方法检测发现,高渗期间,角质细胞和单核细胞中VEGFmRNA的表达量显著增强,且其表达时间与高渗及血管生长时间一致,提示VEGF是创伤愈合过程中一种重要的细胞因子^[8]。

2.2 胚胎发育

Kevin和Peters等人用RNase检测方法检测胎鼠、新生幼鼠及成年鼠中VEGF受体flt1mRNA的含量后发现,胎鼠的总体表达率较低,但在器官生成时flt1有两个表达高峰,而在新生幼鼠和所有成年鼠的某些器官高表达,这些器官包括脑、心、肾及肺^[9]。

2.3 糖尿病视网膜病

血-视网膜屏障的破坏是糖尿病视网膜病的标

志,但其具体的分子机制不详。闭合连接是细胞间紧密结合的细胞膜组成部分,它起着调节血-视网膜屏障通透的作用。David 等人用分子量为 66Kda 的异硫氰酸荧光素-牛血清白蛋白(FITC-BSA)和分子量 10Kda 的罗丹明-葡聚糖(R-D)来检测血-视网膜屏障(B-R-B)通透性。他们发现,用 $0.12\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ 或 $12\text{nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ VEGF 与牛视网膜内皮细胞共孵育 6h 后,能使 B-R-B 降低 46~54%。糖尿病视网膜病患者玻璃体中 VEGF 的增加能通过下调闭合连接而起到提高通透性的作用^[10]。

2.4 心血管疾病

VEGF mRNA 在人类正常心脏的血管内没有发现其表达,但在心肌细胞中发现其存在。而当心肌梗死时,VEGF 及其受体 mRNA 在坏死区附近的小静脉平滑肌细胞中的表达明显高于心肌细胞,提示急性心肌梗死时,VEGF 在血管及基质形成方面有重要作用,此外,人们还发现 VEGF 对外周血管的增生及侧支循环的建立也有重要作用^[11]。

2.5 肿瘤生成

VEGF 本身就是肿瘤研究过程中发现的,其对肿瘤作用已得到公认。VEGF 通过血管生长,提高蛋白通透,增强肿瘤组织的血供及基质形成,从而促进了肿瘤的形成和发展。

3 血管通透性作用及其机制研究

VEGF 引起血管内皮通透性增高的机制目前仍不十分清楚,对 VEGF 诱导血管生长及炎症作用之间的关系也知之甚少。目前已知 VEGF-A 与内皮细胞上两种特异受体作用,它们是 VEGF-R1(也称 fms 样酪氨酸激酶-1 即 flt-1)^[12] 和 VEGF-R2(也称激酶插入区受体即 KDR^[13],在鼠类相应为胎肝激酶即 flk-1^[14])。这两种受体均为膜受体,同属受体酪氨酸激酶,基本只存在于血管内皮细胞中。对 VEGF 通透机制的研究主要在以下几个方面:

3.1 Ca^{2+} 依赖性通道

VEGF 有两种不同的信号转导途径,VEGF-R1 和 VEGF-R2 能分别通过有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导途径传导信号。其过程可能为先活化小 GTP 结合蛋白 Ras^[15],然后活化 Raf,最后是 MAPK 级联,但这条途径的活化是否与毛细血管的通透性升高有关不详。VEGF-R1 和 VEGF-R2 的第二条信号转导途径是通过升高 Ca^{2+} 浓度来实现。VEGF-R2 的活化可导致磷酸化酶 Cr 的酪氨酸磷酸化作用,释放 1,4,5-三磷酸肌醇,促进体内钙的释放。体外实验已证明 VEGF 确实能导致内皮

细胞的 Ca^{2+} 浓度增加,且内皮细胞的 Ca^{2+} 浓度升高与体内、外通透性升高确实有关,尽管并非所有情况均如此。Bates 等人在减弱 Ca^{2+} 流的条件下,用 VEGF 灌注蛙肠系膜微血管,并检测其水压传导率(Lp)—发现,VEGF 第 1 次连续灌注可增加 Lp5.0 倍,而第 2 次为 7.8 倍,两者间并无显著性差异。然而在去极化条件下(膜电位为 -10mv 却 58mMK⁺),Lp 增高从 11.1 倍减到 5.6 倍,在 0mv (100mMK⁺)减到 2.8 倍。加入镍离子减弱钙流同样导致 Lp 增高值的降低(从 13 倍减到 2.5 倍)。因此可认为 VEGF 是通过增加钙流来提高 Lp 的^[16]。但这种钙流的增加而导致通透性的升高是否为 VEGF 长期效应的开关或另有信号转导途径仍有待研究。

3.2 血小板活化因子的合成

众所周知,血管内皮不仅仅是血液与其他组织间的简单物理屏障,这些多功能细胞在不同刺激下能通过释放或合成多种介质来严格控制管腔内的平衡、血液凝固、炎症反应及血管生成。尽管 VEGF 和其他生长因子,包括成纤维生长因子(aFGF 和 bFGF)、表皮生长因子(EGF)及转移生长因子- α 、- β 都能诱导内皮细胞增殖及血管合成,但只有 VEGF 能诱导 PAF 的合成及增加血管蛋白的通透。VEGF 能激活 Ras 依赖和 Ras 非依赖信号传导途径,导致细胞间钙离子浓度快速升高,诱导磷酸化酶 A₂ 活化。在不同的细胞中,用 VEGF 刺激几分钟后,有花生四烯酸及 PAF 释放。小鼠静脉注射 VEGF($0.001 \sim 0.1\text{nmol} \cdot \text{kg}^{-1}$)可导致剂量依赖性蛋白外流,为对照组的 177%。VEGF 本身并非炎症因子,不能直接引起炎症反应,但静脉注射 VEGF 引起急性蛋白外渗,这种给药模式转变而引起的反应被认为是 VEGF 介导的炎症反应。VEGF 在某些组织,体内血管通透性的增高可被选择性 PAF 受体阻滞剂完全清除。在培养的牛主动脉内皮细胞中,VEGF(剂量为 10^{-11} 到 10^{-9}M)可使 PAF 合成提高 20 倍,因此认为 VEGF 增加血管通透性与其诱导 PAF 合成有关。尽管 VEGF 介导炎症反应依赖于 PAF 的合成,但其有丝分裂原作用与此无关^[17]。

3.3 诱导内皮细胞穿孔

穿孔是内皮细胞膜上与血管通透有关的特异性微区,它们常发生在血流较缓区域的内皮细胞上,直径约 60nm。内皮细胞穿孔多见于内分泌组织,如胃肠道、肾小球、脑的一些特殊区域如脉络丛,组织外室如多种肿瘤等。而在连接组织如肌肉、皮肤、肺

和脑,则没有发现穿孔。大鼠静脉注射 VEGF10min 后发现提肌及皮肤的血管内皮穿孔。这些血管不仅包括静脉,还包括除毛细血管静脉外的毛细血管及动脉。后者正常情况下是不发生穿孔的^[18]。体外共培养脉络丛及肾小球上皮细胞发现,VEGF 诱导穿孔。用 VEGFcDNAs 转染的上皮细胞高表达 VEGF,并诱发高于对照 7-8 倍的穿孔。用纯化人重组 VEGF 作用于内皮细胞诱导穿孔高于对照 10 倍。这表明 VEGF 是特异性穿孔诱导剂,其诱导穿孔的机制可能与一种被称为囊泡小体(VVO)的细胞器有关。VVO 横跨在内皮细胞的管腔内、外侧面,可容纳血管内大分子物质通透至血管外。在 VEGF 刺激下,小凹样囊泡聚集融合,伴随着 caveolin-1(一种公认的内皮细胞表面小凹标记蛋白)减少,形成 VVO 及穿孔,促进大分子物质跨膜转运,提高通透性^[19]。关于内皮细胞表面小凹的修饰及穿孔间的关系及穿孔形成的信号转导机制有待于进一步研究。

3.4 NO 及前列腺素

有研究表明,VEGF 诱导的血管通透可被 NO 合成酶抑制剂、环氧化酶抑制剂吲哚美辛及酪氨酸激酶抑制剂抑制。胎盘生长因子(只与 flt-1/VEGF-R1 结合而不与 flk-1/KDR/VEGF-R2 受体酪氨酸激酶结合)不增加通透性,其他生长因子如成纤维生长因子(aFGF、bFGF)、血小板衍生生长因子 PDGF-BB、转移生长因子- β 等均不引起通透性增高。体外研究证实,VEGF 促进血管内皮细胞 NO 及前列腺素合成,血管松弛,通透增加。单独给 NO 供体(SNP 或 SNAP)或前列腺素均不引起血管内皮通透,将 SNP 与 taprostene(一种稳定的前列腺素类似物)联合应用,可使通透升高。这些结果提示,NO 和前列腺素是作为 VEGF/VPF 及其受体 flk-1/KDR/VEGF-R2 之间的介质而产生诱导血管通透作用的^[20]。

3.5 内皮细胞膜表面小凹介导

VEGF 代表了一种决定血管系统生长、分化及环境适应的旁分泌信号系统^[21]。在研究 VEGF 体外对人内皮细胞单层通透性的影响时发现,VEGF 能在增加水压传导率(Lp)20 倍的情况下同时降低白蛋白反射系数(RC),说明 VEGF 是通过直接作用于内皮细胞而产生增加通透作用的。其机制可能为增加滤过压,活化 VEGF 相关炎性细胞,介导 P-选择素表达从而减弱内皮细胞屏障功能^[22]。VEGF 增加血管内皮通透的细胞途径与膜表面小凹有关。

对培养的牛视网膜微血管内皮细胞通透功能及其相应超微结构的生物鉴定证实 VEGF 提高血管内皮通透是通过膜表面小凹进行的,这是一条 NO 合成酶(NOS)依赖的跨膜转运途径。双标记分析及密度测定发现 Flk-1/KDR, eNOS 与小凹标记蛋白 caveolin-1 共定位于膜表面小凹且密度很高。主动脉内皮与视网膜内皮结果相似。这些结果说明 NOS 依赖的膜小凹跨膜转运是 VEGF 增加血管内皮通透的重要机制之一^[23]。

此外,缺血、缺氧、激素、NO、肝素等也可影响 VEGF 的血管通透效应^[24,25]。

4 展望

近年来,有关 VEGF 的研究进展迅速,如果能利用 VEGF 在生理性及病理性过程中的血管增生、血管通透作用来进行临床治疗的研究,将为广大患者带来福音。目前,VEGF 已经在动物实验和临床治疗上取得了初步成果:如心血管方面,可通过 VEGF 促进新生血管的形成、侧支循环的建立来改善心肌缺血,防治再狭窄,甚至在心脏和血管移植方面均有重要作用^[26];肿瘤治疗方面,VEGF 的中和抗体能抑制肿瘤的生长和移植^[27],这为针对 VEGF 的抗血管治疗方案的制订奠定了基础。对 VEGF 的深入研究,将有助于进一步了解血管生长、发育和损伤修复的详细过程,推动我们对许多疾病如治疗、动脉硬化等的认识,进一步提高医疗水平。

参考文献:

- [1] Senger DR, Galli SJ, Perruzzi CA, *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* [J]. 1983, 219:983.
- [2] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, *et al.* Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* [J]. 1989, 246:1306.
- [3] Daorak HF, Brown LF, Detmar M, *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, Microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* [J]. 1995, 146:1029.
- [4] Ferrara N, Hoack KA, Jakeman LB, *et al.* The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* [J]. 1991, 47:211.
- [5] Vincenzi V, Cussano C, Rocchi M, *et al.* Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* [J]. 1996, 93:1493.
- [6] Wei MH, Popescu NC, Lerman MI, *et al.* Localization of the human vascular endothelial growth factor gene, VEGF, at chromosome 6p12. *Hum Genet* [J]. 1996, 97:794.
- [7] Claffey KP, Senger DR, Spiegelman BM, *et al.* Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochem Biophys Acta* [J]. 1995,

1246;1.

[8] Lawrence FB, Yao KT, Brygida B, *et al.* Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* [J]. 1992, 176:1375.

[9] Peter KG, De Vries, and Williams LT. Vascular endothelial growth factor receptor exoression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci* [J]. 1993, 90:8915.

[10] Dabvid AA, Alistair JB, Sonny K, *et al.* Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content. *Vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells.* *Diabetes* [J]. 1998, 47:1953.

[11] 钱孝贤, 余步云. 血管内皮生长因子与心血管疾病, 国外医学内科学分册 [J]. 1999, 26(4):155.

[12] De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, *et al.* The *fn5*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* [J]. 1992, 255:989.

[13] Terman BI, M Dougher-Vermazen, Carrion ME, *et al.* Identification of the KDR tyrosine as receptor for vascular endothelial cells growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* [J]. 1992, 187:1579.

[14] Quinn D, Peters KG, De Vries C, *et al.* Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* [J]. 1993, 90:7533.

[15] Guo D, Jia Q, Song HY, *et al.* Vascular endothelial cells growth factor ponotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* [J]. 1995, 270:6729.

[16] Do Bates and Carry FE. Vascular endothelial growth factor increase microvascular permeability via Ca^{2+} -dependent pathway. *Am J Physiol*, 1997, 273(Heart Circ Physiol 42) [J]. H687.

[17] Sirois, Martin G, and Elazerk E. Vascular endothelial growth factor effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activing factor. *Am J Physiol*, 1997, 272(Heart Circ Physiol 41) [J]. H2746.

[18] Roberts WG and Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor, *J of Cell Sci* [J]. 1995, 108:2369.

[19] Sybille E, Wolburg K, Wolburg H, *et al.* Vascular endothelial growth factor induce endothelial fenestration in vitro. *J Cell Bio* [J]. 1998, 140:947.

[20] Toyook M, Jeffrey RH, Marcy Silver BS, *et al.* Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via Nitric Oxide and prostacyclin. *Circulation* [J]. 1998, 97:99.

[21] Millaner B, Wizigmann-Voos S, Schnurch R, *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* [J]. 1993, 72:835.

[22] Hippenstiel S, Krull M, Ikeman A, *et al.* VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol*, 1998, 274(Lung Cell Mol Physiol 18) [J]. L678.

[23] Feng Y, Venema VJ, Venema RC, *et al.* VEGF-induced permeability increase is mediated by cavedas. *Invest-Ophthalmol-Vis-Sci* [J]. 1999, 40(1):157.

[24] Yukichi Okuda, Kazuki Tsaramam, Seiji Suzuki, *et al.* Hypoxia and endothelin-1 induce VEGF production in human vascular muscle cells. *Life Science* [J]. 1998, 63(6):477.

[25] Gu JW, Thomas HA. Hypoxia-induced expression of VEGF is reversible in myocardial vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1997, 273(Heart Circ Physiol 42) [J]. H628.

[26] 吴翔, 倪润洲, 吴扬, 等. 心肌缺血对血管内皮生长因子的基因表达. *中国循环杂志* [J]. 1997, 12(4):301.

[27] Borgstrom P, Hillan KJ, Sriramarao P, *et al.* Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy form intravitral videomicroscopy. *Cancer Res* [J]. 1996, 56:4032.

收稿日期:2001-12-14

川芎、当归超临界 CO₂ 萃取液对犬血液动力学的影响

张旭静¹, 范柳¹, 曹奕丰¹, 冯春红¹, 王春安², 王桂清¹ (上海市脑血管病防治研究所, 上海市 200433; 第二军医大学生理学教研室, 上海市 200433)

摘要 目的:观察不同剂量的 CO₂ 超临界川芎、当归萃取液对犬脑血液动力学的影响。方法:各实验组十二指肠给药(5ml·kg⁻¹)后记录其脑血流量及血压的改变,并将同组各动物对应的脑血流量、血压进行统计学处理。结果:给川芎、当归萃取液及阳性药物(脑安胶囊),脑血流平均变动幅度与溶剂对照组相比,具有显著性差异,而平均血压变动无显著性差异。结论:川芎、当归萃取液对脑血液动力学有影响,可使犬脑的血流量显著增加,而对血压没有明显的作用。

关键词 川芎;当归萃取液;犬脑血流量;血压

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:1006-0111(2002)04-0231-03