

肿瘤血管形成的分子调控机制

李 涛,孙才兴

(浙江省肿瘤医院,浙江 杭州 310022)

摘 要:恶性肿瘤最显著的表型是肿瘤细胞的失控性生长及异常血管增生。传统的手术、放疗及化疗主要是对恶性肿瘤细胞的杀伤和控制,但少有临床治愈。通过抑制血管形成可能治愈肿瘤的假设已日趋完整。近 30 年的研究表明,无论是生理性还是病理性血管形成,均是由约数十种经典及非经典的正性和负性调节因子共同参与、激活血管形成开关调控的。

关键词:恶性肿瘤;血管形成;分子调控

中图分类号:R730.231 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2014)01-0044-05

doi:10.11735/j.issn.1004-0242.2014.01.A011

Molecular Mechanism of Angiogenesis in Tumor

LI Tao, SUN Cai-xing

(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: The hallmarks of the malignancies are uncontrolled growth of tumor cells and excessive neovascularization. The traditional therapeutic modalities such as operation, radiotherapy and chemotherapy are based on the concept of killing tumor cells. However, rare tumors can be cured clinically. The hypothesis of anti-angiogenesis for treating tumor has been systemic and full of findings. The discovery of angiogenesis studies indicates that a number of classical and non-classical regulators, both positive and negative, form a complex regulation network and participate in the angiogenesis switch process.

Key words: malignancy; angiogenesis; molecular regulator

恶性肿瘤最显著的表型是肿瘤细胞的失控性生长及异常血管增生。从肿瘤的恶性表型不难发现,治疗肿瘤应着眼于对恶性肿瘤细胞的控制及异常血管增生的控制。传统的手术、放疗及化疗主要是对恶性肿瘤细胞的杀伤和控制。1971年,Folkman等^[1]提出通过抑制血管形成可能治愈肿瘤的假设。由于恶性肿瘤的快速生长依赖于新生血管的建立,血管生成是肿瘤生长、转移的必备条件,因此研究肿瘤血管形成对了解恶性肿瘤发生、发展、侵袭和转移的生物学行为和机制,以及抗肿瘤血管形成有重要的理论意义和临床应用价值。本文就血管形成的基本表现形式及其分子调控机制作一综述。

收稿日期:2013-09-02;修回日期:2013-10-08

基金项目:浙江省自然科学基金(LY12H16032)

通讯作者:孙才兴,suncaixing@gmail.com

1 血管形成的表现形式及可能机制

血管新生是包括内皮细胞的激活、增殖、迁移、血管基底膜的破坏、血管和血管网的形成,以及先前存在的血管连接等复杂过程。血管新生分为两种:angiogenesis和vasculogenesis。前者指的是原有血管如毛细血管或毛细血管后静脉的基础上形成新的毛细血管网^[2],也可通过出芽或非出芽方式(由大的窦样毛细血管分裂成更细小毛细血管的过程)。它既可以发生在胚胎期,也可以发生在出生后。而后者是指血管母细胞形成之前的中胚层分化发育过程,因此它仅见于胚胎形成的早期,而不包括出生后的血管形成。目前发现血管内皮祖细胞(CEPs)参与多种形式的血管形成(如胚胎早期发育的血管化、肿瘤的血管形成)等。出芽性血管形成是一个多步骤、高度协

调的过程,包括血管出芽、细胞迁移增殖、管状结构形成和存活。可分为以下5步^[2]:①基底膜降解,由蛋白溶解酶如金属蛋白酶(MMPs)和内皮细胞(ECs)分泌的纤溶酶原激活物对血管基底膜进行降解,导致微小的出芽进入到细胞外基质(ECM);②出芽顶端的ECs向血管形成刺激物迁移;③内皮细胞在新芽下增殖;④血管环(loop)管状化、分枝化后形成功能性血管网;⑤血管外的周细胞或平滑肌细胞(VSMCs)对血管壁的支持。这些血管网形成后,血管发生重构(remodeling),并相继形成小血管如小动静脉后毛细血管,和更大的血管如动、静脉。

2 血管形成的经典分子调控过程

目前认为,无论是生理或病理条件下的血管形成,均受到许多“经典”分子如血管内皮生长因子-1(vascular endothelial growth factor-1, VEGF1),成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2),转化生长因子(transforming growth factors, TGFs),血管生成素(angiopoietins, Angs),血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF),凝血酶蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1),血管抑素(angiostatin)和内皮抑素(endostatin)等的调控。

2.1 血管形成初始应答的调控

无血管期肿瘤仅靠弥散方式获取养分和营养物质,当肿瘤长到2~3mm³大小时,肿瘤便处于缺氧状态,尤其是肿瘤内血管通透性增高,导致组织间隙压力增高,血流灌注下降致缺氧加重。在低氧及缺血条件下,血管形成立即开始。缺氧调节血管生成是通过缺氧诱导转录因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF1 α)的增多实现的^[3]。在血管形成中,受HIF系统调节的主要是VEGF,同时FGF及Angs和其他血管增生因子也表达增高,引起血管内皮细胞的增生,形成新的血管,以满足自身的营养供应。同时缺氧使VEGFR表达上调。VEGF不仅能使血管扩张、增加血管的通透性,同时还能诱导蛋白酶和一些受体的表达,有助于细胞侵袭、组织重构和内皮细胞凋亡的减少。VEGF表达的调控较为复杂,一般认为缺氧是导致肿瘤细胞增加VEGF mRNA表达的重要原因;突变的p53基因通过TPA激活蛋白激酶C(PKC),诱导VEGF表达;野生型p53以剂量依赖方式下调

VEGF的表达;v-src基因的过度表达可上调VEGF表达,但当野生型p53存在时则不能使VEGF启动子基因转录;突变的Ras癌基因可上调VEGF的表达,Ras表达蛋白抑制剂明显降低了VEGF的活性;VHL基因对VEGF表达的调控作用与p53相似^[4]。内皮细胞激活后有赖于MMPs对ECM的降解作用,后者同时受到其抑制剂(TIMPs)的相互作用^[5]。

2.2 内皮细胞迁移和增殖调控

一般认为,VEGF改变了内皮细胞基因的活化形式,上调u-PA和t-PA的表达,诱导内皮细胞表达蛋白水解酶和组织因子,从而诱导了血管形成。蛋白水解酶能降解纤维连接蛋白、层黏连蛋白和蛋白多糖的蛋白中心,同时激活MMPs,诱导FGF-2和bFGF从ECM池进入反应区域。FGF家属是促进血管形成的一类分子。FGF包括18kd的小分子量和22~24kd大分子量两种形式。在血管形成过程中,低分子量FGF连接内皮细胞,诱导FGF-R下调,增加内皮细胞移动、增殖和蛋白酶活性,介调整合素水平。高分子量FGF-2能促进内皮细胞增殖^[7]。正常情况下,FGF-2连接于ECM中的蛋白多糖的肝素分子表面而失活。研究表明一种FGF-2连接蛋白连接于FGF-2后使其释放后发挥其生物学作用。VEGF同时通过NO及cGMP介导的MAPK激活而产生内皮细胞增殖。

整合素是一种跨膜黏附分子,有 α 、 β 亚单位组成,通过其短肽序列与ECM蛋白或细胞表面配体结合。整合素介导的细胞黏附对生长调节有两方面作用,首先整合素能影响有细胞周期素依赖复合体(CDKs)组成的细胞周期的基本运转,其次,整合素对锚依赖性(anchorage-dependent)细胞死亡起关键作用。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 通过暴露其三肽(Arg-Gly-ASP)复合体而介导细胞粘附于玻连蛋白(vitronectin)、纤维黏连蛋白(fibronectin)、层黏蛋白(laminin)、胶原、vWF或骨桥蛋白。整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在静止的内皮细胞很少表达,而在激活的内皮细胞明显上调,从而对血管形成其重要作用^[6]。

ECM成分也参与了内皮细胞的形态和功能的调节,如TSP1, laminin和SPARC等。

TSP1是一种在血小板和细胞外基质中发现的抗血管形成蛋白,粘附于细胞表面的受体整合素 $\alpha_v\beta_3$,干扰内皮细胞形成新的血管,TSP1活化fyn,

src 酪氨酸激酶导致内皮细胞的凋亡。有 TSP1 的存在,内皮细胞对血管形成的刺激信号就无反应。TSP1 基因转染于乳腺癌细胞使 TSP1 过度表达,使乳腺癌细胞丧失血管形成能力。不同浓度的 TSP1 对血管的作用不同,TSP1 既可促进血管形成又可抑制血管形成,在可溶性状态下能抑制内皮细胞的增殖,而在与基质连接状态下则能促进内皮细胞增生^[7]。而且,TSP1 能连接并激活 TGF β ,进而影响蛋白酶的活性和细胞的生长、迁移和分化。在侵袭性膀胱癌中,TSP1 低度表达与肿瘤复发、OS 下降及高微血管密度相关,表明 TSP1 有一定的抗血管形成作用;与 OS 下降及高微血管密度相关,表明 TSP1 有一定的抗血管形成作用^[8]。Laminin 是另一个 ECM 蛋白,能促进内皮细胞粘附、内皮细胞生长、蛋白酶分泌并与其他 ECM 成分如整合素相互作用^[9]。SPARC 也叫 BM40 或骨连接蛋白,其在内毒素刺激、热休克等应急状态下表达增高。SPARC 在食管癌、皮肤黑色素瘤均表达升高,另外在内皮细胞损失及激活时均有过度表达,表明其在组织修复重塑和血管形成中起重要作用^[10]。

2.3 内皮细胞的成熟调控

内皮细胞与 ECM 及间质细胞间的相互作用是血管形成的先决条件。因此在内皮细胞完成增殖、成熟和血管腔形成后,必须招募大量的周细胞共同参与构建血管壁。内皮细胞通过合成分泌 PDGF 完成这一过程,PDGF 能趋化大量间质细胞及原始周细胞,原始周细胞通过与内皮细胞接触方式完成向周细胞转化;另一个由内皮细胞及周细胞分泌的分子 TGF- β 被纤溶酶激活。TGF- β 能诱导肌纤维母细胞和周细胞,有助于血管的成熟。

Ang1 和 Ang2 是两个与血形成密切相关的蛋白,Ang1 促进血管生长,表达于内皮细胞及其前体和肿瘤细胞。Ang2 抑制血管生长,只表达于内皮细胞。Tie2 是二者共有的 EC 特异性酪氨酸激酶受体,Ang1 使 Tie2 磷酸化,而 Ang2 则抑制 Tie2 的磷酸化。Tie2 调节 EC 与周围细胞的相互作用形成管腔结构。Tie 受体家族中还有 Tie1。实验表明,flt1, Tie1 和 Tie2 中任一基因的剔除都能导致胚胎因血管发育异常而死亡,可见其在血管形成中的重要作用。在血管形成过程中 Angs 和 VEGF 相互作用,相互补充^[8]。VEGF 首先通过 Flk1/KDR 启动内皮细胞

的分化,增生和原始血管形成,随后 Ang1 通过 Tie2 受体改建这些原始血管,通过内皮细胞和周围支持细胞的相互作用使血管保存稳定,而 Ang2 主要在血管重构的部位出现,阻断 Ang1 的血管稳定作用。当 VEGF 缺乏时 Ang2 可引起明显的血管萎缩,但在高浓度 VEGF 时,这种抗血管稳定作用则变为促进新血管形成;在肿瘤组织中,缺氧诱导的 VEGF 通过启动血管形成而促进肿瘤生长^[11]。肿瘤血管形成大大改善了肿瘤的血供供应并带走代谢产物,从而促进肿瘤的生长,同时新生的微血管发育不完善,基底膜不完整,更易被肿瘤细胞穿过而出现转移。肿瘤组织中微血管密度已成为一个独立的预后指标,与转移和生存率密切相关。

Angiostatin 和 Endostatin 是由 Folkman 实验室发现的重要的内源性血管形成抑制因子,有明显抗肿瘤作用和抗肿瘤血管作用^[12,13]。Angiostatin 是纤维蛋白溶酶原 N 末端的降解片段,分子量 38kD。Endostatin 是胶原 XV III C 端片段的降解片段,分子量 20kD,其作用依赖于锌原子,作用于细胞微丝 fibulin1 和 fibulin2;Angiostatin 和 Endostatin 的作用机制尚不明。内皮抑素发挥抗肿瘤作用主要通过抑制肿瘤新生血管形成来完成,同时,有研究报道 Endostatin 通过活化的 caspase-3 和 BCL-2/Bax 比例减少诱导细胞的凋亡^[14]。

Bodhm 等^[15]报道用 Endostatin 治疗皮肤癌、纤维肉瘤和黑色素瘤,第一疗程肿瘤缩小 90%,停药后 5~14d 肿瘤增长至治疗前大小,再用药后又缩小,如此反复数次,肿瘤未产生耐药性,用 Endostatin 6 个疗程后肿瘤细胞的特征不改变,停药后肿瘤不复发;而对照组肿瘤细胞对环磷酸胺迅速产生耐药。说明 Endostatin 是有价值的抗肿瘤药。

3 血管形成的非经典分子调节

除了上述血管形成因子参与了血管形成,还有其他非经典分子如许多内源性多肽红细胞生存素(erythropoietin,EPO),血管紧张素 II (angiotensin II,ANG-II),内皮素(endothelins,ETs),尿紧张素 II (Urotensin -II),肾上腺髓质素原 N 端 20 多肽(proadrenomedullin N-terminal 20 peptide,PAMP)等参与血管的形成与调节。它们能通过激活血管周围

细胞产生一些促进血管形成或受体调节的因子,直接或间接作用于内皮细胞、促进血管增殖、分化及成熟。

EPO 是相对分子质量为 30.4kD 的糖蛋白,为促进骨髓红系祖细胞生长、增生、分化和成熟的主要刺激因子,它与幼红细胞表面红细胞生成素受体(EPOR)结合后,与 EPOR 形成二聚体,再通过 JAK/STAT 和 Ras/MAPK 等信号传导途径调节红系的增生和分化。研究证明 EPO 主要作用于红系祖细胞阶段,其作用可能是通过对决定血红蛋白合成的遗传基因去阻遏因子的作用而实现的。EPO 能刺激 ECs 的增殖及迁移,降低 ECs 的凋亡,目前认为其促血管形成能力与 FGF-2 及 VEGF 相当,同时 EPO 能促进 ET-1 的释放^[16]。

ANG-Ⅱ 是一种十八肽激素,通过其刺激醛固酮和血管加压素释放,产生心血管组织生长和神经元交感活性进而调节血压、血浆容量和电解质平衡。血管紧张素通过作用于同属于 G 蛋白耦联受体超家族成员的 ANG Ⅱ 1 型受体(AT1 受体)和 ANG Ⅱ 2 型受体(AT2 受体)而发挥其作用。研究表明 ANG-Ⅱ 在 CMA 模型及兔角膜上有促进血管形成的作用。ANG-Ⅱ 促进 ECs 生长的作用有 AT1R 介调,但受到作用相反的 AT2R 调节。封堵 AT2R 后能增加 ANG-Ⅱ 在皮下海绵状肉芽肿的血管形成^[17]。

Sasaki 等^[18]发现 AT1R 在缺血诱导的血管形成中有重要作用,在 AT1R 野生型鼠下肢缺血模型中观察到同侧有良好发育的血管和新生血管形成,而在 AT1RKO 鼠中血管反应明显减少。ANG-Ⅱ 还通过自分泌和旁分泌机制促进 ET-1 一起分泌。研究同时表明 ANG-Ⅱ 可诱导 VSMCs 的 VEGF 表达。

ET 是一类内源性的肽类物质,由血管内皮细胞产生,包含 ET1、ET2 和 ET3 三种多肽,ETs 通过两种 GPRs,即 ETA-Rs 和 ETBRs 而起作用,两者潜在的连接 ETs 作用如下:ETA-R,ET-1=ET-2>ET-3;ETB-R,ET-1=ET-2=ET-3。研究表明,ECM 能调节 HUVECs 分泌 ET-1。胶原Ⅳ下调 ET-1 分泌,而胶原Ⅰ通过激活整合素和酪氨酸激酶刺激 ET-1 分泌。ET-1 和 ET-3 能结合 ETB-R 促进体外 HUVECs 增殖和迁移,同时该过程可被 ETB-R 拮抗剂 BQ788 抑制^[19],但 ETA-R 拮抗剂 BQ123 的抑制作用较弱,因此,ET-1 的血管形成作用主要涉及到 ETB-R。ET-1 联合 VEGF 时其促血管作用最为明显,两者可相

互刺激,协同作用与 ECs 和 VSMCs,这种相互作用同样存在于肿瘤细胞。

Urotensin-Ⅱ 是一种由 12 个氨基酸组成的具有血管活性的“生长抑素”样环肽(在啮齿类动物为 15AA),1999 年 Ames 等^[20]首次证实人体内有 urotensin-Ⅱ 的特异性受体—孤儿受体 GPR14 的存在,其主要分布在心血管组织中,同时还在人的心血管组织中(包括冠状动脉硬化的斑块)发现了 urotensin-Ⅱ 的存在。Urotensin-Ⅱ 和 GPR14 的结合与钙离子的流动相耦合,它们具有很高的亲和力,结合后可以导致细胞内钙离子的升高,从而引起一系列的心血管效应。其缩血管效应比 ET-1 高一个数量级。由于 urotensin-Ⅱ 及 UT-R 广泛存在于心和大血管系统,因此,urotensin-Ⅱ 在心血管系统的病理生理过程中起重要作用。在多种细胞表型中表示出强力的丝裂原作用,并在多种肿瘤来源的细胞株中有 urotensin-Ⅱ 及 UT-R 表达^[21]。免疫组化及 PCR 检测发现大鼠神经微血管 ECs 能表达 urotensin-Ⅱ 及 UT-R,FGF-2 能促进 ECs 增殖而 urotensin-Ⅱ 缺乏。然后,后者能促进 ECs 在 Matrigel 中的毛细血管样结构形成,它的这一作用基本与 FGF-2 相近。

另外还有脂联素(adiponectin)、肾上腺髓质素(adrenomedullin,AM)、瘦素(leptin)、抑制素 resistin 等也参与了血管形成的调节^[22-25]。

4 展 望

目前已知,有约数十种正性和负性调节因子共同参与,组成了复杂的调节网络,使血管形成开关的转换机制被激活。正是由于正性调节因子的作用超过了负性因子的作用,血管形成开关启动,导致血管形成。目前基于血管生成理论研究的抗血管形成研究均是建立在肿瘤已经血管形成的基础上,由于肿瘤血管表型的获得是肿瘤进展的早期事件和关键点,因此能否在肿瘤血管形成之前也就是对血管开关转换进行干预对预防肿瘤血管形成及肿瘤的浸润、转移甚至死亡有着及其重要的意义,目前要明确是在数十种因子中有哪些参与血管开关转换。相信随着血管形成理论及抗血管形成研究的不断深入,正如 Folkman 所言,抗血管形成将成为继手术、放疗和化疗之后人类治疗恶性肿瘤的第四个重要手段。

参考文献:

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications [J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182–1186.
- [2] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. *Nature*, 1997, 386(4): 671–674.
- [3] Burroughs SK, Kaluz S, Wang D, et al. Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics [J]. *Future Med Chem*, 2013, 5(5): 553–572.
- [4] Patard JJ, Rioux-Leclercq N, Masson D, et al. Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(8): 1412–1417.
- [5] Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, et al. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2012, 50(1): 12–19.
- [6] Liu Y, Yang Y, Zhang C. A concise review of magnetic resonance molecular imaging of tumor angiogenesis by targeting integrin $\alpha v \beta 3$ with magnetic probes [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 1083–1093.
- [7] DiPietro LA. Thrombospondin as a regulator of angiogenesis [J]. *EXS*, 1997, 799(3): 295–314.
- [8] Grossfeld GD, Ginsberg DA, Stein JP, et al. Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis and tumor progression [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1997, 89(2): 219–227.
- [9] Grant DS, Kleinman HK. Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix [J]. *EXS*, 1997, 79(3): 317–333.
- [10] Jendraschak E, Sage EH. Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: Implications for tumor cell biology [J]. *Semin Cancer Biol*, 1996, 7(2): 139–146.
- [11] Maisonnier PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for tie2 that disrupts in vivo Angiogenesis[J]. *Science*, 1997, 277(5322): 55–60.
- [12] 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.
- [13] Javaherian K, Lee TY, Tjin Tham Sjin RM, et al. Two endogenous antiangiogenic inhibitors, endostatin and angiotensin, demonstrate biphasic curves in their antitumor profiles[J]. *Dose Response*, 2011, 9(3): 369–376.
- [14] Ling Y, Lu N, Gao Y, et al. Endostar induces apoptotic effects in HUVECs through activation of caspase-3 and decrease of Bcl-2[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(1): 411–417.
- [15] Boehm T, Folkman J, Browder T, et al. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance[J]. *Nature*, 1997, 390 (6653): 202–207.
- [16] Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, et al. Erythropoietin as an angiogenic factor[J]. *Eur J Clin Invest*, 2003, 33(10): 891–896.
- [17] Walsh DA, Hu DE, Wharton J, et al. Sequential development of angiotensin receptors and angiotensin II-converting enzyme during angiogenesis in the rat subcutaneous sponge granuloma[J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 120(7): 1302–1311.
- [18] Sasaki K, Murohara T, Ikeda H, et al. Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia induced angiogenesis [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(6): 603–611.
- [19] Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(10): 1537–1547.
- [20] Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, et al. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan GPR14[J]. *Nature*, 1999, 401(6750): 282–286.
- [21] Yoshimoto T, Matsushita M, Hirata Y. Role of urotensin II in peripheral tissues as an autocrine/paracrine growth factor[J]. *Peptides*, 2004, 25(10): 1775–1781.
- [22] Diebold I, Petry A, Sabrane K, et al. The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(4): 956–964.
- [23] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors[J]. *Endoc Rev*, 2005, 26(4): 439–451.
- [24] Kobashi C, Urakaze M, Kishida M, et al. Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8 [J]. *Circ Res*, 2005, 97(12): 1245–1252.
- [25] Gonzalez RR, Cherfils S, Escobar M, et al. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2) [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(36): 26320–26328.