

- cells after peripheral nerve injury:a delivery system for therapeutic agents[J].Ann Neurol,1998,43:205—211.
- [10] 许珊丹,曾婧,陈冠民,等.神经生长因子在周围神经系统疾病中的临床应用[J].中国新药杂志,2004,13(7):587—589.
- [11] 赵淑清,刘建丰,金宇,等.神经生长因子促周围神经生长的临床应用[J].河北医药,2002,24(2):122—123.
- [10] Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors [J]. J Neurobiol,1994,25 (11):1386—1403.
- [11] Huang EJ,Reichardt CF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function [J].Annu Rev Neurosci,2001,24:677—736.
- [12] 李昌琪,刘丹,卢大华,等.小鼠坐骨神经损伤后内源性 BDNF 对脊髓前角运动神经元内突触素 I mRNA 表达的调节[J].神经解剖学杂志,2005,21(4):345—349.
- [13] Foster E,Robertson B,Fried K.TrkB-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia following sciatic nerve injury[J].Brain Res,1994,659 (1-2):267—271.
- [14] Cosgaya JM,Chan JR,Shooter EM. The neurotrophin receptor P75NTR as a positive modulator of myelination [J].Science,2002,298(5596):1245—1248.
- [15] Yan H,Wood PM. NT23 weakly stimulates proliferation of adult rat O1 (-)O4 (+) oligodendrocyte-lineage cells and increases oligodendrocyte myelination in vitro[J].J Neurosci Res,2000,62(3):329—335.
- [16] Novikoval LN,Novikov LN,Kellerth JO. Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration[J].Eur J Neurosci,2000,12(2):776—780.
- [17] 雷正旺,薄占东,洪光祥,等.神经营养-3 基因修饰的神经干细胞对周围神经再生修复的影响 [J]. 中华实验外科杂志,2005,22 (1):80—82.
- [18] Braun S,Croizat B,Lagrange MC,et al.Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord -human muscle cocultures [J]. J Neurol Sci,1996,136: 17.
- [19] Gotz R,Koster R,Winkler C,et al.Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family[J].Nature,1994,372: 266.
- [20] Lai Ko,Fu WY, Ip FC, et al. Cloning and expression of a novel neurotrophin,NT-7,from carp [J].Mol Cell Neurosci,1998,11: 64—76.

·综述·

血管内皮生长因子、血管生成素与缺血性脑损伤

郑庆平¹ 胡永善¹

在啮齿动物的胚胎发育过程中,脑血管的发育主要是通过血管发生(angiogenesis),而在成年人类和啮齿动物脑内,新生血管的生成则只在如低氧、缺血等病理生理条件下发生,原先存活的毛细血管经发芽或潜在吻合血管枝增大形成新血管,过程包括内皮细胞趋化移动、增殖,形成新管腔,周细胞、血管平滑肌细胞等血管周围细胞的移入、黏附至内皮层形成完整的血管壁;血管丛经重塑(修剪)形成成熟的血管系统等。在新生血管生成过程中,两条调节途径起到非常重要的作用:一条是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)及其受体(flt-1等)调节通路,另一条是血管生成素(angiopoietin,Ang)及其受体(Tie)调节通路,这两条途径协同作用,共同促进机体血管形成。

1 血管内皮生长因子及其受体的生物学特征及表达特点

1.1 血管内皮生长因子

VEGF 又名血管通透性因子(vascular permeability factor,VPF),被认为是唯一特异性地作用于内皮细胞的重要的血管生成因子。1983年 Senger 等首先在豚鼠肿瘤腹腔渗液及多种肿瘤细胞培养液中发现 VEGF,随后 1989年 Ferrara 等在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来的糖类蛋白质。VEGF 可由许多正常细胞,包括平滑肌细胞、黄体细胞、及肾上腺皮质细胞产生和分泌,正常情况下如创伤愈合、组织器官修复、胚胎发育以及一些病理情况如肿瘤、缺血发生的血管增殖都与它密切相关。

VEGF 是一种有肝素亲和性的同源二聚体多肽,相对分子量 34—45KD。有一个独特的 NH₂ 末端氨基酸顺序,其单体无活性。人 VEGF 基因位于染色体 6P12 上,全长 14kb,由 8 个外显子和 7 个内含子组成。目前发现的 VEGF 家族包括 5

大成员:由于 mRNA 的剪接方式不同,产生 5 种分子变异,即 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 及胎盘生长因子(placenta growth factor,PLGF)。

1.2 VEGF 受体

现已发现三种 VEGF 受体:VEGF 受体 1 (VEGFR1,flt-1),VEGF 受体 2(VEGFR2,kdr/flk-1)和 VEGF 受体 3(VEGFR3,flt-4),均为跨膜的有酪氨酸活性的受体。它们都是糖基化的跨膜受体,其胞外部分有 VEGF 的结合位点,含有 7 个免疫球蛋白样功能区,胞内部分为一个有插入片段的蛋白质酪氨酸激酶序列。不同的受体激活后发挥不同的调节作用:促进新血管生成的主要是 VEGFR2;VEGFR-1 负相调节 VEGF 的功能,VEGFR3 主要调控淋巴管的发生。

2 血管生成素及其受体 Tie 的生物学特征及表达特点

Ang/Tie 通路是一种新发现的调节血管生成的重要信息途径。最近发现它在血管的成熟、稳定性及重建方面扮演着非常重要的角色^[1]。

2.1 血管生成素

血管生成素最早是从人结肠癌细胞中分离得到的,该蛋白质家族有 4 个成员:Ang1—4,特异性作用于内皮细胞,具有很强的促血管生成活性。它们具有共同的结构,即由三个结构域组成的糖蛋白:N-端疏水性分泌信号肽、介导同源寡聚体形成的 α-螺旋样结构域和 C-端介导配体活性的纤维蛋白原样结构域(fibrinogen-like domain,FD)。

1 华山医院康复科,上海市乌鲁木齐中路 12 号,200040

作者简介:郑庆平,女,硕士

收稿日期:2006-02-20

Ang-1 基因位于染色体 8q22, 相对分子质量为 70KD ($\approx 7.0 \times 10^4$ u), 由 498 个氨基酸组成。通常于多种组织内血管平滑肌细胞或其他血管周围细胞表达, 如冠状动脉、皮肤、骨、子宫内膜。Ang-1 激活其受体 Tie-2 对血管的生成、血管内皮细胞的稳定和血管的重塑起重要作用。

Ang-2 基因位于 8p21, 由 496 个氨基酸组成, 主要由内皮细胞表达。Ang-2 与 Ang-1 有 60% 的同源性, 与 Ang-1 的主要区别在于卷曲结构域与纤维蛋白原样结构域的交界处少 1 个半胱氨酸, 且 Ang-2 在正常成年啮齿动物脑内并不存在。Ang-2 的功能主要通过竞争性抑制 Ang-1 形成不稳定渗漏性的血管, 是 Ang-1 的天然竞争性拮抗剂^[2]。

Ang-3 和 Ang-4 基因是 1999 年分别从小鼠和人的胎盘中分离出的 2 种分泌蛋白。它们的蛋白构成存在明显差异, 仅 54% 的氨基酸序列相似。同时它们还存在较大种属间差异: Ang-3 在鼠体内有广泛的表达, 而 Ang-4 仅在人体肺组织中有较高的表达。

2.2 Tie 受体

Tie 为 Ang 内皮特异性酪氨酸激酶受体, Tie-1 和 Tie-2 是酪氨酸激酶家族的 2 个主要成员, 它们已被证实在血管发生的成熟阶段中发挥作用。Tie-2 又称作 TEK, 由 8 个功能区的细胞外结构域和一个酪氨酸激酶结构域的胞内部分组成。目前已知的血管生成素都结合在受体 Tie-2 上, Tie-2 的胞内结构域可结合多种蛋白分子行使功能。Ang1 和 Ang4 为 Tie-2 的受体激动剂, 而 Ang-2 和 Ang-3 为 Tie-2 的受体拮抗剂。Tie-1 不具备酪氨酸激酶功能, 尚未发现相应的配体, 只能与 Tie-2 形成异源复合体调节 Tie-2 的信号传导通路, 但是 Tie-1 基因点突变的小鼠胚胎不能保持血管内膜的完整性, 表现为水肿和局部出血, 它的具体功能尚待进一步发现。

3 VEGF 和 Ang 在生理性血管形成中的作用

血管生成是多种正、负性调节因子直接或间接作用的结果, 在血管生成的调节环路中, VEGF 和 Ang 是两种主要的促血管生成因子, 起不同而互补的作用。

VEGF 作用于血管形成早期, 促进原始血管网形成: 与特异性受体结合, 诱导其磷酸化, 通过一系列级联反应, 主要产生两种生物学效应: ① VEGF 作为一种内皮细胞的特异性有丝分裂原, 对血管内皮细胞有生长刺激作用和趋化作用, 故可诱发内皮细胞增殖、迁移以及细胞间的相互作用和管腔的形成, 促进新生血管形成。体内和体外实验都证明, VEGF 扩展血管并生成小血管^[3]。② VEGF 是目前所知的增加血管通透性的最强物质之一, 它与受体结合使血管通透性增高, 导致血浆中大分子物外渗, 可为组织修复提供养分, 多种其他促血管生成因子, 如: bFGF, PDGF, TNF 等能通过直接或间接影响 VEGF 和/或其受体信号传导起作用。

Ang 家族则是在后期的血管重建、塑形、促成成熟、有空间结构的血管网及稳定中发挥关键作用^[4]。Ang-1 与受体 Tie-2 结合后, 表达活化 Tie-2 的内皮细胞促进血管萌芽和分支, 募集内皮周围支持细胞, 促进血管重塑和成熟, 形成完整的血管壁, 并通过调节内皮细胞和血管周围间质细胞的相互作用维持血管管腔的完整性和稳定性; 同时活化内皮细胞磷

脂酰肌醇激酶(PI₃), 使凋亡抑制剂生成增多, 对抗内皮细胞凋亡。Ang-2 对血管生成的影响与局部微环境有关, 当 VEGF 存在时, Ang-2 可拮抗 Ang-1 促血管结构稳定的作用, 消除血管基底膜和管周细胞对血管形成的限制, 并增加内皮细胞对 VEGF 的敏感性, 有利于血管出芽、生长; 当 VEGF 缺乏时, Ang-2 抑制 Ang-1 则有利于血管的消退^[5]。

4 VEGF 和 Ang 在缺血性脑损伤发病中的作用

4.1 VEGF、Ang 和血脑屏障的关系

4.1.1 VEGF 和血脑屏障: 血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 由血管内皮细胞和细胞间的紧密连接构成, 它在中枢神经系统的生理和病理生理过程中扮演了关键的作用。VEGF 在局灶性脑缺血后 1—3h 就开始增高, 高峰出现在 24—48h^[2]。van Bruggen 等^[6]将可溶性 VEGF 受体嵌合蛋白 Flt-(1-3)-IgG 治疗, 发现鼠脑水肿和脑梗死体积显著减轻, Valable 等^[7]则在缺血 1h 后静脉内注射 VEGF, 发现鼠缺血半球 BBB 渗漏加重; 但是 Harrigan、SUN 等^[8-9]将 VEGF165 注射到右侧脑室后发现, BBB 渗漏并没有增加, 反而脑梗死体积和脑水肿显著减轻, 可见, 注射的方式^[10]、注射剂量^[11]、VEGF 作用受体不同^[12]都可影响 VEGF 的疗效, 而且还可能通过以下途径影响缺血性损伤恢复机制如: 调节 PI3K/Akt/kappaB 核因子通路、抑制 caspase-3 活性的和减少神经元凋亡等^[13]。

4.1.2 Ang 和 BBB: 实验证实, 局灶性脑缺血诱导 Ang-1 的急性下调和 Ang-2 的上升^[14]。Ang-1 的上调在局灶性脑缺血后 48—72h 才能检测到, 而此时 BBB 渗漏开始减轻, 同时, Zhang 等^[15]和 Valable 等^[7]均发现, Ang-1 能减轻 VEGF 所致的血脑屏障渗漏现象; 相反, Nag S 等^[16]发现 Ang-2 能增加血脑屏障渗透, 并认为该现象与 Ang-2 促进继神经元损伤后 1—3 天的内皮细胞凋亡有关, Zhu 等^[17]也发现当 Ang-2 与 VEGF 联合治疗会加重 BBB 渗漏。这些都表明 Ang1-2 影响 BBB 的完整性。有人认为, Ang-1 在维持正常成年大脑的 BBB 完整性起到了稳定的作用; 当脑缺血发生后, 急性上调的 VEGF 和 Ang-2 可能抵消了 Ang-1 的稳定作用, 因此, VEGF 和 Ang-1 的平衡制约着 BBB 的完整性^[18]。

4.2 VEGF、Ang 和血管生成

动物实验已证实^[19], 脑缺血时脑内可见新生血管形成。VEGF/VEGFR 系统和 Ang/Tie 系统在脑缺血血管生成中也起关键作用。

缺血环境可诱导血管内皮细胞内 VEGFmRNA 水平表达增加。Kusaka N 等^[20]在联合间接血管重建术的人类质粒 VEGF 给药后, 慢性脑缺血大鼠脑内出现血管密度的显著增加。Lin 等^[14]发现, 在大鼠局灶性脑梗死后, Ang 基因呈现复杂的变化: 4.4 kb Ang-1 的转录延迟至梗死后 2 周, 且较假手术组增加 8 倍, 2.4 kb Ang-2 的变化则分两个阶段: 高峰期出现在梗死后 24h (6.4 倍) 和 2 周后 (4.6 倍); 4.3kbTie-2mRNA、4.3kb Tie-1mRNA 则于再灌注 24h 后开始升高且持续维持至 2 周后。这种表达方式与脑梗死组织的渐进性液化和新生血管形成有关。Wang 等^[21]发现, MACO 后 8h, Ang-2 蛋白表达在皮层梗死区明显增加, 1 天后梗死灶周边明显增加; 而 VEGF 蛋白则在 2h 后皮层梗死区显著增加, 1 天后梗死灶

周边增加。体内和体外实验已表明,Ang-1水平增高促进大管径薄壁血管通过发芽和分支形成微小毛细血管,向梗死灶生长^[7];Ang-2在VEGF(血管内皮生长因子)的协同下,能促进血管增生^[7],表现出血管生成的协同效应。

可见,VEGF和Ang在脑缺血中发挥的作用是相当复杂的:一方面在脑缺血急性期,Ang-2、VEGF表达增加,而Ang-1表达下降介导了血脑屏障的破坏,加剧缺血中心区损伤;另一方面在脑缺血恢复期,VEGF/VEGFR和Ang/Tie水平的上调,与脑缺血边缘带新生血管形成密切相关,在空间、时间和数量上调节脑梗死中心和半暗带新生血管和侧支循环的形成,促进脑血流,改善脑梗死周边区脑代谢,因而有利于卒中后神经功能的恢复。

4.3 VEGF与脑保护

最近的研究表明,VEGF自身还有神经营养和神经保护的特性^[22],VEGF在缺血性脑损伤中发挥的神经保护作用,除了是促进血管再生外,更可能是来自它自身的直接作用。可能的途径有:直接抑制凋亡的发生和刺激神经再生、上调E2F转录因子家族(如细胞周期蛋白D1、E和cdc25)^[23],刺激VEGFR2受体表达和激活Rho/ROK信号途径等^[24]。

5 展望

治疗性血管再生,是缺血性疾病的希望所在^[25]。治疗性血管生成的观念也渐被引入脑缺血性疾病的治疗。最近的研究表明,VEGF/VEGFR和Ang/Tie通路在以下治疗手段中的作用都得到了证实:药物(如雌激素等^[1])、细胞因子治疗^[19]、脑缺血前的运动训练等。这些都预示VEGF/VEGFR和Ang/Tie通路在脑缺血治疗中的光明前景。

但是仍有很多的问题等待解决。外源性的促血管生成蛋白因子的输入,价格昂贵,在体内不稳定,极易被降解,需反复使用;从静脉输入,蛋白不易透过血脑屏障,治疗效果不佳,而直接注射到脑室或脑表面,需多次应用,对患者伤害太大。这些都限制了其在脑缺血临床应用的可行性。近来通过对VEGF和Ang进行病毒载体的基因转染处理,将其输入体内,在一段时间内能保持最佳的局部浓度且用量小,取得了一定的效果。但是载体的选择和合适的基因转移途径仍是基因治疗脑缺血性疾病的瓶颈问题。

同时,外源性基因治疗也存在一些问题,如脑水肿、血管寿命短暂和血管瘤形成等。最近,内源性基因治疗方法以其安全性受到人们的青睐;内皮祖细胞的移植已用于治疗外周和心肌缺血领域,基因修饰或不修饰的祖细胞移植将可能为脑缺血疾病治疗带来新的机遇。

参考文献

- [1] Ardelit AA, McCullough LD, Korach KS, et al. Estradiol regulates angiopoietin-1 mRNA expression through estrogen receptor- α in a rodent experimental stroke model [J]. *Stroke*, 2005, 36(2): 337.
- [2] Maisonpierre 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.
- [3] Greenberg DA. Angiogenesis and stroke [J]. *Drug News Perspect*, 1998, 11(5):265.
- [4] Webb CP, Vande Woude GF. Genes that regulate metastasis and angiogenesis [J]. *J Neurooncol*, 2000, 50(1-2):71.

- [5] Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Bessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF [J]. *Science*, 1999, 284(5422):1994.
- [6] Van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, et al. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia-reperfusion injury in the mouse brain [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(11):1613.
- [7] Valable, Samuel. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1 [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(11): 1491.
- [8] Harrigan MR, Ennis SR, Sullivan SE, et al. Effects of intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor on cerebral blood flow, edema, and infarct volume [J]. *Acta Neurochir*, 2003, 145(1): 49.
- [9] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 111(12):1843.
- [10] Kaya D, Gursoy-Ozdemir Y, Yemisci M, et al. VEGF protects brain against focal ischemia without increasing blood-brain permeability when administered intracerebroventricularly [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(9):1111.
- [11] Manoonkitiwongsa PS, Schultz RL, McCreery DB, et al. Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2004, 24(6):693.
- [12] Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:10242.
- [13] Sun FY, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2005, 79(1-2):180.
- [14] Lin TN, Wang CK, Cheung WM, et al. Induction of angiopoietin and Tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2000, 20(2):387.
- [15] Zhang ZG, Zhang L, Croll SD, et al. Angiopoietin-1 reduces cerebral blood vessel leakage and ischemic lesion volume after focal cerebral embolic ischemia in mice [J]. *Neuroscience*, 2002, 113(3):683.
- [16] Nag S, Papneja T, Venugoupalan R, et al. Increased angiopoietin-2 expression is associated with endothelial apoptosis and blood-brain barrier breakdown [J]. *Laboratory Investigation*, 2005, 85(10):1189.
- [17] Zhu Y, Lee C, Shen F, et al. Angiopoietin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain [J]. *Stroke*, 2005, 36(7):1533.
- [18] Zheng Z, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(12):62.
- [19] Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2005, 1058(1-2):120.
- [20] Kusaka N, Sugiu K, Tokunaga K, et al. Enhanced brain angiogenesis in chronic cerebral hypoperfusion after administration of plasmid human vascular endothelial growth factor in combination with indirect vasoreconstructive surgery [J]. *J Neurosurg*, 2005, 103(5):882.
- [21] Wang RG, Zhu XZ. Expression of angiopoietin-2 and vascular endothelial growth factor in mice cerebral cortex after permanent focal cerebral ischemia [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(5):405.
- [22] Wang Y, Kilic E, Kilic U, et al. VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena [J]. *Brain*, 2005, 128(1):52.
- [23] Gora-Kupilas K, Josko J. The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF) [J]. *Folia Neuropathol*, 2005, 43(1):31.
- [24] Jin K, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor stimulates neurite outgrowth from cerebral cortical neurons via Rho kinase signaling [J]. *J Neurobiol*, 2006, 66(3):236.
- [25] Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration [J]. *Experimental Physiology*, 2005, 90(3):315.