

-文章编号: 1001-098X(2005)01-0033-04

VEGF 的放射生物学特性及其应用

章文成 杨占山

摘要 放射性烧伤是放疗过程中常见的并发症, 其愈合的关键环节之一是血管再生, 因此对血管再生的调控的研究一直是关注的焦点。研究发现, 血管内皮生长因子可能是调控血管再生和创伤愈合的关键因子, 这可能为放射性皮肤烧伤提供一条新的治疗途径。

关键词 血管内皮生长因子; 放射性烧伤; 基因治疗

中图分类号 R818.74 文献标识码 A

The radiation-biological characteristics and application of vascular endothelial growth factor

ZHANG Wen-cheng, YANG Zhan-shan

(School of Radiation Medicine and Public Health, Suzhou University, Suzhou, 215007, China)

Abstract Irradiation burn is common complication during radiotherapy and the healing critically depends on angiogenesis, as a result, regulation of angiogenesis is always regarded as a focus in research. Studies have indicated that vascular endothelial growth factor (VEGF) is probably a key factor controlling angiogenesis and wound healing, which illustrated a new therapy in irradiation injury.

Key words vascular endothelial growth factor; irradiation burn; gene therapy

放射肿瘤治疗作为肿瘤治疗的主要手段之一, 在临床肿瘤治疗中的应用越来越广泛, 常见的并发症有放射性皮肤烧伤以及黏膜难愈性溃疡, 另外突发性核事故也可导致放射性皮肤烧伤。放射性皮肤烧伤的特点为反复发作、长期不愈合, 因其细胞生长因子分泌减少、细胞增殖受抑、肉芽组织增生不良, 因此伤口反复破溃不愈, 剧痛难忍, 最后可能导致癌变。

创伤愈合的关键环节之一为血管再生, 血管再生的好坏可直接影响伤口愈合的速度, 因此, 对血管再生的调控研究一直是创伤愈合研究关注的焦点之一。近年来对伤口愈合机制的研究发现, 多种细胞生长因子在组织修复及炎症反应中起重要作用^[1], 其中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 可能是调控血管再生和创伤愈合的关键因子^[2]。因此, VEGF 的辐射生物学特性及其在放射性烧伤中的应用越来越受到人们关注。

1 VEGF 的生物学作用特点

1.1 VEGF 和受体结构及其蛋白

作者单位: 210007, 苏州大学放射医学与公共卫生学院

VEGF 又称血管通透因子 (vascular permeability factor) 或促血管因子 (vasculotropin), 是 1989 年从牛垂体滤泡星形细胞培养液内分离纯化出来的一类细胞因子。人 VEGF 基因定位于 6p21.3, 全长 28kb, 编码 VEGF 的基因长约 14kb, 由 8 个外显子和 7 个内含子交替组成, 第一外显子和第二外显子的 4 个氨基酸 (信号肽) 含有一个 α -螺旋结构, 这在形成二聚体中起重要作用, 当 VEGF 向胞外分泌时, 信号肽被切割。外显子 3 的 3 个酸性氨基酸 (Asp63、Glu64、Glu67) 和外显子 4 的 3 个碱性氨基酸 (Arg82、Lys84、His86) 分别是与受体 VEGFR-1 和 VEGFR-2 结合的必需部分。VEGF 蛋白的相对分子质量为 34 000~45 000, 是由两个相同的分子质量 17 000~22 000 的亚基经二硫键连接而成的二聚体糖蛋白。目前发现, 通过选择性剪切 VEGF 前体 mRNA 产生 6 种不同的单体, 包括 VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₃、VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆, 其中 VEGF₁₆₅ 和 VEGF₁₂₁ 在组织分布最为广泛, 功能最强, 是其发挥生物学效应的主要形式。VEGF₁₂₁ 是酸性多肽, 不与肝素结合, 游离存在。VEGF₁₆₅ 可以游离存在, 也可与细胞膜、基底膜或

细胞外基质的肝素糖蛋白结合。VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆是强碱性多肽,与肝素结合,存在于细胞外基质,当其C端被纤溶酶切割后产生具有生物学活性的游离多肽。

VEGF的受体主要包括3个成员:VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3。VEGFR-1和VEGFR-2由7个免疫球蛋白样域、1个跨膜域以及其后的磷酸激酶序列组成,VEGF的结合位点主要位于第2个免疫球蛋白样域。VEGFR-2是VEGF丝裂原效应、血管增殖以及渗透效应的主要调节者,通过形成二聚体和配体依赖激酶磷酸化调节内皮细胞的增殖、分化以及促进新生血管的渗透性,而VEGFR-1是通过抑制VEGFR-2的信号转导来调节血管生成、维持血管功能^[3]。VEGFR-3特异地分布于淋巴管,调节淋巴管的生成。另外,VEGFR-1经剪切后形成可溶性的VEGFR-1,它包含六个免疫球蛋白样结构域,对VEGF有亲和力,通过与VEGFR-2形成无信号的异二聚体来调节VEGF的活性。Neuropilin1、Neuropilin2与外显子7编码的序列结合,可增强VEGF₁₆₅趋化作用。

1.2 VEGF基因表达及其调节

许多细胞因子、激素和生长因子上调VEGF mRNA或者诱导VEGF的释放,包括血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、肿瘤生长因子 α (tumor growth factor- α , TGF- α)、成纤维细胞生长因子7(fibroblast growth factor-7, FGF-7)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、白细胞介素(包括interleukin-1 α , interleukin-1 β , interleukin-6)和胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)。这些因子直接或通过VEGF促进血管增殖。

乏氧诱导VEGF mRNA迅速而强烈地升高,乏氧诱导因子(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)结合位点位于VEGF上游作为增强子,低氧张力时通过HIF-1激活VEGF mRNA转录、增强其稳定性促进VEGF的表达,从而促进新生血管的形成。

其他一些因素也影响VEGF的表达,如p53基因突变、癌基因突变、p21基因扩增等,紫外线、射线等物理因素也会上调VEGF在一些细胞系和组织中的表达。

1.3 VEGF在血管增殖中的作用

1.3.1 VEGF在生理性血管增殖中的作用

VEGF在鼠胚胎形成过程以及出生后起重要作用。在剔除VEGF基因的胚胎中出现生长滞后,大量畸形血管形成,厚壁静脉明显减少。在出生后1~8d注入可溶性VEGF受体嵌合蛋白[mFlt(1,3)-IgG]部分抑制VEGF,新生鼠生长停滞,在出生后46d内全部死亡,各器官增殖减弱,超微结构显示内皮细胞和其他类型的细胞结构改变,病理学和生化改变与心肾功能衰竭一致,分离的肝细胞凋亡明显增加,这说明VEGF不仅在内皮细胞增殖中起重要作用,而且也是内皮细胞必不可少的存活因子。然而,在出生4周后抑制VEGF的表达所导致的改变较上述小,也没有诱导肝细胞发生凋亡^[4]。

VEGF在机体内具有多种功能,能特异性作用于动脉、静脉以及淋巴管来源的内皮细胞,促进血管内皮细胞增殖、加速血管形成、增强血管通透性、维持血管正常结构和功能,但对其他类型细胞无明显的丝裂原效应。VEGF可以诱导抗凋亡蛋白Bcl-2(B-cell lymphoma/leukemia-2)、A1(造血细胞在粒-巨噬细胞集落刺激因子和脂多糖诱导下产生的早期反应基因)的表达,表明VEGF对受损的内皮细胞有保护作用。在无血清的培养条件下,VEGF作为培养的内皮细胞的一个存活因子,同时,它也是不成熟视网膜内皮细胞的一个存活因子。VEGF可诱导培养的牛微血管内皮细胞表达酪氨酸蛋白激酶型溶原酶原激活剂和溶原酶原激活剂-1,也可增加人脐静脉内皮细胞金属硫蛋白酶、胶原酶的表达。VEGF的另一个主要功能是诱发浆蛋白渗漏,渗漏物形成胶状,它是内皮细胞和肿瘤生长的底物。VEGF也调节生长板和内质骨的形成。

VEGF也参与了女性生殖道血管增殖。VEGF mRNA的表达与鼠、哺乳动物的子宫和黄体的血管增殖在时空上相关连,用mFlt(1,3)-IgG处理成年大鼠,其周期性血管增殖完全被抑制,这表明VEGF是女性生殖道周期性血管生长的一个调节因子。

1.3.2 VEGF在病理性血管增殖中的作用

胸、肺、胃肠道、肾、膀胱、卵巢等肿瘤VEGF mRNA表达明显上调,在有坏死的肿瘤中,坏死区邻近的乏氧肿瘤细胞中VEGF mRNA尤为高。这些表明VEGF是肿瘤血管生长的一种调节因子。

糖尿病性视网膜病最初视网膜血管受损,视网膜缺氧引起VEGF表达致异常血管增生,伴随血管

渗漏和出血。这些发现说明,不恰当地引入 VEGF 可能导致异常血管形成,引起疾病。

在缺血性疾病中,缺氧可刺激 VEGF 表达上调,通过 VEGF 对内皮细胞的强烈促有丝分裂作用促进新生血管形成,改善组织血供。

2 辐射与 VEGF 之间的相互影响

2.1 辐射对细胞、机体 VEGF 表达的影响

VEGF 是辐射后血管增殖重要的调节因子,它在促进血管内皮细胞增殖、抗凋亡以及促使受辐射的组织形成新生血管中起到重要作用。体内研究表明,VEGF 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 具有协同作用,使得内皮细胞免于凋亡,抑制 VEGF 受体增加辐射对微血管的破坏,表明 VEGF 对内皮细胞具有辐射保护作用,增加机体对辐射的抗性^[5]。

辐射作用于细胞、机体时,通过激活丝裂原活性蛋白激酶途径增加 VEGF 的表达,同时,内皮细胞在辐射作用下也会上调 VEGFR-2 的表达。当肺鳞癌细胞系(RERF-LC-AT)受 15Gy X 射线和碳离子辐射后 16~24h, VEGF mRNA 较对照组上调 2.5 倍, VEGF 蛋白也较对照组明显增高,与传能线密度无关,但是与剂量呈依赖性关系。辐射诱导的 VEGF mRNA 可以被金雀异黄素(genistein)或者蛋白激酶抑制剂 H7 完全阻断,表明辐射诱导 VEGF mRNA 的机制可能与触发 Src 磷酸激酶和蛋白激酶 C 的通路有关^[6]。

Katoh O 等^[7]对受 γ 射线照射的 CMK86 细胞系和多能造血干细胞通过克隆形成分析发现, VEGF 能抑制辐射所导致的细胞凋亡,其抑制凋亡的能力与细胞周期的分布无关,也没有发现 VEGF 的丝裂原活性,表明 VEGF 可能是使细胞在辐射下免于凋亡而存活的重要因素,同时也可能使一些肿瘤细胞以自分泌和旁分泌 VEGF 增加其辐射抗性。

Shintani S 等^[8]对口腔鳞癌放疗的研究发现,在 VEGF 表达升高的病例中,放疗对肿瘤没有明显的杀伤作用; VEGF 没有升高的病例放疗后 VEGF 表达增加,且伴随着肿瘤的辐射抗性的增强,表明 VEGF mRNA 和蛋白的表达增加与辐射敏感性相关。

正常皮肤内 VEGF 表达较低,主要分布在成纤维细胞及血管内皮细胞的胞膜及胞质中。机体受伤后局部 VEGF 表达升高,形成高峰,之后随伤口逐渐愈合而渐减弱。而在因放射线照射所致的皮肤损

伤和糖尿病小鼠皮肤损伤中, VEGF 表达较正常皮肤轻度增高,溃疡形成后进一步增加,不能形成一个表达高峰,抑制脂质过氧化反应可以恢复 VEGF 的表达,从而促进伤口愈合。因此推测放射性创伤愈合缓慢可能与 VEGF 的表达相关^[9]。

2.2 VEGF 在辐射防护中的作用

Kermani P 等^[10]研究发现,内皮细胞用 β 粒子 2、6、10Gy 照射后,其胸腺核苷吸收和细胞呈剂量依赖关系受到抑制,然而照射后的细胞给予 10 ng/ml 的 VEGF₁₆₅ 处理后,胸腺核苷吸收分别增加 1.5、2.0、4.0 倍,表现出 VEGF 对内皮细胞有一定的辐射防护作用;且与对照组相比, VEGF 也对细胞分化有利。这与辐射后的内皮细胞的 VEGFR-2 上调有关。

体外研究表明,用 VEGF 重组蛋白可减少辐射诱导的人脐静脉内皮细胞的损伤,而 anti-VEGF 明显加强了辐射诱导的人脐静脉内皮细胞的死亡,但不影响肿瘤细胞的辐射敏感性,说明 VEGF 是通过位于内皮细胞上的特异性受体而对内皮细胞产生防护作用^[11]。

体内实验研究表明,正常未受辐射的小肠隐窝腺细胞几乎不能察觉到细胞凋亡,而辐射诱导细胞凋亡早期增加,4h 达最高峰,24h 后下降至基线水平, VEGF 处理后可使其凋亡下降 15%左右,说明 VEGF 在体内也有一定的防护作用,增加细胞的存活^[12]。最近研究表明,大鼠局部照射 40Gy 后,受照射侧 VEGF 表达较未受照射的一侧明显减少,同时伴有白细胞分化抗原 105(cluster of differentiation 105, CD105)下降,毛细血管密度也明显减少;局部应用 VEGF 后,其表达升高,而且内源性 VEGF 表达也升高,同时毛细血管密度增加,促进伤口愈合^[13]。总之, VEGF 通过对内皮细胞的防护而调节辐射损伤后伤口血管生成。

3 VEGF 在基因治疗中的应用及其前景

研究表明,至少有七大类物质具有直接或间接促进血管增殖的作用^[14], VEGF 以其对血管内皮细胞的高度亲和力和强大的血管生成作用受到广泛关注,在周围血管疾病、肿瘤、糖尿病、创伤修复及组织重建的领域受到广泛研究和初步应用。

早期应用 VEGF 的主要方式是蛋白注入。但是由于 VEGF 因子价格昂贵,半衰期短,需反复给

药, 所需质量浓度高并易产生副作用等缺点而使其应用受到限制。

VEGF 基因治疗具有转染成功后在一定时间后可持续表达、需要量小等优点, 因此近年来 VEGF 基因治疗研究越来越广泛。Baumgartner I 等^[15]对 9 例下肢严重缺血的 10 条肢体(其中 7 条肢体有非愈合性溃疡)给予 phVEGF₁₆₅ 4 000ug 进行基因治疗, 治疗后肢体造影显示有新的侧支血管生长, 其中 4 个肢体的缺血性溃疡愈合或明显好转, 并发症有短暂的下肢水肿, 从而证明了用编码 VEGF₁₆₅ 的裸质粒 DNA 肌肉注射能有治疗性血管生成的作用, 并证实了基因转移的安全性和可行性。VEGF 基因治疗的临床实验也在进行, Losordo DW 等^[16]采用随机的、双盲的、安慰剂对照的研究方法, 将编码 VEGF 的裸质粒用经皮导管的途径转移到左室心肌内, 进行 I/II 期临床研究, 结果, 治疗组患者的心绞痛等级较对照组有明显改善, 运动耐受时间延长, 心肌功能改善, 提示该方法安全可行, 为今后的 II/III 期临床试验提供了依据。

然而, VEGF 基因治疗有一些常见的副作用, 如 VEGF 诱导一氧化氮释放, 引起短暂性低血压, VEGF 增加血管通透性, 导致周围性水肿。另外, 建立高效的真核表达载体也是我们所面对的一个大的挑战。如果能克服上述困难, VEGF 基因治疗放射性烧伤以及其他血管增生方面的疾病将有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Alitalo K, Ferrara N. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors[J]. Nat Med, 1999, 5(12): 1359-1364.
- 2 Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, et al. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing[J]. Arch Surg, 1999, 134(2): 200-205.
- 3 Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation [J]. Nature, 2000, 407 (6801): 242-248.
- 4 Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice[J]. Development, 1999, 126(6): 1149-1159.
- 5 Geng L, Donnelly E, McMahon G, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy [J]. Cancer Res, 2001, 61(6): 2413-2419.
- 6 Ando S, Nojima K, Ishihara H, et al. Induction by carbon-ion irradiation of the expression of vascular endothelial growth factor in lung carcinoma cells[J]. Int J Radiat Biol, 2000, 76(8): 1121-1127.
- 7 Katoh O, Tauchi H, Kawaiishi K, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation [J]. Cancer Res, 1995, 55 (23): 5687-5692.
- 8 Shintani S, Kiyota A, Mihara M, et al. Association of preoperative radiation effect with tumor angiogenesis and vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma [J]. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(10): 1051-1057.
- 9 Altavilla D, Saitta A, Cucinotta D, et al. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse[J]. Diabetes, 2001, 50(3): 667-674.
- 10 Kermani P, Leclerc G, Martel R, et al. Effect of ionizing radiation on thymidine uptake, differentiation, and VEGFR2 receptor expression in endothelial cells: the role of VEGF (165)[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 50(1): 213-220.
- 11 Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, et al. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation [J]. Cancer Res, 1999, 59 (14): 3374-3378.
- 12 Okunieff P, Mester M, Wang J, et al. In vivo radioprotective effects of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice[J]. Radiat Res, 1998, 150(2): 204-211.
- 13 Schultze-Mosgau S, Wehehan F, Rödel F, et al. Improved free vascular graft survival in an irradiated surgical site following topical application of rVEGF [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 57 (3): 803-812.
- 14 Braun S, auf dem Keller U, Beer HD, et al. Growth factors in development, repair and disease[J]. Eur J Cell Biol, 2002, 81(7): 375-382.
- 15 Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia[J]. Circulation, 1998, 97(12): 1114-1123.
- 16 Losordo DW, Vale PR, Vale PR, et al. Phase 1/2 placebo controlled, double blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia [J]. Circulation, 2002, 105(17): 2012-2018.

(收稿日期: 2004-10-15)