

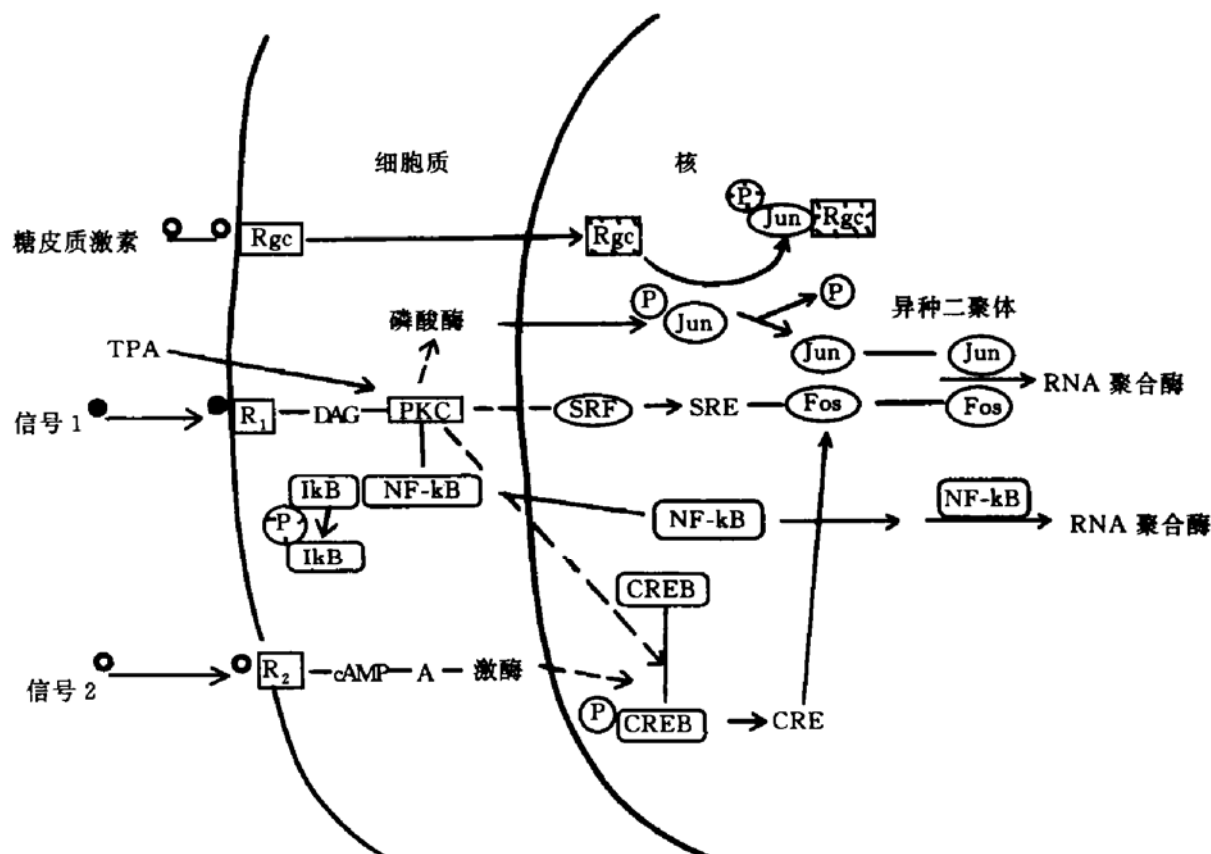


图 4 PKC 与基因表达的调控

Rgc: 糖皮质激素受体; R₁, R₂: 受体; SRF: SRE 结合蛋白; IkB: NF-kB 结合部位的抑制亚基。

参 考 文 献

- 1 Kennerly D A. J Biol Chem, 1987; **262**: 16305
- 2 Tetterborn C S, Muller G C. Biochem Biophys Res Commun, 1988; **155**: 249
- 3 Asaoka Y. Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 6447
- 4 Wijkander J. Eur J Biochem, 1991; **202**: 873
- 5 Yoshida K, Asaoka Y, Nishizuka Y. Nature, 1988; **334**: 661
- 6 Osada S, Mizuno K, Saido T C. J Biol Chem, 1990; **265**: 22434
- 7 Ono Y, Fuji T, Ogita K. Proc Natl Acad Sci USA, 1989; **267**: 4799
- 8 Karin M, Smeal T. TIBS, 1992; **17**: 418
- 9 Trisman R. TIBS, 1992; **17**: 423

血管内皮生长因子与肿瘤

修 波* 周爱儒

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

摘要 血管内皮生长因子是新近确定的一种具有旁分泌机制的生长因子, 能特异作用于血管内皮细胞, 促进其增殖及新生血管的形成, 同时还有增加血管通透性的作用。由于其生物学活性与实体瘤的生长密切相关, 因此对它的研究倍受关注, 进展非常迅速。

关键词 血管内皮生长因子, 血管通透性因子, 血管内皮细胞, 肿瘤, 基因表达

1 血管内皮生长因子概述

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是 1989 年初 Ferrara 和 Gospodarowicz 等^[1]人分别在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来的。根据其促血管内皮细胞有丝分裂的活性, Ferrara 等人命名为 VEGF。实际上血管通透性因子 (vascular permeability factor, VPF) 从 1983 年已开始被 Senger 等人进行了系统的研究, 但当时只知道有增加血管通透性的活性。在 Ferrara 的文章发表以后, 他们相互注意到二者 N 末端氨基酸顺序相同, 接着 Keck 和 Connolly 等人发现 VPF 同样具有 VEGF 的活性。后来根据蛋白质序列测定及基因分析, 认为它们可能是同一基因不同方式的 RNA 剪接而成的系列产物^[2]。因此近来的研究都把它们作为 VEGF 家族的同系物, Berkman 等人还把二者合在一起缩写成 VEGPF。

目前所知, VEGF 是对血管生长有诱导作用的众多生长因子中唯一只特异作用于血管内皮细胞的^[1,3], 也只在血管内皮细胞上发现有

它高亲和结合位点^[3], VEGF 对血管内皮细胞的促有丝分裂作用十分强烈 (在培养液中 0.55pmol/L 即表现出明显作用)^[1], 鸡胚绒毛膜尿囊实验和用载有表达 VEGF 质粒的中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 接种裸鼠均发现有明显促进新生血管生成的作用^[4], 用 Miles 检测法证明它有引起血管通透性增加作用^[5,6]。

从 VEGF 分子量大小, RNA 印迹杂交条带的不均一性和 cDNA PCR 扩增的多片段存在, 显示 VEGF 是由多个成员组成的家族^[2,4]。1991 年 Tischer 等首先搞清了人血管平滑肌细胞中 VEGF 的基因结构 (图 1)^[2], 使我们对 VEGF 家族的存在和形成原因有说服力的证据。该基因长约 14kb, 由 8 个外显子和 7 个内含子构成, cDNA 扩增得到三种 VEGFs, 氨基酸的开放阅读框架分别是 121, 165 和 189, 其构成方式如图 1 所示。三种 VEGFs 均有 26 个疏水性氨基酸构成的信号肽, N 末端和 C 末端的序列完全相同, 因此对 PCR 的扩增十分有利, 用和末端互补的一对引物即可得到 cDNA 中所有的 VEGFs。Houck 等人在人胎肝细胞中发现还有第四种 VEGF mRNA——

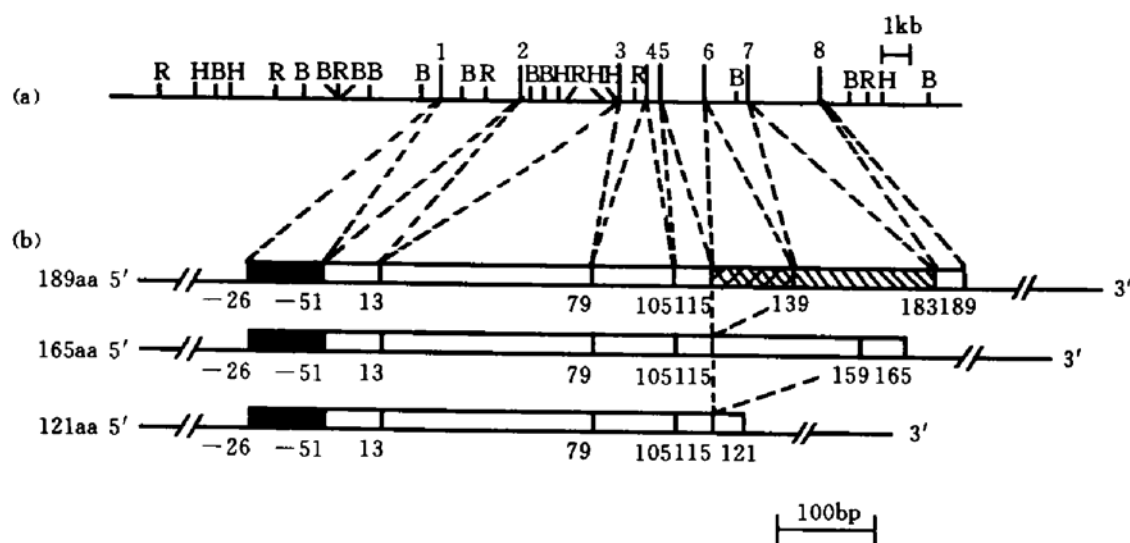


图 1 人 VEGF 基因结构图^[2]

(a) 人 VEGF 基因及两侧区域的限制性酶切图谱, 所标数字为外显子位置及序号; (b) VEGF189, 165 和 121 的组成方式, 数字为氨基酸残基序号。

VEGF206, 但大多数学者得到的只是上面的三种, 有的只得到其中的二种或一种, 这可能与不同组织基因的选择性剪切或研究方法上的差异有关^[5]. 在研究 VEGF 的基因结构时还发现, VEGF 基因和 PDGF 的 A 链及 B 链的基

因大体结构上很相似 (图 2)^[2], 同时其蛋白质的氨基酸顺序也有 20%—25% 的同源性, 但二者的生物学活性却有较大的差别. 在后来的研究中, 许多学者根据它们之间的这种家族亲缘关系, 借鉴了 PDGF 的研究成果.

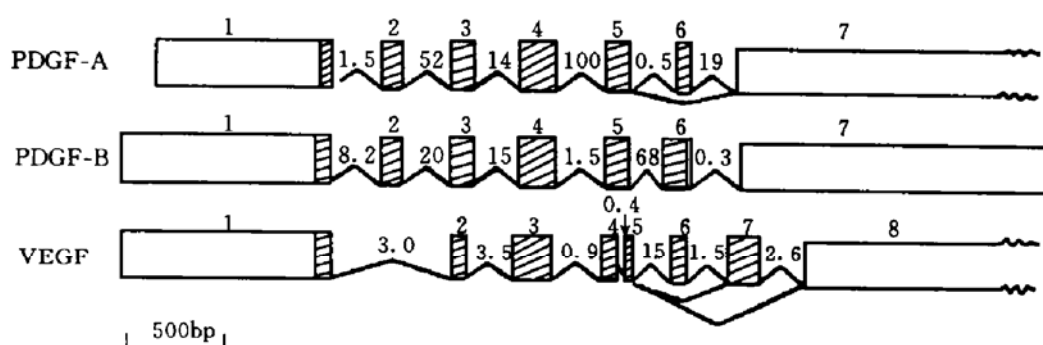


图 2 VEGF 基因与 PDGF A 链和 B 链基因内含子-外显子结构比较^[2]

上方数字表示外显子位置及序号, 划线区表示编码区, 开放的区域为内含子, 里面的数字表示其长度的 kb 数.

从已经纯化到的 VEGF 蛋白质来看, 亚基分子量多是 18 000—24 000 活性分子为同源的二聚体, 分子量 34 000—46 000, 蛋白表面有许多阳离子, 等电点较高, 对热和酸都相当稳定^[1,3]. cDNA 扩增在丰度上显示 VEGF 165 > 121 > 189^[5,6], 亚基为 23 000 左右的很可能就是 VEGF 165^[2], 这也是分离到最多的一种 VEGF 蛋白质. 目前还没有分离到所有可能的四种蛋白质, 因此也不能确定体内是否同时有它们存在, 这对比较它们之间性质上的特点也带来了困难. 最近 Houck 等^[5]人用分别载有四种 VEGF 基因的质粒在人胚胎肾的 CEN4 细胞中成功地表达了四种蛋白质, 并对它们的性质进行了较详细的研究. VEGF121 分子量为 34 000—36 000, 是可溶性分泌型蛋白质. 没有结合肝素活性. VEGF165 分子量为 45 000, 具有结合肝素活性, 只有 30%—50% 以可溶性的形式分泌到细胞外, 余下的部分和细胞膜或基底膜上含有肝素的蛋白聚糖类物质结合. VEGF189 和 206 的性质相同, 与肝素结合的活性更强, 在细胞外液中测不到溶解游离的形式, 这说明它们几乎都结合在质膜或基底膜上

的含有肝素蛋白聚糖上. 由此可看出大片段 VEGFs 在近 C 末端增加的氨基酸与其结合肝素的活性有关. 在体外实验中加入苏拉明、肝素、硫酸肝素、肝素酶和血浆酶均可使结合在膜上的 VEGF 释放出来, 变成游离形式. 血浆酶在这里起到了蛋白水解酶的作用, 降解的 VEGF 可形成溶解的可分泌形式, 这种形式在结构和性质上很象 VEGF121, 同时也具有 VEGF 的全部生物活性. 对四种 VEGFs 进行生物学活性检测, 未发现显著性差异. 根据上述的研究结果, 他们提出 VEGF 在生物利用率上可能存在二种调节机制, 即在基因水平上多种 VEGF 的选择性剪接和蛋白水解酶作用的调节性释放, 其中和膜结合的部分可看作是暂时的一种贮存形式, 当生理或病理条件需要时释放出来.

最近北京医科大学杨亚东等人在大肠杆菌中高效表达了人 VEGF121 蛋白, 表达产物占细菌总蛋白的 30% 以上^[7]. 该研究首次在原核细胞中表达了 VEGF, 也是国内首次关于 VEGF 的研究报告, 这对 VEGF 进一步研究及利用打下了良好基础.

现在已知道内皮细胞膜上的 VEGF 受体属于酪氨酸激酶类, 并且已证实 *flt* (*fms*-like tyrosine kinase) 和 (Flk-1 (fetal liver kinase-1) 是 VEGF 的受体^[8], 同时也不能排除还有其它未确定受体的存在^[3]. 在对受体的研究中发现, 高浓度的 VEGF 可能会诱导受体基因转录, 受体主要分布于新生的血管上, 如肿瘤和胚胎发育期组织中的血管, 这说明 VEGF 主要作用于处在增殖状态下的血管内皮细胞.

VEGFs 是一类具有分泌功能的蛋白质, 对血管内皮细胞有高效特异地促有丝分裂活性, 因此, 它可能在血管生成的生理或病理过程中起中心调控作用. 这对于血管病变和与血管生成有关疾病的研究有着十分重要的意义.

2 血管内皮生长因子与肿瘤生长

由于 VEGFs 在新生血管生成过程中所起的重要作用, 因此从确定之日起就和肿瘤 (特别是实体瘤) 发生了不可分割的联系^[9,10]. 快速增长的肿瘤组织必须伴有新生血管生成, 以保证营养和氧气的供应, 并及时带走代谢废物. 在一些恶性肿瘤组织切片中, 经常会见到局部的坏死灶, 这和供血的不足有直接关系^[6,9].

目前已在许多肿瘤组织和体外培养的肿瘤细胞株中发现有 VEGFs mRNA 的高表达或分离到活性的蛋白质. 肿瘤组织由于来源上的困难, 因此还未见直接纯化到蛋白质的报道, 但用免疫组化已在恶性神经胶质瘤、淋巴瘤以及周围的血管上证明有 VEGF 蛋白质的存在^[9,11]. 体外培养的肿瘤细胞株, 如豚鼠的肿瘤细胞、HL60 (人白血病细胞)、U937 (人淋巴瘤组织细胞瘤)、A-431 (人表皮细胞瘤)、鼠神经胶质瘤和肉瘤等的条件培养液中均得到了有活性的 VEGFs 蛋白质^[3].

VEGFs 能促进肿瘤的生长已得到许多实验的证实. Ferrara 等用转染了载有 VEGF 表达质粒的 CHO 细胞接种裸鼠, 结果发现有分化良好的良性瘤体形成, 而转染有空载质粒和未转染的亲代细胞都未发现瘤体形成^[4]. 瘤

体的组织学检查显示增殖的灶区内较致密, 细胞分化良好, 血管化明显, 新生毛细血管呈连续生长, 没有明显水肿. 在体外培养的上述三种细胞未见有增殖的明显改变, 相反转染表达质粒的还生长缓慢. 由此, Ferrara 等认为, VEGF 的高表达可给予非转化细胞在体内增殖的能力, 而这种能力的形成是与促进新生血管形成所创造的良好生存环境有关, 并非引起了细胞的恶性转化. Kim 等还从另一方面证明了这个问题, 他们用横纹肌肉瘤, 神经胶质瘤和平滑肌肉瘤细胞株接种裸鼠, 同时注入 VEGF 的单克隆抗体. 结果和对照组相比有明显抑制肿瘤生长作用, 其抑制率在三种肿瘤中分别为 96%, 80% 和 70%^[12], 这种抑制程度上的差异和肿瘤组织本身血管丰富程度及恶性程度是一致的. 组织学检查发现实验组的血管化明显低于对照组. 体外培养的这些肿瘤细胞加入单克隆抗体后未见对生长上有影响, 这也说明上述的抑制作用并非抗体的细胞毒作用造成.

VEGFs 的表达水平和肿瘤组织的血管化程度及恶性程度呈强烈的正相关^[6,9,12]. 成血管细胞瘤、卡波济肉瘤、横纹肌肉瘤、恶性神经胶质瘤和多发性肾透明细胞瘤等都有 VEGF mRNA 的高表达^[6,9,12]. 除此之外 VEGFs mRNA 的表达还有下面的特点: a. 肿瘤组织明显高于相同来源的正常组织. 我们研究室用斑点杂交, 比较了胃癌、肾癌、膀胱癌和它们的癌旁组织, 结果癌组织的表达明显高于癌旁组织 (待发表). b. 胚胎发育期的组织和处在分化状态下的细胞高于成年组织和分化完全的细胞^[13,14]. c. 血管密度或/和血管通透性高的组织高于其它组织, 如肺泡表皮、肾小球、肾皮质和心肌细胞等有较高的表达^[15].

免疫组化和原位杂交显示, VEGF 蛋白质在肿瘤组织和其血管上的分布明显高于正常组织, 有些正常组织甚至观察不到^[9,11]. VEGF mRNA 主要分布在肿瘤细胞中, 在坏死灶的周围尤为显著^[6,9], 这和 Shweiki 等所研究的缺氧可引起体外培养细胞表达 VEGF 增高可能是相同的机制. 第二信使通路的激活能促进

VEGF 的转录, 如 TPA (佛波酯)、cAMP 和 cAMP 的类似物均有促进作用^[14]. 我们实验中发现, 载有反义 ras 表达质粒的人膀胱癌 BIU-87 细胞 VEGF mRNA 表达水平降低, 在胃癌 7901 细胞株体外无血清培养液中加入 TPA 引起 VEGF mRNA 水平增高 (待发表). 从上述的研究中我们还弄不清存在着这些表达差异的原因, 也不知高表达组织第二信使通路是如何被激活的, 对癌基因在这里起的作用还了解得太少. 对 22 例恶性多形性胶质瘤和其周围来源的淋巴细胞中的 VEGF 基因进行 DNA 杂交分析, 未见有重排及多拷贝等的突变^[8], 但凭这一研究结果我们还不能完全排除肿瘤细胞中都没有发生 VEGF 基因突变.

在对 VEGFs 的受体 *flt* 原位杂交中显示, 人脑胶质细胞瘤血管壁上有明显的杂交活性, 而正常的脑皮层和白质的血管上未见有杂交活性^[9], 通常这些正是胶质瘤的好发部位. 由此看来在肿瘤组织中既有高浓度的 VEGFs, 又有高密度的受体存在, 这对血管生成十分有利, 对于 VEGF 受体这种分布上的差异可以有二种解释, 一是高浓度的 VEGF 可诱导其受体的表达, 二是处在增殖状态下的内皮细胞本身就具有 VEGF 受体的高表达.

根据 VEGFs 对血管内皮细胞增殖和使血管通透性增加的作用, 以及内皮细胞在肿瘤血行转移中所处的重要地位, 我们不难想象它应该在肿瘤转移过程中起作用. 但遗憾的是至今未见这方面的专门报道, 川口隆宪等在小鼠的体内外研究中发现, 对内皮细胞有刺激增殖能力的 EGF 和 TGF α 等可促进肿瘤向内皮下层浸润, 至于 VEGF 有没有这个作用还缺乏实验依据. 肿瘤细胞在血管内皮细胞上粘附、血浆酶的外渗以及基底膜的降解破坏是肿瘤血行转移的必备条件, 而 VEGFs 的作用恰恰又有利于这些条件的形成. 虽然在载有 VEGF 表达质粒的 CHO 细胞瘤体形成的裸鼠体内未见有转移瘤^[4], 但这不是恶性肿瘤细胞, 还不能说明问题. 恶性肿瘤转移是临床上肿瘤病人死亡的重要原因, 因此进一步研究 VEGFs 与肿瘤转

移的关系有很大的临床价值.

3 血管内皮生长因子与癌性水肿

癌瘤引起的脑水肿、腹水及胸水是临床上肿瘤死亡的重要原因之一, VEGFs 有引起血管通透性提高的作用, 那么两者之间的关系如何呢? Berkman 等对中枢神经系统肿瘤进行了多年的研究, 曾在恶性胶质瘤的囊液和体外培养液中分离到 VPF (VEGF), 经测定有血管通透性增高的活性. 最近他们又比较了多种脑瘤周围水肿和 VEGFs 的关系, 恶性多形性神经胶质瘤 (GBM) 有 VEGFs 的高效表达, 同时也有周围囊肿和脑水肿的存在, 用抗体处理证明血管通透性增加的作用主要来自 VEGFs. 脑转移瘤和脑膜瘤经常有明显的脑水肿症状, 但 VEGF 的表达水平却类同于正常脑组织. 相反, 脑成血管细胞瘤有最高水平的 VEGF 表达, 但临床上很少有脑水肿的症状^[6]. 由此看来, 中枢神经系统的肿瘤引起脑水肿和 VEGF 表达水平的相关远不如血管化那么明显. 对于 VEGFs 引起血管通透性增高的机理了解的还太少, 所以我们很难解释这种差别的原因, 也可能还有其它引起血管通透性增加的物质在起作用. Roberts 等在最近研究中观察到, VEGF mRNA 的表达、光敏感物质 (chloroaluminum sulfonated phthalocyanine) 在肿瘤组织中的积聚与血管通透性增高成正相关^[16]. 这种光敏感物质的存在和血管通透性直接相关, 只是还不能证明是不是由于 VEGF 的直接作用而引起这种光敏感性物质的增加. 另外我们也不清楚血管通透性增高和 VEGFs 的其它生物活性是否是有二类不同的受体参与, 或者前者就根本没有受体的介导.

瘤性腹水是 Senger 等人最先发现 VPF 的地方, 他们把这种能引起血管通透性增加的物质称为 VPF, 在豚鼠的癌性腹水中注射 VPF (VEGF) 的抗体, 结果发现有明显减少腹水的作用. 对癌性胸水还未见有这方面的研究报告. 另外在对非中枢神经系统实体瘤组织的免疫组化检测中发现, 周围有高浓度 VEGF 的血

管,其通透性都是高的^[11].再者有人在血管通透性比较高的肺泡表皮,肾小球和胎盘组织中均发现有高水平的 VEGF^[15].这些研究都使 VEGF 和癌性水肿结下了不能分隔的联系.

4 展 望

VEGFs 自发现以来,已经取得了令人激动的成果.人们发现除肿瘤外,胚胎发育,卵泡成熟,心血管疾病、关节炎等和血管生成及病变有关的疾病与 VEGFs 也有密切的关系.杨亚东等在动脉硬化斑块中检测到有 VEGF mRNA 的高表达^[7].对 VEGFs 进一步研究和利用,势必会对这些疾病的预防和治疗有重要价值,这要求我们寻找出在活体上可利用的、有效的阻断 VEGFs 活性的方法.一方面我们可以从基因调控上想办法,如抑制基因的转录活性,想法阻断第二信使通路的激活.另一方面可以用抗体中和 VEGFs 的作用,或想法阻断受体和它的结合.这样可能会对实体瘤的治疗和有效地控制癌性水肿创出一条新的路子.

遗传性的希佩尔-林道病 (ven hippel-lindau disease) 常伴有多发性肾透明细胞瘤和成血管细胞瘤,这二种瘤都有高表达的 VEGFs^[6].如果能进一步研究它们在基因结构上的改变和 VEGFs 在其中所起的作用,将有助于该病的治疗及弄清 VEGF 基因是否有改变.

根据 VEGFs 能促进新生血管生成的活性,可否能用 VEGF 为血栓患者更快更有效地建立新的侧支循环提供治疗,也可能为心肌梗

塞的恢复期治疗提供一条新的途径.另外还可作为体外难培养的血管内皮细胞减少培养上的难度.

参 考 文 献

- 1 Ferrara N, Henzel W J. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; **161**: 851
- 2 Tischer E, Mitchell R, Hartman T *et al.* *J Biol Chem*, 1991; **266**: 11947
- 3 Myoken Y, Kayada Y, Okamoto T *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 5819
- 4 Ferrara N, Winer J, Burton T *et al.* *J Clin Invest*, 1993; **91**: 160
- 5 Houck K A, Leung D W, Rowland A M. *J Biol Chem*, 1992; **267**: 26031
- 6 Berkman R A, Merrill M J, Reinhold W C *et al.* *J Clin Invest*, 1993; **91**: 153
- 7 杨亚东,周爱儒,李岱宗等. *高技术通讯*, 1993; **3** (5): 13
- 8 Millauer B, Witzigmann-voos S, Schnurch H *et al.* *Cell*, 1993; **72**: 835
- 9 Plate K H, Breier G, Weich H A *et al.* *Nature*, 1992; **359**: 845
- 10 Folkman J. *J Natl Cancer Inst*, 1990; **82**: 4
- 11 Dverak H F, Sioussat T M, Brown L F *et al.* *J Exp Med*, 1991; **174**: 1275
- 12 Kim K J, Li Bing, Winer J *et al.* *Nature*, 1993; **362**: 841
- 13 Breier G, Albrecht U, Sterrer S *et al.* *Development*, 1992; **114**: 521
- 14 Clatney K P, Wilkison W O, Spiegelman B M. *J Biol Chem*, 1992; **267**: 16317
- 15 Berse B, Brown L F, Van de Water L *et al.* *Mol Biol Cell*, 1992; **3**: 211
- 16 Roberts W G, Hasan T. *Cancer Res*, 1993; **53**: 153

RB 基因与肿瘤抑制

龚国胜 钱丽清*

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 RB 基因位于 13q14, 全长 150kb, 编码一个由 928 个氨基酸组成的分子量为 110 000 蛋白 (pp110RB). 它能特异性与 SV40 大 T, E1A 和 E7 结合. 在视网膜细胞中, RB 呈恒定组成性表达, 其

inflammation

The Newest Progress of Protein Kinase C. Yang Yu, Yu Bingzhi. (*Department of Biochemistry, China Medical University, Shenyang 110001*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 308—312

Diacylglycerol (DAG), as the second messenger to activate protein kinase C (PKC), may be derived not only from hydrolysis of phosphatidylinositol (PtdIns), but also from hydrolysis of phosphatidylcholine (PC), in which phospholipases of the type C and D (PLC and PLD) participate. Fatty acids (FA), the products of phospholipases A₂ (PLA₂) also activates PKC. PKC has at least 10 subspecies and 3 group, namely classical PKC, new PKC and atypical PKC. PKC also participates in regulation of gene expression.

Key words protein kinase C, diacylglycerol, phospholipase C, phospholipase D, phospholipase A₂, subspecies

Vascular Endothelial Growth Factor and Tumors. Xiu Bo, Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 312—317

Vascular endothelial growth factor (VEGF) with paracrine mechanism has recently been identified. Its growth-promoting activity is specific for vascular endothelial cells *in vitro*. VEGF also stimulates angiogenesis and increases blood vessel permeability *in vivo*. Because its bioactivity has a direct bearing on the growth of solid tumors, the researches on VEGF have been paid a good deal of attention and made good progress.

Key words VEGF, vascular permeability factor, vascular endothelial cell, tumor, gene

expression

RB Gene and Tumor Suppression. Gong Guosheng, Qian Liqing. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 317—322

The RB gene is located at chromosome 13q14 which spans more than 150kb, with one internal gap, and its product is a phosphoprotein of about 110kD which is constantly expressed in normal retina cells. The RB Protein can specifically bind to SV40 large T, E1A and E7 antigens. The deficiency of the RB gene is the cause of retinoblastoma. Besides, RB gene mutations are detected in osteosarcomas, breast carcinomas, small-cell lung cancer (SCLC), soft-tissue sarcomas and hematopoietic proliferative disorders. The tumorigenicity can be partially or totally suppressed by introducing the RB gene into the tumor cells.

Key words RB, tumor suppressor gene, tumor suppression

Mechanism and Application of Cell Electroporation and Electrofusion. Wang Hemu, Wang Zhou. (*Department of Physics, Nankai University, Tianjin 300071*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 322—326

In recent over ten years, owing to the mutual permeation and the coexperiments of biologists and physicists, a new field of biophysical technology was born and has grown up. It not only involves the basic study of cell electromagnetic effect and its mechanism, but also, as a new field in biotechnology, it relates to the wide application of many other fields, such as molecular biology, cellular biology, immunology, medicine, food and agriculture. The newest progresses in this field are summa-