

血管内皮生长因子受体信号转导通路 with 肿瘤血管生成

谭文福¹⁾ 肖 东 王家骥¹⁾ 丁 健*

(中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

摘要 血管内皮生长因子是促进血管生成的重要调节因子. 它能促进内皮细胞增殖、迁移, 阻止内皮细胞凋亡、管腔网状结构退化, 增加血管渗透性. 所有这些作用都是通过血管内皮生长因子受体信号转导通路实现的. 它们在肿瘤血管生成、肿瘤生长中起着重要的作用. 以血管内皮生长因子受体信号转导通路为靶点是开发肿瘤血管生成抑制剂的理想策略.

关键词 血管内皮生长因子, 血管内皮生长因子受体, 信号转导, 肿瘤血管生成, 血管生成抑制剂

学科分类号 R73

血管生成 (angiogenesis) 是肿瘤赖以生长、转移的基础. 肿瘤血管生成是个十分复杂的过程, 它包括基底膜的降解, 内皮细胞迁移、增殖, 管腔网状结构 (tube network) 形成, 血管重构基底膜等一系列的过程. Hanahan 等^[1]提出了“血管生成的开关平衡假说”, 即新生血管生成的整个过程受血管生成调节因子的严密调控, 血管生成与否取决于血管生成的正性调节因子与负性调节因子之间的“力量”对比. 肿瘤血管的生成正是正性调节因子增多和/或负性调节因子减少的结果. 在促血管生成的正性调节因子中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一主要的调节因子, 它通过血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 转导其促血管生成的信号.

1 VEGF 及其受体家族的生物学特性

VEGF 家族是一个以二硫键或非共价键链接的同源二聚体的糖蛋白, 包括 VEGF、胎盘生长因子 (placenta growth factor, PlGF)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 及 VEGF-E. 它们都含有一个半胱氨酸结 (cysteine knot) 及六个不同的半胱氨酸同源区域. VEGF 为低氧诱导的生长因子, 分子质量为 34~46 ku, 其基因为单一基因长约 14 kb, 由 8 个外显子及 7 个内含子构成^[2,3].

VEGF 的生物活性主要通过两个结构相关的高亲和力的酪氨酸激酶受体介导, 它们分别是 180 ku 的 VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase, Flt-1) 及 200 ku 的 VEGFR-2 (kinase insert domain-

containing receptor/fetal liver kinase, KDR/Flk-1). Flt-1 广泛表达于胚胎及成人血管内皮细胞, 其配体为 VEGF、PlGF、VEGF-B. 而 KDR 主要表达于胚胎发育期的血管内皮细胞, 在成人血管内皮细胞则表达下降, 它主要连接 VEGF、VEGF-C、VEGF-D 及 VEGF-E. VEGF 的第三个受体酪氨酸激酶为 180 ku 的 VEGFR-3, 虽然它也广泛表达于胚胎发育期的血管内皮细胞, 但在成人组织中仅限表达于淋巴管内皮细胞, 它主要和 VEGF-C、VEGF-D 相连^[4]. 三个受体酪氨酸激酶都含有 7 个免疫球蛋白样胞外结构域, 跨膜结构域和一个插入了酪氨酸激酶的胞浆结构域. 最近又发现了一个新的 VEGF 受体 neuropilin-1, 它是一细胞表面的糖蛋白, 为 VEGF165 特异性的受体. 它不仅表达于内皮细胞, 而且表达于其他类型细胞中, 如肿瘤细胞^[5].

2 VEGFR 介导的信号转导通路

如其他的受体酪氨酸激酶一样, VEGFR 在连接配体后也被二聚体化、自身磷酸化. 磷酸化的酪氨酸残基可以控制激酶的活力, 也可为胞浆中的信号分子提供连接位置, 这些信号分子或是一些衔接蛋白或是酶本身.

Flt-1 的信号转导机制目前还不十分清楚. 运用基因敲除法 (gene knock out) 剔除 Flt-1 基因的

* 通讯联系人.

¹⁾ 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 武汉 430030

Tel: 021-64311833, E-mail: jding@mail.shnc.ac.cn

收稿日期: 2000-09-05, 接受日期: 2000-11-01

小鼠因没有血管生成,而导致小鼠死亡。有趣的是表达一缺乏酪氨酸激酶的截短 Flt-1 基因的小鼠能够生成正常血管,这说明 Flt-1 基因或许是一“诱饵受体”(decoy receptor)而非一个信号转导分子^[3]。但最近有报道,在 VEGF 刺激下,Flt-1 磷酸化后虽然不能促进内皮细胞增殖,但能通过激活丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)家族中的 p38MAPK 从而促进肌动蛋白(actin)的聚集而使内皮细胞迁移。而 PlGF 与 Flt-1 结合后可通过激活 p38MAPK 增加内皮细胞增殖^[6]。因此 Flt-1 在 VEGF 信号转导中的作用还有待进一步研究证明。

在 VEGF 刺激下, KDR 迅速被磷酸化。磷酸化的 KDR 通过激活 MAPK 通路而促进内皮细胞有丝分裂已被许多学者证实^[4]。有实验证明 KDR 并不象其他酪氨酸激酶,如表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)一样是通过 Ras-MAPK 旁路,而是通过蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)-MAPK 旁路促进内皮细胞增殖的^[7,8]。体内实验也发现, PKC 抑制剂能阻止 VEGF 介导的 MAPK 磷酸化、血管生成及肿瘤生长^[9],进一步证实了 KDR 是通过 PKC-MAPK 旁路促进内皮细胞增殖的。有关 Ras 在 KDR-MAPK 通路中的作用还存在分歧。虽然有实验证明 KDR 或许是通过 Shc/Grb2/sos/Ras 介导其有丝分裂信号的^[10],但是内皮细胞转染突变的 Ras 后并不能阻止 VEGF 介导 MAPK 磷酸化、内皮细胞增殖^[7]。Doanes^[11]发现 KDR-MAPK 通路是 PKC 依赖的但需要 Ras-Raf 的相互作用。

内皮细胞迁移除了需要 actin 参与外,还需要与粘附有关的蛋白质协同作用。KDR 在 VEGF 刺激下能磷酸化粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)、桩蛋白(paxillin)及粘着斑蛋白(vinculin)而促进内皮细胞迁移。与 KDR 促进内皮细胞增殖不同, KDR 介导内皮细胞迁移是非 MAPK 依赖的,而主要是通过 PKC 磷酸化 FAK、桩蛋白及粘着斑蛋白^[5]。

KDR 磷酸化后还能激活 PI3 激酶(PI3-kinase),后者进一步激活抗凋亡信号分子蛋白激酶 B (protein kinase, B),从而在内皮细胞中转导生存信号,阻止内皮细胞凋亡^[12]。此信号通路也参与了阻止新近形成的不成熟血管 Tube 的退化。最近有研究证明 VEGF 促进血管通透性增加,阻止内皮细胞凋亡需要 Src 激酶的激活^[13]。

Schlessinger 认为 Src 是 PI3-K/PKB 上游的一信号分子, VEGF 磷酸化 KDR 后,激活 Src,从而依次激活 PI3-K、PKB 阻止内皮细胞凋亡^[14]。

相对 KDR 而言,有关 VEGFR-3、neuropilin-1 的信号转导通路目前还知之甚少。在 VEGF-C 的刺激下 VEGFR-3 能磷酸化 Shc,促进内皮细胞增殖及迁移^[15],说明 VEGFR-3 激活了与 KDR 相似的信号转导通路。实验发现 neuropilin-1 能促进 VEGF165 与 KDR 的连接及 VEGF165 介导的内皮细胞迁移,或许 neuropilin-1 与 KDR 是一共同的受体,它间接通过 KDR 转导其信号^[14]。

3 VEGF 及 VEGFR 与肿瘤血管生成

肿瘤在刚发生,体积小于 2~3 mm 时,自身可不需要血管生成,因为氧气等各种营养物质可从位于肿瘤组织旁的血管通过渗透的方式到达肿瘤组织内。当其体积超过 3 mm 时肿瘤即处于缺氧状态。缺氧和癌基因可上调肿瘤细胞 VEGF 的表达, VEGF 和缺氧可进一步提高 Flt-1、KDR 的表达^[16]。肿瘤从而通过 VEGF-VEGFR 信号转导通路诱导血管生成。运用原位杂交、免疫组织化学的方法已发现许多肿瘤组织的 VEGF 及 VEGFR 的表达高于正常组织,且与肿瘤组织血管密度成正相关^[17]。这说明 VEGF-VEGFR 信号转导通路与肿瘤的血管生成、肿瘤的生长有着密切的关系。动物实验也证实了这一点:特异性 VEGF 中和抗体能抑制小鼠移植瘤的新血管生成和肿瘤的生长,而这种抗体对肿瘤细胞没有直接抑制作用^[18]。Millauer 等^[19]进一步证明了 KDR 在肿瘤血管生成中的作用,他们将突变的 KDR 基因导入荷瘤小鼠的血管内皮细胞,发现突变的 KDR 蛋白与内源性 KDR 形成二聚体,从而阻断了 KDR 的信号转导,抑制肿瘤血管生成及肿瘤生长。关于 Flt-1、VEGFR-3 及 neuropilin-1 信号转导通路在肿瘤中的作用还有待研究。Millauer 在实验中发现虽然突变的 KDR 基因能抑制许多类型肿瘤的血管生成及肿瘤生长,但运用这种方法对另一些肿瘤的血管生成及肿瘤生长却没有作用,这些肿瘤中或许主要是依靠其他一些配体、受体信号旁路诱导血管生成的。

4 VEGFR 信号转导通路及肿瘤血管生成抑制剂的开发

开发血管生成抑制剂以治疗肿瘤是当前抗肿瘤研究领域的一大热点。如上所述,应用 VEGF

中和抗体或 KDR 突变技术都能阻止肿瘤血管生成及肿瘤生长. 也有学者证实应用 KDR 信号转导通路下游信号分子 PKC 的抑制剂, 或 VEGFR 的酪氨酸激酶抑制剂阻断 VEGFR 的信号转导后, 可完全阻止视网膜的新生血管生成^[20]. 所以, 以 VEGFR 信号转导通路为靶点开发肿瘤血管生成抑制剂或许是一理想策略.

目前, 医药公司已针对 VEGFR 信号转导通路开发出不少血管生成抑制剂. Genentech 公司的人型 VEGF 单克隆抗体, 作为一抗肿瘤的血管生成抑制剂已进入 II/III 期临床试验^[21]. Imclone Systems 开发了一嵌合型抗 KDR 抗体, 它特异地与 KDR 细胞外区域相连, 能阻止 VEGF 激活 KDR、MAPK 磷酸化, 该药已进入临床前期试验^[22]. 除了单克隆抗体外, 利用小分子酪氨酸激酶抑制剂, 是以 VEGFR 为靶点开发血管生成抑制剂的另一种用途. SU5416、ZD4190、PTK787 是三种特异性 KDR 抑制剂, 前者已进入 II/III 期临床试验, 后两者已进入 I 期临床试验. PD0174073、SU6668 两种非特异性 KDR 抑制剂也已进入前期临床试验. 此外, 以 Flt-1 为靶点的血管生成抑制剂 RPI4610 也已进入 I 期临床试验^[21]. 以上各种血管生成抑制剂都是以 VEGF 或 VEGFR 为靶点阻止 VEGFR 的信号转导而抑制血管生成的. 以 VEGFR 下游信号转导分子为靶点开发血管生成抑制剂也不失为一种理想策略. 前已叙及特异性 PKC 抑制剂能完全抑制视网膜血管生成. 抗过敏药 Tranilast 能抑制 VEGF 诱导的血管生成, 其机制主要为 Tranilast 抑制了 VEGFR 信号转导通路中的下游信号分子 PKC, 而它对 VEGF 与 VEGFR 的结合及 VEGFR、PLC 的活力没有任何作用^[23]. 另有报道已开始进入前期临床试验的内皮抑素 (endostatin) 的作用机制可能是抑制 MAPK 的活力^[21]. 这些研究都表明一些 VEGFR 下游的信号转导分子如 PKC、MAPK 等有可能成为开发血管生成抑制剂的新靶点.

理想的血管生成抑制剂应具有两大特点: a. 其靶点应只表达于肿瘤组织的血管内皮细胞, b. 能有效抑制其靶点在血管生成中的作用^[22]. 虽然, 到目前为止还没有以 Flt-1、VEGF 及 KDR 为靶点的抑制剂疗效比较的实验报道, 但是 KDR 似乎在这三者中是一更理想的开发血管生成抑制剂的靶点, 以 KDR 或其下游信号转导分子为靶点开发血管生成抑制剂应是以后努力的主要方向. 首先,

KDR 不同于 Flt-1, 它只表达处于增生期的血管内皮细胞, 如胚胎发育期或肿瘤组织的血管内皮细胞. 阻止 KDR 的功能可同时抑制 VEGF、VEGF-C、VEGF-D 及 VEGF-E 的生物学作用. 其次, 由各种类型细胞分泌的 VEGF 主要位于间质组织中, 药物很难接近. 而且作为肝素连接蛋白的 VEGF 隐藏在细胞外基质中, 一旦机体需要可随即释放出来, 因此具有生物活性的 VEGF 水平很不稳定, 使药物难以抑制其功能.

肿瘤的血管生成有赖于 VEGFR 信号转导通路, 阻止 VEGFR 的信号转导能抑制肿瘤的血管生成及肿瘤的生长. 因此, 研究 VEGFR 信号转导通路, 阐明 VEGF 诱导血管生成的机制, 能为我们开发肿瘤血管生成抑制剂提供一个理论基础.

参 考 文 献

- 1 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, **86** (3): 353 ~ 364
- 2 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999, (1): 9 ~ 22
- 3 Petrova T V, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res*, 1999, **253** (1): 117~ 130
- 4 Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, *et al.* Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*, 2000, **60** (2): 203~ 212
- 5 Soker S, Takashima S, Miao H Q, *et al.* Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 1998, **92** (6): 735~ 745
- 6 Kanno S, Oda N, Abe M, *et al.* Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*, 2000, **19** (17): 2138~ 2146
- 7 Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*, 1999, **18** (13): 2221~ 2230
- 8 Wu L W, Mayo L D, Dunbar J D, *et al.* Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*, 2000, **275** (7): 5096~ 5103
- 9 Yoshiji H, Kuriyama S, Ways D K, *et al.* Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Res*, 1999, **59** (17): 4413~ 4418
- 10 Kroll J, Waltenberger J. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 1997, **272** (51): 32521~ 32527
- 11 Doanes A M, Hegland D D, Sethi R, *et al.* VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **255** (2): 545~

- 548
- 12 Gerber H P, McMurtrey A, Kowalski J, *et al.* Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 1998, **273** (46): 30336~ 30343
 - 13 Eliceiri B P, Paul R, Schwartzberg P L, *et al.* Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*, 1999, **4** (6): 915~ 924
 - 14 Schlessinger J. New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell*, 2000, **100** (3): 293~ 296
 - 15 Cao Y, Linden P, Farnebo J, *et al.* Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (24): 14389
 - 16 Kremer C, Breier G, Risau W, *et al.* Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res*, 1997, **57** (17): 3852 ~ 3859
 - 17 Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana C D, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res*, 1995, **55** (18): 3964~ 3968
 - 18 Kim K J, Li B, Winer J, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature*, 1993, **362** (6423): 841~ 844
 - 19 Millauer B, Longhi M P, Plate K H, *et al.* Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*. *Cancer Res*, 1996, **56** (7): 1615~ 1620
 - 20 Ozaki H, Seo M S, Ozaki K, *et al.* Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol*, 2000, **156** (2): 697~ 707
 - 21 Klopsch W D, Hamby J M. Antiangiogenic agents. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10** (6): 544~ 549
 - 22 Zhu Z, Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Invest New Drugs*, 1999, **17** (3): 195~ 212
 - 23 Koyama S, Takagi H, Otani A, *et al.* Tranilast inhibits protein kinase C-dependent signalling pathway linked to angiogenic activities and gene expression of retinal microcapillary endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 1999, **127** (2): 537~ 545

Tumor Angiogenesis and Signal Transduction via Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

TAN Wen-Fu¹⁾, XIAO Dong, WANG Jia-Long¹⁾, DING Jian*

(Shanghai Institute of Materia Medica, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China;

¹⁾ Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a central role in tumor angiogenesis. It stimulates endothelial cell proliferation and vessel hyperpermeability, promotes cell migration, and inhibits apoptosis. All these actions of VEGF are mediated by receptor tyrosine kinase, vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR). Selective targeting VEGFR signal transduction pathway may be proved to be useful in developing tumor angiogenesis inhibitors.

Key words vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), signal transduction, tumor angiogenesis, angiogenesis inhibitor

* Corresponding author. Tel: 86-21-64311833, E-mail: jding@mail.shenc.ac.cn

Received: September 5, 2000 Accepted: November 1, 2000