

肿瘤饥饿疗法的新靶标 ——内分泌腺衍生血管内皮生长因子*

闻崇炜^{1)**} 宁德刚²⁾ 刘瑞江¹⁾ 张业旺¹⁾

(¹⁾ 江苏大学药学院, 镇江 212013; (²⁾ 江苏大学环境学院, 镇江 212013)

摘要 “肿瘤饥饿疗法”是通过抑制促肿瘤血管新生细胞因子的作用, 阻断肿瘤血管形成, 最终实现“饿死”肿瘤细胞的一种治疗方法. 内分泌腺衍生血管内皮生长因子(EG-VEGF)是在 2001 年被发现的一个组织选择性促血管新生因子. 近年来的研究表明, EG-VEGF 还兼有促进造血干细胞分化、刺激胃肠道收缩及影响肠神经系统发育等多种生理功能. EG-VEGF 的异常表达与多种肿瘤及血管新生依赖性疾病的发生发展密切相关, 有望作为相应的治疗靶点开发诊断及治疗试剂. 本文对有关研究进展及应用前景作一简要综述.

关键词 肿瘤饥饿疗法, 内分泌腺衍生血管内皮生长因子(EG-VEGF), 组织选择性, 血管新生, 肿瘤

学科分类号 Q71, R33

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00351

“肿瘤饥饿疗法”(starving tumor therapy)是通过抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等与肿瘤血管异常新生相关的促血管新生因子活性, 阻断肿瘤组织血管生成, 最终“饿死”肿瘤细胞的一种治疗方法. 2003 年, “肿瘤饥饿疗法”被《科学》杂志(*Science*)评为当年度世界十大科学成就之一.

2001 年, Genentech 公司的 LeCouter 等^[1]发现了一个新型组织选择性促血管新生因子(tissue-selective angiogenic factor). 该因子与 VEGF 不具有结构相似性, 但在促血管内皮细胞增殖、移行方面具有功能相似性, 鉴于这一作用局限于内分泌腺体(endocrine gland)来源的内皮细胞及卵巢、睾丸组织, 因此被命名为内分泌腺衍生血管内皮生长因子(endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor, EG-VEGF)^[1]. LeCouter 等^[1-4]因此提出, 机体的血管新生受到以 VEGF 为代表的广谱性促血管新生因子及 EG-VEGF 为代表的组织选择性促血管新生因子的双重调控, 后者对特定组织的血管新生起“微调”(fine tune)作用.

近年研究发现, EG-VEGF 还兼有促进造血干细胞分化、刺激胃肠道收缩及影响肠神经系统发育

等其他生理功能. EG-VEGF 或其受体失调与肿瘤、多卵巢综合征等血管新生依赖性疾病的发生发展密切相关. 本文在此对有关 EG-VEGF 的分子特征、基因表达调控、受体及信号通路、生理功能及相关疾病方面的研究进展作一综述, 为进一步研究组织特异性血管新生的调控机理及其在“肿瘤饥饿疗法”中的应用前景提供思路.

1 分子特征

1.1 命名与结构特征

EG-VEGF 在文献报道中还常被称作原动蛋白 1(prokineticin 1, PK1), 这是因为 Li 等^[5]在 2001 年同时发现了这一因子, 并根据其促回肠纵向肌收缩的功能而命名. 序列对比结果表明, EG-VEGF 与 PK1 是同一种蛋白质分子(以下均统一称为 EG-VEGF).

* 国家自然科学基金(30771176), 江苏大学高级人才启动基金资助项目(1281370001).

** 通讯联系人.

Tel: 0511-85038201, E-mail: wenchw@ujs.edu.cn

收稿日期: 2011-07-28, 接受日期: 2011-10-18

成熟的 EG-VEGF 是一个由 86 个氨基酸残基组成的分泌型小分子蛋白质, 分子质量 8.6 ku, 理论等电点 8.46, 其前体蛋白的氨基端还有由 19 个氨基酸残基组成的信号肽^[1,5]。核磁共振结果表明, EG-VEGF 可能具有与共脂肪酶(colipase)及 wnt 信号通路抑制剂 dickkopf 相类似的高级结构^[6]。

EG-VEGF 广泛分布于人、小鼠、大鼠等哺乳动物及黑曼巴蛇、铃蟾、河豚等脊椎动物体内^[6]。

各种属来源 EG-VEGF 的一级结构与高级结构高度保守, 氨基端为丙缬异苏(AVIT)序列, 分子内有 5 对保守二硫键, 现已被归入丙缬异苏蛋白质家族(AVIT protein family)^[6]。EG-VEGF 还有一个高度同源分子, 被命名为原动蛋白 2(prokineticin 2, PK2), 两者在分子大小、序列同源性及信号肽核心结构均有所不同, 因此分属于 AVIT 蛋白质家族的不同亚家族(图 1)^[5]。

		Signal peptide	Mature protein	
Human	EG-VEGF	MRG—ATRVSIMLLLV——TVSDC	AVITGACERDVQCGAGTCCATISLWLRGLRMCTPLGREGECHPGSHKVPFFRKRKHHHTCPLPNLLCSRFPDGRYRCSMDLKNVNF	——105
Rat	EG-VEGF	MRG—AVQVIMLLLA——TVSDC	AVITGACERDVQCGAGTCCATISLWLRGLRCLTPLGREGECHPGSHKIPFFRKRQHHHTCPCSPSLLCSRFPDGRYRCSQDLKNVNF	——105
Mouse	EG-VEGF	MRG—AVHIFIMLLLA——TASDC	AVITGACERDIQCGAGTCCATISLWLRGLRCLTPLGREGECHPGSHKIPFLRKRQHHHTCPCSPSLLCSRFPDGRYRCFRDLKNANF	——105
Swine	EG-VEGF	MRG—GAQVSMMLLV——TVSDC	AVITGACERDVQCGPGTCCAVSLWLRGLRCLTPLGQEGEQCHPGSHKVPFPRKRQHHHTCPLPNLLCSRALGGYRCSADLKNVNF	——105
Bull	EG-VEGF	MRG—ATQSVIILLV——TVSDC	AVITGACERDVQCRAGTCCAVSLWLRGLRVCTPLGRAGEECHPGSHKVPFFRKRQHHHTCPLPNLLCSRGLDGRYRCSNLKNVNF	——105
Zebrafish	EG-VEGF	MSR—VLILCLLLLSM——SCCRG	AVITGACDRDVQCGVGLCCAVSLWLRGLRMCTPLGLEGDECHPYSHKVPFPGRKRQHHHTCPLPHLVCTRYADNRYRCSDFKNTDF	——105
Human	PK2	MRSLLCCAPLLLLLLLPLLLTPRAGDA	AVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTPMGLKDSCHPLTRKVPFPGRRMHHHTCPLPGLACLRTSFNRFICLARK	——108
Rat	PK2	MEDPRCAPLLLLLLL—LLFTPPAGDA	AVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTPMGQVGDSCPLTRKVPFVWGRMHHHTCPLPGLACLRTSFNRFICLARK	——107
Mouse	PK2	MGDPRCAPLLLLLLL—LLFTPPAGDA	AVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTPMGQVGDSCPLTRKVPFVWGRMHHHTCPLPGLACLRTSFNRFICLARK	——107
		* : : : *	***** : * * * * * : * : : * : * * * * * * : * * * * : * : * * * * * * * * * * * : *	

Fig. 1 Alignments of amino acid sequences of EG-VEGF and PK2 from different species
图 1 部分物种 EG-VEGF 及 PK2 的蛋白质序列比较结果

1.2 基因结构与表达调控

人 EG-VEGF mRNA 主要分布于卵巢、睾丸、肾上腺、胎盘等类固醇激素合成组织, 而在非类固醇激素合成组织中含量极低, 呈现严格的组织特异性, 因此, 其促血管新生作用也具有严格的组织选择性^[1,7]。EG-VEGF 又是一种分泌型蛋白质, 因此也可以进入其他组织发挥生理作用。

人 EG-VEGF 基因定位于染色体 1p13.1 区段, 小鼠 EG-VEGF 基因则位于 3 号染色体, 两者均由 3 个外显子与 2 个内含子组成, 第一个外显子编码信号肽及成熟蛋白的前 5 个氨基酸, 第二个外显子编码中间 42 个氨基酸, 包括 6 个半胱氨酸, 第三个外显子编码末端 39 个氨基酸, 包括剩余 4 个半胱氨酸^[8]。

人 EG-VEGF 基因的启动子含有低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 结合位点与类固醇生成因子-1(steroidogenic factor 1, SF-1) 结合位点^[1,3,8], 表明其表达受低氧应激与类固醇刺激调控。报告基因实验结果表明 HIF-1 结合位点可以促使荧光素酶表达水平在低氧状态下升高 3~4 倍^[1]。低氧应激也可促使人胎盘滋养层细胞表达 EG-VEGF^[9]。此外, 低浓度雌激素与孕激素共刺激或高浓度孕激素刺激都可以促使人子宫内膜上皮细

胞表达 EG-VEGF^[10-11]。但是, 低氧应激或孕激素水平变化不影响黄体化颗粒细胞中的 EG-VEGF 表达, 表明黄体组织来源细胞中可能具有不同的表达调控机制^[12-13]。此外, 小鼠 EG-VEGF 基因的启动子区域不具有 SF-1 结合位点, 其 mRNA 主要分布于肝肾组织中, 表明其表达具有种属差异性, 促血管新生活性也具有不同的组织选择性^[9]。

1.3 作用受体与信号通路

EG-VEGF 有 2 个受体, 分别被命名为原动蛋白受体 1(prokineticin receptor 1, PKR1)与原动蛋白受体 2(prokineticin receptor 2, PKR2), 相应基因均已被克隆^[14]。人 PKR1 与 PKR2 基因分别定位于染色体 2p14 区段与 20p13 区段, 各自编码由 393 与 384 个氨基酸残基组成的 7 次跨膜型 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs), 两者相同序列的比例高达 85%, 主要差异序列位于氨基端^[14-16]。对牛、小鼠、大鼠等多个物种的 PKR1 与 PKR2 序列分析的结果表明, 所有受体高度同源, 都含有 7 个跨膜区, 第 3 个跨膜区胞质面还有保守的 DRY(Asp-Arg-Tyr)基序, 氨基端残基数目少于 100, 因此都属于 GPCR 中的神经肽(neuropeptide Y, NPY)受体亚家族。

PKR1 与 PKR2 在脑、心脏、脾脏、前列腺、

睾丸、卵巢、小肠、淋巴细胞、胰腺、肾上腺、胸腺、唾液腺及垂体等多种组织器官中广泛表达^[14-16]。放射配基竞争结合实验结果表明 EG-VEGF 与 2 个受体的结合常数基本相当，因此体外实验中不表现受体选择性。体外实验中，PK2 也可以与 2 个受体结合，结合常数与 EG-VEGF 基本相当。PK2 经可变剪接与翻译后加工，还可以产生一个较小的衍生产物，即 PK2 β ，PK2 β 选择性地与 PKR1 结合，而不与 PKR2 结合^[17]。因此，体内实际生理环境中的 PK2 与 PK2 β 可以影响 EG-VEGF 与 PKR1 或 PKR2 的结合程度，进而影响其生理功能。

PKR1 与 PKR2 可与 G_q、G_s 或 G_i 蛋白发生偶联，因此 EG-VEGF 结合后可激活 p44/p42 丝裂原活化蛋白激酶 (p44/p42 mitogen-activated protein kinase, p44/p42 MAPK)、磷脂酰肌醇-3(羟基)激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、钙调神经磷酸酶 / 活化 T 细胞核因子 (calcineurin-nuclear factor of activated T cell, CaN/NFAT)、环化腺苷单磷酸 (cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, cAMP) 等多条信号通路 (图 2)，这是 EG-VEGF 具有多种直接生理功能的分子基础^[14, 18-20]。有观点认为，EG-VEGF 对特定细胞的最终效应由细胞膜上 PKR1 及 PKR2 的数量与比例，及胞内 G 蛋白的数量与种类等多种因素共同决定^[21]。例如，G α 1 蛋白与 G α 2 蛋白有较高的同源性及相似的生化性质，都可以抑制腺苷酸环化酶活性，但两者的抑制效率差异较大，并影响 ERK 与 Akt 的磷酸化程度^[22-24]。由于人胎盘微血管内皮细胞 (human placental endothelial cell, HPEC) 中 G α 2 水平为人脐静脉血管衍生大血管内皮细胞 (human umbilical vein-derived macrovascular

endothelial cell, HUVEC) 的 3 倍，而 G α 1 仅为后者的 1/3，因此 EG-VEGF 对 HPEC 具有促增殖、移行及存活作用，但对 HUVEC 仅有促存活作用^[21]。

VEGF 是新生血管的关键调控者，主要作用于 VEGFR-1、VEGFR-2 及 VEGFR-3 三个结构相关的酪氨酸激酶受体，激活 PI3K-PKB/Akt-eNOS、PLC-PKC-Ca²⁺、FAK-Paxillin、CDC42-p38 MAPK-HSP27 等多条下游信号通路^[25-26]。由此可见，虽然 EG-VEGF 与 VEGF 的信号传导途径间可能产生交叉调节，但总体来说两者采用不同信号机制来影响血管新生。

PKR1 与 PKR2 还可与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、RET 受体酪氨酸激酶 (RET receptor tyrosine kinase, Ret) 介导的信号通路发生交互应答 (cross-talk)^[27-29]，促进 VEGF、环氧合酶-2 (cyclooxygenase 2, COX-2)、白血病抑制因子 (leukemia inhibiting factor, LIF)、白介素 6 (interleukin 6, IL-6)、白介素 8 (interleukin 8, IL-8)、白介素 11 (interleukin 11, IL-11)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 等多种因子的表达^[19-20, 27, 30-31]，因此 EG-VEGF 还具有广泛间接作用。

2 生理功能

2.1 影响女性生理周期血管新生

女性生理周期中生殖系统的毛细血管会发生周期性生长和衰退。研究表明，EG-VEGF 可组织特异性地促进卵巢血管新生，但不能促进角膜等其他组织的血管新生^[1, 32]。进一步实验结果还显示，卵巢中 EG-VEGF 与 VEGF 均有表达，并具时空互补性，协同调控卵巢血管新生及正常发育^[12]。EG-VEGF 与 VEGF 在卵泡中也呈互补表达，EG-VEGF 表达水平在原始卵泡、初级卵泡及次级卵泡的颗粒细胞中逐次递减，而 VEGF 则逐次递增，共同调控卵泡周围血管新生并影响卵泡发育^[33]。排卵后，EG-VEGF 在卵泡膜黄体细胞中表达逐步增加，而 VEGF 的表达逐步降低，并仅分布于外周卵泡膜细胞中^[33]。对闭锁卵泡的研究发现，EG-VEGF 在残留卵泡膜细胞有较高表达，而 VEGF 表达甚微，因此，EG-VEGF/VEGF 表达互补性异常可能是导致卵泡闭锁发生的重要诱因^[33-34]。

黄体期也有 EG-VEGF 及 VEGF 表达，两者对黄体血管重塑具有不同的作用。VEGF 从黄体早期起即呈高度表达，对黄体早期血管发生起主要作用，EG-VEGF 的表达随黄体成熟而逐步升高，至

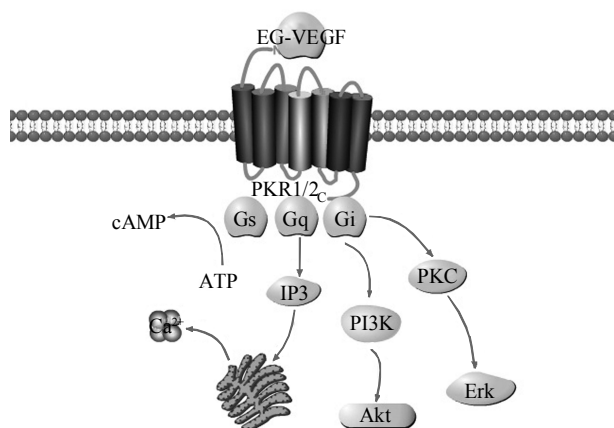


Fig. 2 Main signaling pathways of EG-VEGF on PKR1 and PKR2

图 2 EG-VEGF 的主要信号通路

黄体中晚期达到最高峰, 对黄体中晚期成熟血管床的形成及黄体功能的充分发挥起主要作用^[13].

EG-VEGF 还以剂量依赖方式促进黄体内皮细胞 (luteal endothelial cell, LEC) 增殖及抗凋亡, 促进黄体类固醇生成细胞 (luteal steroidogenic cell, LSC) 表达 VEGF^[30].

EG-VEGF 在子宫内膜中呈周期性、时相性表达, 其表达从增殖期开始增加, 至分泌期出现明显高峰, 月经期仍维持一定程度表达, 在腺上皮细胞、基质细胞、内皮细胞中均有分布^[11]. EG-VEGF 是一种雌/孕激素反应性血管新生因子, 因此表达水平随月经周期中雌/孕激素水平变化而变化. 整个月经周期中 PKR1 与 PKR2 的表达水平基本恒定, 表明 EG-VEGF 正是通过自身表达水平的变化来调节周期性的血管新生^[10]. 此外, 分泌期 EG-VEGF 的表达还可提高子宫内膜血管通透性, 有利于胚泡着床. 子宫肌层平滑肌细胞也表达 EG-VEGF, 影响子宫平滑肌收缩^[10].

2.2 影响妊娠期血管新生、炎症反应及分娩启动

EG-VEGF 在 80% 以上正常围植入期或促排卵剂量人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 刺激的子宫内膜样本中可见高水平表达, 表明与激素所致的植入前子宫内膜血管床重建相关^[10]. 因为 EG-VEGF 在“植入窗”期子宫内膜中呈峰性表达, 与正常人胚泡着床时期一致, Haouzi 等^[35]提出可以此作为衡量子宫内膜容受性的新指标分子.

hCG 通过促进早孕期 EG-VEGF 表达而参与母胎对话, 并调控 LIF 表达, 促进滋养层细胞黏连至纤连蛋白与层黏连蛋白基质, 因此, EG-VEGF 与早孕维持相关^[36]. EG-VEGF 可促进 COX-2、LIF、IL-6、IL-8、IL-11 等其他植入相关分子的表达, 有助于调节植入前胚胎以及胚胎的植入, 并维持妊娠^[27]. EG-VEGF 的促 IL-8 与 IL-11 表达作用与 CaN/NFAT 信号通路的激活有关, 并受到钙调神经磷酸酶调节因子 1~4 (regulators of calcineurin 1~4, RCAN1~4) 的负反馈调控^[19-20].

随着胚泡的着床, 子宫内膜发生蜕膜化. 研究表明, 蜕膜的腺上皮、间质、血管内皮及子宫自然杀伤细胞 (uterine natural killer, uNK) 均可分泌 EG-VEGF, 从而调节植入过程中滋养细胞的侵入及胎盘生成^[27]. EG-VEGF 可以促进早孕期蜕膜中结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 的表达, CTGF 进而影响滋养细胞浸润及母

体螺旋动脉重铸^[17]. EG-VEGF 与 VEGF 在早孕期胎盘中也呈互补表达, 从孕 6 周起, EG-VEGF 在绒毛合体滋养层细胞中开始表达, 孕 7 周起在细胞滋养层内层也有表达, 但在绒毛外滋养层细胞中没有表达, VEGF 则表达于细胞滋养层细胞与绒毛外滋养层细胞, 提示两者协调控制滋养层细胞有节制的生理性侵入及胎盘生成^[9]. PKR1 在滋养层细胞中表达水平远高于 PKR2, 被认为是介导 EG-VEGF 促胎盘生成作用的主要受体^[9]. EG-VEGF 在胎盘绒毛间充质的 Hofbauer 细胞中也有表达, 因此可能还参与母胎间物质转运及母胎免疫调节^[9].

EG-VEGF 可以促进 HUVEC 存活, 促进 HPEC 增殖、移行、存活, 血管芽及假血管结构生成, 并且可以提高 HPEC 的通透性与旁细胞运输能力, 调控胎盘生理性血管新生^[21]. 研究还表明, EG-VEGF 的促血管新生与促血管通透作用分别由 PKR1 与 PKR2 介导, 表明两者虽然具有高度同源性, 但在生理功能上还存在一定分工^[21].

EG-VEGF 在足月胎盘的合体滋养层、细胞滋养层、胎儿血管内皮及巨噬细胞中高度表达, 呈时间依赖方式促进 COX-2 与 IL-8 表达, 因此可能还介导胎盘炎症反应^[29]. 此外, COX-2 与前列腺素合成相关, IL-8 与宫颈扩张、子宫收缩相关, 因此还可能与分娩过程启动及持续相关^[29].

2.3 促造血干细胞 (haematopoietic stem cell, HSC) 分化及趋化作用

HSC 也是 EG-VEGF 的效应细胞. 体外实验中, EG-VEGF 以剂量依赖方式促进 HSC 分化为单核与巨噬系细胞, 体内实验结果还表明可以动员骨髓中 HSC 进入外周血, 分化为中性粒细胞及单核细胞, 从而对 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 引起的急性损伤起保护作用^[38-39].

EG-VEGF 具有趋化作用, 炎症部位中性粒细胞可以通过释放 EG-VEGF 来募集单核细胞^[38]. EG-VEGF 介导的炎症反应与集落刺激因子 (colony stimulating factor-1, CSF-1) 介导的不同, 可以刺激单核细胞表达白介素 12 (interleukin 12, IL-12) 与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α), 抑制白介素 10 (interleukin 10, IL-10) 的表达, 类似于 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 引起的效应, 在先天及获得性免疫反应中都起重要作用^[39].

2.4 促肠神经系统发育

促肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 是自主神经系统的第三个组成部分, 由胚胎期神经嵴

细胞(neural crest cells, NCCs)沿肠壁移行、分化而形成. 研究发现, 胎肠黏膜及间充质有 EG-VEGF 表达, 并可促进 NCC 增殖与分化^[40]. 胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)/ Ret 信号通路是 NCC 增殖与分化的主要途径, 实验结果表明, EG-VEGF 对 Ret 基因敲除的 NCC 也具有促增殖与分化作用, 因此推测 EG-VEGF/PKR1 与 GDNF/ Ret 信号通路共享部分下游靶点, 从而互补 GDNF/Ret 的促 NCC 增殖与分化作用^[28].

2.5 促胃肠道平滑肌收缩

EG-VEGF 可特异性地引起胃肠道平滑肌收缩, 但不引起其他组织来源的平滑肌收缩, PKR1 是介导这一作用的主要受体^[5, 14]. 河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是特异性很强的 Na⁺ 通道阻断剂, EG-VEGF

可诱发离体回肠发生双相收缩反应: 早期为 TTX 敏感型, 后期为 TTX 不敏感型^[41]. EG-VEGF 还可促进纵向肌 - 肌间神经丛的神经元型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS) 生成并释放 NO, 抑制结肠环状肌的巨大移行性收缩运动^[41].

EG-VEGF 可通过作用于小肠黏膜的 PKR1 和前列腺素受体来促进小肠液分泌及小肠运输功能, COX-2 抑制剂吡罗昔康(piroxicam)与前列腺素 EP4 受体拮抗剂 AH23848 可抑制这一作用^[41].

综上所述, EG-VEGF 具有多种重要的生理功能(表 1). PK2 虽然与 EG-VEGF 有很高的同源性, 但除了趋化作用及促胃肠道收缩功能外, PK2 主要表现传递生物钟昼夜节律信号及影响新生嗅觉神经元迁移的功能^[5, 38, 42-43].

Table 1 Main physiologic functions of EG-VEGF
表 1 EG-VEGF 的主要生理功能

作用组织 / 细胞	主要生理功能	参考文献
卵巢	血管新生、卵泡发育	[1, 12, 32-34]
子宫	血管新生、胚胎植入、早孕维持、胎盘生成	[9-11, 19-20, 27, 35-36]
黄体	血管新生、LEC 增殖及抗凋亡	[13, 30]
胎盘	胎盘生成、母胎物质转运、母胎免疫调节	[9, 27]
造血干细胞	HSC 动员、分化	[38-39]
肠神经系统	NCC 增殖、分化	[28, 40]
胃肠道	平滑肌收缩、小肠液分泌、小肠输送	[5, 14, 31, 41]

3 相关疾病

3.1 肿瘤

促血管新生因子表达异常往往与肿瘤血管异常新生密切相关. 例如, VEGF 水平高低与成血管细胞瘤、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的血管化程度及恶变程度强烈正相关^[44].

作为组织特异性促血管新生因子, EG-VEGF 异常高表达与莱迪希(Leydig)细胞瘤、结直肠癌、前列腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、甲状腺乳头状癌等特定组织的肿瘤异常血管新生相关^[45-51]. 这一组织特异性还表现在, 虽然 EG-VEGF 异常与 Leydig 细胞瘤相关, 但与同属睾丸癌的生殖细胞衍生肿瘤、精原细胞瘤不相关^[45]. EG-VEGF 表达水

平高低还与前列腺癌恶变程度正相关, 与 Gleason 评分结果一致, 表明还可用作评价肿瘤恶变程度的指标分子^[47]. 研究还发现, 垂体腺瘤中 EG-VEGF 呈现低水平表达, 这可能因肿瘤细胞黄体生成素释放能力降低所致^[52].

EG-VEGF 处理胰腺癌 Mia PaCa 细胞株及多发性骨髓瘤细胞, 可以促进髓细胞白血病 1 蛋白 (myeloid cell leukemia 1, Mcl-1) 的表达, 使细胞免于凋亡, 因此 EG-VEGF 具有促血管新生为肿瘤细胞提供养分及提高肿瘤细胞抗凋亡能力的双重作用^[53-54].

3.2 其他疾病

EG-VEGF 具有促血管新生作用及改变血管通透性的作用, 为多种疾病的病因学及治疗方案研究提供了有价值的线索. 例如, 多囊卵巢综合征

(polycystic ovary syndrome, PCOS)患者的卵巢间质和卵泡膜存在血管增生性改变, 已有研究表明上述病理特征与 EG-VEGF 的异常表达相关, 而与 VEGF 无关^[3]. 增龄性黄斑退行性病变(age-related macular degeneration, AMD)的发病与脉络膜血管新生(choroidal neovascularization, CNV)有关, 转基因小鼠实验结果表明, EG-VEGF 在视网膜中的过度表达可导致 CNV, 并最终引发 AMD^[55]. 先兆子痫(preeclampsia, PE)的发生与滋养层细胞侵入不足所致的子宫螺旋动脉重铸不良有关, 有研究表明 EG-VEGF/VEGF 表达失调是影响子宫螺旋动脉重铸的重要因素^[9, 29, 56-57]. 卵巢过度刺激综合征(OHSS)有血管外渗出液大量积聚、血管内液体严重减少的病理特点, 最近实验结果表明, EG-VEGF 对血管通透性的影响是其主要诱因, 同时血清和滤泡液中的 EG-VEGF 浓度可用于预测 OHSS 的临床病程及严重程度^[58-59]. EG-VEGF 的异常高表达是子宫异位内膜组织血管新生的主要诱因, 同时还有研究发现正位内膜中 EG-VEGF 表达水平显著降低, 仅为正常样本中的 1/10, 表明与子宫内异位症的发生发展相关^[60-61].

习惯性自然流产的发生与 EG-VEGF 的异常表达相关, 患者分泌中期子宫内膜中可见 EG-VEGF 呈延迟增强表达, 而催乳素呈异常衰减表达, 同时有关病例研究还发现 EG-VEGF 基因及受体基因呈现多态性^[62-63]. 输卵管部位也表达 EG-VEGF 与 PK2, 与输卵管平滑肌收缩力相关. EG-VEGF 与 PK2 正常表达可保证正常胚胎-输卵管运输, 表达不足可导致收缩力不足, 从而胚胎滞留而引发异位妊娠^[64].

4 总结与展望

EG-VEGF 的发现深化并完善了对血管新生调控机理的认识, 推动了对其他组织异性促血管新生因子的研究与探索. EG-VEGF 具有生理功能多样、调控机制复杂的特点, 同时其异常表达与多种肿瘤及血管新生依赖性疾病的发生发展相关, 因此受到越来越多的关注, 有必要开展更多更深入的研究以进一步阐明相关的生理与病理分子机制.

自 1989 年 Ferrara 等^[65]从牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中分离得到 VEGF 以来, 以促血管新生因子为作用靶点的相关疗法在肿瘤治疗中受到较多关注, 也比较热门. 2004 年, 针对 VEGF 的重组人源化单抗即贝伐单抗(Avastin, 阿瓦斯汀)已经

获批准用于临床治疗. 作为组织特异性促血管新生因子, EG-VEGF 的发现为“肿瘤饥饿疗法”提供了新型作用靶标, 现已有初步实验表明了这一想法的可行性^[46]. 鉴于 VEGF 在整个生物体系中具有广泛深入的调控作用及肿瘤血管新生机制的复杂性, 单一针对 VEGF 环节抑制病理性血管新生不仅收效有限, 而且可能影响正常生理性血管新生. 现已在多种组织中发现 EG-VEGF 与 VEGF 呈时相互补表达, 因此开发针对 EG-VEGF 的药物, 并与抗 VEGF 药物联用, 可以实现多途径多机制协同抑制病理性血管新生, 同时还可减少抗 VEGF 药物用量, 以降低对周边组织正常血管新生的影响, 从而收到意想不到的疗效, 能否将这一设想转化为有效并且安全的临床治疗手段, 也是当前分子医学领域值得深入探索的研究重点之一.

参 考 文 献

- [1] LeCouter J, Kowalski J, Foster J, *et al.* Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature*, 2001, **412**(6850): 877-884
- [2] LeCouter J, Ferrara N. EG-VEGF and Bv8. a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, **13**(7): 276-282
- [3] Ferrara N, LeCouter J, Lin R, *et al.* EG-VEGF and Bv8: A novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1654**(1): 69-78
- [4] LeCouter J, Lin R, Ferrara N. Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis. *Nat Med*, 2002, **8**(9): 913-917
- [5] Li M, Bullock C M, Knauer D J, *et al.* Identification of two prokineticin cDNAs: Recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle. *Mol Pharmacol*, 2001, **59**(4): 692-698
- [6] Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G, *et al.* The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep*, 2003, **4**(5): 469-473
- [7] Zhang L, Yang N, Conejo-Garcia J R, *et al.* Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003, **9**(1): 264-272
- [8] LeCouter J, Lin R, Frantz G, *et al.* Mouse endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: A distinct expression pattern from its human ortholog suggests different roles as a regulator of organ-specific angiogenesis. *Endocrinology*, 2003, **144**(6): 2606-2616
- [9] Hoffmann P, Feige J J, Alfaidy N. Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy. *Endocrinology*, 2006, **147**(4): 1675-1684
- [10] Ngan E S, Lee K Y, Yeung W S, *et al.* Endocrine gland-derived

- vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma. *Endocrinology*, 2006, **147**(1): 88–95
- [11] Battersby S, Critchley H O, Morgan K, *et al.* Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, **89**(5): 2463–2469
- [12] Kisiouk T, Levy N, Hurwitz A, *et al.* Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, **88**(8): 3700–3707
- [13] Fraser H M, Bell J, Wilson H, *et al.* Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, **90**(1): 427–434
- [14] Lin D C, Bullock C M, Ehlert F J, *et al.* Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 2002, **277**(22): 19276–19280
- [15] Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, *et al.* Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293**(1): 396–402
- [16] Soga T, Matsumoto S, Oda T, *et al.* Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1579**(2–3): 173–179
- [17] Chen J, Kuei C, Sutton S, *et al.* Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2 beta as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Mol Pharmacol*, 2005, **67**(6): 2070–2076
- [18] Lin R, LeCouter J, Kowalski J, *et al.* Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells. *J Biol Chem*, 2002, **277**(10): 8724–8729
- [19] Cook I H, Evans J, Maldonado-Perez D, *et al.* Prokineticin-1 (PROK1) modulates interleukin (IL)-11 expression *via* prokineticin receptor 1 (PROKR1) and the calcineurin/NFAT signalling pathway. *Mol Hum Reprod*, 2010, **16**(3): 158–169
- [20] Maldonado-Perez D, Brown P, Morgan K, *et al.* Prokineticin 1 modulates IL-8 expression *via* the calcineurin/NFAT signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1793**(7): 1315–1324
- [21] Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, *et al.* Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 2010, **21**(16): 2832–2843
- [22] Itoh H, Toyama R, Kozasa T, *et al.* Presence of three distinct molecular species of Gi protein alpha subunit. Structure of rat cDNAs and human genomic DNAs. *J Biol Chem*, 1988, **263**(14): 6656–6664
- [23] Fields T A, Casey P J. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J*, 1997, **321**(Pt 3): 561–571
- [24] Masri B, Morin N, Pedebernade L, *et al.* The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments. *J Biol Chem*, 2006, **281**(27): 18317–18326
- [25] 康从民, 王大伟, 吕英涛, 等. 血管内皮生长因子受体-2 所介导信号通路的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(10): 1267–1274
- Kang C M, Wang D W, Lü Y T, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(10): 1267–1274
- [26] 谭文福, 肖东, 王家珑, 等. 血管内皮生长因子受体信号转导通路与肿瘤血管生成. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**(5): 623–626
- Tan W F, Xiao D, Wang J L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28**(5): 623–626
- [27] Evans J, Catalano R D, Morgan K, *et al.* Prokineticin 1 signaling and gene regulation in early human pregnancy. *Endocrinology*, 2008, **149**(6): 2877–2887
- [28] Ngan E S, Shum C K, Poon H C, *et al.* Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008, **1783**(3): 467–478
- [29] Denison F C, Battersby S, King A E, *et al.* Prokineticin-1: A novel mediator of the inflammatory response in third-trimester human placenta. *Endocrinology*, 2008, **149**(7): 3470–3477
- [30] Kisiouk T, Podlovni H, Spanel-Borowski K, *et al.* Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) in the bovine ovary: Expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells. *Endocrinology*, 2005, **146**(9): 3950–3958
- [31] Hoogerwerf W A. Prokineticin 1 inhibits spontaneous giant contractions in the murine proximal colon through nitric oxide release. *Neurogastroenterol Motil*, 2006, **18**(6): 455–463
- [32] LeCouter J, Lin R, Tejada M, *et al.* The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(5): 2685–2690
- [33] Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, *et al.* Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol*, 2003, **162**(6): 1881–1893
- [34] Kisiouk T, Friedman A, Klipper E, *et al.* Expression pattern of prokineticin 1 and its receptors in bovine ovaries during the estrous cycle: involvement in corpus luteum regression and follicular atresia. *Biol Reprod*, 2007, **76**(5): 749–758
- [35] Haozui D, Mahmoud K, Fourar M, *et al.* Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod*, 2009, **24**(1): 198–205
- [36] Evans J, Catalano R D, Brown P, *et al.* Prokineticin 1 mediates fetal-maternal dialogue regulating endometrial leukemia inhibitory factor. *Faseb J*, 2009, **23**(7): 2165–2175
- [37] Waddell J M, Evans J, Jabbour H N, *et al.* CTGF expression is up-regulated by PROK1 in early pregnancy and influences

- HTR-8/Svneo cell adhesion and network formation. *Hum Reprod*, 2011, **26**(1): 67–75
- [38] LeCouter J, Zlot C, Tejada M, *et al.* Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(48): 16813–16818
- [39] Dorsch M, Qiu Y, Soler D, *et al.* PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation. *J Leukoc Biol*, 2005, **78**(2): 426–434
- [40] Ngan E S, Lee K Y, Sit F Y, *et al.* Prokineticin-1 modulates proliferation and differentiation of enteric neural crest cells. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1773**(4): 536–545
- [41] Wade P R, Palmer J M, Mabus J, *et al.* Prokineticin-1 evokes secretory and contractile activity in rat small intestine. *Neurogastroenterol Motil*, 2010, **22**(5): e152–161
- [42] Cheng M Y, Bullock C M, Li C, *et al.* Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 2002, **417**(6887): 405–410
- [43] Ng K L, Li J D, Cheng M Y, *et al.* Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science*, 2005, **308**(5730): 1923–1927
- [44] 修波, 周爱儒. 血管内皮生长因子与肿瘤. *生物化学与生物物理进展*, 1994, **21**(4): 312–317
- Xiu B, Zhou A R. *Prog Biochem Biophys*, 1994, **21**(4): 312–317
- [45] Samson M, Peale F V Jr, Frantz G, *et al.* Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, **89**(8): 4078–4088
- [46] Goi T, Fujioka M, Satoh Y, *et al.* Angiogenesis and tumor proliferation/metastasis of human colorectal cancer cell line SW620 transfected with endocrine glands-derived-vascular endothelial growth factor, as a new angiogenic factor. *Cancer Res*, 2004, **64**(6): 1906–1910
- [47] Pasquali D, Rossi V, Staibano S, *et al.* The endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF)/prokineticin 1 and 2 and receptor expression in human prostate: Up-regulation of EG-VEGF/prokineticin 1 with malignancy. *Endocrinology*, 2006, **147**(9): 4245–4251
- [48] Ngan E S, Sit F Y, Lee K, *et al.* Implications of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 signaling in human neuroblastoma progression. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(3): 868–875
- [49] Morales A, Vilchis F, Chavez B, *et al.* Expression and localization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) in human pancreas and pancreatic adenocarcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2007, **107**(1–2): 37–41
- [50] Jiang X, Abiatari I, Kong B, *et al.* Pancreatic islet and stellate cells are the main sources of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 in pancreatic cancer. *Pancreatol*, 2009, **9**(1–2): 165–172
- [51] Pasquali D, Santoro A, Bufo P, *et al.* Upregulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancers displaying infiltrative patterns, lymph node metastases, and BRAF mutation. *Thyroid*, 2011, **21**(4): 391–399
- [52] Raica M, Coculescu M, Cimpean A M, *et al.* Endocrine gland derived-VEGF is down-regulated in human pituitary adenoma. *Anticancer Res*, 2010, **30**(10): 3981–3986
- [53] Ren L N, Li Q F, Xiao F J, *et al.* Endocrine glands-derived vascular endothelial growth factor protects pancreatic cancer cells from apoptosis *via* upregulation of the myeloid cell leukemia-1 protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **386**(1): 35–39
- [54] Li Q F, Zhu H Y, Yang Y F, *et al.* Prokineticin-1/endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is a survival factor for human multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma*, 2010, **51**(10): 1902–1912
- [55] Tanaka N, Ikawa M, Mata N L, *et al.* Choroidal neovascularization in transgenic mice expressing prokineticin 1: An animal model for age-related macular degeneration. *Mol Ther*, 2006, **13**(3): 609–616
- [56] Chung J Y, Song Y, Wang Y, *et al.* Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, **89**(5): 2484–2490
- [57] Hoffmann P, Saoudi Y, Benharouga M, *et al.* Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications. *J Cell Mol Med*, 2009, **13**(8b): 2224–2235
- [58] Ajonuma L C, Ajuonuma M U, Ajuonuma B C, *et al.* EG-VEGF concentrations may predict OHSS. *Fertil Steril*, 2011, **95**(7): e37
- [59] Gao M Z, Zhao X M, Sun Z G, *et al.* Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor concentrations in follicular fluid and serum may predict ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril*, 2011, **95**(2): 673–678
- [60] Lee K F, Lee Y L, Chan R W, *et al.* Up-regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor but not vascular endothelial growth factor in human ectopic endometriotic tissue. *Fertil Steril*, 2010, **93**(4): 1052–1060
- [61] Tiberi F, Tropea A, Apa R, *et al.* Prokineticin 1 mRNA expression in the endometrium of healthy women and in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril*, 2010, **93**(7): 2145–2149
- [62] Su M T, Lin S H, Lee I W, *et al.* Polymorphisms of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor gene and its receptor genes are associated with recurrent pregnancy loss. *Human Rep*, 2010, **25**(11): 2923–2930
- [63] Salker M, Teklenburg G, Molokhia M, *et al.* Natural selection of human embryos: impaired decidualization of endometrium disables embryo-maternal interactions and causes recurrent pregnancy loss. *PLoS One*, 2010, **5**(4): e10287
- [64] Shaw J L, Denison F C, Evans J, *et al.* Evidence of prokineticin dysregulation in fallopian tube from women with ectopic pregnancy. *Fertil Steril*, 2010, **94**(5): 1601–1608
- [65] Ferrara N, Kerbel R S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 2005, **438**(7070): 967–974

A Novel Target for Starving Tumor Therapy: Endocrine-gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor*

WEN Chong-Wei^{1)**}, NING De-Gang²⁾, LIU Rui-Jiang¹⁾, ZHANG Ye-Wang¹⁾

¹⁾ School of Pharmacology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; ²⁾ School of Environment, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract Starving tumor therapy is a new approach to treat cancers by blocking the function of angiogenic factors and inhibiting angiogenesis of tumor tissues. Endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) was firstly identified as a novel tissue-selective angiogenic factor in 2001. During the past ten years, it has been demonstrated that EG-VEGF could play a wide range of other biological functions, including inducing differentiation of haematopoietic stem cells, stimulating contraction of gastrointestinal smooth muscle and regulating development of enteric nervous system (ENS). In addition, the abnormal expression of EG-VEGF is involved in the occurrence and development of several kinds of angiogenesis-dependent diseases, such as tumors and polycystic ovary syndrome. EG-VEGF has been considered as a potential target for the development of diagnostic and therapeutic agents. Herein, the recent progress on biological function, related diseases and potential application of EG-VEGF is reviewed.

Key words starving tumor therapy, endocrine-gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF), tissue-selective, angiogenesis, tumor

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00351

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30771176) and The Research Foundation for Talented Scholars of Jiangsu University(1281370001).

**Corresponding author.

Tel: 86-511-85038201, E-mail: wenchw@ujs.edu.cn

Received: July 28, 2011 Accepted: October 18, 2011