

血管内皮生长因子受体-2 所介导信号通路的研究进展*

康从民** 王大伟 吕英涛 张媛媛

(青岛科技大学化工学院, 青岛 266042)

摘要 血管新生是许多生理和病理进程发生的重要机理。在生物体内, 血管新生需经过多步精细调控历程, 现有研究表明, 血管内皮生长因子(VEGF)及其受体蛋白酪氨酸激酶, 尤其是血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)所介导的信号级联通路是其中关键性的调节途径。VEGF/VEGFR-2 所介导的信号级联通路可以调控血管内皮细胞的增殖、迁移、存活和通透性的改变, 促进血管的新生。VEGF 与 VEGFR-2 的胞外区特异性结合后, 引起受体的二聚化和自身的交互磷酸化, 使胞内特定的酪氨酸残基磷酸化。下游信号蛋白可以通过其 Src 同源结构域-2(SH2)与 VEGFR-2 结合, 随后激活下游的效应蛋白, 调控内皮细胞的生物学活性。此外, VEGF/VEGFR-2 信号通路还可以下调树突细胞(DC)的活性。对 VEGF/VEGFR-2 信号通路作用的深入了解, 将有助于新药的研发。

关键词 血管内皮生长因子(VEGF), 血管内皮生长因子受体(VEGFR), 血管新生, 肿瘤, 树突细胞

学科分类号 Q71, R33

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00095

血管新生, 即从已经存在的血管中构建出来新的血管, 是许多生理和病理进程发生的重要机理。正常情况下血管新生仅发生在胚胎发育期, 创伤愈合期和女性的生理周期。病理条件下会出现异常的血管新生^[1], 尤其在肿瘤的生长过程中需要新生血管来供应营养物质和排泄代谢物。现有研究表明, 血管内皮生长因子 / 血管内皮生长因子受体(VEGF/VEGFR)信号通路对于新生血管具有关键性的调节作用, 对其作用机制的研究将有助于人们对相关疾病的研究和新药的研发。VEGFR-2 作为 VEGF 的主要受体, 调节血管内皮细胞的增殖、存活、迁移和通透性的改变。此外, VEGF/VEGFR-2 信号通路还可以下调树突细胞的活性。本文将介绍 VEGFR-2 信号通路的作用机制及影响 VEGFR-2 生理功能的因素。

1 血管内皮生长因子的结构和功能

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF), 也称血管渗透因子(vascular permeability factor, VPF), 是机体分泌的由二硫键共价相连的同源二聚体所构成的糖蛋白。在哺乳动物中, VEGF 家族包括 VEGF-A(常称为 VEGF)、

VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 和胎盘生长因子(placenta growth factor, PlGF), 此外, 其他的 VEGF 还有被命名为 VEGF-E 的病毒 *Orf* VEGF^[2]和名为 VEGF-F 的蛇毒 VEGFs^[3]等。研究表明, 其中的 VEGF-A 具有重要的生物调节活性, 基因型为 VEGF-A^{-/-}的小鼠会表现为严重的血管生长缺陷, 在胚胎期 E(embryonic day)9.5~10.5 死亡^[4]。缺失一条 VEGF-A 等位基因的小鼠, 也会导致血管的异常, 在 E11~12 死亡^[5]。

人类的 VEGF-A 基因位于染色体的 6p21.3^[6], 其编码区约有 14 kb, 包含有 8 个外显子。在哺乳动物中, 由于前信使 RNA 的选择性剪接, VEGF-A 有多种亚型。在人类中已经有 6 种被确定, 分别为: VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₄₅、VEGF-A₁₆₅、

* 国家自然科学基金(20772070), 山东省自然科学基金(Y2007C175, Y2007C176), 山东省高等学校科技计划项目(J07YC08, J09LC20)和青岛市科技计划基础研究项目(09-1-3-74-JCH)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0532-84023290, E-mail: cmkang@qust.edu.cn

收稿日期: 2009-02-21, 接受日期: 2009-03-29

VEGF-A₁₈₃、VEGF-A₁₈₉ 和 VEGF-A₂₀₆^[7, 8], 其中 VEGF-A₁₆₅ 为主要的表达亚型. VEGF-A 可由血管平滑肌细胞、巨噬细胞和肿瘤细胞等所分泌, VEGF-A 基因的表达受到氧张力的调控^[9], 5' 和 3' 端的非翻译区含有缺氧效应元件, 缺氧可以导致 VEGF-mRNA 快速和持续地增加.

正常生理性血管生长过程中, 如胚胎形成、骨骼生长, VEGF 信号具有重要的促进作用, 病理情况下可出现 VEGF 的异常表达. 在缺血性疾病中, 缺氧可刺激 VEGF 表达上调, 通过对内皮细胞强烈的促有丝分裂作用, 促进新生血管形成, 改善组织供血. 在肿瘤组织中, 肿瘤细胞、肿瘤浸润的巨噬细胞和肥大细胞能分泌高水平的 VEGF, 以旁分泌的形式刺激肿瘤血管内皮细胞, 促进其增殖和迁移, 诱导血管形成, 有利于肿瘤转移. 但 Kawamura 等^[10]发现 VEGF-A₁₆₅ 剪接变体 VEGF-A_{165b} 则几乎没有刺激血管新生的能力.

2 血管内皮生长因子受体的结构和功能

血管内皮生长因子受体 (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) 家族包含有 3 种亚型, 即: VEGFR-1 (同时也可以写作 Flt-1)、VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 和 VEGFR-3 (Flt-4), 此外, 还有神经菌毛蛋白 (neuropilin) 1 和 2 两个协同受体. 其中 VEGFR-1 主要分布在血管内皮细胞、造血干细胞、巨噬细胞和单核细胞, 可与 VEGF-A、VEGF-B 和 PlGF 结合, 主要与造血干细胞的生长调节有关. VEGFR-2 主要分布在血管内皮细胞和淋巴内皮细胞中, 可以与 VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E 结合. VEGF 刺激内皮细胞增殖、增加血管通透性和新血管生成的作用主要通过结合和激活 VEGFR-2 来实现. 与 VEGFR-2 相比, VEGFR-1 与 VEGF 的亲合力高 10 倍, 但调节内皮细胞的活性低很多, 可能是对 VEGFR-2 活性具有负向调节作用. VEGFR-3 主要表达在淋巴管内皮细胞, 能与 VEGF-C 和 VEGF-D 结合, 调控淋巴内皮细胞的生长^[11].

2.1 VEGFR-2 的结构及其生物学功能

VEGFR-2 (kinase-insert domain receptor, KDR/foetal liver kinase-1, Flk-1) 是一种 III 型的跨膜蛋白激酶, Terman 等^[12]于 1991 年将其首次分离. 人类的 VEGFR-2 基因位于染色体 4q11-q12, 编码全长受体的 1356 个氨基酸. VEGFR-2 在细胞内部时被翻译为约有 150 ku 且没有明显糖基化的蛋白

质, 然后经过一系列的糖基化处理, 成熟时约有 230 ku, 表达在胞膜上^[13]. VEGF-A 结合到 VEGFR-2 胞外的第 2 个与第 3 个 Ig 样区域^[13], 然后引起受体的二聚化和自身交互磷酸化, 激活下游的信号通路. VEGFR-2 在血管的形成中具有重要的作用, 基因型为 VEGFR-2^{-/-}的小鼠会由于血岛、血管内皮细胞和造血细胞的生长障碍在胚胎期的 E8.5~9.5 死亡^[14].

2.2 VEGFR-2 激酶区的结构及其生物学功能

作为受体酪氨酸激酶, VEGFR-2 催化反应: $\text{MgATP} + \text{Protein-OH} \rightarrow \text{Protein-OPO}_3^{2-} + \text{MgADP} + \text{H}^+$. VEGFR-2 蛋白激酶的核心部位拥有两裂片样的空间结构, 活性中心位于两个裂片之间, 由两个裂片的残基共同组成^[15]. 与蛋白激酶有关的空间结构变化有两类: 第一类包括活性状态和非活性状态之间互变, 包括 N 端叶片 α 螺旋和 C 端活性片段的空间结构的改变. 第二类的结构改变发生在激酶的活性状态, 随着激酶的催化性循环, 两个裂片之间相对运动, 使它们中的裂缝打开或闭合. ATP 和蛋白质底物结合到开放的构象, 随后空间闭合发生催化作用, ADP 和磷酸化的底物再随着裂隙开放释放出来, 完成一次催化. 在较为小的 N 端, 含有疏水性的口袋, 作为 ATP 腺嘌呤的结合部位. 在其 β 折叠结构中含有一个富含甘氨酸 (GXGXXG) 的 ATP 磷酸结合环. 较大的 C 端的叶片, 含有大量 α 螺旋结构, 包括有催化环 (重要性残基 HRDLAARN, 1026-1033) 和活性片段 (重要性残基为 Y, 1054 和 1059). 受体中的 K/D/D (Lys-Asp-Asp) 基序对于 VEGFR-2 的催化性质有重要作用. 在活化的酶中, Lys868 和 ATP 的 α 和 β 磷酸基及 α 螺旋上的 Glu885 形成离子对. ATP 缺失时, Lys868 则与活化片段上磷酸化的酪氨酸结合, 远离 Glu885. 位于保守的 HRD (His-Arg-Asp) 序列中的 Asp1028, 可促使底物蛋白上的酪氨酰基定向转化为催化感受态. Asp1046 位于活性环上保守的 DFG (Asp-Phe-Gly) 序列中的第一个残基, 它可以与镁离子结合, 后者可与 ATP 的 β 和 γ 磷酸基结合, Asp1046 同时也可以与 α 磷酸基结合.

3 VEGFR-2 所介导的信号通路

现有研究表明, 许多由 VEGF 所引起的内皮细胞生理或病理的改变主要是由 VEGFR-2 所介导. 这些调节包括增殖、迁移、存活和通透性的改变等, 如图 1 所示^[11].

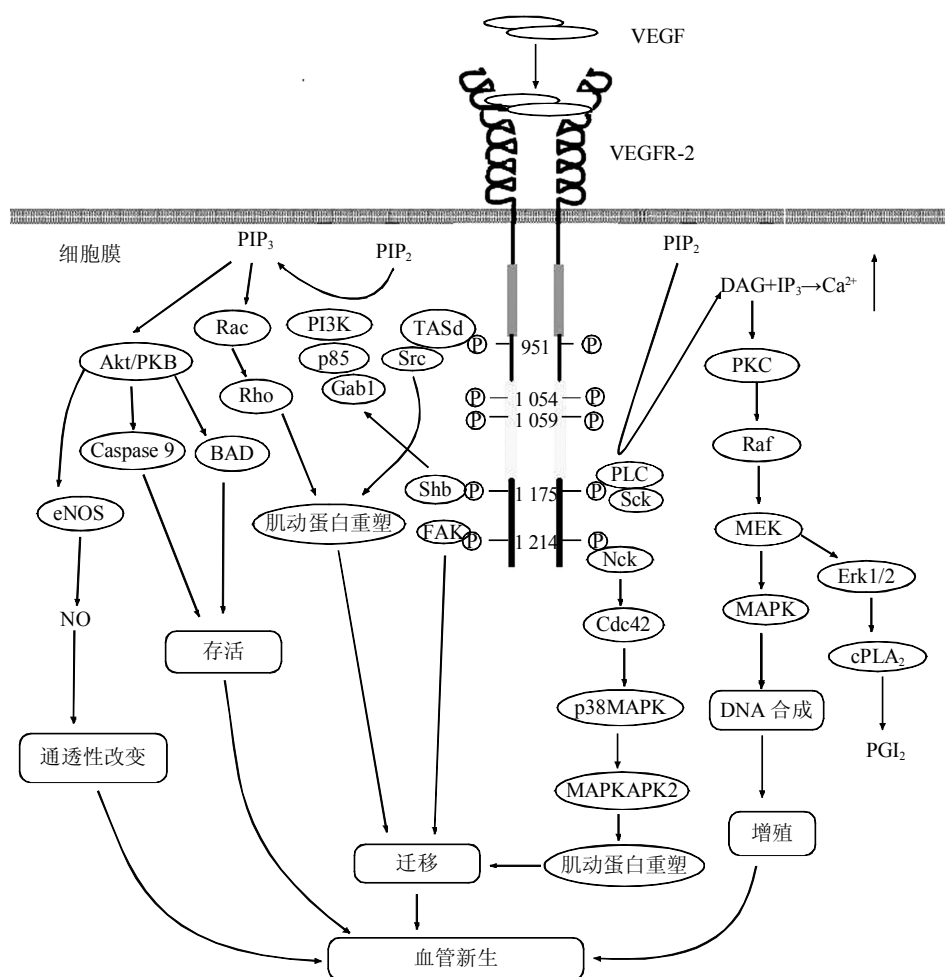


Fig. 1 Signal transduction and biological processes mediated by VEGFR-2^[11]

图 1 VEGFR-2 介导的信号通路及其生物学进程^[11]

VEGFR-2 与 VEGF 结合后, 发生二聚化和胞内特定酪氨酸残基的自磷酸化。随后激活胞内的信号级联通路, 调控细胞的增殖、迁移、存活和通透性的改变。

3.1 调控内皮细胞的增殖

VEGF-A 是很多内皮细胞的促细胞分裂原, 可以通过细胞膜上的 VEGFR-2 将细胞外的信号传递到胞内, 激活一系列的下流信号通路, 调控内皮细胞的增殖。VEGFR-2 主要是通过 PLC- γ -PKC-Raf-MEK-MAPK 信号通路, 将信号传递至核内激活 DNA 的合成, 促进内皮细胞的增殖^[16]。VEGFR-2 可以活化磷脂酶 C- γ (phospholipases C- γ , PLC- γ)^[17], 随后激活 PKC 信号通路。VEGFR-2 的 C 端 Tyr1175 磷酸化后可与 PLC- γ 结合, 使其磷酸化, 增强催化活性。PLC- γ 水解 4, 5- 二磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol (4, 5)-bisphosphate, PIP₂)生成二酰甘油(adiacylglycerol, DAG)和 1, 4, 5- 三磷酸肌醇(inositol 1, 4, 5-trisphosphate, IP₃)。IP₃ 生成的结果是增加细胞内的钙离子浓度, 而 DAG 是

PKC 的生理激活剂。

PLC- γ 在小鼠的血管新生中具有重要作用, PLC- γ 1 缺损的胚胎由于血管生成和红细胞生成障碍, 大约会在 E9.0 死亡^[18]。在小鼠中, 若 Flk-1 的 Tyr1173(KDR1175)突变, 则胚胎会由于内皮细胞和造血细胞生成障碍在 E8.5~9.5 死亡, 与 Flk-1 缺失的情况相似^[19]。上述表明, 受体 Flk-1 的 Tyr1173 在调控血管新生中有重要作用。PLC- γ 、Shb 和 Sck 都可结合到 Tyr1173 位点, 但是 Shb 和 Sck 在此通路中的作用有待进一步研究。在体内, 可能同时还存在有负向的调节机制。研究表明 c-Cbl(Casitas B-lineage lymphoma)E3 连接酶可以调控 VEGFR-2 介导的血管新生。c-Cbl 可以诱导 PLC γ 1 的泛素化, 加速其被蛋白酶水解, 抑制 VEGFR-2 介导的新生血管的形成^[20]。c-Cbl 可以通

过直接和 VEGFR-2 磷酸化的 1 052 和 1 057 酪氨酸残基结合, 也可通过 VEGFR-2 上 Tyr1173 结合的 PLC γ 1 间接地与 VEGFR-2 结合. 在后者中 PLC γ 1 相当于桥的作用, 使 c-Cbl 和 VEGFR-2 相结合, 且这种形成的三元复合物可能对于负向调节是必需的. VEGFR-2、PLC γ 1 和 c-Cbl 形成的三元复合物能够选择性地启动泛素化和抑制 PLC γ 1 酪氨酸残基磷酸化.

很多 PKC 蛋白激酶的亚型被确定参与 VEGF 调控的细胞增殖, 如: PKC- β , PKC- α 和 PKC- ϵ ^[11, 21] 等. 有研究发现, VEGF-A 也可以通过蛋白激酶 C 和鞘氨醇激酶激活的 Ras 信号通路, 表明 VEGFR-2 可以通过激活 Ras 进行信号传导^[22].

3.2 调控内皮细胞的迁移

内皮细胞的迁移对于血管的新生具有重要意义, 且有助于肿瘤的转移和扩散. 内皮细胞可以通过蛋白酶水解的基底膜, 顺着 VEGF 和其他生长因子的浓度梯度迁移. 多种 VEGFR-2 介导的信号通路与此有关:

a. 衔接蛋白 Shb 可与 VEGFR-2 的 Tyr1175 结合, 并调控 VEGF 引起的细胞迁移^[23]. 以猪动脉内皮细胞表达的人类 VEGFR-2 为载体, 利用免疫共沉淀法和 GST 沉降试验研究表明, Shb 蛋白的 SH2 区域(Src homology domain-2, SH2)与 VEGFR-2 上 C 端磷酸化的 Tyr1175 残基结合. 使用 siRNA 抑制 Shb 的表达, 可以阻止 VEGF 介导的细胞支架重组、迁移和磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)的激活. Shb 连接蛋白还可以与其他的蛋白质结合, 如粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK), 使其 Tyr576 磷酸化, 此酶对于细胞的粘附和细胞的迁移起重要作用.

b. 在肿瘤组织的血管内皮细胞中, VEGFR-2 上 Tyr951 的磷酸化可以与 T 细胞特异性衔接分子(T-cell-specific adapter, TSAd)相结合^[24]. 激活的 TSAd 和 Src 形成复合物, 调节细胞的迁移. 对 VEGFR-2 上 Tyr951 定点突变为苯丙氨酸或者使用 siRNA 干扰 TSAd 的表达, 可以抑制 VEGF 介导的细胞骨架的重组和迁移, 但不能抑制其有丝分裂.

c. VEGFR-2 上 Tyr1214 的磷酸化参与 VEGF 引起肌动蛋白的重塑^[25, 26]. Tyr1214 的磷酸化可以与衔接蛋白 Nck 的 SH2 区域结合, Nck 与 Src 激酶家族的 Fyn 结合, 可使 p21 激活性激酶-2(p21-activated protein kinase-2, PAK-2)磷酸化, 随

后激活 Cdc42. 作为 Cdc42 的下游信号, 应激活蛋白激酶 2(stress-activated protein kinase2, SAPK2)/p38-MAPK, 随后被激活. Cdc42-SAPK2/p38-MAPK 活化蛋白激酶-2(MAPK-activating protein kinases 2, MAPKAP K2)信号通路介导 VEGF 引起的内皮细胞张力纤维中激动蛋白的重塑.

d. 尽管 VEGFR-2 不像其他的酪氨酸激酶那样含有 Y-X-X-M 序列(此序列区域是 PI3K 的 p85 调节亚基 SH2 区的识别结合区域), 但是也可以激活 PI3K 调节细胞的迁移. PI3K 可以催化 PIP2 生成 3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate, PIP3), 后者可活化小分子质量的 GTP 结合蛋白 Rac, 可以促使胞膜褶皱和细胞运动. 衔接蛋白 Gab1 可以介导 VEGFR-2 活化 PI3K 和细胞迁移^[27]. Gab1 含有可以结合 PI3K 的 p85 调节亚基的位点, 同时也含有可以结合到 VEGFR-2 的位点. PI3K 的催化亚基 p110 含有 p110 α 、p110 β 和 p110 δ 亚型, 其中的 P110 α 亚型对于血管的生成是必需的^[28]. 由于新生血管形成和血管重塑障碍, P110 α 的失活导致胚胎在妊娠中期死亡. 在血管内皮细胞中, p110 α 对 GTPase RhoA 具有上调作用, 并通过调节其活性调节内皮细胞的迁移. 在内皮细胞中, P110 β 是位于 G 蛋白偶联受体下游的配体, 而 p110 δ 的表达量很低, 仅有微弱的 PI3K 活性.

3.3 调控内皮细胞的存活

VEGF-A 调控人脐静脉内皮细胞的存活, 依赖于 VEGFR-2 及其随后激活的 PI3K. 活化 PI3K 可以在细胞膜附近催化 PIP2 生成 PIP3, 随后磷酸化蛋白激酶(protein kinase B, PKB/Akt)^[29], 使其激活. Akt 直接磷酸化两种细胞凋亡蛋白: Bcl-2 相关凋亡启动子(Bcl-2 associated death promoter, BAD)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(caspase 9), 抑制它们的细胞凋亡活性以保障细胞存活. 血管新生时, 新生成血管的存活需要整合蛋白 $\alpha_v\beta_3$. VEGFR-2 和 $\alpha_v\beta_3$ 整合蛋白结合可以增加 VEGFR-2 的活性和 Akt 的活性^[30].

3.4 调控内皮细胞的通透性

VEGF-A 最初发现时被认为是一种血管通透性因子. VEGF 信号可以活化内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)生成 NO, 引起血管通透性的变化. eNOS 的活化可以通过 PLC- γ 引起的钙内流或 Akt/PKB 介导的 eNOS 上 Ser1179 磷酸化所引起^[31]. VEGF 可以通过活化

VEGFR-2 刺激血管内皮细胞释放 NO. 利用基因突变技术研究表明, VEGFR-2 的 Tyr801 残基磷酸化对于 VEGF 刺激引起 NO 的释放是必需的, 主要是通过 PI3K/Akt 通路激活 eNOS^[31]. VEGFR-2 介导的信号还可以增加 eNOS 和其分子伴侣热休克蛋白 90(heat-shock protein 90 ku, Hsp90)的结合. VEGFR-2 激活后, 可促使 c-Src 催化 Hsp90 Y300 的磷酸化, 增强 Hsp90 与 eNOS 的结合, 促使内皮细胞释放 NO^[32]. Becker 等^[33]发现, neuropilin-1 参与 VEGFR-2 调控细胞的通透性, VEGF-A 介导通透性的改变可能需要 VEGFR-2 和协同受体 neuropilin-1 共同参与. 血管通透性的提高将有利于大分子渗出, 而这样同样也有利于内皮细胞的迁移.

除了能够增加血管的通透性, VEGF-A 也可以引起血管的舒张, 增加组织的供血量, 这种降低血压的作用也可以由 VEGFR-2 介导. VEGFR-2 可以介导生成 NO 和前列腺素(prostacyclin, PGI₂), 使血管平滑肌细胞松弛^[11, 34]. VEGFR-2 激活可以增加胞内钙的浓度和 Erk1/2 介导的胞浆磷脂酶 A2 (cytosolic phospholipase A2, cPLA2)的磷酸化^[34]. cPLA2 磷酸化激活后可水解膜磷脂, 释放花生四烯酸, 后者可以被环加氧酶和前列环素合酶催化生成 PGI₂.

3.5 VEGF/VEGFR-2 信号通路对树突细胞活性的调节

树突细胞(dendritic cells, DCs)是主要的抗原递呈细胞, 在抗肿瘤的主动免疫中占有重要的作用. VEGF 可以引起 DC 的功能障碍, 抑制不成熟的树突细胞转化为成熟的树突细胞, 损坏树突细胞的分化^[35]. VEGF 并不能改变成熟的 DC 表型、白细胞介素的产生和诱导其凋亡. 然而, VEGF 能够抑制成熟的 DC 去刺激同种反应性 T 细胞. VEGF 所引起的 DC 抗原递呈功能障碍主要是通过 VEGFR-2 所介导的. 这一点已被实验所证实, VEGF 引起的 DC 功能障碍可以利用 VEGF 或者 VEGFR-2 的单克隆抗体得以恢复, 但 PlGF 或者 VEGFR-1 的特异性配体对此却没有作用. VEGFR-2 可能是通过其下游的 Erk1/2 信号通路来下调 DCs 的功能^[36].

4 影响 VEGFR-2 生物学功能的因素

4.1 蛋白酪氨酸磷酸酶的影响

VEGF 和 VEGFR-2 结合后, VEGFR-2 发生二聚化和自磷酸化, 使胞内特定的酪氨酸残基磷酸化, 随后激活下游的信号通路, 表现出不同的生物

学活性. 在生物体内, 酪氨酸的磷酸化由蛋白酪氨酸激酶和蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatases, PTPs)之间的平衡调控. Nakamura 等^[37]发现, 在小鼠后肢缺血模型的血管新生中, PTP1B 的表达和活性显著增强. 在内皮细胞中, PTP1B 的过量表达, 抑制了 VEGF 引导 VEGFR-2 和 Erk1/2 的磷酸化, 从而抑制内皮细胞的迁移, 而利用 PTP1B-siRNA 可以增强此效应, 这表明 PTP1B 可以下调 VEGFR-2 所介导信号通路的生物学功能. 但 VEGF 诱导 p38MAPK 的磷酸化和内皮细胞的迁移则不受 PTP1B 过量表达的影响. 在体内实验中, 去磷酸化和 myc-VEGFR2 胞浆域与多种 GST-PTP1B 标记突变株共转染测定表明, PTP1B 结合到 VEGFR-2 的胞内域, 使激活的人类脐静脉 VEGFR-2 脱磷酸化. PTP1B 的过量表达也可以通过减少血管内皮细胞钙粘蛋白(vascular endothelial cadherin, VEC)酪氨酸残基的磷酸化, 稳定 VEC 介导的血管内皮细胞间的粘结. 若利用 PTP1B- siRNA 可以导致相反的结果, 即增加血管的通透性. T 细胞蛋白酪氨酸磷酸酶(T-cell protein tyrosine phosphatase, TCPTP)^[38], 也可以抑制 VEGFR-2 信号通路从而抑制内皮细胞的生长和迁移.

4.2 Myoferlin 膜蛋白的影响

Myoferlin 和 dysferlin 属于 ferlin 膜蛋白家族成员. 近来研究表明, 由于基因突变或遗传造成的 myoferlin 或 dysferlin 膜蛋白的损伤, 导致质膜完整性的损坏. 利用蛋白质组学分析表明, myoferlin 在内皮细胞和血管组织中大量表达, myoferlin 的缺失, 会导致对血管内皮生长因子应答的降低, 内皮细胞的增殖、迁移和 NO 的释放等生理活动会受到影响^[39]. Western blot 和生物素表面标记实验表明, 缺失 myoferlin 可导致内皮细胞 VEGFR-2 的表达水平和磷酸化能力的下降. 在重组的细胞体系内, 转染 myoferlin 可增加 VEGFR-2 在细胞膜的表达, 同时可增加 VEGF 引起的 VEGFR-2 胞内的磷酸化能力. 在 myoferlin 基因敲除的小鼠中(myof^{-/-}), VEGFR-2 的蛋白质表达水平和 VEGF 介导的血管通透性都会降低. 分子机制研究表明, myoferlin 的 Sh3 区域可以与动力蛋白-2、VEGFR-2 形成复合物, 抑制了 Cbl 介导的蛋白质泛素化和蛋白质酶解.

4.3 受体内吞的影响

受体内吞是使细胞膜上受体减少的有效办法, 细胞也因此降低了对信号分子的敏感性. 在细胞信

号的传导中,受体的胞吞作用可以调控信号的强度和持续时间.但是,受体经过胞吞内陷入胞膜内后,并不一定被马上水解掉,有的可以继续保留其传导信号的活性.Lampugnani 等^[40, 41]发现,当 VEC 缺失时,VEGFR-2 大范围地被胞吞到细胞内的小室内,然而它们依然保留信号传导的活性,仍具有激活 PLC- γ 和 p44/42MAPK,调节细胞增殖的作用.VEC 可以和 VEGFR-2 结合,阻止其被胞吞,使其保留在细胞膜的表面,从而可能增加磷脂酶 DEP-1/CD148 对 VEGFR-2 的脱磷酸化以降低其活性.

此外, Sarkar 等^[42]发现,神经递质多巴胺可以抑制 VEGF 引起的微血管通透性、内皮细胞增殖和迁移.与正常组比较,多巴胺不足或多巴胺 D2 受体缺失的小鼠内皮细胞中,VEGF 引起的 VEGFR-2、粘着斑激酶和 MAPK 活性显著增加.表明在内皮细胞中,内源性多巴胺也能够调节 VEGF 所介导的信号通路.

5 以 VEGF/VEGFR 信号通路为靶点的抗肿瘤治疗

当肿瘤直径大于 2mm 时,需要有新生血管来提供营养物质和排泄代谢废物.VEGF/VEGFR 信号通路在肿瘤血管的生成中起关键性作用,可以通过阻断或干扰 VEGF/VEGFR 信号通路抑制血管的新生,以达到控制肿瘤的生长的疗效^[43].与传统的细胞毒性药物相比,以 VEGF/VEGFR-2 为靶标的抗肿瘤药物有很大的优势.在正常生理条件下,血管新生只在创伤愈合和月经周期等生理活动中起作用,所以使用抗血管生成药物治疗肿瘤,对人体毒性作用小,血管内皮细胞与血液直接接触,使药物更加容易到达作用位点.

通过目前对 VEGF/VEGFR 信号通路作用机制的了解,可以得到以下几种可能的抑制剂研究方向: a. 利用单克隆抗体抑制 VEGF 或 VEGFR,使其不能特异性结合,阻断信号传导.当然也可以利用基因技术抑制它们的表达,减弱其活性. b. 设计特定的小分子抑制剂,结合到 VEGFR 胞外 VEGF 结合区域,竞争性拮抗 VEGF,同理,也可以是结合到 VEGF 上 VEGFR 的特定结合域,竞争性拮抗 VEGFR. c. 抑制 VEGFR 的胞内激酶域,主要是 ATP 的结合位点,竞争性地拮抗 ATP,使其无法提供 γ 磷酸基. d. 抑制胞内的 VEGFR 下游信号的关键性蛋白.考虑到患者的依从性,能口

服的小分子抑制剂可能具有良好的前景.

一些以 VEGF/VEGFR 信号通路为作用靶点的药物,已经被应用于临床治疗肿瘤.贝伐单抗(商品名为 Avastin)是 VEGF-A 的人源化的鼠单克隆抗体,是被美国食品药品监督管理局(FDA)所审批的第一个此类药物.它可选择性地与 VEGF-A 结合,该药在 2004 年被美国 FDA 批准与 5- 氟尿嘧啶类化学药物联合治疗转移性结肠癌^[44].此外,一些以 VEGFR 胞内酪氨酸激酶域为靶点的小分子抑制剂,如索拉非尼^[45]和舒尼替尼^[46]等,都被美国 FDA 批准用于临床治疗癌症.

6 结 语

抗血管生成已经成为治疗肿瘤的一个有效途径,使得抗血管生成药物成为研究的热点.人们期望通过设计更好的抗血管生成药物,与传统的治疗药物联合最终能多方位地治疗肿瘤.除肿瘤外其他的一些疾病中,如视网膜病变、风湿性关节炎、子宫内膜异位症等,血管新生也是重要的病理机制.因此,针对 VEGF/VEGFR 信号通路的治疗药物也可能同样对这些疾病产生疗效.由于 VEGF/VEGFR 信号通路对血管新生具有重要的作用,故对其作用机制的深入研究,将有助于对高选择性的具有良好药物动力学性质药物的研发.

参 考 文 献

- 1 Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep*, 2008, **41** (4): 278~286
- 2 Kiba A, Sagara H, Hara T, *et al.* VEGFR-2-specific ligand VEGF-E induces non-edematous hyper vascularization in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **301**(2): 371~377
- 3 Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, *et al.* Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem*, 2003, **278**(52): 51985~51988
- 4 Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996, **380**(6573): 435~439
- 5 Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M, *et al.* Insights in vessel development and vascular disorders using targeted inactivation and transfer of vascular endothelial growth factor, the tissue factor receptor, and the plasminogen system. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, **811**: 191~206
- 6 Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, *et al.* Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 1996, **93**(8): 1493~1495
- 7 Zygalki E, Kaklamanis L, Nikolaou N I, *et al.* Expression profile of

- total VEGF, VEGF splice variants and VEGF receptors in the myocardium and arterial vasculature of diabetic and non-diabetic patients with coronary artery disease. *Clin Biochem*, 2008, **41**(1~2): 82~87
- 8 肖 扬, 焦炳华, 缪辉南. 血管内皮细胞生长因子研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2000, **27**(2): 131~135
Xiao Y, Jiao B H, Miao H N. *Prog Biochem Biophys*, 2000, **27**(2): 131~135
 - 9 Liu L, Simon M C. Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol Ther*, 2004, **3**(6): 492~497
 - 10 Kawamura H, Li X, Harper S J, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak *in vitro* agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res*, 2008, **68**(12): 4683~4692
 - 11 Holmes K, Roberts O L, Thomas A M, *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*, 2007, **19**(10): 2003~2012
 - 12 Terman B I, Carrion M E, Kovacs E, *et al.* Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 1991, **6**(9): 1677~1683
 - 13 Ruch C, Skiniotis G, Steinmetz M O, *et al.* Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol*, 2007, **14**(3): 249~250
 - 14 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi T P, *et al.* Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995, **376**(6535): 62~66
 - 15 Kornev A P, Haste N M, Taylor S S, *et al.* Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(47): 17783~17788
 - 16 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
 - 17 Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, *et al.* A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*, 2001, **20**(11): 2768~2778
 - 18 Liao H J, Kume T, McKay C, *et al.* Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plg1-deficient mice. *J Biol Chem*, 2002, **277**(11): 9335~9341
 - 19 Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, *et al.* Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(4): 1076~1081
 - 20 Singh A J, Meyer R D, Navruzbekov G, *et al.* A critical role for the E3-ligase activity of c-Cbl in VEGFR-2-mediated PLC γ 1 activation and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(13): 5413~5418
 - 21 Rask-Madsen C, King G L. Differential regulation of VEGF signaling by PKC-alpha and PKC-epsilon in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, **28**(5): 919~924
 - 22 Shu X, Wu W, Mosteller R D, *et al.* Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol*, 2002, **22**(22): 7758~7768
 - 23 Holmqvist K, Cross M J, Rolny C, *et al.* The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem*, 2004, **279**(21): 22267~22275
 - 24 Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, *et al.* VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *EMBO*, 2005, **24**(13): 2342~2353
 - 25 Lamallice L, Houle F, Jourdan G, *et al.* Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*, 2004, **23**(2): 434~445
 - 26 Lamallice L, Houle F, Huot J. Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *J Biol Chem*, 2006, **281**(45): 34009~34020
 - 27 Laramée M, Chabot C, Cloutier M, *et al.* The scaffolding adapter Gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. *J Biol Chem*, 2007, **282**(11): 7758~7769
 - 28 Graupera M, Guillermet-Guibert J, Foukas L C, *et al.* Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature*, 2008, **453**(7195): 662~666
 - 29 Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*, 2004, **15**(2): 177~182
 - 30 Soldi R, Mitola S, Strasly M, *et al.* Role of $\alpha_3\beta_3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J*, 1999, **18**(4): 882~892
 - 31 Blanes M G, Oubaha M, Rautureau Y, *et al.* Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem*, 2007, **282**(14): 10660~10669
 - 32 Duval M, Le Boeuf F, Huot J, *et al.* Src-mediated phosphorylation of Hsp90 in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is required for VEGF receptor-2 signaling to endothelial NO synthase. *Mol Biol Cell*, 2007, **18**(11): 4659~4668
 - 33 Becker P M, Waltenberger J, Yachechko R, *et al.* Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circ Res*, 2005, **96**(12): 1257~1265
 - 34 Gliki G, Abu-Ghazaleh R, Jezequel S, *et al.* Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca $^{2+}$. *Biochem J*, 2001, **353**(3): 503~512
 - 35 Mimura K, Kono K, Takahashi A, *et al.* Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol Immunother*, 2007, **56**(6): 761~770
 - 36 Takahashi A, Kono K, Ichihara F, *et al.* Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer*

- Immunol Immunother, 2004, **53**(6): 543~550
- 37 Nakamura Y, Patrushev N, Inomata H, *et al.* Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circ Res*, 2008, **102** (10): 1182~1191
- 38 Mattila E, Auvinen K, Salmi M, *et al.* The protein tyrosine phosphatase TCPTP controls VEGFR2 signalling. *J Cell Sci*, 2008, **121**(21): 3570~3580
- 39 Bernatchez P N, Acevedo L, Fernandez-Hernando C, *et al.* Myoferlin regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 stability and function. *J Biol Chem*, 2007, **282**(42): 30745~30753
- 40 Lampugnani M G, Zanetti A, Corada M, *et al.* Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol*, 2003, **161**(4): 793~804
- 41 Lampugnani M G, Orsenigo F, Gagliani M C, *et al.* Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol*, 2006, **174** (4): 593~604
- 42 Sarkar C, Chakroborty D, Mitra R B, *et al.* Dopamine *in vivo* inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, **287**(4): H1554~1560
- 43 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): 623~625
- Tan W F, Xiao D, Wang J L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (5): 623~625
- 44 Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, *et al.* Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004, **350**(23): 2335~2342
- 45 Hahn O, Stadler W. Sorafenib. *Curr Opin Oncol*, 2006, **18**(6): 615~621
- 46 Deeks E D, Keating G M. Sunitinib. *Drugs*, 2006, **66**(17): 2255~2266; discussion 2267~2268

Progress in The Study of VEGFR-2 Signaling Pathway*

KANG Cong-Min**, WANG Da-Wei, LÜ Ying-Tao, ZHANG Yuan-Yuan

(College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract Angiogenesis is of great importance to a variety of normal physiological processes and pathological disorders. It is tightly regulated by many mechanisms, among which vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most potent promoters. VEGF binds and activates its specific receptor tyrosine kinases, especially vascular endothelial growth factor receptor-2(VEGFR-2). VEGFR-2 mediates the key functional and biochemical effects of VEGF in endothelial cells including proliferation, migration, survival, and permeability. Following its binding to VEGF, VEGFR-2 dimerizes and undergoes autophosphorylation on tyrosine residues within its cytoplasmic portion. This creates docking sites for adapter molecules to be recruited through their Src homology domain-2 (SH2). These adapter molecules can then initiate the activation of downstream signaling cascades. Further down-stream effector molecules are activated, and regulate the biological effects of endothelial cells. It is also found that VEGF/VEGFR-2 signaling pathway may negatively regulate the function of human monocyte-derived mature dendritic cells (DCs) as well as the maturation of immature-DCs. Advances in the understanding of the VEGF/VEGFR-2 signaling pathway may contribute to the discovery of kinds of pharmaceutical agents.

Key words vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), angiogenesis, cancer, dendritic cell

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00095

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (20772070), The Natural Science Foundation of Shandong, China (Y2007C175, Y2007C176), The Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program (J07YC08, J09LC20) and The Project of Science and Technology Program for Basic Research of Qingdao, China (09-1-3-74-JCH).

**Corresponding author. Tel: 86-532-84023290, E-mail: cmkang@qust.edu.cn

Received: February 21, 2009 Accepted: March 29, 2009