

[文章编号] 1007-385X(2002)03-

血管生成素(Angiopoietins)及其在肿瘤血管新生中的作用

朱洪新 综述, 李锦军, 万大方 审阅(上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032)

[摘要] 血管生成素是新近发现的一个与血管新生密切相关的蛋白家族,其共同受体是 Tie2。由于 Ang1 和 Ang2 在体内具有与 VEGF 共同调节生理性和病理性血管新生的功能,其研究进展受到广泛关注。本文综述了血管生成素家族中主要成员 Ang1, Ang2, Ang3, Ang4 等在克隆、生化性质,血管生成素受体 Tie2 在信号转导中的作用,血管生成素在生理发育和血管新生中的作用等方面的研究进展。

[关键词] 血管生成素; 肿瘤; 血管新生; Tie2

[中图分类号] R730.23 [文献标识码] A

血管新生的一种方式是在原始血管丛或已存在血管的基础上以发芽的方式形成新生血管的过程,受多种因子的调控。血管生成素(angiotensin, Ang)是近年来发现的一个与血管新生密切相关的家族,现已发现 4 个成员,即 Ang1, Ang2, Ang3 和 Ang4。由于相对于 Ang3 和 Ang4,目前 Ang1 和 Ang2 的功能研究比较深入,因此本文主要就 Ang1 和 Ang2 的生化性质、受体及信号转导及其在肿瘤血管新生中的作用作一综述。

1 血管生成素的克隆及生化性质

1996 年 Davis 等^[1]在寻找 Tie2 的配体时获取了人和小鼠的 Ang1 cDNA。分析表明:人和小鼠 Ang1 基因的开放阅读框均编码 498 个氨基酸,两者有 97.6% 的同源性。N 端有一疏水的分泌信号肽和一个卷曲(Coiled-Coil)结构域,C 端包含一纤维蛋白原样(Fibrinogen)结构域。从氨基酸序列计算出的 Ang1 的分子量为 55 kD,而分泌的 Ang1 分子量为 70 kD,可能是翻译后修饰的结果,Ang1 氨基酸序列中含有几个糖基化位点。人 Ang1 基因位于染色体 8q22.3~23。

Maisonpierre 等^[2]用小鼠 Ang1 cDNA 为探针,在低严谨度的条件下筛选人和小鼠的 cDNA 文库,获得了人和小鼠的 Ang2 cDNA。Ang2 蛋白由 496 个氨基酸构成,有一分泌信号肽。人和小鼠 Ang2 的氨基酸序列有 85% 的同源性,与 Ang1 均有 60% 的同源性。其 N 端和 C 端同样存在卷曲结构域和纤维蛋白原样结构域。Ang1 中 9 个半胱氨酸中的 8 个在 Ang2 中是保守的,只有卷曲结构域和纤维蛋白原样结构域之间的一个半胱氨酸在 Ang2 中缺少。人 Ang2 基因位于染色体 8p23.1。

Ang4 是 1999 年从人的胎盘获得的一种分泌蛋白,同一因子在小鼠则称为 Ang3。Ang4 和 Ang3 基因分别编码 503 和 509 个氨基酸。Ang3 和 Ang4 氨基酸仅有 54% 的同源性,因此该基因的种属分化较其他血管生成素基因更明显^[3]。Ang4 基因位于染色体 20p13。

在成年鼠,Ang1 在多种组织中广泛表达,而 Ang2 仅在卵巢,胎盘和子宫等发生血管重塑的组织中表达。在胚胎组织,Ang1 在心房及心室的心肌层,间质和多数血管的平滑肌细胞含量丰富,Ang2 在背主动脉及主要的动脉分支表达高,特别是血管内皮细胞下的平滑肌层,而在发育中的心脏未能检出^[2,4]。Ang1 和 Ang2 这种相似但不相同的表达谱提示在血管发育过程中,Ang2 调节 Ang1 的功能。VEGF、bFGF、瘦素(leptin)、缺氧等促进 Ang2 的表达^[5-6]。

2 受体与信号转导

血管生成素的受体是内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体。现已证实 Ang1 和 Ang2 诱导 Tie-2 受体磷酸化由 Fibrinogen 样结构域介导。Jones 等^[7]用酵母双杂交系统寻找与磷酸化 Tie2 受体相结合的分子,结果发现 Grb2, Grb7, Grb14, Shp2 和 PI3 激酶的 p85 亚单位可以通过 SH2 结构域与 Tie2 结合,并依赖于磷酸酪氨酸。研究还揭示 Tie2 羧基端存在一个多底物的 docking 位点。将该位点突变可破坏体内 Grb2, Grb7 与 Tie 的结合,该位点是 Grb7 和 P85 酪氨酸磷酸化所必需。进一步的研究表明 Ang1 刺激 Tie2 表达细胞使 Tie2 及 PI3 激酶的 P85 亚单位磷酸化,PI3 激酶的活性增强,并成剂量依赖关系。PI3 激酶特异性抑制剂 Wortmannin 和 LY294002 能够阻断 Ang1 的抗凋亡作用^[8]。另一项研究表明 Ang1 通过 PI3 激酶进一步使 Akt 的 473 位点的丝氨酸磷酸化,从而上调凋亡抑制因子 Survivin 的表达^[9]。以上结果提示 Ang1 可能通过 PI3/Akt/Survivin 通路抑制内皮细胞凋亡,维持血管新生过程中血管的稳定性。

关于 Ang3 和 Ang4 的信号转导知之甚少,Ang3 似乎起拮抗作用,而 Ang4 起激活作用^[3]。

3 血管生成素在生理情况下的作用

在体外,Ang1, Ang2 对内皮细胞的增殖均无明显作用。Ang1 能够促进内皮细胞的迁移和分化,而 Ang2 无此作用,

但 Ang2 可拮抗 Ang1 的作用, Ang1 具有抗内皮细胞凋亡的作用^[1,2,10]。还有报道 Ang1 和 Ang2 促进整合素介导的细胞黏附^[11]。但这不是血管生成素在体内的主要生物学作用。

在胚胎发育过程中,血管形成及 Ang 的作用可概括为:

① VEGF 和 VEGFR2 结合诱导中胚层细胞分化为内皮细胞并增殖。② 随着胚胎的进一步发育, VEGF 和内皮细胞 VEGFR1 结合,促进原始血管的形成。③ Ang1 和内皮细胞 Tie2 结合,诱导其磷酸化,吸引血管周细胞和平滑肌细胞,并与其相互作用,维持血管稳定性。用同源重组方法敲除小鼠 Ang1 基因,9.5 d 就出现胚胎心脏发育缺陷,心内膜不成熟,折叠异常,心室内仅有内皮细胞衬而缺少心肌小梁。11 d 胚胎开始表现异常,12.5 d 胚胎死亡^[4]。Ang1 转基因小鼠则表现为血管管腔增大,灌注量升高,基底膜更完整,血管能够耐受炎症刺激^[12]。④ Ang1 的拮抗剂 Ang2 阻断 Tie2 受体的磷酸化,破坏内皮细胞与其周围细胞的相互作用,使内皮细胞处于激活状态。在 VEGF 存在的情况下,内皮细胞增殖、侵袭、迁移、形成新生血管;在无 VEGF 的条件下,激活的内皮细胞发生凋亡,血管新生受到抑制。Ang2 的转基因小鼠在 9.5~10.5 d 死亡,其异常的血管发育类似于 Ang1 基因敲除小鼠^[2]。可见,Ang1 的主要作用是诱导 Tie2 磷酸化,吸引周细胞及血管平滑肌细胞与内皮细胞相互作用,促进血管成熟,维持血管稳定性。而 Ang2 竞争性的抑制 Ang1,如同时存在 VEGF,则促进血管新生,否则血管退化。

用小鼠角膜血管新生实验模型发现 Ang1 和 Ang2 在成年鼠具有类似的生物学功能。VEGF 可引起角膜缘血管新生,而单独 Ang1 和 Ang2 均无此作用。与 VEGF 引起的新生血管相比,Ang1 和 VEGF 联合引起的新生血管管腔较大,灌流量较高,毛细血管密度增高,而角膜缘基底动脉管径增大。Ang2 和 VEGF 联合诱导的新生血管则较长,在新生血管边缘常有分离的内皮细胞。可溶性的 Tie2-Fc 对 VEGF 诱导的新生血管形态没有明显影响,但能够消除 Ang1 及 Ang2 对血管新生的调节作用^[13]。

4 血管生成素在肿瘤血管新生中的作用

4.1 血管生成素在肿瘤组织中的表达

Tsnaka 等^[14]用 RT-PCR 方法检测血管生成素 mRNA 在 23 例肝癌标本中的表达结果表明:Ang1 在肝癌和癌旁肝组织中的表达无明显差异,而 Ang2 在肝癌组织中表达明显增高。在 12 例富血管肝癌组织中,有 10 例 Ang2 表达,而在 11 例少血管肝癌中仅 2 例呈现 Ang2 的表达,而正常肝组织持续表达的 Ang1 在肿瘤细胞的表达明显下降。Wurmbach 等^[15]发现多数前列腺癌肿瘤细胞和腺内基质细胞表达 Ang1 和 Ang2。Ang1 和 Ang2 在肿瘤毛细血管也有表达。此外,Ang2 在肿瘤血管平滑肌细胞也表达,但正常的前列腺组织不表达血管生成素。原发性非小细胞性肺癌组织的血管 Ang2 表达明显升高,且和肿瘤细胞 VEGF 的表达相关。胃癌和恶性角质瘤组织 Ang2 表达增高^[16-17],而直肠癌 Ang1 和 Ang2 的表达均增加^[18]。上述结果提示血管生成素尤其是

Ang2 在多种肿瘤的血管新生中可能起着重要作用。

4.2 血管生成素在肿瘤血管新生中的作用机理

以往认为,肿瘤生长开始不依赖于血管新生,只有在直径大于 2 mm³ 的情况下,才发生血管新生。其机理如下:① VEGF, bFGF 和缺氧使肿瘤 Ang2 表达上调,破坏了 Ang1 和 Ang2 之间的平衡;② 增高的 Ang2 阻断 Ang1 对 Tie2 的激活,从而破坏内皮细胞与周细胞,平滑肌细胞之间的相互作用;③ 内皮细胞失去与微环境正常的相互作用后,处于激活状态,在肿瘤细胞分泌的血管新生因子(如 VEGF)的刺激下发生增殖,迁移,浸润,形成血管结构;④ 肿瘤细胞及间质细胞产生的 Ang1 与 Ang2 参与维持肿瘤新生血管的结构^[19]。

目前存在的另一种观点则认为:① 至少有一部分肿瘤在开始就共选择(coopt)已存在的宿主血管,形成一个富血管的肿瘤小块,但肿瘤细胞不表达 VEGF。② 可能是由于宿主存在的防御机制,肿瘤块内血管 Ang2 的表达显著上调,通过拮抗 Ang1 的作用破坏内皮细胞和周围细胞的作用,使内皮细胞处于激活状态,但是由于缺少 VEGF,内皮细胞发生凋亡,血管破坏,导致大量的肿瘤细胞死亡。③ 这时,残存的肿瘤细胞开始分泌 VEGF(这是肿瘤血管新生的早期标记),从而刺激部分激活的内皮细胞发生迁移,增殖,形成新生血管。④ 相对于上调的 Ang2, Ang1 的表达在肿瘤发展的过程中并无明显变化,因此肿瘤新生血管渗漏性增高。上述机理已在恶性胶质瘤, C6 胶质瘤模型, 乳腺腺癌模型, Lewis 肺癌转移瘤模型中得到证实^[20]。

5 展望

综上所述,血管生成素在肿瘤血管新生过程中起着复杂而重要的作用,现在已有可用可溶性的血管生成素受体 Tie2 抑制肿瘤血管新生,肿瘤发展的报道^[21]。相信随着对血管生成素信号转导,基因表达调控等方面的深入研究,在不久的将来,血管生成素有望为肿瘤的临床治疗提供一种新途径。

[参考文献]

- [1] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning [J]. *Cell*, 1996, 87: 1161-1169.
- [2] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis [J]. *Science*, 1997, 277: 55-60.
- [3] Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, *et al.* Angiopoietins 3 and 4: Diverging gene counterparts in mice and humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1904-1909.
- [4] Suri c, Jones PF, Patan S, *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis [J]. *Cell*, 1996, 87: 1171-1180.
- [5] Oh H, Takagi H, Suzuma K, *et al.* Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 15732-15739.
- [6] Cohen B, Barkan D, Levy Y, *et al.* Leptin induces angiopoietin-2 expression in adipose tissues [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 7697-7700.
- [7] Jones N, Master Z, Jones J, *et al.* Identification of Tek/Tie2 bind-

- ing partners [J]. J Biol Chem, 1999, 274: 30896-30905.
- [8] Kim I, Kim HG, So JN, *et al.* Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3 -kinase/Akt signal transduction pathway [J]. Circ Res, 2000, 86: 24-29.
- [9] Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, *et al.* Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/Survivin pathway [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 9102-9105.
- [10] Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, *et al.* Chemotactic properties of angiopoietin-1 and 2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2 [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 18514-18521.
- [11] Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, *et al.* Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 26516 - 26525.
- [12] Thurston G, Suri C, Smith K, *et al.* Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1 [J]. Science, 1999, 286: 2511-2514.
- [13] Asahara T, Chen D, Takahashi T, *et al.* Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization [J]. Circ Res, 1998, 83: 233-240.
- [14] Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, *et al.* Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. J Clin Invest, 1999, 103: 341-345.
- [15] Wurbach JH, Hammerer P, Sevinc S, *et al.* The expression of angiopoietins and their receptor Tie-2 in human prostate carcinoma [J]. Anticancer Res, 2000, 20: 5217-5220.
- [16] Eton T, Inoue H, Tanaka S, *et al.* Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma [J]. Cancer Res, 2001, 61: 1245-1253.
- [17] Koga K, Todaka T, Motohiro M, *et al.* Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis [J]. Cancer Res, 2001, 61: 6248-6254.
- [18] Ahmad SA, Liu W, Jung YD, *et al.* The effects of angiopoietin-1 and 2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61: 1255-1259.
- [19] Lauren Juha, Gunji Y, Alitalo K. Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis? [J]. Am J Pathol, 1998, 153: 1333-1339.
- [20] Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF [J]. Science, 1999, 284: 1994-1998.
- [21] Lin P, Polverini P, Denhirst M, *et al.* Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie-2 in pathologic vascular growth [J]. J Clin Invest, 1997, 100: 2072-2078.

[收稿日期] 2002 - 03 - 08

[修回日期] 2002 - 04 - 23