

10 Sieling PA <i>et al.</i> <i>Science</i> , 1995; 269: 227	19 Cardell S <i>et al.</i> <i>J Exp Med</i> , 1995; 182: 993
11 Porcelli SA <i>et al.</i> <i>Nature</i> , 1989; 341: 447	20 Balk SP <i>et al.</i> <i>Science</i> , 1994; 265: 259
12 Bendelac A <i>et al.</i> <i>Science</i> , 1995; 268: 863	21 Behar SM <i>et al.</i> <i>J Exp Med</i> , 1995; 182: 2007
13 Faure F <i>et al.</i> <i>Eur J Immunol</i> , 1990; 20: 703	22 Bendelac A. <i>J Exp Med</i> , 1995; 182: 2091
14 Thomssen H <i>et al.</i> <i>Immunology</i> , 1995; 85: 33	23 Ohtehi T <i>et al.</i> <i>J Exp Med</i> , 1994; 180: 699
15 Beckman EM <i>et al.</i> <i>Nature</i> , 1994; 372: 691	24 Vicari AP <i>et al.</i> <i>Immunol Today</i> , 1996; 17: 71
16 Castano AR <i>et al.</i> <i>Science</i> , 1995; 269: 223	25 Yoshioto T <i>et al.</i> <i>Science</i> , 1995; 270: 1845
17 Benham A <i>et al.</i> <i>Immunol Today</i> , 1995; 16: 359	26 Dellabona P <i>et al.</i> <i>J Exp Med</i> , 1994; 177: 1763
18 Brutkiewicz RR <i>et al.</i> <i>J Exp Med</i> , 1995; 182: 1913	27 Balk SP <i>et al.</i> <i>Science</i> , 1991; 253: 1411

(1996-07-23 收稿)

血管内皮细胞生长因子与心血管缺血性疾病的治疗

张 皓综述 张相根审核

上海第二医科大学附属仁济医院血管外科 (上海, 200001)

摘要 血管内皮细胞生长因子(VEGF)是一种高特异性的促血管内皮细胞生长的因子。正常情况下,VEGF 在创伤愈合、组织器官修复和胚胎发育中起着重要作用,但在缺血、炎症和肿瘤等病理情况下表达也增加。VEGF 通过内皮细胞上的特异性受体促进血管的发生和生长。利用 VEGF 的这一特性,将其用于治疗心血管的缺血性疾病,可明显增加侧支循环,改善缺血。由于 VEGF 在循环中的半衰期短暂,它的基因治疗将是研究方向。

关键词 血管内皮细胞生长因子; 基因治疗

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),又称 VAS (vasculotropin)或 VPF(vascular permeability factor),是一种特异性的、与血管生长有关的生长因子。无论在胚胎发育、创伤修复等生理情况下,还是在炎症、视网膜病和肿瘤生长等病理情况下,都与血管的发生和生长有密切联系。VEGF 最先是在研究肿瘤的过程中被发现,随着对 VEGF 生物学功能认识的不断深入,不少从事生物治疗的研究者,正在加紧探索 VEGF 治疗心血管缺血性疾病的可行性及有关技术。

1 肿瘤源性血管内皮细胞生长因子

早在 60 年代,Folkman 等^[1]在研究新生

血管与肿瘤生长之间的关系时发现:置于游离血红蛋白溶液中的内皮细胞,发生肿胀但不能增殖。将肿瘤细胞置于同样溶液中,肿瘤只能长到 1~2 mm 直径,且从不血管化。但是这些肿瘤细胞处于“血管化前”状态,一旦植入宿主体内,即迅速生长,可以超过 1 cm。因而他们提出假设:肿瘤的生长依赖于血管生长。70 年代,经过一系列研究发现:肿瘤能持续释放可弥散的血管形成因子,这些因子能刺激毛细血管生长超过 2~5 mm。Folkman 等^[2]将体外培养的毛细血管内皮细胞置于肿瘤化的培养基中,发现这些内皮细胞能形成完整的毛细血管网。所以他们认为,血管内皮细胞在接受了来自肿瘤细胞的血管化信号后,可以表现出一种特有的反应而形成新

生毛细血管。80年代,部分提纯了这种肿瘤源性的血管内皮细胞生长因子,但对其性质和功能还不完全了解^[3]。以后发现,这些肿瘤源性的血管内皮细胞生长因子与正常组织中的血管内皮生长因子并无区别,所不同的是,正常情况下,这些因子只有在胚胎发育及创伤等情况下才表达,而肿瘤细胞则持续表达这种因子^[1]。

2 VEGF在正常生理或病理状况下的表达

VEGF可由许多正常细胞产生和分泌,包括平滑肌细胞、黄体细胞,肾上腺皮质细胞和滤泡柱状细胞(folliculo-stellate cell)^[4,5]。在正常情况下,如周期性黄体形成、创伤愈合、组织器官修复和胚胎发育等^[6,7],以及一些病理情况,如肿瘤、类风湿性关节炎、视网膜膜病^[7]和缺血刺激^[8,9]等,都会发生血管增殖。血管增殖是一个复杂的新生血管形成的过程,其间有许多血管生长因子参与^[9],其中,VEGF是高特异性促血管内皮细胞有丝分裂的因子^[8,10~12]。在某些情况下,VEGF可迅速增加。Hashimoto等^[8]在体内试验中观察到,当心脏缺血5~10 min,心肌细胞内VEGF的mRNA表达可在30 min内达到高峰,且至少维持3 h;在心肌细胞体外培养试验中,缺氧条件下得到的结果与之相同。Bannai亦观察到类似结果^[13]。在体外,当缺氧2~4 h,心肌细胞内VEGF的mRNA水平增高6~10倍;在体内,心脏缺血时,心肌细胞中VEGF的mRNA水平增加了3~5倍。一般认为,血管内皮细胞只是VEGF作用的靶细胞,其本身并不表达VEGF^[14]。但是,亦有研究发现:血管内皮细胞在正常情况下不表达VEGF,但当内皮细胞被置于缺氧环境时,细胞内VEGF的mRNA水平明显增加^[15]。这表明,VEGF不仅通过旁分泌途径作用于内皮细胞^[6,16~18],而且有自分泌机制参与^[5,15]。

3 VEGF的结构及生物学功能

VEGF是一种二聚糖蛋白,分子量为45 kD左右^[10,19~22],两个亚基由二硫键连接^[13,22],每一个亚基分子量为23 kD^[13,22]。由于在mRNA水平的拼接不同,造成VEGF有含氨基酸数量不同的4种形式:VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆^[6,10,11,20]。其中,VEGF₁₂₁和VEGF₁₆₅是分泌型的^[11,20],而VEGF₁₈₉和VEGF₂₀₆则保留着和细胞的联系^[11,20]。VEGF₁₆₅主要分布在细胞表面和细胞外基质^[11],它是成熟的VEGF,具有生物学活性^[6],可用于治疗肢体动脉缺血^[10]。用酵母细胞产生的VEGF₁₂₁进行动物实验研究,发现也具有促进血管增生的生物学作用^[23]。目前认为VEGF₁₈₉可能是作为一种储存形式积聚在细胞表面^[6]。VEGF多肽链的N端有一段典型的信号肽^[10],其第一位氨基酸是丙氨酸,C端富含碱性氨基酸^[24]。VEGF和PDGF(platelet-derived growth factor,血小板源性生长因子)的基因具有同源性^[19,22,24]。有人认为,VEGF是PDGF基因家族中的新成员^[19],但二者又不相同,PDGF中,所有8个半胱氨酸分散在A链和B链中,而VEGF中,则8个半胱氨酸都集中在C端的50个氨基酸中^[7];PDGF作用于成纤维细胞和平滑肌细胞,而VEGF则特异性刺激内皮细胞增生^[23],且PDGF与肝素亲和性低,VEGF则与肝素有高度亲和性^[1]。VEGF中C端的8个半胱氨酸排成一行,提示在这一区域有保守的三级结构^[6]。

4 VEGF及其相关受体

VEGF对血管内皮细胞的特异性作用是由于内皮细胞表面有VEGF的特异性受体^[5,6,10,16~18]。受体分子量为180 kD^[6,17]的糖蛋白,其中的糖分子不仅在维持受体功能方面,而且是VEGF与受体的相互作用方面所需的成分^[17]。受体属酪氨酸蛋白激酶,是flt,

flk-1 和 KDR 的基因产物^[6,10,25]。受体酪氨酸蛋白激酶(RTKs)是一个促使膜转运受体磷酸化从而完成多肽生长因子生物学功能的大家族,各种激酶亚型的功能取决于与之相结合的配体,有 metRTK、trkRTK 等。flt、flk-1 和 KDR 是 fms 样 III 型 RTK^[25]。flk-1 和 KDR 具有高度同源性^[26]。VEGF 与受体有高度亲和力。Millauer 等^[16]通过实验研究发现:flk-1 基因在整个胚胎期的表达水平均很高,鼠脑和整个鼠胚胎切片原位杂交结果显示,flk-1 基因表达与内皮细胞在组织中的分布方式及它们的起源有关。婴儿出生早期,内皮细胞增生仍很活跃,flk-1 表达多,而成人器官在完成了血管化的过程后,flk-1 表达很低。这些现象表明,flk-1 基因产物(受体)介导了血管化过程早期的信号传递。flk-1 基因表达开始于内皮细胞生长早期,表达在那些将成为内皮细胞的细胞上,因而 flk-1 可能对这些细胞的生长与分化起着调节作用。Kevin 等^[18]的研究显示了 flt 表达在胚胎的内皮细胞上,由此推测,VEGF 不仅影响血管生长,而且影响内皮分化。Guo 等^[25]最近的研究表明,VEGF 促使几种基因产物(受体)聚集,并各自在信号传递中起着不同的作用。

循环中的 α_2 -巨球蛋白能与 VEGF 结合,二者一旦形成复合物,VEGF 即不能与血管内皮细胞上的受体结合。而 α_2 -巨球蛋白与 VEGF 的结合又可被细胞外基质释放的肝素样分子(肝素及硫酸肝素)所抑制^[5,10]。实验结果表明,肝素样分子可以促进 VEGF 的活性,一方面它能加强 VEGF 与细胞表面受体的结合,另一方面它能防止由于 VEGF 与 α_2 -巨球蛋白结合而引起的失活^[5]。

5 应用 VEGF 治疗缺血性疾病的实验研究

VEGF 特异地作用于血管内皮细胞,在体内,它能促使内皮细胞有丝分裂,增加毛细血管的穿透性生长能力^[6,10,18,27],并具有单核

细胞趋化作用和蛋白酶活性^[28];在体外实验中,VEGF 也能促使血管生长,将体外培养的人脐静脉内皮细胞置于 I 型胶原凝胶上层,再加入 VEGF,1 d 后可见人脐静脉内皮细胞“发芽”,3 d 开始形成管状,7 d 时更明显^[21]。鉴于上述这些功能,人们开始探索将 VEGF 用于治疗肢体和心肌的缺血性疾病^[10,11,29~31]。目前仍处于动物实验阶段。心肌或外周动脉缺血实验动物造型后,用 VEGF₁₆₅ 进行局部动脉灌注^[10]、肌肉注射^[11,29]及静脉给药^[30],观察缺血肢体的血供改善情况。血管造影和病理切片证实,经 VEGF 治疗的缺血肢体,侧枝循环明显增多^[10,11,29,30],且侧枝形成的数量随 VEGF 剂量增加而增加^[10,11]。但由于 VEGF 在循环中的半衰期很短(<6 min)^[10,11],给治疗带来很大不便,因此,人们设想采用基因治疗手段,将带有 VEGF 基因的载体转染至局部动脉细胞^[31]。可用于转染 VEGF 基因的载体有:微注射、DEAE-右旋糖酐、病毒和脂质体等^[32]。常用的病毒有疱疹病毒^[33]和腺病毒^[34],病毒的优点是能作用于特定的靶细胞,缺点是仍有病毒的特性^[32]。因而目前用得较多的是脂质体^[32]。基因转染方式有两种:细胞介导的基因转染和直接基因转染,前者是取出宿主内皮细胞,体外培养,转染基因后再回输入体内;后者则将要转染的基因直接注入宿主组织中^[32]。这些基因可以通过细胞表面受体介导的细胞内吞、弥散或直接插入的方式进入宿主细胞,然后由宿主细胞的酶转录成 mRNA,翻译成蛋白质^[32]。这样,宿主细胞可以不断产生 VEGF,达到治疗目的。

6 小结

VEGF 是一种高特异性的促血管内皮细胞生长因子,它在胚胎发育、创伤修复等生理情况及缺血、炎症、肿瘤等病理情况下,可以通过旁分泌和自分泌机制,作用于血管内皮细胞上的特异性受体,促使血管发生和生长。

将它用于治疗动脉缺血性疾病,可明显增加侧枝循环,改善缺血。因此,VEGF 是一种很有临床应用价值的细胞因子。

参 考 文 献

- 1 Folkman *et al.* *Cancer Res*, 1986; 46: 467
- 2 Folkman *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 5217
- 3 Folkman J *et al.* *Science*, 1987; 235: 442
- 4 Neufeld G *et al.* *Prog Growth Factor Res*, 1994; 5: 89
- 5 Soker S *et al.* *J Biol Chem*, 1993; 268: 7685
- 6 Plouet J *et al.* *Horm Res*, 1994; 42: 14
- 7 David W *et al.* *Science*, 1989; 246: 1306
- 8 Hashimoto E *et al.* *Am J Physiol*, 1994; 267: H1948
- 9 Diaz Flores L *et al.* *Histol Histopathol*, 1994; 9: 807
- 10 Takeshita S *et al.* *J Clin Invest*, 1994; 93: 662
- 11 Takeshita S *et al.* *Circulation*, 1994; 90: 1-228
- 12 Connolly DT *et al.* *J Biol Chem*, 1989; 264: 20017
- 13 Banai S *et al.* *Cardiovasc Res*, 1994; 28: 1176
- 14 Shifren JL *et al.* *J Clin Endocrinol Metab*, 1993; 79: 316
- 15 Liu Y *et al.* *Circ Res*, 1995; 77: 638
- 16 Millauer B *et al.* *Cell*, 1993; 72: 835
- 17 Vaisman N *et al.* *J Biol Chem*, 1990; 265: 19461
- 18 Kevin G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 8915
- 19 Tischer E *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 165: 1198
- 20 Ballaun C A *et al.* *J Invest Dermatol*, 1995; 104: 7
- 21 Bikfalvi A *et al.* *J Cell Physiol*, 1991; 149: 50
- 22 Conn G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 1323
- 23 Kondo S *et al.* *Biochem Biophys Acta*, 1995; 195: 1243
- 24 Keck PJ *et al.* *Science*, 1989; 246: 1039
- 25 Guo D *et al.* *J Biol Chem*, 1995; 270: 6729
- 26 Millauer B *et al.* *Cell*, 1993; 72: 835
- 27 Maglione D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 9267
- 28 Simon M *et al.* *Am J Physiol*, 1995; 268(2 Pt 2): F240
- 29 Pu LQ *et al.* *Circulation*, 1993; 88: 208
- 30 Bauteras C *et al.* *J Vasc Surg*, 1995; 21: 314
- 31 Takeshita S *et al.* *Circulation*, 1993; 88: 1-476
- 32 Nabel EG *et al.* *Cardiovasc Res*, 1994; 28: 445
- 33 Mesri EA *et al.* *Circ Res*, 1995; 76: 161
- 34 Michael D *et al.* *Circulation*, 1993; 88: 1937

(1996-05-27 收稿)

腺病毒载体的免疫反应与免疫调节

欧阳平 黄洪莲 刘伊丽

第一军医大学南方医院心内科 (广州, 510515)

摘要 重组腺病毒载体因在体内能高效感染广泛的细胞类型而成为目前 *in vivo* 基因治疗的一个颇具吸引力和极有前途的载体,但机体对腺病毒载体产生的抗原特异性细胞免疫和体液免疫反应使腺病毒介导的外源基因仅能短暂表达,且再次进行腺病毒载体转基因时外源基因无法在体内表达,由此大大降低了腺病毒载体基因治疗的效果。本文综述了机体对腺病毒的免疫反应,阐明