

综述 ·

血管内皮生长因子及其受体与血液系统恶性肿瘤

梁爱斌¹ 综述,顾龙君² 审校

(1. 同济大学附属同济医院儿童血液肿瘤科,上海 200065; 2. 上海第二医科大学附属新华医院/上海儿童医学中心,上海 200092)

[中图分类号] R733 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)05-0427-04

自90年代以来,国外许多文献报道了血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体在血液系统恶性疾病如急性白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、骨髓增生异常综合征中存在过度异常表达。目前认为,VEGF及其受体表达的高低在血液系统恶性疾病的发生发展、演变、迁移、治疗反应及预后判断等方面均发挥着越来越重要的作用。但是,VEGF及其受体发挥功能的细胞、分子生物学机制迄今尚未完全阐明,就此问题本文通过复习近年相关领域的文献报道作一综述。

1 VEGF家族及其受体的一般生物学特性^[1]

VEGF是一种糖基化多肽因子,分子量为34-45 KD,由于在转录水平不同的剪切导致产生4种单体形式,分别含121,165,189,206个氨基酸序列。VEGF是一种强烈的丝裂原,同时也是血管生成激活分子,能促进血管内皮细胞分裂,刺激微血管形成。VEGF家族基因定位于6p21.3,含8个外显子和7个内含子,全长28 Kb,最早由Leung等人从人白血病细胞系HL-60克隆。目前,已经确定有3种VEGF受体:flt-1, KDR(flk-1),flt-4,其中前两种受体亲和度及表达效价远大于flt-4,故一般研究多集中于前二者。VEGF受体归属于II型酪氨酸蛋白激酶受体家族,分布于早期干细胞、淋巴组织内皮、血管内皮、肾小球内皮、血小板等细胞表面,但最多表达于肿瘤细胞且强度更高。

2 VEGF及其受体在血液系统恶性肿瘤中高度表达

2.1 VEGF异常表达的组织学与免疫学证据

Vacca等^[2]1994年应用免疫组化方法首先报道在多发性骨髓瘤患者骨髓中血管生成较正常人明显增加,表现为微血管密度(microvessel density, MVD)计数升高,其分布、生长方式与在淋巴组织、肝脏、脾脏中类似,说明VEGF与多发性骨髓瘤形成、迁移有关,并且预测新生血管生成情况可以作为判断淋巴血液系统肿瘤预后的指标之一。而Mangi^[3]等应用免疫荧光标记的抗人VEGF抗体(UEA-1,Ⅷ因子相关抗原抗体和抗CD31,CD34抗体)检测40例儿童急性淋巴细胞白血病患者骨髓中微血管内皮细胞表达情况,结果显示较正常儿童显著增高。Turley等^[4]运用重组VEGF189单体蛋白作为抗原刺激小鼠产生单抗,经纯化后用于检测血液肿瘤患者骨髓中巨核细胞,发现存在高度表达VEGF。其后,Bellamy和Salven等^[5]在恶性淋巴瘤患儿,Aguayo等^[6]在急性淋巴细胞性、髓性白血病患者,Mesters等^[7]在多发性骨髓瘤患者中均发现类似现象。同时,许多学者还使用固相酶联免疫吸附试验(ELISA)检测患者和健康人群血清和尿液中VEGF的浓度,发现正常人群VEGF水平为9~20 pg/ml,而肿瘤患者数值均大于26.74 pg/ml ($P < 0.01$),从而说明血液系统恶性肿瘤患者体内确实存在高表达的VEGF。

然而,虽然VEGF高度异常表达在血液肿瘤细胞中存在已无争议,但是迄今仍缺乏检测VEGF受体KDR及flt-1在血液肿瘤细胞表面存在的受体

[收稿日期] 2002-02-10; [修回日期] 2002-06-18
[基金项目] 本项目受国家自然科学基金青年基金(批准号:30100203)资助
[作者简介] 梁爱斌(1971),男,博士,主治医师。

分子生物学和免疫学方法。

2.2 VEGF 及其受体异常表达的分子生物学证据

Bellamy WT 等^[5]使用 Northern Blot Analysis, RT-PCR 及原位杂交等方法检测了 12 种肿瘤细胞系(包括急性 T 淋巴细胞性和非 T 非 B 细胞性白血病、皮肤 T 细胞性淋巴瘤、Burkitt's 淋巴瘤、急性早幼粒细胞白血病、单核细胞白血病、慢性髓性白血病、多发性骨髓瘤及毛细胞白血病等) VEGF 及其两种受体的表达,发现所有的肿瘤细胞系均表达 VEGF 开放阅读框架(ORF),说明他们均具备自身合成、分泌这种细胞生长因子的功能,即自体分泌功能(Autocrine),其中多以表达 VEGF121 和 165 两种单体为主。同时,除 MM 细胞系外其他 11 种肿瘤细胞系细胞膜表面均存在 VEGFR-1 受体(flt-1),说明大多数血液肿瘤细胞不但自身能够分泌 VEGF,还具备接受 VEGF 传递信号的功能,从而间接证实肿瘤细胞在发生、发展过程中存在外源性 VEGF 旁分泌(paracrine)机制。但是,在 Bellamy WT 等人的报道中肿瘤细胞表面并未表达 VEGFR-2 受体(KDR),与其他作者的报道有所不同。与此相反,Koistinen P 等人^[8]通过流式细胞术、Western 蛋白印迹方法报道大部分的急非淋白血病患者细胞膜表面均存在 KDR,尤其在急性粒细胞白血病、单核细胞白血病、巨核细胞白血病中表达较高,而 flt-1 表达较低。目前,大多数作者通过 RT-PCR 方法检测不同血液肿瘤细胞的 VEGF 受体,发现大多数血液肿瘤细胞均同时存在 VEGFR-1/ R-2 受体,表达高低与肿瘤细胞类型有关。

3 VEGF 及其受体的分泌途径和信号传导通路

3.1 VEGF 自分泌和旁分泌途径^[9]

研究发现,应用 RT-PCR 检测恶性血液肿瘤细胞,发现它们同时表达 VEGF 及其受体的 mRNA,而受体 mRNA 的表达又以 KDR 表达为主。把白血病细胞通过转基因移植入 NOD-SCID 小鼠体内,然后运用针对 KDR 的单抗阻断 KDR 表达,发现白血病细胞无法生长。同时,在这些肿瘤细胞的提取液中发现了 VEGF 蛋白表达,从而说明肿瘤细胞本身存在分泌 VEGF 的功能并通过细胞-细胞形式进行细胞间 VEGF 的信号传递,促进肿瘤细胞的繁殖和生长,形成了所谓的自分泌途径。与此同时,研究表明血液肿瘤患者的骨髓血管内皮基质细胞也可分泌 VEGF,经血流方式传递给肿瘤细胞,通过 VEGF 受体进行瀑布式信号传导导致肿瘤细胞的增殖和生

长,形成旁分泌途径。

3.2 VEGF 受体信号胞膜传递通路^[10]

现已表明,参与 VEGF 受体信号胞膜传递的方式为酪氨酸蛋白激酶信号传递。自分泌及旁分泌的 VEGF 至细胞表面后被 KDR 的类似 Ig 的酪氨酸蛋白激酶结合区结合,形成双体膜单向通道使 VEGF 刺激信号传入胞内,随即受体酪氨酸残基发生自身磷酸化,将信号进一步传向胞内受体。

3.3 VEGF 受体信号胞内传递的可能通路

迄今发现胞内 VEGF 信号传递方式可能有以下 3 种:①一氧化氮(NO)途径^[8]:通过酪氨酸蛋白激酶传递的 VEGF 信号传至胞内激活磷酸酯纤维醇-3-羟基激酶(PL3-K),再激活 AKT 激酶,后者又激活一氧化氮合酶,利用左旋精氨酸合成 NO,NO 能够使肿瘤细胞通过各种途径产生凋亡抑制,从而引起肿瘤细胞耐药或无限繁殖;同时 NO 还能够抑制造血干细胞生长及分化,引起正常骨髓细胞增殖抑制,导致骨髓造血功能障碍。②丝/苏氨酸蛋白激酶-1-有丝分裂原活化激酶-胞外信号调节蛋白激酶方式(Raf-1-MEK-ERK)^[11]:VEGF 信号传递至胞内,使丝/苏氨酸残基磷酸化,激活有丝分裂原活化蛋白,使胞外信号调节蛋白激酶活化进入细胞核,促进 DNA 合成加速,从而使肿瘤细胞增殖,此信号传递方式主要作用于肿瘤的发生、发展及增殖。③蛋白激酶 C 依赖方式^[11]:VEGF 信号在刺激前两种受体同时也作用于蛋白激酶 C 受体,它磷酸化后刺激细胞产生大量的趋化因子和运动蛋白使肿瘤细胞容易迁移和扩散。

4 VEGF 及其受体异常表达促进血液系统恶性疾病发生、发展的机制

迄今为止,VEGF 及其受体在血液系统恶性肿瘤细胞中异常表达、分泌途径及作用已被公认。但是,其促进肿瘤发生、增殖等功能的分子生物学机制尚未完全阐明,仍需进一步研究。目前的研究结果表明 VEGF 及其受体在肿瘤细胞异常表达与肿瘤细胞耐受药物或放射治疗诱导的细胞凋亡抑制有关,至少存在 3 种分子机制。

4.1 MCL-1-Caspase3 途径^[12]

MCL-1 是 bcl-2 基因家族中的一员,编码含 139 个氨基酸序列的功能蛋白-凋亡抑制蛋白(Inhibitory apoptosis protein, IAP),它能够抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的活化,而后的活化是引起细胞线粒体功能改变后发生所谓级联效应从而导致肿瘤细胞凋亡的正向调控因子。Katoh

M 等人在研究白血病细胞系 CMK86 的 VEGF 表达后,结果表明高表达的自分泌和旁分泌 VEGF 传递至肿瘤细胞表面,信号被其受体接受后发生酪氨酸蛋白激酶磷酸化,将刺激信号传入细胞内引起 MCL-1 表达上调,抑制 Caspase3 活化,阻碍了肿瘤细胞的凋亡,引起肿瘤细胞耐药。

4.2 锌指基因 7 (Zinc finger 7, ZK-7) 途径^[13]

ZK7 是最近才被克隆的一个基因,属于 Krüppel-type 锌指基因家族,与传统的锌指基因家族成员 HZF16 存在高度同源性,但是功能相异。Kuramoto K 等人通过筛选 cDNA 文库、Northern blotting、Western blotting 及 RT-PCR 等方法发现 ZK7 由两个功能互补的功能区 box-A, box-B 组成,二者相互折叠形成双面螺旋结构。box-A 在 VEGF 及其受体高表达的肿瘤细胞内功能被激活,产生凋亡抑制作用,此作用被 box-B 强化。但是 box-A 激活后如何产生凋亡抑制的机制未明,可能与多种凋亡因子活性改变有关。

4.3 Fas-FasL-Caspase8 途径^[14]

Fas-FasL 是调节细胞凋亡的重要因子之一, Franco S 等描述了白血病细胞上调 FasL 的表达,产生死亡结构域蛋白 (Fas associated death domain protein, FADD),它与 Caspase8 结合,使其不能正常剪切活化 Caspase3,4,7,9,10 等导致正常凋亡不能发生,从而逃避了 Fas⁺ 细胞毒细胞的免疫监视作用,使肿瘤细胞增殖加速。

5 与 VEGF 及其受体表达相关的细胞因子^[15]

目前研究结果表明,许多细胞因子参与了 VEGF 分泌及传递过程,包括纤维细胞生长因子 (bFGF),Fas 配体 (FasL),粒/粒单细胞集落刺激因子 (G/GM-CSF),干扰素- γ ,白细胞介素-1,6,8,10,基质金属蛋白酶 (MMP),基质细胞衍生因子 (SDF) 等,它们或者是增强 VEGF 的自分泌和旁分泌,诱导受体表达,使肿瘤细胞产生增殖、迁移,或者是参与了 VEGF 及其受体的细胞信号传递、抑制肿瘤细胞正常凋亡、产生耐药等,临床上表现为肿瘤负荷加重,易于全身转移扩散等。但是,也存在抑制 VEGF 表达的细胞因子,最常见的是肿瘤坏死因子- α (TNF- α),它的作用在于下调和抑制 VEGF 及其受体的表达,减轻它的生物学功效。

6 抗 VEGF 活性及抗 VEGF 受体表达在血液系统恶性肿瘤治疗中应用

血液系统恶性肿瘤细胞异常表达 VEGF 及其

受体,并且已明确与疾病的发生、演变、迁移等密切相关,因此针对 VEGF 活性及 VEGF 受体表达的治疗策略则应运而生。现国际上普遍认为根据 VEGF 及其受体不同作用位点和不同肿瘤分类、分型而采用不同的策略,以下为目前常见的几种针对 VEGF 及其受体的治疗途径或方法。

6.1 阻断血管新生药物

目前在国外报道较多的药物首推反应停^[16],它通过阻断血管新生而产生抗肿瘤生长和转移,在经过其治疗的肿瘤患者骨髓中发现 MVD 较治疗前显著下降,因此在实体肿瘤如淋巴瘤和多发性骨髓瘤中获得较满意的结果。同时部分作者报道在 MDS 中也取得一定疗效,但尚未明确。

6.2 VEGF 单抗

Bevacizumab^[17]是一种识别 VEGF 的单克隆抗体,能够识别所有的 VEGF 单体,阻断它和受体结合,同时使 VEGF 效价降低,起到抗肿瘤作用,因此它可广泛应用在所有血液系统恶性肿瘤,包括各类急慢性白血病。目前国外已在进行 I 期临床试验。

6.3 VEGF 受体拮抗剂^[18]

Flt-1 和 KDR 是一种酪氨酸蛋白激酶,属于小分子物质,它的活性能被吲哚素-2 (Indolin-2) 抑制。Indolin-2 竞争性抑制 VEGF 受体的 ATP 结合位点,使信号传递通路阻断,因此产生抗肿瘤效应。此药物抗肿瘤谱广,副作用小,目前也处于 I 期临床试验中。

6.4 凋亡诱导剂-全反式维甲酸^[19]

Gail 等和 Ameet 等人将不同浓度的 VEGF 和白血病细胞系 HEL 和 NB4 共同孵育,发现上述两种细胞系 VEGF 受体的表达远高于未加 VEGF 的细胞系。随后他们又将全反式维甲酸作用于 VEGF 受体高表达的细胞系进行孵育,然后把含全反式维甲酸作用和未含全反式维甲酸作用的细胞进行凋亡检测和 VEGF 及其受体表达的检测,发现前者凋亡率远高于后者,而 VEGF 及其受体表达远低于后者,由此推断全反式维甲酸可以阻断 VEGF 的凋亡抑制作用,可以作为一种常规药物使用。

7 结语

VEGF 及其受体的异常表达对于血液系统恶性肿瘤的发生、演变、迁移、治疗均存在一定的作用,现已成为共识。同时也有许多临床学家认为把 VEGF 及其受体的表达结合其他临床及实验室检查如免疫分型、核型分析、凋亡因子等作为一种判断疾病预后

的指标,目前尚无定论。^[20]

总之,有关 VEGF 及其受体表达与血液系统恶性肿瘤关系的研究仍处于早期阶段,在此领域仍然存在许多待解决的课题,例如:①VEGF 及其受体表达在实体肿瘤和各类型白血病中的表达是否一致;②检测 VEGF 及其受体表达的方法如何统一;③目前尚缺乏 VEGF 及其受体在健康人群和肿瘤患者的标准曲线;④VEGF 及其受体表达在血液肿瘤中的作用机制尚未完全阐明;⑤VEGF 及其受体表达能否作为疾病预后检测指标;⑥抗 VEGF 活性及抗 VEGF 受体表达药物的确切疗效、毒副作用研究资料 and 方案等。因此,在国内开展此领域的研究迫在眉睫。

[参 考 文 献]

- [1] Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, et al. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res*, 1995, 55(23): 5687 - 5692.
- [2] Vacca A, Ribatti D, Iurlaro M, et al. Human lymphoblastoid cells produce extracellular matrix-degrading enzymes and induce endothelial cell proliferation, migration, morphogenesis, and angiogenesis. *Int J Clin Lab Res*, 1998, 28(1): 55 - 68.
- [3] Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol*, 2000, 111(1): 43 - 51.
- [4] Helen Turley, Prudence A, Victoria M, et al. Expression of VEGF in routinely fixed material using a new monoclonal antibody VG1. *Journal of pathology*, 1998, 186(2): 313 - 318.
- [5] Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res*, 1999, 59(3): 728 - 733.
- [6] Aguayo A, Manshouri T, O'Brien S, et al. Clinical relevance of Flt1 and Tie1 angiogenesis receptors expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Res*, 2001, 25(4): 279-85.
- [7] Mesters RM, Padro T, Steins M, et al. Angiogenesis in patients with hematologic malignancies. *Onkologi*, 2001, 24 (Suppl 5): 75 - 80.
- [8] Koistinen P, Siitonen T, Mantymaa P, et al. Regulation of the acute myeloid leukemia cell line OCI/AML-2 by endothelial nitric oxide synthase under the control of a vascular endothelial growth factor signaling system. *Leukemia*, 2001, 15(9): 1433 - 1441.
- [9] Hayashibara T, Yamada Y, Miyanishi T, et al. Vascular endothelial growth factor and cellular chemotaxis: a possible Autocrine pathway in adult T-cell leukemia cell invasion. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(9): 2719 - 2726.
- [10] Masood R, Gordon EM, Whitley MD, et al. Retroviral vectors bearing IgG-binding motifs for antibody-mediated targeting of vascular endothelial growth factor receptors. *Int J Mol Med*, 2001, 8(4): 335 - 343.
- [11] Podar K, Tai YT, Davies FE, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*, 2001, 98(2): 428 - 435.
- [12] Katoh O, Takahashi T, Oguri T, et al. Vascular endothelial growth factor inhibits apoptotic death in hematopoietic cells after exposure to chemotherapeutic drugs by inducing MCL1 acting as an antiapoptotic factor. *Cancer Res*, 1998, 1; 58(23): 5565 - 5569.
- [13] Kuramoto K, Uesaka T, Kimura A, et al. ZK7, a novel zinc finger gene, is induced by vascular endothelial growth factor and inhibits apoptotic death in hematopoietic cells. *Cancer Res*, 2000, 60(2): 425 - 430.
- [14] Franco S, Marco T, Paola C, et al. Fas-L up-regulation by highly malignant myeloma plasma cells: role in the pathogenesis of anemia and disease progression. *Blood*, 2001, 97(5): 1155 - 1164.
- [15] Janice L G. Angiogenic growth factors: Autocrine and paracrine regulation of survival in hematologic malignancies. *The Oncologist*, 2001, 6(suppl): 4 - 7.
- [16] Lu D, Jimenez X, Zhang H, et al. Complete inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) activities with a bifunctional diabody directed against both VEGF kinase receptors, fms-like tyrosine kinase receptor and kinase insert domain-containing receptor. *Cancer Res*, 2001, 61(19): 7002 - 7008.
- [17] Francis J G. The vascular endothelial growth factor signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *The Oncologist*, 2001, 6(suppl5): 32 - 39.
- [18] Annie TF, Laura KS, Li sun, et al. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor that inhibits Tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Research*, 1999, 59: 99 - 105.
- [19] Roboz GJ, Dias S, Lam G, et al. Arsenic trioxide induces dose- and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an antileukemic effect via inhibition of angiogenesis. *Blood*, 2000, 96(4): 1525 - 1530.
- [20] Ferrajoli A, Manshouri T, Estrov Z, et al. High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(4): 795 - 799

(本文编辑:尹飞)