文章编号:1000-5404(2005)04-0361-03

综述

内皮细胞特异性 RTK 受体与血管生成

Endothelial cell-specific receptor RTK and angiogenesis

明 佳 综述,刘旭盛 审校 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

血管生成(angiogenesis)是指在原有的毛细血管和/或微静脉基础上通过血管内皮细胞的迁移和增殖,从已存在的血管处以芽生或非芽生(套迭)的形式生成新的、以毛细血管为主的血管系统的过程,在成人,它至少包括 6 个连续的步骤:已存在的周细胞的分离;内皮细胞分泌的蛋白酶降解细胞外基质;内皮细胞迁移;增殖;形成管腔;周细胞粘附、血管的稳定。在此过程中涉及多种分子的作用,目前研究得较多的有两类内皮细胞表面特异性、具有受体酪氨酸激酶活性(receptor tyrosine kinase, RTK)的受体:Tie-2 受体和 VEGF 受体。Tie-2 受体(tyrosine kinase with immunoglobulin-like loops and epidermal growth factor homology domain-2)的配体是血管生成素 1 和 2(angiopoietin, Ang1 和 Ang2),它的主要作用是调节内皮细胞和血管周围间质的相互作用;VEGF 受体血管内皮生长因子受体,(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)的配体是 VEGF(vascular endothelial growth factor,血管内皮生长因子),它的主要作用是调节内皮细胞的增殖和迁移。

1 Tie-2 受体

1.1 Tie-2 受体的结构和信号转导通路

Tie-2 受体广泛表达于各级血管的内皮细胞表面,包括动脉、静脉和毛细血管的内皮细胞,它由发生接触反应的核心、激酶插入区(kinase insert domain, KID)和 C 末端的尾部组成,它的独特结构在于其核苷酸结合环是一种抑制性环,这在其它激酶中是没有的,而它的活化环却采用一种缺乏磷酸化作用的活化样结构;其次,它的 N 末端的 Tyr-897,可以防止激酶区的二聚化或通过其在磷酸化时招募的磷酸酶反向调节 Tie-2 的活性[1]。

Tie-2 的天然配体有 Ang1 和 Ang2,Ang1 是 Tie-2 受体的天然配体,它可以诱导受体的酪氨酸磷酸化;而 Ang 2 是抑制性配体,它不能诱导 Tie-2 受体的酪氨酸磷酸化。但目前对于 Ang 1 磷酸化 Tie-2 受体后的途径尚不清楚,有人推测,可能是通过 PI3-K/AKT 及 p125FAK 的磷酸化,然后激活转录因子 STAT,促进 p21 的转录[2];同时,Ang1 还可以抑制 caspase-3、7、9 的活化,上调凋亡抑制因子生成素(survivin)的表达,从而抑制内皮细胞的凋亡[3]。

1.2 Tie-2 受体在血管生成中的作用

Ang /Tie-2 系统在调节血管的完整性和某些病理条件下的血管生成中起着重要作用,Takagi 等[4] 向糖尿病小鼠静脉内注射 Tie-2 的可溶性抗体,发现在阻断 Ang /Tie-2 通路后,完全抑制了因糖尿病引起的视网膜血管形成。

Ang 1 可以促进内皮细胞上的 Tie-2 受体的自身磷酸化(活化),Tie-2 活化了的内皮细胞就能够吸引血管平滑肌细胞、周细胞等血管周围细胞,包围、支持内皮细胞形成完整的血管壁,并使内皮细胞处于静止状态,促进血管重塑、成熟,维持血管的稳定性;Douglas[5] 的实验也证明,阻断 Ang 1/Tie-2 信号通路后,体内的内皮细胞数量正常,能够形成管腔,但形成的血管缺乏分支网络,管腔的结构也很薄弱。

Ang2 是抑制性配体,它不能诱导 Tie-2 受体的酪氨酸磷酸化,该通路的作用主要是破坏血管的稳态,使致密的血管结构变得疏松,使得蛋白酶能够降解内皮细胞周围的基底膜,将内皮细胞暴露于血管生成诱导因子的作用之下,如果有 VEGF 等血管生成诱导因子存在,内皮细胞就被活化,发生迁移和增殖,新的毛细血管芽生、管腔形成;如果缺乏 VEGF 等生存信号,Ang2 处于高水平的血管就发生退化[5,6]。

2 血管内皮细胞生长因子受体(VEGFR)

VEGF 是体内重要的血管生成诱导因子,它可以刺激内皮细胞合成蛋白酶,促进内皮细胞增殖和迁移,它介导的信号转导是通过 VEGFR——另一类内皮细胞特异选择性 RTK 受体完成的,目前认为,参与血管生成的 VEGFR 主要有两个:VEGFR-1(fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1)和 VEGFR-2(kinase insert domain-containing receptor, KDR /fetal liver kinase-1, Flk-1);VEGFR-1 染色体定位于 4q12,该受体的氨基酸数目为 1 388 个,分子量为 180 $\times 10^3$,主要与 EC 的粘附、维持血管通透性有关;VEGFR-2 染色体定位于 13q12,氨基酸数目为 1356,分子量为 230 $\times 10^3$,VEGFR-2 似乎与 EC 增殖、分化有关[7]。

2.1 VEGFR-1 和 VEGFR-2 的结构

VEGFR-1 和 VEGFR-2 均为跨膜受体,结构相似,均分为胞外区、跨膜区、胞内区 3 部分,其中,胞外区由 N 端信号肽和 7 个免疫球蛋白样结构域组成;胞内区由激酶功能区、酪氨酸激酶插入区及 C 端三部分构成。

在 VEGFR-1 和 VEGFR-2 胞外区的 7 个免疫球蛋白样结构域中,第二个结构域含有与 VEGF 结合的主要决定簇,它以疏水作用与 VEGF 二聚体的头部结合后,可以引发信号级联反应,当 VEGFR-1 缺失胞外的第二个结构域将完全失去与 VEGF 结合的活性 ,如将 VEGFR-2 的第二个结构域引入 VEGFR-1 的相应部位,VEGFR-1 可恢复与 VEGF 结合的活性 ,但却表现出 VEGFR-2 受体的配体结合特异性。

在 VEGFR-1 和 VEGFR-2 的胞内区结构中,VEGFR-1 有 2 个主要的酪氨酸磷酸化位点:Tyr1213 和 Tyr1242,2 个次要的酪氨

作者简介:明 佳(1970-),女,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事难愈伤口与血管生成方面的研究,电话:(023)65136063
通讯作者:刘旭盛,电话:13608378821
收稿日期:2004-09-28;修回日期:2004-11-10

酸磷酸化位点:Tyr1329 和 Tyr1333,这些特异性酪氨酸磷酸化位点为含不同 SH2 结构域的分子提供了高亲和力的结合位点。在 VEGFR-2 的酪氨酸激酶区,有 4 个磷酸化位点,分别位于第 951,996,1054,1059 位的酪氨酸残基[8];在酪氨酸激酶区以外的某些酪氨酸也参与了受体酪氨酸激酶的活化,如最近新发现的 C 区第 1212 位酪氨酸,就具有这样的功能[9]。

当 VEGF 与 VEGFR-2 结合后,VEGFR-2 有很强的酪氨酸磷酸化作用,而 VEGFR-1 的此功能明显弱于 VEGFR-2,目前发现,这种差异主要是由于 VEGFR-1 胞内近膜区有一个由 3 个丝氨酸组成的序列,它抑制了由 VEGF 引起的 PI-3K 的活化和内皮细胞的迁移,当该序列被 VEGFR-2 相应区域的 ANGG 取代,或敲除这 3 个丝氨酸后,表达 VEGFR-1 的细胞就表现出与野生型表达 VEGFR-2 的细胞同样的、由 VEGF 介导的 PI-3K 的活化,以及 PI-3K 的亚单位 P85 磷酸化和内皮细胞的迁移[10]。

2.2 VEGFR 的信号转导通路与血管生成作用

VEGFR-1 主要与 EC 的粘附、维持血管通透性有关,VEGFR-2 与血岛和血细胞的形成、EC 增殖、分化有关[11],有实验表明,当阻断 VEGF/ VEGFR-1 通路时,有丰富的内皮细胞形成,但却不能形成血管管腔;当阻断 VEGF/ VEGFR-2 通路时,无内皮细胞和发育的造血系统[5]。

在 VEGF 刺激下,VEGFR-2 可以迅速被磷酸化,磷酸化的 VEGFR-2 通过激活蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)-MAPK 旁路,促进内皮细胞的有丝分裂和增殖[12]。VEGFR-1 可以与 PLC-γSH2 区相互作用,VEGF 诱导 PLC-γ 磷酸化,导致 4、5-2 磷酸磷脂酰肌醇水解为 1、4、5-3 磷酸肌醇和二酰甘油,1、4、5-3 磷酸肌醇可以提高细胞内的 Ca^{2+} 水平,二酰甘油可以激活某些靶细胞表达的 PKC 亚型 α 和 β_2,从而促进内皮细胞的增殖,运用 PKC-β 的选择性抑制剂可以抑制 VEGF 对这些细胞的致有丝分裂作用[13]。

最近有文献报道,在 VEGF 刺激下,VEGFR-1 的磷酸化能通过激活 MAPK 家族中的 p38MAPK,从而促进肌动蛋白的聚集和内皮细胞的迁移[14]。除了肌动蛋白外,内皮细胞迁移还需要与粘附有关的蛋白质协同作用,VEGFR-2 可以通过 PKC 磷酸化粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK)、桩蛋白(paxillin),使粘着斑蛋白(vinculin)在局部粘着斑内聚集[15],从而促进内皮细胞的迁移。

VEGF/VEGFR 可以抑制内皮细胞的凋亡,VEGF 主要通过与 VEGFR-2 结合,进一步激活 PI3K/Akt,Ras/Raf/MEK/ERK 等通路,提高凋亡调节蛋白 *Bcl*-2/*Bcl*-XL、Survivin/XIAP、NO 等的浓度,从而抑制了内皮细胞的凋亡,促进内皮细胞的存活。

3 VEGF/VEGFR、Ang/ Tie-2 信号通路在伤口愈合中的作用

结合 VEGF/VEGFR 和 Ang/ Tie-2 的不同功能,推测它们在血管发生期、成熟期、血管生成期和消退期等不同时期的机制为:在胚胎血管发生期,VEGF 通过 VEGFR-2 启动内皮细胞的分化增殖,促进新生血管的形成;在血管成熟期,二者协同作用,通过募集血管周围的平滑肌细胞和周细胞,保持血管管腔的稳定性;在血管生成期,Ang2 阻断 Ang 1/Tie-2 的信号传递,使细胞外间质和支持细胞与血管内皮细胞之间的联系出现松动,使内皮细胞对 VEGF 发出的出芽信号更易起发应,能够突破细胞外基质的限制,以出芽的方式形成新生血管;在血管消退期,由于缺乏 VEGF 的生存信号,Ang2 使血管周围的间质细胞和周细胞与内皮细胞的联系松解,血管结构破坏,内皮细胞出现凋亡;存在 VEGF 时,Ang2 诱导新生血管形成[16]。对于 VEGFR-1 在血管生成中的具体作用,目前还有争议,它究竟仅仅是作为一种 VEGF 的配体结合分子,还是作为 VEGF 的信号转导的受体,尚无定论[17]。

目前,关于 VEGF/VEGFR、Ang/Tie-2 信号通路在肿瘤血管生成方面的研究较多,而在伤口愈合方面的研究报道却很少,在伤口愈合中,内皮细胞的迁移和增殖是必不可少的,而内皮细胞的迁移和增殖至少部分源于内皮细胞表面 VEGFR 的表达及其对 VEGF 的反应,在难愈合伤口中,VEGFR 的功能受抑制也许是一个重要原因,最近有报道,在由细菌引起的败血症和伤口感染中,G⁻菌胞壁的脂多糖(LPS)和细菌脂蛋白(BLP)对 VEGFR 有明显的抑制作用,而且此抑制作用并非由 LPS 和 BLP 的毒性作用引起[18],Kampfer 等的研究也表明,在普通正常的伤口愈合中,Ang1 和 Ang2 呈平行增长,但在受伤后 7 d 左右,Ang2 的表达就开始下降,而在同时期的糖尿病患者的难愈合伤口中,Ang2 却始终保持较高水平;同时,在正常的伤口愈合中,有 Tie-2 的表达,而在难愈合伤口中,却未见 Tie-2 的表达,VEGF 的表达也有所下降[19],从血管生成在伤口愈合中的作用、VEGF/VEGFR、Ang/ Tie-2 信号通路在血管生成中的作用以及大量的实验成果来看,VEGF/VEGFR、Ang/ Tie-2 信号转导通路在难愈合伤口中的确发生了一定的变化,但是,在不同原因引起的难愈合伤口中,这两条通路是否同时表现为异常,或其中一条表现得更为突出;这种异常是表现在受体与配体的结合上,还是在受体激酶本身的活性方面,或者发生在信号通路的其他分子异常方面,这些都是有待进一步深入研究的,这一方面的深入研究对于临床治疗具有理论和实践两方面的指导意义。

关键词:内皮细胞;RTK 受体;血管生成

中图法分类号:R392.3 **文献标识码**:A

参考文献:

[1] Shewchuk L M, Hassell A M, Ellis B, *et al*. Structure of the Tie2 RTK domain: self-inhibition by the nucleotide binding loop, activation loop, and C-terminal tail[J]. Structure Fold Des, 2000, 8(11): 1105 - 1113.

[2] Kim I, Kim H G, Moon S O, *et al*. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion[J]. Circ Res, 2000, 86(9): 952 - 959.

[3] Harfouche R, Hassessian H M, Guo Y, *et al*. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells[J]. Microvasc Res, 2002, 64(1): 135 - 147.

[4] Takagi H, Koyama S, Seike H, *et al*. Potential role of the angiopoietin/ tie2 system in ischemia-induced retinal neovascularization[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(1): 393 - 402.

[5] Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance[J]. Science, 1997, 277(5322): 48 - 50.

[6] Lobov I B, Brooks P C, Lang R A. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(17): 11205 - 11210.

[7] 熊 兵, 易传勋. 血管内皮生长因子其家族与基因治疗[J]. 中华医学美容杂志, 2000, 6(6): 328 - 330.

[8] 姜自彬, 李 元. 血管内皮生长因子受体的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2001, 28(1): 9 - 13.

[9] Meyer R D, Dayanir V, Majnoun F, *et al*. The presence of a single tyrosine residue at the carboxyl domain of vascular endothelial growth factor

receptor-2/FLK-1 regulates its autophosphorylation and activation of signaling molecules[J]. J Biol Chem, 2002, 277(30): 27081 - 27087.

[10] Gille H, Kowalski J, Yu L, *et al*. A repressor sequene in the juxtamembrance domain of Flt-1(VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3′-kinase activation and endothelial cell migration[J]. EMBO J, 2000, 19(15): 4064 - 4073.

[11] Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, *et al*. Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation[J]. Human Pathology, 2002, 33(9): 863 - 870.

[12] Wu L W, Mayo L D, Dunbar J D, *et al*. Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation[J]. J Biol Chem, 2000, 275(7): 5096 - 5103.

[13] Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, *et al*. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors[J]. Cancer Res, 2000, 60(2): 203 - 212.

[14] Kanno S, Oda N, Abe M, *et al*. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells[J]. Oncogene, 2000, 19(17): 2138 - 2146.

[15] Sato Y, Kanno S, Oda N, *et al*. Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 902: 201 - 207.

[16] 方 全, 唐孝达. 血管生成素与肿瘤新生血管生成[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(5): 345 - 347.

[17] Bussolati B, Dunk C, Grohman M, *et al*. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis *via* nitric oxide[J]. Am J Pathol, 2001, 159(3): 993 - 1008.

[18] Power C, Wang J H, Sookhai S, *et al*. Bacterial wall products induce downregulation of vascular endothelial growth factor receptors on endothelial cells via a CD14-dependent mechanism: implications for surgical wound healing[J]. J Surg Res, 2001, 101(2): 138 - 145.

[19] Kampfer H, Pfeilschifter J, Frank S. Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair[J]. Lab Invest, 2001, 81(3): 361 - 373.

（编辑 张 宁）

文章编号：1000-5404(2005)04-0363-03

综述

Tbx3 基因功能研究及其在肿瘤演进中的作用

Tbx3 gene function and its roles in tumor progression

邓 军 综述，刘友生 审校 （第三军医大学西南医院病理科，重庆 400038）

*Tbx*3(T-box 3)基因是 T-box(*Tbx*)基因家族的成员之一，该家族属发育调控相关转录因子基因家族，表达产物作为真核生物的转录调控因子，有 20 多个成员，其共同特征是编码具有高度保守的 N 末端 DNA 结合区(T区)的转录因子，广泛存在于多细胞生物，具有重要的发育调控功能，在脊椎和非脊椎动物胚胎的形态和组织发生中发挥着重要作用。*Tbx*3 基因的异常表达将导致尺骨-乳腺综合症(ulnar-mamary syndrome, UMS)，后者是一种严重的家族性显性遗传性疾病。近年来的研究已经证实，Tbx2 基因在乳腺癌有变异表达，而 *Tbx*3 基因也和 *Tbx*2 一样主要参与的 p19ARF-p53 途径等信号传导，由此推测 *Tbx*3 的变异可能与肿瘤的发生也密切相关。

1 Tbx3 基因的结构和功能

1.1 *Tbx*3 基因结构及其表达产物

*Tbx*3 基因位于人染色体 12q24.1，全长 12 895 个碱基。目前已发现该基因有两个剪接变异体，即 *Tbx*3-1 和 *Tbx*3-2，前者有 7 个外显子和 6 个内含子，cDNA 长 2 433 个碱基，后者有 8 个外显子和 7 个内含子，cDNA 长 3 327 个碱基。T-box 区位于 574 ~ 3 948 bp，涵盖了外显子 1 和 4 的部分碱基，外显子 2 ~ 3 的全部碱基及外显子 1 ~ 4 之间全部内含子碱基序列。*Tbx*3 基因编码的蛋白质长约 723 个氨基酸，DNA 结合区位于第 105 ~ 285 位氨基酸。在斑马鱼研究中发现该基因表达具有严格的时空特异性和空间特异性[1]，正常情况下 *Tbx*3 表达在早期胚胎的内胚层，在成熟个体的四肢作 RT-PCR 显示呈弱表达[2]。但也有认为，*Tbx*3 广泛表达在成体组织中[3]。

目前尚少发现 TBX3 蛋白作用的天然靶点，与该家族的其它成员编码的蛋白质一样，其中碳端拥有一个约 180 个高度保守的氨基酸残基区域，称为 T-box 结构域，而其前、后的序列非常多变。这一区域在所有的 T-box 基因都较为相似，*Tbx*3 与 *Tbx*2 在该区域就有 95% 的相同残基，该区域拥有一段约 20 bp sDNA 回文结构结合位点，*Tbx*3 基因可独立识别具有回文结构的双链 DNA 的两个位点，尽管也可单一半位结合，其结合却不如双链强，结合到双链的两个 *Tbx*3 的 T-box 结构域可以通过少数另一移动的侧链彼此接触。

1.2 *Tbx*3 基因的功能

TBX3 蛋白与 DNA 结合形成的复合物共同构成 *T-box* 转录因子，形成的球形表面与该家族的 Xbra/DNA 复合物较为相似，该复合物含有一个结合到 p19ARF 启动子的 T 位点。鼠短尾突变体表型的小鼠的缺失突变异显示在碳端紧接 T-box 结构域的区域具有两个反式激活位点和两个抑制位点，共同构成反式激活结构域[4-5]。*Tbx* 基因的突变致病主要表现为多点突变[6]，也表现为 *Tbx*3 的杂合表达。

*Tbx*3 基因表达产物主要作为转录因子，早期即在胚胎的肢芽边缘表达，参与细胞信号的传导，从而影响机体的发育和稳定，尤其在胚胎发育时期，对于四肢和乳腺的发育尤其重要，对

作者简介：邓 军(1975 -)，男，四川省安岳县人，硕士，主治医师，主要从事乳腺癌病因及发病学方面的研究。电话：(023)68754024

通讯作者：刘友生，电话：(023)68754431

收稿日期：2004-09-25；修回日期：2004-12-01