

血管生成抑制素作用机理的研究进展

赵田夫^{①②} 李晶^①

(^①中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080 ;^②保定师范专科学校生物学系 保定 071000)

摘要 血管生成抑制素(angiotatin)是纤溶酶原(plasminogen)在体内的天然水解产物,能够有效抑制血管内皮细胞的增殖、迁移和管状结构的形成而参与对血管生成过程(angiogenesis)的调节。血管生成是指从已经存在的血管生长出新的分枝血管的过程。该过程在成体组织并不活跃,然而在某些病理条件下如伤口愈合、炎症、肿瘤的生长和恶性转移时却常常伴随活跃的血管生成过程。血管生成抑制素对血管生成的抑制作用,提示其作为一种特异性的针对血管内皮细胞的药物治疗与血管生成有关的一些疾病,如肿瘤的可能性。本文主要介绍近年来关于 Angiotatin 作用机理的研究进展以及其作为治疗药物的应用前景。

关键词 :血管生成抑制素 ;血管生成 ;肿瘤

中图分类号 :Q551 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2006)03-123-06

Molecular Mechanisms of Angiotatin Action : New Advances

ZHAO Tian-Fu^{①②} LI Jing^①

(^①State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080 ;

^②Department of Biology, Baoding Teachers' College, Baoding 071000, China)

Abstract :Angiotatin, a 38 ku derivate of plasminogen, has been identified and characterized to be a potent inhibitor of angiogenesis and tumor metastasis. Angiogenesis referred to sprouting and branching of new vessels from the pre-existing ones. Although it is rare in adult, angiogenesis is a key event in a broad range of pathological events, such as wound healing, inflammation, tumor growth and metastasis. The purpose of this review is to describe the highlights of research on the mechanism of Angiotatin action and its application as an anti-angiogenic factor for curing some diseases such as tumor.

Key words :Angiotatin ;Angiogenesis ;Tumor

血管生成(angiogenesis)不同于血管发生(vasculogenesis),是指从已经存在的血管生长出新的分枝血管的过程。该过程在胚胎发育组织器官形成中发挥重要作用,然而在成体,只有在某些组织如雌性生殖系统和病理条件下,如伤口愈合、炎症、肿瘤的生长和恶性转移时,才会出现活跃的血管生成过程。虽然启动血管生成过程需要上调促血管生成因子的表达,但同时也需要下调血管生成抑制分子的表达。因此,某一组织在某一特定时间是否能够进行血管生成取决于在本地环境中血管生成因子和血管生

成抑制分子间的平衡^[1]。血管生成抑制素(angiotatin)是第一个从长有肿瘤动物的血清和尿液中分离得到的内源性血管生成抑制因子,以后通过相似的方法又分离得到了血管内皮抑制素(endostatin)、TSP-1和serine antithrombin。

基金项目 国家重点基础研究资助项目(No. TG1999055903),国家自然科学基金资助项目(No. 30170357)和中国科学院知识创新工程领域前沿项目(No. KSCX3-IOZ-7);

第一作者介绍 赵田夫,男,副教授;研究方向:生殖生物学; E-mail: girl5210@sohu.com。

收稿日期 2005-08-20,修回日期 2006-02-27

目前为止,已经发现近 30 种内源性的血管生成抑制因子,并且其中大多数都分离自肿瘤动物模型,那么肿瘤为什么会产生如此高剂量的内源性血管生成抑制因子?为什么原发性肿瘤需要抑制继发转移病灶的形成?为什么原发肿瘤的生长不受它们自己产生的血管生成抑制因子的调节?以下将以血管生成抑制素为代表简要综述近年来关于其分子作用机理的研究进展及其作为治疗药物的应用前景。

1 血管生成抑制素的产生和结构特点

血管生成抑制素是纤溶酶原(plasminogen)在体内的天然水解产物,分子量 38 ku。1994 年 哈佛医学院的 Folkman 实验室首次从肺癌转移模型小鼠的血清和尿液中分离得到,由于它能够有效抑制内皮细胞的增殖、迁移和管状结构的形成,因此将其命名为血管生成抑制素^[2]。血管生成抑制素是纤溶酶原在体内的天然水解片段,含有纤溶酶原的前 4 个圆饼状结构(93 ~ 470 氨基酸),有两处糖基化位点。每个圆饼状结构都由最多 80 个氨基酸以高度保守的方式排列而成,并在内部形成 3 个二硫键维持结构的稳定性。各圆饼状结构在氨基酸序列上具有很大的相似性(大约 50%),它们抑制内皮细胞生长的能力依次为 K1、K3、K2、K4。事实上,K4 几乎不具备抑制内皮细胞生长的能力,而血管生成抑制素(K1-3)比血管生成抑制素(K1-4)具有更强的抑制内皮细胞生长的能力^[3]。除了这 4 个圆饼状结构外,在纤溶酶原中还有一个圆饼状结构 K5,K5 同样也含有 80 个氨基酸残基,并且在序列上与 K1 具有更高的相似性(大约 60%)。体外实验表明,K5 抑制血管内皮细胞增殖能力是血管生成抑制素(K1-4)的几倍,由于二者在抑制血管内皮细胞增殖方面具有协同效应,因此它们可能通过不同的途径发挥作用。然而体外实验结果并不一定代表在体效果,因为 K5 在体内的半衰期相当短。此外,尿激酶激活型纤溶酶作用于人纤溶酶原除了产生血管生成抑制素(K1-4)外,也会产生 K1-5。K1-5 在抑制血管内皮细胞增殖的能力

方面是血管生成抑制素的 50 倍,由于 K1-5 在体内也同样存在,因此 K1-5 在调节生理性和病理性血管生成过程中可能也发挥一定作用^[4]。

由于纤溶酶原存在不同的裂解位点,因此在不同的细胞环境中会产生不同形式的血管生成抑制素。关于血管生成抑制素的产生过程,首先,纤溶酶原在激活因子的作用下产生纤溶酶,而磷酸甘油酯激酶的激活会抑制纤溶酶产生,此时环境中的纤溶酶或其他氨基酸蛋白酶作用于纤溶酶原或纤溶酶自身首先生成血管生成抑制素(K1-4.5),然后在周围多种金属蛋白酶的作用下进一步生成 K1-3 或 K1-4。存在于基质中的多种蛋白水解酶及肿瘤细胞产生的水解酶都能作用于纤溶酶或纤溶酶原产生功能性血管生成抑制素样片段,这些水解酶包括 pancreas elastase, uPA(尿激酶)激活的纤溶酶, prostatic specific antigen, cathepsin D 以及多种基质金属蛋白酶如 MMP-12, 7, 9, 3 和-2^[5]。K5 的生成则稍有不同,中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase)作用于纤溶酶原会产生血管生成抑制素(K1-3),游离的 K4 和纤溶酶原片段(miniplasminogen),该片段含有 K5 和丝氨酸蛋白酶区,然后,在金属蛋白酶的作用下,进一步产生游离的 K5。天然的纤溶酶原存在 6 种糖异构体,而在体外由纯化的纤溶酶原糖异构体产生的血管生成抑制素中,只有 angiostatin 2epsilon 糖异构体能够抑制体外内皮细胞的增殖和管状结构的形成。总之,纤溶酶原裂解位点的复杂性以及翻译后修饰过程使得血管生成抑制素的产生和调节过程更为复杂,并且极其依赖于周围的环境^[6]。

2 血管生成抑制素的作用机理

血管生成抑制素是在细胞膜上还是进入细胞内来完成其对内皮细胞的抑制作用,尚未见报道。无论是纤溶酶原还是纤溶酶在细胞膜表面都存在多种受体,然而它们并没有抑制血管生成功能,这说明血管生成抑制素可能通过不同的细胞表面受体发挥作用。此外,如前所述,不同的裂解方式会产生不同的血管生成抑制

素,以及不同的翻译后修饰过程都会导致血管生成抑制素以不同的方式结合并将信号传递到胞内。除了细胞表面受体外,血管生成抑制素也能结合胞外的某些分子如组织型纤溶酶原抑制因子,说明血管生成抑制素也可以通过调节细胞周围的蛋白水解活性参与血管生成过程^[7]。

2.1 细胞表面受体整合素 $\alpha v\beta 3$ 血管生成抑制素是在细胞膜上还是进入细胞内来完成其对内皮细胞的抑制作用,尚未见报道。然而,不论是哪种作用机制,都涉及到内皮细胞中特异受体的参与。Tarui 等研究发现,在牛主动脉内皮细胞(bovine aortic endothelium,BAE),血管生成抑制素 n 能够与整合素 $\alpha v\beta 3$ 结合,然而这种结合并不会形成张力纤维,并且应用赖氨酸的拮抗剂 ϵ -氨基乙酸能够阻止 BAE 细胞向血管生成抑制素的粘附,表明血管生成抑制素中 Kringle 赖氨酸位点的暴露对于整合素的结合是必要的^[8]。一般情况下,灭活 FAK 基因或用反义寡核苷酸干扰 FAK 的作用均可导致细胞迁移受阻和细胞凋亡增加。Claesson-Welsh 等研究发现血管生成抑制素能够激活 FAK,从而引起细胞迁移的下降和凋亡的增加。进一步研究表明,这种作用与 RGD 结构无关,不涉及到 Src 的共活化,因此血管生成抑制素对 FAK 的激活并不依赖整合素的参与^[9]。然而,在人绒毛癌细胞 JEG-3 中,血管生成抑制素却能通过 $\alpha v\beta 3$ /FAK 信号通路下调 MMP 的表达,可见,在不同的细胞类型中血管生成抑制素可能通过不同的机制参与对细胞功能的调节^[10]。

2.2 内皮细胞表面的 F_1F_0 ATP 合成酶 存在于内皮细胞表面的 F_1F_0 ATP 合成酶,本来是存在于线粒体内膜上的一种将 ATP 水解和合成偶联在一起的结构酶。在其结构中含有两个部分, F_0 部分位于膜内充当质子循环泵的功能, F_1 部分执行 $ADP \leftrightarrow ATP$ 催化功能。血管生成抑制素能够结合内皮细胞表面的 F_1F_0 ATP 合成酶,并且同该酶的一种抑制分子 IF_1 (inhibitor of F_1) 具有竞争作用。进一步研究表明,血管生

成抑制素与 F_1F_0 ATP 合成酶结合后对于内皮细胞的抑制作用是 pH 依赖的,因为在体外实验中,在 pH 7.5 和 pH 6.5 时,血管生成抑制素都能结合并抑制 F_1F_0 ATP 合成酶的酶活性,而只有在 pH 6.5 时,内皮细胞才能被血管生成抑制素杀死。在肿瘤快速生长的过程中,肿瘤细胞的代谢物由于异常的血管生成过程而无法通过血液循环及时清除,因此,常导致肿瘤组织内环境 pH 降低。血管生成抑制素与内皮细胞表面的 F_1F_0 ATP 合成酶结合后对于内皮细胞作用的 pH 依赖性,提示 F_1F_0 ATP 合成酶可能作为一种新的治疗肿瘤的靶分子而发挥作用^[11~13]。

2.3 angiotensin 最近,通过酵母双杂交实验又发现了一种新的血管生成抑制素结合蛋白——angiotensin,进一步研究表明,angiotensin 属于一个新的蛋白质家族,该家族成员都具有保守的 coiled-coil 和 PDZ 结合区域。在血管内皮细胞中表达外源性人 angiotensin 能将建成的管状结构维持 30 d,并且能够促进从这些管状结构产生的内皮细胞的迁移能力。血管生成抑制素只有作用于转染 angiotensin 的细胞系才能增加 FAK 的活性并且抑制细胞迁移和管状结构的形成。虽然现在还没有证据表明血管生成抑制素对于 angiotensin 表达的影响是直接的还是间接的,然而 angiotensin 只参与血管生成抑制素对于细胞迁移和形态的调节,至于血管生成抑制素对于内皮细胞增殖和死亡方面的调节则并没有作用^[14]。

2.4 其他 2002 年 Tuszynski 等通过配基偶联实验寻找 BAE 表面血管生成抑制素结合蛋白时,发现了 Annexin II。Annexin II 不仅能同血管生成抑制素结合,同时也是纤溶酶原的受体之一,并且纤溶酶原能部分竞争血管生成抑制素同 BAE 细胞的结合(大约 40%)。进一步研究表明,血管生成抑制素与 Annexin II 结合后,能够引起细胞内游离钙离子浓度的增加从而抑制血管内皮细胞的增殖并诱导细胞凋亡。然而,纤溶酶原并不具备血管生成抑制素样功能,但二者为何能够结合相同的受体并引起不同的细胞反应还有待于进一步研究^[13]。

肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)与血管生成抑制素在氨基酸序列上具有很大的相似性,并且二者都具有圆饼状结构,然而它们对于内皮细胞的增殖和迁移的作用却正好相反。Wajih 和 Same 的研究表明,在人脐动脉血管内皮细胞(HUVEC),重组的血管生成抑制素 K1-3 能够抑制 HGF 导致的受体 c-met 及其下游信号分子 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化,并且过量 HGF 能够逆转血管生成抑制素的抑制作用,可见,血管生成抑制素通过阻止 HGF/c-met 的相互作用而抑制血管生成也是血管生成抑制素的作用机制之一^[15]。

最近,又发现了一种新的血管生成抑制素结合蛋白,由于该蛋白是一种新的蛋白,因此将其命名为血管生成抑制素结合序列蛋白(angiostatin binding sequence protein, ABSP),然而这种蛋白在血管生成抑制素 n 生物学效应中究竟发挥什么样的作用还有待于进一步研究^[16]。

同上述蛋白不同,在细胞表面还存在另一种硫酸软骨素蛋白质多糖 NG2,它与血管生成抑制素结合后,并不直接介导血管生成抑制素的信号通路,但却可以通过调节细胞外血管生成抑制素的活性促进中枢系统中血管生成依赖性肿瘤的生长^[17]。

3 血管生成抑制素作为治疗性药物的应用前景

肿瘤细胞的遗传学不稳定性为直接针对肿瘤细胞的治疗带来困难,然而肿瘤的生长和转移过程离不开血管生成,因此选择某些血管生成抑制因子以遗传学相对稳定的血管内皮细胞为目标的方法将会为癌症的治疗提供一条新的途径。血管生成抑制素由于为天然蛋白质对身体不存在明显的毒副作用,因此,在过去几年里,大量的研究表明重组或纯化的血管生成抑制素蛋白以 50 mg/kg 体重 2 次/日处理能显著抑制多种原发性肿瘤的生长^[1]。目前,关于血管生成抑制素的临床应用已进入一期阶段。然而,由于血管生成抑制素作为治疗药物存在半衰期短、用药剂量高、提纯蛋白的花费较为昂

贵、不易运输和贮存等缺点,又为血管生成抑制素的广泛应用带来了困难。解决方法一种是构建血管生成抑制素表达载体进行基因治疗,近几年大量的研究表明,将血管生成抑制素 n 表达载体瘤体内注入同样能显著抑制肿瘤的生长^[1]。另一种方法是在细胞表面寻找能够同血管生成抑制素结合并介导其血管抑制功能的特异受体,从而研制出一种更为稳定的血管生成抑制素类似物。但是,目前为止,由于存在不同的血管生成抑制素片段及糖异构体,并且在细胞表面鉴定出的多种受体又分别介导血管生成抑制素的不同功能,都为这方面的研究带来了困难。相信随着血管生成抑制素作用机制研究的不断深入,必将有益于研究出更适合的血管生成抑制因子治疗癌症。

在创伤愈合、其他一些血管损伤过程以及心血管疾病中,血管生成和炎症反应常常是两个紧密联系的过程,而这两个过程之间联系的分子机制目前还不是十分清楚。最近,有研究表明,血管生成抑制素(K1-4)也能发挥抗炎的功能。在体外,血管生成抑制素能够抑制 beta-1 和 beta-2 整合素介导的白细胞粘附于细胞外基质和血管内皮细胞以及白细胞穿过血管内皮的过程。在体内,血管生成抑制素也能抑制由腹膜炎引起的中性粒细胞的浸润。由于在皮肤损伤/炎症反应中在创口附近能够产生血管生成抑制素,并且在随后的创伤愈合中一直伴随血管生成抑制素 n 的产生,说明除了作为血管生成抑制因子外,血管生成抑制素也能作为抗炎因子而发挥作用^[18]。

胚胎植入是一个相当复杂的生物学过程,胚胎必须具备侵入母体子宫内膜的能力,并进一步形成胎盘同母体的血管建立联系,胚胎才能够存活并维持妊娠。事实上,成功的胚胎植入和胎盘形成离不开植入位点处血管通透性的增加和新血管生成。参与调节血管生成的因子如 FGF 家族、VEGF 及其受体在小鼠胚胎植入期无论在子宫还是胚胎都呈现特异性的表达^[19]。血管生成抑制素特异性的血管生成抑制作用提示,它也可能通过相似的机制干扰正

常胚胎植入过程。为了证实血管生成抑制素是否会对胚胎植入产生影响,我们首先采用宫角注射方法将血管生成抑制素直接注入植入前的小鼠子宫,结果发现 $3 \mu\text{g}$ 的血管生成抑制素对胚胎的植入率毫无影响,而 $6 \mu\text{g}$ 的血管生成抑制素却能显著抑制植入率。进一步研究表明,妊娠第 3 d 宫角注射 $4 \mu\text{g}$ 血管生成抑制素、第 4 d 和第 5 d 宫角注射 $5 \mu\text{g}$ 血管生成抑制素是抑制小鼠胚胎植入的最低有效剂量,与此同时,子宫中 MMP-2 和 MMP-9 的表达和酶活性也受到显著抑制^[20]。此外,血管生成抑制素也能以剂量依赖方式抑制胚泡在 FN 上的粘附和扩展并下调胚泡中 VEGF 及其受体 KDR 的表达^[21]。由此可见,血管生成抑制素通过干扰植入窗口期子宫和胚胎中 VEGF 通路以及 MMPs/TIMPs 系统的平衡从而抑制小鼠胚胎植入,并且,在胚泡上强烈表达的整合素 $\alpha\text{V}\beta 3$ 可能是介导血管生成抑制素作用的受体之一。上述研究结果表明,如果摸索出给药的适宜剂量和适宜时间,血管生成抑制素可能也是一种新型有效的避孕药。然而,由于体外合成血管生成抑制素的花费较为昂贵,采用基因治疗又无法控制血管生成抑制素 n 的表达,如何最方便有效的应用血管生成抑制素进行避孕治疗是首要解决的问题,相信随着研究的不断深入将为人类发展新型避孕药提供可能。

致谢 感谢中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室段恩奎研究员为本文提供其组内发表文章作为素材及在综述写作和修改过程中提出的宝贵意见。

参 考 文 献

- [1] Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, **33** : 357 ~ 369.
- [2] O'Reilly M S, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, **79** : 315 ~ 328.
- [3] Cao Y, Ji R W, Davidson D, et al. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, **271** : 29 461 ~ 29 467.
- [4] Cao Y. Antiangiogenic cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 2004, **14** : 139 ~ 145.
- [5] Cao R, Wu H L, Veitonmaki N, et al. Suppression of angiogenesis and tumor growth by the inhibitor K1-5 generated by plasmin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** : 5 728 ~ 5 733.
- [6] Gonzalez-Gronow M, Grenett H E, Gawdi G, et al. Angiostatin directly inhibits human prostate tumor cell invasion by blocking plasminogen binding to its cellular receptor, CD26. *Exp Cell Res*, 2005, **303** : 22 ~ 31.
- [7] Stack M S, Rinehart A R, Pizzo S V. Comparison of plasminogen binding and activation on extracellular matrices produced by vascular smooth muscle and endothelial cells. *Eur J Biochem*, 1994, **226** : 937 ~ 943.
- [8] Tarui T, Miles L A, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2001, **276** : 39 562 ~ 39 568.
- [9] Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, et al. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** : 5 579 ~ 5 583.
- [10] Zhang J, Cao Y J, Li F Y, et al. Effects of fibronectin, VEGF and angiostatin on the expression of MMPs through different signaling pathways in the JEG-3 cells. *Am J Reprod Immunol*, 2003, **50** : 273 ~ 285.
- [11] Moser T L, Stack M S, Asplin I, et al. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** : 2 811 ~ 2 816.
- [12] Moser T L, Kenan D J, Ashley T A, et al. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** : 6 656 ~ 6 661.
- [13] Wahl M L, Kenan D J, Gonzalez-Gronow M, et al. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *J Cell Biochem*, 2005, **96** : 242 ~ 261.
- [14] Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, et al. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J Cell Biol*, 2001, **152** : 1 247 ~ 1 254.
- [15] Wajih N, Sane D C. Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. *Blood*, 2003, **101** : 1 857 ~ 1 863.
- [16] Kang H T, Bang W K, Yu G. Identification and characterization of a novel angiostatin-binding protein by the display cloning method. *J Biochem Mol Biol*, 2004, **37** : 159

- ~ 166.
- [17] Chekenya M , Hjelstuen M , Enger P O , *et al* . NG2 proteoglycan promotes angiogenesis-dependent tumor growth in CNS by sequestering angiostatin. *FASEB J* , 2002 **16** : 586 ~ 588.
- [18] Chavakis T , Athanasopoulos A , Rhee J S , *et al* . Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment. *Blood* , 2005 , **105** : 1 036 ~ 1 043.
- [19] Smith S K. Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod* , 2000 , **15** : 59 ~ 66.
- [20] 赵田夫 张键 李晶等. 血管生长抑素抑制小鼠胚胎植入的最低有效剂量及其作用机理. *动物学报* , 2003 **49** (3) 332 ~ 338.
- [21] 赵田夫 张键 李晶等. 血管生长抑素在小鼠胚泡中的调节作用. *生物化学与生物物理进展* 2003 **30** : 778 ~ 782.