View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

[文章编号] 1007-385X(2006)04-0308-03

·综述·

血管内皮细胞生长抑制因子的研究进展

Research on vascular endothelial growth inhibitor: An update

陈彩霞[1]综述; 庄国洪[2]审阅 (1. 厦门大学生命科学学院; 2. 厦门大学医学院, 厦门 361005)

[摘 要] 血管内皮细胞生长抑制因子(vascular endothelial growth inhibitor, VEGI)是一种新型的血管内皮细胞生长抑制因子,属于TNF超家族,是Ⅱ型跨膜蛋白。重组VEGI不仅可以抑制内皮细胞增殖和诱导血管内皮细胞凋亡,而且可阻止新生血管生成,从而产生抗肿瘤生长的作用。VEGI作为一个内皮细胞产生的血管生成负调控因子可激活JNK、P38MAPA及胱冬肽,也可激活NF-κB,从而诱导内皮细胞的凋亡。VEGI的N段部分缺失可影响其生物活性,具有重要的病理生理意义,在肿瘤生物治疗方面有很大的应用前景。

[关键词] VEGI; TNF; 血管的发生; 顺式调节; 同工型
[中图分类号] R730.231 [文献标识码] A

血管内皮细胞生长抑制因子(vascular endothelial growth inhibitor, VEGI)是1997年Tan等[1]从表达序列标签(expressed sequenced tag, EST)库中寻找TNF和Fas配体的同源分子时发现的肿瘤坏死因子超家族的新成员。VEGI主要在内皮细胞中表达,也有认为VEGI可以在固有层淋巴细胞和浆细胞中表达[2]。VEGI有3种同工型,最早发现的$VEGI_{174}$又称为TL1,后来又发现了由全长基因序列编码的$VEGI_{251}$(TL1A)和$VEGI_{192}$,这3种同工型在结构和功能上均具有一定的差异。研究发现,VEGI可以和死亡受体3(death receptor 3, DR3)或诱骗受体3(decoy receptor 3, DcR3)结合,从而启动不同的信号转导通路,调节基因的表达,最终对肿瘤细胞产生不同的作用。故VEGI作为一个内源性的血管生成负调控因子,将在肿瘤治疗方面具有重要意义[3]。

1 VEGI及其受体

1.1 VEGI的结构

VEGI基因位于人染色体9q32,其cDNA由4.5 kb核苷酸组成,在5′和3′端均有长的非翻译区,其开放阅读框架为575个核苷酸,包含4个外显子和3个内含子。通过不同的剪切可形成$VEGI_{174}$、$VEGI_{251}$和$VEGI_{192}$ 3种同工型[4-5],它们具有共同的C端151个氨基酸残基片段。最先发现的$VEGI_{174}$,由174个氨基酸组成,包括细胞质内N末端12个非疏水性氨基酸,跨膜部分13个疏水性氨基酸和细胞质外C末段的149个氨基酸残基,与TNF家族的其他成员有20%~30%的同源性。$VEGI_{174}$完整分子可溶性差,不能诱导内皮细胞的凋亡。而N端缺失23个疏水性氨基酸的重组人可溶性VEGI($hVEGI_{151}$)却具有良好的抑制内皮细胞增殖的生物学效应。$VEGI_{251}$缺少N端信号肽序列,5′端附近含有一段疏水性跨膜区域,羧基端与TNF家族成员高度同源,可抑制癌细胞周围的内皮细胞增殖、减小肿瘤微血管的密度、诱导癌细胞凋亡。$VEGI_{192}$经纯化注射到C57BL/6小鼠中,对肿瘤生长有抑制作用,抑制率可达50%。

1.2 VEGI的受体DR3和DcR3

VEGI可以和DR3、DcR3结合。DR3属于TNFR超家族,主要在淋巴细胞中表达。当T细胞聚集在炎症部位时,DR3与VEGI结合会增强T细胞的扩增和促进分泌前炎症因子,从而使巨噬细胞和中性粒细胞集中到炎症部位。T细胞中,TL1A与DR3结合可以诱导NF-κB的活性并成为协同刺激信号,但不能诱导Caspase活性和T细胞凋亡。而存在CHX的条件下,TL1A与DR3却可以诱导肿瘤细胞株TF-1的Caspase活性和细胞凋亡。诱骗受体DcR3可与DR3竞争结合TL1A,降低T细胞对同源抗原的敏感性,从而保护肿瘤细胞免于凋亡。分析TL1A、DR3和DcR3在人类疾病中的表达,将会有助于解释这些分子在自身免疫、炎症、肿瘤的发生中所起的作用[6-7]。

2 VEGI的表达调节

2.1 VEGI基因启动子的顺式调节作用

Xiao等[8]经实验证明VEGI启动子中含有顺式调节元件,并进一步明确启动子中-312~-57区域对VEGI的表达起着关键的调节作用。该区域中存在一个NF-κB结合位点和3个线型排列的SP1结合位点。用NF-κB抑制子SN50或SP1抑制子MA对鼠大脑皮层细胞进行预处理,经RT-PCR观察VEGI mRNA的水平,结果SN50会削弱荧光蛋白酶的活性。说明NF-κB结合位点对VEGI的表达起着很重要的增强作用。另外,对该结合位点进行突变实验也进一步验证了这一结论。

2.2 TNF-α和IL-1对VEGI基因表达的诱导

IL-1和TNF-α可诱导VEGI的表达,且IL-1的诱导作

[基金项目] 厦门大学科研启动基金资助(NO. Z03103)
[作者简介] 陈彩霞(1981-),女,安徽宣城人,硕士生,主要从事肿瘤生物治疗的研究
[通讯作者] 庄国洪, E-mail: zhuangguohong@yahoo.com.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用大于 TNF-α。Kim 等[9]通过在人脐静脉内皮细胞（human umbilical vein endothelial cells, HUVEC）中加入 IL-1或 TNF-α，8 h后发现相应的 VEGI mRNA会分别增加 5倍和 2倍。电泳迁移率实验结果显示 TNF-α可以促进 NF-κB结合到 VEGI启动子同源序列上[10]，从而诱导 VEGI的表达。

3 VEGI的生物学功能

3.1 抑制血管内皮细胞增殖及新生血管的形成

$hVEGI_{151}$可直接抑制内皮细胞的增殖，且抑制作用在一定浓度范围内具有剂量依赖性，35 ng/mL的 $hVEGI_{151}$对 ECV304细胞的抑制率是 28%，浓度升高至 70 ng/ml时，抑制率也相应增加到 50%；体外培养单层汇合的血管内皮细胞 1∶2传代培养时，约 2 d生长至汇合状态；但如果加入 VEGI蛋白，即使浓度低至 17.5 ng/ml，1周后细胞仍不能生长至汇合状态，而没有 VEGI蛋白时，细胞则恢复原来的生长速度。但 100 ng/ml的 VEGI对 T细胞或骨髓基质细胞的增殖无影响，此结果显示 VEGI能特异性的抑制内皮细胞增殖，且抑制作用稳定持久，具有可逆性[11]。

在体外血管生成模型中，重组人 VEGI可明显抑制牛主动脉内皮细胞在胶原纤维中形成管样结构，IC_{50}值约为 30 ng/mL。在体内鸡胚尿囊膜新生血管实验中，VEGI可剂量依赖性抑制 FCF或 VEGF诱导的毛细血管生成。表现为：血管发育受阻，血管减少，以及血管变细。由此可见，无论为何种刺激血管生成的因素，VEGI均可通过抑制血管内皮细胞增殖来阻止新生血管的生成。

3.2 抗肿瘤作用

Zhai等[12]发现 VEGI抗肿瘤活性与其抑制新生血管形成密切相关。试验表明，重组 VEGI会剂量依赖性地抑制 S180实体瘤的生长，表现为瘤体积缩小甚至消失，防止了肉瘤侵犯皮肤形成恶性皮肤溃疡，明显延长 S180腹水瘤小鼠生存时间。另外，对肿瘤组织进行解剖或免疫组化染色均发现 VEGI组肿瘤微血管大大减少，而对照组血管丰富，可见 VEGI是通过抑制肿瘤血管形成而产生强大的抗肿瘤作用。

4 VEGI的作用机制及影响因素

4.1 激活 JNK、P38MAPK 及胱冬肽（caspase）

JNK、P38MAPK及胱冬肽（caspase）在细胞凋亡中起着重要作用。研究显示，VEGI可快速激活上述 3种细胞因子[13]。为了探讨 JNK和 P38MAPK在 VEGI诱导内皮细胞凋亡中的作用，将 c-Jun的缺陷形式或突变体转染牛肺动脉内皮细胞发现 VEGI诱导的凋亡下降 62.8%。另外，VEGI诱导的凋亡也被 P38MAPK的特异性抑制剂 SB203580所抑制，10 μmol/L SB203580抑制 VEGI诱导的凋亡率达 51%。免疫组化试验发现 Caspase-3在 VEGI处理的牛肺动脉内皮细胞中被激活，使多聚 ADP核糖多聚酶（PARP）降解。这些结果表明，VEGI诱导的凋亡依赖于 JNK、P38MAPK与 Caspase活性。

4.2 激活 NF-κB

激活 NF-κB是 TNF家族成员的特性之一。NF-κB的激活需要细胞质内异源二聚体 p50和 p65亚基与抑制性亚基 IκB分离，然后 p65亚基移入细胞核内与 DNA上的特异位点结合。通过电泳迁移率变动分析实验，发现 1 μg/ml VEGI处理 U-937细胞 12 h可提高 NF-κB与 DNA结合，并且 VEGI诱导 $I_{\kappa}B$的降解与 NF-κB p65亚基的核移位[14-15]。

4.3 诱导内皮细胞的凋亡

为了阐明 VEGI的作用机制，将 VEGI作用于牛肺动脉内皮细胞，透射电镜观察到明显的细胞凋亡的形态学变化，包括染色质浓缩和形成凋亡小体。此结果显示，诱导内皮细胞凋亡可能是 VEGI抗血管生成的一个重要机制。Jingyi Yu等[16]研究发现细胞周期本身对 VEGI的诱导细胞凋亡有一定的限制作用。将 VEGI加到不同阶段的细胞培养物中，发现 VEGI具有双重作用：使 G_0/G_1期细胞生长停滞，诱导 S期的细胞凋亡。研究人员认为这是因为 VEGI阻止了 PRB在 G_1晚期的过磷酸化和 c-myc基因的表达，从而使 PRB继续保持其对细胞的生长抑制作用，阻止 G_0/G_1期细胞进入晚 G_1期与 S期。另外，VEGI还可抑制细胞周期蛋白依赖激酶 CDK2、CDK4、CDK6的活性。只有在增殖状态的内皮细胞中，VEGI才诱导凋亡与激活 Caspase-3、JNK、P38MAPK，而在融合状态的细胞中无作用。

4.4 N段部分缺失影响 VEGI的生物活性

目前对 VEGI的研究尚处于初始阶段，有关其结构与功能方面的研究仍为空白。为了探讨 VEGI蛋白 N段对其活性的影响，将 VEGI与 TNF家族成员进行了基于结构知识的一级结构序列联配，并构建、表达 N端缺失 43与 51个氨基酸的突变体，N端缺失 43个氨基酸的 $VEGI_{131}$表达量占总菌体蛋白质的 25.2%，N端缺失 51个氨基酸的 $VEGI_{123}$表达量为 27.8%，纯化后纯度分别为 92.5%和 91.6%。$VEGI_{131}$可明显抑制 HUVEC增殖（IC_{50}约为 35 mg/L），而 $VEGI_{123}$在同样条件下几乎无抑制作用。野生型 VEGI即 N端缺失 23个氨基酸的 VEGI（$VEGI_{151}$）IC_{50}约为 27 mg/L。鸡胚绒毛尿囊膜血管生成实验证明，$VEGI_{151}$可使主血管数显著减少；$VEGI_{131}$可使主血管变细，毛细血管数减少；$VEGI_{123}$与对照组相比无明显变化。体内外研究显示 VEGI活性从高到低依次为：$VEGI_{151} > VEGI_{131} > VEGI_{123}$。结果提示：VEGI的 N端前 43个氨基酸对活性无明显影响，而第 44～51位氨基酸对其生物活性的发挥具有重要作用[16-17]，可能与受体结合位点相关。

5 结语

目前，研究人员根据 $VEGF_{165}$的结构合成了一种新的环状血管内皮细胞生长抑制因子——Cyclo-VEGI[18-19]。该因子在水溶液中呈 α-螺旋型式，可抑制碘化 $VEGF_{165}$结

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

合到细胞膜上,从而阻止新生血管的发生。在裸鼠和转基因小鼠中, CycloVEGI能有效地阻止脑神经瘤的生长,从而提高小鼠的存活率。另外,用工程学的方法将作用机制不同的抗血管生成抑制剂组合,构建双功能嵌合分子,目前已成为抗血管生成研究的新方向。PF-4 /CTF、CycloVEG I是血管生长抑制因子, PEX、PF-4 /DLR可以通过不同的信号转导途径抑制血管的生成和浸润。研究者将这 4种抑制因子两两重组成融合基因,然后在神经胶质瘤细胞中表达,发现融合蛋白可强烈抑制内皮细胞的增殖、诱导细胞凋亡,抑制效果更持久、有效,并且还可以抑制神经胶质瘤内皮细胞表达 $VEGF_{165}$,使肿瘤细胞因缺血而发生大量的凋亡[20]。将两基因融合,使表达的融合蛋白通过阻断新生血管生成的不同环节来提高治疗效果,这将为抗血管生成基因治疗提供新的思路。

[参 考 文 献]

[1] Tan KB, Harrop J, Reddy M, *et al.* Characterization of a novel TNF2 like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells[J]. Gene, 1997, 204(1-2): 35-46

[2] Bamias G, Martin C, Marini M, *et al.* Expression, localization, and functional activity of TL1A, a novel Th1-polarizing cytokine in inflammatory bowel disease[J]. J Immunol, 2003, 171(9): 4868-4874

[3] Metheny-Barlow LJ, Li LY. Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI), an endogenous negative regulator of angiogenesis[J]. Semin Ophthalmol, 2006, 21(1): 49-58.

[4] Chew LJ, Pan H, Yu J, *et al.* A novel secreted splice variant of vascular endothelial growth inhibitor[J]. FASEB J, 2002, 16(5): 742-744.

[5] Hou W, Medynski D, Wu S, *et al.* VEGI-192, a new isoform of TNFSF15, specifically eliminates tumor vascular endothelial cells and suppresses tumor growth[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(15): 5595-5602

[6] Migone TS, Zhang J, Luo X, *et al.* TL1A is a TNF-like ligand for DR3 and TR6/DcR3 and functions as a T cell costimulator[J]. Immunity, 2002, 16(3): 479-492

[7] Wen L, Zhuang L, Luo X, *et al.* TL1A-induced NF-kappaB activation and c-IAP2 production prevent DR3-mediated apoptosis in TF-1 cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(40): 39251-39258

[8] Xiao Q, Hsu CY, Chen H, *et al.* Characterization of cis-regulatory elements of the vascular endothelial growth inhibitor gene promoter[J]. Biochem J, 2005, 388(Pt 3): 913-920.

[9] Kim S, Zhang L. Identification of naturally secreted soluble form of TL1A, a TNF-like cytokine[J]. J Immunol Methods, 2005, 298(1-2): 1-8

[10] 王　路,潘　卫,朱分禄,等. 新型血管内皮细胞抑制因子VEGI151的基因克隆表达及其活性[J]. 生物化学与生物物理学报:英文版, 2000, 32(5): 485-489.

[11] 刘银萍,柳　林,潘　欣,等. Ad-VEGI151对人脐静脉内皮细胞增殖的影响[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(9): 1006-1008.

[12] Zhai Y, Ni J, Jiang GW, *et al.* VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas *in vivo*[J]. FASEB J, 1999, 13(1): 181-189.

[13] Yue TL, Ni J, Romanic AM, *et al.* TL1, a novel tumor necrosis factor-like cytokine, induces apoptosis in endothelial cells. Involvement of activation of stress protein kinases (stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase) and caspase-3-like protease[J]. J Biol Chem, 1999, 274(3): 1479-1486.

[14] Huang S, Robinson JB, Deguzman A, *et al.* Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8[J]. Cancer Res, 2000, 60(19): 5334-5339.

[15] Udalova IA, Richardson A, Denys A, *et al.* Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB-p50 binding to the TNF promoter region[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(24): 9113-9119.

[16] Yu J, Tian S, Metheny-Barlow L, *et al.* Modulation of endothelial cell growth arrest and apoptosis by vascular endothelial growth inhibitor[J]. Circ Res, 2001, 89(12): 1161-1167.

[17] 张　珉,王　路,王宏伟,等. 血管内皮细胞生长抑制因子N端部分缺失对生物活性的影响[J]. 生物化学与生物物理学报:英文版, 2003, 35(2): 133-137.

[18] Zilberberg L, Shinkaruk S, Lequin O, *et al.* Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor[J]. J Biol Chem, 2003, 278(37): 35564-35573.

[19] Goncalves M, Estieu-Gionnet K, Berthelot T, *et al.* Design, synthesis, and evaluation of original carriers for targeting vascular endothelial growth factor receptor interactions[J]. Pharm Res, 2005, 22(8): 1411-1421.

[20] Bello L, Lucini V, Costa F, *et al.* Combinatorial administration of molecules that simultaneously inhibit angiogenesis and invasion leads to increased therapeutic efficacy in mouse models of malignant glioma[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(13): 4527-4537.

[收稿日期] 2006-05-10　　[修回日期] 2006-07-06
[本文编辑] 郁晓路

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net