

血管新生及其意义

姜志胜¹ 综述, 唐朝枢² 审校

(1. 衡阳医学院心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001;

2. 北京医科大学第一临床学院心血管病研究所, 北京 100034)

[主题词] 血管新生; 影响因素; 治疗意义

[摘要] 血管新生是在原来存在的血管结构上长出新血管的生物学过程。成纤维细胞生长因子、血管内皮生长因子等许多因素均可刺激新生血管的形成。促进缺血组织血管新生已成为治疗血管闭塞性疾病的新策略, 并在实验研究及临床试验中取得良好效果。

[中图分类号] R364.3

[文献标识码] A

血管新生(angiogenesis)是在原来存在的血管结构上长出新血管的生物学过程,是由于细胞-细胞、细胞-基质及细胞-细胞因子相互作用的结果。成熟器官已形成的血管中,内皮细胞保持一种静止、非增殖状态。新血管网的形成极为

罕见,可一过性地发生于生殖周期的女性生殖器官中,受到严格的控制。在创伤、缺血、炎症、伤口愈合、肿瘤生长、糖尿病性视网膜病、风湿性关节炎、牛皮癣等许多病理条件下亦可发生新的血管形成(neovascularization)。血管新生包括以

下几个过程^[1]: 小血管(常常为毛细血管后静脉)基底膜和基质的降解,参与这一过程的有胶原酶、尿激酶型纤溶酶原激活物(urokinase-type plasminogen activator, uPA)等。④内皮细胞在趋化因子的作用下发生迁移,碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、白细胞介素(interleukin) 8 及 uPA 等对这一过程均具有促进作用。⑤内皮细胞增殖。在内皮芽生(sprouting)的基础上形成管腔(canalization)。芽生的管腔相互融合成环状血管分支,形成三维管状结构,允许血流通过。血管周细胞(pericytes)进一步构建血管结构。⑧血管周围基膜的形成。新生血管也可以通过第二种途径形成:在原先存在的血管管腔中长出柱状间质组织,随着这些柱状间质组织的继续生长和稳定,导致了血管腔的分隔及局部血管网的重建。若新生血管大于毛细血管,则血管平滑肌细胞也发生移行,并粘附至新形成的基质上。理论上讲,血管新生任何过程的变化都会促进或妨碍新血管的形成。现已提出诱导血管新生作为治疗冠状动脉和外周动脉粥样硬化引起的心肌和肢体缺血的一个新策略,在实验性心肌梗死、慢性心肌缺血和肢体缺血等的研究中,应用促血管新生疗法已取得较为理想的结果,并已开始临床试用。

1 血管新生的影响因素

1.1 刺激血管新生的因素

血管新生的过程受其刺激因素与抑制因素相互作用及新形成的血管网血流量的调节。文献[2]报道,冠心病病人心肌侧枝循环的形成常与冠状动脉的逐步阻塞有关。尽管这些病人侧枝循环的存在可改善临床症状,但其净效应不足以补偿冠状动脉阻塞造成的血流减少。侧枝血流通常未增加到恢复正常血流程度的原因尚不清楚。可能是由于冠状动脉内阻塞性动脉粥样病变的快速进展造成侧枝建立的时间滞后(time lag),或者是血管新生所需的细胞因子和其它局部因子的产生不足,亦可能是动脉粥样病变内皮对各种生长因子(如血管内皮生长因子和 FGF)的反应性降低。在许多血管新生刺激因素作用下(如缺氧、缺血、机械伸展和炎症等)内皮丝裂原及其膜受体增加。内皮丝裂原可来自心肌周围血管壁本身,缺血心脏中血管内皮生长因子^[3,4]及其两种酪氨酸激酶受体(flk-1 和 flt-1)^[4]增加 7 倍,其中,以心肌细胞及心肌内巨噬细胞中的血管内皮生长因子 mRNA 含量增加最多。同时,FGF 家族的某些成员(包括 bFGF 和 aFGF)及 FGF 受体^[5]的表达也增加。除缺血外,心肌伸展(左室功能不全时)也引起心肌中血管内皮生长因子表达的增加^[6]。目前,以 FGF 及血管内皮生长因子对血管新生调控的研究最受瞩目。

在 FGF 家族 9 种成员中,aFGF 和 bFGF 研究得最为广泛。FGF 能促进内皮细胞(endothelial cells, EC)、血管平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMC)等多种细胞的增殖,并具有一些重要的共同特征:与肝素高亲和性结合,高度的蛋白同源性,能与高亲和性受体结合启动酪氨酸激酶活性,也能与低亲和性、高容量受体(硫酸乙酰肝素蛋白聚糖)结合。FGF 与高亲

和性受体的结合受与低亲和性受体结合的调节。目前,至少已发现四种高亲和性 FGF 受体,并已克隆其 cDNA。除丝裂作用外,FGF 还能刺激内皮细胞产生一系列蛋白酶,包括纤溶酶原激活物和胶原酶,水解细胞外基质,有利于新生血管的形成与发展。

血管内皮生长因子为具有血管新生作用、也能增强血管通透性的肝素结合糖蛋白,值得注意的是血管内皮生长因子和 bFGF 对内皮细胞的增殖分化及血管新生具有协同效应。血管内皮生长因子产生于 SMC 等各种细胞,EC 具有血管内皮生长因子结合位点,但仅在缺氧时产生血管内皮生长因子。与其它生长因子不同,血管内皮生长因子的丝裂作用为内皮细胞特异性。通过对 mRNA 的不同剪切可产生四种血管内皮生长因子,它们与内皮细胞膜上硫酸肝素蛋白聚糖的结合能力各不相同,内源性血管内皮生长因子在胚胎及成人缺血时的血管发育中起一定作用;缺氧通过缺氧诱导因子 1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)介导的血管内皮生长因子 mRNA 转录增加、血管内皮生长因子 mRNA 稳定性的增加或血管内皮生长因子受体表达的增加^[7]而上调血管内皮生长因子的表达或其生物学效应。在人细胞上已发现两种酪氨酸激酶为高亲和性血管内皮生长因子受体:fms-like 酪氨酸激酶(Flt1)和激酶片段区域(kinase domain region, KDR or Flk1),敲除(knockout)这两种受体基因的胚胎于 9 天左右死亡;无 Flk-1(Flk-1 null)的胚胎几乎完全缺乏血管结构,无 Flt-1(Flt-1 null)的胚胎则血管系统紊乱、异常^[8]。这些资料表明在胚胎发育的早期,Flk-1 的作用较 Flt-1 更重要。近来,已发现内皮细胞特异性酪氨酸激酶受体家族的另一种配体 Flt-4,又称为血管内皮生长因子-C。这种因子氨基酸序列与血管内皮生长因子的具有 32% 的同源性,它不与 Flt-1 或 Flk-1 结合,可刺激培养于胶原凝胶中的牛内皮细胞的移行。

血管内皮生长因子及 FGF 受体的表达因血管床的不同而不同,并受缺血的影响(正常心肌中很少或无表达)。缺氧可刺激 FGF、PDGF 和血管内皮生长因子及其受体^[4,5]的表达,促进内皮细胞的生长。但血管新生亦可发生于供氧正常的组织,说明存在启动血管发育的另一种机制。

如前所述,缺血因其能诱导许多细胞因子及生长因子的表达而促进血管新生。此外,对血管新生起重要作用的另一个因素为炎症。动物实验表明,巨噬细胞和中性粒细胞等炎症细胞的存在足以引起血管新生,但炎症细胞的存在是否为血管新生所必需尚不清楚。心肌梗死后伴有淋巴细胞和巨噬细胞进入梗塞区,它们一方面可释放许多细胞因子,如转移生长因子 β (transfer growth factor- β , TGF- β)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和 IL-6,这些细胞因子都能刺激血管内皮生长因子表达;另一方面,还可释放血管内皮生长因子和各种 FGF。这些巨噬细胞来源的细胞因子及心肌来源的 bFGF 和血管内皮生长因子以及多种蛋白水解酶,如基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)、胶原酶(collagenases)和其它一些蛋白酶(组织型纤溶酶原激活物, uPA)等,为新的血管形成提供了良好的环境。研究发现实验性心肌梗死的边缘及局部坏死周围有大量的新生血管形成^[4]。作为

动脉粥样硬化病理过程的一部分,类似的炎症反应也可导致动脉粥样斑块中的新生血管形成。将血管内皮生长因子基因导入正常组织,在血管内皮生长因子表达区域周围出现炎症反应,并有新生血管形成,这进一步表明炎症反应与新生血管的产生密切相关。继发于血管内皮生长因子引起的血管通透性的增加而导致的炎症细胞在组织中的出现可能是新生血管形成所需要的刺激因素。而且,巨噬细胞上血管内皮生长因子受体的存在及血管内皮生长因子刺激巨噬细胞移行的能力可增加细胞因子的血管形成活性。相反,bFGF具有类似的丝裂作用而对血管通透性无影响。将bFGF注射于正常组织中,在无血管损伤的情况下,注射部位不发生或仅发生轻微的血管新生。上述实验结果表明,就引起血管新生来讲,血管内皮生长因子增加血管通透性及聚集炎症细胞的能力与其对内皮细胞的丝裂活性同等重要。

近年发现,angiopoietin、angiogenin、leptin、neuropeptide以及凝血因子、整合素等亦参与促进新生血管的形成过程^[9]。

1.2 抑制血管新生的因素

除刺激血管新生的因素外,体内尚存在抑制血管新生的因素。目前发现的血管形成抑制因子有以下几种:(1) Angiostatin^[10,11]:这是从荷瘤小鼠血清及尿液中分离获得的一种分子量38 kDa的蛋白质。它能抑制内皮细胞迁移、增殖,从而阻止新生血管的新成。(2) Endostatin^[12,13]:分子质量为20 kDa的蛋白质,可来自于肝细胞。天然及重组 endostatin均可抑制肿瘤血管生成及肿瘤生长。(3) Thrombospondin 1 (TPS-1):为一类四聚体糖蛋白,分子质量为140 kDa。血小板、巨噬细胞、成纤维细胞及血管平滑肌细胞等多种细胞均可产生TPS-1,后者通过与细胞基质相互作用而抑制血管新生。此外, fibronectin、prolactin、血小板因子-4、干扰素- α 、INF诱导蛋白-10等均有一定的抑制新生血管新成的作用。

2 治疗性血管新生

治疗性血管新生的概念首先由Hockel等于1993年提出。血管新生有益于心脏、脑、下肢、皮瓣、外周神经、骨和气管移植等许多缺血情况的改善,并可作为加速伤口愈合的一种新策略。肝素是最先应用于实验性冠状动脉及外周动脉疾病上诱导血管新生的血管活性因子。它也能加强其它因素启动的血管新生作用,促进侧枝循环的建立。随后对各种生长因子诱导的缺血性肢体及心脏治疗性血管新生进行了研究。外周血管新生的研究主要集中在切除股动脉后造成的兔后肢缺血模型上进行。在这种模型上,手术后不同时期可自然发生血管新生和侧枝循环的重建,使用生长因子可加速这一过程。体内应用生长因子的方法有多种。给急性心肌梗死的狗冠状动脉内注射bFGF两次,两周后发现,心肌梗死的面积显著缩小,缺血或梗塞心肌内毛细血管及小动脉的数目增加。猪急性心肌梗死后冠状动脉内应用bFGF也证实心肌内新生血管增多,但未发现左室功能有何改变。我们的研究发现^[14],兔急性心肌梗死后从静脉内多次注射bFGF,明显降低心肌梗死面积,并显著改善心功能;组织学检查亦显示缺血心肌内小血管的数目明显增加。bFGF缩小心肌梗死

面积的机制固然与该因子增加心肌细胞的存活力和对损伤的抵抗力^[15]、恢复缺血损伤的内皮依赖性血管舒张功能、开通原先存在的侧枝血管等有关,但更与其促进血管新生的作用密不可分。在慢性心肌或肢体缺血模型上应用bFGF及其它肝素结合生长因子也取得了良好的效果。而且,与急性缺血的研究不同(仅通过冠状动脉内注射给药),慢性缺血时可通过许多技术来维持bFGF的持续释放,已使用的方法有血管外给药(生长因子饱和的海绵, growth factor-saturated sponges)、持续释放聚合物(sustained-release polymers)、心包内注射(intrapericardial injections)和血管内给药(连续的冠状动脉内或左心房注射)等方式。此外,近来病毒介导的基因转染已作为一种血管形成生长因子释放的方法,应用于慢性缺血的动物模型上。

有报道,每天对慢性冠状动脉阻塞的狗从左心房或冠状动脉内注射bFGF(最多2 mg),持续4周,发现缺血心肌内血管数目增加,侧枝血流迅速改善^[16]。在猪慢性心肌缺血模型上,通过血管外肝素-藻酸盐缓释聚合物(extravascular slow-release heparin alginate polymer)于阻塞血管的外膜侧应用bFGF引起的血管新生,明显改善了左室及全心功能,且bFGF总的剂量(5 μ g)低于血管内给药所使用的剂量。在大鼠后肢缺血模型上,从股动脉缓慢给予外源bFGF增加了缺血肢体的血流,而肝素和鱼精蛋白减缓了侧枝循环形成的速度。肌成形术后应用bFGF可促进相应骨骼肌内毛细血管密度增高和肌肉功能的恢复^[17]。但是,应用bFGF动物与对照动物缺血肢体血流的差异仅存在于前3周,至第4周时,即无明显差别。

据报道,短期应用bFGF对侧枝形成的影响可持续6个月。有资料显示,狗慢性、单枝冠状动脉阻塞和成熟侧枝形成后,左房内重复给以bFGF不再引起血管新生^[18]。这说明全身性应用重组生长因子引起有效的血管新生需要缺血的存在。

成纤维细胞生长因子FGF家族其它成员在体内是否具有促血管新生效应尚不十分清楚。1991年,有学者利用狗慢性心肌缺血模型首次研究了aFGF对心血管疾病的治疗作用。局部应用aFGF导致了心内膜下梗塞区域内微动脉和小动脉血管平滑肌细胞的增生,但未见侧枝血管的形成。与单独使用肝素比较,将吸附天然aFGF的海绵置于心包表面以及向冠状动脉内或心房内连续注射天然aFGF均未取得好的效果;近来研究发现,使用半衰期延长的突变aFGF使猪缺血心肌的冠状动脉流量及心功能显著改善。对兔缺血后肢每天肌肉注射aFGF(股动脉切除11天后开始),持续10天,缺血肢体血管新生明显,远端动脉树结构重建,血液灌注改善。通过腺病毒介导的基因转染方法应用FGF-5,使缺血心肌血液灌流增加,正常及缺血区域毛细血管数目增多。

血管内皮生长因子(VEGF)因其对内皮细胞作用的特异性而广泛应用于实验性肢体及心肌缺血的研究。最早于1994年,Takeshita等人将兔股动脉切除,10天后向支配缺血区域的髂动脉注射血管内皮生长因子,30天后,两侧后肢血压及毛细血管密度增加。在同样动物模型上全身应用或局部肌肉注射血管内皮生长因子均取得了类似的效应^[19]。

将狗冠状动脉左旋枝逐步缩窄造成慢性心肌缺血, 10 天后从缩窄血管的远端每天注射血管内皮生长因子, 28 天后, 侧枝血流及心肌内直径超过 20 μm 的血管密度增加。也有报道, 从左房分别注射血管内皮生长因子和 bFGF^[20], 后者增加了缺血心肌侧枝血流, 前者对血流无明显影响。而同时动脉内注射 bFGF 和血管内皮生长因子在增加兔缺血后肢侧枝血管形成方面具有协同作用。此外, bFGF 和血管内皮生长因子均可增加猪慢性心肌缺血时血管的舒张反应, 这与它们各自酪氨酸激酶受体基因表达的增加有关^[5]。

总之, 全身或局部应用血管形成生长因子已成功诱导出血管新生。但是, 各种研究对这些生长因子的作用只作了短期观察(未超过 4~6 周), 长期效应尚待进一步探索。

此外, 激光心肌血管重建术(transmyocardial laser revascularization, TMLR)作为缺血性心脏病的一种新的治疗手段已逐渐应用于临床, 并取得了较好的疗效。据认为, 该法的长期疗效与其诱导缺血心肌血管新生有关。

3 问题与展望

尽管对血管闭塞性疾病进行治疗性血管新生疗法取得了良好的实验性及临床疗效, 但仍存在一些有待解决的问题, 例如: 血管新生的判断标准: 目前常用一些生理参数(如冠状动脉流量、全心和局部左室功能等)来评价血管新生的情况, 但这些参数没有一个能证实已发生新血管的形成。通过造影或计数微血管的数目可以直接证实血管分布的增加, 但不能区别新生的血管与重新开放的侧枝以及样品的差异。④生长因子的给药方式: 到目前为止尚未在生长因子给药方式或途径(血管内、冠状动脉内、局部心肌、基因转移等)方面开展比较研究以明确何者效果最为理想。⑤新生血管网的稳定性: 采用各种方式诱导产生的新生血管是否持久存在? 如果新形成的血管仅存在一段时间, 再次使用生长因子是否有助于防止其退化? 此外, 转基因方法的安全性以及新生血管形成对糖尿病性视网膜病的不良影响等问题均应给以高度重视。尽管存在种种问题, 可以相信, 随着研究的进一步深入, 促进缺血组织的血管新生疗法必将为临床缺血性疾病的治疗带来深刻的变革。

参考文献

- [1] Jain RK, Schlenger K, Hockel M, et al. Quantitative angiogenesis assays: progress and problems [J]. *Nat Med*, 1997, **3**: 1 203- 208
- [2] Shaper W, Ito W. Molecular mechanisms of collateral vessel growth [J]. *Circ Res*, 1996, **79**: 911- 919
- [3] Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, et al. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart [J]. *Am J Physiol*, 1994, **267**: H1948- 954
- [4] Li J, Brown LF, Hibberd MC, et al. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis [J]. *Am J Physiol*, 1996, **270**: H1803- 811
- [5] Sellke FW, Wang SY, Stamler A, et al. Enhanced microvascular

relaxations to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium [J]. *Am J Physiol*, 1996, **271**: H713- 720

- [6] Li J, Hampton T, Morgan J, et al. Stretch induced TGF- β release increases VEGF expression in the heart [J]. *Circulation*, 1996, **94**: 1- 285
- [7] Brogi E, Schattman G, Wu T, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression [J]. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 469- 476
- [8] Fong CH, Rossant J, Gertsenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium [J]. *Nature*, 1995, **376**: 66- 70
- [9] Laurence BJR, Patricia AD. Vascular development: cellular and molecular regulation [J]. *FASEB J*, 1997, **11**: 365- 373
- [10] Falcone DJ, Khan KM, Layne T, et al. Macrophage formation of angiostatin during inflammation [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 31 480- 485
- [11] Griscelli F, Li H, Bennaceur A, et al. Angiostatin gene transfer: inhibition of tumor growth in vivo by blockage of endothelial cell proliferation associated with a mitosis arrest [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 6 367- 372
- [12] Schuppan D, Cramer T, Bauer M, et al. Hepatocytes as a source of collagen type XV endostatin [J]. *Lancet*, 1998, **352**: 879- 880
- [13] Ding YH, Tavaehant K, Lo KM, et al. Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 10 443- 448
- [14] 姜志胜, 李夏, 陈魁, 等. 碱性纤维母细胞生长因子对实验性家兔急性心肌梗死的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**(2): 126- 129
- [15] Padua RR, Sethi R, Dhalla NS, et al. Basic fibroblast growth factor is cardioprotective in ischemic reperfusion injury [J]. *Mol Cell Biochem*, 1995, **143**: 129- 135
- [16] Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, et al. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart [J]. *Circulation*, 1995, **91**: 145- 153
- [17] Mannion JD, Magno MG, Spinale FG, et al. Basic fibroblast growth factor is associated with increased capillary density and preservation of muscle morphology in chronically stimulated ischemic muscle [J]. *Circulation*, 1996, **94**: 8: 1- 342
- [18] Shou M, Thirumurti V, Rajanayagam S, et al. Effect of basic fibroblast growth factor on myocardial angiogenesis in dogs with mature collateral vessels [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, **29**: 1 102- 106
- [19] Bauters C, Asahara T, Zheng LP, et al. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor [J]. *J Vasc Surg*, 1995, **21**: 314- 324
- [20] Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response [J]. *Circulation*, 1996, **94**: 1 074- 082

(此文 1999- 08- 10 收到, 2000- 02- 06 修回)

(此文编辑 胡必利)