

中医药对血管新生相关信号通路的影响

刘磊¹, 刘健², 万磊², 纵瑞凯², 曹云祥²

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 安徽中医药大学第一附属医院风湿科)

[摘要] 血管新生是机体常见的重要生理、病理过程,其过程涉及多种细胞、细胞因子及相关信号通路,多种疾病的发生发展均与血管新生密切相关。细胞因子通过信号转导通路调节血管新生相关细胞的迁移、增殖、凋亡影响血管新生。近年来对血管新生机制的最新研究表明,VEGF通路、Notch通路、PTEN/PI3K/AKT通路、JAK/STAT通路参与调节血管新生。中医药可通过调节信号转导通路调节血管新生,在治疗以血管新生为主要病变基础的疾病上取得了一定成绩。

[关键词] 血管生成调节剂;新生血管化,生理性;信号传导;中草药

中图分类号:R285;R331.3 文献标识码:A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2016.03.031

Effects of traditional Chinese medicine on angiogenesis related signaling pathway Liu Lei*, Liu Jian, Wan Lei, Zong Ruikai, Cao Yunxiang (* Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Corresponding author: Liu Jian, Email: liujianahzy@126.com.cn

[Abstract] Angiogenesis is a common and important process of physiological and pathological. The process involves a lot of cells, cytokines and related signaling pathways. The development of many diseases are closely related to angiogenesis. Cytokines can affect angiogenesis by signaling pathways to mediate migration, proliferation, apoptosis of angiogenesis-related cell. In recent years, new research about mechanism of angiogenesis shows that VEGF pathway, Notch pathway, PTEN/PI3K/AKT pathway, JAK/STAT pathway involved in regulating angiogenesis. Chinese medicine can be regulating angiogenesis by adjusting signal transduction pathways, and had made certain achievements in the treatment of angiogenesis-based diseases.

[Key words] Angiogenesis modulating agents; Neovascularization, physiologic; Signal transduction; Drugs, Chinese herbal

血管新生是机体常见的重要生理、病理过程,肿瘤组织生长、类风湿关节炎血管翳形成等病理变化,血管新生均涉及其中。血管新生过程涉及细胞(内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等)、细胞因子(生长因子、炎症因子、趋化因子等)、细胞外基质及多种信号转导通路,是各种因素、多个环节共同参与的

错综复杂的过程。中医药在治疗血管新生相关疾病上存在一定优势,现从血管新生相关信号转导通路及中医药对其调控方面进行概述。

1 血管新生过程

血管新生是指在原有血管床基础上的血管发芽,从现已存在的血管系统中形成新的血管是血管由少到多的过程,涉及到多种信号分子的共同参与^[1]。在组织缺血缺氧、炎症细胞浸润诱导及细胞因子如血管新生因子等多种因素的作用下,原组织微血管内皮细胞激活,合成释放如金属蛋白酶等可降解原血管基底膜,使原有血管基底膜及基底部发生降解,血管通透性增加。在多种生长因子及趋化因子的作用下血管内皮细胞穿过原血管壁发生迁移、增殖,形成芽生血管腔,新生血管芽相互融合形成血管网,趋化周围细胞进一步包裹构建血管结构^[2]。

基金项目: 国家临床重点专科中医风湿病科建设项目(财社[2013]239号); 国家中医药重点学科中医痹病学建设项目(国中医药发[2009]30号); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAI26B02); 安徽省重点实验室建设项目(1306c083035); 安徽省科技计划项目(11010402170)

作者简介: 刘磊, 博士在读, Email: dr_tcm_liu@126.com

通信作者: 刘健, 主任医师, 教授, 博士生导师, Email: liujianahzy@126.com.cn

血管新生过程是一系列调控因子共同作用的结果,如血管内皮生长因子(VEGF)结合 VEGFR-2 激活 p38MAPK 通路、RAS-MEK-ERK 通路、PI3K-Akt / PKA 途径促进内皮细胞的增殖、分化。转化生长因子 β (TGF- β)可激活 TGF- β /Smad 信号通路,可调节细胞核的转录活动,促进血管内皮细胞的增殖和迁移,诱导新生血管的形成。内皮抑素与整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 结合,可下调粘着斑激酶活性,影响 MAP 通路中 ERK1/P38 的磷酸化,抑制内皮细胞的迁移,血小板反应蛋白-1(TSP-1)可降低细胞凋亡相关蛋白 bcl-2 的表达,提高 bax 的表达进而抑制内皮细胞增殖,以构建新生的稳态血管结构^[3-4]。

2 血管新生信号通路

2.1 VEGF 信号通路与血管新生 VEGF 是由二硫键连接而成的二聚体糖蛋白,VEGF 家族有 VEGF-A、B、C、D、E、F 及胎盘生长因子(PlGF)7 个亚型。VEGF 主要有 VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3 3 种酪氨酸激酶受体及 NP-1、NP-2 两种非酪氨酸激酶的跨膜受体。VEGFR-1 主要表达于血管内皮细胞。VEGFR-2 表达于内皮细胞、单核细胞、干细胞。VEGFR-3 仅表达于成年期淋巴管内皮细胞及胚胎静脉内皮细胞。NP-1、NP-2 表达于神经轴突、血管内皮细胞及各种肿瘤细胞。VEGFR-2 与 VEGF 的亲合力虽低于 VEGFR-1,但 VEGFR-2 活化后产生的酪氨酸激酶生物效应更强,因此 VEGFR-2 在 VEGF 信号转导中起主导作用^[5]。VEGF 与 VEGFR-2 结合后形成二聚体,激活并将细胞膜/细胞质激酶级联反应信号传递到细胞核,通过抗凋亡等机制调节内皮细胞的存活,促进血管新生并维持其完整性。VEGFR-2 主要是通过 PLC- γ -PKC-Raf-MEK-MAPK 信号通路促进内皮细胞增殖。VEGFR-2 活化后磷酸化 PLC- γ ,增强水解 4,5 二磷酸磷脂酰肌生成 DAG、IP₃。DAG 是 PKC 的生理激活剂,而 IP₃可增加细胞内的钙离子浓度,介导生成 NO 与前列腺素影响血管通透性^[6]。VEGF 与 VEGFR-2 结合后可激活鸟嘌呤三核苷酸酶,最终可通过引起内皮细胞张力纤维中肌动蛋白的重塑,使内皮细胞迁移。通过黏附分子整合蛋白与其配体结合或 VEGF 与其受体结合后可激活黏着斑激酶 FAK,FAK 激活细胞内 MAPK、JNK 通路,进一步实现对细胞生长、凋亡、粘附及迁移的影响。研究表明佐剂性关节炎大鼠滑

膜组织 VEGF 表达水平与滑膜微血管计数及关节炎指数成正相关^[7],说明 VEGF 介导的血管新生与关节炎的发病密切相关。

2.2 Notch 信号通路与血管新生 Notch 信号通路是一种进化上高度保守的信号机制,是细胞之间直接作用的主要信号通路之一。Notch 信号通路由 Notch 受体(Notch1-4)、配体(Del11、Del14、Jagged1、Jagged2)和靶基因转录因子(HES1)等组成。Notch 家族是作为高度保守的跨膜蛋白,可以广泛调节细胞的发育和分化。Notch 信号通路是调控体内稳态和细胞分化的重要信号通路,Notch 信号由两个邻近细胞的 Notch 受体与配体相互作用而激活,释放出 Notch 的胞内段(NICD),NICD 在细胞核内与转录抑制因子 RBP-JK 结合、招募共活化物如组蛋白乙酰基转移酶 P / CBP 等,可活化分化拮抗基因的转录,表达产物与相应的分化效应基因的启动子特异性结合,并募集 Groucho/TLE 等转录共抑制因子,最终影响细胞的分化、增殖和凋亡^[8-9]。Notch 配体和受体在内皮细胞或周细胞及平滑肌细胞表达,提示 Notch 信号途径在血管发育中发挥重要作用。有研究表明敲除 Notch 配体 Del14 基因小鼠,其动脉血管内皮细胞 Del14 蛋白表达减少,小鼠可出现背主动脉血管狭窄闭锁或破裂、动脉分支缺陷等血管畸形的发生^[10],说明该信号途径涉及血管形成。使用 Del14/FC 融合蛋白、抗 Del14 体阻断异种移植瘤小鼠模型的 Notch-Del14 信号通路后可促进内皮出芽从而增加血管密度,但非功能血管增多,功能血管相对减少。研究发现缺失配体 Jagged1 将会激活 Notch 信号,而导致内皮细胞出芽减少从而抑制血管新生^[11]。尖细胞和茎细胞由内皮细胞分化而来,是具有高度迁移活性,其增殖可促进血管芽延伸、延长形成新血管管腔网络,而 Notch 信号通路及 VEGF 共同调控了内皮细胞向尖细胞和茎细胞分化的过程^[12]。Notch 信号激活可以限制管腔的扩大和血管萌芽,继而抑制血管新生;而通过阻断 Notch 信号可诱发血管内皮细胞增生,因此,可调控 Notch 号通路开放,抑制血管内皮细胞增生和凋亡,影响血管新生。

2.3 PTEN/PI3K/AKT 信号通路与血管新生 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT)信号通路在细胞的凋亡、存活、增殖等活动中发挥重要的生物

学作用^[13]。PI3K是由一个催化亚基 p110 和一个调节亚基 p85 构成的二聚体蛋白。PI3K 可将其分为 I、II、III 3 个亚型。在 PI3K 家族中,研究最广泛的是 I 型 PI3K。p85 亚基与蛋白激酶 C、RAS 等激活蛋白的相互作用,激活催化亚基 p110,从而活化 PI3K。PI3K 其主要通过在磷脂酰肌醇的肌醇环三位进行磷酸化产生胞内重要的第二信使—磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(PIP3)而发挥作用^[14]。Akt 是一种丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶,有三个家庭成员 AKT1、AKT2 和 AKT3。Ser473 和 (或) Thr308 位点的磷酸化是 Akt 激活的必要条件。活化的 Akt 通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白的表达,引起信号传导通路的级联反应,进而调节细胞周期蛋白,维持细胞存活与凋亡的动态平衡。活化的 AKT 可磷酸化内皮型一氧化氮合酶(eNOS)使之激活,产生 NO,NO 可刺激血管舒张、血管重塑和血管生成^[15]; PI3K/AKT 信号还可通过多种途径上调缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)^[16],HIF-1 α 可促进 VEGF 及其他血管生成因子的表达和分泌,VEGF 是一个强大的血管生成诱导剂,同时其本身又可活化 PI3K/AKT 信号通路,从而通过自分泌和旁分泌两种途径刺激血管生成;活化的 AKT 还可通过磷酸化 IKKs,使 I- κ B 降解,激活 NF- κ B,从而上调血管生成因子。PTEN 是 PIP3 的主要负性调节蛋白,其主要功能是使 PIP3 去磷酸化,从而拮抗 PI3K/AKT 通路的活化^[17]。PTEN 通过 PIP3 调节包括 AKT 在内的许多下游信号蛋白,过度表达 PTEN 或使用 PI3K 抑制剂可使 VEGF mRNA 表达减少。PTEN 抑制内皮细胞 VEGF 的主要受体 VEGFR2 与 PI3K 的结合。说明作为血管生成开关的调控轴心,PTEN/PI3K 的活性状态决定促进/抑制血管的生成,PTEN 通过抑制 PI3K/AKT 信号通路抑制血管形成,PTEN 表达缺失和 PI3K/AKT 通路的过度活化必然促进血管的新生。有研究表明佐剂性关节炎大鼠的滑膜组织及前列腺癌组织中微血管密度表达升高并与 PI3K/AKT 通路相关基因、蛋白的表达成正相关,亦证明该通路与血管新生密切相关^[18]。

2.4 JAK/STAT 信号通路与血管新生 JAK 激酶/信号传导与转录活化因子(JAK/STAT)信号通路是重要的信号转导途径之一,其广泛参与调节疾病的病理生理过程^[19]。JAK 家族是一类非跨膜型的酪

氨酸激酶,迄今为止共发现 4 个成员:JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2。JAK 家族有 7 个高度保守的功能结构区 JH1-JH7,JH1、JH2 起催化作用,JH3-JH7 的氨基端同源区域主要是受体结合区域。STAT 家族已发现有 7 个成员,分别为 STAT1-4、STAT5a、STAT5b、STAT6。JAK 激酶选择性地与跨膜细胞因子受体结合,诱导受体发生二聚化,激活 JAK 激酶启动磷酸化,随后招募一个或者多个 STAT。之后 JAK 催化 STAT 发生磷酸化,活化的 STAT 蛋白以二聚体的形式进入核内,与 DNA 靶序列特异性结合,调节相应基因表达,完成细胞因子介导的信号由胞外传至胞内的全过程。对体外内皮细胞实验证实^[20],抑制 STAT3 化能显著降低 VEGF 和 HIF-1 α 表达水平,同时 miRNA-9 能下调内皮细胞中的细胞因子信号转导抑制因子(SOCS5),激活 JAK/STAT 信号通路,增加内皮细胞迁移和增殖。有研究表明多种细胞因子(PDGF、PIGF)可通过 JAK/STAT 诱导了平滑肌细胞的增殖与迁移,与动脉粥样硬化病变密切相关,而抑制 JAK2/STAT3 信号通路可诱导平滑肌细胞凋亡。

3 中医药对血管新生信号通路的调节

许多疾病如类风湿关节炎、肿瘤等疾病的发病均伴随有血管新生,特别是微血管新生更是与疾病的发展、发展密切相关。在中医学传统理论“扶正祛邪”及“活血通络”理论指导下,结合辨病与辨证,中医药在治疗以血管新生为主要病变基础的疾病上取得了一定成绩。

3.1 中医药对 VEGF 通路的影响 有研究表明中药复方制剂新风胶囊(药物组成:黄芪、薏苡仁、雷公藤、蜈蚣)能有效降低 AA 大鼠足跖肿胀度、关节炎指数、滑膜微血管密度 MVD,该药物影响滑膜血管翳形成的主要机制与新风胶囊能有效降低 AA 大鼠滑膜 VEGF-A mRNA 的表达有关^[21]。临床研究证明消痰散结方^[22](药物组成:制南星、制半夏、枳实、陈皮、茯苓、全蝎、蜈蚣、土鳖虫、炙甘草)对胃癌患者胃癌组织、胃癌旁近端、胃癌旁远端组织微血管密度 MVD 和 VEGF-A/VEGF-2 有不同程度的下调作用,消痰散结方治疗胃癌的部分作用机制可能与其抑制 VEGF-A/VEGF-2 信号通路,降低微血管密度有关。

3.2 中医药对 Notch 通路的影响 研究表明蝎毒

多肽提取物^[23]可能通过抑制肿瘤微环境中 Notch1 和 Del14 的表达,从而发挥抑制肿瘤新生微血管功效。中药化痰消癥方^[24](药物组成:陈皮、半夏、半枝莲、猫爪草、鸡内金、紫丹参、薏苡仁、蒲黄粉、蒲公英)可显著改善胃癌前病变模型大鼠胃黏膜组织病理学状况,逆转癌前病变,其机制可能是通过下调 Notch1 表达,从而促使细胞增殖与凋亡的状态平衡有关。

3.3 中医药对 TEN/PI3K/AKT 通路的影响 有研究表明在肺腺癌移植瘤裸鼠模型中,瘤裸鼠脾、胃、肺组织中 PI3K, AKT 蛋白和基因表达增加,顺铂联合补中益气汤^[25](药物组成:黄芪、甘草、人参、当归、橘皮、升麻、柴胡、白术)可降低肺腺癌移植瘤裸鼠脾、胃、肺中 PI3K、AKT 蛋白及基因的表达,从而保护脾、胃、肺的功能,PI3K/AKT 信号通路上可能有补中益气汤作用的靶点。

3.4 中医药对 JAK/STAT 信号通路的影响 研究表明^[26]益气活血解毒方(药物组成:银花藤、黄芪、薏苡仁、南星、乳香、没药、川芎、归尾、赤芍、姜黄、生地黄、防风)能明显抑制胶原诱导性关节炎大鼠关节滑膜组织增生,缓解炎性渗出,并显著降低 CIA 大鼠血清中白细胞介素、基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP13,升高基质金属蛋白酶的抑制组织抑制剂(TIMP)1、TIMP3 的含量,益气活血解毒方能够抑制 IL-6 介导的 Jak/Stat 细胞信号通路活性,调节 MMP/TIMP 的失衡状态,抑制关节软骨及骨质的炎性损伤。

血管新生过程中涉及细胞因子网络如炎性细胞因子、生长细胞因子等互相交织,信号传导通路通过激酶相互联系和作用,不同信号通路之间信息交互作用存在的可能的“cross-talk”等因素决定了血管新生的繁琐复杂。这些因素决定了对疾病血管新生病变开展研究不能流于单一方法、角度、单种细胞的研究,应开展体内与体外实验相结合的实验研究,实验应采用先进的、不同层次检测方法,同时高度注重局部病变与整体的联系。

参考文献

[1] 倪伟,王浩宇,刘涛,等. Slit/Robo 信号在血管新生及内皮细胞迁移中作用的研究进展[J]. 心血管病学研究进展,2012,33(5):670-672.

[2] 孙艳,安永潼,尹蓓珮,等. 类风湿关节炎中血管新生

调节网络及其药物研究启发[J]. 中国免疫学杂志 2014,30(8):1148-1151.

- [3] 郝晓圆,李鸿斌. 类风湿关节炎与滑膜血管新生[J]. 医学综述,2014,20(14):2534-2536.
- [4] Lopez-Dee Z, Pidcock K, Gutierrez LS. Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation [J]. *Mediators Inflamm*,2011: 296069
- [5] 达古拉,李鸿斌. 血管内皮细胞生长因子与类风湿关节炎发病机制及其治疗的相关性[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志,2012,6(1):55-59.
- [6] 康从民,王大伟,吕英涛,等. 血管内皮生长因子受体-2 所介导信号通路的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2009,36(10):1267-1274.
- [7] 张晓军,刘健,万磊,等. 佐剂关节炎大鼠滑膜血管新生与 PTEN/PI3K/AKT 信号传导通路的关系[J]. 中医正骨杂志,2015,28(1):71-74.
- [8] Plalaga T, Minter LM. Notch signaling and its emerging role in autoimmunity[J]. *Front Biol*,2012,5(5):1-16.
- [9] 付亚娟,叶枫,吕卫国,等. Notch 信号通路的研究现状[J]. 医学分子生物学杂志,2007,4(5):447-450.
- [10] Segarra M, Williams CK, Sierra Mde L, et al. DLI4 activation of Notch signaling reduces tumor vascularity and inhibits tumor growth [J]. *Blood*, 2008, 112(5):1904-1911.
- [11] Holderfield MT, Hughes CC. Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transfor growth factor-beta in vascular morphogenesis [J]. *Circ Res*, 2008, 2(6):637-652.
- [12] Jubb AM, Soilleux EJ, Turley H, et al. Expression of vascular notch ligand delta-like 4 and inflammatory markers in breast cancer[J]. *Am J pathol*,2010,176(4):2019-2028.
- [13] Bhattacharya D, Singh MK, Chaudhuri S, et al. T11TS impedes glioma angiogenesis by inhibiting VEGF signaling and pro survival PI3K/AKT/eNOS pathway with concomitant upregulation of PTEN in brain endothelial cells[J]. *J Neurooncol*,2013,113(1):13-25.
- [14] Germena G, Hirsch E. PI3Ks and small GTPases in neutrophil migration: Two sides of the same coin [J]. *Mol Immunol*,2013,55(1):83-86.
- [15] Crociani O, Zanieri F, Pillozzi S, et al. hERG1 channels modulate integrin signaling to trigger angiogenesis and tumor progression in colorectal cancer [J]. *SCI*,2013,25(3):3-10.
- [16] Gordan JD, Simon MC. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype [J]. *Curr Opin Genet*