

文章编号:1005-6947(2006)12-0952-03

·综述·

# 血管内皮生长因子治疗下肢缺血性疾病的研究进展

方伟 综述 郭曙光 审核

(解放军昆明总医院 血管外科, 云南 昆明 650032)

**摘要:** 单独使用血管内皮生长因子(VEGF)基因治疗下肢缺血性疾病的研究由来已久,目前尚无满意疗效。目前已证实血管内皮前体细胞(EPC)可定向分化血管内皮细胞并能形成新生血管,其中VEGF在EPC定向分化、体内动员、体外扩增及转染EPC后定向移植治疗周围缺血性疾病等过程中发挥重要作用。笔者对VEGF在基因治疗、细胞治疗和基因转染细胞治疗下肢缺血性疾病的研究进展综述如下。

**关键词:** 血管内皮生长因子/治疗应用; 动脉硬化, 闭塞性/治疗; 血栓性脉管炎, 闭塞性/治疗; 下肢; 综述文献

中图分类号: R654.4; Q658.3

文献标识码: A

慢性周围血管闭塞性疾病(PCOD)如下肢动脉硬化闭塞症(ASO)、血栓闭塞性脉管炎(TAO)、糖尿病足等患者逐年增多。当病情加重而无法进行血流重建(bypass)、血管成形(angioplasty)等方法治疗时,患者往往面临截肢的危险。近年来治疗性血管新生(therapeutic neovascularization)的兴起,提供了治疗此类疾病的新思路。血管内皮生长因子(VEGF)作为特异性血管生长因子,在治疗性血管新生中起着重要作用。

## 1 VEGF与血管新生

血管新生(angiogenesis)是指已经存在的血管通过出芽延伸,或通过融合等方式进一步增生、扩展,形成成熟血管网的过程。一般包括血管基底膜、细胞外基质降解;血管内皮细胞增殖、迁移;新生血管丛形成;血管

外周壁细胞聚集;血管周围基质形成;血管网的重塑与修剪。治疗性血管新生(therapeutic angiogenesis)是指将外源性血管新生诱导因子转入组织中增强缺血区的侧支血管新生。VEGF作为最有效的促血管生长因子之一,其作用主要体现在:(1)VEGF作用于血管新生的全过程,包括血管形成初始期(initiation)、进展期(progression)、及成熟-终末期(maturation-termination);(2)多种促血管生长因子如血小板源性生长因子(PDGF)、间质细胞源性因子(SCDF)、肿瘤坏死因子(TNF)等通过增强VEGF的表达起作用<sup>[1-3]</sup>。

## 2 VEGF蛋白治疗

由于VEGF在体内的半衰期短(<3min),利用VEGF蛋白制剂治疗需反复多次给药,不仅价格昂贵且不方便。随着载体控释技术研究的日趋成熟和工艺技术的进步,研究者更青睐于使用载体缓释VEGF的方法促进血管新生。目前常用的控释载体主要有水凝胶、支链淀粉凝胶、胶原基质、肝素、藻酸盐等。Gu等<sup>[4]</sup>将VEGF包入藻酸钙微球内,发现以6ng·mL/(L·d)速度VEGF可持续释放2周,分别通过在磷酸盐缓冲液和血清中释放比较,发现在血清中释放速度快于磷酸盐缓冲

液,可能是因为血清减少了藻酸盐与VEGF之间的静电作用的原因。Sun等<sup>[5]</sup>采用气体发泡技术和微粒滤过的方法将VEGF165加入聚丙烯交酯和聚乙烯交酯(比例85:15)制成的可降解复合材料中,置入后下肢缺血小鼠体内持续缓慢释放,结果治疗组缓释的VEGF显示了较为明显的血管生成作用。

## 3 VEGF基因治疗

1996年,Tsurumi等<sup>[6]</sup>将编码VEGF基因的裸露质粒DNA直接注入缺血兔模型后肢肌肉内,30d后造影显示缺血肢体侧支循环明显增多,内收肌和腓肠肌内毛细血管密度提高,并通过组织学检验出标记VEGF表达的蛋白。同年Takeshita等<sup>[7]</sup>报道了经气囊导管将含VEGF165质粒输送到兔缺血后下肢髂动脉内,取得了相似的效果。

Isner<sup>[8]</sup>率先将VEGF基因治疗肢体缺血用于临床试验。1996年该试验小组用hVEGF165质粒DNA涂于球囊导管表面,经股动脉将输送到一位慢性下肢动脉缺血患者腘动脉远端,扩张球囊转染病变区血管壁细胞,12周后患肢血流灌注增加,患者缺血症状改善。Baumgartner等<sup>[9]</sup>用phVEGF质粒

**基金项目:** 云南省自然科学基金资助(2004C0023Q)。

**收稿日期:** 2006-09-30;

**修改日期:** 2006-11-06。

**作者简介:** 方伟,男,湖北枝江人,解放军昆明总医院主治医师,主要从事外周血管疾病诊治。

**通讯作者:** 方伟 E-mail: chief7198@sinan.com。

DNA 局部肌注治疗因肢体缺血引起顽固性溃疡或静息痛患者 9 例共 10 条肢体,踝肱指数 (ABI) 由治疗前平均 0.33 增加至治疗后平均 0.48,7 条肢体经造影显示有明显侧支血管形成,8 条肢体远端输出道血流增强。7 处溃疡面有 4 处愈合或明显缩小,包括 3 例准备截肢的患者。Kusumanto 等<sup>[10]</sup>。用同样的办法将 VEGF 基因注入糖尿病足患者小腿肌肉内,缺血区域侧支血管增生明显。

VEGF 基因治疗目前有 3 种载体:裸露质粒 DNA,脂质体 DNA 和病毒载体 DNA。前两种转染简便易行,但转染效率低,表达持续时间短。病毒载体主要是逆转录病毒和腺病毒。逆转录病毒转染效率较腺病毒低,且只能转染分裂细胞;腺病毒转染后 VEGF 基因不整合入宿主的基因组 DNA,可持续表达几周至数月。但可能引起的免疫反应及毒副作用是其切点。基因输送方式主要为肌肉注射及经导管腔内输送。近年来有研究者<sup>[11-13]</sup>利用物理技术如超声波、离子照射、磁场作用等增强 VEGF 基因促血管新生的试验研究,均取得了较理想的效果。(1) 超声波辅助治疗:Barzelai 等<sup>[11]</sup>用低强度超声波 ( $0.05 \text{ W/cm}^2$ ) 照射的缺血小鼠后下肢,3 周后中等缺血组小鼠缺血组织血流灌注明显提高,组织切片 VEGF-mRNA 表达明显增强。(2) 离子照射:Heissig 等<sup>[12]</sup>通过低剂量 (6.5 Gy) 离子照射缺血小鼠,刺激肥大细胞向缺血区定向移动,并通过肥大细胞分泌 VEGF,促进缺血区域的血管再生。(3) 磁场作用:Jiang 等<sup>[13]</sup>用包裹含 VEGF DNA 裸质粒的磁性纳米微粒子经动脉注入后下肢缺血小鼠体内,通过外在磁场使微粒子在肢体缺血区富集,促进血管再生,改善肢体缺血。

## 4 VEGF 与细胞治疗

目前已证实血管内皮前体细胞 (EPC) 可定向分化血管内皮细胞并能形成新生血管,其中 VEGF 在 EPC 定向分化、体内动员、体外扩增及转染 EPC 后定向移植治疗周围缺血性疾病等过程中发挥重要作用。

1998 年 Shi 等<sup>[14]</sup>用免疫磁珠的方法从骨髓中分离出人 CD34<sup>+</sup> 细胞,置

于涂有纤连蛋白/明胶的塑料平板上培养 1d 后,弃去贴壁细胞,收集悬浮细胞,以去除可能含有的成熟内皮细胞。将悬浮细胞用含有 VEGF 的培养基培养 15~20d 后,形成快速增殖的贴壁细胞集落。这些细胞具有内皮细胞的特征,包括能摄取 AcLDL, vWf 因子组化染色阳性、表达 flk-1 等。Gehling 等<sup>[15]</sup>将外周血分离得到的 CD133<sup>+</sup> 细胞,在 VEGF 等生长因子诱导下分化为内皮细胞。

使骨髓中 EPC 尽可能多出现于外周血中,这个过程就是 EPC 的动员。VEGF 是 EPC 高效的外源性动员剂。Isner 试验小组<sup>[16]</sup>将小鼠腹腔内注射可溶性 VEGF,每天 1 次,连续 1 周。VEGF 处理的第 1 天,外周血 EPC 细胞数是未处理的 254%,第 4 天达到最高值,是未处理的 375%。接着,研究者损伤了小鼠的角膜,发现 EPC 参与了受损角膜新血管的形成。与未动员的对照相比,VEGF 动员后有更多的 EPC 参与了血管形成。

慢性肢体缺血患者中,高龄、合并糖尿病、高脂血症者偏多。由于 EPC 数量的减少和内皮细胞功能紊乱,治疗前常需对 EPC 进行体外培养扩增。Kalka 等<sup>[17]</sup>将分离出的人外周血 EPC 在含 VEGF 等多种生长因子的培养剂中培养 7~10d, EPC 数量可增加 80~90 倍。将扩增后的 EPC 移植于无胸腺小鼠缺血后肢,明显增加后肢缺血量和微血管密度。

由于 EPC 自体移植具有容易获取、操作简单、无免疫排斥性、定向移植于血管生成部位等特点,因此 EPC 是基因治疗理想的导向载体。Iwaguro 等<sup>[18]</sup>在体外将 VEGF 基因转染 EPC,自体移植急性后腿缺血的小鼠模型,这些表型改变后的 EPC 在增殖、黏附、聚集及激活缺血组织内皮细胞等功能上大大增强。并可通过自分泌效应,即 EPC 分化的内皮细胞分泌的 VEGF 与内皮细胞膜上的受体 flk-1/KDR、flt-1 结合,促进内皮细胞增殖、迁移、重塑,形成新生血管。研究表明,与对照组相比,转基因缺血小鼠截肢率下降了 63.7%,而同单独 EPC 移植取得同样改善供血效果,所需 EPC 数量下降了 30 倍。

## 5 存在问题与展望

VEGF 促血管新生希望与风险并存。VEGF 的一些常见的副作用,如诱导 NO 释放,引起短暂性低血压;增加血管通透性,导致组织水肿;VEGF 的应用还可能对病理性血管生成起作用,引发或加重肿瘤、增殖性视网膜等疾病病变发展。最近越来越多的证据表明,VEGF 与动脉粥样硬化的进展和斑块不稳定性有密切关系。主要因粥样硬化的动脉管壁中缺氧区的存在,刺激 VEGF 表达增强,引起粥样斑块内血管增生活跃。这些新生血管管壁脆弱,易渗漏。破裂出血形成小血栓,血栓形成过程中产生的凝血酶,可刺激血管平滑肌迁移、增殖。另外新生血管渗漏的白蛋白、纤维蛋白原可促进斑块的生长,引起炎症细胞的浸润和炎症反应的发生,增加其不稳定性<sup>[19]</sup>。

国外学者<sup>[20-22]</sup>研究证实慢性肢体缺血患者的缺血组织内 VEGF 的表达并无代偿增强甚至减弱,而 VEGF 基因注射缺血肌肉后可增强肌红蛋白表达,提高肌肉氧合能力。这些直接的证据为 VEGF 治疗慢性肢体缺血提供了很好的前景,但远不能达到临床安全而有效的治愈标准。恶性实体肿瘤的生长同肢体缺血一样同样存在一个缺血缺氧的环境,肿瘤细胞能通过表达 VEGF 等促血管新生因子形成大量新生血管,造成肿瘤快速增长甚至转移<sup>[23-24]</sup>。能否将 VEGF 转染至肌肉内经证实存在的多能性成人祖细胞 (multipotential adult progenitor cell, MAPC), 通过 VEGF 表达既促进缺血肢体内血管新生,又促进肌肉组织修复而治疗此类疾病呢<sup>[25]</sup>另外骨髓中还存在另外一种能分化成内皮细胞的多能性前体细胞,即骨髓间充质干细胞 (MSC), 能否作为 VEGF 基因转染的细胞载体,进行治疗性血管新生,也是值得关注的问题。

### 参考文献:

- [1] Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, et al. Essential role of PDGFR $\alpha$ -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor an-

- giogenesis in vivo; role of PDGFRalpha during angiogenesis [ J ]. *Circ Res*, 2004, 94 ( 9 ): 1186 - 1194.
- [ 2 ] Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, *et al.* Gene transfer of stromal cell-derived factor-1 alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization [ J ]. *Circulation*, 2004, 109 ( 20 ): 58 - 66.
- [ 3 ] Sugano M, Tsuchida K, Makino N. Intramuscular gene transfer of soluble tumor necrosis factor-alpha receptor 1 activates vascular endothelial growth factor receptor and accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia [ J ]. *Circulation*, 2004, 109 ( 6 ): 797 - 782.
- [ 4 ] Gu F, Amsden B, Neufeld R. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads [ J ]. *J Control Release*, 2004, 96 ( 3 ): 463 - 472.
- [ 5 ] Sun Q, Chen RR, Shen Y, *et al.* Sustained vascular endothelial growth factor delivery enhances angiogenesis and perfusion in ischemic hind limb [ J ]. *Pharm Res*, 2005, 22 ( 7 ): 1110 - 1116.
- [ 6 ] Tsurumi V, Takeshita S, Chen D, *et al.* Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor segments collateral development and tissue perfusion [ J ]. *Circulation*, 1996, 94 ( 12 ): 3281 - 3290.
- [ 7 ] Takeshita S, Weir L, Chen D, *et al.* Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hind limb ischemia [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 227 ( 2 ): 628 - 635.
- [ 8 ] Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, *et al.* Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of ph-VEGF165 in patient with ischemic limb [ J ]. *Lancet*, 1996, 348 ( 9024 ): 370 - 374.
- [ 9 ] Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, *et al.* Constitutive expression of ph-VEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia [ J ]. *Circulation*, 1998, 97 ( 12 ): 1114 - 1123.
- [ 10 ] Kusumanto YH, van Weel V, Mulder NH, *et al.* Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial [ J ]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17 ( 6 ): 683 - 691.
- [ 11 ] Barzelai S, Sharabani-Yosef O, Holbova R, *et al.* Low-intensity ultrasound induces angiogenesis in rat hind-limb ischemia [ J ]. *Ultrasound Med Biol*, 2006, 32 ( 1 ): 139 - 145.
- [ 12 ] Heissig B, Rafii S, Akiyama H, *et al.* Low-dose irradiation promotes tissue revascularization through VEGF release from mast cells and MMP-9-mediated progenitor cell mobilization [ J ]. *J Exp Med*, 2005, 202 ( 6 ): 739 - 750.
- [ 13 ] Jiang H, Zhang T, Sun X. Vascular endothelial growth factor gene delivery by magnetic DNA nanospheres ameliorates limb ischemia in rabbits [ J ]. *J Surg Res*, 2005, 126 ( 1 ): 48 - 54.
- [ 14 ] Shi Q, Rafii S, Wu MH, *et al.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells [ J ]. *Blood*, 1998, 92 ( 2 ): 362 - 367.
- [ 15 ] Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, *et al.* In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells [ J ]. *Blood*, 2000, 95 ( 10 ): 3106 - 3112.
- [ 16 ] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization [ J ]. *Circ Res*, 1999, 85 ( 3 ): 221 - 228.
- [ 17 ] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, *et al.* Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 ( 7 ): 3422 - 3427.
- [ 18 ] Iwaguro H, Yamaguchi JI, Kalka C, *et al.* Endothelial progenitor cells vascular endothelial growth factor transfer for vascular regeneration [ J ]. *Circulation*, 2002, 105 ( 6 ): 732 - 738.
- [ 19 ] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [ J ]. *Nature*, 2002, 420 ( 6917 ): 868 - 874.
- [ 20 ] Palmer-Kazen U, Wariaro D, Luo F, *et al.* Vascular endothelial cell growth factor and fibroblast growth factor 2 expression in patients with critical limb ischemia [ J ]. *J Vasc Surg*, 2004, 39 ( 3 ): 621 - 628.
- [ 21 ] Tuomisto TT, Rissanen TT, Vajanto I, *et al.* HIF-VEGF-VEGFR-2, TNF-alpha and IGF pathways are upregulated in critical human skeletal muscle ischemia as studied with DNA array [ J ]. *Atherosclerosis*, 2004, 174 ( 1 ): 111 - 120.
- [ 22 ] Van Weel V, Deckers MM, Grimbergen JM, *et al.* Vascular endothelial growth factor overexpression in ischemic skeletal muscle enhances myoglobin expression in vivo [ J ]. *Circ Res*, 2004, 95 ( 1 ): 58 - 66.
- [ 23 ] 洪士开, 李绍森, 陆云飞, 等. VEGF-C 和 MMP-7 的表达与胃癌侵袭转移的关系 [ J ]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15 ( 2 ): 90 - 93.
- [ 24 ] Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q, *et al.* Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12 ( 26 ): 4241 - 4245.
- [ 25 ] Huss R, Heil M, Moosmann S, *et al.* Improved arteriogenesis with simultaneous skeletal muscle repair in ischemic tissue by SCL ( + ) multipotent adult progenitor cell clones from peripheral blood [ J ]. *J Vas Res*, 2004, 41 ( 5 ): 422 - 431.