

目 录

第一章 血管新生概述 /1

- 一、血管新生的概念 /1
- 二、血管新生研究的发展 /1
- 三、血管新生研究的基本内容 /4
- 四、生理和病理条件下机体的血管新生方式 /10

第二章 血管内皮细胞生成因子（VEGF）与血管新生 /15

- 一、血管内皮细胞生成因子（VEGF）概述 /15
- 二、VEGF 及其受体参与血管新生的作用机制 /23

第三章 促血管生成素（Ang）与血管新生 /32

- 一、促血管生成素（Ang）概述 /32
- 二、Ang 及其受体参与血管新生的作用机制 /41

第四章 血小板源性生长因子（PDGF）与血管新生 /51

- 一、血小板源性生长因子（PDGF）概述 /51
- 二、PDGF 及其受体参与血管新生的作用机理 /60

第五章 肿瘤坏死因子（TNF- α ）与血管新生 /68

- 一、肿瘤坏死因子（TNF- α ）概述 /68
- 二、TNF- α 和其受体的生物学作用及作用机制 /73

第六章 缺氧诱导因子 (HIF-1) 与血管新生 /94

- 一、缺氧诱导因子 (HIF-1) 的分子生物学结构 /94
- 二、HIF-1 的活性调节 /95
- 三、HIF-1 的靶基因和其对靶基因的调控作用 /99
- 四、HIF-1 的生物学作用 /105

第七章 成纤维细胞生成因子 (FGF) 与血管新生 /116

- 一、成纤维细胞生成因子 (FGF) 概述 /116
- 二、FGF 的主要生物学功能 /123

第八章 胰岛素样生长因子 (IGF-1) 与血管新生 /135

- 一、胰岛素样生长因子 (IGF-1) 概述 /135
- 二、IGF-1 促血管新生的生物学作用 /135

第九章 基质细胞衍化因子 -1 (SDF-1) 及其受体趋化因子受体 4 (CXCR4) 与血管新生 /144

- 一、基质细胞衍化因子 -1 (SDF-1) 及其受体趋化因子受体 4 (CXCR4) 概述 /144
- 二、SDF-1/CXCR4 与血管新生 /153

第十章 肝细胞生长因子 (HGF) 与血管新生 /165

- 一、肝细胞生长因子 (HGF) 概述 /165
- 二、HGF 促血管新生的生物学作用 /167

第一章 血管新生概述

一、血管新生的概念

血管新生是在原有毛细血管或微静脉基础上通过血管内皮细胞（endothelial cells, ECs）增殖和迁移，从已存在的血管中以出芽（sprouting）或非出芽（套叠，intussusception）方式生成新的血管。血管新生主要有两种方式：出芽和套叠式血管新生。出芽式血管新生是指新生的毛细血管在原血管的基础上发芽，呈线性长出，毛细血管尖端指向刺激源；套叠式血管新生是指微动静脉或毛细血管中相对管壁内皮细胞向管腔内突伸并相互连接，形成内皮细胞双分子层，接着细胞外基质在双分子层和基底膜中心穿孔，间充质中细胞长入形成微柱（pillor），继而周细胞使微柱增粗，最终在此结构的基础上微柱不断增多、融合，把原血管纵向一分为二。

二、血管新生研究的发展

（一）套叠式血管新生研究的发展

套叠式血管新生综合不同时期套叠式血管新生研究的主要内容、使用的主要技术、研究的主要进展把套叠式血管新生的研究分为三个阶段：推测阶段、实验证明阶段和机制研究阶段。

套叠式血管新生的研究有20多年的历史。但早在19世纪末20世纪初，许多微循环系统的观察者已详细给出了带有微孔的毛细血管网的示意图。20世纪中期Shoat首次把带有微孔的毛细血管网和毛细血管床的扩大联系起来，认为通过增加毛细血管间空间的数量可以扩大毛细血管床。遗憾的是当时他的假设没有得到进一步的论证，仅停留在陈述阶段，在结构和功能方面没有进一步的阐述。70年代后期和80年代前期，不同器官和机体中微血管结构的微孔已经有大量的报道。直至1986年Caduff等在发育肺的薄壁组织微血管中发现许多微孔，推测它们由血管套叠而来，因此命名为套叠血管新生（intussusceptional angiogenesis）。

直至1990年Burri和Tarek通过计算机辅助技术三维重构毛细血管腔证实

了Caduff等的推测，并修正为套叠微血管生长（intussusceptive microvascular growth）。这仅仅是套叠发展的初始阶段，因为真实的微柱如何产生必须通过体内观察才能知道。后来Patan等较多的研究者把小鸡绒毛尿囊膜（CAM）的胚胎发育作为活体观察的模型。首先通过实验粗略的观察内皮细胞、上皮细胞的连接，证明CAM适合体内观察套叠式毛细血管新生，然后以CAM为实验模型详细观察套叠式微血管生长过程中微柱的形成。主要观察微柱形成过程中内皮细胞的形态，微柱中主要的细胞成分及内皮细胞周边细胞的作用。同期研究者对动物生长过程中各器官微血管的新生方式进行了研究，如心肌、胃、肝、肾小球、脉络膜、肠黏膜、肝脏、脑、骨骼肌等器官，在它们的生长过程皆发现了套叠式血管新生，其中脑、骨骼肌、肝脏、心肌中套叠现象较少。

21世纪初期，较多的研究证明一些器官（CAM、肾）和动物体中毛细血管网络的扩大依赖于套叠式微血管生长，同时也发现了套叠式树枝状分支（intussusceptive arborization）及套叠式分支重塑（intussusceptive branching remodeling）。早在20世纪80年代末，就已发现大鼠从出生到成体，肺容量增加约20倍，毛细血管表面积和容量都增加约30倍。21世纪初，Djonov等用铸型法观察小鸡眼睛和绒毛尿囊膜胚胎发育中的血管结构，发现毛细血管网的扩大首先需要大量跨毛细血管微柱的形成，即套叠式微血管生长。开始形成的微柱以圆形的孔洞出现，继而变形为细长形并沿着纵轴彼此相互融合，形成管腔内的隔膜，最终与毛细血管网分隔开，形成小动脉和小静脉，而远端新的微柱则形成未来血管的延伸部分，树枝状分支血管结构出现于原血管丛中。后来用录像法观察CAM中微动静脉的形成。因形成的血管系统非最优化，所以启动套叠式分支重塑改变血管分支处的分支角度、分支指数及分支血管的直径等以达到优化血管网络的作用，使血管系统做功最少，使用的构建材料最少。

90年代以来，套叠式血管新生机制也引起了研究者的关注和研究。分子机制方面，许多因子共同调节套叠的形成，有些能调节内皮细胞间或内皮细胞和周细胞间的信号传导，如血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）及其受体、促血管生成素（angiopoietin, Ang）及其受体（angiopoietin/tyrosine kinase receptors, Tie）、血小板源性生长因子（platelet derived growth factor, PDGF）、单核细胞趋化蛋白-1、促红细胞生成素等。敲除Ang-1和Tie-2的小鼠，血管结构仍然保持在发育的初始阶段，没有经历进一步的重塑。但是如

果过度表达Ang-1或Ang-2和VEGF就会导致大管腔血管的形成，毛细血管层中也会有丰富的微孔，这些都是套叠过程的典型特征。若把PDGF-B加入到发育成熟的CAM中，会发现较粗的前后毛细血管形成，而毛细血管网没有进一步扩大。若向新生儿的视网膜中注入PDGF受体由的抗体，就会完全阻止周细胞的募集，套叠终止，视网膜发育停止。在小鸡CAM生长阶段，也发现VEGF诱导周细胞分化和募集。

近年来套叠式血管新生的研究主要集中在套叠的动因、套叠现象的数学模拟和病理条件下套叠式血管新生的发现。认为血液动力对微柱的形成起重要的作用，特别是剪切应力。另外周细胞的作用也引起了进一步的关注。数学模拟方面，Do分钟ik Szczerba利用计算机几何、固体力学、计算流体力学及数据可视化技术等二维和三维模拟套叠式微血管生长形成的毛细血管网的初始形态，并描绘血液动力性能和氧、代谢产物及信号分子的输送特征。对于不同病理条件下套叠式血管新生的发现，近来在肿瘤腹水诱导的腹膜和肠系膜组织血管新生期间以及活体检验肿瘤中皆发现了套叠式血管新生，也在生物材料修复组织过程中发现了套叠式血管新生。

（二）出芽式血管新生研究的发展

第一个描述出芽过程的人是希腊的医生Galen.他把发育的胚胎比喻成生长于脐静脉的植物。当植物到达胚胎表面后，分裂、分支和增殖形成一系列较小的分支，肝就是存在于这些小分支中的果实。而第一次体内观察毛细血管出芽是在两栖动物幼体透明的尾巴和小鸡的绒毛尿囊膜。近年来研究者用各种模型对出芽的形成进行了详细的描述。其中最重要的模型是小鸡绒毛尿囊膜和角膜。而培养皿中无壳小鸡胚胎培养系统的研制便利了体内显微镜观察CAM和运用球状聚合物来控制生长和抑制因子的释放。直至Folkman提出抑制血管新生能够阻碍肿瘤的生长，血管新生的研究才作为一个新的领域。之后主要是通过体外培养和克隆毛细血管内皮细胞、分离血管新生生长因子来研究血管新生。

近年来，研究者关注和研究最多的就是血管新生过程中各种细胞因子如血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）、促血管生成素（angiopoietin, Ang）、血小板源性生长因子（platelet derived growth factor, PDGF）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）、缺氧诱导因子（hypoxia inducible factor, HIF）、成纤维细胞生成因子（fibroblast generating factor,

FGF)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor 1, IGF-1)、基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor 1, SDF-1) 及其受体趋化因子受体4 (chemokine receptor 4, CXCR4)、肝细胞生长因子 (HGF) 等之间的相互作用。细胞外基质中各种酶、黏附分子和各种因子之间的相互作用也成为研究的热点。同时各种因子在各种肿瘤中的表达程度、体外刺激程度不同引起的血管新生程度及加入各种促和抑血管生成因子对血管新生的影响等也有较多的研究。

三、血管新生研究的基本内容

(一) 套叠式血管新生

套叠式血管新生是指微动静脉或毛细血管中相对管壁的内皮细胞向管腔内突伸并相互连接, 形成内皮细胞双分子层, 然后从双分子层和基底膜中心穿孔, 肌成纤维细胞和周细胞长入, 胶原纤维沉淀, 最后形成直径小于 $2.5\ \mu\text{m}$ 的微柱 (pillor), 继而覆盖在微柱周边的周细胞沿着毛细血管侧壁参与微柱的形成, 使微柱增粗, 最终在此结构的基础上微柱不断增多、融合把原血管纵向一分为二。下面详细阐述套叠式血管新生的形成机制。

1. 跨毛细血管微柱 (pillor) 的形成

微柱的形成是套叠式血管新生的重要步骤。观察大鼠肺中跨毛细血管微柱的微观结构, 发现跨血管腔的细长连接带呈现四种不同的形态, 推断它们是微柱形成的四个阶段。

第一阶段: 此阶段的形态在实验中较少观察到。毛细血管相对管壁中内皮细胞向管腔内突伸, 约在管腔中央处吻合, 跨毛细血管腔的连接带形成。吻合处沿着细胞膜的密集斑点可能是内皮细胞的连接点。实验中也观察到周细胞覆盖在突伸的内皮细胞上, 推测这些具有伸缩性的细胞参与了该过程。

第二阶段: 微柱形成的下一步是内皮细胞取分子层的穿孔。主要特征是圆柱状跨毛细血管微柱的形成, 它的直径约 $1\sim 1.5\ \mu\text{m}$ 。而且微柱在此阶段出现的频率较第一阶段多。它的主要成分是间充质, 特别是成纤维细胞延伸出的细胞质。

第三阶段: 此阶段微柱的直径和结构和第二阶段相似。另外常覆盖于毛细血管连接处的周细胞此时作为柱的框架出现于微柱的两侧.其细胞质出现于毛细血管壁的侧边。

第四阶段：正常毛细血管网的典型结构，但网孔的直径小于 $2.5\ \mu\text{m}$ 。网孔的主要成分除了阶段三微柱中出现的细胞，还含有胶原纤维。

2. 导致微柱形成的各种方式

仔细观察大鼠肺和小鸡绒毛尿囊膜的血管结构发现其他方式也可形成跨毛细血管微柱，除上述的方式外，还可能存在其他三种方式。总结得出形成跨毛细血管微柱的方式分别为：

(1) 吻合连接 (kissing contacts) 该过程表现出血管腔对称的形成微柱。相对血管壁的内皮细胞向管腔内突伸直至它们相互连接，一旦连接后，它们会相互捆绑在一起，之后变薄、断裂，为间充质组织提供通路。

(2) 销式连接 (peg-like contacts) 该过程本质上和第一种方式相同。不同的是毛细血管壁单边向管腔内突伸和相对边内皮细胞连接形成内皮细胞双分子层，然后在管腔外对内皮细胞双分子层进行穿孔。这是种完全不对称的方式，但也说明了(1)和(2)两种方式中任何种过渡形式都有可能。

(3) 内消旋式腔内折叠 (meso-like intraluminal folds) 已在CAM中观察到此种方式。毛细血管可通过管壁单边折叠来减小管腔直径。折叠形成的褶皱中含有间质成分，褶皱边的内皮细胞下方有多股连续的纤维，整个结构呈现出内消旋式的感觉。内皮细胞双分子层间间质较少，构成悬挂的薄膜。薄膜在力的作用下断裂，断裂处细胞质融合，分离出的微柱的细胞质也融合，最后形成跨毛细血管微柱。

(4) 相邻毛细血管融合 (merging of adjacent capillaries) 此方式出现的频率较高。因毛细血管网是动态的结构，如果血管与其平行的血管连接和融合，血流会做出适当的改变，这样沿着相邻血管的管壁，就会发现两处或更多处管壁融合，形成微柱或长的组织岛。

(5) 毛细血管网孔的分裂 (splitting of intercapillary meshes) 体内观察CAM得知血管体系中细长的组织柱可通过夹断毛细血管网孔得到。此种方式扩大血管表面积的同时并可产生新的微柱。

3. 套叠式血管新生方式

(1) 套叠式微血管生长 (IMG) 套叠式微血管生长的基本原理是分散于血管床上的微柱不断形成和扩增，大部分的毛细血管是以这种方式进行增殖。

微柱的不断形成和扩增导致了毛细血管层的快速增长，从而使血氧交换面积也随之增大。

(2) 套叠式树枝状分支 (IAR) 套叠式树枝状分支中套叠式微柱的形成是血管树形成的开始。在单层毛细血管网内，细长的平行排列的微柱预先形成了毛细血管前动静脉的主要通路。最初形成的微柱以圆形的孔洞出现，继而变形为细长形并沿着纵轴彼此相互融合，形成管腔内的隔膜，最终与毛细血管网分隔开，形成小动静脉，而远端新的微柱则形成未来血管的延伸部分。这些过程不断重复便形成了许多分支的动静脉树。

(3) 套叠式分支重塑 (IBR) 套叠式分支重塑是为了血管网的扩增适应血液供应的需要。Burri等在2周龄左右的CAM的血管模型中发现，动静脉的分支处有许多圆形或三角形的微柱或网孔。这些微柱在血管生成中的作用与其大小、形状及位置有关。当新生的微柱位于血管中央时，微柱不断增大直到其外层与分支角处的结缔组织相融合，使动静脉分支的角度变小；当微柱出现在距分支角 $8\sim 10\mu\text{m}$ 处时，这些微柱逐渐变薄并向分支角处延伸，形成一个纵向的折叠，这就影响了下一级血管的直径并可能使其血液动力得到优化；当新生的微柱偏离血管中央时，会使血管的几何形状发生不对称的改变，即血管的两个分支中的一支缩小为一个小的分支，并最终消退，称为血管修剪。这些都是套叠式分支重塑的表现形式。

4. 套叠式血管新生机制研究

(1) 流体动力 血液动力是血管结构形态的重要决定者。夹住CAM微动脉叉状分支中的一根，发现血流增大，几乎是瞬间影响了分支的形态。而套叠式分支重塑的启动只需几分钟， $15\sim 30$ 分钟就可观察到微柱，而40分钟分支角度减少约20%。这些现象说明剪切应力可能是套叠分支重塑主要原因，因为剪切应力切向作用于毛细血管壁并可随着血流的增加而发生变化，可导致微柱的形成，减小血管的直径。另外分支处主血管和分支血管的直径也会随着血管系统的优化而发生变化，因此血流动力对血管系统的优化也起着重要的作用。

(2) 分子机制 内皮细胞能够感应剪切应力的变化。这种变化可通过分子（如PECAM/CD31）传入细胞内部。接着机械传导系统会改变许多蛋白的转录率，如黏附蛋白，血管新生因子等。而且剪切应力变化也会引起生理或病理环境中周细胞、巨噬细胞和内皮细胞间的相互作用。一些器官中，血管微柱形成的初

始和最后阶段，周细胞和（或）内皮细胞周边细胞募集。并认为在套叠形成过程中，这些细胞对跨毛细血管微柱的形成、保持微柱机械稳定性及血管通透性方面有贡献。已在CAM生长过程中发现VEGF能够诱导周细胞分化和募集。

视网膜、脑和胎盘中，Ang-2和PDGF-B对周细胞募集起重要作用，因此对套叠血管新生过程中微柱的形成和成熟可能有重要作用。若把PDGF-B加入发育成熟的CAM中，会发现直径较大的前后毛细血管形成，而毛细血管网结构没有进一步扩大。小鼠敲除Ang-1和Tie-2后，血管结构仍然保持在发育的初始阶段，没有经历进一步的套叠式重塑。相对于其他生长因子，VEGF作为促血管新生因子出现的较早。Ashton给出当VEGF保持在适度的常数值时，血管保持在未成熟的状态，然而下调VEGF值则伴随血管修整。VEGF促进新毛细血管片段的形成及通过周细胞和平滑肌细胞募集促进新血管成熟。在视网膜和CAM血管结构中加入VEGF会导致套叠式和出芽式血管新生。虽不知哪个出现的频率大，但还是对血管新生的启动起了重要作用。

套叠新生过程中，微柱的形成过程已渐明朗，需时较短，但要把一根血管分为两根或更多根的进一步过程还不清楚，完成此过程所需的时间也仍未知。若套叠中内皮细胞只是变薄或伸长而没有增殖，那么套叠扩大毛细血管网，其中的内皮细胞如何而来？

（二）出芽式血管新生

1. 出芽的过程

以出芽方式形成新血管的过程在生理、病理的研究中已经得到了广泛的证实。出芽血管新生的特征是在原血管基础上内皮细胞发芽，一些促血管生成因子如VEGF常作为趋化剂指引出芽生长的方向，新形成的血管芽体与邻近的血管芽或已存在的血管吻合，最终形成网状结构。一般情况下，出芽新生有以下几个阶段：①出芽始于原有的小静脉或毛细血管；②最靠近血管新生刺激源的微静脉或毛细血管的基底膜降解；③内皮细胞向着刺激源的方向迁移；④内皮细胞以双极模式排列；⑤新管腔形成，临近尖端内皮细胞的内皮细胞进行有丝分裂；⑥芽体之间的连接形成回路（但不知芽体是如何找到对方，然后连接起来）；⑦回路形成后管腔灌注；⑧毛细血管外的周细胞和平滑肌细胞沿着内皮细胞排列，血管壁成熟；⑨新基底膜形成。

2. 出芽式血管新生机制研究

在体内外的刺激下，如机体生长、肿瘤生长、创伤修复，组织细胞首先面临的是缺氧。缺氧可上调HIF-1的水平，这一转录因子可结合多种促血管因子及其受体的基因启动缺氧反应元件来增强相应蛋白的表达，从而启动血管新生过程。这些因子主要包括VEGF、VEGF的受体flt-1、Ang-2、转化生长因子- β （TGF- β ）等。促血管生长因子局部积聚，激活附近血管的内皮细胞，内皮细胞产生纤溶酶原激活剂和其他酶类来溶解周围的基底膜。

在各种促血管生长因子的作用下，蛋白酶降解细胞外基质（ECM），使内皮细胞与周围组织的黏附松脱，周细胞及内皮细胞增殖、迁移。具体过程是：VEGF结合内皮细胞表面的VEGFR-2受体形成质膜囊泡，然后逐步融合成内皮穿孔、跨内皮通道，最后形成细胞间隙，血管通透性增加。因此血浆纤维蛋白易渗出并沉积于血管外，为内皮细胞的黏提供支架，有利于内皮细胞沿着VEGF浓度梯度方向迁移。另外基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase, MMP）-13可通过调节氧化亚氮来促进内皮细胞迁移。内皮细胞的迁移包括三个主要机制，即趋化性、趋触性和趋应力迁移。趋化性迁移是内皮细胞沿着VEGF、FGF等生长因子的浓度梯度方向迁移；而趋触性是指迁移的内皮细胞对捆绑在细胞外基质组分上的整合素的反应；趋应力即机械应力引导的迁移，因为剪切应力能够激活迁移的路径，而管壁内皮细胞又能够时刻感知剪切应力的变化。内皮细胞和细胞外基质相互作用还能够产生张力区，细胞通过张力来探知周围细胞的浓度，然后沿着张力线向浓度大的地方迁移。有研究也表明EC迁移过程中流体切应力诱导产生的形态变化对血管生长、血管新生和血管创伤修复有显著的影响。

关于内皮细胞的增殖，芽体中增殖的内皮细胞是紧挨着尖端内皮细胞的柄细胞，而尖端内皮细胞似在指引出芽的方向。对于生长因子的刺激作用，缺氧诱导产生的促有丝分裂因子可通过促进内皮细胞的增殖和迁移来提高血管新生。在新生儿视网膜的早期发育中就发现了VEGF-A指引尖端内皮细胞迁移和增殖，迁移取决于VEGF-A的梯度，VEGF-A的浓度调节内皮细胞的增殖。

关于内皮细胞的连接，近来Yannick B等在斑马鱼胚胎中节间血管新生过程观察中看到，背主动脉的内皮细胞迁移出来，沿着背腹轴排列，细胞之间的连接不是头和尾，而是有交叠的连接。对于内皮细胞管腔化的问题，过去曾认为是单个细胞折叠起来所形成，后来Makoto K等对活斑马鱼的血管形成所做的高分辨率

延时成像的研究表明，血管内腔是由细胞内质膜小泡合并、融合进细胞质膜中所形成。该研究最终为已有一个世纪之久的关于内皮细胞管腔形成的融合模型提供了活体确认。实验也证明了内皮细胞内和细胞间小泡的融合推动了血管腔的形成。

尽管在血管新生方式中已得到很多有价值结果，但是仍遗留了许多没有得到解决的难题。如内皮细胞增生后形成索状以及网络的机制为何？内皮细胞又是如何实现管腔化？最近的研究成果中，增生内皮细胞形成索状及网络化的机制，研究证实增生的内皮细胞在重度缺氧区与正常供氧区之间聚成索状，有利于构建符合节约原则的毛细血管网络系统。这些工作对于分析血管网络形成是有意义的。

（三）出芽和套叠的比较

通过上述对出芽和套叠式血管新生的形成过程和基本机制的介绍，下面对这两种新生方式的基本特征进行比较，见表1-1。

出芽	套叠
结构单元：带有盲端的管腔	结构单元：血管腔内组织结构（ITS）有确定的超微结构
单个内皮细胞（ECs）的迁移；周细胞阻碍进程	内皮细胞层的移动和收缩；ECs周边细胞加速该进程，促进ITS核形成
关键步骤：因ECs迁移，基底膜降解（蛋白质水解），抑制胶原纤维的合成	关键步骤：鉴于周围ECs的收缩，微柱的核（胶原纤维组成）沉积；
ECs增殖	ECs拉伸和变薄，外周细胞形成ECs的衬里
ECs中管腔形成	ECs中穿孔形成连接折叠和分离的微柱
所有的步骤发生在无血流灌注的情况下，芽体的融合使血流灌注	所有步骤发生在灌注的血管中，所有部分都是和血管网络连接的
单根血管	整个血管网络
芽体的融合形成新的血管回路	原位形成回路是完整的结构
血管网络的重塑需增加更多的芽体	通过血管的分裂和融合来重塑血管网络
血管网络的扩大依靠周边血管出芽	血管网络的自我扩大
出芽向着血管新生源方向生长	血管网络向着血管新生源方向扩大网络结构

比较套叠和出芽式血管新生方式，套叠式较出芽式存在的优势为：①速度很快，套叠分支重塑过程中微柱的形成需15~30分钟，一般需4~5h。而体内启动出芽式血管新生至少要1天，新回路的形成、灌注及完全的连接到血管体系中至少需3~5天。②从能量和新陈代谢角度来看套叠比较经济，不需要大量内皮细胞的增殖、基底膜的降解和对周围组织的入侵。③它的特征是生理学水平上的血管渗透，是协调组织和实现器官功能的根本条件。④在血管树状结构形成和血管重

塑机制中，可能是独一无二的方式。套叠中微柱出现的位置、时间和频率不同，会导致套叠式微血管生长、套叠式树枝状分支、套叠式分支重塑的出现。

四、生理和病理条件下机体的血管新生方式

（一）生理条件下机体的血管新生方式

生理条件下，机体的胚胎发育和生长过程的血管系统中都存在较多套叠形成的微孔。如小鸡绒毛尿囊膜（chorionic allantoic membrane, CAM）和肾的胚胎发育，前期采用出芽方式进行血管新生，后期则依靠套叠方式来扩大毛细血管网络。对于后天的生长过程，已在大鼠的肺、心肌、骨骼肌、视网膜、肾等器官中发现套叠式血管新生。

研究者们最先在大鼠肺中发现套叠形成的微孔（ $1\sim 2.5\ \mu\text{m}$ ），从出生到成体套叠出现的频率逐渐减少。新生前后期，套叠出现的频率最高，随后逐渐减少，成体中出现的最少；血管表面积密度也是如此，出生后快速增大，2周龄达到最大，而后呈下降趋势，到达成体后呈持平趋势。大鼠心肌血管系统中也发现了此现象。观察4~9周龄大鼠各个器官的血管系统发现，临近上皮表面的毛细血管床中套叠出现的频率较高，如眼角膜、腺体周边的血管篮、肠黏膜、肾、卵巢、子宫等。骨骼肌、心肌、肝脏、脑中套叠出现的频率较低。另外在非洲爪蛙蝌蚪变形时的肺中还发现套叠参与毛细血管床的重塑和肺泡微动静脉的成熟和重塑。总结套叠出现的位置和时间发现套叠主要出现于膨大的血管中或是具有三或四个分支的分支点处，三维重置的毛细血管网络中也出现了套叠。除了套叠式血管新生，还在一些器官中发现了出芽式，如哺乳动物卵泡通过出芽和套叠方式进行毛细血管新生，人胎盘终端绒毛毛细血管床通过毛细血管的伸长和出芽进行血管新生。

胚胎发育血管新生方式的研究中，采用最多的器官是小鸡绒毛尿囊膜（CAM）。胚胎发育5~7天毛细血管网络扩大的主要方式为出芽式，8~12天为套叠式。此过程中，血管系统通过IMG使毛细血管网生长和扩大，通过IAR形成带有分支的动静脉树状结构。这些过程中最关键的步骤是跨毛细血管微柱的形成，Patan等运用体内视频法和光、电镜观察切片法对CAM中跨毛细血管微柱的形成进行了详细的研究。毛细血管壁中内皮细胞向管腔内突伸，形成含有胶原纤维等细胞成分的核，随着内皮细胞的拉伸、变薄，断裂脱离毛细血管壁。此外还

介绍了CAM中微柱形成的两种方式-相邻毛细血管融合和毛细血管网孔的分裂。而小鸡肾的胚胎发育和CAM相似，5~7天中肾微血管新生的主要方式为出芽，7天时转为套叠直至11天；8~13天后肾血管生长的主要方式为出芽，13天时转变为套叠生长，且套叠也负责血管的修整和重塑。由上述得，这两种器官胚胎发育过程中，前期血管新生的主要方式为出芽，后期套叠为血管新生的主要机制。

（二）病理条件下机体的血管新生方式

病理条件下，创伤修复和肿瘤生长过程中出芽和套叠式血管新生都得以呈现。肿瘤的发生发展过程经历无血管生长期和血管期两个阶段。当肿瘤体积小于 1mm^3 时，肿瘤主要依靠原有组织中毛细血管送达的氧及营养物质存活，此阶段称为无血管生长期（precascular phase）；当肿瘤体积大于 $1\sim 2\text{mm}^3$ 时，肿瘤主要依靠新生的血管获得氧和营养，即血管期。在直径小于 8mm 的肿瘤中，毛细血管新生主要采用出芽式，而在体积较大的肿瘤中，也观察到套叠式血管新生。目前肿瘤血管化的方式还有充塞式、内皮祖细胞的参与、马赛克式及血管生成拟态。这些方式可能同时出现在同一肿瘤中，也可能出现在同一个体不同肿瘤中。而创伤修复过程中，毛细血管新生主要采用出芽式。近期也有研究表明，皮肤的切割伤口中血管新生最初还是采用出芽式。而在生物材料修复缺损部位过程中，既发现了出芽式血管新生也发现了套叠式血管新生。

1. 肿瘤生长

肿瘤的发生发展过程可分为两个阶段，当肿瘤体积小于 1mm^3 时肿瘤主要依靠渗透获得营养，即血管前期（precascular phase），为无血管生长期；当肿瘤体积大于 1mm^3 时，肿瘤主要依靠血管生成获得营养，即血管期。随着肿瘤增大血管参与肿瘤的生长，则需血管新生。除了出芽式血管新生，套叠式血管新生也是肿瘤血管生成的一个重要方式。研究表明，在直径小于 8mm 的肿瘤中，肿瘤的毛细血管主要是以出芽式血管新生为主，而体积大的肿瘤组织内，可以观察到具有套叠式血管新生特点的扁平的毛细血管网，通常在同一个肿瘤组织内这两种血管生成的方式同时存在。套叠和出芽式血管新生也出现于不同的肿瘤中，同一肿瘤的不同部位和不同时期也出现，通过体外作用肿瘤中血管的新生方式还会改变。如人结肠腺癌的生长过程中，套叠是肿瘤血管新生的重要机制。生长前期，血管新生主要采用套叠和出芽式；在稳定区域，套叠重塑血管网络，快速的血管重塑也可能改善肿瘤中间断的血流状况。化疗或抗血管新生治疗哺乳动物的癌后，肿

瘤中血管数变少了，血管的生长方式由发芽转为套叠，肿瘤血管系统主要依靠血管套叠生长扩大，其中膨大的窦状血管中有较多跨毛细血管微柱。

Burri等利用HIF-1、CD31、VEGF、FGF、PDGF和转化生长因子（transforming growth factor, TGF）等抗体进行免疫组化，用于研究出芽式血管生成和套叠式血管生成之间可能的关系。研究表明，除了VEGF以外，其他生长因子与套叠式血管生成之间并没有十分直接的关系。在体积较大的肿瘤组织中，VEGF的表达主要分布于肿瘤组织的周边部分，而在肿瘤的周边以出芽血管生成方式为主。在套叠式血管生成成为主要血管生长方式的部位VEGF表达呈阴性，两个相邻的肿瘤组织内VEGF表达的水平也可能相同，这主要与肿瘤组织内存在套叠式血管生成有关。Burri等据此推测，在肿瘤生长的早期由于局部缺氧以出芽血管生成为主，没有套叠式血管生成，而在晚期阶段，由于肿瘤生长的需要更高密度的血管来满足对血液供应的需要，因此套叠式血管生成取代了肿瘤中央的出芽式血管生长。

2. 组织修复

创伤修复过程中，新生的毛细血管主要以出芽的方式形成。Joanne EB等的研究指出，皮肤切开伤口中的血管新生最初还是通过出芽方式实现。Olaf K等对植入骨缺陷位置的可降解性纳米颗粒羟基磷灰石中的微血管生长过程进行了观察，结果显示材料植入10天后在骨缺陷部位由已有血管通过出芽和套叠方式形成了新血管。Machteld J等将可生物降解的牛I型胶原片植入到老鼠背部皮下，28天后观察到胶原片中的细胞浸润（主要是巨噬细胞，巨细胞和成纤维细胞）以及血管化程度。结果显示胶原片强烈的血管化过程中频繁发现血管出芽、套叠血管新生。

除了上述三种情况，在其他的病理条件下也发现了出芽和套叠血管新生方式，如下。向老鼠中注射Thy-1抗体使肾小球膜溶解，毛细血管凋亡。在血管修复过程中发现许多直径约为 $1.5\ \mu\text{m}$ 的微孔，跨毛细血管微柱的出现说明套叠式毛细血管新生参与了该修复过程。骨骼肌中不同程度的刺激也引起了血管新生现象，血管新生采用的方式不同。成体大鼠趾长伸肌的超负荷工作引起血管新生，早期毛细血管主要以芽方式新生。药物 α 1-哌唑嗪受体拮抗剂（ α 1-antagonist prazosin）作用于成体大鼠的长伸肌1周后，出现许多内皮细胞胞质伸入管腔内的现象，有些胞质横跨整个管腔和对面的内皮细胞连接起来；2周后，有些单根

毛细血管拥有2个管腔，呈Y型或双Y型，这些都是套叠的现象。电击（10Hz/8h/day）成体大鼠趾长伸肌，2~7天观察到出芽、套叠血管新生，及血管伸长。这些都说明体外刺激的程度不同，启动血管新生的方式不同。

（三）概述

当机体处于不同的生理（机体生长过程）或病理（肿瘤和创伤修复等）条件下，毛细血管新生会采用不同的方式，同种方式也会出现在不同的生理或病理情况下。近年来的文献研究表明，目前对血管新生方式的研究主要集中在分子水平上阐述套叠和出芽现象中血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）、促血管生成素（angiopoietin, Ang）及其受体、血小板源性生长因子（platelet derived growth factor, PDGF）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）、缺氧诱导因子（hypoxia inducible factor, HIF）、成纤维细胞生成因子（fibroblast generating factor, FGF）、胰岛素样生长因子（insulin-like growth factor 1, IGF-1）、基质细胞衍生因子-1（stromal cell derived factor 1, SDF-1）及其受体趋化因子受体4（chemokine receptor 4, CXCR4）、肝细胞生长因子（HGF）等因子的作用。在本书中，我们将对以上内容进行重点阐述，为读者对于血管新生的理解提供参考依据。

参考文献

[1]Hlushchuk R, Styp-Rekowska B, Dzambazi J, et al. Endoglin inhibition leads to intussusceptive angiogenesis via activation of factors related to COUP-TFII signaling pathway[J].PLoS One, 2017, 12（8）:e0182813.

[2]Siveen KS, Prabhu K, Krishnankutty R, et al. Vascular Endothelial Growth Factor（VEGF） Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2017, 15（4）:339-351.

[3]Mukwaya A, Peebo B, Xeroudaki M, et al. Factors regulating capillary remodeling in a reversible model of inflammatory corneal angiogenesis[J].Sci Rep, 2016, 6:32137.

[4]Henning RJ. Therapeutic angiogenesis: angiogenic growth factors for ischemic heart disease[J].Future Cardiol, 2016, 12（5）:585-99.

[5]Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive Angiogenesis: Its

Emergence, Its Characteristics, and Its Significance[J].*Developmental Dynamics*, 2004, 231: 474-488.

[6]Pang JM, Jene N, Fox SB. Assessing Tumor Angiogenesis in Histological Samples[J].*Methods Mol Biol*, 2016, 1430:3-33.

[7]Gianni-Barrera R, Bartolomeo M, Vollmar B, et al. Split for the cure: VEGF, PDGF-BB and intussusception in therapeutic angiogenesis[J].*Biochem Soc Trans*, 2014, 42 (6) :1637-42.

[8]Alameddine RS, Hamieh L, Shamseddine A. From sprouting angiogenesis to erythrocytes generation by cancer stem cells: evolving concepts in tumor microcirculation[J].*Biomed Res Int*, 2014, 2014:986768.

[9]Kim M, Park HJ, Seol JW, et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy[J].*EMBO Mol Med*, 2013, 5 (9) :1415-30.

[10]Blum Y, Belting HG, Ellertsdottir E, et al. Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo[J].*Developmental Biology*, 2008, 316:312-322.

[11]步宏. 病理学与病理生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017.6.

[12]Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited[J].*Acta Neuropathol*, 2012, 124 (6) :763-75.

[13]LeBlanc AJ, Krishnan L, Sullivan CJ, et al. Microvascular repair: post-angiogenesis vascular dynamics[J].*Microcirculation*, 2012, 19 (8) :676-95.

[14]Farahani RM, Sarrafpour B, Simonian M, et al. Directed glia-assisted angiogenesis in a mature neurosensory structure: pericytes mediate an adaptive response in human dental pulp that maintains blood-barrier function[J].*J Comp Neurol*, 2012, 520 (17) :3803-26.

[15]Liu D, Krueger J, Le Noble F. The role of blood flow and microRNAs in blood vessel development[J].*Int J Dev Biol*, 2011, 55 (4-5) :419-29.

[16]Styp-Rekowska B, Hlushchuk R, Pries AR, et al. Intussusceptive angiogenesis: pillars against the blood flow[J].*Acta Physiol (Oxf)*, 2011, 202 (3) :213-23.

第二章 血管内皮细胞生成因子 (VEGF) 与血管新生

一、血管内皮细胞生成因子 (VEGF) 概述

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 又称血管通透因子, 是内皮细胞特异的有丝分裂原, 是一种促血管新生因子, 也具有促使血管通透性增加的作用, 生长因子、炎症因子、缺氧等可刺激内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞分泌VEGF, 目前认为VEGF在缺血、炎症、肿瘤的发生过程中具有生理和病理作用, 其可作用于全身血管内皮细胞, 特异的促进内皮细胞的分裂、增殖和迁移并在血管发生和血管新生中发挥重要调节作用。

(一) VEGF及其受体的一般概述

1. VEGF结构

VEGF是一种分子量34-46KD的肝素结合性糖蛋白, 是由两个二硫键连接而成的同源二聚体, 是参与血管新生和血管发生过程的重要信号蛋白。VEGF的基因位于染色体的6p21处, 由8个外显子和7个内含子组成, 由于mRNA的剪切方式的不同分别根据氨基酸的数目命名VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF189和VEGF206, 生理情况下VEGF165和VEGF206是主要的存在形式, 外显子6和7编码肽段的存在与否是VEGF各单体的主要区别。VEGF121和VEGF145、VEGF165。是分泌性蛋白质, 都能有效地从细胞中分泌出去, VEGF189和VEGF206的信号肽尽管和上述三种单体相同, 但保留在细胞表面, 并与细胞表面的蛋白糖有较高的亲和性。除VEGF121为弱酸性不结合肝素外, VEGF165、189、206均呈碱性且与肝素的亲和力逐渐增强。

2. VEGF家族

(1) VEGF-A VEGF家族由7种糖蛋白组成, 其中VEGF-A是VEGF家族中最早被发现且是迄今已知的最重要的成员。VEGF-A最先由Senger等于1983年从培养的豚鼠肿瘤细胞中发现, 由于它能增加微血管通透性, 因而被称为血管通透性因子 (vascular permeability factor, VPF), 后被Ferrarra等从牛垂体滤泡细胞培