

# 神经迁移因子在血管系统中的表达与功能

张娜 钱凯先\* 耿建国<sup>1</sup>\*

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310027;

<sup>1</sup>中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**摘要** 神经迁移因子是近 10 年来在发育神经生物学中的研究热点, 主要由 ephrin、neuropilin、Slit 和 netrin 四大家族成员构成, 其主要功能是吸引或排斥神经元轴突的迁移, 在神经系统中发挥着重要作用。现在, 越来越多的实验证据表明: 神经迁移因子的作用不仅仅局限在神经系统发育过程中, 在血管发生或新生血管形成中同样具有不可替代的功能。

**关键词** 神经迁移因子; 血管发生; 新生血管形成

血管系统和神经系统的发育在胚胎形成过程中都是十分重要的过程, 也具有相似的结构特征和发育机制<sup>[1]</sup>。例如, 它们在成体内几乎是静息的, 而在胚胎发育和病理条件下却十分活跃; 它们基本上是由两类细胞构成: 血管系统包含内皮细胞和支持细胞, 而神经系统由神经元和胶质细胞组成; 它们都参与了机体内重要的信息交换过程: 循环系统通过动脉和静脉运输物质和氧气, 而神经系统通过运动神经和感觉神经传递化学或电信号; 两者搜寻靶位点的方式也惊人地相似, 毛细血管末端细胞伪足可以感应促新生血管形成因子, 从而促进血管内皮细胞迁移, 导致新生血管和毛细血管的形成, 而神经元的生长锥也具有膜受体, 可以感应外部刺激信号, 引导神经元轴突的正确导向。因此, 我们可以假设两个系统之间很有可能存在着相似的作用分子及其保守的信号转导通路。

神经迁移分子是一些细胞外的因子, 可以排斥或吸引神经元的生长锥, 从而使得轴突和树突能够正确的定位和识别它们的突触配体<sup>[2,3]</sup>。近期的证据也提示了这些神经迁移因子(表 1)同样也在血管系统中发挥作用。

## 1 Ephrin 和 Eph

### 1.1 Ephrin/Eph 分类

自从表达红细胞生成素的肝癌细胞株中克隆出 Eph 家族的第一个成员以来, 在脊椎动物中已发现 Eph 家族的 14 个成员, 成为已知最大的酪氨酸激酶受体(RTK)家族<sup>[4]</sup>。1994 年, 研究人员发现了 Eph 这一大 RTK 家族的配体, 命名为 ephrin<sup>[5]</sup>。目前, ephrin 在脊椎动物中已发现 8 个成员<sup>[6]</sup>。据它们的结构特征, ephrin 被分为两个类型: ephrinA(A1~A5)

和 ephrinB(B1~B3)。前者以 GPI 结合形式固定在细胞膜上, 与 EphA 受体结合; 而后者则是单链跨膜蛋白, 有一保守的羧基末端序列, 与 EphB 受体结合。根据序列相似性及其与不同配体的结合特异性, Eph 受体分为 EphA 或 EphB 两类。其中, EphA4 是唯一既可与 ephrinA 又可与 ephrinB 结合的受体蛋白。Eph 受体和 ephrin 配体在神经系统模式形成中具有重要的调节作用, 它们参与了后脑菱脑原节的模式形成、轴突定向和导向神经嵴细胞的迁移<sup>[6]</sup>。然而, 最近的许多研究已经证实, ephrin/Eph 家族的一些成员在胚胎血管发生和新生血管形成过程中同样发挥着作用, 这些作用与它们在神经系统中的作用同等重要。

### 1.2 Ephrin/Eph 的表达与功能

对鼠科和其他脊椎动物胚胎的研究发现, 几种 Eph 和 ephrin 蛋白可以在血管系统中表达。原位杂交实验显示 ephrinA1 在心内膜前体细胞、背部大动脉、早期头部静脉、肌节间血管以及四肢萌芽脉管系统中均有表达<sup>[7]</sup>。其他 EphA 蛋白也被发现在相似的位置上表达。近期的研究显示了一些 EphB 蛋白成员在胚胎发育的血管系统中的表达。EphrinB2-lacZ 或 EphB4-lacZ 杂合小鼠胚胎中的  $\beta$ -lacZ 的表达模式显示了 ephrinB2 及其受体 EphB4 的互补表达: ephrinB2 在动脉内皮细胞中表达, 而 EphB4 在静脉内皮细胞中表达<sup>[8]</sup>。其他的 EphB 蛋白在新生血管区域部分也有表达: ephrinB1 在动脉和静脉内皮细胞

收稿日期: 2004-02-27 接受日期: 2004-04-30

国家自然科学基金资助项目(No. 39925015)

\* 通讯作者。钱凯先: Tel: 0571-87952761, E-mail: kaikai2001@hznc.com; 耿建国: Tel: 021-54921351, E-mail: jggeng@sunm.shcnc.ac.cn

表1 四大神经迁移分子家族及其在血管系统中的功能

配体	受体	血管系统中的功能
Ephrin	Eph	参与血管发育时期动脉和静脉的分化；血管系统形态形成；肿瘤新生血管生成。
Semaphorin	Neuropilin, Plexin	Neuropilin 参与胚胎期新生血管生成；SemaIII 可抑制 integrin 的功能；肿瘤新生血管生成。
Slit	Robo	Slit1/Robo2 介导肿瘤新生血管生成；Robo4 参与新生血管生成。
Netrin	UNC-40(DCC), UNC-5	只发现 $\beta$ -netrin 在血管系统中表达，以及 <i>Unc5h2</i> mRNA 被发现存在于血管系统中。

中均有表达，EphB3 则在卵黄囊的静脉和部分动脉中表达，ephrinB2 和 EphB2 也在间质支持细胞中有表达。另外，研究人员也发现越来越多的 Eph 受体和 ephrin 配体存在于成体正常的新生血管形成过程，以及病理条件下的肿瘤内的新生血管形成。在正常雌性成体生殖系统的新生血管形成过程中，发现 ephrinB2 大量表达<sup>[9]</sup>。在肿瘤形成中，内皮细胞和各种人肿瘤细胞均有表达 ephrinA1/EphA2 配体/受体对。研究也已显示 ephrinB/EphB 蛋白在许多肿瘤中均有表达。Ephrin/Eph 的广泛表达模式提示了它们对胚胎形成中的血管发育起着一定的作用。

首先研究的是 ephrinA1 在血管发育中的功能。ephrinA1 在体外具有内皮细胞迁移趋化性和促进新生血管生成活性，并且可诱导角膜囊血管萌发。一种可溶的 EphA2-Fc 受体可以特异抑制 VEGF 诱导的内皮细胞存活、迁移、萌发以及角膜的新生血管形成。EphA2 的反义寡核苷酸也可抑制 ephrinA1 和 VEGF 诱导的细胞迁移。这些表明在依赖 VEGF 的新生血管形成过程中 EphA 受体活化发挥的作用。在肿瘤形成中表达的 ephrinA1/EphA2 配体/受体对，可以建立起一个能通过激活新生血管内皮细胞上的 EphA2 受体来刺激肿瘤新生血管生成的微环境。有许多研究，例如阻断 EphA 类受体活性、刺激 EphA2 的磷酸化以及过量表达 EphA2 等，可证明 ephrinA/EphA 信号转导参与了肿瘤新生血管形成过程。当然，ephrinA1 及其受体的体内功能仍有待研究。而 B 类成员在血管发育中的功能研究得很详细。小鼠基因剔除实验证明：ephrinB2<sup>-/-</sup> 小鼠在 10.5 天胚胎死亡，其表现为欠缺的血管重塑和萌发，心脏小梁形成缺陷<sup>[8]</sup>。EphrinB2 可与 EphB2、EphB3 和 EphB4 相结合。特异缺失 EphB4 的表型与 ephrinB2 缺失的表型相似，这提示该受体/配体对是调节血管形成中主要的 B 类成员相互作用形式<sup>[10]</sup>。缺少 ephrinB2 胞内区域的纯合小鼠与 ephrinB2<sup>-/-</sup> 小鼠在新生血管形成方面的表型上相似，推断该胞内区域对与 ephrinB2 的血管功能非常重要，这也支持了关于配体反向信号转导的观点。单独缺失其他 Eph 成员，例如 EphB2 或 EphB3，并不能导致血管缺陷。然而，30% 的 EphB2 和 EphB3 双重缺失小鼠却显示了与 ephrinB2 或 EphB4 缺失小鼠相象的血管缺陷，这说明了其他 EphB 受体的功能补偿作用<sup>[11]</sup>。最近，有关 EphB4/ephrinB2 信号通路机制的研究发现，内

皮细胞正向的 ephrinB2/EphB4 信号转导在内皮细胞黏附、迁移和新生血管形成中起着抑制性的作用，与之相反，反向的 EphB4/ephrinB2 信号转导却在这些过程中起着促进性的作用。这些研究结果提示了 ephrinB2 和 EphB4 的双向信号转导的抑制性和促进性作用相互协调，限制了细胞间融合，并调节了动脉和静脉边界的形成，从而保证了新生血管网络的正常形成<sup>[12]</sup>。但 ephrin/Eph 蛋白调节肿瘤新生血管生成的机制仍不清楚，推测肿瘤细胞表达的 ephrin 可能通过与新生血管上的 EphA2 受体相互作用引导新血管的形成。

## 2 Semaphorin 和 Neuropilin

### 2.1 Neuropilin 与血管发生

Neuropilin 是在发育中的非洲蟾蜍神经系统内发现的，是一种被神经元特异的单克隆抗体 A5 识别的细胞表面抗原。现已发现两种 neuropilin (简称为 Np 或 Npn)，分别是 neuropilin-1 和 neuropilin-2，具有相似的结构和 45%~50% 的序列同源性。Neuropilin 是分子量为 130~140 kDa 的单链跨膜蛋白质，含有大约 40 个氨基酸的胞内区域<sup>[13]</sup>。它们通过结合配体 semaphorin III (SemaIII) 类蛋白发挥作用。SemaIII 类蛋白是分泌型蛋白，属于高等在脊椎动物中已知 19 个成员的 semaphorin 家族，是许多神经元的有效轴突排斥物。Neuropilin 被发现在神经系统发育中发挥作用，通过 neuropilin-1 与其可溶性的配体 SemaIII 结合而在轴突导向过程中起着排斥性的作用。

然而，基因打靶实验发现了 neuropilin 在体内血管发生和新生血管形成中的重要功能。在转基因小鼠中过量表达 neuropilin-1 可以导致过度的毛细血管形成、血管扩张以及大量出血<sup>[14]</sup>。Np-1<sup>-/-</sup> 小鼠在 E10.5-E12.5 死亡，出现神经纤维投射生长的破坏、神经血管生成损坏、大血管移位、混乱和不完整的卵黄囊血管网络发育<sup>[15]</sup>。而 Np-2<sup>-/-</sup> 小鼠可存活，但有大量神经系统缺陷和淋巴管缺乏。Np-1<sup>-/-</sup>Np-2<sup>-/-</sup> 小鼠在 E8.5 死亡，早于 Np-1<sup>-/-</sup> 或 Np-2<sup>-/-</sup> 小鼠，并显示出更多严重的血管表型异常，与 VEGF 或 VEGFR-2 基因剔除小鼠相象。Np-1<sup>-/-</sup>Np-2<sup>-/-</sup> 或者 Np-1<sup>-/-</sup>Np-2<sup>-/-</sup> 杂合小鼠同样也是胚胎致死，仅存活至 E10-E10.5，表现为大量的卵黄囊血管减少、血管混乱以及

胚胎生长延迟<sup>[16]</sup>。总的看来,以上实验结果提示了 neuropilin-1 和 neuropilin-2 对于卵黄囊和胚胎血管的正常发育是必需的。

## 2.2 Neuropilin 介导血管发生的可能机制

发现 neuropilin-1 是 VEGF<sub>165</sub> 的受体<sup>[17]</sup>提示了 neuropilin 和 semaphorin 可能调节 VEGF 在血管系统中的功能,随后的各种实验研究证实了这一推测。体外实验证明,neuropilin-1 可以提高 VEGF<sub>165</sub> 与其信号转导 RTK 受体 KDR/flk-1 的亲合力,从而增强 KDR/flk-1 调节体外内皮细胞的化学趋化作用和促有丝分裂作用。另外,SemaIII 可以抑制 VEGF 诱导的血管出芽,这种抑制是由 SemaIII 和 VEGF<sub>165</sub> 竞争结合 neuropilin-1 造成的<sup>[18]</sup>。研究人员随后发现位于 Npn-1 氨基末端 CUB 区域的两个相邻亲水环上的 7 个氨基酸是 Npn-1 与 SemaIII 而非与 VEGF 结合所必需的。随后, *nfn-1<sup>Sema</sup>* 突变小鼠被研究出来,其中 Npn-1 蛋白可以正常表达,但 Sema-Npn-1 信号转导被破坏,而 VEGF-Npn-1 信号转导不受影响<sup>[19]</sup>。通过对这种小鼠的研究发现 VEGF-Npn-1 信号转导对于血管发育是非常重要的。

Neuropilin-1 也被证明在肿瘤新生血管中起作用。肿瘤细胞可以表达 neuropilin-1,并与 VEGF<sub>165</sub> 结合。Neuropilin-1 表达上调与各种肿瘤的生长相关联。小鼠肿瘤细胞中 neuropilin-1 的过量表达可以导致肿瘤增大,显著提高肿瘤新生血管生成<sup>[20]</sup>。此外,可溶性的 neuropilin-1 是一种肿瘤新生血管生成的拮抗剂<sup>[21]</sup>。

## 3 Slit 和 Robo

### 3.1 Slit/Robo 概况

Slit 广泛存在于非脊椎动物和脊椎动物中,它是一种具有多样的蛋白质结合模体(motif)的分泌蛋白大家族,最初被认为是果蝇中一种可以指引轴突导向和控制神经元迁移的胞外因子<sup>[22]</sup>。在哺乳动物中,Slit 包含 3 个成员,即 Slit1、Slit2 和 Slit3,而且都在神经管的背部中线上表达。其中,Slit1 主要存在于神经系统中,而 Slit2 和 Slit3 也可以在其他细胞中表达。Slit 的受体是单链跨膜蛋白 roundabout (Robo),最初是在一个筛选影响轴突导向突变基因的实验中从果蝇中分离出来的<sup>[23]</sup>。目前在小鼠和人类中共发现了 4 种 Robo 基因,果蝇中存在 3 种。与 Slit 相类似,虽然所有的 Robo 蛋白主要在神经系统中表达,其中的 3 个也被发现存在于在神经以外的系统中。

### 3.2 Slit/Robo 与血管发育

鉴于 Slit 和 Robo 的表达模式,最近已经证明 Slit/Robo 信号通路也在血管系统中起作用。Slit2 可以抑制由化学趋化因子诱导的白细胞化学趋化,这

一发现证明了 Slit 在非神经元细胞中的功能。Robo1 也被证明参与调节 Slit 对白细胞反应<sup>[24]</sup>。考虑到 Robo 在血管系统中的表达,这些结果提示了 Slit 和 Robo 在血管系统中的潜在功能。一方面,Robo4 (Robo 受体家族中的新成员)被发现,它的表达特异地存在于胚胎血管中和成体组织中的新生血管活跃位点,尤其是肿瘤血管上。正如 Robo1、Robo2 和 Robo3 在神经元导向中的作用一样,Robo4 可以在新生血管形成过程中向内皮细胞传递化学排斥信号<sup>[25]</sup>。从 Robo4 的表达模式可以推断,Robo4 可能对引导和维护高等动物生殖系统血管模式很重要,这一点仍需进一步研究。另一方面,Slit/Robo 信号通路被揭示可以控制肿瘤细胞-内皮细胞的联系,可以调节肿瘤诱导的新生血管生成<sup>[26]</sup>。有趣的是,Slit2 广泛地在肿瘤中表达,而 Robo1 在人脐静脉内皮细胞(HUVECs)和免疫缺陷小鼠的恶性黑色素瘤血管上表达。一种可能的机制是肿瘤细胞分泌的 Slit2 蛋白可以通过与 Robo1 相互作用吸引内皮细胞,从而调节肿瘤的新生血管生成。与已知的 Slit/Robo 信号通路在神经系统中的排斥作用相反,该信号通路在肿瘤新生血管生成中起诱导作用。

与 ephrin/Eph 和 semaphorin/neuropilin 相互作用一样,Slit/Robo 信号通路可能又是一对在血管系统中发挥作用的神经迁移因子。

## 4 Netrin

1994 年,在搜寻脊椎动物连合轴突的化学诱导物研究中,netrin 第一次被发现。Netrin 是与膜相连的蛋白质,包括 netrin-1 和 netrin-2。在线虫、果蝇和小鼠的相关研究已证明 netrin 在神经系统中起着神经元轴突迁移因子的作用。Netrin 相应的跨膜受体是 UNC-40(也称为 DCC,“deleted in colorectal cancer”)和 UNC-5 蛋白。

目前,对于 netrin 及其受体在血管系统中的功能仍不清楚。直至最近,netrin 家族的新成员  $\beta$ -netrin 已经被发现存在于血管的基底膜上<sup>[27]</sup>。表达最广泛的 *Unc5* 家族成员——*Unc5h2* mRNA,在早期的血管形成中也被观测到<sup>[28]</sup>。Netrin 及其受体是否在血管系统中发挥作用仍有待研究。

## 5 小结和研究前景

神经和血管系统的正常发育对于胚胎发育和成体都是十分重要,许多证据提示它们之间存在着比预想更多的共同点,至少能在两个层次上相互影响。首先,它们拥有共同的保守信号通路和机制来调节分化、生长、迁移等重要的生命活动。除了上述详细讨论的 4 个神经迁移分子家族,还有许多已知的分子在两个系统的发育过程中起着重要作用

用。例如, Notch 信号通路在脊椎动物正常的神经生成、体节形成以及淋巴细胞发育中是必需的, 同时 Notch 在胚胎血管发育中也是十分重要的<sup>[29]</sup>。另外, VEGF 在血管发育中是很重要的分子, 近来证实 VEGF 也是一种神经营养因子, 在外周神经系统和中枢神经系统的神经元和神经胶质细胞中均有表达, 可以刺激轴突生长并且对神经元起到保护的作用<sup>[30]</sup>。其次, 血管系统和神经系统可能在发育过程中相互影响。最近的一项研究显示外周感觉神经和皮肤小动脉的分支模式是相互协调的, 由于神经系统的 Schwann 细胞可以释放 VEGF, 它可以诱导小动脉的血管内皮细胞沿着神经分支生长<sup>[31]</sup>。相反, 血管系统也可以调节神经模式形成, 例如, 由血管平滑肌细胞表达的, 属于 GDNF 家族的 artemin (ARTN), 就可以引导交感神经纤维的迁移<sup>[32]</sup>。

血管系统和神经系统这两个领域的交叉研究中, 仍有很多问题有待解决。例如, 是否 netrin 在血管系统中也存在着重要的生物学功能? 既然 Slit/Robo 信号在肿瘤内新生血管形成中有作用, 那么是否在胚胎的血管系统发生和胚胎的新生血管形成中也有调节作用? Slit/Robo 信号在调节神经突起跨中线生长的过程中起重要作用, 那么是否对血管系统在机体的对称分布上也有调节作用? 是不是除了皮肤动脉, 所有的血管(无论动脉还是静脉)在胚胎发育时期都需要神经系统的模板? 内皮细胞具有极高的可塑性, 可以在成体内由静息状态转变为活跃生长状态, 由此是否可能还存在刺激神经再生的新通路? 鉴于 VEGF 在中枢神经系统和外周神经系统的功能, VEGF 是否可以应用于某些神经系统疾病的治疗中? 轴突导向的研究是否可以作为一些重要的血管生

长紊乱疾病(如 Haemangioma)的分子机制提供有用的证据? 所有这些问题都需要进一步研究得以解答。

### 参考文献 (References)

- [1] Shima DT *et al. Curr Opin Genet Dev*, 2000, **10**: 536
- [2] Mueller BK. *Annu Rev Neurosci*, 1999, **22**: 351
- [3] Dickson BJ. *Science*, 2002, **298**: 1959
- [4] Hirai H *et al. Science*, 1987, **238**: 1717
- [5] Bartley TD *et al. Nature*, 1994, **368**: 558
- [6] Flanagan JG *et al. Annu Rev Neurosci*, 1998, **21**: 309
- [7] McBride JL *et al. Mech Dev*, 1998, **77**: 201
- [8] Wang HU *et al. Cell*, 1998, **93**: 741
- [9] Gale NW *et al. Dev Biol*, 2001, **230**: 151
- [10] Gerety SS *et al. Mol Cell*, 1999, **4**: 403
- [11] Augustin HG *et al. Cell Tissue Res*, 2003, **314**: 25
- [12] Fuller T *et al. J Cell Sci*, 2003, **116**: 2461
- [13] RAPER JA. *Curr Opin Neurobiol*, 2000, **10**: 88
- [14] Kitsukawa T *et al. Development*, 1995, **121**: 4309
- [15] Kawasaki T *et al. Development*, 1999, **126**: 4895
- [16] Takashima S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 3657
- [17] Soker S *et al. Cell*, 1998, **92**: 735
- [18] Miao HQ *et al. J Cell Biol*, 1999, **146**: 233
- [19] Gu C *et al. Dev Cell*, 2003 **5**: 45
- [20] Miao HQ *et al. FASEB J*, 2000, **14**: 2532
- [21] Gagnon ML *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 2573
- [22] Piper M *et al. Bioessays*, 2003, **25**: 32
- [23] Kidd T *et al. Cell*, 1999, **96**: 785
- [24] Wu JY *et al. Nature*, 2001, **410**: 948
- [25] Huminiecki L *et al. Genomics*, 2002, **79**: 547
- [26] Wang B *et al. Cancer Cell*, 2003, **4**: 19
- [27] Koch M *et al. J Cell Biol*, 2000, **151**: 221
- [28] Engelkamp D. *Mech Dev*, 2002, **118**: 191
- [29] Lawson ND *et al. Dev Cell*, 2002, **3**: 127
- [30] Carmeliet P *et al. Semin Cell Dev Biol*, 2002, **13**: 39
- [31] Mukouyama YS *et al. Cell*, 2002, **109**: 693
- [32] Honma Y *et al. Neuron*, 2002, **35**: 267

## Roles of Neuronal Guidance Cues in the Vascular System

Na Zhang, Kai-Xian Qian\*, Jian-Guo Geng<sup>1\*</sup>

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; <sup>1</sup> Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Neuronal guidance cues are paid great attention to in recent ten years, which are attractive or repellent to the migration of axons and play important roles in the nervous system. Now increasing evidence has been provided to demonstrate that those neuronal guidance cues (such as ephrin, semaphorin, Slit and netrin) first described in the nervous system are indispensably involved in the vascular system as well.

**Key words** neuronal guidance cues; vasculogenesis; angiogenesis

Received: February 27, 2004 Accepted: April 30, 2004

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 39925015)

\*Corresponding author. Kai-Xian Qian: Tel: 86-571-87952761, E-mail: kaikai2001@hzcnc.com; Jian-Guo Geng: Tel: 86-21-54921351, E-mail: jggeng@sunm.shenc.ac.cn