

神经导向因子 Netrin-1 在血管生成中可能的双向作用

胡佳[△], 朱超[△], 黄矛*

第二军医大学基础部新药评价中心, 上海 200433

[摘要] Netrin 家族以经典的神经导向因子而闻名。但近年来一系列的研究发现在非神经组织中也有 netrins 广泛表达, 提示 netrin 家族的功能并不像先前理解的那么简单。其中 netrin-1 在促进和抑制血管生成中可能具有的双向作用无疑是 netrin 家族新功能中最令人关注的。尽管 netrin-1 在血管生成中的确切作用还存在不少争论, 仍加深了我们对神经系统与脉管系统间的密切联系的了解, 也为临床心脑血管缺血性疾病、糖尿病引起的血管和神经病变等的治疗以及抑制肿瘤血管生成提供了新思路。本文综述了 netrin-1 在血管生成中的可能的双向作用及其潜在的临床意义。

[关键词] 神经导向因子; netrin-1; 血管生成; 血管生成因子

[中图分类号] R 331.32 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0950-03

The possible dual role of neuronal guidance factor netrin-1 during angiogenesis and vascularization

HU Jia[△], ZHU Chao[△], HUANG Mao*

Center of New Drug Evaluation, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] The netrin family is known as classical axon guidance factors. Recent studies suggested the wide existence of netrins in non-nerve tissues, indicating a more complicated role for netrin family than previously known. The dual role of netrin-1 in promoting and inhibiting vascularization is undoubtedly the most attractive research area. Though the specific role of netrin-1 in vascularization is not determined, it casts new lights on the close link between the nervous system and vascular system, and it also provides new thoughts on the treatment of cardiac and cerebral ischemia disorders, diabetes-induced vascular and nervous disorders, and on inhibition of tumor angiogenesis. This paper reviews the possible dual role of netrin-1 in vascularization and its potential significance.

[KEY WORDS] neuronal guidance factor; netrin-1; angiogenesis; angiogenic factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8): 950-952]

大脑对信息的处理在很大程度上取决于神经连接所构成的复杂网络, 在这个复杂网络的构建过程中, 轴突能选择性地朝向其靶组织生长, 这种严格的生长方向性由一系列化学因子精确调控。Netrin 家族就是最早发现的可溶性神经导向因子^[1]。近年来的研究表明, netrin 家族及其受体在很多非神经组织中均有表达, 提示 netrins 并不仅仅在中枢神经系统的发育过程中提供迁移信号^[2-4], 在非神经组织中也参与了血管细胞的黏附、游走、增殖、分化甚至凋亡的调控^[5-7]。Netrin 家族在非神经系统的广泛功能再次激发了研究者的关注。本文旨在综述神经导向因子 netrin-1 及其受体在血管生成中可能的双向作用, 并探讨其潜在的临床意义。

1 Netrin 家族及其受体

Netrin 家族由一类结构上与组织基底膜的结构成分层粘连蛋白(laminin)相关且进化上高度保守的可分泌蛋白组

成, 其命名源于梵语“netr”, 意为“引路者”。不同物种间的 netrins 存在变异, 目前已被鉴定的包括 netrin-1, 2, 3, 4 和 G-netrin。netrin-1, 2, 3 和 G-netrin 与层粘连蛋白的 γ 链具有同源性, netrin-4 则与 β 链相关。它们都包含一个层粘连蛋白 VI 结构域、3 个 EGF 样重复序列类层粘连蛋白-V 结构域和 1 个肝素结合的羧基端(C 区)^[8-9]。netrin-1 在 netrin 家族中备受关注, 是第一个被鉴定并命名的轴突导向因子(axon guidance factor), Tessier-Lavigne 等^[1]发现它可以刺激生长中的脊髓联合神经元生长和定位。

在哺乳动物中, netrin-1 的受体主要来自 DCC 家族和 UNC5 家族。这 2 个家族都属于免疫球蛋白超家族而且仅跨膜一次。在轴突的生长中, DCC 受体主要介导吸引作用, 也可介导排斥作用。而 UNC5 受体不管是单独作用还是与 DCC 受体联合, 都仅仅显示了排斥作用。另外, 有报道^[10]认

[收稿日期] 2009-01-08 **[接受日期]** 2009-03-30

[作者简介] 胡佳, 第二军医大学临床医学专业八年制 2004 级学员. E-mail: pondlily@163.com; 朱超, 第二军医大学临床医学专业五年制 2004 级学员. E-mail: m_j_c_k_e_y@163.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871034, E-mail: mhuang@smmu.edu.cn

为属于腺苷酸受体家族的 A2b 受体也可能参与了 netrin-1 的信号转导, 但具体作用机制尚不清楚。

Netrin 家族是作为神经导向因子而被发现和命名的, 但越来越多的研究^[5-7,9,11-12]显示它们在非神经组织中亦广泛分布且在形态发生方面起着一定的作用, 如哺乳动物腺体的形成、肺分支形态发生、肿瘤发生等。最近的研究^[5-7]显示, netrins 在血管生成过程中还担任了内皮导向分子的功能。

2 血管生成及其与神经生长的相似性

2.1 血管生成 胚胎发育、创伤修复、缺血缺氧、肿瘤、炎症、自身免疫性疾病、内分泌疾病等生理或病理状态下, 靶组织有一个血管化的过程。血管新生 (angiogenesis) 包括血管发生和血管生成两种形式。血管生成是指已存在的微血管以出芽或分裂的方式产生新的毛细血管的过程, 是血管内成熟的高度分化的内皮细胞增殖、迁移和重塑的结果。

2.2 血管生成与神经生长的相似性 神经系统与脉管系统是人体两大重要的系统, 均是层次有序的网络结构, 有着相似的复杂分支结构。然而这种相似性并非偶然。越来越多的研究^[13-14]表明, 这两个系统之间的联系远比人们先前认识的更为密切。除了结构相近, 神经元和血管在其生长方式上也表现出了惊人的相似性。在机体中, 神经和血管循着相同的迁移路线相伴而行; 在发育中的脊椎动物胚胎内, 血管和神经的分支结构也以高度可重复的方式朝着靶组织生长, 说明血管的生成和轴突的生长都是一个精确调控的导向过程。

神经元轴突到达靶组织的导向取决于轴突顶端的特定结构即生长锥 (growing core)。生长锥通过感受周围环境中的吸引性及排斥性化学信号, 整合信息, 最终决定轴突的生长方向。与此类似, 生长中的血管丛前沿也具有一个运动型结构——端细胞 (tip cell)。端细胞通过延伸出的难以计数的丝状伪足探测细胞外基质中的导向信号, 使芽生的毛细血管顺血管内皮生长因子 (VEGF) 的浓度梯度生长。相邻内皮的端细胞融合形成管腔, 从而产生新的血管分支^[15]。血管生成与神经轴突生长的这种相似性, 提示可能有相同的信号分子参与了远端靶位神经分布和血管化的调控。已知参与神经轴突导向的 4 对主要的配体及其受体在血管形态发生中也起着一定的导向作用, netrins 及其受体就是其中之一^[7]。

3 Netrin-1 与血管生成的双向效应

Netrin-1 在血管生成的过程中具有导向作用已得到广泛认同。但这种导向作用究竟是正性的、负性的抑或双向的, 介导这种作用的又是何种受体仍处于争论中。

3.1 Netrin-1 的正性效应 Park 等^[6]指出 netrin-1 参与了血管生成的调节, 属于一种血管生成因子。他们在体外培养的成人血管内皮细胞和血管平滑肌细胞中加入 netrin-1, 发现它能以一种与 VEGF、血小板源性生长因子 (PDGF) 不同的方式作用于这两种细胞, 促进细胞增殖、迁移以及促进血管平滑肌细胞 (而不是内皮细胞) 的黏附; 免疫组化和蛋白质印迹法检测仅发现血管平滑肌细胞有 netrin 受体 neogenin 表达, 血管内皮细胞未检测出任何已知的 netrin-1 受体, 提示 neogenin 介导了 netrin-1 对血管平滑肌的作用, 而 netrin-1 对内皮细胞的促

血管生成效应可能由一种未知的受体介导。Wilson 等^[7]采用斑马鱼或哺乳动物模型, 以功能缺失或功能获得的策略, 通过在体试验或离体试验, 都得出了同样的结论: netrin-1 是一种促进血管生成的因子。同样, 作者也未能在内皮细胞上找到任何已知的 netrin-1 受体, 支持了 Park 等^[6]的结论。Nguyen 和 Cai^[12]用蛋白质印迹法检测到了 DCC 在主动脉内皮细胞的表达, 发现 netrin-1 体外可诱导血管生成, 且是通过 DCC 依赖的 ERK1/2-eNOS 前馈机制增加内皮细胞的 NO 生成, 刺激内皮细胞增殖和迁移, 从而实现其促血管生成效应。

前述研究基本上是动物实验或人体细胞的离体实验, 在体实验亦可得出相似结论。2007 年, 杨昀等^[16]采用 RT-PCR 和蛋白质印迹法检测了 netrin-1 在正常妊娠及子痫前期妊娠胎盘组织中的表达, 同时采用免疫组化及抗 FⅧ因子抗体检测了两组孕妇胎盘组织中的血管密度, 发现两组孕妇胎盘组织中 netrin-1 mRNA 及其蛋白表达与血管密度均呈正相关。

3.2 Netrin-1 的负性效应 尽管很多实验证实了 netrin-1 促血管生成的作用, 但也有不少研究显示了相反的结果。Lu 等^[5]认为在血管生长和探路的过程中, netrin-1 是作为一种排斥信号存在的。他们分析了不同 Netrin-1 受体在鼠胚胎中的表达, 结果显示仅 UNC5B 在生长的血管 (尤其是动脉、毛细血管和内皮端细胞) 中特异表达。而且 *unc5b* 功能缺失型突变小鼠表现出血管过度分支和内皮端细胞丝状伪足过度延伸。在培养的表达有 *unc5b* 的动脉内皮细胞体系中加入 netrin-1, 丝状伪足收缩。用反义寡核苷酸敲除斑马鱼的 netrin-1 同源基因, 发现血管发育过程中相似类型的异常分支减少。由此证实 netrin-1 能干扰丝状伪足的延伸, 提示它可抑制血管的芽生, 且这种效应由 UNC5B 受体介导。最近, Bouvrée 等^[17]研究了血管上 *unc5b* 的表达和功能在进化上的保守性, 鸡胚实验得出了相同的结论。

两种不同结论的实验证据都比较充分, 有理由推测, netrin-1 在血管生成的导向调节中也如同调节轴突生长方向一样扮演了双重角色。有报道^[18]称低浓度 netrin-1 促进血管生成, 高浓度则发挥抑制血管生成作用。也许不同研究系统 netrin-1 受体表达条件的差异, 可以解释所观察到的 netrin-1 促进或拮抗血管生成效应的差异。另外, Bouvrée 等^[17]观察到鸡胚绒毛尿囊膜 (CAM) 中加入 netrin-1 会导致胞质外渗, 继而形成纤维小结, CAM 脉管系统重组 (Park 等^[6]也曾观察到相似现象)。作者因此提出假设, 血管对 netrin-1 的第一反应是快速的胞质外渗, 而纤维小结形成和血管重组只是胞质外渗的继发事件, 可能由释放的炎性介质所诱导而非对 netrin-1 的直接反应。确切的效应有待进一步证实。

3.3 Netrin-1 与血管生成的临床前景 血管生成涉及多种生理和病理过程, 机制相当复杂。神经导向因子 netrin-1 对血管生成的调节作用的发现, 为很多相关疾病的临床治疗提供了新的希望。一项在体研究显示缺血部位肌肉细胞过度表达 netrin-1 可以促进股动脉结扎后肢体的再血管化, 甚至可以逆转糖尿病鼠模型的血管和神经病变^[7]。Fan 等^[19]发现 netrin-1 的过表达可以促进成年小鼠中枢神经系统血管新生, 提示 netrin-1 在脑血管的发育与重建中发挥着重要作用; 与此同时 Wu 等^[20]的研究证明, 缺血性卒中动物模型中,

向缺血皮质持续性注射 netrin-1 可有效减缓缺血所致神经元凋亡。上述结果提示,将 netrin-1 应用于人类缺血性脑卒中、血栓闭塞性脉管炎等缺血性疾病及糖尿病引起的血管和神经病变的治疗,以促进侧循环的建立,改善缺血组织的血供,减缓疾病进程和改善疾病预后是一条值得探索的途径。此外 netrin-1 在肿瘤的发生发展中也起着重要作用,包括对细胞凋亡、肿瘤血管生成、癌细胞转移等的调节作用^[21-22],为肿瘤的临床治疗提供了新的发展方向。

4 小结与展望

神经系统和脉管系统的发生、发展过程中有一系列的分子参与,如已知的 VEGF、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)等。深入的研究发现这些经典的分子并不局限于一个系统内发挥作用,而是参与了两个系统的活动。在神经退行性变疾病中,通常伴有脉管的异常,且与神经元的丢失相平行^[23]。而血管源性因子控制成人神经元存活与变性的基因证据已得到证实^[24-25],基因学研究显示神经源性因子也具有调节血管生成的作用^[26]。Netrins 等神经导向因子在血管生成中的调节作用的发现,使我们对神经系统与脉管系统间的密切联系有了更深入的理解。接下来的研究需要明确 netrin-1 在血管生成的导向中究竟扮演了何种角色,介导其信号的是何种受体,其进一步的信号转导机制是怎样的以及如何最终决定血管的生长方向。相信随着研究的深入,将使 netrins 在血管生成中的导向作用和相关调节变得清晰,为疾病临床治疗提供新的思路与希望。

[参考文献]

- [1] Tessier-Lavigne M, Goodman C S. The molecular biology of axon guidance[J]. *Science*, 1996, 274: 1123-1133.
- [2] Meyerhardt J A, Caca K, Eckstrand B C, Hu G, Lengauer C, Banavali S, et al. Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas[J]. *Cell Growth Differ*, 1999, 10: 35-42.
- [3] Dalvin S, Anselmo M A, Prodhon P, Komatsuzaki K, Schnitzer J J, Kinane T B. Expression of Netrin-1 and its two receptors DCC and UNC5H2 in the developing mouse lung[J]. *Gene Expr Patterns*, 2003, 3: 279-283.
- [4] Liu Y, Stein E, Oliver T, Li Y, Brunken W J, Koch M, et al. Novel role for netrins in regulating epithelial behaviour during lung branching morphogenesis[J]. *Curr Biol*, 2004, 14: 897-905.
- [5] Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system[J]. *Nature*, 2004, 432: 179-186.
- [6] Park K W, Crouse D, Lee M, Karnik S K, Sorensen L K, Murphy K J, et al. The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16210-16215.
- [7] Wilson B D, Ii M, Park K W, Suli A, Sorensen L K, Larriue-Lahargue F, et al. Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis[J]. *Science*, 2006, 313: 640-644.
- [8] Serafini T, Kennedy T E, Gallo M J, Mirzayan C, Jessell T M, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6[J]. *Cell*, 1994, 78: 409-424.
- [9] Kruger R P, Lee J, Li W, Guan K L. Mapping netrin receptor binding reveals domains of Unc5 regulating its tyrosine phosphorylation[J]. *J Neurosci*, 2004, 24: 10826-10834.
- [10] Corset V, Nguyen-Ba-Charvet K T, Forcet C, Moysse E, Chédotal A, Mehlen P. Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor[J]. *Nature*, 2000, 407: 747-750.
- [11] Larrivée B, Freitas C, Trombe M, Lv X, De Lafarge B, Yuan L, et al. Activation of the UNC5B receptor by netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis[J]. *Genes Dev*, 2007, 21: 2433-2447.
- [12] Nguyen A, Cai H. Netrin-1 induces angiogenesis via a DCC-dependent ERK1/2-eNOS feed-forward mechanism[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 6530-6535.
- [13] Popovici C, Isnardon D, Birnbaum D, Roubin R. *Caenorhabditis elegans* receptors related to mammalian vascular endothelial growth factor receptors are expressed in neural cells[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 329: 116-120.
- [14] Chao M V. Trophic factors: An evolutionary cul-de-sac or door into higher neuronal function[J]? *J Neurosci Res*, 2000, 59: 353-355.
- [15] Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia[J]. *J Cell Biol*, 2003, 161: 1163-1177.
- [16] 杨 响, 邹 丽, 徐可树. 轴突导向因子 netrin-1 在子痫前期患者胎盘组织中的表达及其与胎盘新生血管形成的关系[J]. *中华妇产科杂志*, 2006, 41: 597-600.
- [17] Bouvrée K, Larrivée B, Lv X, Yuan L, DeLafarge B, Freitas C, et al. Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis in developing avian embryos[J]. *Dev Biol*, 2008, 318: 172-183.
- [18] Freitas C, Larrivée B, Eichmann A. Netrins and UNC5 receptors in angiogenesis[J]. *Angiogenesis*, 2008, 11: 23-29.
- [19] Fan Y, Shen F, Chen Y, Hao Q, Liu W, Su H, et al. Overexpression of netrin-1 induces neovascularization in the adult mouse brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28: 1543-1551.
- [20] Wu T W, Li W W, Li H. Netrin-1 attenuates ischemic stroke-induced apoptosis[J]. *Neuroscience*, 2008, 156: 475-482.
- [21] Delloye-Bourgeois C, Brambilla E, Coissieux M M, Guenebeaud C, Pedoux R, Firlej V, et al. Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101: 237-247.
- [22] Roperch J P, El Oudrani K, Hendrix A, Emami S, De Wever O, Melino G, et al. Netrin-1 induces apoptosis in human cervical tumor cells via the TAp73alpha tumor suppressor[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 8231-8239.
- [23] Marchal G, Serrati C, Rioux P, Petit-Taboué M C, Viader F, de la Sayette V, et al. PET imaging of cerebral perfusion and oxygen consumption in acute ischaemic stroke: relation to outcome[J]. *Lancet*, 1993, 341: 925-927.
- [24] Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano M P, Appelmans S, Oh H, et al. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS[J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8: 85-92.
- [25] Wang Y, Jin K, Mao X O, Xie L, Banwait S, Marti H H, et al. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration[J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85: 740-747.
- [26] Kermani P, Hempstead B. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17: 140-143.