

## • 综 述 •

## Robo4 与血管生成和缺血性脑卒中相关的研究进展

付国娇 向文强 籍凌蔚 杜怡丹 马学玲

【中图分类号】 R743.3    【文献标识码】 A    【文章编号】 1007-0478(2020)02-0244-04  
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.02.027

缺血性脑卒中作为危害人类健康的一类重大疾病,具有较高发病率、病死率、致残率等特点,给家庭和社会造成严重的负担。脑组织由于其不可再生性,使得缺血性脑卒中的治疗成为困扰全球的一类重大难题,然而血管的可再生性使其成为治疗缺血性脑卒中的重中之重。Robo4 是近年来发现的内皮细胞特异性受体,具有调节内皮细胞增殖、迁移,调节血管的通透性,维持血管完整性等作用。本研究对 Robo4 的结构、生物学特性以及其在治疗缺血性脑卒中的作用研究进展做一综述。

### 1 Robo4 的基本结构

Robo 蛋白最初在研究轴突导向因子 Slit 蛋白中而被发现。Robo4 蛋白是一种单程跨膜受体,在血管生成相关的研究中逐渐被发现,属于神经导向分子 Robo 家族。Robo 家族有 Robo1、Robo2、Robo3、Robo4 四位成员,它们均由 1000-1600 个氨基酸组成。其中 Robo1 蛋白是最早被发现的,它包括 5 个免疫球蛋白样结构域、3 个纤连蛋白Ⅲ型重复序列组成的胞外区以及 1 个单一跨膜结构域和 4 个保守的 Robo 特异性序列(CC0、CC1、CC2、CC3)组成的胞内区<sup>[1]</sup>。随后研究人员又相继发现了 Robo 家族的其他成员 Robo2 和 Robo3,它们的胞外区与 Robo1 类似。Robo4 是新近发现的 Robo 受体家族成员,也称魔法回旋,与 Robo 家族其他成员不同,它的胞外区的分子结构仅由 3 个纤连蛋白重复序列和 2 个免疫球蛋白样结构域组成,与 Robo1 中前 2 个免疫球蛋白样结构域的同源性最大,为 42%;而 Robo4 的胞内区只由 CC0 和 CC2 组成<sup>[2]</sup>。这些基序被认为是 Robo4 蛋白与各种细胞内蛋白和蛋白激酶结合的位点,从而参与细胞内信号传递。Robo4 与其他 Robo 家族成员的这种结构差异也导致了功能上的差异。

### 2 Robo4 的生物学特性

Robo4 是一种内皮特异性受体,通过与不同的配体结合参与内皮细胞迁移、增殖、血管生成和维持血管稳态,参与多

种疾病的病理生理过程,然而迄今为止它的主要作用途径还不甚清楚。

Robo4 有关肿瘤血管生成的研究较为丰富,Robo4 被认为是在各种肿瘤实体内的血管网络中表达的肿瘤标记物。内皮细胞的增殖、迁移和管状形成是肿瘤血管生成的关键步骤,Robo4 参与了肿瘤新血管的形成。有研究人员在前列腺癌的研究中发现,Robo4 不仅在肿瘤基质中表达,在癌上皮细胞中也有表达,并且发现肿瘤恶性程度越高,Slit2 和 Robo4 在肿瘤内的表达水平越高,并且发现高水平 Robo4 的患者倾向于降低生化复发率<sup>[3]</sup>。这反映了 Robo4 在肿瘤中抗血管生成的保护作用。此外,Robo4 对其他系统疾病也有作用。Stephanie 等<sup>[4]</sup>在研究中发现血管内皮细胞通过引导 Robo4,积极地促进造血干细胞从血液向骨髓迁移,并且通过形成血管屏障来阻止其从骨髓到血液的外溢,从而加强造血干细胞在骨髓中的定位。还有研究人员发现,敲除 Robo4 可以防治高脂肪饮食诱导的动脉粥样硬化和全身代谢功能障碍<sup>[5]</sup>。Russell 等<sup>[6]</sup>发现 Robo4 的变异使人容易患上主动脉瓣和胸主动脉瘤;在内皮细胞中靶向沉默或突变 Robo4 基因的表达可导致屏障功能受损和内皮向间质的过渡。Eloisa 等<sup>[7]</sup>人发现 Slit2 循环水平的增加和 Slit2/Robo4 抗血管生成轴的激活,可能与系统性硬化症中早期微血管损伤导致的血管生成的减少和周围毛细血管的丢失有关。Weng 等<sup>[8]</sup>发现 Slit2/Robo4 信号通路对输注致急性肺损伤模型内皮高通透性的调节作用<sup>[8]</sup>。Robo4 可以促进糖尿病视网膜病变的细胞迁移和增加血管通透性,促进病情进展,而在 Robo4 敲除的小鼠中并没有发现此作用<sup>[9]</sup>。Tang 等<sup>[10]</sup>在 mRNA 水平证实 Robo4 在脉络膜内皮细胞中表达,并且在一定范围内添加越多的外源性 Slit2,Robo4 的表达就越多,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导的脉络膜内皮细胞迁移和管腔形成就越少。也就是说,Slit2/Robo4 信号通路可以调控脉络膜血管生成。由此可见,Robo4 在调节血管功能方面参与多种疾病的病理生理过程。

### 3 Robo4 对血管的作用

#### 3.1 Robo4 的表达和分布

Robo 受体家族广泛分布于全身,Robo1 在神经系统和血管系统中都有表达,Robo2 和 Robo3 在神经系统中高表达,但在血管系统中无法追踪<sup>[11]</sup>。而这个家族的最新成员 Robo4,研究人员通过生物信息数据挖掘证实,它是一种新

基金项目:国家自然科学基金项目(81441039);哈尔滨医科大学附属第四医院基金项目(HYDSYJQ201506);哈医大四院非纵向课题(ET170602002)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四医院[付国娇 向文强 籍凌蔚 杜怡丹 马学玲(通信作者)]

的内皮细胞特异性蛋白,在血管内皮细胞表面特异性表达,包括肿瘤、视网膜、脑血管等全身各个血管系统<sup>[12]</sup>。其主要作用在于调节血管内皮细胞功能,参与调节血管生成<sup>[13]</sup>。它在胚胎发育中也有着不可替代的作用,有研究表明 Robo4 参与调节胚胎发育中的血管生成<sup>[14]</sup>。Slit-Robo 信号通路是哺乳动物中一种保守的轴突引导信号,其同源性配体 Slit 也广泛在脉管系统中表达。这说明从空间分布上来看 Robo4 容易接受到其配体发出的信号,并将其传递给下游的信号传导分子,从而调节血管内皮功能。

### 3.2 Robo4 与不同配体结合对血管内皮细胞的作用

#### 3.2.1 Slit2

Robo 家族的配体目前研究最多的就是 Slit 蛋白。Slit 蛋白是一种分泌型糖蛋白,最初在果蝇中被发现,而后在哺乳动物体内也有发现。Slit 家族有 Slit1、Slit2、Slit3 三位成员。它们具有类似的分子结构,包括 1 个 N-末端信号肽、4 个富含亮氨酸重复序列(Leucine rich repeat, LRR)、若干个表皮生长因子样结构域、1 个层黏连蛋白 G 样结构域和 1 个 C-末端富含半胱氨酸结构域<sup>[15]</sup>。Slit1 仅在神经系统中有表达,Slit2 和 Slit3 在神经系统、肾脏、肺脏、内皮细胞中均有表达<sup>[16]</sup>,其中 Slit2 和 Slit3 蛋白被证明可以与 Robo4 相互作用。Slit2 蛋白是一种主要由星形胶质细胞分泌的轴突导向因子,由 1500 个氨基酸组成,可以被切割成 Slit2-n 末端和 Slit2-c 末端。在哺乳动物体内 Slit2 通过第 2 个 LRR 序列与人 Robo1 或 Robo2 的前 2 个免疫球蛋白样结构域结合<sup>[17]</sup>。Robo4 由于缺乏与 Slit2 结合的位点,所以 Robo4 是如何与 Slit2 作用尚存在争论。

一些学者认为,Robo4 与 Slit2 直接作用来调控细胞迁移、细胞增殖和血管通透性。Park 等人发现 Slit2 通过抑制 VEGF 诱导的内皮细胞迁移、血管通透性以及管腔形成来维持血管完整性。这是通过阻断 Robo4 阳性内皮细胞中非受体酪氨酸激酶的激活而发生的,而在 Robo4 阴性的细胞内则无此作用<sup>[18]</sup>。这些结果提示 Slit2 以 Robo4 相关的方式起作用,并且他们观察到 Slit2 与 Robo4 的免疫共沉淀,Slit2 与完整细胞膜上的 Robo4 结合,支持了 Slit2 是 Robo4 配体的假设<sup>[18]</sup>。还有一些学者认为,与 Slit2 结合的残基在 Robo4 中并不保守,而是被与 Slit2 结合不相容的残基所取代。添加可溶性 Robo4 能够抑制血管生成、内皮细胞迁移和生长,但它不能与任何已知 Slit 蛋白相互作用,而 Robo1 可以与所有 3 个已知 Slit 相互作用<sup>[19]</sup>。这表明与 Robo4 相比,Robo1 与 Slit2 具有更高的绑定效率。在体外培养的内皮细胞中已发现 Robo4 与 Robo1 共沉淀,表明 Robo1-Robo4 异二聚可以作为 Robo4 对 Slit2 反应的中介物<sup>[20]</sup>。因此,他们认为 Robo4 通过 Slit2/Robo1-Robo4 相互作用来保持血管完整性,并且由于 Slit2 与 Robo1 之间更有效的结合,它优先与 Robo1 结合,从而导致缺乏游离 Slit2 和增强了 Slit2/Robo1-Robo4 信号传递促进血管完整性的信号。

Src 依赖的 Rac1 活化对于 VEGF 诱导的内皮细胞迁移和渗透性是必不可少的。Slit2 对内皮细胞的作用降低了 VEGF 刺激的 Src 家族激酶磷酸化,从而阻止了 Rac 1 的激活,提示 Slit2/Robo4 信号通路可以对抗 VEGF 信号<sup>[21]</sup>。还

有研究人员发现,Robo4 通过与胞内适配蛋白 Paxillin 直接相互作用而介导上述机制。Robo4-Paxillin 复合物的形成阻断了 GTPase ARF 6 的激活,从而阻断 Rac,抑制 VEGF 诱导的内皮细胞迁移和血管通透性<sup>[22]</sup>。这些数据强烈提示,Slit2-Robo4-Paxillin 通路通过抑制 VEGF 诱导的内皮细胞迁移和血管形成来维持血管完整性,因此可能成为治疗血管系统疾病的新靶点。

#### 3.2.2 Slit3

最近有研究发现,轴突导向因子 Slit3 是一种新的促血管生成因子,由“周细胞”分泌,通过与 Robo4 结合,促进内皮细胞的增殖和迁移。有研究表明,Slit 与 Robo 结合需要硫酸乙酰肝素(Heparan Sulfate, Hs)作为媒介,轴突导向分子 Slit3 是一种新的 Hs 结合蛋白。它的前 2 个 LRR 结构域和 C-末端胱氨酸结构域与 Hs 结合后 Hs 再与 Robo 前 2 个免疫球蛋白样结构域结合,从而使 Slit3 和 Robo 结合起来,介导血管生成<sup>[23]</sup>。然而,Slit-Robo-Hs 信号复合物的结构目前尚不清楚。有研究表明,NDST1 参与 Hs 的生物合成,而 Slit3 与 Hs 结合是其与 Robo4 作用的重要前提。当 Zhang 等<sup>[24]</sup>研究先天性膈疝(CDH)的病因时 NDST1 基因敲除的小鼠膈肌血管化缺陷与 Slit3 敲除的小鼠相似;当同时敲除 Robo4 基因时,血管生成出现更严重的缺陷;在体外在没有 NDST 1 的情况下 Slit3 诱导的 Rho GTPase 家族成员的细胞迁移和激活被阻断,这意味着 Hs 以内皮细胞自主的方式发挥促进 Slit3-Robo4 信号传递的功能。也有研究发现,Slit3 作为 Robo4 的天然配体,与 Robo4 相互作用,促进内皮细胞的增殖、迁移、管状形成和微血管的萌发,显示了 Robo4 在哺乳动物中的促血管生成功能。当加入抗 Robo4 抗体一起培养,则完全抑制了由 Slit3 诱导的人脐静脉内皮细胞的迁移,这表明来自 Slit3 的促血管生成信号通过 Robo4 转导<sup>[25]</sup>。

#### 3.2.3 UNC5B

Unc5 受体家族最初被认为是参与轴突引导的跨膜受体家族,它包括 Unc5a-d。它们在细胞凋亡、血管生成中发挥重要作用。其中,Unc5b 在 Robo4 的通路研究中备受关注。Robo4 的胞外结构域与 Unc5b 胞外结构域的相互作用可能是维持血管完整性的必要条件。有研究发现,血管内网状受体 Unc5b 在内皮细胞中表达,它通过与 Robo4 相互作用,抑制 VEGF 介导的 Src 激活,从而维持血管完整性,调节血管生成<sup>[26]</sup>。还有研究人员发现,加入外源性 Robo4 可以抑制 VEGF 诱导的血管通透性,并可以修复 Robo4 基因缺陷的小鼠;但在小鼠体内使用抗 Unc5b 时则没有这种作用<sup>[27]</sup>。因此,Robo4-Unc5b 信号通过抑制 VEGF 信号来维持血管完整性,从而确定了血管中一种新的引导受体相互作用的功能。

## 4 Robo4 与缺血性脑卒中

脑血管疾病是危害人类身体健康的重要疾病之一。缺血性脑卒中为脑血管疾病的主要临床类型,是目前导致人类死亡的第二位原因,也是单病种致残率较高的疾病,约 2/3 的幸存者遗留不同程度的残疾。近年来,随着人口老龄化的

加剧以及人们生活习惯和饮食结构的改变,缺血性脑卒中发病率逐年提高。据 2017 年 Ness-China 中国脑卒中流行病学调查研究,我国脑卒中发病率 345.1/10 万人年,死亡率 159.2/10 万人年,患病率 1596.0/10 万人年,给全世界公共卫生事业带来沉重的压力。脑卒中中以突然发病、迅速出现局限性或弥散性神经功能缺损为共同临床特征,具有较高发病率、病死率、致残率的特点,给社会和家庭造成沉重的负担。脑卒中包括缺血性脑卒中和出血性脑卒中,其中缺血性脑卒中占有脑卒中的绝大多数,占 70%~80%。缺血性脑卒中已经成为危害人类健康的一类重大疾病。缺血性脑卒中是指各种原因所致脑部血液供应障碍,导致局部脑组织缺血、缺氧性坏死而出现相应神经功能缺损的常见神经系统疾病。促进脑血管再生是治疗急性缺血性脑卒中的关键。

Li<sup>[28]</sup> 等人发现,在缺氧损伤的人脑内皮细胞中 Annexin A2 作为 Robo4 的配体能有效地抑制连接蛋白的表达,降低跨内皮通透性,这些保护作用部分是通过调节 Robo4-Paxilin-ARF 6 信号传导通路的能力来实现的。也就是说,Robo4 可能与维持脑血管损伤后的内皮紧密性有关。Robo4-Paxilin-ARF 6 信号传导通路可作为保护血脑屏障的潜在治疗靶点。Prativa 等<sup>[29]</sup> 在外科脑损伤的研究中发现,Slit2-Robo4-Paxilin 介导的 Rac 1 激活可以稳定血脑屏障的紧密连接,降低脑损伤诱导的血脑屏障通透性,有利于血脑屏障的保护。糖尿病患者通过增加 VEGF 血管生成信号来促进脑新生血管形成,而 Robo4 蛋白是一种内源性 VEGF 信号抑制剂,具有稳定血管的作用。Mohammed 等<sup>[30]</sup> 发现由于 Robo4 与 VEGF 激活的  $\beta 3$  整合素结合,在糖尿病患者脑血管中 VEGF 信号的增加降低了 Robo4 的表达和可用性,并且 Robo4 的过度表达也降低了 VEGF 诱导的血管生成信号,减少了糖尿病患者的脑新生血管形成;选择性 VEGFR-2 拮抗剂 sklb 1002 对 VEGF 信号的抑制作用降低了 Robo4- $\beta 3$  整合素的相互作用,从而增加 Robo4 的表达和可用性,起到稳定糖尿病患者脑新生血管的作用。以上研究结果说明,Robo4 在脑血管相关的研究中有着不可替代的作用。

## 5 总结与展望

血管内皮细胞是血管壁的主要组成细胞。细胞之间紧密连接形成血管内皮,它是大分子物质从血液到组织最重要的屏障,是最先感受组织缺血、缺氧的细胞。血管内皮受损,暴露的内皮下层可使血小板粘附、聚集,导致血栓形成,严重者可出现主要血管闭塞,严重影响相应供血区域脑组织的功能,而且受刺激的内皮细胞可释放组织因子促进凝血因子 XII 参与的外源性凝血过程,加速血栓形成。因此,维持血管内皮细胞功能是治疗缺血性脑卒中的关键。血管和神经都是脑组织间的重要通道,促进血管的功能有助于促进其周围的神经恢复,从而使缺血的脑组织功能得以改善。近年来,Robo4 的发现成为血管研究领域的一项重大突破。Robo4 是一种血管内皮特异性受体,在全身血管内皮细胞表面广泛表达,它在细胞迁移、血管形成、调节血管通透性和维血管完整性方面有着不可替代的作用。血管形成涉及多种机制。它已经被证明在肿瘤、糖尿病视网膜病变、脑血管病等

多种疾病中有着不可替代的作用。通过与不同配体结合,参与调节内皮细胞迁移及血管形成,降低血管通透性,维持血管完整性。目前,Robo4 及其相关的信号通路的研究仍处于初级阶段,其有关脑血管病的研究更需进一步开展,这将为 Robo4 治疗缺血性脑卒中在血管生成方面提供新的临床治疗思路,为缺血性脑卒中的临床治疗提供新的方向。

## 参 考 文 献

- [1] Dickson BJ, Gilestro GF. Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its robo receptors[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006, 22(1): 651-675.
- [2] Kidd T. Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors[J]. *Cell*, 1998, 92(2): 205.
- [3] Pircher A, Schaefer G, Eigentler A, et al. Robo 4-the double-edged sword in prostate cancer; impact on cancer cell aggressiveness and tumor vasculature[J]. *Int J Med Sci*, 2018, 41(4): 323.
- [4] Smith-Berdan S, Nguyen A, Hong MA. ROBO4-Mediated vascular integrity regulates the directionality of hematopoietic stem cell trafficking[J]. *Stem Cell Reports*, 2015, 4(2): 255-268.
- [5] Phuong TT, Walker AE, Henson GD, et al. Deletion of Robo4 prevents high-fat diet-induced adipose artery and systemic metabolic dysfunction [J]. *Microcirculation*, 2019, 26(5, SI): e12540.
- [6] Gould RA, Aziz H, Woods CE, et al. ROBO4 variants predispose individuals to bicuspid aortic valve and thoracic aortic aneurysm[J]. *Nat Genet*, 2019, 51(1): 42.
- [7] Romano E, Manetti M, Rosa I, et al. Slit2/Robo4 axis May contribute to endothelial cell dysfunction and angiogenesis disturbance in systemic sclerosis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(11): 1665-1674.
- [8] Weng J, Zhou XM, Xie H, et al. Slit2/Robo4 signaling pathway modulates endothelial hyper-permeability in a two-event in vitro model of transfusion-related acute lung injury[J]. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 2019, 76: 7-12.
- [9] Gong QY, Li FQ, Xie J, et al. Upregulated VEGF and Robo4 correlate with the reduction of miR-15a in the development of diabetic retinopathy[J]. *Endocrine*, 2019, 65(1): 35-45.
- [10] Jiang SQ, Du Y, Liu BN, et al. Inhibitory effect of slit2-N on VEGF165-induced proliferation of vascular endothelia via slit2-N-Robo4-Akt pathway in choroidal neovascularization[J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(11): 1241-1253.
- [11] Huminiecki L, Gorn M, Suchting S, et al. Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis[J]. *Genomics*, 2002, 79(4): 547-552.
- [12] Dai C, Gong QY, Cheng Y, et al. Regulatory mechanisms of Robo4 and their effects on angiogenesis[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(7): 1-34.
- [13] Yadav S S, Narayan G. Role of ROBO4 signalling in developmental and pathological angiogenesis[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 1-9.