

Eph/Ephrin 信号通路在缺血性心脏病血管生成中的研究进展

施国荣 刘婷婷 田欣 祝自新 郑文荣 王宇峰 孙芳玲 王文

(北京市老年病医疗研究中心 首都医科大学宣武医院实验动物室, 北京 100053)

【摘要】 缺血性心脏病主要是粥样硬化病变导致冠状动脉梗阻而引起心肌缺血后的左心室发生一系列病变问题,在中老年人群中的发病率和死亡率逐年增高。Eph/ephrin 信号对心脏发育及血管生成等过程具有重要的作用,很可能作为心脏功能调控的关键途径。现对 Eph/ephrin 信号通路在血管发育及再生中的作用机制的研究进展进行综述,以期对缺血性心脏病的有效治疗提供参考。

【关键词】 缺血性心脏病; Eph/ephrin 信号通路; 血管再生

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2021.02.016

Eph/Ephrin Signaling Pathway in Angiogenesis of Ischemic Heart Disease

SHI Guorong, LIU Tingting, TIAN Xin, ZHU Zixin, ZHENG Wenrong, WANG Yufeng, SUN Fangling, WANG Wen

(Beijing Geriatrics Medical Research Center, Xuanwu Hospital Animal Laboratory, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

【Abstract】 Ischemic heart disease is mainly caused by atherosclerotic lesions, which leads to coronary artery obstruction, and a series of pathological changes of left ventricle. The morbidity and mortality of myocardial ischemia in middle-aged population are rapidly increasing year by year. Since Eph/ephrin signaling pathway is essential for heart development and vessels formation, it might play an important role in heart function recovery. This paper reviews the research progresses of Eph/ephrin pathway in the development and regeneration of vascular, to provide an insight into the treatment of ischemic heart disease.

【Key words】 Ischemic heart disease; Eph/ephrin pathway; Angiogenesis

近年来缺血性心脏病的发病率和死亡率居高不下,如何有效地改善心脏功能和预后一直是缺血性心脏病治疗的难题。寻求有效的靶点和策略解决心肌受损和微血管数量减少的问题,对增加心肌再灌注和恢复心脏功能有重大的意义^[1]。Eph/ephrin 家族是哺乳动物体内最大的酪氨酸激酶受体家族,在心脏发育过程中至关重要^[2]。研究证实,缺乏 EphrinB2 或 EphB4 的小鼠胚胎会死于严重的心血管系统畸形^[3]。而在缺血性心血管疾病中,缺血缺氧可诱导内皮细胞(endothelial cell, EC)、周细胞和炎症细胞等不同细胞的 Eph/ephrin 信号的表达,诱导血管生成,进而恢复受损心脏的功能^[4]。现对 Eph/ephrin 信号家族在心血管发育和缺血性心脏病中的作用进行综述,此外还将介绍几种有关 Eph/ephrin 信号潜在的治疗方式,以期对缺血性心脏病后的再生修复治疗研究提供线索。

1 Eph/ephrin 家族

1.1 Eph/ephrin 家族结构特点和功能

Eph/ephrin 信号通路是一类非常保守的蛋白受体酪氨酸激酶家族,根据序列的同源性、锚定方式及结合嗜性等分为 A 和 B 两个亚型,目前 Eph/ephrin 在哺乳动物的体内共有 14 个受体和 8 个配体,包括 EphA (A1 ~ A8 和 A10)、EphB (B1 ~ B4 和 B6)、EphrinA (A1 ~ A5) 和 EphrinB (B1 ~ B3)。Eph 受体都具有相似的结构:细胞外部分、单个跨膜区域和胞浆内部分^[5]。细胞外部分由球形配体结合结构域组成:一个类似表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、富含半胱氨酸的区域和两个纤连蛋白Ⅲ型的重复序列。细胞内部分由近膜部分、酪氨酸激酶区域、无菌 α 基序结构域和 postsynaptic density-95/discs large/zona occludens-1 (PDZ) 结合结构域组成^[6]。与 Eph 相比, EphrinA 和 EphrinB 具有不同的结构, EphrinA 在细胞外部分具有

基金项目:国家自然科学基金(81503049, 81573633)

通信作者:孙芳玲, E-mail: sun_fangling@163.com; 王文, E-mail: lzwwang@163.com

Eph 受体结合结构域并通过糖基磷脂酰肌醇连接至细胞膜,无胞质结构域;而 EphrinB 包含一个 Eph 受体结合结构域、一个跨膜区域和一个胞质部分,其中胞质部分具有多个酪氨酸和丝氨酸磷酸化位点以及一个 PDZ 结合基序^[7]。研究发现,EphB4 是 EphrinB2 的特异性受体^[7]。

Eph/ephrin 信号的传导是双向的,即 Eph 和 Ephrin 可互相激活。Ephrin 激活相邻细胞,Eph 受体的胞质内酪氨酸激酶结构域通过自磷酸化来启动正向信号传导;Ephrin 的末端区域可通过 PDZ 依赖的方式来启动反向信号传导。Eph/ephrin 调控的双向信号传导在心脏发育中具有重要意义,可指导心肌循环的完成、心内膜的扩张、心肌小梁形成和心脏瓣膜的形成以及心脏谱系分化的发展^[8]。除心脏发育外,Ephrin 信号还参与病理性心脏重构过程,包括心肌缺血后线粒体功能调节和心脏损伤或心肌纤维化后的血管新生等过程。

1.2 EphB4 下游信号传导方式

EphB4 下游信号传导具有复杂的机制。PI3K/Akt 信号通路可介导 EphB4 诱导 EC 增殖,抑制 EphB4 可降低 Akt 磷酸化,从而抑制细胞的增殖^[5]。使用 PI3K、Akt、PKG 和甲乙酮(methyl ethyl ketone, MEK)的阻滞剂可抑制 EphB4 诱导 EC 增殖。但 Ras 和 Src 信号传导途径对增殖反应无影响^[3]。Akt 可特异性磷酸化内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS),增加 EphB4 激活后的亚硝酸盐的产生,从而激活 cGMP-PKG 信号通路^[6]。cGMP-PKG 信号通路可激活下游信号 Raf 产生 MEK,因而 EphB4 诱导的增殖信号部分可能是通过 PI3K/Akt-eNOS/NO-cGMP/PKG-Raf/MEK 激酶级联介导的^[6]。

1.3 EphrinB2 下游信号传导方式

与正向 EphB4 信号传导不同,由于缺乏内在的催化活性,EphrinB2 介导的反向信号依赖于募集信号分子^[2]。EphrinB2 的反向信号募集信号分子的方式有两种。其一,EphrinB2 的磷酸化由 Src 家族激酶的募集介导,然后与含 SH2/SH3 域的衔接子蛋白如 Grb4 和信号转导及转录活化因子 3 结合^[2]。Grb4 诱导多种细胞骨架调控信号介导 EC 的迁移,例如局部黏着斑激酶、G 蛋白偶联受体激酶 1、动力蛋白、Cbl 相关蛋白、Abl 相互作用蛋白和 p21 活化激酶^[2]。信号转导及转录活化因子 3 蛋白将 EphrinB 信号从细胞膜传递到细胞核,通过 EphrinB 反向信号传导参与到细胞外基质介导的 EC 和周细胞的组装过程中。其二,含 PDZ 的蛋白质被募集到 EphrinB2 的 PDZ 结合基序上,用于介导磷酸化无关的信号传导,这对于血管生成过程以及新生血管的稳定非常重要^[2]。含 PDZ 蛋白质

的 G 蛋白信号调控因子和蓬乱蛋白 2 可能与依赖 PDZ 的 EphrinB2 反向信号传导有关^[2]。含 PDZ 蛋白质的 G 蛋白信号调控因子可能通过调节 G 蛋白信号通路来介导 EphrinB2 反向信号传导,但是 EphrinB2 反向信号介导血管生成的准确机制还需进一步地研究。

1.4 Eph/ephrin 信号通路与其他信号通路之间的串扰

Eph/ephrin 信号通路参与肿瘤血管生成、肿瘤生长和转移扩散的关键过程。通过肿瘤细胞-血管细胞相互作用和血管细胞中受体非依赖性的 Ephrin 功能,EphrinB2 和 EphB4 调节肿瘤新血管的形成^[9]。通过传导肿瘤血管生成信号血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)/血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)的受体 VEGFR2 和 VEGFR3, EphrinB2 可调节肿瘤的生长和血管形成^[9]。

在缺血性心脏病中, DLL4/Notch 和 VEGF/VEGFR 信号通路都会与 Eph/ephrin 信号通路发生串扰且影响血管的新生。通过 VEGF 诱导 DLL4/Notch 是新生血管形成中必不可少的途径,且可选择性地促进 EphrinB2 的表达^[10]。VEGF 通过 PI3K/Akt 途径激活叉头框转录因子诱导 DLL4-Notch 信号传导^[10]。Notch 信号通过转录介质 RBPJ 蛋白参与 EphrinB2 的表达^[7]。通过阻断 DLL4 和使用可溶性 EphrinB2 治疗,诱导心脏中非功能性血管的生成,进而增加血管密度。

2 Eph 信号与血管生成

2.1 Eph 信号在心脏血管发育中的作用

EphrinB2 是 Eph/ephrin 家族在心脏发育中非常重要的成员。EphrinB2 全基因敲除小鼠会在胚胎期的第 11.5 天死亡,该类小鼠的心脏经观察后发现有心脏循环不完全、心内膜扩张失败和心肌小梁形成缺陷等问题^[11]。敲除 EphrinB2 的 PDZ 结合结构域(抑制 EphrinB2 反向信号)导致的小鼠死亡率与 EphrinB2 整体敲除的无差异,说明在心脏早期发育的过程中 EphrinB2 是传导反向信号的配体;而敲除 EphrinB2 的 PDZ 结合结构域后注射 β 半乳糖则可使小鼠胚胎发育完全且正常出生,这表明 EphrinB2 突变蛋白保留了表面结合活性且可介导正向信号传导。由此可见 EphrinB2 的双向传导都参与胚胎期的心脏发育过程^[12]。

在心脏血管发育过程中,EC 与其他支持细胞通过自分泌和旁分泌形式激活 EphrinB2 的双向传导^[13]。EphrinB2 参与 VEGF 信号传导促进发育性血管生成,参与方式是通过 EphrinB2 依赖于 PDZ 的反向信号调

控 EC 中 VEGF 的受体 VEGFR2 和 VEGFR3^[14]。EphB4 也能通过磷酸化细胞外调节蛋白激酶调节 VEGFR2 信号传导。

2.2 Eph/ephrin 信号在缺血性心脏损伤后血管生成中的作用

血管重建可治疗心肌梗死和缺血再灌注损伤,且促进受损的心肌恢复^[15]。新血管的生成有以下三种方式:通过出芽的方式从先前存在的血管中生成毛细血管,由内皮祖细胞生成新血管和由小侧支动脉形成血管。

EphrinB2 和 EphB4 可促进小鼠心肌梗死模型中功能性新血管的生成,但 EphrinB2 在体外培养的 EC 中的过度表达则无法导致细胞形态和功能的改变^[16]。因此使用 EphrinB2-Fc(重组小鼠 EphrinB2 蛋白)可能成为促进缺血性心血管疾病早期血管新生的有效途径。在培养的人主动脉 EC 中,EphrinB2-Fc 可诱导细胞增殖;在小鼠主动脉环血管生成模型中,EphrinB2-Fc 可诱导出芽式血管形成;小鼠心肌梗死后梗死区的 EC 增殖加速,在用 EphrinB2-Fc 治疗后 EC 增殖速度更快^[17]。在结扎小鼠左前降支动脉诱发心肌梗死模型后的第 2 天开始每天腹腔注射 EphrinB2-Fc 20 μg/25 g,分别取 14 d 和 28 d 的小鼠心脏进行免疫荧光染色,发现 14 d 的小鼠心脏在心肌中检测出 EC 有丝分裂增加;28 d 的小鼠梗死周围的毛细血管密度增加 28%,达到未梗死区域相同的水平^[17]。

EphrinA1 蛋白和 EphA 受体在心肌梗死后血管生成中也有显著作用。由肿瘤坏死因子-α、白介素-1β 和 VEGF 诱导 EphrinA1 通过整合素 αvβ3 刺激 EC 黏附和细胞骨架改变,最终引起旧血管的不稳定^[18-19]。VEGF 和肿瘤坏死因子-α 也通过诱导 EphA1 的表达,引起 EC 迁移和血管生成。而在心肌梗死发生后,心肌细胞中 EphrinA1 的表达量增加。通过在永久性冠状动脉闭塞小鼠模型的心肌中注射 EphrinA1-Fc 可显著调节 Eph 受体的 mRNA 表达变化:EphA1 的表达显著增加,导致梗死面积的减少^[20]。通过阻塞冠状动脉左前降支 30 min 制作小鼠的缺血再灌注模型,结扎后立刻在梗死的边缘注射 EphrinA1-Fc,使梗死面积比对照组减少 46%,蛋白代谢水平得以恢复正常,心脏能正常运行^[20]。对小鼠的缺血再灌注模型使用 EphrinA1-Fc 的优异表现说明外源性给予 EphrinA1-Fc 起到的心脏保护作用可能是以后心肌梗死的有效治疗方式。

3 Eph/ephrin 信号潜在的治疗方式

3.1 蛋白酶分解 EphrinB 家族配体

EphrinB 家族配体(EphrinBs)的蛋白酶调节对于

发育和疾病具有广泛的意义。特异性蛋白酶的阻断可能是抑制异常的 EphrinBs 功能的有效方法。使用蛋白酶将 EphrinBs 的胞外、跨膜和胞内结构域分离,从而避免与 Eph 相互作用^[21]。其中去整合素-金属蛋白酶(a disintegrin and metalloprotease, ADAM)家族的蛋白酶 ADAM10,可在细胞外裂解 EphrinB2,而 ADAM8 和 ADAM13 可裂解其他 EphrinBs^[22]。此外,基质金属蛋白酶也可胞外裂解 EphrinBs。通过与 EphBs 的相互作用,基质金属蛋白酶 8 裂解 EphrinB1 作用得到增强^[22]。这些 EphrinBs 胞外域的蛋白水解片段保留了与 EphBs 的结合活性,还具有调节胚胎发育、血管生成和心肌纤维化的功能。另外 γ 分泌酶分解 EphrinB2 的胞内结构域可使 EphrinB2 反向信号得到增强^[22]。

3.2 重组细胞外结构域和抗体

Eph/ephrins 的重组细胞外结构域(extracellular domain, ECD)已被广泛地研究,作为可溶性替代物激活和抑制双向信号传导^[23]。EphrinB2-Fc 可通过激活 EphB 正向信号传导进而促进血管生成^[23]。ECD 与 Fc 结构域或白蛋白的偶联可进一步延长其在体内的半衰期^[23]。将 EphrinB2 ECD 与仿生纤维蛋白载体共价偶联,可实现 EphrinB2 的靶向传递^[24]。这种靶向传递可使得局部血管得以重建,促进其局部治疗性血管的生成^[24]。近年来,新型的 EphrinB2 ECD 可溶性生物聚合物及 EphrinAs ECD 纳米颗粒被制备出来,这些纳米级技术可在靶细胞中准确调节 Eph/ephrin 信号传导,这在新兴的纳米疗法中具有广阔的前景^[24]。

虽然 EphrinB2 ECD 可作为可溶性配体激活 EphBs,但可溶性的 EphB4(soluble EphB4, sEphB4)ECD 及其优化形式 sEphB4-HAS(将人血清白蛋白和 sEphB4 融合)可抑制 EphB4/ephrinB2 双向信号^[22]。由于 EphB4/ephrinB2 双向信号被抑制,体外 EC 会发生功能障碍以及体内治疗性血管重建无法正常运行。因此,sEphB4 可用于抗血管生成治疗和抑制 EphrinB2 反向信号。此外,特异性靶向 EphrinB2 和 EphB4 的抑制性抗体在抑制血管生成以及治疗肿瘤方面有较高的疗效^[25]。

4 总结与展望

Eph/ephrin 信号通路作为心脏发育过程中的关键调控途径,在缺血性心脏病的病理生理过程和治疗策略研究中具有重大意义。目前对其治疗缺血性心脏病的研究还停留在临床前研究阶段。在动物实验中通过外源性地给予 EphrinB2-Fc 和 EphrinA1-Fc 等可促进心脏中的血管生成。通过基质金属蛋白酶、ADAM 和 γ 分泌酶等裂解 EphrinB,合成 Ephrin 或 Eph 重组 ECD,将为调控 Eph/ephrin 信号治疗缺血性心脏病提供潜在方法。

参考文献

- [1] Gurunathan A, Ricci K, Iacobas I, et al. Impact of vascular anomalies on the PTEN phenotype in children and young adults[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2020, 67(6):e28258.
- [2] Niethamer TK, Bush JO. Getting direction(s): the Eph/ephrin signaling system in cell positioning[J]. *Dev Biol*, 2019, 447(1):42-57.
- [3] Su SA, Xie Y, Zhang Y, et al. Essential roles of EphrinB2 in mammalian heart: from development to diseases[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1):29.
- [4] Yang D, Jin C, Ma H, et al. EphrinB2/EphB4 pathway in postnatal angiogenesis: a potential therapeutic target for ischemic cardiovascular disease [J]. *Angiogenesis*, 2016, 19(3):297-309.
- [5] Tsakiroglou P, VandenAkker NE, Del Bo'C, et al. Role of berry anthocyanins and phenolic acids on cell migration and angiogenesis: an updated overview [J]. *Nutrients*, 2019, 11(5):1075.
- [6] Luxán G, Stewen J, Díaz N, et al. Endothelial EphB4 maintains vascular integrity and transport function in adult heart[J]. *Elife*, 2019, 8:e45863.
- [7] Chen K, Bai H, Liu Y, et al. EphB4 forward-signaling regulates cardiac progenitor development in mouse ES cells[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(3):467-475.
- [8] Park I, Lee HS. EphB/ephrinB signaling in cell adhesion and migration[J]. *Mol Cells*, 2015, 38(1):14-19.
- [9] Gucciardo E, Sugiyama N, Lehti K. Eph- and ephrin-dependent mechanisms in tumor and stem cell dynamics[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(19):3685-3710.
- [10] Pitulescu ME, Schmidt I, Giaimo BD, et al. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(8):915-927.
- [11] Yuan C, Wang P, Zhu S, et al. Overexpression of ephrinB2 in stem cells from apical papilla accelerates angiogenesis[J]. *Oral Dis*, 2019, 25(3):848-859.
- [12] Cao C, Huang Y, Tang Q, et al. Bidirectional juxtacrine ephrinB2/Ephs signaling promotes angiogenesis of ECs and maintains self-renewal of MSCs [J]. *Biomaterials*, 2018, 172:1-13.
- [13] Ho VC, Fong GH. Vasculogenesis and angiogenesis in VEGF receptor-1 deficient mice[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1332:161-176.
- [14] Groppa E, Brkic S, Uccelli A, et al. EphrinB2/EphB4 signaling regulates non-sprouting angiogenesis by VEGF[J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(5):e45054.
- [15] Gong T, Xu J, Heng B, et al. EphrinB2/EphB4 signaling regulates DPSCs to induce sprouting angiogenesis of endothelial cells[J]. *J Dent Res*, 2019, 98(7):803-812.
- [16] Chen D, Teng JM, North PE, et al. RASA1-dependent cellular export of collagen IV controls blood and lymphatic vascular development[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9):3545-3561.
- [17] Xiao H, Huang Q, Wang JQ, et al. Effect of ephrin-B2 on the expressions of angiopoietin-1 and -2 after focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(11):1784-1789.
- [18] Buckens OJ, El Hassouni B, Giovannetti E, et al. The role of Eph receptors in cancer and how to target them: novel approaches in cancer treatment[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2020, 29(6):567-582.
- [19] Cheng N, Brantley DM, Liu H, et al. Blockade of EphA receptor tyrosine kinase activation inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced angiogenesis [J]. *Mol Cancer Res*, 2002, 1(1):2-11.
- [20] Torres MJ, McLaughlin KL, Renegar RH, et al. Intracardiac administration of ephrinA1-Fc preserves mitochondrial bioenergetics during acute ischemia/reperfusion injury[J]. *Life Sci*, 2019, 239:117053.
- [21] Le MNT, Hasegawa K. Expansion culture of human pluripotent stem cells and production of cardiomyocytes[J]. *Bioengineering (Basel)*, 2019, 6(2):48.
- [22] Kemmerling N, Wunderlich P, Theil S, et al. Intramembranous processing by γ -secretase regulates reverse signaling of ephrin-B2 in migration of microglia[J]. *Glia*, 2017, 65(7):1103-1118.
- [23] Barquilla A, Pasquale EB. Eph receptors and ephrins: therapeutic opportunities [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2015, 55:465-487.
- [24] Protack CD, Foster TR, Hashimoto T, et al. Eph-B4 regulates adaptive venous remodeling to improve arteriovenous fistula patency[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):15386.
- [25] Zheng LC, Wang XQ, Lu K, et al. Ephrin-B2/Fc promotes proliferation and migration, and suppresses apoptosis in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):41348-41363.

收稿日期:2020-07-15

(上接第 157 页)

- [31] Yan L, Zhang Y, Zhang W, et al. lncRNA-NRF is a potential biomarker of heart failure after acute myocardial infarction[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2020, 13(6):1008-1015.
- [32] Matholi M, Shafei AE, Agwa SHA, et al. Identification of novel molecular network expression in acute myocardial infarction[J]. *Curr Genomics*, 2019, 20(5):340-348.
- [33] Zhuo LA, Wen YT, Wang Y, et al. lncRNA SNHG8 is identified as a key regulator of acute myocardial infarction by RNA-seq analysis[J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1):201.
- [34] Salgado-Somoza A, Zhang L, Vausort M, et al. The circular RNA MICRA for risk stratification after myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2017, 17:33-36.
- [35] Zhao B, Li G, Peng J, et al. CircMACF1 attenuates acute myocardial infarction through miR-500b-5p-EMP1 axis[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021, 14(1):161-172.
- [36] Bai M, Pan CL, Jiang GX, et al. CircRNA 010567 improves myocardial infarction rats through inhibiting TGF- β 1[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(1):369-375.
- [37] Sun LY, Zhao JC, Ge XM, et al. Circ_LAS1L regulates cardiac fibroblast activation, growth, and migration through miR-125b/SFRP5 pathway [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(4):443-450.

收稿日期:2020-07-15