

脑缺血后脑内血管新生机制

黄绮娟¹ 综述 李龙宣^{1,2} 审校

1. 广东医学院附属医院神经内科, 广东省湛江市 524001

2. 上海市浦东新区公利医院神经科, 上海市 200135

摘要: 脑缺血发生后, 纤维连接蛋白(Fn)和基底膜聚糖C-端第五功能区(DV)等细胞外基质成分表达增加, 与其相应的受体整合素 $\alpha 5\beta 1$ 或 $\alpha v\beta 3$ 结合, 可引起血管内皮生长因子(VEGF)等生长因子释放增加, 从而启动内源性血管新生, 促进缺血区血供恢复, 挽救濒死的神经元、神经胶质细胞和血管内皮细胞, 有利于神经功能恢复。为进一步研究细胞外基质(Fn、DV)-受体整合素-生长因子(VEGF、Ang)通路在脑缺血后血管新生中的机制, 现对其最新的相关研究做一综述。

关键词: 脑缺血, 血管新生, 纤维连接蛋白, 基底膜聚糖, 血管内皮生长因子, 血管生成素。

缺血性卒中目前是主要的致死和致残性疾病之一, 缺乏特效的治疗方法。目前研究业已发现脑缺血后为恢复血流与氧供脑内出现血管新生, 脑缺血后微血管新生的范围和程度直接关系到半暗带血流改善, 为神经再生和突触发生创造了条件, 影响着神经功能恢复, 也决定着预后。因此, 明确血管新生机制, 能更好利用血管新生治疗缺血性卒中, 为临床治疗提供新的方向。本文主要概述了纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)、基底膜聚糖等细胞外基质与其整合素受体及相关生长因子的最新研究现状, 有助于进一步明确脑缺血后血管新生机制。

1 细胞外基质及其受体

血管基底膜的主要细胞外基质成分包括Fn、层粘连蛋白、VI型胶原和基底膜聚糖, 它们通过与整合素或其他细胞外基质受体结合调节细胞功能和细胞内各种信号传导通路^[1]。血管完整性破坏和细胞外基质降解是血管新生过程关键启动步骤, 细胞外基质在调节血管新生和重构中发挥着至关重要的作用。缺血性卒中发生后短时间内血管完整性破坏程序即被快速激活, 导致血管渗透性增加, 血浆蛋白溢出到邻近组织, 为内皮细胞的迁移提供机械性支持。在血管周围细胞的帮助下, 细胞外基质成分即Fn、基底膜聚糖等开始降解, 同时为生长因子和导向分子发挥作用准备了舞台。整合

素是由至少16个 α 亚基和8个 β 亚基异二聚体组成的细胞表面受体, 不同的 α 亚基和 β 亚基之间氨基酸序列有不同程度的同源性, 它们通过非共价键组合成二十余种不同的整合素分子, 主要通过介导细胞与细胞外基质、细胞与细胞间的黏附传递信号, 调节细胞黏附、存活、分化、生长和迁移^[2], 一直被广泛认为是转导细胞外基质的定位信息到细胞内信号装置的重要分子。

1.1 Fn及其受体整合素 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 3$

Fn是一种广泛存在于细胞外基质、基底膜和各种体液中的糖蛋白, 含有被细胞表面受体识别的结合位点, 特别是与各种整合素结合的精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸肽(Arg-Gly-Asp, RGD)序列。Fn分子构象的改变可通过调节与协同依赖整合素(例如 $\alpha 5\beta 1$)和非协同依赖整合素(如 $\alpha v\beta 3$)的特异性结合来改变细胞黏附、分泌各种细胞因子的行为。2013年, Wan等^[3]在体外基质细胞培养实验中发现, 未折叠型分子构象的Fn比折叠型的Fn更能促进细胞释放VEGF, 同时降低细胞的黏附率, 且在肿瘤相关基质中, Fn分子构象改变后与 $\alpha v\beta 3$ 整合素结合更能促进VEGF的释放。由此可见, Fn对细胞信号的调节与各种细胞外基质的组成无关, 有可能与改变自身与其受体整合素的结合特异性相关。在发育的血管新生中, 脑微血管表达高水平Fn及其受体整合素 $\alpha 5\beta 1$ 。2002年, Milner等^[4]发

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81171244); 广东省自然科学基金项目(S2011010004095); 广东省医学科研基金项目(A2011440); 第44批教育部留学人员回国启动基金项目(教外司留[2012]940号)

收稿日期: 2013-12-04; 修回日期: 2014-03-29

作者简介: 黄绮娟(1987-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事脑血管疾病的研究。

通讯作者: 李龙宣(1972-), 男, 博士, 硕士生导师, 教授, 主任医师, 主要从事血管神经病学与神经变性疾病(痴呆)的研究。Email: longxuan-lee30@aliyun.com。

现血管成熟与 Fn 和 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的减少,层粘连蛋白及其受体整合素 $\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$ 增加相关。2006年,Wang 等^[5]证实 Fn 通过其受体整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 和 $\alpha V \beta 3$ 激活 MAP 激酶信号通路促进体外培养的脑血管内皮细胞生存与增殖。正常的中枢神经系统,罕见 $\beta 3$ 整合素表达阳性的血管,但整合素 $\alpha V \beta 3$ 和 $\alpha 5 \beta 1$ 在缺氧后的野生小鼠脑内新生血管上高水平表达^[6,7]。进一步研究发现 $\beta 3$ 敲除小鼠脑内皮细胞上整合素亚单位 αV 随 $\beta 3$ 敲除而缺失,但 $\alpha 5$ 反明显增加,该敲除鼠缺氧后脑内未见明显的血管新生缺陷,其血管新生与 $\alpha 5$ 表达代偿上调显著相关。这些结果提示 $\alpha 5 \beta 1$ 和 $\alpha V \beta 3$ 在缺氧后血管新生中起不同作用, $\alpha V \beta 3$ 可能起非主导作用,而 $\alpha 5 \beta 1$ 可能起关键调节作用^[6]。2008年,Milner 等^[8]提出脑缺氧刺激脑微血管上 Fn 和 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素表达增加,并在缺氧后 4 d 达到高峰,随后减少,而且 $\alpha 5$ 整合素亚基由生成血管的内皮细胞表达,提示 Fn- $\alpha 5 \beta 1$ 整合素有可能是缺氧后驱使血管新生的一个重要分子开关。用 Cre-Lox 基因敲除技术剔除内皮细胞上 $\alpha 5$ 基因建立了内皮细胞特异性 $\alpha 5$ 敲除小鼠,发现缺氧后 $\alpha 5$ 敲除鼠脑内皮细胞增殖延迟,脑内血管新生减弱,毛细血管密度降低,这证实整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 对缺氧后脑内血管新生具有关键调控作用。 $\alpha V \beta 3$ 或 $\alpha 5 \beta 1$ 拮抗剂阻断碱性成纤维细胞生长因子但不能阻断血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)诱导的血管新生,提示 $\alpha 5 \beta 1$ 和 $\alpha V \beta 3$ 可能调节相似血管新生通路。2012年,Li 等^[9]发现小鼠脑缺血再灌注后 7 d 缺血半暗带中 Fn 及其受体整合素 $\alpha V \beta 3$ 和 $\alpha 5 \beta 1$ 的表达均比对照侧未缺血半球明显升高,且与新生血管的数量相关。我们近期的实验研究发现,小鼠缺血再灌注后半暗带中血管上 Fn 的表达和内皮细胞上 $\alpha 5$ 、 $\beta 3$ 整合素表达平行上调,在 4 d 迅速增加,7 d 达到高峰,14 d 下降。令人意外的是,半暗带中内皮细胞的增殖亦在 4 d 迅速增加,7 d 达到高峰,14 d 下降。这证明纤维连接蛋白及其受体整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha V \beta 3$ 的表达与内皮细胞的增殖密切相关。综上所述可见,Fn- $\alpha 5 \beta 1$ / $\alpha V \beta 3$ 轴在血管新生早期促进内皮细胞增殖。

1.2 基底膜聚糖第五功能区

基底膜聚糖(perlecan)是一种硫酸类肝素蛋白多糖,分子量 >400 kDa,由多个核心蛋白功能区和 N-端的三个粘多糖链组成。它五个独特的功能区

与各种不同的生物分子互相作用,包括生长因子和其他细胞外基质成分,从而发挥传导细胞信号的作用,调节细胞迁移、增殖和分化^[10]。2011年,Lee 等^[11]研究发现,啮齿类动物缺血性卒中后数小时内基底膜聚糖开始裂解,产生新的细胞外基质蛋白片段——基底膜聚糖 C-端第五功能区(domain V, DV),缺血核心区和半暗带中 DV 产生均增加。Fukuda 等^[12]用免疫组化的方法也证实了在大脑中动脉阻塞后数小时内,基底膜聚糖的数量快速减少 43%~63%。Lee 等^[11]认为 DV 还通过促使内皮细胞释放 VEGF 直接保护神经元,并通过 VEGF-VEGFR 依赖途径增加脑血管新生,此外 DV 还能与受体整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 结合,引起 VEGF 的产生和释放,而 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素敲除能阻止 DV 引起的 VEGF 释放,由此可见,DV 在体外促进血管生成的作用是通过结合整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 介导的 VEGF 释放而完成的。Clarke 等^[13]进一步研究发现 DV 通过其 DGR 序列与 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素结合,以细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)依赖途径引起 VEGF 基因的表达和分泌。

由此可见,脑缺血后血脑屏障破坏,基底膜聚糖快速降解产生 DV,参与内源性保护作用,促进血管新生和神经保护,能从根本上改善预后。

2 血管生成生长因子

脑缺血发生后细胞外基质降解,与相应受体整合素结合后激活细胞信号传导通路,引起下游一系列相关的血管生成因子释放,从而发挥血管生成效应。此类生长因子主要有 VEGF、血管生成素(angiotensin, Ang)等。VEGF 和 Ang-1 调节着血管新生和成熟,而 VEGF 受体(Flk-1)和 Ang-1 受体 Tie-2 均含有酪氨酸激酶亚基,在调节血管新生发挥重要作用。

2.1 血管内皮生长因子

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是内皮细胞特异性促有丝分裂原和趋化因子,作用于血管内皮细胞表面的相应受体,从而激活相关的缺血缺氧转导通路,促进新生血管形成,脑缺血后 VEGF 在不同区域发挥的作用不同^[14]。VEGF 配体及其受体有多种类型,但生成血管效应主要是通过 VEGF-1 与 VEGFR-2(Flk-1)相互作用介导的。脑缺血后脑组织中 VEGF 的表达上调,在缺血后 4 d 达到高峰,7~10 d 后下降至正常水平^[15]。因此 VEGF 治疗的途径和时间十分关

键。2010年, Yang等^[16]用免疫组化的方法发现大鼠中动脉阻塞的脑缺血大鼠用 VEGF 鼻内给药治疗,能明显改善功能恢复和诱导缺血半暗带中血管新生,这可能为卒中治疗提供新的方法。Zechariah等^[17]用重组人 VEGF 侧脑室内注射治疗脑缺血的小鼠发现,在给药 10 d 后能增加脑毛细血管的密度,减小梗死面积和炎症反应,同时保护半暗带的代谢功能,减少 ATP 的消耗,连续给药 21 d 后,脑内皮细胞上周细胞的覆盖明显增加,促进成熟血管形成,维持缺血后血脑屏障的完整性。2013年, Dziejko等^[18]亦证实脑缺血后 VEGF 延期治疗能减轻损伤,促进内皮细胞增殖,增加血管密度。这说明,适当时间窗内 VEGF 不仅能促进血管新生,恢复缺血区的血流量,还能促使血管成熟,降低血管渗透性,减少不良反应。2010年, Katsumata等^[19]给缺血大鼠颞肌注射不同剂量的 VEGF 发现,治疗剂量为 100 μg 时,引起血管新生的效应最明显,并没有增加血管渗透性和产生不良反应。VEGFR-2 受体抑制剂则促进细胞凋亡和限制内皮细胞增殖,从而抑制血管新生^[20]。

由此可见, VEGF 能促进血管新生,挽救缺血周边区的组织,从根本上改善卒中预后。VEGF 治疗引起血管新生,但可使血管渗透性增加,因此 VEGF 治疗的时间和剂量仍有待进一步探讨,相信随着研究的不断深入,能为卒中治疗带来新的靶点。

2.2 血管生成素

血管生成素(Ang)家族由 Ang-1、Ang-2、Ang-3 和 Ang-4 四种组成。Ang-1 和 Ang-2 是最重要的血管生成素,与 Tie-2 有相同的亲和力。Tie 受体是酪氨酸蛋白激酶受体家族,主要包括 Tie-1 和 Tie-2。四种血管生成素均为 Tie-2 的配体, Tie-2 主要表达在内皮细胞,目前尚未发现 Tie-1 受体的配体。Ang-1 促进内皮细胞存活和血管成熟, Ang-2 破坏血管稳定和成熟,使内皮细胞和周细胞接触松懈,从而使血管处于一种更加可塑状态。大鼠脑缺血后, Ang-2 的表达比 Ang-1 早,因此 Ang-2 可能是缺血后血管新生的一个启动子^[21]。2014年, Meng等^[22]研究发现, Ang-1 能促进大鼠脑缺血后半暗带中内源性内皮细胞增殖和血管新生。Ang-1 不仅与各种整合素相互作用,通过激活 Akt 和各种促有丝分裂蛋白激酶提高细胞存活^[23],还能调节 ERK1/2 等其他存活信号,参与血管新生^[24]。Ang-

1 既能使血管系统维持在静息状态,又介导血管新生的原因可能是由于它与 Tie-2 受体在细胞中形成不同的配体-受体复合物,通过 $\beta 1$ 受体整合素^[25]与细胞外基质结合,释放黏附分子促进细胞和血管成分的迁移^[26]。

2.3 Ang 与 VEGF 协同作用

大鼠脑缺血后半暗带中 Ang-2 与 VEGF 表达平行上调,两者协同促进血管新生^[15],当缺乏 VEGF 时, Ang-2 失稳会导致血管退化^[27]。在小鼠心肌梗死模型中, Ang-1 能减少 VEGF 过度表达引起的血管渗漏^[28]。Ang-1 和 VEGF 的共表达增加血管屏障结构完整性和减少小鼠大脑中动脉堵塞后脑组织的萎缩面积^[29]。

3 展望

防御性内源性血管新生建立能改善患者的预后,明确血管新生的机制对脑缺血早期治疗十分必要。现阶段研究证明,血管新生涉及一系列的生长因子、细胞外基质及其相关受体。随着对细胞外基质-受体整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 和 $\alpha v \beta 3$ -VEGF 血管新生通路具体机制的深入研究,这有可能成为未来卒中治疗的新方向。

参 考 文 献

- [1] Baeten KM, Akassoglou K. Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke. *Dev Neurobiol*, 2011, 71(11): 1018-1039.
- [2] Streuli CH. Integrins and cell-fate determination. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 2): 171-177.
- [3] Wan AM, Chandler EM, Madhavan M, et al. Fibronectin conformation regulates the proangiogenic capability of tumor-associated adipogenic stromal cells. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(9): 4314-4320.
- [4] Milner R, Campbell IL. Developmental regulation of beta1 integrins during angiogenesis in the central nervous system. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 20(4): 616-626.
- [5] Wang J, Milner R. Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins via MAP kinase signalling. *J Neurochem*, 2006, 96(1): 148-159.
- [6] Li L, Welser JV, Milner R. Absence of the alpha v beta 3 integrin dictates the time-course of angiogenesis in the hypoxic central nervous system: accelerated endothelial proliferation correlates with compensatory increases in alpha 5 beta 1 integrin expression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(5): 1031-1043.
- [7] Li L, Welser JV, Dore-Duffy P, et al. In the hypoxic central nervous system, endothelial cell proliferation is followed by astrocyte

- activation, proliferation, and increased expression of the alpha 6 beta 4 integrin and dystroglycan. *Glia*, 2010, 58(10): 1157-1167.
- [8] Milner R, Hung S, Erokwu B, et al. Increased expression of fibronectin and the alpha 5 beta 1 integrin in angiogenic cerebral blood vessels of mice subject to hypobaric hypoxia. *Mol Cell Neurosci*, 2008, 38(1): 43-52.
- [9] Li L, Liu F, Welser-Alves JV, et al. Upregulation of fibronectin and the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins on blood vessels within the cerebral ischemic penumbra. *Exp Neurol*, 2012, 233(1): 283-291.
- [10] Whitelock JM, Melrose J, Iozzo RV. Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry*, 2008, 47(43): 11174-11183.
- [11] Lee B, Clarke D, Al Ahmad A, et al. Perlecan domain V is neuroprotective and proangiogenic following ischemic stroke in rodents. *J Clin Invest*, 2011, 121(8): 3005-3023.
- [12] Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, et al. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke*, 2004, 35(4): 998-1004.
- [13] Clarke DN, Al Ahmad A, Lee B, et al. Perlecan Domain V induces VEGF secretion in brain endothelial cells through integrin alpha5beta1 and ERK-dependent signaling pathways. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45257.
- [14] 胡强 陈高. 缺氧诱导因子-1 α 在缺血缺氧脑损伤中的作用研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2013, 40(3): 258-262.
- [15] Lai T, Li M, Zheng L, et al. Over-expression of VEGF in marrow stromal cells promotes angiogenesis in rats with cerebral infarction via the synergistic effects of VEGF and Ang-2. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2012, 32(5): 724-731.
- [16] Yang JP, Liu HJ, Liu XF. VEGF promotes angiogenesis and functional recovery in stroke rats. *J Invest Surg*, 2010, 23(3): 149-155.
- [17] Zechariah A, ElAli A, Doepfner TR, et al. Vascular endothelial growth factor promotes pericyte coverage of brain capillaries, improves cerebral blood flow during subsequent focal cerebral ischemia, and preserves the metabolic penumbra. *Stroke*, 2013, 44(6): 1690-1697.
- [18] Dzierżko M, Derugin N, Wendland MF, et al. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke. *Transl Stroke Res*, 2013, 4(2): 189-200.
- [19] Katsumata A, Sugi K, Tokunaga K, et al. Optimal dose of plasmin vascular endothelial growth factor for enhancement of angiogenesis in the rat brain ischemia model. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2010, 50(6): 449-455.
- [20] Shimotake J, Derugin N, Wendland M, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition promotes cell death and limits endothelial cell proliferation in a neonatal rodent model of stroke. *Stroke*, 2010, 41(2): 343-349.
- [21] Ma XL, Liu KD, Li FC, et al. Human mesenchymal stem cells increases expression of alpha-tubulin and angiopoietin 1 and 2 in focal cerebral ischemia and reperfusion. *Curr Neurovasc Res*, 2013, 10(2): 103-111.
- [22] Meng Z, Li M, He Q, et al. Ectopic expression of human angiopoietin-1 promotes functional recovery and neurogenesis after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 2014, 16(267): 135-146.
- [23] Dallabrida SM, Ismail NS, Pravda EA, et al. Integrin binding angiopoietin-1 monomers reduce cardiac hypertrophy. *FASEB J*, 2008, 22(8): 3010-3023.
- [24] Abdel-Malak NA, Mofarrahi M, Mayaki D, et al. Early growth response-1 regulates angiopoietin-1-induced endothelial cell proliferation, migration, and differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(2): 209-216.
- [25] Lee OH, Xu J, Fueyo J, et al. Expression of the receptor tyrosine kinase Tie2 in neoplastic glial cells is associated with integrin beta1-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(12): 915-926.
- [26] Fukuhara S, Sako K, Minami T, et al. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5): 513-526.
- [27] Bhandari V, Elias JA. The role of angiopoietin 2 in hyperoxia-induced acute lung injury. *Cell Cycle*, 2007, 6(9): 1049-1052.
- [28] Su H, Takagawa J, Huang Y, et al. Additive effect of AAV mediated angiopoietin-1 and VEGF expression on the therapy of infarcted heart. *Int J Cardiol*, 2009, 133(2): 191-197.
- [29] Shen F, Walker EJ, Jiang L, et al. Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(12): 2343-2351.