

# Wnt 信号通路对脑梗死后血管新生的调控机制探讨

庞博<sup>1</sup>, 姜涛<sup>2</sup> 综述 杜元灏<sup>2</sup>, 李晶<sup>3</sup> 审校

1. 天津中医药大学研究生院, 天津市 300193
2. 天津中医药大学第一附属医院针灸部, 天津市 300381
3. 天津中医药大学第一附属医院针灸研究所, 天津市 300381

**摘要:** Wnt 信号通路作为一条多环节、多作用位点的开放通路, 具有广泛的生物学效应。近年研究证实, Wnt 信号通路在促进中枢神经系统内皮细胞增殖、维持血脑屏障稳态等方面均发挥重要调控作用, 且与多种血管生成相关因子具有协同作用。对 Wnt 信号通路在脑梗死后血管新生调节机制的基础研究也成为了近年热点。

**关键词:** Wnt 信号通路; 脑梗死; 血管新生

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.02.019

Wnt 通路是研究较早且较成熟的一条信号转导途径, 广泛存在于无脊椎动物和脊椎动物中<sup>[1]</sup>。Wnt 相关配体通过与靶细胞表面特异性受体相互作用来实现细胞间信号的传递, 进而参与对胚胎干细胞的增殖、分化、凋亡等生理病理过程的调控<sup>[2]</sup>。研究表明, Wnt 蛋白存在于血管中, 是参与脑血管生成的重要调节介质, 激活或抑制 Wnt 信号通路对胚胎和成体血管新生起到一定控制及调节作用<sup>[3]</sup>。本文对 Wnt 信号通路的调节过程及其对中枢神经

系统 (central nervous system, CNS) 血管新生的调节机制的相关研究进行综述, 以期对脑梗死后血管新生的影响机制研究提供参考。

## 1 Wnt 信号通路概述

### 1.1 Wnt 信号通路的构成

Wnt 信号通路主要包括以下成员: 细胞外的配体蛋白、膜表面特异性受体及胞浆内的信号物质和核内的转录调控成分<sup>[4]</sup>。组成通路的主要组分和调制因子的类别见表 1<sup>[5]</sup>。

表 1 Wnt 通路主要成分及调制因子 (根据参考文献<sup>[5]</sup>修改)

Components and function	Family members
Wnt ligands	Wnt-1 (Wg), Wnt-2, Wnt-2b, Wnt-3, Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-6, Wnt-7a, Wnt-7b, Wnt-8a, Wnt-8b, Wnt-9a, Wnt-9b, Wnt-10a, Wnt-10b, Wnt-11, Wnt-16 Alternative ligands: Norrin and R-spondins
Receptors	Fzd receptors (Fzd1-10) Low-density lipoprotein receptor related proteins 5 and 6 (LRP5/6) Ror2, Ryk and PTK7
Signaling intermediates	Dishevelleds (Dsh)
$\beta$ -Catenin destruction complex	Axin, adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase-3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ ), casein kinase-1 (CK-1), protein phosphatases (PP1 and PP2A)
Transcription factors	T-cell factor (TCF-1, TCF-3, TCF-4), lymphoid enhancer factor (LEF-1)
Extracellular modulators	Secreted Frizzled related proteins (sFRP), Wnt-inhibitory factor (WIF-1), Dickkopfs (DKK)

### 1.2 Wnt 信号通路的传导

Wnt 信号通路分为经典途径 (因下游信号受  $\beta$ -catenin 调控, 故也称为 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径) 和非经典途径<sup>[6]</sup>。目前, 对于前者的研究最为透彻。

#### 1.2.1 经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号转导途径

经典 Wnt 信号通路的主要标志是  $\beta$ -catenin 在细胞质的积聚及迁移入核。 $\beta$ -catenin 的浓度受 Axin、GSK-3 $\beta$ 、APC 和 CK-1 组成的复合物的控制。当 Wnt 信

基金项目: 国家自然科学基金 (81473765)

收稿日期: 2016-08-23; 修回日期: 2017-03-13

作者简介: 庞博 (1990-), 女, 在读博士研究生, 主要从事针灸治疗缺血性脑血管病机制的研究。

通讯作者: 杜元灏 (1964-), 男, 教授、主任医师, 博士生导师, 医学博士。主要从事针灸治疗脑血管病的基础和临床研究。E-mail: jipjs\_cn@sina.com。

号未能激活时,  $\beta$ -catenin 依次被 Axin 复合体中的 CK-1、GSK3 $\beta$  磷酸化, 继而在被 E3 泛素连接酶  $\beta$ -转导重复蛋白 ( $\beta$ -transduction repeat-containing protein,  $\beta$ -Trep) 识别后, 经泛素化被蛋白酶体 (proteasome) 降解<sup>[7-9]</sup>。当存在 Wnt 信号时, Wnt 配体与细胞膜上的受体 Fzd 及辅助受体 LRP5/6 结合, 同时胞质中的 Dsh 被募集到膜下。在 Dsh 的作用下, GSK3 $\beta$  等成分经磷酸化后从 Axin 上脱离, 导致“APC-Axin-GSK3 $\beta$  复合物”不能形成, 从而阻断  $\beta$ -catenin 的降解。大量游离的  $\beta$ -catenin 进入细胞核与 TCF/LEF 结合, 进而调控靶基因的转录<sup>[7]</sup>。经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号途径可概括为: Wnt  $\rightarrow$  Fzd&LRP5/6  $\rightarrow$  Dsh  $\rightarrow$   $\beta$ -catenin 的降解复合体解散  $\rightarrow$   $\beta$ -catenin 积累, 入核  $\rightarrow$  TCF/LEF  $\rightarrow$  基因转录 (如 c-myc、cyclinD1 等)。

**1.2.2 非经典 Wnt 信号转导途径** 非经典 Wnt 信号通路主要分为 Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  通路和平面细胞极性 (the planar cell polarity, PCP) 通路, 二者的信号传导过程均不依赖  $\beta$ -catenin。

目前普遍认为, Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  通路是通过 Wnt5a 和 Wnt11 激活 Fzd 受体蛋白 G 蛋白后, 引起胞内钙离子水平的升高并激活一系列激酶的级联反应<sup>[10,11]</sup>, 主要涉及 G 蛋白激活磷脂酶 C (PLC)、蛋白激酶 C (PKC) 和钙调蛋白 (CaMK II)。CaMK II 能够诱导核内转录因子 NFAT 的激活, 进而参与对细胞黏附、迁移和组织分化的调节<sup>[12]</sup>。钙离子浓度升高又能激活钙调磷酸酶 (calcineurin, CaN), 进而活化 TAK1 和 NLK 激酶, 二者被认为是抑制经典 Wnt 信号途径的重要脚手架蛋白<sup>[13,14]</sup>。此外, PCP 通路主要通过 Wnt 配体与 Fzd 受体及其辅助受体 (NRH1、Ryk、PTK7 或 Ror2) 结合, 相继激活 Dsh 下游区、小 G 蛋白 Rho 和 ROCK, 从而参与细胞骨架的调节。

## 2 Wnt 信号通路在脑梗死后血管新生中的生物学机制

脑缺血后形成的急性梗死灶包括中心坏死区及其周围的缺血半暗带 (ischemic penumbra, IP), 多数学者认为 IP 自缺血 1 h 后即出现, 发展到最终梗死的时间窗可达 24 h, 甚至 48 h<sup>[15]</sup>。研究表明, IP 脑组织的低灌注状态“基本上可逆”, 且随着时间推移处于动态变化过程, 在有利条件下会促进血流再通而逐渐恢复为正常组织, 而在不利条件下可进展为脑梗死组织<sup>[16-18]</sup>。因此, 脑梗死后微血管新生对有效时间窗内 IP 血流的改善具有重要作

用<sup>[19]</sup>。

### 2.1 Wnt 信号通路与内皮细胞增殖

内皮细胞 (endothelial cell, ECs) 作为血管系统的基本单元, 在促进血管发生和重塑中发挥着关键作用; 同时, ECs 又是构成血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 的重要成员, 而后者对维持大脑可塑性至关重要, 也是脑神经发生和血管新生之间的关键纽带<sup>[20,21]</sup>。CNS 血管新生是 ECs 增生、迁移以及再塑、成熟的过程, 而 Wnt 信号通路在其中起到重要调控作用<sup>[19]</sup>。

研究发现, CNS 血管的 ECs 膜主要表达 Fzd4、Fzd6 和 Fzd8, 其中 Fzd6 表达尤高; 阻断 Fzd 受体会出现 CNS 血管发育异常<sup>[22]</sup>。体外实验继而证实了 Wnt 配体 (包括 Wnt1, Wnt3, Wnt5a、Wnt7a 和 Wnt7b) 在诱导 CNS 的 ECs 增殖 (和/或迁移) 中的重要作用<sup>[23,24]</sup>。研究发现, 胚胎期脑组织和脊髓可以产生 Wnt7a 和 Wnt7b, 在内皮中能够通过激活经典 Wnt 信号通路促进血管新生和 BBB 的形成<sup>[24]</sup>; 联合剔除神经上皮 Wnt7a 和 Wnt7b 导致 CNS 的血管发生无法正常进行, 且会发生动脉出血<sup>[23]</sup>。此外, 动物实验也发现了在病理性血管新生过程中, 信号关键因子  $\beta$ -catenin 在 ECs 内的异位以及核内的迁移现象。阻断 CNS 的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路能特异性干扰血管新生过程, 主要体现在血管密度降低、毛细血管床丧失和畸形血管形成<sup>[23]</sup>。

近年对于 Gpr124 在血管新生中的作用以及与 Wnt 信号通路关系的研究备受关注。Gpr124 是黏附 G 蛋白家族偶联受体 (GPCRs) 的一员, 特定表达于发生中的 ECs。研究发现, Gpr124 基因突变会阻碍小鼠胚胎期 CNS 血管新生和 BBB 形成, 这与阻断经典 Wnt 信号通路所造成的 CNS 发生缺陷极为相似<sup>[25,26]</sup>。故 CNS 中, Gpr124 可能作为一个特异性的配体激活剂来开启经典 Wnt 通路, 进而实现对 CNS 血管芽生的调控<sup>[26-28]</sup>。

### 2.2 Wnt 信号通路与血脑屏障的塑形

Wnt 信号在调控“神经血管单元” (neurovascular unit, NVU) BBB 的完整性中起到重要作用<sup>[29]</sup>。研究发现, 内皮的 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号在胚胎时期开始就能够诱导 BBB 的形成及维持 BBB 的稳态; 阻断 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路除了影响血管新生之外, 还对 ECs 的紧密性造成损害<sup>[30]</sup>。

研究表明, Wnt 蛋白不但存在于血管中, 还存在于 BBB 中, 是参与脑血管新生和 BBB 分化的重

要调节介质<sup>[31]</sup>。Wnt 配体 Wnt3a/Wnt7a/b 以及  $\beta$ -catenin 都能够提高闭合蛋白 3 (Claudin3) 的表达。Claudins (脑中主要为 Claudin3、Claudin5 和 Claudin12) 是紧密连接 (TJ) 的胞外结构之一, 而 TJ 是 BBB 完整性的主要标志。另有研究发现, 体外稳定原代培养的 CNS 的 ECs 中的  $\beta$ -catenin 可以提高 Claudin3 的表达、TJ 的形成和 BBB 特性基因的特征; 而  $\beta$ -catenin 的失活又会导致 Claudin3 显著下调和 BBB 的降解<sup>[23,30]</sup>。并且, Wnt3a/Wnt7a/b 还能够调节 BBB 中葡萄糖转运体 *glut-1* 的表达, 从而对 BBB 的转运过程产生影响<sup>[32]</sup>。此外, Wnt 信号辅助受体 LRP5/6 在脑血管生成及维持 BBB 稳定性中起到辅助作用<sup>[25]</sup>。

### 2.3 Wnt 通路与血管生成相关因子的协同作用

大量研究已经证实, 生长因子相关基因 (如 VEGF、bFGF) 是 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的靶基因; 采用  $\beta$ -catenin/TCF 抑制剂抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路后能显著下调 VEGF 的表达<sup>[33]</sup>。另有研究发现, 使用 GSK-3 $\beta$  抑制剂氯化锂后, VEGF-A 和  $\beta$ -catenin 的表达明显上调, 这对缺血性脑损伤后血管重塑产生正向调节作用, 这也为脑卒中的治疗提供了新的研究方向<sup>[34]</sup>。

Wnt 家族与细胞膜上受体结合进入细胞内, 经过一系列反应, 可激活核内 HIF-1 $\alpha$ 。而 HIF-1 $\alpha$  作为缺氧条件下刺激 VEGF 分泌的重要介导因子, 能在基因水平上调 VEGF 的表达。在正常情况下,  $\beta$ -catenin/TCF-4 复合物能上调 HIF-1 $\alpha$  抑制因子 VHL 的表达, 而在低氧条件下, VHL 表达下降会导致 HIF-1 $\alpha$  的聚集。研究发现, HIF-1 $\alpha$  可竞争性地与  $\beta$ -catenin 结合进而促进下游靶基因的表达<sup>[19]</sup>。另外, Wnt 配体能够以不依赖  $\beta$ -catenin 的方式活化雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR), 促进 HIF-1 $\alpha$  信号进入细胞核与 DNA 结合, 进而激活 VEGF 信号通路<sup>[35]</sup>。

此外, 血管生成素/酪氨酸激酶受体 (angiopoietin/tyrosine kinase receptor, Ang/Tie) 系统对调节血管网形成也有着重要作用, 其中 Ang-1 对于 VEGF 诱导脑血管新生的不良作用 (血管通透性升高引起的渗漏) 起到一定拮抗作用, 与 VEGF 系统协同调节脑缺血后血管新生并提高 BBB 的完整性<sup>[36]</sup>。研究表明, Wnt5a 能促进基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 和 Tie-2 的表达, 从而促进 Ang 的结合, 诱导 ECs 增殖<sup>[37]</sup>。

R-spondin (Rspo) 是近年来发现的蛋白家族。研究发现, Rspo3 基因敲除小鼠的胚胎血管发育严重缺失, 提示 Rspo3 可能影响血管的发生和发育<sup>[38]</sup>; 并且, 这种缺陷可能与胎盘中 VEGF 的表达受抑制有关<sup>[39]</sup>。此外, 向人血管上皮细胞系中加入体外重组的 Rspo2 能够促进体外血管的生成, 进一步添加 Dkk1 又起到抑制 Rspo2 的作用。故推测 Rspos 很可能通过对经典 Wnt 信号通路的作用从而激活 VEGF 信号, 进而促进血管新生。

### 3 展望

脑卒中具有发病率高、致残率高、病死率高的特点, 而缺血性脑卒中 (脑梗死) 占全部脑卒中的 60% ~ 80%<sup>[16]</sup>, 如何在有效时间窗内最大限度挽救可逆性神经元、减轻梗死范围是临床治疗脑梗死的重点所在。近年来, 诸多研究证实了 Wnt 信号通路在脑梗死后血管新生中发挥着重要作用, 尤其是对 ECs 增殖和大脑可塑性的维持。然而, 脑梗死后血管新生是一个多因素、多机制参与的复杂过程, 多条信号通路及相关因子形成网状复杂的分子信号网络。深入研究并阐明 Wnt 信号通路在脑梗死后血管新生中的作用机制, 可以为缺血性脑卒中治疗性血管新生开启新的航向。

### 参 考 文 献

- [1] Niehrs C. The complex world of WNT receptor signaling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(12): 767-779.
- [2] Clevers H, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-1205.
- [3] Choi H J, Park H, Lee H W, et al. The Wnt pathway and the roles for its antagonists, DKKS, in angiogenesis [J]. *IU-BMB Life*, 2012, 64(9): 724-731.
- [4] 尹定子, 宋海云. Wnt 信号通路: 调控机理和生物学意义 [J]. *中国细胞生物学报*, 2011, 33(2): 103-111.
- [5] Baarsma HA, Königshoff M, Gosens R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: molecular mechanisms and pharmacological targets [J]. *Pharmacol Therap*, 2013, 138(1): 66-83.
- [6] van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development [J]. *Development*, 2009, 136(19): 3205-3214.
- [7] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases [J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- [8] Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways a prelude for more [J]. *Circul Res*, 2010, 106(12): 1798-1806.
- [9] Clevers H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in development and dis-

- ease[J]. *Cell*, 2006, 127(3): 469-480.
- [10] van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors [J]. *Sci Signal*, 2008, 1(35): re9.
  - [11] Seifert JRK, Mlodzik M. Frizzled/PCP signaling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(2): 126-138.
  - [12] Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways [J]. *Organogenesis*, 2008, 4(2): 68-75.
  - [13] Sugimura R, Li L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010, 90(4): 243-256.
  - [14] Lv L, Wan C, Chen B, et al. Nemo-Like Kinase (NLK) Inhibits the Progression of NSCLC via Negatively Modulating WNT Signaling Pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2014, 115(1): 81-92.
  - [15] 张加英,倪光夏. 缺血半暗带的研究概况 [J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(6): 1312-1315.
  - [16] Angels Font M, Arboix A, Krupinski J. Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2010, 6(3): 238-244.
  - [17] 张秀花. 针刺对 MCAO 大鼠缺血半暗带影响的基础研究 [D]. 黑龙江中医药大学, 2005.
  - [18] Baron JC. Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment [J]. *Cerebrov Dis*, 1999, 9(4): 193-201.
  - [19] Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res*, 2010, 107(8): 943-952.
  - [20] Pham LDD, Navaratna D, Lo EH, et al. Brain Angiogenesis After Stroke [J]. *Biochem Basis Ther Implicat Angiogenes*, 2013, 6: 239.
  - [21] Lee J, Baird A, Eliceiri BP. Vascular normalization in cerebral angiogenesis: friend or foe? [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1135: 25-34.
  - [22] Daneman R, Aqullu D, Zhou L. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(2): 641-646.
  - [23] Cheng C, Yeh J, Fan TP, et al. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(2): 285-290.
  - [24] Cullen M, Elzarrad MK, Seaman S, et al. GPR124, an orphan G protein-coupled receptor, is required for CNS-specific vascularization and establishment of the blood-brain barrier [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(14): 5759-5764.
  - [25] Kuhnert F, Mancuso MR, Shamloo A, et al. Essential regulation of CNS angiogenesis by the orphan G protein-coupled receptor GPR124 [J]. *Science*, 2010, 330(6006): 985-989.
  - [26] Anderson KD, Pan L, Yang X, et al. Angiogenic sprouting into neural tissue requires Gpr124, an orphan G protein-coupled receptor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(7): 2807-2812.
  - [27] Vanhollebeke B, Stone OA, Bostaille N, et al. Tip cell-specific requirement for an atypical Gpr124-and Reck-dependent Wnt/ $\beta$ -catenin pathway during brain angiogenesis. *Elife*, 2015, 4: e06489.
  - [28] Zhou Y, Nathans J. Gpr124 controls CNS angiogenesis and blood-brain barrier integrity by promoting ligand-specific canonical wnt signaling [J]. *Dev Cell*, 2014, 31(2): 248-256.
  - [29] Rodriguez JP, Coulter M, Miotke J, et al. Abrogation of  $\beta$ -catenin signaling in oligodendrocyte precursor cells reduces glial scarring and promotes axon regeneration after CNS injury [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(31): 10285-10297.
  - [30] Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier [J]. *Nat Med*, 2013, 19(12): 1584-1596.
  - [31] Paolinelli R, Corada M, Orsenigo F, et al. The molecular basis of the blood brain barrier differentiation and maintenance. Is it still a mystery? [J]. *Pharmacol Res*, 2011, 63(3): 165-171.
  - [32] Stenman JM, Rajagopal J, Carroll TJ, et al. Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature [J]. *Science*, 2008, 322(5905): 1247-1250.
  - [33] 郑群,徐立红. 经典 Wnt 信号通路中  $\beta$ -连环蛋白的影响因素 [J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(2): 183-190.
  - [34] Guo S, Arai K, Stins MF, et al. Lithium upregulates vascular endothelial growth factor in brain endothelial cells and astrocytes [J]. *Stroke*, 2009, 40(2): 652-655.
  - [35] 文丽梅,杨洪军,马超英,等. Wingless/Wnt 信号与缺血性脑中风中神经血管单元相关的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(7): 903-907.
  - [36] 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]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(12): 2343-2351.
  - [37] Masckauchán TNH, Agalliu D, Vorontchikhina M, et al. Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2 [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, 17(12): 5163-5172.
  - [38] Aoki M, Mieda M, Ikeda T, et al. R-spondin3 is required for mouse placental development [J]. *Dev Biol*, 2007, 301(1): 218-226.
  - [39] Kazanskaya O, Ohkawara B, Heroult M, et al. The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development [J]. *Development*, 2008, 135(22): 3655-3664.