

## 神经导向因子 Netrin-1 调节单核巨噬细胞迁移与动脉粥样斑块关系的研究进展

易玉红, 张璐璐 综述, 彭道泉 审校

(中南大学湘雅二医院心内科, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 神经导向因子; Netrin-1; 单核巨噬细胞迁移; 动脉粥样硬化

[摘要] 动脉粥样硬化是动脉壁的一种慢性炎症性疾病, 单核巨噬细胞在其发生发展中起着关键作用。动脉粥样斑块中单核巨噬细胞迁移能力受损, 滞留于斑块内, 增加了斑块不稳定性, 加速动脉粥样硬化病变的进展。目前研究表明动脉粥样斑块中巨噬细胞分泌的神经导向因子 Netrin-1 通过与巨噬细胞表面相应受体结合, 可以抑制巨噬细胞迁出斑块, 促进动脉粥样硬化的进展。但在动脉粥样硬化形成初期, 血管内皮细胞表达的 Netrin-1 却被发现对动脉粥样硬化起到保护作用。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

### Research Progress on the Relationship Between Neural Guidance Factor Netrin-1 Regulating Macrophage Migration and Atherosclerotic Plaque

YI Yu-Hong, ZHANG Lu-Lu, and PENG Dao-Quan

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Neural Guidance Factor; Netrin-1; Monocytes/Macrophages Migration; Atherosclerosis

[ABSTRACT] Atherosclerosis is recognized as a chronic inflammatory disease of the artery wall, in which monocytes/macrophages plays a key role in its development. The migration ability of monocytes/macrophages is damaged in atherosclerotic plaque, and retained in plaque. This increases plaque instability and accelerates the progression of atherosclerotic lesions. Recent studies show that neural guidance factor netrin-1, secreted by macrophages in atherosclerotic plaque, can inhibit macrophage migration out of plaque and promote the progress of atherosclerosis, through binding to receptors on the surface of macrophages. However, in the early stage of atherosclerosis, netrin-1 expressed in vascular endothelial cells is found to play a protective role in atherosclerosis.

动脉粥样硬化是动脉壁的慢性疾病, 其发病机理极其复杂, 虽然目前认为主要与脂质氧化、炎症、免疫等有关, 但其确切机制仍有待阐明<sup>[1]</sup>。炎症细胞, 尤其是单核巨噬细胞在动脉粥样硬化过程中起关键作用<sup>[2-3]</sup>。在动脉粥样硬化早期, CC 类趋化因子配体 2 (C-C chemokine ligand 2, CCL2) 与单核细胞表面的同源受体即趋化因子受体 2 (C-C chemokine receptor 2, CCR2) 结合, 可介导单核细胞迁入内膜下, 使之活化为巨噬泡沫细胞, 促进粥样斑块形成<sup>[4-6]</sup>。而动脉粥样硬化斑块内巨噬细胞迁出与斑块逆转相关。目前利用斑块逆转模型研究

表明, 降低血浆中非高密度脂蛋白或增加高密度脂蛋白水平可促进单核细胞来源的细胞从斑块迁移至周围淋巴结和循环系统中, 导致斑块逆转<sup>[7-9]</sup>; 其机制可能与两种趋化因子 CCL19 和 CCL21 与其共同受体 CCR7 结合介导巨噬细胞迁移相关<sup>[10]</sup>。

斑块中巨噬泡沫细胞迁移能力受损的原因尚不清楚, 目前研究表明动脉粥样斑块中巨噬细胞分泌的神经导向因子 Netrin-1 通过与巨噬细胞表面受体不协调家族成员 5b (uncoordinated family member 5b, UNC5b) 结合, 可以抑制巨噬细胞迁出斑块, 促进动脉粥样硬化的进展。但在动脉粥样硬化形成

[收稿日期] 2015-05-24

[修回日期] 2015-07-14

[作者简介] 易玉红, 博士研究生, 研究方向为血脂、炎症与动脉粥样硬化, E-mail 为 yiyuhong19880324@163.com。张璐璐, 硕士研究生, 研究方向为血脂、炎症与动脉粥样硬化, E-mail 为 lulu19880719@gmail.com。通讯作者彭道泉, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血脂、炎症与动脉粥样硬化, E-mail 为 pengdq@hotmail.com。

初期,血管内皮细胞表达的 Netrin-1 却被发现对动脉粥样硬化起到保护作用。本文将对 Netrin-1 通过调节单核巨噬细胞迁移而影响动脉粥样硬化进程方面作一简要概述。

## 1 Netrin-1 及其受体

Netrin 为神经导向因子家族中重要的一类,在胚胎形成过程中介导细胞和轴突的迁移,其命名来自于梵文“Netr”,意为“引路者”。哺乳动物中已明确的 Netrin 家族包括分泌型 Netrin-1、3、4 及跨膜型 Netrin G1、G2 五类<sup>[11-12]</sup>。分泌型 Netrin-1 是表达在脊髓中心的一种层粘连蛋白相关分子,对脊椎动物连合轴突的形成起重要作用。

Netrin-1 至少存在 9 种可能受体:结直肠癌缺失 (deleted in colorectal cancer, DCC) 蛋白受体、再生蛋白 (neogenin, NEO) 受体、UNC5a-d、唐氏综合征细胞黏附分子 (Down syndrome cell adhesion molecule, DSCAM) 以及  $\alpha 6\beta 4$  和  $\alpha 3\beta 4$  整合素。Netrin-1 通过与不同的受体结合,可产生化学吸引和排斥作用。如与 DCC 或 NEO 受体结合主要介导吸引作用,也可介导排斥作用;而与 UNC5b 受体单独结合,或与 UNC5b 受体及 DCC 受体联合作用均介导排斥作用<sup>[11-12]</sup>。目前已经证实 Netrin-1 不仅存在于神经系统,在肺、心、肾、小肠、肝、脾中均有表达,且肺中大量表达的 Netrin-1 主要在血管内皮细胞表面<sup>[13]</sup>。虽然 Netrin-1 首先在神经系统中被发现,但在非神经系统如器官生成、肿瘤的形成、肺急性炎症的调节、急性肾损伤的调节及血管生成等方面均起重要作用<sup>[14-19]</sup>。近年来发现 Netrin-1 在动脉粥样硬化的形成和发展中也起着多重作用。

## 2 Netrin-1 表达的调控

在不同组织细胞中 Netrin-1 表达的调控不同。血管内皮细胞表达的 Netrin-1 受到血流性质及化学因子调节。低密度脂蛋白受体基因敲除 (low density lipoprotein receptor gene knocked-out, LDLR<sup>-/-</sup>) 小鼠主动脉弓部内曲面 (易发动脉粥样硬化部位) 血管内皮细胞表达的 Netrin-1 mRNA 比外曲面 (少发动脉粥样硬化部位) 减少 48%。体外研究发现,与静脉血流刺激相比,动脉血流刺激可显著上调人冠状动脉内皮细胞 Netrin-1 mRNA 的表达。而用 CCL2、不规则趋化蛋白 (fractalkine, FKN)、白细胞介素 8 等单核细胞趋化因子干预人冠状动脉内皮细胞后,

Netrin-1 表达明显下调<sup>[20]</sup>。炎症因子中肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、干扰素  $\gamma$  均可降低人脐静脉内皮细胞 Netrin-1 的表达<sup>[13]</sup>。

巨噬细胞 Netrin-1 的表达则受脂质及低氧调控。与正常饮食组相比,高脂饮食喂养的 LDLR<sup>-/-</sup> 和载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knocked-out, ApoE<sup>-/-</sup>) 小鼠分离的腹腔巨噬细胞 Netrin-1 和 UNC5b mRNA 的表达明显增加。用氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 干预腹腔巨噬细胞后,其 Netrin-1 mRNA 和蛋白的表达均上调,并且此调节依赖于 CD36<sup>[21]</sup>。最新研究发现低氧环境和低氧诱导剂可诱导小鼠及人动脉粥样斑块中巨噬细胞 Netrin-1 及其受体 UNC5b 的表达上调,抑制巨噬细胞的迁移<sup>[22]</sup>。

## 3 Netrin-1 对单核巨噬细胞迁移的影响

研究表明 Netrin-1 参与调节炎症细胞的迁移。在急性炎症反应时,Netrin-1 通过与白细胞表面的 UNC5b 受体结合抑制其迁移,从而发挥抗炎效应。Ly 等<sup>[13]</sup>研究发现在急性金黄色葡萄球菌感染时,静脉内皮细胞 Netrin-1 表达下调,后者通过与其受体 UNC5b 相互作用抑制单核细胞、中性粒细胞及淋巴细胞的迁移。此外,在缺氧<sup>[23]</sup>、再灌注损伤<sup>[24]</sup>及急性肺损伤<sup>[16]</sup>的模型中再次证实上皮细胞表达的 Netrin-1 可抑制白细胞的聚集。

### 3.1 动脉粥样斑块内巨噬细胞表达的 Netrin-1 对巨噬细胞迁移的影响

由于 Netrin-1 在急性炎症中可阻止白细胞迁移, van Gils 等<sup>[21]</sup>进一步探讨在慢性炎症疾病如动脉粥样硬化中,Netrin 信号对斑块内巨噬细胞迁移的影响;其研究发现人冠状动脉粥样斑块内巨噬细胞表达 Netrin-1 及具有化学排斥作用的 UNC5b 受体,而主要介导吸引作用的 DCC 受体未被检测到。而高脂饮食喂养的 LDLR<sup>-/-</sup> 和 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉斑块内同样发现 Netrin-1 表达及分泌,并较野生型 C57BL/6 小鼠表达增加。体外研究显示 ox-LDL 通过与 CD36 结合激活核因子  $\kappa B$ , 诱导巨噬细胞 Netrin-1 及其受体 UNC5b 的表达。通过使用博伊登 (Boyden) 小室 Netrin-1 体外刺激 RAW264.7 细胞和腹腔巨噬细胞,可阻断趋化因子 CCL2、CCL19 和 CCL21 等诱导的肌动蛋白聚合作用,干扰 Rac1 信号通路,继而抑制巨噬细胞的迁移。给小鼠皮下注射 Netrin-1,可抑制内毒素刺激引起的腹腔巨噬细胞向网膜引流淋巴管的迁移。这些功能学研究表明 Ne-

Netrin-1 可能通过促进抑制巨噬细胞迁移,使其在斑块内聚集,促进斑块进展。研究者进一步利用荧光微球标记追踪巨噬细胞发现,基因敲除骨髓来源细胞的 Netrin-1,可促进巨噬细胞从斑块中的迁移,减少斑块中巨噬细胞的水平,明显减少 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠的粥样斑块。上述研究提示在高胆固醇血症时,Netrin-1 可能通过促进巨噬细胞在斑块中的滞留,维持动脉粥样硬化斑块的炎症状态,加快斑块进展。Ramkhalawon 等<sup>[22]</sup>进一步研究发现,Netrin-1 和 UNC5b 在人和鼠动脉粥样斑块巨噬细胞表达区域与低氧及低氧诱导转录因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible transcription factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 表达区域重叠。巨噬细胞在低氧环境或氧含量正常时加入二氯化钴、二甲草酰甘氨酸(两者为低氧诱导剂)均可上调 Netrin-1 及其受体 UNC5b 的表达,而阻断 HIF- $\alpha$  则可逆转此效应。事实上,利用启动子荧光素酶报告基因发现低氧诱导剂可增加 Netrin-1 和 UNC5b 的启动子活性,并且此过程依赖于 HIF- $\alpha$ 。J774 巨噬细胞表达 HIF- $\alpha$  后,与对照组相比,可增加 Netrin-1 和 UNC5b 表达,抑制巨噬细胞向 CCL2 的迁移;阻断 Netrin-1 则可恢复该效应。故此项研究为 HIF- $\alpha$  调节 Netrin-1 促进斑块中巨噬细胞聚集提供了依据。

### 3.2 动脉血管内皮细胞表达的 Netrin-1 对单核细胞迁移的影响

尽管以往研究证实 Netrin-1 在斑块内表达可促进动脉粥样硬化进展,但 van Gils 等<sup>[20]</sup>最近的研究则显示了 Netrin-1 的另一面,其研究发现内皮细胞表面表达的 Netrin-1 参与内皮细胞屏障作用,在动脉粥样硬化初期抑制单核细胞向动脉内膜迁移,可抑制动脉粥样硬化形成;实验组发现高脂喂养 2 周的 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠主动脉弓部内曲面(易发动脉粥样硬化部位)血管内皮细胞表达的 Netrin-1 mRNA 较外曲面(少发动脉粥样硬化部位)明显减少。在体外,研究者用细胞转移实验发现,加入重组 Netrin-1 可抑制新鲜分离的人外周血单个核细胞向 CCL2、FKN 迁移达 50%;而阻断人外周血单个核细胞表面的 Netrin-1 受体 UNC5b 后则可逆转 Netrin-1 所致的此效应。另外 Netrin-1 干预人冠状动脉内皮细胞(human coronary artery endothelial cell, HCAEC)后,可明显抑制 THP-1 与肿瘤坏死因子  $\alpha$  或内毒素处理的 HCAEC 之间的黏附,而阻断 Netrin-1 则可增加 THP-1 与 HCAEC 的黏附。在体内,实验组应用活体显微镜观察到给 C57BL/6J 小鼠静脉注入 Netrin-1 封闭肽可两倍增加白细胞与血管内皮细胞之间的黏附。因此推测血管内皮细胞表达的 Netrin-1 参与

内皮细胞的屏障功能,阻止单核细胞与内皮细胞黏附及进入内皮下<sup>[20]</sup>。与 Netrin-1 对动脉粥样硬化保护作用一致,将含人 Netrin-1 基因的腺病毒载体尾静脉注射至 LDLR<sup>-/-</sup>的动脉粥样硬化模型小鼠体内,同时高脂饮食喂养,发现斑块形成明显减少,推测是增加了其在内皮细胞表达<sup>[25]</sup>。

## 4 小结和展望

综上所述,Netrin-1 通过抑制趋化因子诱导的单核巨噬细胞迁移而对动脉粥样硬化产生影响。Netrin-1 在不同的细胞表达,对动脉粥样硬化作用不同。如在内皮细胞表达,表现出对动脉粥样硬化的保护作用<sup>[20]</sup>,而在斑块中巨噬细胞表面表达,则表现出促进动脉粥样硬化作用<sup>[21]</sup>,但其机制均为抑制趋化因子诱导的单核细胞迁移。总之,减少单核细胞迁入内膜及增加巨噬细胞迁出斑块可以限制斑块内慢性炎症,从而治疗动脉粥样硬化。van Gils 等<sup>[21]</sup>2012 年发表的文章引起大家广泛关注,多篇评论先后发表<sup>[26-29]</sup>,共同认为他们的研究增加了对单核细胞迁移和动脉粥样硬化机制的理解,且为 Netrin-1 成为治疗动脉粥样硬化的新靶点提供了可能性。但 Netrin-1 如何影响单核细胞迁移及动脉粥样硬化各阶段的具体过程,及其信号转导机制仍需更多的研究。相信随着研究深入,Netrin-1 对单核细胞及动脉粥样硬化的影响更加明确,可能为动脉粥样硬化治疗带来新的方向和希望。

### [参考文献]

- [1] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J]. Nature, 2011, 473(7347): 317-325.
- [2] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Cell, 2011, 145(3): 341-355.
- [3] Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure[J]. Science, 2013, 339(6116): 161-166.
- [4] Mestas J, Ley K. Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis[J]. Trends Cardiovasc Med, 2008, 18(6): 228-232.
- [5] Boring L, Gosling J, Cleary M, et al. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis[J]. Nature, 1998, 394(6696): 894-897.
- [6] Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low

- density lipoprotein receptor-deficient mice [J]. *Mol Cell*, 1998, 2(2): 275-281.
- [7] Feig JE, Parathath S, Rong JX, et al. Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques [J]. *Circulation*, 2011, 123(9): 989-998.
- [8] Llodra J, Angeli V, Liu J, et al. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11 779-784.
- [9] Feig JE, Rong JX, Shamir R, et al. HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(17): 7 166-171.
- [10] Trogan E, Feig JE, Dogan S, et al. Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3 781-786.
- [11] Rajasekharan S, Kennedy TE. The netrin protein family [J]. *Genome Biol*, 2009, 10(9): 239.
- [12] Barallobre MJ, Pascual M, Del RJ, et al. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2005, 49(1): 22-47.
- [13] Ly NP, Komatsuzaki K, Fraser IP, et al. Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(41): 14 729-734.
- [14] Ramesh G. Role of Netrin-1 beyond the brain: From biomarker of tissue injury to therapy for inflammatory diseases [J]. *Recent Pat Biomark*, 2012, 2(3): 202-208.
- [15] Castets M, Mehlen P. Netrin-1 role in angiogenesis: to be or not to be a pro-angiogenic factor? [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(8): 1 466-471.
- [16] Mirakaj V, Thix CA, Laucher S, et al. Netrin-1 dampens pulmonary inflammation during acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181(8): 815-824.
- [17] Paradisi A, Mehlen P. Netrin-1, a missing link between chronic inflammation and tumor progression [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(7): 1 253-262.
- [18] Mutz C, Mirakaj V, Vagts DA, et al. The neuronal guidance protein netrin-1 reduces alveolar inflammation in a porcine model of acute lung injury [J]. *Crit Care*, 2010, 14(5): R189.
- [19] Strizzi L, Mancino M, Bianco C, et al. Netrin-1 can affect morphogenesis and differentiation of the mouse mammary gland [J]. *J Cell Physiol*, 2008, 216(3): 824-834.
- [20] van Gils JM, Ramkhelawon B, Fernandes L, et al. Endothelial expression of guidance cues in vessel wall homeostasis: Dysregulation under proatherosclerotic conditions [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(5): 911-919.
- [21] van Gils JM, Derby MC, Fernandes LR, et al. The neuro-immune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(2): 136-143.
- [22] Ramkhelawon B, Yang Y, van Gils JM, et al. Hypoxia induces netrin-1 and UNC5b in atherosclerotic plaques: Mechanism for macrophage retention and survival [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(6): 1 180-188.
- [23] Rosenberger P, Schwab JM, Mirakaj V, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(2): 195-202.
- [24] Wang W, Reeves WB, Ramesh G. Netrin-1 and kidney injury I: Netrin-1 protects against ischemia-reperfusion injury of the kidney [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(4): F739-F747.
- [25] Khan JA, Cao M, Kang BY, et al. Systemic human netrin-1 gene delivery by adeno-associated virus type 8 alters leukocyte accumulation and atherogenesis in vivo [J]. *Gene Ther*, 2011, 18(5): 437-444.
- [26] Gerszten RE, Tager AM. The monocyte in atherosclerosis—should I stay or should I go now? [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(18): 1 734-736.
- [27] Griffin GK, Lichtman AH. Why don't macrophages leave atherosclerotic lesions? [J]. *Circ Res*, 2012, 110(10): 1 273-275.
- [28] Swirski FK, Nahrendorf M, Libby P. The ins and outs of inflammatory cells in atheromata [J]. *Cell Metab*, 2012, 15(2): 135-136.
- [29] Moore KJ, Fisher EA. Macrophages, atherosclerosis and the potential of netrin-1 as a novel target for future therapeutic intervention [J]. *Future Cardiol*, 2012, 8(3): 349-352.

(此文编辑 曾学清)