

## · 综述 ·

# Dll4/Notch通路 与肿瘤血管形成

丁新宇 综述 徐志飞 审校

【中图分类号】R734.2 DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2009.11.15

## Dll4/Notch Signaling Pathway and Tumor Angiogenesis

Xinyu DING, Zhifei XU

Department of Cardiothoracic Surgery, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Corresponding author: Zhifei XU, E-mail: xu-zhifei@yahoo.com.cn

This work was supported by grant from the National Natural Science Foundation of China (to Zhifei XU)(No.30972965).

Notch是一个高度保守的跨膜受体蛋白家族,广泛存在于无脊椎以及脊椎动物体内。有5种Notch配体存在于哺乳动物体内,分别为Dll1、Dll3、Dll4、Jagged1和Jagged2。它们和Notch1-4的4个受体通过相邻细胞膜表面的接触、结合来激活Notch信号通路,发挥一系列的生物学调控功能<sup>[1]</sup>。该通路在内皮细胞的发育分化、干细胞分化、血管形成及肿瘤发生发展过程中具有重要作用<sup>[2,3]</sup>。Dll4是最后一个被克隆成功的配体,研究<sup>[4-6]</sup>发现Notch配体Dll4是5个配体中唯一特异性存在于内皮细胞的配体,在正常机体及肿瘤血管管腔形成的过程中发挥着重要功能。

### 1 Dll4的结构与活化

Dll4是定位于人染色体15q14、基因编码长度为685个氨基酸的单链跨膜蛋白。它在进化过程中高度保守,人和鼠Dll4基因编码的蛋白具有87%的同源序列。Dll4的胞外段含有与Notch受体结合必需的8个表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)样重复序列、4个潜在的糖基化位点和1个由45个氨基酸组成的保守DSL(Delta, Serrate, Lag2)结构域<sup>[7]</sup>。

Dll4通过与相邻细胞膜上的Notch1或Notch4受体<sup>[5]</sup>相互结合,使Notch受体经过一系列蛋白酶裂解。这个过程主要包含2个蛋白酶,即肿瘤坏死因子 $\alpha$ 转换酶(tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme, TACE)和早老素(presenilin)

或称为 $\gamma$ -分泌酶( $\gamma$ -secretase),受体裂解后释放出活化形式的胞内区域(notch intracellular Domain, NICD)。NICD直接进入细胞核内与RBP-J $\kappa$ (recombination signal binding protein J $\kappa$ )作用,启动转录抑制因子如Hes(Hairy/Enhancer of Split)、Hey(Hes-related protein)家族而发挥调控作用<sup>[8]</sup>。

### 2 Dll4在正常血管形成中的作用

血管形成(angiogenesis)是血管丛萌发、分支,并形成血管网络的过程,即从现存的血管形成新血管,并得以广泛地重建。促血管发生因子和抗血管发生因子的调控在这个过程中发挥主要作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一个主要生长因子,它在原始血管网形成及在血管生长过程中的引导作用得到广泛的认可。基因学研究<sup>[9]</sup>表明Dll4介导的Notch信号通路对于胚胎血管的发生与形成有重要作用。Dll4等位基因单个缺失[即Dll4(-/+)]的小鼠在胚胎发育早期(E10.5)便由于严重的血管生长缺陷而死亡,解剖其胚胎发现有多种类型的血管缺陷,主要包括有动脉血管生成受损、血管层发生断裂和血管生长密度增加但管腔异常狭窄甚至闭塞。目前认为Dll4和VEGF是目前已知的仅有的两个失去一个等位基因即可由于无法形成有功能的血管而引起胚胎早期死亡的基因<sup>[10]</sup>。对正常血管生长过程的研究<sup>[9]</sup>发现,在小鼠胚胎时期Dll4的表达主要局限于大的血管;而在成年小鼠中它的表达主要在小动脉和微血管的内皮细胞中。近些年许多的实验<sup>[11-16]</sup>结论认为,Dll4/Notch信号通路通过抑制血管分支的发生和促进血管功能完善来抑制血管的过度形成。基因敲除内皮

本研究受国家自然科学基金项目(No.30972965)资助

作者单位:200003 上海,第二军医大学长征医院胸心外科(通讯作者:徐志飞, E-mail: xu-zhifei@yahoo.com.cn)

细胞中的DII4, 多种内皮细胞的功能受到了明显抑制<sup>[17]</sup>。当细胞过表达DII4时, 则会减少内皮细胞的增殖、迁移和管腔的形成<sup>[18]</sup>, 提示一个合适的DII4表达水平对内皮细胞发挥其正常功能是必需的, 过少或过多的表达都可能引起功能异常。

DII4是VEGF的下游基因, 它通过对VEGF的负反馈来限制其作用, 减少血管的过度生长<sup>[10]</sup>。人类脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 的体外培养发现<sup>[18,19]</sup>, 阻断DII4/Notch通路后, 血管内皮生长因子受体2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2) 受体表达上调, VEGFR-1受体下降; 而通过DII4来活化Notch通路后, VEGFR-2受体表达下降。VEGFR-2是血管内皮生长因子VEGF发挥作用的主要结合部位。因此, DII4通过下调VEGFR-2和上调VEGFR-1来调控VEGF信号通路在血管生长中的作用。许多因子包括VEGF、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、低氧诱导因子1 $\alpha$  (hypoxia inducing factor 1- $\alpha$ , HIF1- $\alpha$ )、Foxc和NICD本身对DII4有调控作用<sup>[7,18,20,21]</sup>。用VEGF刺激HUVEC或人髂动脉内皮细胞, 可明显诱导DII4高表达, bFGF是另一个血管生长前的作用分子, 刺激HUVEC也能诱导出DII4的表达。此外, DII4也受到缺氧的诱导, 在低氧状态 (氧浓度为0.1%), DII4在许多内皮细胞中出现了高表达。缺氧时HIF1- $\alpha$ 大量表达, 其可能通过激发血管生成来改善细胞的缺氧状况。Foxc转录因子通过与VEGF-DII4-Notch相互作用激活下游靶基因来发挥对动脉血管的调节作用, 同时持续活化的NICD在内皮细胞中可诱导DII4的表达。这些因子均通过对DII4的调节, 来调控机体内血管的形成。

### 3 DII4在肿瘤血管生成中的作用

肿瘤生长包括了血管前期和血管期: 在血管前期, 弥散是肿瘤获取营养和氧气的主要方式; 但随着肿瘤不断发展, 这种方式无法满足肿瘤的生长需求, 肿瘤便通过分泌多种血管生长因子、刺激新生血管的形成以获得更多的营养和氧气<sup>[22]</sup>。肿瘤血管形成是一个多因子参与的复杂过程<sup>[23]</sup>。

**3.1 DII4参与肿瘤血管结构和功能的完善** 良好的血管结构、正常的血运功能, 对肿瘤的生长起着关键作用。DII4在正常机体中少量分布在动脉和毛细血管的内皮细胞, 在静脉血管内皮细胞中几乎缺失<sup>[5,24]</sup>。然而在肿瘤血管周围, DII4有明显的高表达, 其异常表达可以引起

肿瘤血管的动静脉分化。实验<sup>[20,25]</sup>表明, DII4/Notch信号通路可以使Ephrin B2水平明显上升, Ephrin B2被认为是一种较为特异的动脉受体, 而静脉受体Ephrin B4水平下降。Hainaud等<sup>[1]</sup>通过对转基因鼠肝癌模型的研究发现, Notch4/DII4在肝癌的肝窦内皮细胞中的表达比正常肝组织中高, 正常肝窦内皮细胞中Ephrin B2没有变化, 而在肝癌组织中从结节期到肝癌期Ephrin B2的mRNA水平逐步上升。肝窦内皮细胞是静脉来源的, VEGF-Notch4/DII4-Ephrin B2通路促使肿瘤中血管静脉向动脉分化。进一步研究<sup>[26]</sup>发现DII4可以上调Notch信号通路, 同时下调邻近内皮细胞CXCR4的表达, 而CXCR4的下调被认为对我们经常发现的肿瘤血管生长特点起着重要的作用。

通过运用融合蛋白DII4-Fc阻断DII4/Notch途径, 用过表达DII4来启动DII4/Notch途径作对照的研究<sup>[27]</sup>发现, 使用DII4-Fc的肿瘤血管密度增加而肿瘤较小, 肿瘤缺氧增加数倍, 而且大部分的血管是无功能的。在神经胶质瘤细胞移植到小鼠的同时系统性给予DII4-Fc, 可减少肿瘤大小约70%, 而且anti-DII4抗体也可抑制肿瘤生长。该实验可得出抑制DII4/Notch信号通路可促进无功能性血管大量生长而抑制肿瘤生长的结论。另有研究<sup>[13,19]</sup>发现, 对小鼠体外生长肿瘤运用anti-DII4抗体或可溶性DII4 (soluble DII4), 通过血管内示踪剂显像显示出肿瘤血管的灌注很差。HUVEC的三维培养实验中, anti-DII4导致血管分支及数量增加、内皮发芽形态的改变及多细胞性的管腔结构的完整性缺失。在anti-DII4治疗的新生小鼠视网膜中, 动脉生成缺陷, 视网膜血管的周细胞完全缺失。可溶性DII4也可使裸鼠移植瘤血管壁周细胞的减少。DII4在肿瘤血管结构完整性和功能化中有非常重要的作用, 阻断该通路可以明显抑制肿瘤的生长。

**3.2 DII4影响肿瘤生长、凋亡** 肿瘤血管和肿瘤的生长之间一直被认为有重要的关系。研究<sup>[17,28]</sup>发现DII4在肾透明细胞癌中的水平比正常肾组织中高出9倍, 浅表性膀胱癌中比正常膀胱组织高出2倍, 侵袭性癌中则高出1.5倍, 且均分布于肿瘤血管周围, 而在正常血管中的表达很低。Li等<sup>[29]</sup>通过小鼠荷瘤实验发现转入过表达DII4基因的人类纤维瘤生长速度明显快于对照组, 瘤中的Ki67、caspase-3凋亡基因的表达比对照明显降低, 组织学检查过表达DII4纤维瘤几乎没有凋亡组织, 而对照组中约1/4的部位出现凋亡。人前列腺癌和纤维肉瘤的实验也得到类似的结果。凋亡主要发生在血管分布差、血供少的地方, DII4促使充足的血液供应来减少肿瘤细胞的凋亡, 促进肿瘤快速生长。

#### 4 肿瘤基因治疗的新靶点

肿瘤基因靶向治疗是目前肿瘤治疗研究的一个热点,多种靶向治疗的药物也已经相继上市。这些药物大致可分为受体靶向治疗、针对肿瘤细胞信号传导的阻断剂或拮抗剂、基因靶向治疗、瘤苗靶向治疗和肿瘤新生血管抑制剂。目前临床上多种抗VEGF的药物单独或联合运用,在转移性结肠癌、进展性非小细胞肺癌、肾细胞癌、肝癌和转移性乳腺癌患者中均取得了一定的效果<sup>[30-32]</sup>。然而,有很大一部分病人对目前的抗血管治疗无反应<sup>[33]</sup>,导致需要研究新的治疗靶点。近年发现一些对anti-VEGF有天然抵抗的肿瘤对Dll4抑制剂有着良好的敏感性,联合使用VEGF抑制剂和Dll4抑制剂对于肿瘤的抑制作用比各自单独使用的效果更佳,通过特异性Dll4阻断促使肿瘤内缺氧和凋亡来抑制肿瘤发展<sup>[10,13]</sup>。而且Dll4在实体瘤血管中高表达,但在正常的成熟血管中低表达<sup>[4]</sup>。以Dll4作为靶点来治疗肿瘤,可对肿瘤产生明显抑制作用,而对正常组织产生很小的副作用。

#### 5 结语

就目前国内外的研究,Dll4/Notch信号通路在肿瘤及其血管生长方面具有很重用的作用,但该通路与其它通路相互之间有广泛的联系<sup>[8]</sup>。同时,Dll4与该通路其它配体之间<sup>[34]</sup>和其它Notch受体<sup>[35]</sup>之间也有不同的相互作用,更有研究<sup>[36]</sup>发现Dll4在细胞核内也有表达,预示着它可能还有其它方面的作用。以Dll4作为靶基因来治疗肿瘤还需对其进行更全面和更深入的研究。

#### 参 考 文 献

- Hainaud P, Contreres JO, Villemain A, *et al*. The role of the vascular endothelial growth factor Delta-like 4 ligand/Notch4-Ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8501-8510.
- Bray SJ. Notch signaling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 678-689.
- Cristofaro B, Emanuela C. Possible novel targets for therapeutic angiogenesis. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(2): 102-108.
- Mailhos C, Modlich U, Lewis J, *et al*. Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation*, 2001, 69(2-3): 135-144.
- Shutter JR, Scully S, Fan Wei, *et al*. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev*, 2000, 14(11): 1313-1318.
- Hofmann JJ, Iruela-Arispe ML. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circ Res*, 2007, 100(11): 1556-1568.
- Sainson RC, Harris AL. Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis? *Trends in Mol Med*, 2007, 13(9): 389-395.
- Harrington LS, Sainson RC, Williams CK, *et al*. Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res*, 2008, 75(2): 144-154.
- Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, *et al*. Haploinsufficiency of Delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(45): 15949-15954.
- Yan M, Plowman GD. Delta-like 4/Notch signaling and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(24): 7243-7246.
- Suchting S, Freitas C, le Noble F, *et al*. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3225-3230.
- Siekman AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*, 2007, 445(7129): 781-784.
- Schneht JS, Jiang W, Kumar SR, *et al*. Inhibition of Dll4 mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood*, 2007, 109(11): 4753-4760.
- Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, *et al*. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(9): 3219-3224.
- Leslie JD, Ariza-McNaughton L, Bermange AL, *et al*. Endothelial signaling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development*, 2007, 134(5): 839-844.
- Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, *et al*. Dll4 signaling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 2007, 445(7129): 776-780.
- Patel NS, Li JL, Generali D, *et al*. Up-regulation of Delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer Res*, 2005, 65(19): 8690-8697.
- Williams CK, Li JL, Murga M, *et al*. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood*, 2006, 107(3): 931-939.
- Ridgway J, Zhang G, Wu Y, *et al*. Inhibition of Dll4 signaling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature*, 2006, 444(7122): 1083-1087.
- Diez H, Fischer A, Winkler A, *et al*. Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp Cell Res*, 2007, 313(1): 1-9.
- Hayashi H, Kume T. Foxc transcription factors directly regulate Dll4 and HEY2 expression by interacting with the VEGF-Notch signaling pathways in endothelial cells. *Plos one*, 2008, 3(6): 2401.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, 407(6801): 249-257.
- Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in anti-angiogenic therapy. *Science*, 2005, 307(5706): 58-62.
- Benedito R, Duarte A. Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene Expr Patterns*, 2005, 5(6):

- 750-755.
- 25 Iso T, Maeno T, Oike Y, *et al.* Dll4-selective Notch signaling induces EphrinB2 gene expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(3): 708-714.
- 26 Williams CK, Segarra M, Sierra Mde L, *et al.* Regulation of CXCR4 by the Notch ligand Delta-like 4 in endothelial cells. *Cancer Res*, 2008, 68(6): 1889-1895.
- 27 Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, *et al.* Blockade of Dll4 inhibits tumor growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature*, 2006, 444(7122): 1032-1037.
- 28 Patel NS, Dobbie MS, Rochester M, *et al.* Up-regulation of endothelial Delta-like 4 expression correlates with vessel maturation in bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(16): 4836-4844.
- 29 Li JL, Sainson RC, Shi W, *et al.* Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11244-11253.
- 30 Ferrara N. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology*, 2005, 69(Sup 3): 11-16.
- 31 Shojaei F, Ferrara N. Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Cancer J*, 2007, 13(6): 345-348.
- 32 Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(8): 579-591.
- 33 Burris H 3rd, Rocha-Lima C. New therapeutic directions for advanced pancreatic cancer: targeting the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways. *Oncologist*, 2008, 13(3): 289-298.
- 34 Rocha SF, Lopes SS, Gossler A, *et al.* Dll1 and Dll4 function sequentially in the retina and pV2 domain of the spinal cord to regulate neurogenesis and create cell diversity. *Dev Biol*, 2009, 328(1): 54-65.
- 35 Indraccolo S, Minuzzo S, Masiero M, *et al.* Cross-talk between Tumor and Endothelial Cells Involving the Notch3-Dll4 Interaction Marks Escape from Tumor Dormancy. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1314-1323.
- 36 Martinez JC, Müller MM, Turley H, *et al.* Nuclear and membrane expression of the angiogenesis regulator delta-like ligand 4 (DLL4) in normal and malignant human tissues. *Histopathology*, 2009, 54(5): 598-606.

(收稿: 2009-09-28 修回: 2009-10-22)

(本文编辑 孙丹)

## · 启事 ·

### 周允中教授从医50年庆典于上海举行

2009年11月13日晚,周允中教授从医50年庆典在上海举行。本次庆典由上海市胸科医院、上海市肺部肿瘤临床医学中心举办,来自北京、天津、广州、四川、山东、福建、江苏及上海的数十位专家出席庆典。因故未能出席的原天津肿瘤医院胸外科主任张熙曾教授和广东省人民医院副院长吴一龙教授也特别发来贺电。《中国胸心血管外科临床杂志》编辑部冯远景主任及《中国肺癌杂志》编辑部刘谦主任到会祝贺。上海市胸科医院冯运院长、廖美琳教授在致辞中高度评价周允中教授。支修益教授代表中华医学会及中国医师协会致贺辞。与会专家与周允中教授合影留念,共话春秋,气氛喜庆热烈。周允中教授从医50年,历任上海市胸科医院院长、胸外科主任、上海市肺部肿瘤临床医学中心主任、上海市胸科医院首席专家、美国芝加哥大学客座教授、中华医学会心胸外科学会委员、中国胸外科医师协会副会长、上海医学会心胸外科专业委员会副主任委员、中国癌症研究基金会理事及中日消化外科学组委员。为我国胸部外科事业的发展做出了卓越贡献,是我国胸部外科界享有盛誉的著名专家和学者。他豁达谦逊,淡泊名利,宽厚仁和,尊老爱幼,展现一代名医的大家风范,彰显人生境界的从容儒雅,因而赢得了国内外同道友人的衷心尊敬。

申屠阳