

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.06.018

· 综述 ·

Slit 蛋白作用机制及其在抗炎领域的应用

Mechanisms and application of Slit protein in anti-inflammatory field

袁 熙 (YUAN Xi) 综述, 李碧娟 (LI Bi-juan) 审校

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[关键词] Slit 蛋白; 趋化性; 炎症; 细胞因子风暴; 抗炎

[中图分类号] R454.9 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2014)06-0380-05

神经轴突导向分子 Slit 是一种分泌型糖蛋白。Slit 蛋白在体内不仅可以阻止神经元的转移, 同时也在其他多个器官中都有表达, 抑制血管内皮细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、肿瘤细胞等多种细胞的转移。在机体重症感染时, 病原菌的刺激使体内产生大量细胞因子, 形成细胞因子风暴, 而外源性 Slit 蛋白可以抑制趋化因子的趋化性, 减少白细胞的黏附和迁移, 同时通过稳定血管, 降低血管通透性, 防止过多细胞因子进入血液循环, 加重炎症损伤。而该作用主要是通过 Slit 的第 2 个亮氨酸重复序列 (Slit D2) 与 Robo 的 N-端免疫球蛋白样区域 IG1-2 的结合后, 诱导 Src 激酶、磷脂酰肌醇 3 (PI-3) 激酶等去磷酸化而失活、抑制多种趋化信号及细胞骨架重排、加强血管内皮 VE-钙黏蛋白间连接、紧密血管内皮等机制来实现。尽管很多研究都表明 Slit 蛋白在抗炎领域的重要意义, 但目前 Slit 蛋白的作用机制尚未十分明确, 其获得途径有限, 因此, Slit 蛋白在抗炎领域的研究将为炎性疾病提供更广阔的治疗策略。

Slit 蛋白最初在果蝇神经组织中发现, 其在轴突导向和神经元转移排斥过程中起着重要作用。人 Slit 的结构与其他物种的 Slit 高度同源, 如与大鼠的相似度为 95%, 与非洲爪蟾属的相似度为 87%, 与果蝇 40% 同源^[1]。Slit1 主要存在在中枢神经系统, 而 Slit2 和 Slit3 除神经系统外, 在肝、脾、肾、心脏、淋巴结及血管内皮也均有分布。Slit 在体内的作用是通过与其受体 Roundabout (Robo) 结合而产生,

Robo 为单个跨膜受体, 属于免疫球蛋白超家族的跨膜信号分子。在最初的研究中, Slit 以轴突的导向作用和神经细胞转移排斥作用而著称^[2]; 随后的研究发现, Slit 可能是一种潜在的肿瘤抑制基因, 在肿瘤患者体内, Slit 启动子被超甲基化修饰, Slit 蛋白的表达降低^[3-4]。Kim 等^[5]在乳腺癌患者病理组织及血清的 *slit* 基因超甲基化检测中发现, 其阳性率明显高于良性肿块患者, 尤其是原位导管癌和浸润性癌的阳性率更高。在进一步研究中, Slit 不仅抑制神经细胞的转移, 在肿瘤细胞及白细胞的趋化抑制作用中也发挥着重要作用^[6-8]。因此, 很多研究者推测 Slit 蛋白是否在体内也可抑制炎症反应、减轻炎症损伤、有效治疗感染性疾病^[9-10], 这还需要我们对 Slit 蛋白在体内的抗炎作用机制作更深入的研究。

1 Slit 蛋白及其受体 Robo 的分子结构

20 世纪 80 年代, *slit* 基因在果蝇的神经组织内第 1 次被发现, 随后, 多种动物及人体内也被证实存在 *slit* 基因及其表达的 Slit 蛋白。无脊椎动物体内只有一种 *slit* 基因, 而在脊椎动物体内存在 3 种 *slit* 基因, 即 *slit1*、*slit2*、*slit3*; 除神经组织外, 心脏、血管、肌肉等多种非神经组织中也有分布。其表达的 Slit 蛋白是一种分泌型细胞外基质糖蛋白, 分子质量约为 170 kDa, 大约含有 1 500 个氨基酸。从果蝇到哺乳动

[收稿日期] 2013-12-20

[作者简介] 袁熙 (1988-), 女 (汉族), 湖南省娄底市人, 在读硕士, 主要从事输血免疫学研究。

[通信作者] 李碧娟 E-mail: libijuan0528@126.com

物,Slit 蛋白的分子结构都十分保守。人 Slit 蛋白由一个 N-端信号肽、4 个富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeats, LRRs)、9 个表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)样结构、1 个多聚层黏蛋白 G 结构域和 1 个 C-端含半胱氨酸序列五个部分组成^[11](图 1)。Slit 蛋白在蛋白水解酶的作用下分解为两部分:Slit-N 与 Slit-C,Slit-N 包括 1 个 N-端信号肽、4 个 LRRs 重复序列和 5 个 EGF 样结构;Slit-C 则由剩下的部分组成。Slit-N 主要与其受体 Robo 结合而在体内发挥生物学作用;Slit-C 调节其在各组织细胞中的分布^[12]。

Robo 是免疫球蛋白家族的一类新成员,与配体 Slit 蛋白结合后在组织中发挥作用。Robo 基因分为 4 类:Robo1、Robo2、Robo3、Robo4,在多种细胞及血管内皮上表达。其组成结构相似,Robo1、Robo2 及 Robo3 包含 5 个 Ig 样重复序列、3 个 III 型纤维连接蛋白样结构、1 个跨膜区域和 4 个 CC 基序(CC0、CC1、CC2、CC3);而 Robo4 只包含 3 个 Ig 样重复序列^[13]。细胞

外区域为 Ig 样重复序列和 III 型纤维连接蛋白样结构,胞内区是 4 个 CC 基序(图 1)。

一级结构相似的不同亚型 Slit 蛋白可以与不同的 Robo 受体结合产生不同的生物学作用,在体内与 Slit 蛋白结合后负性调节趋化性的主要是 Robo1 和 Robo4。形成 Slit-Robo 复合物时,Robo 的 N-端免疫球蛋白样区域 IG1-2 与 Slit 的第 2 个亮氨酸重复序列(Slit D2)连接(图 2~3),硫酸乙酰肝素(heparan sulfate,HS)蛋白聚糖作为在 Slit-Robo 信号途径的一个重要的共受体,与 Slit 蛋白 C-端连接后在 Slit-Robo 复合物的表面不断延伸^[14]。Fukuhara 等^[11]使用组织结构突变的方法发现,Slit 和 HS/肝素连接的主要决定簇包含在 IG1 内,而 IG2 可能是一个次要的 Slit2 D2 结合位点;IG1-IG2 连接的可变性允许 Slit2 D2 与 IG1 和 IG2 间连接的转换,并调节其下游的信号转导,而它们之间的连接也可通过 Slit D2 的第 365 位酪氨酸残基 Tyr 与 IG1 的第 86 位苏氨酸残基 Thr 上的氢键来加强^[15]。

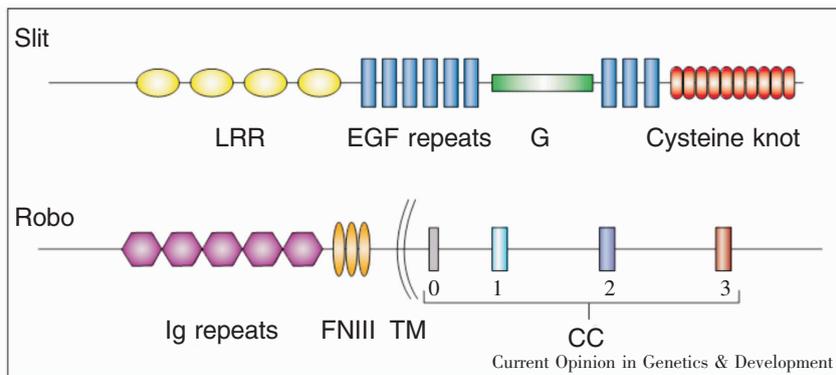
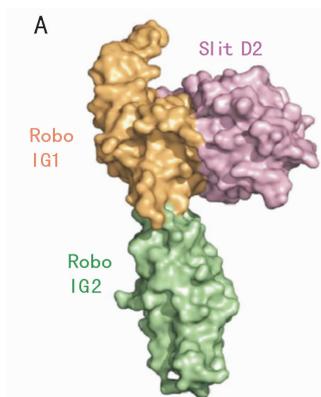


图 1 哺乳动物 Slit 及 Robo 蛋白的原始结构^[8]

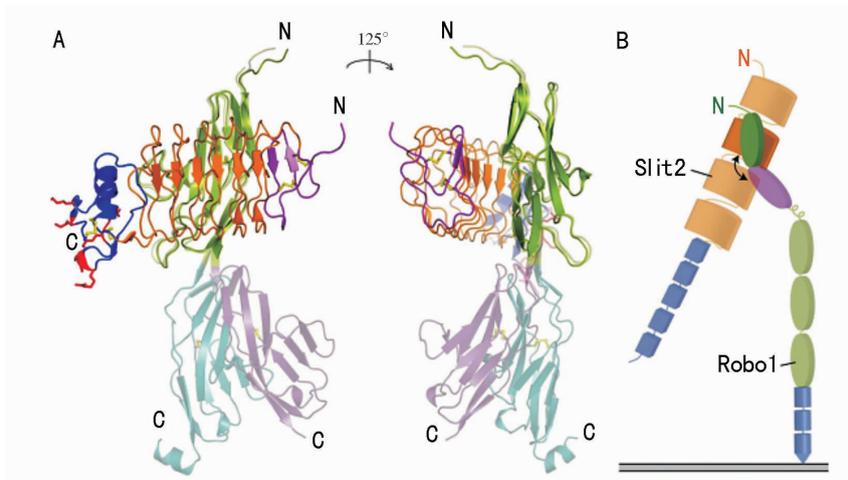


人体内 Slit2 D2-Robo1 IG1-2 复合物的晶状结构模型:浅褐色表示 Robo1 IG1;浅绿色表示 Robo1 IG2;浅紫色表示 Slit2 D2^[11]

图 2 Slit-Robo 复合物上的肝素结合位点

2 Slit 蛋白在抗炎治疗中的作用及其机制

细菌、病毒或真菌等病原体感染人体时,免疫系统迅速激活并分泌多种趋化因子,募集中性粒细胞及巨噬细胞等吞噬外来病原体,达到保护自身组织的目的。但在严重感染或细菌病毒物质反复入侵时,机体可释放大量细胞因子进入血液循环,这种状态称为高细胞因子血症或细胞因子风暴。此时,大量的免疫细胞被激活,在清除有害物质的同时也对自身正常组织细胞进行吞噬及破坏,使炎症加重,感染难以控制,预后极差。Slit 蛋白是一种可能的抗炎因子,在严重的感染性疾病时补充外源性 Slit 蛋白,可以减少免疫细胞大量聚集对人体正常细胞的损伤,改善重症感染患者的预后。



A: 不同角度下的两个 Robo1 IG1-2 重叠晶状体结构及 Slit2 D2 结合 Robo1 IG1 示意图; B: 弯曲箭头处表示 Slit2 与 Robo1 结合; 绿色表示 Robo1 IG1 区域, 橘色表示 Slit2 D2 区域^[15]

图 3 Robo1-IG1-2 链状结构的可变性

2.1 抑制趋化因子的趋化性, 阻止细胞转移 2001 年, Wu 等^[6]在对实验小鼠的研究中发现, Slit 通过与其受体 Robo 结合而抑制趋化因子的趋化性, 该研究提示人体内存在抑制趋化性的负性调节因子。Guan 等^[16]使用 Slit2 干预小鼠免疫应答, 其结果表明, Slit2 蛋白明显抑制朗格汉斯细胞的转移; 而 Kanellis 等^[17]建立的小鼠新月体肾小球肾炎模型中, 其内源性 Slit2 蛋白表达明显减少; 使用外源性 Slit2 蛋白对模型小鼠进行治疗后, 单核细胞趋化蛋白介导的炎性细胞转移明显减少, 实验小鼠的预后得到改善。进一步的实验证明, Slit2 蛋白可以明显减少包括中性粒细胞在内的多种细胞向炎症部位转移, 而这些都是通过抑制趋化因子的趋化性而实现^[18]。因此, 无论是败血症等全身重症感染还是再灌注造成的局部炎症反应, 抑制趋化因子的趋化性, 减少细胞因子风暴时引起的多种炎性细胞迁移都十分重要^[9, 19]。

趋化因子在体内调节白细胞趋化性是通过 7 个跨膜 G 蛋白与受体偶联实现的。趋化因子与细胞膜上的受体结合, 受体极化与 G 蛋白偶联, 空间构象发生改变, 使细胞内 Rho 家族中的小 GTP 酶包括 RhoA、Rac 和 Cdc42 等活化, 细胞骨架发生重排, 促使细胞与血管内皮间的黏附增加, 细胞向炎症部位迁移^[20]。而 Slit 蛋白与细胞表面 Robo 受体结合后, 促进细胞内可溶性重组 GTP 酶活化蛋白 (soluble recombinant GTPase-activating protein, srGAPs) 与 Robo 上的 CC3 基序连接, 增加 srGAPs 与 Cdc42、RhoA 间的结合, GTP 酶的磷酸化及活化

减少, 趋化性受抑制; Slit-Robo 复合物对 Rac 引起的白细胞趋化性无明显影响^[8, 21-22]。

2.2 阻止白细胞与血管内皮的黏附, 减少细胞渗出

炎症反应时, 在趋化因子的诱导下, 白细胞沿着血管壁滚动并与血管内皮黏附, 这是白细胞渗出的重要步骤。有研究者提出, 阻止白细胞与血管壁的黏附可以明显减少细胞渗出, 从而减轻炎症反应。使用在体显微镜技术观察 Slit 蛋白调节体内白细胞作用的实验中, Altay 等^[23]给小鼠注射肿瘤坏死因子 (TNF)- α 和夹闭双侧颈动脉, 分别制作脑血管炎症和大脑半球缺血模型, 然后系统性给予 Slit 蛋白, 结果显示给予 TNF- α 4 h 和大脑半球缺血 24 h 后的白细胞与内皮间黏附显著减少, 这个结果有力地支持了前面提出的假设。可能的作用机制是通过抑制 Src、PI-3 等多种磷酸激酶的活化来实现。Src 激酶、PI-3 激酶是 CXCL-12/CXCR-4 趋化因子活化的早期信号分子; 细胞膜受体信号转导后, 使这些酶磷酸化而活化是白细胞黏附和转移过程中的重要机制^[20]。而当 Slit 蛋白与细胞膜上的受体 Robo 结合后, Src 激酶和 PI-3 激酶活化减少, 下游信号减弱, 抑制了白细胞与血管内皮间的黏附, 从而阻止白细胞向炎症部位的迁移^[24]。Src 的底物包括黏着斑激酶 FAK、相关黏附焦点酪氨酸激酶 RAFTK (pyk2) 和桩蛋白。Slit 可以抑制 FAK 上 576 位点及 RAFTK 上 580 和 881 位点的残基磷酸化, 阻止 Src 激酶的活化^[7]。此外, 丝裂原激活的蛋白激酶 MAPK 路径也是细胞内信号传递过程中的重要介质, 包括细胞外调节激酶 ERKs (p44/42)、应激活

化蛋白激酶 SAPK2/p38、SAPK1/JNK 等。Slit 蛋白可以阻止 CXCL12 诱导的 p44/42 活化,但相同条件下,Slit 对 p38 和 JNK 激酶没有明显的活化抑制效应^[25],因此推测 Slit 在抑制 MAPK 路径时主要作用于 p44/42。

2.3 紧密血管内皮细胞间连接,稳定血管 机体在细胞因子的刺激下,血管通透性增加,大量炎症介质、炎症细胞及蛋白等物质渗出,加重炎症反应。因此,加强血管内皮间连接,减少渗出是抗炎治疗的一个重要机制。而 Slit 蛋白通过与其受体结合后,加强血管内皮细胞间的紧密连接,发挥稳定血管的作用^[26]。该过程主要是依赖增加内皮间连接蛋白——VE-钙黏蛋白的定植。

炎症信号传递至细胞内时,许多非受体酪氨酸激酶、丝氨酸-苏氨酸激酶和小 GTP 酶活化形成短暂的空间构象改变,VE-钙黏蛋白内陷,血管通透性增加,而 Slit 蛋白可以在与内皮特异性受体 Robo4 结合后抑制这些酶的活化,提高 VE-钙黏蛋白的定植,从而保持血管的完整性,降低炎症反应时血管的高渗状态^[27];而 p120 连环蛋白与钙黏蛋白类似,通过与 VE-钙黏蛋白结合,可以促进细胞间连接。Slit2-N 可以增加细胞表面 p120 连环蛋白含量,促进其与 VE-钙黏蛋白间的连接,抑制趋化因子 IL-1 β 等诱导的 VE-钙黏蛋白上酪氨酸磷酸化,稳定血管系统^[9],达到减少炎症介质等物质渗出的目的。

3 Slit 蛋白在炎症疾病中的作用

研究表明,Slit 蛋白可在全身多个器官中表达,当人体局部发生炎症反应或者全身重症感染时,Slit 蛋白与其受体 Robo 结合,抑制趋化因子的趋化性和减少炎症细胞的迁移,稳定血管系统,防止过度的炎症反应对正常组织造成损伤。目前,Slit 蛋白在炎症疾病的应用仍处于探索阶段,但在已有的文献报道中,通过制造动物模型研究 Slit 蛋白对炎症的治疗情况已取得很大进展,证实 Slit 蛋白在多种炎症疾病中都有显著的疗效。部分 Slit 蛋白在不同炎症疾病中的应用见表 1。

4 展望

国外已有大量实验证明,Slit 蛋白在体内可以抑制白细胞趋化性和多种细胞的转移,减轻炎症反

表 1 Slit 蛋白在不同炎症疾病中的应用

疾病	受体	配体	参考文献
新月体型肾小球肾炎	Slit2	RoboN	[17]
败血症	Slit2	Robo4	[9,26]
脑血管炎症	SlitN	RoboN	[23]
禽流感 H5N1	Slit2N	Robo4	[9]
HIV 感染	Slit2	Robo1	[28]
肾缺血再灌注损伤	Slit2	Robo	[19]
肺炎	Slit2	Robo1	[22]
腹膜炎	Slit2	Robo1	[18]
增殖型玻璃体视网膜病变	Slit	Robo1	[29]

应。当机体处于炎症状态时,Slit 的表达较正常个体明显降低,不能有效阻止炎症损伤,补充外源性 Slit 蛋白可以明显改善实验动物的预后。同样,肿瘤患者如乳腺癌患者,其癌组织中 Slit 蛋白也较良性乳腺肿瘤组织明显降低;进一步的研究发现乳腺癌患者出现大量 *slit* 基因的启动子超甲基化,因此推测 Slit 蛋白表达减少的原因可能为癌基因的过度表达造成 *slit* 基因启动子超甲基化,使 Slit 蛋白无法正常表达^[30]。而处于炎症状态时,Slit 蛋白的表达降低是通过何种原因引起,目前尚无相关研究及文献报道,这有待我们作更深入的研究。此外,我们也可以针对该作用机制,使用药物来抑制其作用过程,达到抑制 Slit 蛋白减少的目的,从而改善炎症患者的预后,为临床治疗重症感染的疾病提供另一条新途径。

目前,有很多研究指出,人脑组织、肾脏、肝脏、肺、淋巴结、血管内皮均可生成 Slit,并通过结合单个跨膜受体 Robo 来发挥细胞转移排斥等作用。而 Robo 产生的部位在神经轴突、中性粒细胞等表面,Slit 主要通过旁分泌或自分泌的形式与 Robo 结合。人体内源性 Slit 是否也可以以内分泌的方式将 Slit 蛋白通过血液循环运输到远处受体部位发挥作用,我们可以检测含蛋白较多的冷沉淀或血浆,若冷沉淀或者血浆中可以检测出 Slit 蛋白,提示我们可以通过输注冷沉淀或者血浆补充 Slit 蛋白来改善炎症反应,并可以比较两者之间含量的差别而合理选择,使冷沉淀或血浆作为获取 Slit 蛋白治疗炎症疾病的一种新方法。

[参考文献]

- [1] Li H S, Chen J H, Wu W, et al. Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons [J]. Cell, 1999, 96(6): 807 -

818.

- [2] Rothberg J M, Hartley D A, Walther Z, et al. Slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system [J]. *Cell*, 1988, 55(6): 1047-1059.
- [3] Sharma G, Mirza S, Prasad C P, et al. Promoter hypermethylation of p16INK4A, p14ARF, CyclinD2 and Slit2 in serum and tumor DNA from breast cancer patients [J]. *Life Sci*, 2007, 80(20): 1873-1881.
- [4] Dong R, Yu J, Pu H, et al. Frequent Slit2 promoter methylation in the serum of patients with ovarian cancer [J]. *J Int Med Res*, 2012, 40(2): 681-686.
- [5] Kim G E, Lee K H, Choi Y D, et al. Detection of Slit2 promoter hypermethylation in tissue and serum samples from breast cancer patients [J]. *Virchows Arch*, 2011, 459(4): 383-390.
- [6] Wu J Y, Feng L, Park H T, et al. The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors [J]. *Nature*, 2001, 410(6831): 948-952.
- [7] Prasad A, Fernandis A Z, Rao Y, et al. Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10): 9115-9124.
- [8] Wong K, Park H T, Wu J Y, et al. Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(5): 583-591.
- [9] London N R, Zhu W, Bozza F A, et al. Targeting Robo4-dependent Slit signaling to survive the cytokine storm in sepsis and influenza [J]. *Sci Transl Med*, 2010, 2(23): 23ra19.
- [10] Fernandis A Z, Ganju R K. Slit: a roadblock for chemotaxis [J]. *Sci STKE*, 2001(91): pe1.
- [11] Fukuhara N, Howitt J A, Hussain S A, et al. Structural and functional analysis of slit and heparin binding to immunoglobulin-like domains 1 and 2 of *Drosophila* Robo [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 16226-16234.
- [12] Ning Y, Sun Q, Dong Y, et al. Slit2-N inhibits PDGF-induced migration in rat airway smooth muscle cells: WASP and Arp2/3 involved [J]. *Toxicology*, 2011, 283(1): 32-40.
- [13] Chedotal A. Slits and their receptors [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 621: 65-80.
- [14] Zhang F, Ronca F, Linhardt R J, et al. Structural determinants of heparan sulfate interactions with Slit proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(2): 352-357.
- [15] Morlot C, Thielens N M, Ravelli R B, et al. Structural insights into the Slit-Robo complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(38): 14923-14928.
- [16] Guan H, Zu G, Xie Y, et al. Neuronal repellent Slit2 inhibits dendritic cell migration and the development of immune responses [J]. *J Immunol*, 2003, 171(12): 6519-6526.
- [17] Kanellis J, Garcia G E, Li P, et al. Modulation of inflammation by slit protein in vivo in experimental crescentic glomerulonephritis [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(1): 341-352.
- [18] Tole S, Mukovozov I M, Huang Y W, et al. The axonal repellent, Slit2, inhibits directional migration of circulating neutrophils [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(6): 1403-1415.
- [19] Chaturvedi S, Yuen D A, Bajwa A, et al. Slit2 prevents neutrophil recruitment and renal ischemia-reperfusion injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(8): 1274-1287.
- [20] Roca-Cusachs P, Sunyer R, Trepast X. Mechanical guidance of cell migration: lessons from chemotaxis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(5): 543-549.
- [21] Prasad A, Qamri Z, Wu J, et al. Pivotal Advance: Slit-2/Robo-1 modulates the CXCL12/CXCR4-induced chemotaxis of T cells [J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82(3): 465-476.
- [22] Ye B Q, Geng Z H, Ma L, et al. Slit2 regulates attractive eosinophil and repulsive neutrophil chemotaxis through differential srGAP1 expression during lung inflammation [J]. *J Immunol*, 2010, 185(10): 6294-6305.
- [23] Altay T, McLaughlin B, Wu J Y, et al. Slit modulates cerebrovascular inflammation and mediates neuroprotection against global cerebral ischemia [J]. *Exp Neurol*, 2007, 207(2): 186-194.
- [24] Legg J A, Herbert J M, Clissold P, et al. Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration [J]. *Angiogenesis*, 2008, 11(1): 13-21.
- [25] Prasad A, Fernandis A Z, Rao Y, et al. Slit protein-mediated inhibition of CXCR4-induced chemotactic and chemoinvasive signaling pathways in breast cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10): 9115-9124.
- [26] London N R, Li D Y. Robo4-dependent Slit signaling stabilizes the vasculature during pathologic angiogenesis and cytokine storm [J]. *Curr Opin Hematol*, 2011, 18(3): 186-190.
- [27] Jones C A, London N R, Chen H, et al. Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability [J]. *Nat Med*, 2008, 14(4): 448-453.
- [28] Anand A R, Tirumuru N, Ganju R K. A novel role for Slit2/Robo1 axis in modulating HIV-1 replication in T cells [J]. *AIDS*, 2011, 25(17): 2105-2111.
- [29] Huang L, Xu Y, Yu W, et al. Effect of Robo1 on retinal pigment epithelial cells and experimental proliferative vitreoretinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(6): 3193-3204.
- [30] Sharma G, Mirza S, Prasad C P, et al. Promoter hypermethylation of p16INK4A, p14ARF, CyclinD2 and Slit2 in serum and tumor DNA from breast cancer patients [J]. *Life Sci*, 2007, 80(20): 1873-1881.