

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00459

G 蛋白偶联受体在血管发育中的作用

李方方, 李文庆, 荆清

上海交通大学医学院, 中国科学院上海生命科学研究院健康科学研究所干细胞生物学重点实验室, 上海 200025

摘要: 血管发育包括血管发生和血管生成两个阶段。近年研究表明, G 蛋白偶联受体广泛参与调控成血管细胞的分化、迁移和接合, 尖端细胞和柄细胞命运决定, 内皮细胞的增殖、迁移和管腔形成等多个过程。文章以血管发育中的这些关键事件为主线, 总结了 G 蛋白偶联受体家族成员特别是视紫红质类和卷曲类受体在调节血管发育方面的最新研究进展。文章着重介绍了斑马鱼作为模式生物在血管发育生物学研究中的独特优势, 并展望了利用斑马鱼深入开展 G 蛋白偶联受体相关研究的广阔前景。

关键词: G 蛋白偶联受体; 血管发生; 血管生成; 视紫红质样受体; Frizzled/Smoothed; 斑马鱼

G protein-coupled receptors in vascular development

LI Fang-Fang, LI Wen-Qing, JING Qing

Key Laboratory of Stem Cell Biology, Institute of Health Sciences, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine & Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China

Abstract: The vascular development consists of two continuous processes: vasculogenesis and angiogenesis. Some researches showed that G protein-coupled receptors (GPCRs) play important roles in these processes, including the regulation of differentiation, migration and coalescence of angioblasts, fate decision of tip and stalk cells, proliferation and migration of endothelial cells and tube formation. For the key events of vasculogenesis and angiogenesis, we summarize the recent advance of GPCRs, especially Class A and F. In particular, the advantages, of zebrafish, which has been widely used in developmental biology as a vertebrate model, are introduced. Using zebrafish will bring the great potential and prospect to demonstrate the role of GPCRs in vascular development in the future.

Keywords: G protein-coupled receptors; vasculogenesis; angiogenesis; rhodopsin-like receptors; Frizzled/Smoothed; zebrafish

血管发育是生物体血管网络建成和获得功能的过程, 可分为两个阶段, 即血管发生(Vasculogenesis)和血管生成(Angiogenesis)。血管发生是指起源于中

胚层的成血管细胞(Angioblast)在原位分化为内皮细胞, 并通过增殖和迁移组装成原始的血管网^[1-3]。血管生成则是在原始血管网的基础上, 内皮细胞以出

收稿日期: 2012-05-08; 修回日期: 2012-08-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(编号: 81130005)资助

作者简介: 李方方, 在读硕士研究生, 专业方向: 心血管发育生物学。E-mail: lifang091001@163.com

通讯作者: 荆清, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 心血管发育生物学。E-mail: qjing@sibs.ac.cn

网络出版时间: 2012-11-21 9:36:28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20121121.0936.005.html>

芽或非出芽的方式形成新血管。这些血管经过选择性融合和退化等重塑过程,继而招募平滑肌细胞、周细胞等其他类型细胞,形成成熟的血管^[4,5]。血管生长和抑制因子严格调控血管发育的过程,其中对内皮细胞行为的调控居于核心地位。

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是最大的一类跨膜蛋白受体家族,广泛存在于从真菌到哺乳动物的所有生物体中^[6]。GPCRs 具有高度保守的 7 次跨膜结构域,并能够与 G 蛋白相互作用^[7]。当受到胞外信号(蛋白质、肽类、类花生酸等)刺激时,GPCRs 能够偶联不同的 G 蛋白(*Gai*、*Gaq*/11、*Ga*12/13、*Gas*、*Gβ*、*Gγ*)^[7,8],并调节其活性,从而将胞外信号传至胞内,行使多种生理和病理功能。根据序列同源性和功能相似性,GPCRs 可分为 A~F 6 大类;之后根据进化关系将哺乳动物中 GPCRs 分为 5 大类,视紫红质类受体、粘附类受体、分泌类受体、谷氨酸类受体和卷曲类受体^[6]。

目前报道的参与血管发育过程的 GPCRs 大多属于视紫红质类和卷曲类受体,本文将以血管发生和生成中的关键事件为主线,着重介绍这两类 GPCRs 在血管发育中的研究进展,同时对利用斑马鱼这种模式生物进一步阐明其调控机理进行展望。

1 血管发生

1.1 内皮分化基因受体与血管发生

内皮分化基因受体,又称溶血磷脂受体,包括溶血磷脂酸受体(Lysophosphatidic acid receptor, LPAR)和 1-磷酸鞘氨醇受体(Sphingosine-1-phosphate receptor, S1PR)。目前研究表明该类 GPCRs 与血管发生密切相关^[9,10]。

LPAR 及其相关基因,例如 *LPA*、合成酶基因、降解酶基因等,在脊椎动物中非常保守^[11]。LPAR 可被 LPA 激活,介导胞内钙动员、应力纤维形成、神经突收缩、增殖和存活等过程。哺乳动物中,该亚家族成员包括 LPAR1-6,其中 LPAR1-3 属于内皮分化基因受体。催化 LPA 合成的自分泌运动因子(Autoaxin, ATX)^[11-13]或 LPA 通路下游因子 *Gα*13 缺陷的小鼠^[14]卵黄囊和胚胎的血管生成严重缺陷,在胚胎期 9.5 d 时死亡。*Lpar* 单敲^[12,15,16]或双敲^[12]均未观察到上述异常,这可能是由于该受体亚家族成员

在体内的冗余所造成的^[17]。这些研究提示 LPA 及其受体参与了血管发生,但参与其中的受体亚型和精细调节过程尚不清楚,有待进一步研究。

S1PR 与 S1P 结合,能够介导多种细胞类型的粘连及运动,该亚家族包括 S1PR1-5、Gpr3、Gpr6、Gpr12 和 Gpr63,后 4 个受体的生理病理作用尚不清楚^[18-20]。目前,大多实验数据支持 S1P 通过其受体促进血管发生这一观点。绒毛尿囊膜实验表明,胚胎期 7.8 d 外源加入 S1P 能够诱导血管发生,并促进初级血管网络的扩张,但不影响内皮细胞分化或成血管细胞的增殖^[21]。然而,将 *S1pr1*、*S1pr2*、*S1pr3* 和 *S1pr5* 单个缺陷的小鼠尿囊进行体外培养,发现其对早期血管发生没有重要作用^[10, 22]。但当介导 *S1pr2*、*S1pr3* 和 *S1pr4* 信号通路的 *Gα*13 缺陷^[23]时,胚胎在 9.5 d 死亡,此时卵黄囊的血管完全缺失,这一结果又提示 S1P 通路参与调控卵黄囊血管发生过程。S1P-S1PR 信号通路对于血管发生是否具有关键调控作用,还需要直接的实验证据佐证,Gpr3、Gpr6、Gpr12 和 Gpr63 这 4 个受体的功能分析很可能成为解决该问题的突破点。

1.2 趋化因子受体与内皮前体细胞

趋化因子受体与配体结合后,能够调节细胞行为,在免疫细胞发育、分化及炎症反应中起着重要的作用。哺乳动物中有 19 个不同的趋化因子受体,根据它们结合的趋化因子的类型可分为 4 个亚家族,即 CXC 趋化因子受体(CXCR)、CC 趋化因子受体(CCR)、CX3C 趋化因子受体(CX3CR)和 XC 趋化因子受体(XCR)^[24]。其中 CXCR 亚家族在血管发生方面受到了较大的关注。趋化因子受体 CXCR4 及其配体体细胞来源因子(Stromal cell -derived factor-1, SDF-1 又称 CXCL12)参与血管发生,是动员和招募内皮前体细胞的主要调节者^[25,26]。*Cxcr4* 和 *Cxcl12* 的敲除小鼠胚胎均出现胃和小肠大血管的严重缺陷,确认了 CXCL12-CXCR4 信号通路对血管发生的调控是必需的^[27]。而斑马鱼在体研究表明,*Cxcr4* 的同源基因 *cxcr4a* 局限地表达于前中胚层来源的内皮细胞,它的配体 *cxcl12b* 相应地仅表达于侧主动脉附近的中胚层组织。胚胎缺失 *cxcr4a* 或 *cxcl12b* 时会出现侧主动脉缺陷,而背主动脉则不受影响^[28]。这一结果不仅进一步确认了 *cxcr4* 在血管发生中的重要

作用,同时提示不同解剖位置的动脉发生,受到不同信号通路的调节。此外,出生后的血管发生主要由内皮前体细胞(Endothelial progenitor cells, EPCs)介导,CD34(+)的 EPCs 细胞高表达 CXCR4 和 CX3CR1, CXCL12 可以刺激其迁移和粘附^[29],这一发现为缺血性血管疾病的细胞治疗提供了可能。趋化因子受体家族对血管发生的调控仍需进一步探索,该方面的研究将丰富血管发生的调控机制,并为血管疾病提供潜在的治疗新靶点。

2 血管生成

2.1 GPCRs 与内皮尖端细胞和柄细胞的命运决定

Wnt- β -catenin 通路中的受体 Frizzled(FZD)是一种属于 Frizzled/Smoothed 亚家族的 GPCR^[30]。激活该信号通路将促进内皮细胞中 *dll4* 的表达^[31],而细胞内 Notch 信号通路激活的水平对于尖端细胞和柄细胞的命运决定起着至关重要的作用^[32,33]。Dll4 激活临近内皮细胞的 Notch 通路,下调 *VEGFR3* 的表达水平,抑制其成为尖端细胞,稳定柄细胞的状态^[34]。Wnt- β -catenin 通路参与 Dll4-Notch 通路的调节,提示其在尖端细胞和柄细胞命运决定中发挥一定作用。当在小鼠中过表达 β -catenin 时,Notch 被强烈激活,从而破坏内皮细胞的出芽^[31]。同时,Notch 激活的细胞能够诱导 *Nrarp*(Notch-regulated ankyrin repeat-containing protein)表达,进一步激活柄细胞中的 Wnt 通路,使内皮细胞间连接更加紧密并促进其增殖^[35]。

血管生成过程中,尖端细胞释放分泌型分子,如:趋化因子、Apelin、肾上腺髓质素、血管生成素-2 等。其中 *apelin* 选择性地尖端细胞中高表达,可与仅在柄细胞上表达的 GPCR-APJ 结合,激活下游的信号通路,调控柄细胞的行为,从而决定细胞命运^[36]。相关实验提示小鼠 *Cxcr4* 和斑马鱼 *cxcr4* 在尖端细胞命运决定中发挥一定作用。野生型小鼠视网膜尖端细胞中富含 *Cxcr4*, CXCL12-CXCR4 通路对新生小鼠尖端细胞的生成及细胞间连接有重要的作用,若阻断该通路,小鼠视网膜出现尖端细胞缺陷且细胞间连接弱化^[37]。斑马鱼胚胎受精后 36~48 h,迁移的后脑中枢动脉(Central arteries, CtA)尖端细胞中特异表达 *cxcr4*, 当与基部动脉(Basilar artery, BA)

连接后该基因的表达水平迅速下调^[38]。

尖端细胞和柄细胞命运决定是血管生成研究领域中的重要科学问题,深入探讨经典通路间的交互作用及新的调控机制将成为阐明该问题的关键。

2.2 GPCRs 与血管内皮细胞的增殖和迁移

血管生成是内皮细胞、平滑肌细胞、周细胞等多种细胞共同参与的复杂过程。其中,内皮细胞首先对血管生成相关信号分子做出反应,在出芽的起始、管腔形成和管壁构建等方面均发挥主导作用^[5]。因此,内皮细胞行为在血管生成过程中如何被调控是非常重要的问题,是正确理解血管发育过程的关键所在。研究表明,GPCRs 家族中部分成员参与调控血管内皮细胞的增殖和迁移。

2.2.1 内皮分化基因受体

内皮分化基因受体不仅参与血管发生,研究表明,该亚家族也参与到内皮细胞的增殖和迁移过程中。

LPA 及其受体调节血管生成的机制并不明确,近年来研究表明,LPA 及其受体能够促进包括内皮细胞在内的一些细胞类型的迁移^[39,40],内皮细胞的迁移可能是通过促进血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)而引起的^[41]。*Lpar1-3* 敲除的小鼠均未出现血管发育异常^[42]。而斑马鱼在体研究表明,ATX 通过 *Lpar1* 和 *Lpar4* 调控节间血管的生长,*Lpar1* 和 *Lpar4* 共敲低与 ATX 敲低有相似的表型,即受精后 36 h 节间血管生长停滞在肌隔附近,节间血管与背主动脉间的连接被破坏,这提示了 *Lpar1* 和 *Lpar4* 介导的信号通路参与调控内皮细胞间连接^[43]。

不同的 S1PR 被激活会产生不同的效应^[20],S1PR1 和 S1PR3 信号通路对血管生成有促进作用,S1PR1 和 S1PR3 反义寡核苷酸能够抑制 S1P 对血管的促进作用^[42,43]。S1PR1 的拮抗剂在体外实验中能够抑制内皮细胞形成毛细血管样网络,在体实验中该拮抗剂则抑制由 VEGF 引起的角膜血管生成。而 *S1pr2* 对血管既有促进作用,也有抑制作用^[43]。*S1pr2* 缺陷的小鼠血管生成加快,从而促进肿瘤的生长;而当视网膜病变时,*S1pr2* 的缺陷会导致血管生成减少^[44]。同时,S1PR 的激活对内皮细胞和平滑肌细胞间的相互作用尤为重要,*S1pr1* 缺陷的胚胎期

小鼠新生血管平滑肌细胞覆盖不完全^[10], *Slpr2* 和 *Slpr3* 缺陷的小鼠血管覆盖正常, 但内皮细胞形态出现畸形^[22]。以上研究表明, S1P 及其受体在血管生成及后期成熟过程中发挥一定作用, 但其具体机制仍不明确, 此信号通路的进一步阐明将有助于理解血管生成过程中多种细胞如何相互作用。

2.2.2 趋化因子受体

趋化因子受体及其配体可直接调控或间接通过免疫细胞分泌促血管生成因子来调控血管内皮细胞的行为^[45]。趋化因子受体与含谷氨酸-亮氨酸-精氨酸(Glutamic acid-leucine-arginine, ELR)基序的趋化因子(如: CXCL8 和 CXCL2)结合后能够直接促进血管生成^[46], Cxcr2 是其中主要的一类, 其对血管生成的促进作用在角膜微囊袋^[47]和该基因突变的小鼠^[48]中均得到了验证。Cxcl8 和 Cxcl2 能诱导明显的血管新生, 这种效应能够被抗 Cxcr2 的抗体阻断, 且在 *Cxcr2* 的敲除小鼠上不能诱导血管新生^[47], 这些结果证实 Cxcl8 和 Cxcl2 能够激活 Cxcr2, 进而促进血管生成。趋化因子 CXCL12 虽无 ELR, 但与 CXCR4 结合同样能促进血管生成。CXCL12-CXCR4 信号通路特异影响胃肠道内的血管生成, *Cxcr4* 广泛敲除或内皮细胞特异敲除的小鼠胚胎, 肠系膜上动脉与邻近毛细血管间连接减少, 但静脉网正常^[49]。随后, 斑马鱼在体研究显示 CXCL12-CXCR4 信号通路调控 CtA 的迁移, 进而特异地影响脑部血管新生, 其对建立脑部毛细血管网动静脉的连接非常重要。60 h 的野生型斑马鱼 CtA 与 BA 相连, 而突变体中出现了异常的 CtA 间的连接^[38]。另一方面, 趋化因子招募表达趋化因子受体的免疫细胞, 这些免疫细胞能够分泌 VEGF 等促血管生成因子作用于周围的内皮细胞, 从而促进血管生成^[50]。深入了解趋化因子受体及其配体对血管生成的调控过程将有助于理解免疫反应和血管生成相伴而生的机制, 从而寻找新的临床治疗方法。

2.2.3 蛋白酶激活受体

哺乳动物中, 蛋白酶激活受体(Protease-activated receptors, PARs)有 4 个成员 PAR1、PAR2、PAR3 和 PAR4, PAR1/3/4 能被凝血酶、MMP1 激活, PAR2 能被胰蛋白酶激活^[51]。其中 PAR1 在血管生成方面起着重要的作用, 该基因敲除的小鼠约 50%死于妊娠

中期, 并伴随出血现象, 若在内皮细胞中过表达 *PAR1*, 则可挽救胚胎出血表型^[52]。鸡绒毛尿囊膜在体实验及基质胶离体实验显示, PAR1 的小分子特异抑制剂能够抑制内皮细胞增殖并诱导其凋亡^[53], 这突显了 *PAR1* 在血管生成中的关键作用。此外, PAR1 激活能够促进血小板释放 VEGF, 抑制释放血管抑制因子内皮他丁(Endostatin); 而 PAR4 对两种因子的释放发挥与 PAR1 相反的调控作用^[54]。截至目前, 斑马鱼中已克隆到 4 个 *PARs*, 其表达谱提示不同的 *PARs* 在胚胎发育过程中发挥着不同的作用, 其中 *PAR1* 在胚胎早期泛在表达, 而后在包括心血管在内的特定器官中表达, 其表达谱与哺乳动物极为类似^[51]。斑马鱼中 *PARs* 表达谱的确定为进一步研究该亚家族在血管生成中的细胞生物学机制奠定了良好的基础。

2.2.4 血管紧张素受体和 Apelin-APJ 系统

AGTR1(Angiotensin II receptor, type 1)和 AGTR2(Angiotensin II receptor, type 2)是血管紧张素受体, 血管紧张素 II(Angiotensin II, ANGII)与这两种受体结合发挥相反的作用。受到 ANGII 刺激后, *Agtr1* 能够抑制血管生成, 而 *Agtr2* 促进血管的生成^[55], 使用 *Agtr1* 的拮抗剂时, 血管生成会加快; 与野生型小鼠相比, *Agtr2* 敲除的小鼠接种癌细胞后, 其血管生成明显减少。但最近研究表明, 在病理条件下, 选择性激活 *Agtr1* 能够促进血管生成, 而激活 *Agtr2* 抑制血管的生成。*Agtr1* 偶联 $G_{12/13}$, 促进 *Vegf* 表达, 诱导内皮细胞出芽和迁移, 从而调控血管生成。而 *Agtr2* 则偶联 G_i , 抑制血管生成^[56]。

Apelin-APJ 系统能促进内皮细胞的增殖及平滑肌细胞的迁移, *APJ* 受体的表达位置决定其功能, 该系统在心血管方面的作用报道较多。当 *APJ* 在内皮细胞和平滑肌细胞^[57,58]表达时, 主要参与血压调节和血管生成^[59]。体外实验表明, 低氧可诱导培养的内皮细胞中 *Apelin* 表达, 从而促进其增殖; 若使用 RNAi 技术将 *Apelin* 或 *APJ* 敲低, 小鼠胚胎内皮细胞的增殖则会受到抑制^[57]。利用小鼠颈动脉结扎模型发现, 内皮细胞来源的 *Apelin* 通过旁分泌上调受损血管处平滑肌细胞 *APJ* 的表达, 刺激平滑肌细胞迁移至新生内膜处^[60]。斑马鱼基因组中有 *agtr11a* 和 *agtr11b* 两个 *APJ* 的同源基因, 其中 *agtr11a* 仅在静脉

中表达^[61], 尾鳍再生实验证实 apelin-agtr11 参与低氧诱导的血管再生^[57], 其功能需深入研究。

AT1R 与 APJ 受体同源性高, 组织表达高度相似。体外实验表明, AT1R 与 APJ 可形成异源二聚体, 有效减少 APJ 的数量^[62], 提示了两种受体之间可能存在相互作用。在体水平研究这两类 GPCR 的相互作用机制, 将有助于全面揭示其生理功能。

新近研究表明, 还有一些 GPCRs 成员也参与调控内皮细胞的迁移和增殖。内皮细胞中高表达的分泌素类受体-GPR124 完全敲除或在内皮细胞特异敲除会破坏小鼠神经中枢系统的血管生成^[63]。在体实验显示, GPR124 能够调节内皮细胞的出芽迁移, 该受体很可能成为神经中枢系统相关的血管疾病治疗的靶点。视紫红质类受体-D2 多巴胺受体(D2 dopamine receptor, D2DR)与 VEGFR2 在细胞表面共定位, 多巴胺能够抑制 VEGFR2 的磷酸化, 从而抑制内皮细胞的增殖和迁移, 降低微血管的通透性^[64]。同时有实验数据表明, 多巴胺-D2DR 通路能够促进皮肤损伤组织的血管再生^[65]。

2.3 GPCRs 与管腔形成

近几年, 对血管管腔形成的分子机制有了深入的了解, 主要包括内皮细胞极性建立, 招募壁细胞和管腔扩张 3 个过程。研究表明, GPCRs 也参与其中。

招募壁细胞(周细胞和平滑肌细胞)到新生血管周围是血管稳定和成熟的关键环节。内皮细胞和壁细胞之间的连接主要是由血管内皮细胞分泌的血小板衍生生长因子 B(Platelet derived growth factor B, PDGFB)吸引表达血小板衍生生长因子受体 β (Platelet derived growth factor receptor β , PDGFR β)的周细胞向新生血管迁移。研究表明, G 蛋白偶联受体 S1P1 可能参与此过程, 血小板分泌 S1P, 作用于其受体 S1PR1, 促进 N-钙粘蛋白的胞内运输, 从而增强内皮细胞与周细胞间的附着和细胞连接^[10,66]。

管腔扩张过程中, 血管生成素(Angiopoietin-1, Ang1)Ang1-Tie2, Apelin-APJ 信号通路参与调控管腔大小的形成。VEGF 可诱导出芽的血管内皮表达 APJ, 当 Ang1 作用于血管内皮的 Tie2 受体时, 会诱导这些内皮细胞表达 Apelin, 进而介导内皮细胞集合作用, 促进较大的内皮细胞束形成, 从而发育为直径较大的血管并促进内皮细胞增殖^[67,68]。

此外, 视紫红质类受体-GPR4 对血管的稳定性有一定的调节作用^[69]。AT1R 与 ANGII 结合, 通过激活 MAPK 信号通路, 提高环氧酶(Cyclooxygenase-2, COX-2)的表达^[70], 促进血管平滑肌细胞的增殖。近期体外实验发现 PAR1 在凝血酶的刺激下能够上调 VEGF, 从而促进平滑肌细胞增殖和管腔形成^[71]。

3 展望

心血管是胚胎期第一个获得并行功能的系统, 血管的形态建成和功能获得对于胚胎其他部分的正常发育至关重要。因此, 研究血管发育过程中的调控机制一直是国际上的研究热点和前沿领域。确认新的参与血管发育的调控因子以及它们和经典通路之间的交互作用, 是亟待解决的重要科学问题, 并且具有显而易见的应用价值, 可能为相关疾病的诊疗提供新的策略和靶点。

作为一类数目庞大的受体家族, 越来越多的报道表明 GPCRs 参与了血管发生和生成的调节过程, 同时 GPCRs 是很多临床心血管疾病药物作用的靶点, 因此 GPCRs 在血管发育调控中的作用受到了极大的重视。在血管细胞中表达的 GPCRs 有上百种, 它们对血管发育可能都有一定的作用, 需要深入研究。一些新模型, 特别是斑马鱼的应用, 使得在体水平可视化地研究 GPCRs 调控血管发育的细胞生物学行为成为可能。

血管发育研究中, 主要的模型包括小鼠视网膜、小鼠后脑、斑马鱼节间血管、体外胚状体系统^[4]和鸡胚^[72]等。已有的 GPCRs 研究大多在小鼠和体外模型中进行。在小鼠中, 如果将 GPCRs 通路上的某些基因敲除后, 如 *Gal3*^[14], 会导致胚胎子宫内死亡, 不利于确认其在血管发育中的作用; 且因其胚胎在子宫内发育, 无法动态活体直接地观察 GPCRs 对相关细胞行为的调控。而体外模型中对 GPCRs 调控血管发育的认识, 均需进一步在体内模型上加以确认。斑马鱼与上述其他模型相比, 胚胎透明, 有血管特异表达荧光蛋白的多种转基因鱼系, 且早期胚胎的存活和发育不依赖于血液循环, 对血管发育研究非常有利。同时, 斑马鱼的基因操作技术较为成熟, 如条件性基因诱导表达、morpholino 介导的基因敲低、ZFN 敲除和 TALEN 敲除^[73]等技术。上述研究

优势结合动态高分辨率活体成像技术, 为从细胞生物学水平在体内分析 GPCRs 在血管发育中的调控功能提供了极大的便利。此外, 斑马鱼胚胎体积小, 饲养方便, 发育周期短, 特别适合高通量的小分子和药物筛选, 为确认新的参与血管发育的 GPCRs 提供了强大的工具。

近年来研究显示, 斑马鱼中已鉴别出多种 GPCRs, 并且它们的表达模式及功能具有一定的保守性^[51]。因此, 进一步利用斑马鱼等模式生物从在体水平阐明数目庞大的 GPCRs 参与血管形态建成和功能获得的细胞生物学机制, 不仅能深化对血管发育基本科学问题的认识, 而且为血管发育及病理性血管生成相关疾病——特别是肿瘤发生, 提供治疗的新靶点。

参考文献(References):

- [1] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011, 473 (7347): 298–307. [DOI](#)
- [2] Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(6): 464–478. [DOI](#)
- [3] You LR, Lin FJ, Lee CT, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature*, 2005, 435(7038): 98–104. [DOI](#)
- [4] Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development*, 2011, 138(21): 4569–4583. [DOI](#)
- [5] Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(9): 551–564. [DOI](#)
- [6] Krishnan A, Almén MS, Fredriksson R, Schiöth HB. The origin of GPCRs: identification of mammalian like *Rhodopsin*, *Adhesion*, *Glutamate* and *Frizzled* GPCRs in fungi. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29817. [DOI](#)
- [7] Liapakis G, Cordomi A, Pardo L. The G-protein coupled receptor family: actors with many faces. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(2): 175–185. [DOI](#)
- [8] Lappano R, Maggiolini M. G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(1): 47–60. [DOI](#)
- [9] Rivera-Lopez CM, Tucker AL, Lynch KR. Lysophosphatidic acid (LPA) and angiogenesis. *Angiogenesis*, 2008, 11(3): 301–310. [DOI](#)
- [10] Liu YJ, Wada R, Yamashita T, Mi YD, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*, 2000, 106(8): 951–961. [DOI](#)
- [11] Yukiura H, Hama K, Nakanaga K, Tanaka M, Asaoka Y, Okudaira S, Arima N, Inoue A, Hashimoto T, Arai H, Kawahara A, Nishina H, Aoki J. Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in *Zebrafish*. *J Biol Chem*, 2011, 286(51): 43972–43983. [DOI](#)
- [12] Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. Requirement for the *lpa1* lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(24): 13384–13389. [DOI](#)
- [13] Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH, Chun J. Characterization of *lpa2* (*Edg4*) and *lpa1/lpa2* (*Edg2/Edg4*) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to *lpa2*. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(19): 6921–6929. [DOI](#)
- [14] Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, Moolenaar WH. Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and $G\alpha_{12/13}$ subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell*, 1999, 10(6): 1851–1857. [DOI](#)
- [15] Ye XQ, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J. *LPA3*-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature*, 2005, 435 (7038): 104–108. [DOI](#)
- [16] Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano MR, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S. *LPA4* regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood*, 2010, 116(23): 5060–5070. [DOI](#)
- [17] Teo ST, Yung YC, Herr DR, Chun J. Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB Life*, 2009, 61(8): 791–799. [DOI](#)
- [18] Rosen H, Liao JY. Sphingosine 1-phosphate pathway therapeutics: a lipid ligand-receptor paradigm. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(4): 461–468. [DOI](#)
- [19] Uhlenbrock K, Huber J, Ardati A, Busch AE, Kostenis E. Fluid shear stress differentially regulates *gpr3*, *gpr6*, and *gpr12* expression in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*, 2003, 13(2): 75–84. [DOI](#)

- [20] Argraves KM, Wilkerson BA, Argraves WS. Sphingosine-1-phosphate signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *World J Biol Chem*, 2010, 1(10): 291–297. [DOI](#)
- [21] Argraves KM, Wilkerson BA, Argraves WS, Fleming PA, Obeid LM, Drake CJ. Sphingosine-1-phosphate signaling promotes critical migratory events in vasculogenesis. *J Biol Chem*, 2004, 279(48): 50580–50590. [DOI](#)
- [22] Kono M, Mi YD, Liu YJ, Sasaki T, Allende ML, Wu YP, Yamashita T, Proia RL. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P₁, S1P₂, and S1P₃ function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem*, 2004, 279(28): 29367–29373. [DOI](#)
- [23] Offermanns S, Mancino V, Revel JP, Simon MI. Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Gα₁₃ deficiency. *Science*, 1997, 275(5299): 533–536. [DOI](#)
- [24] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, 12(2): 121–127. [DOI](#)
- [25] Hristov M, Zernecke A, Liehn EA, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. *Thromb Haemost*, 2007, 98(2): 274–277. [DOI](#)
- [26] Sainz J, Sata M. CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(2): 263–265. [DOI](#)
- [27] Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 1998, 393(6685): 591–594. [DOI](#)
- [28] Siekmann AF, Standley C, Fogarty KE, Wolfe SA, Lawson ND. Chemokine signaling guides regional patterning of the first embryonic artery. *Genes Dev*, 2009, 23(19): 2272–2277. [DOI](#)
- [29] Walenta KLH, Bettink S, Böhm M, Friedrich EB. Differential chemokine receptor expression regulates functional specialization of endothelial progenitor cell subpopulations. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(2): 299–305. [DOI](#)
- [30] Schulte G, Bryja V. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(10): 518–525. [DOI](#)
- [31] Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, Caprini A, Giampietro C, Taketo MM, Iruela-Arispe ML, Adams RH, Dejana E. The Wnt/β-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev Cell*, 2010, 18(6): 938–949. [DOI](#)
- [32] Siekmann AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*, 2007, 445(7129): 781–784. [DOI](#)
- [33] Roca C, Adams RH. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev*, 2007, 21(20): 2511–2524. [DOI](#)
- [34] Benedito R, Rocha SF, Woeste M, Zamykal M, Radtke F, Casanovas O, Duarte A, Pytowski B, Adams RH. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature*, 2012, 484(7392): 110–114. [DOI](#)
- [35] Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, Ondr JK, Rao S, Lang RA, Thurston G, Gerhardt H. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell*, 2009, 16(1): 70–82. [DOI](#)
- [36] del Toro R, Prahst C, Mathivet T, Siegfried G, Kaminker JS, Larrivee B, Breant C, Duarte A, Takakura N, Fukamizu A, Penninger J, Eichmann A. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood*, 2010, 116(19): 4025–4033. [DOI](#)
- [37] Strasser GA, Kaminker JS, Tessier-Lavigne M. Microarray analysis of retinal endothelial tip cells identifies CXCR4 as a mediator of tip cell morphology and branching. *Blood*, 2010, 115(24): 5102–5110. [DOI](#)
- [38] Bussmann J, Wolfe SA, Siekmann AF. Arterial-venous network formation during brain vascularization involves hemodynamic regulation of chemokine signaling. *Development*, 2011, 138(9): 1717–1726. [DOI](#)
- [39] Panetti TS, Nowlen J, Mosher DF. Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(4): 1013–1019. [DOI](#)
- [40] Avraamides C, Bromberg ME, Gaughan JP, Thomas SM, Tsygankov AY, Panetti TS. Hic-5 promotes endothelial cell migration to lysophosphatidic acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(1): H193–H203. [DOI](#)
- [41] Ptaszynska MM, Pendrak ML, Stracke ML, Roberts DD. Autotaxin signaling via lysophosphatidic acid receptors contributes to vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(3): 309–321. [DOI](#)
- [42] Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell*, 1999, 99(3): 301–312. [DOI](#)
- [43] Du W, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Gonda K, Sugihara K, Fukamizu A, Asano M, Takuwa Y. S1P₂, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate,

- negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth *in vivo* in mice. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 772–781. [DOI](#)
- [44] Skoura A, Sanchez T, Claffey K, Mandala SM, Proia RL, Hla T. Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *J Clin Invest*, 2007, 117(9): 2506–2516. [DOI](#)
- [45] Kiefer F, Siekmann AF. The role of chemokines and their receptors in angiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(17): 2811–2830. [DOI](#)
- [46] Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(6): 593–609. [DOI](#)
- [47] Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, Buechi L, Walz A, Richmond A, Strieter RM. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*, 2000, 165(9): 5269–5277. [DOI](#)
- [48] Devalaraja RM, Nanney LB, Qian QH, Du JG, Yu YC, Devalaraja MN, Richmond A. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(2): 234–244. [DOI](#)
- [49] Ara T, Tokoyoda K, Okamoto R, Koni PA, Nagasawa T. The role of CXCL12 in the organ-specific process of artery formation. *Blood*, 2005, 105(8): 3155–3161. [DOI](#)
- [50] Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzhiy S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, 2010, 116(5): 829–840. [DOI](#)
- [51] Xu H, Echemendia N, Chen SH, Lin F. Identification and expression patterns of members of the protease-activated receptor (PAR) gene family during zebrafish development. *Dev Dyn*, 2011, 240(1): 278–287. [DOI](#)
- [52] Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science*, 2001, 293(5535): 1666–1670. [DOI](#)
- [53] Zania P, Kritikou S, Flordellis CS, Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE. Blockade of angiogenesis by small molecule antagonists to protease-activated receptor-1: association with endothelial cell growth suppression and induction of apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(1): 246–254. [DOI](#)
- [54] Ma L, Perini R, McKnight W, Dickey M, Klein A, Hollenberg MD, Wallace JL. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and VEGF release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(1): 216–220. [DOI](#)
- [55] Walther T, Menrad A, Orzechowski HD, Siemeister G, Paul M, Schirner M. Differential regulation of *in vivo* angiogenesis by angiotensin II receptors. *FASEB J*, 2003, 17(14): 2061–2067. [DOI](#)
- [56] Carbajo-Lozoya J, Lutz S, Feng YX, Kroll J, Hammes HP, Wieland T. Angiotensin II modulates VEGF-driven angiogenesis by opposing effects of type 1 and type 2 receptor stimulation in the microvascular endothelium. *Cell Signal*, 2012, 24(6): 1261–1269. [DOI](#)
- [57] Eyries M, Siegfried G, Ciomas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, Soubrier F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res*, 2008, 103(4): 432–440. [DOI](#)
- [58] Kawamata Y, Habata Y, Fukusumi S, Hosoya M, Fujii R, Hinuma S, Nishizawa N, Kitada C, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1538(2–3): 162–171. [DOI](#)
- [59] Szokodi I, Tavi P, Földes G, Voutilainen-Myllylä S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuholta J, Rysä J, Tóth M, Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res*, 2002, 91(5): 434–440. [DOI](#)
- [60] Kojima Y, Kundu RK, Cox CM, Leeper NJ, Anderson JA, Chun HJ, Ali ZA, Ashley EA, Krieg PA, Quertermous T. Upregulation of the apelin-APJ pathway promotes neointima formation in the carotid ligation model in mouse. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(1): 156–165. [DOI](#)
- [61] Tucker B, Hepperle C, Kortschak D, Rainbird B, Wells S, Oates AC, Lardelli M. Zebrafish Angiotensin II Receptor-like 1a (*agtr1la*) is expressed in migrating hypoblast, vasculature, and in multiple embryonic epithelia. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7(3): 258–265. [DOI](#)
- [62] Kálin RE, Kretz MP, Meyer AM, Kispert A, Heppner FL, Brandli AW. Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev Biol*, 2007, 305(2): 599–614. [DOI](#)
- [63] Cullen M, Elzarrad MK, Seaman S, Zudaire E, Stevens J, Yang MY, Li X, Chaudhary A, Xu L, Hilton MB, Logsdon D, Hsiao E, Stein EV, Cuttitta F, Haines DC, Nagashima K, Tessarollo L, St Croix B. GPR124, an orphan G protein-coupled receptor, is required for CNS-specific vascularization and establishment of the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(14): 5759–5764. [DOI](#)
- [64] Sinha S, Vohra PK, Bhattacharya R, Dutta S, Sinha S, Mukhopadhyay D. Dopamine regulates phosphorylation of

- VEGF receptor 2 by engaging Src-homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 18): 3385–3392. [DOI](#)
- [65] Shome S, Rana T, Ganguly S, Basu B, Chaki Choudhury S, Sarkar C, Chakroborty D, Dasgupta PS, Basu S. Dopamine regulates angiogenesis in normal dermal wound tissues. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25215. [DOI](#)
- [66] Allende ML, Yamashita T, Proia RL. G-protein-coupled receptor SIP₁ acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*, 2003, 102(10): 3665–3667. [DOI](#)
- [67] Kidoya H, Naito H, Takakura N. Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood*, 2010, 115(15): 3166–3174. [DOI](#)
- [68] Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J*, 2008, 27(3): 522–534. [DOI](#)
- [69] Yang LV, Radu CG, Roy M, Lee S, McLaughlin J, Teitell MA, Iruela-Arispe ML, Witte ON. Vascular abnormalities in mice deficient for the G protein-coupled receptor GPR4 that functions as a pH sensor. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(4): 1334–1347. [DOI](#)
- [70] Young W, Mahboubi K, Haider A, Li I, Ferreri NR. Cyclooxygenase-2 is required for tumor necrosis factor- α - and angiotensin II-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2000, 86(8): 906–914. [DOI](#)
- [71] Wang BH, Pearson T, Manning G, Donnelly R. In vitro study of thrombin on tubule formation and regulators of angiogenesis. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2010, 16(6): 674–678. [DOI](#)
- [72] Li YJ, Duan CL, Liu JX, Xu YG. Pro-angiogenic actions of Salvianolic acids on in vitro cultured endothelial progenitor cells and chick embryo chorioallantoic membrane model. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(3): 562–566. [DOI](#)
- [73] Huang P, Xiao A, Zhou MG, Zhu ZY, Lin S, Zhang B. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 699–700. [DOI](#)