



Slit-Robo 细胞信号转导通路研究进展*

王 舒^{1,3)} 甘卫冬²⁾ 金锦祥¹⁾ 施青青¹⁾ 睦承志^{2)**}⁽¹⁾ 厦门大学医学院, 厦门 361000; ⁽²⁾ 厦门大学附属第一医院, 厦门 361000; ⁽³⁾ 南京医科大学康复医学院, 南京 210000)

摘要 Slit-Robo 细胞信号转导通路调控多种多样的生理功能, 不同的下游信号转导途径可产生不同的生理功能。其中最广为人知的功能是介导双侧对称生物体胚胎神经系统发育时的轴突排斥现象。近年来, 作为一种在生物体内广泛表达的细胞信号转导通路, Slit-Robo 的功能库已大大扩展, 与神经发育、血管生成、器官及组织发育以及干细胞的增殖调节等均有关。本文就 Slit-Robo 细胞信号转导通路目前的研究进展做一综述。

关键词 Slit, Roundabout, Slit-Robo 信号转导

中图分类号 Q28, Q291

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0329

1 Slit 配体与 Robo 受体

1.1 Slit 分泌蛋白与 Robo 细胞膜表面受体的结构

Slit 蛋白是一种分泌蛋白, 在物种间的表达高度保守。目前已知在脊椎动物中存在 3 种 Slit 基因 (Slit1、Slit2、Slit3), 其中 Slit1 基因位于人染色体 10q24.1 上, Slit2 基因位于人染色体 4p15.31 上, Slit3 基因位于人染色体 5q34-35.1 上。Slit 基因所编码的 Slit 蛋白为细胞外分泌型糖蛋白, 分子质量约为 170~190 ku, 其结构可分为 5 部分, 包括: 1 个 N 端信号肽 (Ss); 4 段富含亮氨酸的重复结构域 (leucine-rich repeat, LRRs; 又名 D1-D4); 9 段 (非哺乳动物为 7 段) 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 重复序列; 1 个层黏连蛋白-G 样结构域 (laminin-G-like domain, lamG; 又名 Agrin-Perlecan-Laminin-Slit, ALPS) 以及 1 个 C 端半胱氨酸结。其中, 蛋白酶切割位点位于第 5 和第 6 EGF 结构域之间^[1] (图 1)。

Roundabout (Robo) 细胞膜表面蛋白是 Slit 蛋白的主要受体, 目前已知有 Robo1、Robo2、Robo3、Robo4。在人类基因染色体中, Robo1 和 Robo2 基因位于 3p12.3, Robo3 和 Robo4 基因位于 11q24.2。Robo 受体为单次跨膜蛋白, 自身并不具有酶活性, 通过下游的信号分子来实现其对应的功能。Robo1~3 的细胞外片段包括 5 个免疫球蛋白样

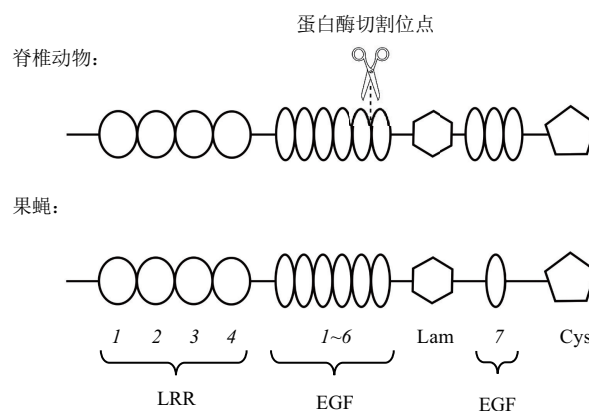


Fig. 1 The structure of slit ligands^[1]

图1 Slit 蛋白结构示意图^[1]

结构域 (Ig1~5) 和 3 个 III 型纤维黏连蛋白重复序列 (FNIII 1~3)。细胞跨膜片段 (transmembrane domain, TM) 之后的细胞内片段包括 4 个保守结构域 CC (cytoplasmic conserved), 分别为 CC0、CC1、CC2 和 CC3, 不同物种之间的 CC 结构差别

* 福建省自然科学基金 (2018J01378) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0592-2137145, E-mail: sczxm9@126.com

收稿日期: 2020-09-09, 接受日期: 2021-06-21

很大。Robo 蛋白在生物体内通过翻译后修饰（如胞外域脱落）和剪接亚型等生化反应使其组成进一步扩大。哺乳动物的 Robo4 结构与 Robo 家族其他成员的结构差异很大，它的胞外域只有 2 个 FNIII 和 2 个 Ig，胞内域也只有 CC0 和 CC2 两个序列，缺少能与 Slit 结合所需的关键残基（图 2）。

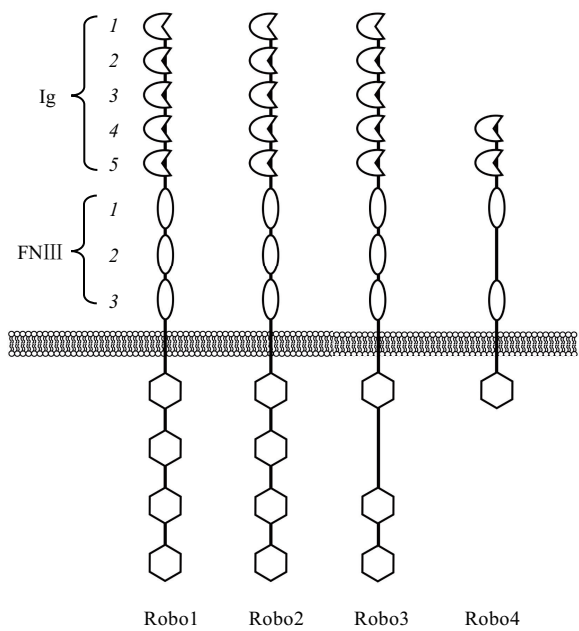


Fig. 2 The structure of Robo receptor^[1]
图2 哺乳动物Robo受体蛋白结构示意图^[1]

Slit 通过其 LRR2 结构域与 Robo 蛋白 Ig1 结合；也可与硫酸乙酰肝素蛋白多糖（heparan sulfate proteoglycans）以及 Robo 结合形成三元复合物在细胞膜上发挥作用^[2]；也有学者^[3]发现 Slit 还可以通过 LRR4 结构形成同二聚体来发挥其生物功能。由于前文提到的 Robo4 结构与 Robo1~3 不同，研究者未检测到 Robo4 与 Slit2 的直接结合，且 Robo4 与 Slit 结合的胞外域 Ig1 并非保守序列，故有学者认为 Robo4 可能不属于严格意义上的 Robo 受体。有研究发现，Robo3 也可不通过结合 Slit 蛋白来发挥作用，例如 Robo3 发挥其拮抗 Slit2-Robo1/2 诱导的排斥作用时是通过与类神经表皮生长因子 2（neural epidermal growth factor-like-like 2, NELL2）结合而不是与 Slit 结合^[4]，故有学者认为 Robo3 与 Robo4 同样，具有很大不确定性，同样应单独归类为一种独特的受体。

1.2 Slit与Robo的水解加工

Slit 和 Robo 通过被酶水解加工来发挥其信号转导的功能。2014 年一项关于 Robo1 胞外域研究的最新模型发现，细胞外基质（extracellular matrix, ECM）中的 Slit 蛋白与细胞膜表面 Robo1/2 胞外域结合后产生的分子张力使 Robo 近膜域扭曲，暴露出金属蛋白酶（ADAM10/Kuzbanian）的结合位点^[5]。被 ADAM10 水解而脱落胞外域的 Robo 残端可被 γ 分泌酶（ γ -secretase）进一步处理并释放胞内 C 端片段（C-terminal fragment, CTF）。那么，是否所有脊椎动物体内的 Robo 受体都会释放 CTF 以及 CTF 在细胞内又是如何继续发挥作用的呢？尚待更多研究（图 3）。

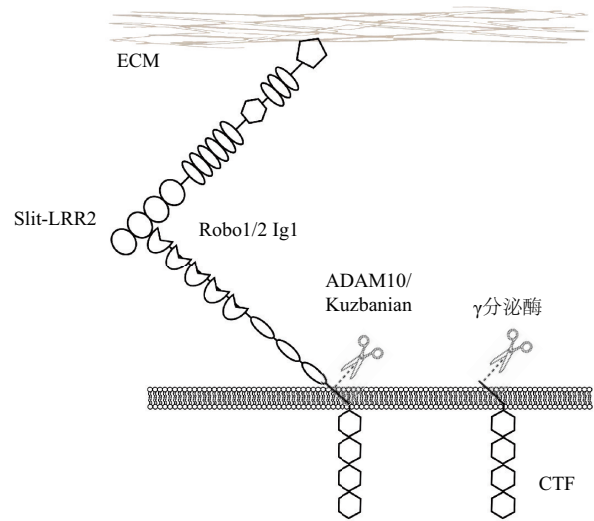


Fig. 3 Robo proteolytic processing^[1]
图3 Robo受体的水解加工示意图^[1]

Slit 蛋白无论是在果蝇还是哺乳动物体内均被一种未知的酶切割成两个大小不等的片段：较长的 N 片段（N-Slit）和较短的 C 片段（C-Slit）。完整的 Slit 蛋白（Slit-FL）和 Slit-N 常作为配体与细胞表面的受体相结合，Slit-C 则主要存在于细胞外^[6]。有研究发现，不同的 Slit 片段与受体结合后可产生不同甚至完全相反的效应。

值得一提的是，越来越多研究表明，Slit 除与 Robo 结合外还可与其他受体结合，同样，Robo 也可以与除 Slit 外的其他分子结合并发挥生物学功能，下文对其生物学功能进行介绍时将会进一步说明。Slit-Robo 细胞信号转导通路的这一特点使其

作用机制和生理功能的复杂性大大增加,这或许可以解释为什么不同研究者设计的实验所得出的结论完全相反^[7]。

2 Slit-Robo细胞信号转导通路的生物学功能

Slit-Robo 信号转导通路通过多种不同的下游信号转导途径实现其多种多样的生物学功能。除在神经发育过程中发现其扮演重要角色外,在肿瘤组织、免疫系统、血管系统也发现了与该通路相关的调节因子。大量研究表明,Slit-Robo 信号转导通路广泛参与细胞增殖、控制血管生成与血管通透性、炎细胞趋化、肿瘤血管发生、肌细胞迁移等过程,并且还参与调控心脏、乳腺、肾脏、隔膜等组织器官的发育过程。

2.1 Slit-Robo信号转导通路在神经发育过程中发挥作用

在对称生物体内,神经系统发育的组织中心称为中线,神经轴突穿越整个中线的过程需要精确的时空调控。在神经系统发育过程中,神经细胞运动和轴突生长锥生长的方向受到微环境中各种分子的调控,其过程包括神经元迁移到终靶区、轴突被精确引导至靶位、形成突触连接等,以上步骤缺一不可。神经轴突导向分子分布于轴突以外、在神经系统发育过程中引导神经元轴突选择正确路径、使神经元成功到达靶区,是神经发育过程中的重要分子。

Slit-Robo 信号转导通路在神经轴突导向(axon pathfinding)过程中起重要作用。在小鼠脊髓中,连合中间神经元(commisural interneurons)发生于神经管背部,其轴突需穿过腹侧中线或底板。神经底板(floor plate)是胚胎发育过程中主要由神经胶质细胞组成的特化结构,3种Slit蛋白在脊椎动物的神经底板上均有表达。早年的研究发现,将Slit1、2、3基因敲除后的小鼠出现了神经轴突跨越错误和轴突发育停滞的现象;Robo2单突变体不会出现类似的发育异常现象;Robo3基因敲除小鼠发育过程中所有轴突均未能跨过中线;Robo1^{-/-}突变体部分表现出与前述Slit突变体相似的表型;Robo1/2双突变体也可表现出与Slit突变体相似的神经轴突跨越停滞现象,但程度较后者更轻^[8](图4)。以上研究表明,在神经底板发育过程中Slit可独立于Robo发挥作用,且极有可能存在Robo以外的Slit受体。目前已有研究证明了以

上猜想,例如有研究发现,Slit蛋白可以与神经丛蛋白A1(plexin A1)结合发挥轴突排斥作用^[9],为存在除Robo以外的Slit受体这一猜想提供了证据。

Slit-Robo排斥作用(Slit-Robo repulsion)可能在轴突延伸的定位过程中发挥功能^[10]。Slit-Robo信号转导通路可以与Netrin-1/DCC通路(目前已知的4个神经轴突导向分子家族成员之一)相互反应。在Slit存在的情况下,Robo1与DCC相互作用,反过来使Netrin-1沉默。并且,Slit-Robo排斥作用还可以在没有DCC信号存在的情况下发生^[11],这说明Robo1/2并非只是单纯消除Netrin-1/DCC通路对神经轴突的吸引功能。哺乳动物运动神经元与中间神经元的不同之处在于运动神经元上同时表达Robo1/2、DCC和Slit2,这种情况下运动轴突似乎通过自分泌Slit2来实现与其目标肌肉的联合^[12]。另外,也有研究者认为Robo还可与其他配体结合发挥作用,如NELL2与Robo3结合后在脊髓中线的发育过程中发挥神经导向的作用^[13]。这为存在Slit以外的Robo配体提供了证据。

2.2 Slit-Robo信号转导通路在血管生成过程中发挥作用

生物体内动静脉交织而形成的血管网络与神经网络伴行而生,血管系统的发育与神经系统有许多相似之处,毛细血管前端细胞膜上的受体受环境中信号分子的调控,并可以把调控信号转导至细胞内部来调控血管系统的生长。目前的研究也已证实两系统间的关联性,在对小鼠的实验中发现,小鼠四肢皮肤的动脉分支和分化过程是以神经为模板进行的,因此有很多学者认为这两个系统可能存在类似且保守的调控机制以及相同的信号分子,Slit-Robo便是这些信号分子中的一种。

Slit-Robo信号转导通路在血管生成过程中的作用是使现有血管发出分支。血管平滑肌细胞、内皮细胞和血管周细胞分泌Slit2和Slit3,内皮细胞表达Robo1、Robo2和Robo4,Slit-Robo细胞信号转导通路通过改变内皮细胞的极性和运动能力来调节血管的生成。但是,现有研究所得出的结论却并不一致,甚至完全相反。例如,Robo4在脊椎动物内皮细胞上选择性表达,控制血管生成和血管通透性^[14]。一些研究认为Robo4的功能与Slit的结合有关^[15],但也有一些研究者认为Robo4并不与Slit直接结合,小鼠相关基因敲除实验也证明Robo4和Slit之间没有直接联系^[16]。血管内皮细胞表达

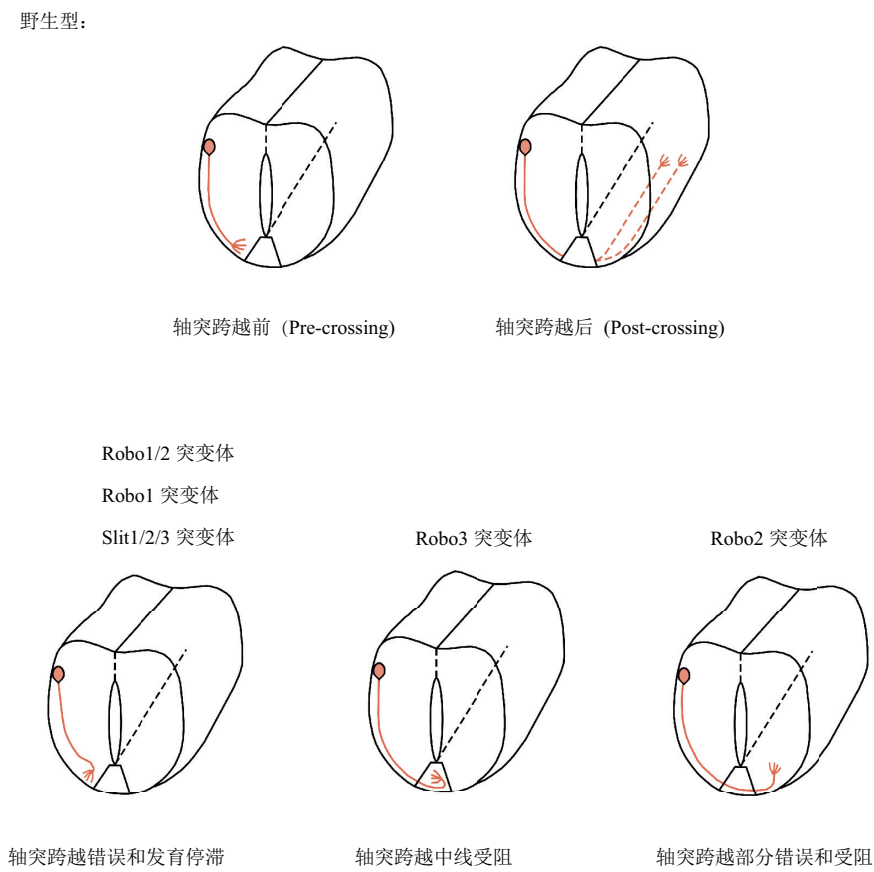


Fig. 4 The roles of Slit-Robo in the development of spinal cord midline^[1]
图4 Slit-Robo在脊髓中线发育过程中的作用^[1]

Robo1/2 和 Slit, 特别是 Slit2 可以通过促进内皮细胞的运动和增加细胞极性从而促进血管生成^[17] (图5)。也有研究表明, Slit可能并非直接与Robo4结合, 而是通过与受体异二聚体 (receptor heterodimers) 结合发挥作用。例如, 在人内皮细胞的体外实验中 Robo1/Robo4 异二聚体可促进细胞迁移^[18]。在血管中, Slit-Robo 信号转导通路可以

与血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 共同诱导新血管形成^[17]。一项对增生型糖尿病视网膜病变 (proliferative diabetic retinopathy, PDR) 患者血管膜 (FVM) 中 VEGF 和 Robo4 的研究发现, PDR 患者的 FVM 中 VEGF 和 Robo4 共表达。在糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 早期, VEGF 被上调并促进 DR 的发展, 在 DR 的晚期, VEGF 和 Robo4 共同作用加重了 DR 的进展。并且, miR-15a 可以下调 VEGF 和 Robo4 从而改善 DR 的发展^[19]。这说明 Robo4 对于血管的生成起促进作用。那么, 可以就此认为 Slit-Robo 信号转导通路对血管生成起促进作用吗? 答案是否定的, 早在 2011 年 Koch 等^[20] 的研究就发现, Robo4 结合非协调性分子 5 同源蛋白 B (uncoordinated-5-homolog B, UNC5B) 可抑制血管内皮生长因子-血管内皮生长因子受体 (VEGF-VEGFR) 信号转导, 从而稳定血管并抑制血管生成。以上证据表明, Slit-

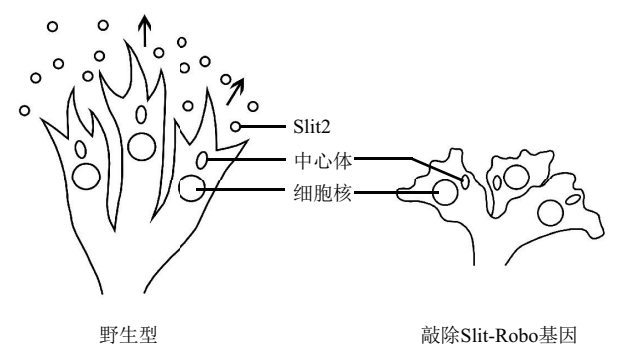


Fig. 5 Slit2 may promote endothelial cell polarity^[1]
图5 Slit2可以促进内皮细胞的运动和增加细胞极性^[1]

Robo 信号转导通路可以通过不同的激活途径来促进或抑制血管生成。

2.3 Slit-Robo 信号转导通路在器官发育过程中发挥作用

Slit-Robo 信号转导通路参与许多器官的发育。在肾脏的发育过程中, 生肾索 (nephrogenic cord, NC)、后肾间质 (metanephric mesenchyme, MM) 和中肾管 (wolffian duct, WD) 的分离需要 Slit-Robo 介导的排斥作用, 同时, 胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) 能够通过其受体 Ret /Gfra 吸引越来越多的输尿管芽 (ureteric bud) 向 MM 移动。据检测, Slit1~3 和 Robo1、Robo2 在小鼠胚胎肾脏中均有表达^[21]。敲除 Slit2 或 Robo2 的小鼠 Robo2 排斥信号

缺失, 导致 WD 无法从 NC 分离, 过度活跃的 GDNF 信号导致输尿管芽增殖过度, 最终胚胎发育为多叶肾^[22-23], 这一表型与携带 Robo2 突变的人类患者中观察到的缺陷十分相似。Robo2 在胚胎发育过程中起促进生肾索与中肾管分离的作用, 从而避免生肾索过度增殖^[24]。在已经发育成熟的小鼠体内, Robo2 可以抑制肾脏足细胞中的肌动蛋白聚合, 维持其稳定性^[25]。对先天性肾尿路畸形 (congenital abnormalities of the kidney and urinary tract, CAKUT) 患者全外显子测序 (whole exome sequencing, WES) 发现其 SRGAP1 和 Slit2 基因有突变^[26]。这说明 Slit-Robo 信号转导通路在人类肾脏发育过程中发挥着重要作用 (图6)。

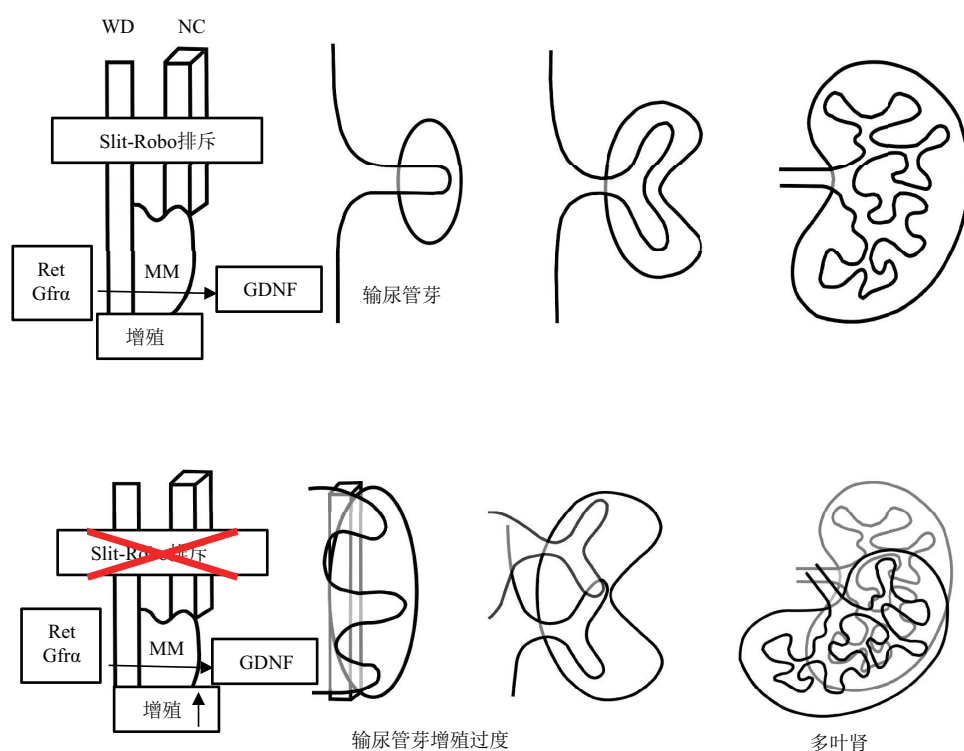


Fig. 6 The roles of Slit-Robo in the development of kidney^[1]

图6 Slit-Robo在肾脏发育过程中的作用^[1]

Slit 和 Robo 在哺乳动物的心脏发育过程中也发挥着重要作用, 与人类先天性心脏畸形密切相关。哺乳动物胚胎心脏的形成始于双侧祖细胞向中线迁移, 在中线相遇后融合形成心管, 心管两极的细胞增加使心管逐渐延长; 心内膜细胞逐渐转化为间质细胞, 逐渐形成流出道和房室间隔; 接着心室、心

房和室间隔逐渐扩张、心脏瓣膜与房室间隔逐渐成型, 最终发育为四腔心。

Slit1/2/3 和 Robo1/2/4 基因在小鼠心脏发育过程中均有表达^[27]。将小鼠相应基因敲除后对其表型分析提示 Robo1/2 和 Slit2/3 在心脏发育过程中发挥不同作用: Robo1/2 和 Slit3 突变体表现为室间隔

缺失, 而Slit2突变体则表现为部分隔膜发育缺陷。相比之下, Slit2对于主动脉瓣的形成更为重要。Robo1基因敲除小鼠表现为缺乏部分心包, 可能是由于心脏神经嵴细胞凋亡增加导致心包腔异位造成的, 并且这些突变体的心脏静脉发育也受到了不同程度的干扰, 其心脏血管畸形的表现与前文所述Slit-Robo信号在血管系统发育中的作用相一致。以上研究表明, Slit-Robo信号转导通路参与心脏发育过程中的多个环节。

Slit-Robo信号转导通路在乳腺发育中也发挥着重要作用。Strickland等^[28]在2006年首次发现在Slit2^{-/-}突变体中构成乳腺导管的两个细胞层(外肌上皮细胞和内腔上皮细胞)发生了分离, 导致乳腺导管管腔减少。后来的研究表明, Slit-Robo在调节乳腺分支的形态方面也发挥作用, Robo1和Slit2/3突变体表现出乳腺管状分支增多^[29]。其下游信号转导途径涉及TgfrRII信号传导通路诱导的Robo1转录。Robo1信号进而抑制蛋白激酶B (protein kinases, PKB; 又名Ak、Rac), 导致GSK-3 β 蛋白活化(即去磷酸化)。因此, Slit-Robo信号转导通路的激活可以抑制其增殖基因的转录。综上可知, Slit-Robo信号转导通路可以限制乳腺上皮细胞过度增殖, 从而限制其分支数量。

Slit-Robo信号转导通路对于胚胎发育过程中的内脏定位与隔膜发育至关重要^[30]。Slit-Robo突变小鼠的胃从腹部通过膈肌错位到了胸腔, 这为研究人类先天性膈疝(congenital diaphragmatic hernia, CDH)的形成机制提供了重要借鉴。在胚胎发育过程中, 消化系统和呼吸系统形态的正确发育需要一个与体壁分离的过程, 而这一过程在Robo1/2突变体胚胎发育过程中无法完成, 说明Robo在此过程中起重要的调控作用。

另外, 还有研究发现Slit-Robo信号转导通路还参与黄体细胞凋亡^[31]、胎儿卵巢卵泡发育^[32]等环节。

2.4 Slit-Robo信号转导通路在细胞增殖和干细胞调节中发挥作用

Slit-Robo在细胞增殖和干细胞调节中同样发挥着重要作用。研究发现, Robo4和Cxcr4可协助造血干细胞锚定到骨髓壁龛中, 称为黏附效应, 若要将这些细胞招募到血液中则需要克服这一效应。动物实验表明, Slit-Robo信号转导通路在黏附效应中扮演着重要角色^[33]。

2.5 Slit-Robo信号转导通路在肿瘤中发挥作用

Slit-Robo信号转导通路在机体中调节细胞的增殖与运动, 这一机制在肿瘤的发展过程中涉及细胞间黏附的减少、细胞骨架的重组、诱导血管和神经的生成等环节, 并可以使肿瘤细胞避开机体的自我保护机制, 迁移到新的组织。大量研究表明, 在许多类型的肿瘤组织中, Slit-Robo信号转导通路相关蛋白质的表达量发生了改变, 这种改变既有上调又有下调, 因此推测该通路对肿瘤细胞的调控可能具有抑制和促进的双重作用。肿瘤组织中多表达Slit2、Robo1和Robo4, 其中, Slit2基因广泛存在, Robo1则主要分布在细胞的胞质内, Robo4多表达于肿瘤的血管内皮。在对乳腺癌、胃癌、肺癌、肝癌、食道癌等肿瘤的研究中, Slit的表达均下调或未检测到其表达, 表明在这些癌症中起抑制作用。而在黑色素瘤、胃癌、胰腺癌组织和肝细胞癌中发现了Slit和Robo的过度表达, 这表明Slit-Robo信号转导通路在某些癌症中也可能起促进作用^[7]。

Slit-Robo信号转导通路可影响肿瘤细胞的增殖与侵袭性。许多研究发现, 肿瘤中的Slit和Robo高表达, 说明Slit-Robo信号转导通路对肿瘤的生长有积极作用。例如, 人类黏液表皮样癌Mc3细胞系中Slit2和Robo1高表达。进一步研究表明, Slit2-Robo1通路可促进Mc3细胞的增殖, 且用单克隆抗体R5(monoclonal antibody R5)中断该通路可显著抑制Mc3细胞的生长和增殖, 且增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达显著降低^[34]。再如, 对鳞状细胞癌A431细胞系的研究发现, Slit2可促进肿瘤的侵袭力, 且单克隆抗体R5阻断该通路后肿瘤的侵袭力显著降低^[35]。Slit-Robo信号转导通路促进肿瘤细胞增殖与侵袭的这一特性, 被视为肿瘤治疗的新靶点。然而, 也有研究表明, Slit-Robo信号转导通路对肿瘤细胞的增殖与侵袭起抑制作用。例如, 在对原代卵巢癌上皮细胞的研究中, Slit2、Slit3、Robo1、Robo2和Robo4的表达水平较低, 阻断Slit-Robo通路后肿瘤细胞的凋亡大大减少, 因此有研究者认为Slit-Robo信号转导通路具有降低肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡的作用^[36]。

Slit-Robo信号转导通路可改变肿瘤细胞之间的黏附性。上皮钙黏素(E-cadherin)是一类介导细胞与细胞间相互黏附、具有维持组织结构完整性和极性的钙依赖性跨膜糖蛋白。 β 连环蛋白(β -catenin)是一种重要的调节蛋白, 在静止细胞

中与 E-cadherin 的胞内部分结合, 稳定细胞间黏附。Slit-Robo 信号转导通路可通过改变二者之间的连接来降低肿瘤细胞间的黏附性从而促进肿瘤的生长和转移^[37]。然而, 在对口腔鳞癌的研究中发现, Slit2 可促进胎盘钙黏素 (P-cadherin) 与 Robo3 的相互作用, 从而抑制口腔鳞状细胞癌中的细胞迁移^[38]。除了与钙黏蛋白相互作用外, Slit-Robo 信号转导通路还可通过其他途径来影响癌细胞的转移。例如, Slit2 通过抑制 Cdc42、FAK 和 Paxillin 蛋白活性来抑制食道癌细胞的转移^[39]。Slit2 还可通过灭活 Rac 蛋白来抑制前列腺癌细胞的转移^[40]。还有研究表明, Robo1 过表达可以上调基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和膜型基质金属蛋白酶 1 (MT-MMP-1) 的表达, 从而促进肿瘤的转移^[41]。然而, 在对恶性黑色素瘤的研究中, Slit3-Robo2 则下调 MMP2 和 MMP14 的表达, 起抑制癌细胞转移的作用^[42]。以上研究表明, 在不同的肿瘤组织中, Slit-Robo 信号转导通路通过不同机制既可能促进肿瘤的转移, 也可能抑制肿瘤的转移。

Slit-Robo 信号转导通路对肿瘤细胞具有趋化作用。在对乳腺癌研究中发现, 与 Slit2 低表达组相比, Slit2 高表达组的胶质母细胞瘤 (glioblastoma) 可以促进乳腺癌细胞的转移。这说明 Slit 可以作为一种趋化因子 (chemokine) 或者通过调节其他趋化因子来影响肿瘤细胞的转移。Slit-Robo 信号转导通路还可以通过影响肿瘤血管、淋巴的生成和神经支配来间接影响肿瘤的生长和转移^[7]。研究者发现将 Slit2 基因过表达可使淋巴血管生成显著增加, 从而促进胰岛肿瘤的肠系膜淋巴结转移^[43]。

Slit-Robo 信号转导通路可促进或抑制肿瘤组织中血管的生成。正如前文所述, Slit-Robo 信号转导通路在调控血管生成方面具有双重行为。Slit-Robo 信号转导通路通过 VEGFA 促进血管生成, 或者与 UNC5B 相互作用抑制血管生成。血管的生成对肿瘤细胞的生长与转移至关重要, 肿瘤组织内部的微环境可诱导新血管的形成, 各种类型癌症中内皮细胞迁移和血管生成的过程中均有 Slit-Robo 信号转导通路的参与^[6]。

总之, Slit-Robo 信号转导通路与肿瘤关系密切且作用复杂, 既有促进也有抑制, 是一个潜在的肿瘤治疗靶点。

2.6 Slit-Robo 信号转导通路在机体炎症反应中发挥作用

Slit 在炎症反应中的作用主要从以下 3 方面体现: a. 抑制趋化因子, 减少并阻止细胞转移。其机制可能为 Slit 蛋白与 Robo 受体结合后, 促使细胞内可溶性重组 GTP 酶活化蛋白 (srGAPs) 与 Robo 的 CC3 片段连接, 增加 srGAPs 与 Cdc42 蛋白和 RhoA (Rho 家族中的小 GTP 酶之一) 之间的结合, 使得 GTP 酶的磷酸化被抑制, 从而使炎症细胞的趋化性减弱。b. Slit 蛋白可减少白细胞与血管内皮间的黏附, 从而减少细胞的渗出。其可能的机制是, Slit 与 Robo 结合后, 会使 Src 激酶与 PI-3 的活化减少, 进一步使得其下游 CXCL-12/CXCR-4 信号减弱, 抑制白细胞与血管内皮间的黏附, 达到减少白细胞渗出的目的。c. Slit 可使血管内皮细胞间连接紧密, 稳定血管。有研究表明, Slit 蛋白与其受体结合后, 能够抑制酪氨酸激酶、丝氨酸/苏氨酸激酶和小 GTP 酶的活化, 提高内皮间连接蛋白即血管内皮钙黏蛋白 (vessel endothelium cadherin, VE-cadherin) 的定植, 使得血管内皮间的细胞连接更紧密, 保持更好的血管完整性, 减轻血管的高渗状态, 起到稳定血管的作用^[44]。

Slit 最初被认为具有抑制白细胞趋化性的作用。在肾缺血-再灌注损伤模型研究中发现, Slit2 通过抑制 Cdc42 和 Rac2 (细胞迁移的关键物质) 的激活而阻止人类嗜中性粒细胞对炎症反应组织中血管内皮屏障的黏附作用。这表明, Slit-Robo 细胞信号转导通路可抑制白细胞趋化因子的趋化作用, 并且可能具有治疗炎症细胞浸润的作用。然而, 最近有研究发现, Slit2 对人类嗜中性粒细胞既有趋化作用也有化学排斥作用。中性粒细胞在血液和组织间的运动受趋化因子和化学排斥因子 (chemorepellents) 调节。研究发现, 用酶切割 Slit2 蛋白后, 其中 140 ku 的 Slit2-N 片段为中性粒细胞的趋化因子, 而 110 ku 的 Slit2-S 片段则为中性粒细胞的化学排斥因子。二者与细胞上相似的受体结合, 通过不同的细胞内传导途径作用于中性粒细胞的细胞骨架和拟足, 最终产生趋化或排斥的不同结果^[44]。

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的特征性变化是气道、肺实质和肺血管的慢性炎症改变, 中性粒细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞等炎症细胞参与其发病过程。一项对 COPD 的研究发现, 在 COPD 肺组织中 Slit-

Robo 信号转导通路表达降低, 且与疾病的进展呈负相关^[45]。为 Slit-Robo 信号转导通路参与机体炎症反应提供了新证据。

3 讨 论

Slit-Robo 细胞信号转导通路介导神经导向作用的发现, 是对 Slit-Robo 细胞信号转导通路理解的重要里程碑, 近年来的研究发现了许多神经系统发育以外的作用。并且, Slit 和 Robo 之间的相互作用也不是唯一的, 目前已发现许多 Robo 以外的 Slit 受体, 且 Robo 也可与除 Slit 外的配体相互作用。这些相互作用在调控细胞运动过程中起关键作用。

由 Slit-Robo 细胞信号转导通路介导的生理功能具有高度多样性, 并且这些不同的生理功能如何通过不同的下游信号转导途径进行调控仍是未知的。因此, 未来可以设计更多相关性研究, 来进一步阐明 Slit-Robo 如何通过不同的下游信号转导途径实现其不同的生理功能, 观察对比不同细胞在不同环境下的下游信号传导途径的不同。另一方面, 从分子到细胞、从小鼠模型到人类基因研究都表明了 Slit-Robo 细胞信号转导通路具有巨大的治疗潜力, 这在未来很大一段时间内将仍是一大研究热点。

参 考 文 献

- [1] Blockus H, Chédotal A. Slit-Robo signaling. *Development*, 2016, **143**(17):3037-3044
- [2] Zelina P, Blockus H, Zagar Y, *et al.* Signaling switch of the axon guidance receptor Robo3 during vertebrate evolution. *Neuron*, 2014, **84**(6):1258-1272
- [3] Seiradake E, von Philipsborn A C, Henry M, *et al.* Structure and functional relevance of the Slit2 homodimerization domain. *EMBO Rep*, 2009, **10**(7):736-741
- [4] Jaworski A, Tom I, Tong R K, *et al.* Operational redundancy in axon guidance through the multifunctional receptor Robo3 and its ligand NELL2. *Science*, 2015, **350**(6263):961-965
- [5] Barak R, Lahmi R, Gevorgyan-Airapetov L, *et al.* Crystal structure of the extracellular juxtamembrane region of Robo1. *J Struct Biol*, 2014, **186**(2):283-291
- [6] Koohini Z, Koohini Z, Teimourian S. Slit/Robo signaling pathway in cancer; a new stand point for cancer treatment. *Pathol Oncol Res*, 2019, **25**(4):1285-1293
- [7] Tong M, Jun T, Nie Y, *et al.* The role of the Slit/Robo signaling pathway. *J Cancer*, 2019, **10**(12):2694-2705
- [8] Jaworski A, Long H, Tessier-Lavigne M. Collaborative and specialized functions of Robo1 and Robo2 in spinal commissural axon guidance. *J Neurosci*, 2010, **30**(28):9445-9453
- [9] Delloye-Bourgeois C, Jacquier A, Charoy C, *et al.* PlexinA1 is a new Slit receptor and mediates axon guidance function of Slit C-terminal fragments. *Nat Neurosci*, 2015, **18**(1):36-45
- [10] Spitzweck B, Brankatschk M, Dickson B J. Distinct protein domains and expression patterns confer divergent axon guidance functions for *Drosophila* Robo receptors. *Cell*, 2010, **140**(3):409-420
- [11] Garbe D S, Bashaw G J. Independent functions of Slit-Robo repulsion and Netrin-Frazzled attraction regulate axon crossing at the midline in *Drosophila*. *J Neurosci*, 2007, **27**(13):3584-3592
- [12] Jaworski A, Tessier-Lavigne M. Autocrine/juxtacrine regulation of axon fasciculation by Slit-Robo signaling. *Nat Neurosci*, 2012, **15**(3):367-369
- [13] Jaworski A, Tom I, Tong R K, *et al.* Operational redundancy in axon guidance through the multifunctional receptor Robo3 and its ligand NELL2. *Science*, 2015, **350**(6263):961-965
- [14] Jones C A, Nishiya N, London N R, *et al.* Slit2-Robo4 signalling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(11):1325-1331
- [15] Enomoto S, Mitsui K, Kawamura T, *et al.* Suppression of Slit2/Robo1 mediated HUVEC migration by Robo4. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, **469**(4):797-802
- [16] Rama N, Dubrac A, Mathivet T, *et al.* Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. *Nat Med*, 2015, **21**(5):483-491
- [17] Dubrac A, Genet G, Ola R, *et al.* Targeting NCK-mediated endothelial cell front-rear polarity inhibits neovascularization. *Circulation*, 2016, **133**(4):409-421
- [18] Sheldon H, Andre M, Legg J A, *et al.* Active involvement of Robo1 and Robo4 in filopodia formation and endothelial cell motility mediated via WASP and other actin nucleation-promoting factors. *FASEB J*, 2009, **23**(2):513-522
- [19] Gong Q, Li F, Xie J, *et al.* Upregulated VEGF and Robo4 correlate with the reduction of miR-15a in the development of diabetic retinopathy. *Endocrine*, 2019, **65**(1):35-45
- [20] Koch A W, Mathivet T, Larivée B, *et al.* Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Dev Cell*, 2011, **20**(1):33-46
- [21] Piper M, Georgas K, Yamada T, *et al.* Expression of the vertebrate Slit gene family and their putative receptors, the Robo genes, in the developing murine kidney. *Mech Dev*, 2000, **94**(1-2):213-217
- [22] Yu J, McMahon A P, Valerius M T. Recent genetic studies of mouse kidney development. *Curr Opin Genet Dev*, 2004, **14**(5):550-557
- [23] Grieshammer U, Ma L, Plump A S, *et al.* SLIT2-mediated ROBO2 signaling restricts kidney induction to a single site. *Dev Cell*, 2004, **6**(5):709-717
- [24] Wainwright E N, Wilhelm D, Combes A N, *et al.* ROBO2 restricts the nephrogenic field and regulates Wolffian duct-nephrogenic cord separation. *Dev Biol*, 2015, **404**(2):88-102
- [25] Fan X, Labrador J P, Hing H, *et al.* Slit stimulation recruits Dock and Pak to the roundabout receptor and increases Rac activity to regulate axon repulsion at the CNS midline. *Neuron*, 2003,

- 40(1):113-127
- [26] Hwang D Y, Kohl S, Fan X, *et al.* Mutations of the SLIT2-ROBO2 pathway genes SLIT2 and SRGAP1 confer risk for congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Hum Genet*, 2015, **134**(8):905-916
- [27] Zhao J, Mommersteeg M. Slit-Robo signalling in heart development. *Cardiovasc Res*, 2018, **114**(6):794-804
- [28] Strickland P, Shin G C, Plump A, *et al.* Slit2 and netrin 1 act synergistically as adhesive cues to generate tubular bi-layers during ductal morphogenesis. *Development*, 2006, **133**(5): 823-832
- [29] Macias H, Moran A, Samara Y, *et al.* SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev Cell*, 2011, **20**(6):827-840
- [30] Domyan E T, Branchfield K, Gibson D A, *et al.* Roundabout receptors are critical for foregut separation from the body wall. *Dev Cell*, 2013, **24**(1):52-63
- [31] 张学敬, 米梅艳, 郝伟丽, 等. Slit/Robo通路参与调控小鼠黄体细胞凋亡. *生理学报*, 2019, **71**(2): 287-293
Zhang X J, Mi M Y, Hao W L, *et al.* *Acta Physiologica Sinica*, 2019, **71**(2):287-293
- [32] Dickinson R E, Hryhorskyy L, Tremewan H, *et al.* Involvement of the SLIT/ROBO pathway in follicle development in the fetal ovary. *Reproduction*, 2010, **139**(2):395-407
- [33] Smith-Berdan S, Nguyen A, Hassanein D, *et al.* Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell Stem Cell*, 2011, **8**(1):72-83
- [34] 韩冰, 王丽京, 王静, 等. Slit-Robo信号对粘液表皮样癌细胞增殖作用的影响. *南方医科大学学报*, 2012, **32**(01): 37-39+45
Han B, Wang L, Wang J, *et al.* *Journal of Southern Medical University*, 2012, **32**(1): 37-39+45
- [35] Jiang Z, Liang G, Xiao Y, *et al.* Targeting the SLIT/ROBO pathway in tumor progression: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Ther Adv Med Oncol*, 2019, **11**:432497018
- [36] Dickinson R E, Fegan K S, Ren X, *et al.* Glucocorticoid regulation of SLIT/ROBO tumour suppressor genes in the ovarian surface epithelium and ovarian cancer cells. *PLoS One*, 2011, **6**(11): e27792
- [37] Han S, Cao C, Tang T, *et al.* ROBO3 promotes growth and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer Lett*, 2015, **366**(1): 61-70
- [38] Bauer K, Dowejko A, Bosserhoff A K, *et al.* Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Carcinogenesis*, 2011, **32**(6):935-943
- [39] Tseng R C, Chang J M, Chen J H, *et al.* Deregulation of SLIT2-mediated Cdc42 activity is associated with esophageal cancer metastasis and poor prognosis. *J Thorac Oncol*, 2015, **10**(1): 189-198
- [40] Han S, Cao C, Tang T, *et al.* ROBO3 promotes growth and metastasis of pancreatic carcinoma. *Cancer Lett*, 2015, **366**(1): 61-70
- [41] Yuan M, Guo H, Li J, *et al.* Slit2 and Robo1 induce opposing effects on metastasis of hepatocellular carcinoma Sk-hep-1 cells. *Int J Oncol*, 2016, **49**(1):305-315
- [42] Denk A E, Braig S, Schubert T, *et al.* Slit3 inhibits activator protein 1-mediated migration of malignant melanoma cells. *Int J Mol Med*, 2011, **28**(5):721-726
- [43] Yang X M, Han H X, Sui F, *et al.* Slit-Robo signaling mediates lymphangiogenesis and promotes tumor lymphatic metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **396**(2):571-577
- [44] Pilling D, Chinea L E, Consalvo K M, *et al.* Different isoforms of the neuronal guidance molecule Slit2 directly cause chemoattraction or chemorepulsion of human neutrophils. *J Immunol*, 2019, **202**(1):239-248
- [45] Lin Y Z, Zhong X N, Chen X, *et al.* Roundabout signaling pathway involved in the pathogenesis of COPD by integrative bioinformatics analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2019, **14**:2145-2162

Advances in Slit-Robo Signaling*

WANG Shu^{1,3}, GAN Wei-Dong², JIN Jin-Xiang¹, SHI Qing-Qing¹, SUI Cheng-Zhi²**

⁽¹⁾*School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361000, China;*

⁽²⁾*The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361000, China;*

⁽³⁾*School of Rehabilitation Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China)*

Abstract Slit-Robo regulates many physiologic processes, such as neuronal development, angiogenesis, organ development, cell proliferation, tumor and inflammatory response, and different downstream signal pathways can produce different physiological functions. Moreover, the interaction between Slit and Robo is not one-to-one, many Slit receptors other than Robo have been found, and Robo can also interact with ligands other than Slit. These interactions play a key role in the regulation of cell movement. This article reviews the current research progress of Slit-Robo signal transduction pathways, including the protein structure, proteolytic processing and physiological processes *in vivo* such as neural development, angiogenesis, organ development, cell proliferation, tumor and inflammatory response. However, the physiological processes of Slit-Robo are highly diverse, and how these differences are regulated remains unknown. We thus expect more basic and translational research.

Key words Slit, Roundabout, Slit-Robo signaling

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0329

* This work was supported by a grant from Fujian Provincial Natural Science Foundation (2018J01378).

** Corresponding author.

Tel: 86-592-2137145, E-mail: sczxm9@126.com

Received: September 9, 2020 Accepted: June 21, 2021