

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.11.042

活化素受体样激酶 1 与相关疾病研究进展*

毛伟东 于海波 白一辰 李冬青 刘欣阳

(天津大学生命科学学院 天津 300072)

摘要:活化素受体样激酶 1 (Activin receptor-like kinase 1, ALK 1)是转化生长因子 β (Transforming growth factor β , TGF- β)超家族的 I 型受体。ALK 1 表达于多个物种中,而且特异的高表达于内皮细胞和血管发生旺盛的组织,在血管网络的形成和稳态维持过程中发挥着重要作用。ALK 1 基因的异常表达会导致遗传性出血性毛细血管扩张症 (Hereditary hemorrhagic telangiectasia, HHT) 在内的多种疾病。本文旨在对 ALK 1 信号传导通路,ALK 1 蛋白结构,ALK 1 的功能,ALK 1 异常导致的疾病以及基于 ALK 1 的抗血管生成疗法等方面进行阐述,希望可以对未来 ALK 1 结构,功能的研究以及以 ALK 1 为靶向的药物开发有所帮助。

关键词:活化素受体样激酶 1;信号传导通路;疾病;治疗手段

中图分类号:Q55;Q71;Q78;Q814 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)11-2195-06

Activin Receptor-like Kinases 1 and Related Diseases*

MAO Wei-dong, YU Hai-bo, BAI Yi-chen, LI Dong-qing, LIU Xin-yang

(School of Life Science, Tianjin University, Tianjin, 300072, China)

ABSTRACT: Activin receptor-like kinase 1 (ALK 1) is a type I receptor in the transforming growth factor-beta (TGF- β) super family. ALK 1 is expressed in several species and is particularly highly expressed in endothelial cells and vasogenic tissues. ALK1 plays an important role in the formation and maintenance of vascular system. Abnormal expression of ALK 1 gene can lead to Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) and other diseases. This paper aims to elaborate on ALK 1 signaling pathway, ALK 1 protein structure, ALK 1 function, ALK 1 abnormal diseases and ALK 1 based anti-angiogenesis therapy. It is hoped that it will be helpful for the study of the structure and function of ALK 1 and the development of drugs targeting ALK-1 in the future.

Key words: Activin receptor like kinase 1; Signal pathway; Disease; Treatment

Chinese Library Classification(CLC): Q55; Q71; Q781 Q814 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)11-2195-06

前言

血管网络的形成与稳态维持对机体的生长发育,各组织器官正常发挥功能等起着重要的作用,是保持生物体结构和功能完整性的重要基础。完整的血管网络为生物体提供了必要的血液流动,氧气和营养物质,二氧化碳和代谢废物等的运输提供了必要的载体。血管发育一般分为两个阶段,即血管发生(Vasculogenesis)和血管生成(Angiogenesis)^[1]。血管发生主要是在早期的胚胎发育过程中,是指血管的从头生成。而血管生成主要发生在胚胎后期和机体出生后的发育过程中,是指在已有血管的基础上扩展和重塑血管,从而建立起成熟的血管网络的过程。血管发生和血管生成都是一个复杂的,精密调控的,需要多种细胞因子共同参与的过程,其中,血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前最著名的,研究最广泛的促血管生成因子,并通过中和抗体,配体陷阱或 VEGF 受体酪氨酸激酶抑制剂等多种方式被广泛用作抗血管生成治疗的靶标^[2],但与化疗结合使用的靶向 VEGF 长期治疗会产生耐药性,而且,血管生成需要多种信号通路共同参与,当阻断任意一条信号通路后,其他信号通路的活性可能增强,从而导致

结果未发生改变,这些为治疗带来了新的挑战。目前,人们越来越把目光聚焦包括 TGF- β 超家族成员在内的其他促血管生成因子,ALK 1 作为 TGF- β 超家族信号通路中的关键蛋白也渐渐走入人们的视野,受到越来越多的关注。

本文旨在对 ALK 1 信号传导通路,ALK 1 蛋白结构,ALK 1 的功能,ALK 1 异常导致的疾病以及基于 ALK 1 的抗血管生成疗法等方面进行阐述,希望可以对未来 ALK 1 结构,功能的研究以及以 ALK 1 为靶向的药物开发有所帮助。

1 ALK 1 一级结构与表达

ALK 1 是一种单次跨膜的具有丝氨酸 - 苏氨酸激酶结构域的膜蛋白受体,在血管网络的形成和稳态维持等方面起着重要作用。ALK 1 是 TGF- β 超家族的 I 型受体,TGF- β 超家族的 I 型受体共有 7 种,分别是 ALK 1-ALK7^[3]。编码人类 ALK 1 蛋白的基因 ACVRL1 位于 12q13.13,编码 ALK 1 蛋白 503 个氨基酸残基,在一级结构上,ALK 1 可以分为 5 个部分,分别是 N 端信号肽,富含半胱氨酸的细胞外结构域,单次跨膜结构域,富含半胱氨酸和丝氨酸的 GS 结构域以及高度保守的丝氨酸 / 苏氨酸激酶结构域。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31670738)

作者简介:毛伟东(1996-),男,硕士研究生,主要研究方向:结构生物学,电话:17302259890,E-mail:xiaomao_dada@163.com

(收稿日期:2020-04-29 接受日期:2020-05-24)

ALK 1 最初被发现是在于受孕 6.5 天的鼠胚胎细胞中,并在受孕 7.5 到 8.5 天的鼠胚胎细胞中达到表达量的顶峰,这正好与 ALK 1 基因表达部位的血管发生状态相符合^[4]。随着的研究不断深入,人们发现,ALK 1 基因表达于多个物种中,而且特异的高表达于内皮细胞和血管发生旺盛的组织^[5]。在成人体内,ALK 1 基因表达于肺部,视网膜组织,孕妇的胎盘组织以及脂肪组织和骨骼肌组织等多个组织器官中,而且除内皮细胞外,在单核细胞,软骨细胞,成肌细胞,平滑肌细胞,皮肤成纤维细胞,肝脏星形细胞(HSC),神经嵴干细胞,硬皮病成纤维细胞等多种细胞中也能检测到 ALK 1 基因的表达。

2 ALK 1 信号传导通路

2.1 ALK 1 与配体 BMP 9/BMP 10

ALK 1 最初被认为是 TGF- β 1 的受体,因为 TGF- β 1 可以与 ALK 1 的细胞外域结合,并促进 ALK 1 与 ALK 5 异源二聚体的形成,激活下游信磷酸化^[6],但是这一信号通路在生物体内发挥的作用和具体作用机制都尚未被解释清楚。

目前认为,骨形态发生蛋白(Bone morphogenic proteins, BMP)9 和 BMP 10 是 ALK 1 的配体,BMP 9 和 BMP 10 以非常高的亲和力与 ALK 1 结合,这种亲和力远高于 BMP 对其他受体的亲和力^[6]。BMP 9 和 BMP 10 是同一 TGF- β 配体蛋白亚型的两个相似度非常高的成员,在蛋白质水平上具有 65% 的序列同一性。BMP 9 也称为 GDF 2,主要在肝脏中表达,并且在肺和脑中也检测到较低水平。BMP 9 最开始被认为是造血,生肝,成骨和软骨形成因子,如今也被确定为葡萄糖代谢的调节剂和胆碱能神经元的分化因子。BMP 10 在机体发育的不同过程中有着不同的表达水平。BMP 10 的合成主要分为两个阶段,在胚胎发育时期 BMP 10 只表达于心脏器官的心房以及心室的心肌小梁中,在成年人中,BMP 10 只高表达于右心房中^[7]。

BMP 9 以前体蛋白的形式产生,并在高尔基体中通过弗林蛋白酶加工成熟配体,并以复合物的形式分泌。BMP 9 前体结构域不抑制 BMP 9 的活性,在细胞培养基中加入 BMP 9 生长因子同源二聚体和 BMP 9 前体蛋白复合物均能激活 ALK 1 信号,具有类似的作用。这种缺乏抑制作用的原因可能是 BMP 9 前体结构域的"开放臂"构象,它允许生长因子域结合 ALK 1,BMPRII,ActRIIA,ActRIIB 或 Endoglin^[8]。然而,与 BMP 7 类似,BMP 9 的前结构域可能与原纤维蛋白或其他一些糖蛋白结合,从而产生"闭环结构"构象并导致潜伏期。关于循环 BMP 10 水平和活性的报告一直存在矛盾^[9]。尽管循环 BMP 10 蛋白通过 ELISA 和蛋白质组学的方法检测到的,但在人血清或血浆中很难检测到其活性。此外,有研究显示 BMP 10 的前体结构域可有效抑制 C2C12 小鼠成肌细胞中 BMP 10 生长因子结构域的活性,虽然尚未确定参与这种相互作用的受体^[10]。因此,具有前体结构域结合的 BMP 10 被认为是潜伏的,如前体结构域结合的 TGF- β 和肌生长抑制素。蛋白多糖或糖蛋白是否在顶端与 BMP 10 前体结构域结合也尚不清楚^[11]。

2.2 ALK 1 与 II 型受体

BMP 9/BMP 10 和 ALK 1 的跨膜信号传导还需要其 II 型受体的参与。BMP 9/BMP 10 和 ALK 1 可以与 BMPRII,ActRIIA 和 ActRIIB 三种 BMP II 型受体相互作用,其结合可能

因血管床而异^[12]。成熟的 BMP 10 以相似的亲和力结合 II 型受体,而成熟的 BMP 9 对 ActRIIB 的选择性高于 BMPRII 和 ActRIIA。然而,有研究表明,BMP 9 前体复合物对 BMPRII 的亲和力比对 ActRIIA 和 ActRIIB 的亲和力强。这些明显矛盾的结果可能表明,成熟的和带有前体结构域的 BMP 9 形式对其 II 型受体的亲和力可能有所影响^[9]。

2.3 ALK 1 与 III 型受体

虽然 BMP 9/BMP 10 激活 ALK 1 不需要其 III 型受体 Endoglin 的参与,但它增强了磷酸化的 Smad 1/5/8 下游的信号输出。Endoglin 最初认为是许多 TGF- β 超家族配体的共同受体,包括 TGF- β 1,TGF- β 3,激活素(Activin)A,BMP 2 和 BMP 7。然而,与这些配体结合的 Endoglin 需要 I 型或 II 型受体的共同表达。事实上,在所有 TGF- β 超家族配体中,Endoglin 只能直接和独立地结合 BMP 9 和 BMP 10 生长因子同源二聚体^[13]。

2.4 ALK 1 介导的信号传导

在经典的 Smad 依赖的信号传导途径中,信号传导需要下游 Smad 蛋白的参与。在配体 BMP 9/BMP 10 存在的情况下,配体首先以高亲和力与 I 型受体结合,然后招募 II 型受体形成四聚体,配体的结合会先激活 II 型受体激酶结构域的磷酸化,从而导致 I 型受体激酶结构域的反式磷酸化,被激活的 ALK1 会磷酸化受体活化型 Smad(R-Smad),即 Smad 1/5/8,被激活的受体活化型 Smad 与共用 Smad(Co-Smad),即 Smad 4 形成三元复合物,其中包括 2 个受体活化型 Smad 和 1 个共用 Smad。三元复合物的多重性和特异性增加了 ALK 1 信号传导的复杂性与多样性。三元复合物可以在细胞核中积聚,从而调节下游信号分子^[14]。

除上述经典的 Smad 依赖的信号传导途径外,ALK 1 还存在多种不依赖 Smad 蛋白的信号通路,例如,PI3K-AKT,MAPK(Mitogen-activated protein kinase) 成员 ERK/JNK/p38 等信号通路都可被 ALK 1 激活。ALK 1 介导的 PI3K 活性抑制被认为与动静脉血管畸形(Arteriovenous malformation, AVM)的预防有关^[15]。有研究表明,在 ALK 1 缺失的内皮细胞中,PI3K 的磷酸化增加,PI3K 靶点 AKT 和它的下游目标 FoxO 1 的激活增强,并且增加了通常与 PI3K 相对的 PTEN 的磷酸化的非活性形式。此外,PI3K 抑制剂对 ALK 1 缺失或 BMP 9/BMP 10 缺失的新生小鼠视网膜 AVMs 有保护作用^[15]。ALK 1 介导的 JNK 和 ERK 的激活抑制了培养细胞的迁移。

2.5 ALK 1 和 ALK 5

值得注意的是,ALK 1 和 ALK 5 信号通路彼此之间存在这一定的相互作用,ALK 1 的激活需要 ALK 5 的参与,ALK 5 的表达需要激活的 ALK 1 的存在。目前很多研究认为,ALK 1-TGF- β 1-ALK 5 是一个动态平衡的整体,但具体的作用机制如何还尚未解释清楚,有待进一步的研究^[16]。在病理状态下,内皮细胞中 ALK 1 基因的过表达会对 ALK 5 信号通路的信号传导产生拮抗作用,诱导细胞增殖和迁移,而内皮细胞中 ALK 5 基因的过表达会促进 ALK 1 信号通路的信号传递^[17]。敲除 ALK 1 和 ALK 5 基因均会导致血管发育畸形。ALK 1 和 ALK 5 作为 TGF- β 1 的直接受体,参与机体的平衡状态的维持,表现出 TGF- β 作用的双向性。

2.6 ALK 1 调控基因表达

在体外培养的细胞中进行的实验发现,Notch 和 ALK 1 刺激对典型由 RBPJ/NICD 诱导 Notch 靶点,如 HEY 1 和 HEY 2 的 mRNA 表达具有增强或协同的效应^[18]。BMP 9 会刺激诱导磷酸化的 Smad 1/5/8 与这些启动子结合,然而具体的过程现在还不清楚。

此外,ALK 1 参与的信号传导通路还参与 EDN 1, Dll 4 以及 CXCR 4 等基因的表达。BMP 9/ALK 1 信号还能在内皮细胞 (ECs) 中诱导连接蛋白 40(CX 40, 又称 GJA 5) 的表达。BMP 9/ALK 1 信号在小鼠及培养的 ECs 中也能诱导表达一种功能未知的小跨膜蛋白 TMEM 100。TMEM 100 是由细胞内的内质网的应激状态所诱导,而且主要表达于细胞膜上,提示 TMEM 100 可能参与跨膜受体的保护^[19]。

3 ALK 1 蛋白结构

3.1 ALK 1 细胞外结构域蛋白结构

2012 年 Pardeep Mahlawat 等人使用 NMR 确定 ALK 1 细胞外结构域蛋白结构和使用 SPR 鉴定了对结合重要的氨基酸残基,结果显示 ALK 1 胞外域(ALK 1^{ECD})的结构是由五个 β 折叠(β 1, β 2, β 3, β 4, β 5) 和一个较短的螺旋(3_{10}) 共同组成一个三指环毒素折叠结构。ALK 1^{ECD} 的内部韧性表现为规则的二级结构区域都是刚性的;连接 β 2 折叠和 β 3 折叠以及 β 4 折叠和 3_{10} 螺旋的环也具有很高的刚性;连接 β 1 折叠和 β 2 折叠的环在其大部分长度上都相对刚性,除了其尖端部分,这可能是因为在这个环内具有内部二硫键,该二硫键限制了环的柔韧性;连接 β 3 折叠和 β 4 折叠以及 3_{10} 螺旋和 β 5 折叠的环是灵活的;连接 β 4 折叠和 β 5 折叠的环的 N 端和 C 端部分在柔韧性上有显著差异,N 端具有结构性刚性,C 端则没有^[20]。

3.2 BMP 9 - ALK 1^{ECD} - ActRII B^{ECD} 复合物蛋白结构

Sharon A 等人解析了 BMP9 - ALK1^{ECD} - ActRIIB^{ECD} 复合物的晶体结构^[21],结果显示,该结构的 " 组装 " 类型类似于其他被报道的 BMP - 受体三元复合物,其 BMP 9 位于该三元复合物的中心,两个 ALK 1 和 ActRIIB 交替结合在外部。具体而言,ActRIIB 分子与 BMP 9 的侧面凸表面结合,BMP 9 上的两个反向平行的 β 折叠 (指节 1 和指节 2) 介导与 ActRIIB 上的凹型疏水区域的结合。ALK 1 的结合是通过识别两个 BMP 9 形成的 " 腕部 ", 大部分的结合是通过 ALK 1 的 α 1 螺旋与 BMP 9 的预螺旋环和 α 1 螺旋堆积来实现的。

3.3 ALK 1 细胞内结构域蛋白结构

2014 年 Georgina Kerr 等人使用 X 射线晶体衍射的方式获得了 ALK 1 细胞内结构域 195 - 503 氨基酸残基的蛋白结构,结果显示 ALK 1 采用与 ALK 2 密切保守的激酶结构域非活性构象^[44]。

4 ALK 1 与血管和淋巴管的形成

ALK 1 信号传导在机体血管网络的形成和稳态维持等方面起着重要作用。在小鼠早期的发育过程中,ALK 1 基因的表达与小鼠血管发生与血管生成的时间与部位一致^[21]。在成年小鼠中,ALK 1 基因的表达一般被抑制,仅在肺动脉内皮细胞中表达较高,但在伤口愈合部位或肿瘤等血管生成比较旺盛的部

位,ALK 1 基因又被诱导表达。遗传研究更加确定了 ALK 1 在血管发育中的重要作用。ALK 1 基因敲除的纯合子小鼠会在胚胎发育第 10.5 天的妊娠中期死亡,表现为严重的血管发育异常,小鼠出现神经丛重塑失败,血管扩张和 AVM,血管平滑肌细胞覆盖率降低等症状。ALK 1 基因突变的斑马鱼也表现为血管畸形,血流受限。针对成年小鼠的内皮细胞 ALK 1 基因进行敲除,会导致小鼠的脑,肺,胃肠道,子宫出血^[22]。此外,成年小鼠 ALK 1 基因的缺失还会导致脐带和胎盘血管形成不足,提示 ALK 1 在胎盘发育的过程中有着重要的作用。ALK 1 基因的表达在动静脉血管及其血管床的发育过程中也起着至关重要的作用,ALK 1 基因的缺失会导致血管分流和 AVM^[23],这是一类以动静脉血管不经毛细血管床而直接相连为特征的一类疾病,这些血管表现出扩张的形态,容易破裂出血,这些 AVM 在患有 HHT 的患者中可见^[24]。

除了血管生成,ALK 1 在淋巴管的生成中也起着重要作用。ALK 1 调节淋巴管内皮细胞的分化。用 BMP 9 刺激淋巴管内皮细胞并通过使用 ALK 1-Fc 融合蛋白抑制 ALK 1 信号传导可减少新生儿淋巴管生成^[25]。淋巴管的发育受 ALK 1 参与的信号通路和 VEGF 参与的信号通路的协同调节,暗示着这两个信号通路间存在着一定的联系。

5 ALK 1 与疾病

ALK 1 基因的突变与缺失,已经被证实与多种疾病的发生有关,包括 HHT,肺动脉高压,动脉粥样硬化,骨关节炎,糖尿病视网膜病变等。深入了解 ALK 1 与这些疾病的关系,对于以 ALK 1 为靶点的治疗具有非常重要意义。

5.1 ALK 1 与 HHT

HHT 是一种常染色体显性遗传病。HHT 最早是由 Sutton 在 1864 年发现。Rendu 在 1896 年较为详细的描述了 HHT。Osler 在 1901 年报道了 HHT 的临床特征和家族遗传特征,在此之后 Weber 对 HHT 进行阐述,因此 HHT 也用三位研究者的名字被命名为 Osler- Rendu- Weber 综合征。1909 年 Hanes 首次将该病命名为 HHT。HHT 是一种罕见病,每 5000-8000 人中就有一人患病,其特征是较为反复的出血和毛细血管扩张以及多个组织和器官中的动静脉畸形。严格意义上,根据致病基因的不同,遗传性出血性毛细血管扩张症一般分为五类:HHT 1, HHT 2, HHT 3, HHT 4 以及幼年性息肉病和 HHT 综合征 (JPHT),分别是由 Endoglin 基因的突变,ALK 1 基因的突变,5 号和 7 号染色体上某个尚未克隆出的致病基因突变以及 Smad 4 基因的突变所导致的^[26]。

ALK 1 基因的突变导致的 HHT 2, 是较为常见的 HHT 类型之一。在具有 ALK1 基因杂合突变的小鼠中也发现了与 HHT 2 患者相类似的表型,括皮肤,口腔,肺,肝脏,胃肠道和大脑中的血管病变。目前研究认为 ALK 1 基因单倍体功能不足是引起 HHT 2 的主要原因。HHT2 的 ALK 1 突变体大多位于内皮细胞表面,可以正常的与其配体结合,但是不能正常的向下游传递信号。ALK 1 信号传递的缺乏导致血小板衍生生长因子受体表达降低,导致 VEGF 刺激后壁细胞募集减少,这可能是导致 HHT 2 相关动静脉畸形,血管壁完整性受损的潜在机制之一,但具体机制还有待进一步研究^[27]。

5.2 ALK 1 和肺动脉高压

肺动脉高压(Pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种肺部血管异常所导致的疾病,每一万人中约 0.25 人患病。肺动脉高压主要是由于肺部血管细胞增殖增加和管脉收缩增强,导致血压升高,最终导致右心室衰竭。研究发现 ALK 1 基因的突变会导致 PAH^[28]。ALK 1 基因突变所导致的 PAH 既可以单独存在,也可能与 HHT 形成综合症。导致 PAH 的 ALK 1 基因突变均位于细胞内结构域。

5.3 ALK 1 与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一种常见的血管病变,是多种疾病的基础。动脉粥样硬化的产生是由来源于血浆的载脂蛋白 (apoB) - 脂蛋白复合物,特别是低密度脂蛋白 (LDL) 和含载脂蛋白 B 的复合物在穿过内皮细胞的皮下区域中积聚引起的。目前为止,治疗动脉粥样硬化的最主要手段还是降低 LDL 的水平,从而降低 apoB 载脂蛋白 - 脂蛋白复合物,进而减少这些粒子进入并保留在动脉壁内的可能性。LDL 可以通过两种途径内化,分别是 LDL 受体(LDLR)依赖型途径和 LDLR 非依赖型途径。

小鼠血管的研究报告显示,易发生动脉粥样硬化的部位有着较高的 ALK 1 的表达。还有报告显示,ALK 1 在人冠状动脉粥样硬化病变的内皮,新生内膜和中膜中的表达都有所增加^[29]。2016 年 Jan R. Krachling 等人研究发现,ALK 1 介导 LDL 进入到内皮细胞中。LDL 结合 ALK 1 的亲合力比 LDLR 低,并且仅在高胆固醇血症浓度下饱和。ALK 1 通过异常的内吞途径介导 LDL 进入内皮细胞,该途径将 LDL 从溶酶体降解中转移出来并促进 LDL 的胞吞作用。而且通过遗传手段敲除 ALK1 基因的动物体内,LDL 吸收到主动脉内皮细胞中的次数减少^[30]。这种活性不需要 BMP 9/BMP 10,Endoglin,BMPRII 或 ALK 1 激酶活性,BMP 9/BMP 10 不能和 LDL 竞争性的与受体 ALK 1 结合,因此,靶向 LDL/ALK 1 相互作用可能是开发预防动脉粥样硬化新药物的可行途径。

5.4 ALK 1 和骨关节炎

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是关节炎中最常见的形式。导致骨关节炎的因素有很多种,这些因素会引起关节软骨退化损伤,关节边缘和软骨下骨反应性增生。软骨细胞的凋亡是导致骨关节炎的重要原因之一,诱导软骨细胞凋亡的机制有很多种,包括低氧诱导因子信号通路,Wnt/ β - 连锁蛋白以及 FGFs/FGFRs 信号通路等,而近些年来,TGF- β 信号通路最为其中非常重要的途径之一也受到越来越多的关注。研究者对骨关节炎的小鼠模型进行研究时发现,TGF- β 1-ALK 5-Smad 2/3 信号通路高表达于胚胎阶段,具有促进软骨细胞发育的作用,而 BMP 9-ALK 1-Smad 1/5/8 信号通路表达于软骨细胞衰老和骨关节炎发生和发展的时期,起着诱导软骨细胞凋亡的作用^[31]。在 TGF- β 信号通路中 ALK 1 和 ALK 5 的比例失调可能是导致骨关节炎的关键因素。有研究表明,在软骨细胞中,ALK 1 与 ALK 5 比例会随年龄的增长发生变化,ALK 1 的比例会逐渐增加,而 ALK 5 的比例会逐渐下降,从而诱导软骨细胞凋亡。因此,ALK 1 和 ALK 5 的表达比例可能是骨关节炎形成的重要节点之一^[32],这将会是骨关节炎的治疗的新方向。

5.5 ALK 1 与纤维化

ALK 1 似乎也与纤维化(Fibrosis)有关。纤维化是与几种病理相关的常见现象,其特征在于细胞外基质沉积过多,导致进行性器官功能障碍。因此,纤维化在影响肾脏,肝脏,肺,皮肤(硬皮病)和关节(关节炎)等慢性疾病中具有重要作用。不同器官纤维化的发病机制有许多相似之处,其中之一是激活的成纤维细胞,称为肌成纤维细胞,它是细胞外基质蛋白(Extracellular matrix, ECM)的主要来源^[33]。肾纤维化是所有进行性肾脏疾病的常见病。ECM 蛋白合成和沉积被为是肾纤维化的主要原因。肝纤维化发生在许多种类的慢性肝病中。它的特征是 ECM 蛋白积聚,引起组织功能和体内平衡的干扰,并在某些情况下导致器官衰竭^[34]。

ALK 1 在纤维变性疾病中所发挥的作用仍然未知,其作用似乎取决于细胞和组织。在几种细胞类型中,例如 ECs,大鼠成肌细胞,肝细胞和人软骨细胞,ALK 1 似乎可以抵消 TGF- β / ALK 5 诱导的 ECM 蛋白表达。在 HSCs 中,TGF- β 通过 ALK 1 - Smad 1/5 途径促进分化诱导因子 1 的表达,并增强 HSCs 向肌成纤维细胞的转分化,丰富的成肌纤维细胞有助于肝纤维化^[35]。另一方面,ALK 1 - Smad1/5 途径促进了硬皮皮肤成纤维细胞(SSc)中的纤维化表型。此外,ALK 1 可能在上皮向间质转化(EMT)中的可能作用^[36]。EMT 是指上皮细胞失去上皮特性,分解细胞间结合结构并获得运动性和侵入性,并获得间质表型的现象。EMT 对于正常的胚胎发育是必需的,但它也参与了器官的纤维化。由于 ALK 1 在纤维化中的作用尚不清楚且有争议,还有待我们进一步研究。

5.6 ALK1 与糖尿病视网膜病变

糖尿病视网膜病变的主要原因是糖尿病黄斑水肿(DME)。DME 是一种多因素病因的复杂疾病,是血液 - 视网膜屏障不稳定的结果。血液 - 视网膜屏障破坏通常是由周细胞和内皮细胞丢失以及血管紧密连接的改变引起的,导致血管高通透性。血液 - 视网膜屏障遭到破坏导致了液体积聚进入视网膜,引起组织损伤,最终导致视力丧失。当前治疗手段包括视网膜光凝或靶向抑制 VEGF,以限制血管渗漏。然而,长期的玻璃体内使用抗 VEGFs 的药物与潜在的安全问题有关,因此已被证明是强有力的血管静止因子的 ALK 1 进入人们的视野。ALK 1 信号通路还具有阻止了 VEGF 诱导的血管内皮钙黏蛋白的磷酸化,并诱导了封闭蛋白的表达,从而增强了血管屏障的功能。有研究表明,在高糖培养的内皮细胞和链脲佐菌素小鼠糖尿病模型中的 ALK 1 信号均存在一定的被抑制的现象。此外,ALK 1 单倍体功能不全加重了糖尿病小鼠的血管渗漏,提示 ALK 1 信号通路具有维持血管屏障功能^[37,38]。

6 基于 ALK 1 的抗血管生成疗法

在抗 VEGF 疗法的最初成功之后,关于抗 VEGF 疗法的效率和抗性引起了许多关注,基于 ALK 1 的抗血管生成疗法作为与之类似的治疗方案也逐渐得到关注。基于 ALK 1 的抗血管生成疗法一般包括通过可溶性的 ALK 1-Fc 靶向 ALK 1 配体的方法,以及通过使用抗 ALK 1 的中和抗体直接靶向 ALK 1 的方法,可溶性的 ALK 1-Fc 靶向 ALK 1 的抗体与 ALK 1 的细胞外结构域结合,靶向 ALK 1 激酶结构域的抑制剂还有待开发。

6.1 通过 ALK 1-Fc 隔离 ALK 1 配体来抑制 ALK 1 功能

ALK 1-Fc 是一种嵌合蛋白, 由 ALK 1 的配体结合胞外结构域与抗体的 Fc 部分结合而成^[39]。与 Fc 部分的融合导致 ALK 1 的配体二聚化并增加循环 ALK 1-Fc 的稳定性。该配体陷阱是一种可与循环配体结合的可溶性受体, 阻止配体与细胞表面受体结合。使用内分泌胰腺肿瘤的 RIP 1-Tag 2 小鼠模型进行了体内和体外实验验证 ALK 1-Fc 对血管生成的影响时发现, ALK 1-Fc 有效阻断 BMP 9 和 BMP 10 诱导的 Smad1 磷酸化和 Smad1 依赖性转录反应。在细胞水平上, ALK 1-Fc 可抑制小鼠脐静脉内皮细胞参与的脐带形成, 内皮发芽和内皮向内生长。此外, ALK 1-Fc 可减少 RIP 1-Tag 2 模型中的肿瘤大小。ALK 1-Fc 在鸡胚绒毛尿囊膜中可抑制 BMP 9 诱导的分化诱导因子 1 的表达, 脐静脉内皮细胞参与的脐带形成以及 VEGF 和 BMP 诱导的血管形成。用 ALK 1-Fc 治疗小鼠后, MCF 7 乳腺癌细胞和 B 16 黑色素瘤细胞的肿瘤负荷得以减轻。融合蛋白 ACE-041 作为一种 ALK 1-Fc 已经进入临床试验^[42], ALK 1-Fc 作为一种治疗手段应用于疾病的治疗指日可待。

6.2 抗 ALK 1 的中和抗体直接靶向 ALK 1

ALK 1 中和抗体作用的潜在机制是通过干扰 ALK 1 / Endoglin 的结合, 导致 BMP 9 与 ALK 1 之间的复合物形成受损。在功能水平上, 抗体抑制内皮发芽^[4]。有研究表明, 人 ALK 1 的中和抗体可以抑制 HUVEC 中血清诱导的 Smad1 磷酸化, 细胞迁移和血管形成。在小鼠 ALK 1 的中和抗体可抑制原位移植乳腺癌细胞的肿瘤生长, 并伴有微血管密度的显著降低以及淋巴管密度的轻度降低。另一项研究表明, 用人 ALK 1 的中和抗体进行治疗可抑制 BMP 9 诱导的 Smad 磷酸化和 BRE- 荧光素酶报告分子的活性。最近提供了 ALK 1 中和抗体在一组肝细胞癌患者中以及在一批患有各种实体瘤的患者中的临床应用的首批临床数据, 这些数据表明, 抗 ALK 1 治疗对患者具有良好的耐受性^[4]。

6.3 基于 ALK 1 的抗血管生成疗法的安全性

虽然现在还没有关于 ALK 1 靶向药物有严重副作用的报道, 但是 ALK 1 基因的表达在生物体的生长发育过程中起着关键的作用, 而且 ALK 1 基因的突变会导致 HHT 2 等一系列疾病的产生, 因此 ALK 1-Fc 或 ALK 1 中和抗体对 ALK 1 的抑制作用可能导致 HHT 2 等相关症状是值得注意的方面。同样, 还必须考虑到由影响其他细胞 ALK 1 的表达, 如成纤维细胞或神经细胞所引起的靶向副作用。当使用 ALK 1-Fc 靶向 ALK 1 信号传导时, 通过 ALK 1 以外的其他受体的 BMP 9 信号传导可能会被阻断, 并可能影响其他过程, 例如成骨作用。但是, 迄今已报道的副作用表明, 与其他抗血管生成治疗引起的高血压, 蛋白尿和头痛相比, ALK 1 靶向治疗的副作用较小。

7 展望

血管网络的形成与稳态维持对生物体的生长发育, 各组织器官的功能发挥着关键的作用。ALK 1 作为影响血管形成的 TGF- β s 信号通路的关键蛋白越来越被重视。ALK 1 蛋白的结构, 功能以及其与疾病的关系和相关治疗手段, 已经被阐述的越来越完善, 未来以 ALK 1 为靶向的药物的开发将会是 ALK 1 相关研究的重点。

参考文献(References)

- [1] Reva G, Garmasch A, Sadovaya Y, et al. Regulation of vasculogenesis and angiogenesis in the human body [J]. Archiv Euromedica, 2018, 8 (1): 49-50
- [2] Apte R S, Chen D S, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: Beyond discovery and development[J]. Cell, 2019, 176(6): 1248-1264
- [3] Muñoz-Félix J M, González-Núñez M, López-Novoa J M. ALK1-Smad1/5 signaling pathway in fibrosis development: Friend or foe?[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2013, 24(6): 523-537
- [4] Jonker L. TGF- β & BMP Receptors Endoglin and ALK1: Overview of their functional role and status as antiangiogenic targets [J]. Microcirculation, 2014, 21(2): 93-103
- [5] Oh M K, Kim I S. Involvement of placental growth factor upregulated via TGF- β 1-ALK1-Smad1/5 signaling in prohepatoangiogenesis[J]. Plos One, 2019, 14(4): e02162894
- [6] Emmanuelle T, Marie O, Agnès D, et al. A heterodimer formed by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 provides most BMP biological activity in plasma [J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, 293(28): A118-A2968
- [7] Li W, Salmon R M, Jiang H, et al. Regulation of the ALK1 ligands, BMP9 and BMP10 [J]. Biochemical Society Transactions, 2016, 44 (4): 1135-1141
- [8] Mi L, Brown C T, Gao Y, et al. Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(12): 3710-3715
- [9] Capasso T L, Li B, Volek H J, et al. BMP10 is the sole required ligand for endothelial ALK1 signaling [J]. Angiogenesis, 2019, 22 (4): 588-589
- [10] Roman B L, Hinck A P. ALK1 signaling in development and disease: new paradigms[J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2017, 74(24): 4539-4560
- [11] Capasso T L, Li B, Volek H J, et al. BMP10-mediated ALK1 signaling is continuously required for vascular development and maintenance[J]. Angiogenesis, 2019
- [12] Townson S A, Martinez-Hackert E, Greppi C, et al. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287 (33): 27313-27325
- [13] Kim S K, Henen M A, Hinck A P. Structural biology of betaglycan and endoglin, membrane-bound co-receptors of the TGF-beta family [J]. Experimental Biology And Medicine, 2019, 244 (UNSP 153537021988116017SI): 1547-1558
- [14] Li Y, Luo W, Yang W. Nuclear transport and accumulation of smad proteins studied by single-molecule microscopy [J]. Biophysical Journal, 2018, 114(9): 2243-2251
- [15] Alsina-Sanchis E, Garcia-Ibanez Y, Figueiredo A M, et al. ALK1 loss results in vascular hyperplasia in mice and humans through PI3K activation [J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2018, 38(5): 1216-1229
- [16] Cunha S I, Pietras K. ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer[J]. Blood, 2011, 117(26): 6999-7006
- [17] Van C A, Davidson E B, Van D K P. TGF β Signaling via ALK1 requires ALK5 kinase activity in chondrocytes [J]. Osteoarthritis and

- Cartilage, 2017, 25(1): S167-S168
- [18] Kerstin W L, Markus J, Andreas F, et al. Serum induces transcription of Hey1 and Hey2 genes by Alk1 but not Notch signaling in endothelial cells[J]. Plos One, 2015, 10(3): e120547
- [19] Moon E, Kim Y H, Vu P, et al. TMEM100 is a key factor for specification of lymphatic endothelial progenitors [J]. Angiogenesis, 2020, [Epub ahead of print]
- [20] Mahlawat P, Ilangovan U, Biswas T, et al. Structure of the Alk1 extracellular domain and characterization of its bone morphogenetic protein (BMP) binding properties [J]. Biochemistry, 2012, 51(32): 6328-6341
- [21] Rochon E R, Menon P G, Roman B L. Alk1 controls arterial endothelial cell migration in lumenized vessels [J]. Development, 2016, 14(143): 2593-2602
- [22] Ma L, Shen F, Jun K, et al. Integrin beta 8 deletion enhances vascular dysplasia and hemorrhage in the brain of adult Alk1 heterozygous mice[J]. Translational Stroke Research, 2016, 7(6): 488-496
- [23] Zhu W, Saw D, Weiss M, et al. Induction of brain arteriovenous malformation through CRISPR/Cas9-mediated somatic Alk1 gene mutations in adult mice [J]. Translational Stroke Research, 2019, 10(5): 557-565
- [24] Hawinkels L J, Garcia D V A, Ten D P. Activin receptor-like kinase 1 as a target for anti-angiogenesis therapy [J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2013, 22(11): 1371-1383
- [25] Niessen K, Zhang G, Ridgway J B, et al. ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development[J]. Blood, 2009, 115(8): 1654-1661
- [26] Robert F, Desroches-Castan A, Bailly S, et al. Future treatments for hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2020, 15(4): e12814
- [27] Ruiz-Llorente L, Gallardo-Vara E, Rossi E, et al. Endoglin and alk1 as therapeutic targets for hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2017, 21(10): 933-947
- [28] Uznańska-Loch B, Wikło K, Kulczycka-Wojdala D, et al. Genetic variants in a polish population of patients with pulmonary arterial hypertension: Sequencing of BMPR2, ALK1, and ENG genes [J]. Kardiologia Polska, 2018, 76(5): 852-859
- [29] Yao Y, Zebboudj A F, Alejandra T, et al. Activin-like kinase receptor 1 (ALK1) in atherosclerotic lesions and vascular mesenchymal cells [J]. Cardiovascular Research, 2007, 74(2): 279-289
- [30] Krachling J R, Chidlow J H, Rajagopal C, et al. Genome-wide RNAi screen reveals ALK1 mediates LDL uptake and transcytosis in endothelial cells[J]. Nature Communications, 2016, 7: 13516
- [31] Blaney D E, Remst D F, Vitters E L, et al. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice [J]. Journal of Immunology, 2009, 182(12): 7937-7945
- [32] Lin H, Eric H, Augustin L, et al. Proprotein convertase furin inhibits matrix metalloproteinase 13 in a TGFβ-dependent manner and limits osteoarthritis in mice[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 10488-10490
- [33] Morine K J, Qiao X, Paruchuri V, et al. Reduced activin receptor-like kinase 1 activity promotes cardiac fibrosis in heart failure [J]. Cardiovascular Pathology, 2017, 31(1): 26-33
- [34] Desroches-Castan A, Tillet E, Ricard N, et al. Bone morphogenetic protein 9 is a paracrine factor controlling liver sinusoidal endothelial cell fenestration and protecting against hepatic fibrosis [J]. Hepatology, 2019, 70(4): 1392-1408
- [35] Wiercinska E, Wickert L, Denecke B, et al. Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells [J]. Hepatology, 2006, 43(5): 1032-1041
- [36] Kwon Y C, Sasaki R, Meyer K, et al. Hepatitis c virus core protein modulates Endoglin (CD105) signaling pathway for liver pathogenesis [J]. Journal of Virology, 2017: 1217-1235
- [37] Claesson W L. Alk1 (activin receptor-like kinase 1) and vascular hyperpermeability in diabetic retinopathy: More is less [J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2018, 38(8): 1673-1675
- [38] Naoufal A, Claire V, Natalija P, et al. BMP (bone morphogenetic protein) 9/Alk1 (activin-like kinase receptor type I) signaling prevents hyperglycemia-induced vascular permeability [J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2018, 38(8): 118-310733
- [39] Hawinkels L J, Vinuesa A G D, Paauwe M, et al. Activin receptor-like kinase 1 ligand trap reduces microvascular density and improves chemotherapy efficiency to various solid tumors [J]. Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2016, 22(1): 96-106