

· 综 述 ·

# 脑海绵状血管畸形 KLF2、KLF4 信号通路的研究进展

张 峰 综述 刘 利 审校

【关键词】脑海绵状血管畸形;发病机制;KLF2 信号通路;KLF4 信号通路

【文章编号】1009-153X(2022)08-0698-03 【文献标志码】A 【中国图书资料分类号】R 739.41

脑海绵状血管畸形(cerebral cavernous malformations, CCM)是由桑椹样扩大的不规则血管形成的,缺乏平滑肌、弹性组织和完整的基底膜,因此血管壁薄,易渗漏<sup>[1]</sup>。CCM 的发病率约为 0.5%,以中枢神经系统多见,导致头疼、中风、癫痫发作和局灶性神经功能缺失。CCM 发病形式包括散发性 CCM (sporadic CCM, SCCM) 和家族性 CCM (familial CCM, FCCM), 其中 FCCM 与染色体 7q 的 CCM1 (KRIT1)、染色体 7p 的 CCM2 (OSM) 和染色体 3q 的 CCM3 (PDCD10) 基因有关。研究发现,参与 CCM 损伤的信号通路有:MEKK3-Krüppel 样因子(Krüppel-like factor, KLF) 2/4、RhoA/ROCK、内皮-间充质转化(endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT)、血小板反应蛋白 1(thrombospondin 1, TSP1) 丢失、促炎状态、氧化应激和自噬<sup>[2,3]</sup>。本文主要介绍 KLF2、KLF4 在 CCM 信号通路中所起的作用。

## 1 KLF2、KLF4 结构和功能

KLF 家族是真核生物体内一类结构高度保守的转录因子,其 C-末端有 3 个连续高度保守的 C2H2 锌指结构域,通过结合靶基因启动子 GC 富含序列,调控相应基因的表达;其 N-末端属于转录调控结构域,高度变异,通过结合特异蛋白质,介导多种因子的转录。KLF4 在人体内表达广泛,主要存在于细胞核内,其特征是:因作用靶基因的不同,具有转录活化或转录抑制的双重调节作用。KLF4 通过对其下游靶基因的调控,参与细胞的增殖、分化、凋亡以及

血管生成和肿瘤的发生发展<sup>[4]</sup>。KLF2 可受血流切应力的诱导,调节内皮细胞多种功能基因的表达,参与调节炎症、凝血、血管舒缩和血管生成等多种过程<sup>[5]</sup>。KLF2 和 KLF4 之间有许多共同的靶点,但它们对共同调控的启动子在亲和力方面存在个体差异,因而表现出特异性。Zhou 等<sup>[6]</sup>发现,CCM 小鼠模型的早期形成与 KLF2、KLF4 的过度表达和 Rho/ROCK 活性的增加有关。当 CCM 蛋白缺陷后,激活 MEKK3-MEK5-ERK5-MEF2 信号轴,使转录因子 KLF2、KLF4 表达增加<sup>[7]</sup>,KLF2 可进一步激活下游 RhoA/ROCK 信号通路,而 KLF4 则激活其下游的 EndMT 信号通路<sup>[8]</sup>,KLF2 与 KLF4 二者也可共同作用于 TSP1,使其表达减少,从而促进 CCM 的发展及其出血性演变<sup>[9]</sup>。目前认为,KLF2、KLF4 是 CCM 早期发展和进展的关键,可以作为 CCM 发病机制的研究重点。

## 2 信号转导

2.1 KLF2/4 与 MEKK3-MEK5-ERK5-MEF2 信号轴  
有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路表达于所有真核生物内,是将细胞上接收的刺激信号传递到相应蛋白所必需的信号通路。因此,MAPK 通路在细胞的炎症反应、分化、生长和增殖等过程中起着非常重要的作用。MAPK 激酶激酶 3(MAPK kinase kinase 3, MEKK3)是 MAPK 信号通路中重要的节点,通过磷酸化激活细胞外信号调节激酶激酶 5(Mitogen/extracellular signal-regulated kinase kinase 5, MEK5),进一步激活细胞外信号调节蛋白激酶 5(extracellular signal-regulated protein kinase 5, ERK5)从而发挥生物学效应。Maddaluno 等<sup>[7]</sup>发现,人体内三种 CCM 蛋白相互作用形成的蛋白质复合物(CCM signaling complex, CSC)是 MEKK3 级联反应的抑制因子。当 CSC 蛋白缺陷后,会激活 MEKK3,激活 MEKK3-MEK5-ERK5 信号途径。磷酸化 ERK5 可以通过调节肌细胞增强

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.08.027

基金项目:哈尔滨医科大学研究生科研和实践创新项目(YJSSJCX2019-26HYD);哈尔滨医科大学附属第一医院科研创新基金(2020M19);黑龙江省教育厅项目(GA20C019)

作者单位:150001 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第一医院神经外科(张 峰、刘 利)

通讯作者:刘 利, E-mail: h.e2000@hotmail.com

因子2A、2C的转录活性,进一步促进KLF2、KLF4的表达<sup>[8,9]</sup>。Cuttano等<sup>[10]</sup>发现,敲除KLF4基因表达可显著降低CCM1小鼠病死率,并适度改善血管病变。

**2.2 TLR4、CDC42与MEKK3-KLF2/4 Toll样受体4** (toll like receptors 4, TLR4)可识别病原微生物细胞壁上的保守成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。LPS作为I型急性期反应蛋白可诱导机体产生炎症免疫反应。TLR4也是一种保守的I型跨膜蛋白,可以将细胞外刺激传递到细胞内,进而通过信号转导参与多种疾病发生发展过程。Tang等<sup>[11]</sup>在CCM1小鼠模型中发现,诱导革兰氏阴性细菌脓肿,会显著增加CCM病变表型的严重程度,提示TLR4可能是MEKK3的上游靶点。当革兰氏阴性细菌产生LPS后,可被TLR4蛋白识别,进一步通过TLR4-MEKK3-KLF2/4信号途径来加速CCM的形成。

细胞分裂周期蛋白42(cell division cycle 42, CDC42)是Ras超家族GTP酶中的核心成员,位于细胞质,包含191个氨基酸,主要参与调解细胞骨架中肌动蛋白重排与调控蛋白激酶,并通过对GTP结合/活化状态和与GDP结合/失活状态之间循环切换,从而在复杂的细胞信号转导网络中起到开关作用。当CDC42功能丧失后,会损害脑内皮细胞的发芽、分支形态发生、轴向极性以及其在脑组织中的正常分布。Castro等<sup>[12]</sup>发现,CDC42也参与CSC之间的相互作用并形成复合物,当脑内皮细胞CDC42缺失后,也通过激活MEKK3-MEK5-ERK5信号通路,进而导致KLF2、KLF4的过表达,诱导CCM的形成。

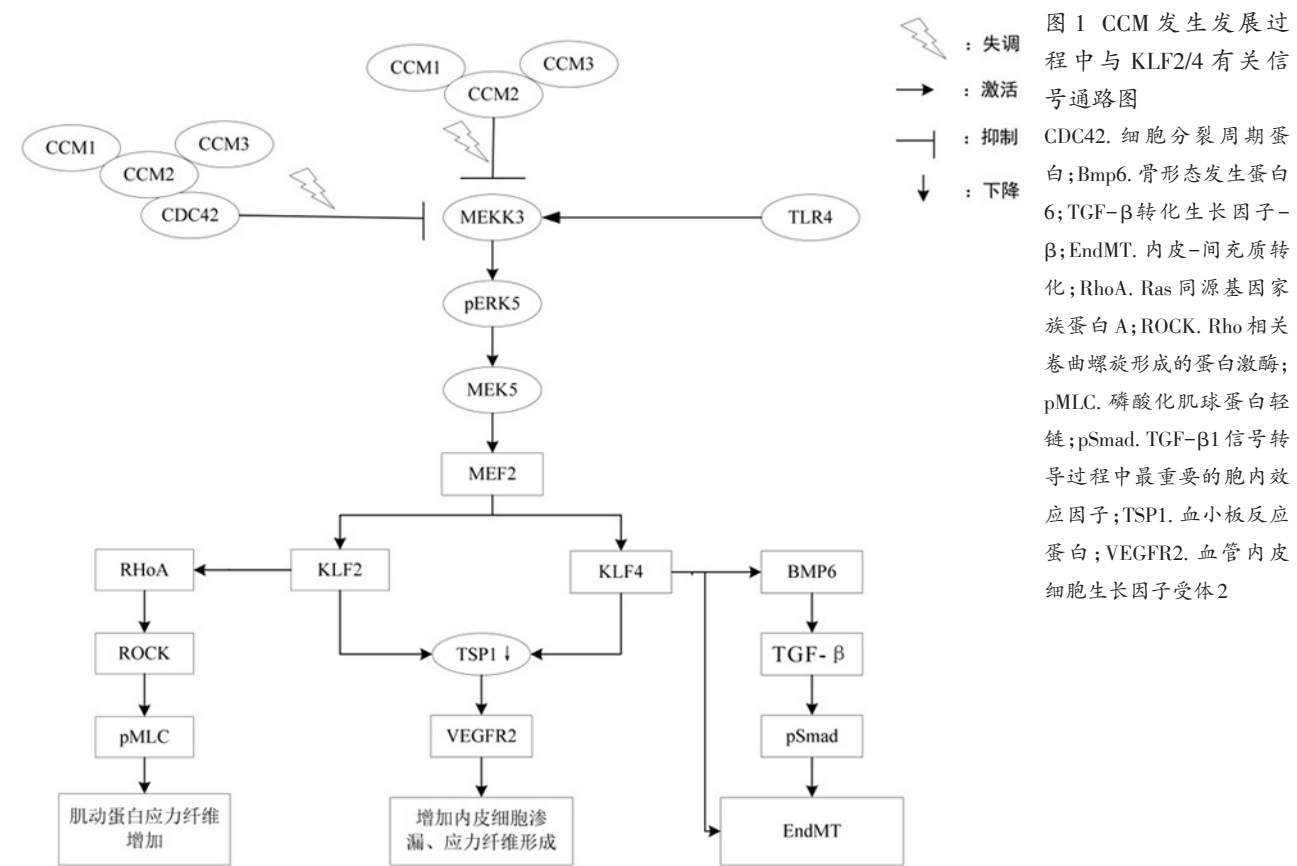
**2.3 KLF2与RhoA/ROCK信号通路** RhoA是一种小的GTP结合蛋白,具有高度保守的GDP/GTP结合区、GTP酶活性区、靶区和膜定位结构。作为一种分子开关,RhoA的主要功能是调节细胞骨架重组、细胞生长和基因表达,在细胞信号转导通路中起着重要的作用。RhoA的功能主要是通过ROCK实现的,ROCK有ROCK1和ROCK2两种异构体,在激酶结构域的水平上有65%的总体同源性和92%的相似性。Richardson等<sup>[13]</sup>发现,当体内出现任何一种CCM蛋白缺陷,都会激活MEKK3-KLF2-RhoA-ROCK1/2-pMLC信号通路,最终导致肌动蛋白应激纤维的增加、细胞黏附性的降低以及血管通透性增加;当抑制KLF2表达时,CCM1小鼠模型中病变表现出99%的恢复,且组织学上只有少量的小静脉扩张。

**2.4 KLF4与EndMT** EndMT被认为是上皮间质转分化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)的一种亚型,是指内皮细胞失去其自身特性而获得间质

细胞和干细胞样特性的表型转变过程。EndMT的特点是细胞连接结构的改变、细胞极性丧失,细胞增殖或迁移增加,最终导致血管生成增加,并可在炎症微环境下形成桑椹状<sup>[14]</sup>。在正常人体内,CSC可通过抑制小GTP酶RAS相关蛋白1的效应器来控制内皮细胞屏障功能。在CCM蛋白缺陷的情况下,脑内皮细胞间粘附连接减少,可诱发内皮细胞经历EndMT形成CCM。EndMT主要是由内源性骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)6上调介导的,可激活EndMT发生有关的BMP和转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )信号通路<sup>[7]</sup>。Zhang等<sup>[15]</sup>发现,KLF4是CCM蛋白缺陷后产生EndMT的关键。BMP6作为KLF4的靶基因,KLF4可以通过诱导BMP6启动子的活性,从而诱发EndMT的形成。研究报道,KLF4除诱导BMP6外,还可以直接通过与某些EndMT标志物启动子的结合来诱导EndMT的产生,如干细胞抗原1(stem cell antigen 1, SCA1)和成纤维细胞特异性蛋白(fibroblast-specific protein 1, FSP1)。同时,在CCM1小鼠模型中,KLF4基因敲除既会显著降低EndMT典型标志物(DNA结合抑制因子1、FSP1、SCA1)中mRNA与蛋白水平,又会导致与EndMT发生有关的BMP6被强烈抑制。

**2.5 KLF2/4与TSP1** TSP1是一种细胞基质糖蛋白,可通过调节细胞增殖、黏附和凋亡,来维持细胞平衡;同时,TSP1也是最有效和最具特征性的内源性血管生成抑制剂之一,在血管生成过程中表达上调,通过抑制体内基质金属蛋白酶的表达来抑制血管生成,从而限制血管密度。Lopez-Ramirez等<sup>[8]</sup>发现,CCM蛋白缺失后会引发KLF2和KLF4的过表达,从而导致其下游TSP1的表达被抑制。TSP1可以促进血管内皮细胞生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)降解,从而抑制VEGFR2信号通路。当TSP1表达减少时,会增强VEGFR2信号通路,从而导致CCM的发生。VEGFR2也与内皮细胞有丝分裂和血管生成密切相关。当VEGFR2活化后,可增加参与内皮细胞渗漏、应力纤维形成和血管生成密切相关的血管内皮钙粘蛋白和Beta连环蛋白磷酸化和迁移,从而诱发CCM病变形成<sup>[16]</sup>。Lopez-Ramirez等<sup>[8]</sup>在用KLF2、KLF4来抑制TSP1表达的实验中发现,当诱导人内皮细胞异位表达KLF2和KLF4后,TSP1表达水平与CCM1沉默后的水平相似;并发现KLF2和KLF4的过表达也可以导致TSP1 mRNA表达水平下降。

综上所述,KLF2、KLF4被MEKK3-KLF2/4信号



通路激活后,在EndMT、RhoA/ROCK信号通路以及TSP1表达中起到重要的桥梁作用(图1),是CCM发生发展的关键。在CCM小鼠模型中,KLF2、KLF4基因失活可大大减少CCM病变的形成,因此,KLF2、KLF4可作为未来CCM发病机制信号通路的研究重点。KLF2、KLF4作为新的药物治疗靶点,也可为不可触及的病变提供新的治疗方案,如脑干CCM、多发性CCM或位于功能区的病变。

【参考文献】

[1] Polster SP, Cao Y, Carroll T, *et al.* Trial readiness in cavernous angiomas with symptomatic hemorrhage (CASH) [J]. Neurosurgery, 2019, 84(4): 954-964.

[2] Dettler MR, Snellings DA, Marchuk DA. Cerebral cavernous malformations develop through clonal expansion of mutant endothelial cells [J]. Circ Res, 2018, 123(10): 1143-1151.

[3] Padarti A, Zhang J. Recent advances in cerebral cavernous malformation research [J]. Vessel Plus, 2018, 2: 21.

[4] Abdelilah-Seyfried S, Tournier-Lasserre E, Derry WB. Blocking signalopathic events to treat cerebral cavernous malformations [J]. Trends Mol Med, 2020, 26(9): 874-887.

[5] Li J, Zhao Y, Coleman P, *et al.* Low fluid shear stress conditions contribute to activation of cerebral cavernous malformation signalling pathways [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(11): 165519.

[6] Zhou Z, Tang AT, Wong WY, *et al.* Cerebral cavernous malformations arise from endothelial gain of MEKK3-KLF2/4 signalling [J]. Nature, 2016, 532(7597): 122-126.

[7] Maddaluno L, Rudini N, Cuttano R, *et al.* EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations [J]. Nature, 2013, 498(7455): 492-496.

[8] Lopez-Ramirez MA, Fonseca G, Zeineddine HA, *et al.* Thrombospondin1 (TSP1) replacement prevents cerebral cavernous malformations [J]. J Exp Med, 2017, 214(11): 3331-3346.

[9] Abdelilah-Seyfried S, Tournier-Lasserre E, Derry WB. Blocking signalopathic events to treat cerebral cavernous malformations [J]. Trends Mol Med, 2020, 2020, 26(9): 874-887.

[10] Cuttano R, Rudini N, Bravi L, *et al.* KLF4 is a key determinant in the development and progression of cerebral cavernous malformations [J]. EMBO Mol Med, 2016, 8(1): 6-24.

[14] Panditharatna E, Kilburn LB, Aboian MS, *et al.* Clinically relevant and minimally invasive tumor surveillance of pediatric diffuse midline gliomas using patient-derived liquid biopsy [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(23): 5850-5859.

[15] Saratsis AM, Yadavilli S, Magge S, *et al.* Insights into pediatric diffuse intrinsic pontine glioma through proteomic analysis of cerebrospinal fluid [J]. Neuro Oncol, 2012, 14(5): 547-560.

[16] Piccioni DE, Achrol AS, Kiedrowski LA, *et al.* Analysis of cell-free circulating tumor DNA in 419 patients with glioblastoma and other primary brain tumors [J]. CNS Oncol, 2019, 8(2): CNS34.

[17] Stallard S, Savelieff MG, Wierzbicki K, *et al.* CSF H3F3A K27M circulating tumor DNA copy number quantifies tumor growth and in vitro treatment response [J]. Acta Neuropathol Commun, 2018, 6(1): 80.

[18] Pan C, Diplas BH, Chen X, *et al.* Molecular profiling of tumors of the brainstem by sequencing of CSF-derived circulating tumor DNA [J]. Acta Neuropathol, 2019, 137(2): 297-306.

[19] Duan H, Hu JL, Chen ZH, *et al.* Assessment of circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid by whole exome sequencing to detect genomic alterations of glioblastoma [J]. Chin Med J (Engl), 2020, 133(12): 1415-1421.

[20] Kanamori M, Maekawa M, Shibahara I, *et al.* Rapid detection of mutation in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes using mass spectrometry [J]. Brain Tumor Pathol, 2018, 35(2): 90-96.

[21] Xu H, Xia YK, Li CJ, *et al.* Rapid diagnosis of IDH1-mutated gliomas by 2-HG detection with gas chromatography mass spectrometry [J]. Lab Invest, 2019, 99(4): 588-598.

[22] Longuespee R, Wefers AK, De Vita E, *et al.* Rapid detection of 2-hydroxyglutarate in frozen sections of IDH mutant tumors by MALDI-TOF mass spectrometry [J]. Acta Neuropathol Commun, 2018, 6(1): 21.

[23] Kalkanis SN, Kast RE, Rosenblum ML, *et al.* Raman spectroscopy to distinguish grey matter, necrosis, and glioblastoma multiforme in frozen tissue sections [J]. J Neurooncol, 2014, 116(3): 477-485.

[24] Livermore LJ, Isabelle M, Bell IM, *et al.* Raman spectroscopy to differentiate between fresh tissue samples of glioma and normal brain: a comparison with 5-ALA-induced fluorescence-guided surgery [J]. J Neurosurg, 2020. doi: 10.3171/2020.5.JNS20376. Online ahead of print.

[25] Uckermann O, Yao W, Juratli TA, *et al.* IDH1 mutation in human glioma induces chemical alterations that are amenable to optical Raman spectroscopy [J]. J Neurooncol, 2018, 139(2): 261-268.

[26] Livermore LJ, Isabelle M, Bell IM, *et al.* Rapid intraoperative molecular genetic classification of gliomas using Raman spectroscopy [J]. Neurooncol Adv, 2019, 1(1): vdz008.

[27] Daoust F, Nguyen T, Orsini P, *et al.* Handheld macroscopic Raman spectroscopy imaging instrument for machine-learning-based molecular tissue margins characterization [J]. J Biomed Opt, 2021, 26(2): 022911.

(2022-04-16 收稿, 2022-07-02 修回)

(上接第 700 页)

[11] Tang AT, Choi JP, Kotzin JJ, *et al.* Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations [J]. Nature, 2017, 545(7654): 305-310.

[12] Castro M, Lavina B, Ando K, *et al.* CDC42 deletion elicits cerebral vascular malformations via increased MEKK3-dependent KLF4 expression [J]. Circ Res, 2019, 124(8): 1240-1252.

[13] Richardson BT, Dibble CF, Borikova AL, *et al.* Cerebral cavernous malformation is a vascular disease associated with activated RhoA signaling [J]. Biol Chem, 2013, 394(1): 35-42.

[14] Ma J, Sanchez-Duffhues G, Goumans MJ, *et al.* TGF-beta-induced endothelial to mesenchymal transition in disease and tissue engineering [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 260.

[15] Zhang Y, Li C, Huang Y, *et al.* EOFaz inhibits endothelial to mesenchymal transition through downregulation of KLF4 [J]. Int J Mol Med, 2020, 46(1): 300-310.

[16] Distefano PV, Glading AJ. VEGF signalling enhances lesion burden in KRIT1 deficient mice [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 632-639.

(2020-08-19 收稿, 2021-01-21 修回)