DOI:10.16016/j.1000-5404.202104042

Zic3 通过非经典 Wnt 和 VEGF 信号轴调控斑马鱼胚胎脑血管发育的分子机制

李帅庭[1],王云鹏[1],袁 志[1],王业启[2],程 志[1],黄慧哲[1] 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院生殖医学中心,发育生物学研究室[1];400030 重庆,重庆大学生物工程学院[2]

[摘要] **目的** 探究锌指转录因子 3(*zic3*)基因对斑马鱼早期脑血管发育的影响及其机制。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 技术获得 *zic3* 基因突变体,以野生型斑马鱼(AB 品系)为对照,统计各个基因型 72 hpf(hour post fertilization)胚胎脑出血比例。利用血管标记转基因鱼 AB(Tg flk1:gfp)与 *zic3* 突变体杂交,将得到的 *zic3*$^{+/-}$(Tg flk1:gfp)进行自交得到同窝对照,使用激光共聚焦显微镜观察 72 hpf 胚胎血管发育表型($n=30$),利用 RT-PCR 检测相关基因表达。**结果** 成功获得了 *zic3* 纯合突变体并经基因测序验证。与对照组相比,*zic3* 纯合突变体存在明显的出血表型,且质膜膜泡关联蛋白(plasmalemma vesicle associated protein,Plvap)基因与 *zic2* 基因的表达量明显升高($P<0.05$),但杂合突变体未观察到此表型。在杂合突变体中,后脑血管发育出现明显抑制,血管数量相比野生型降低 60%($P<0.05$),存在明显发育缺陷。同时非经典 Wnt 信号通路基因(*wnt5a*、*wnt7ba*、*wnt9b*)以及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)通路基因(*kdrl*、*vegfab*、*ephrlnB2*)表达量均明显上升($P<0.05$)。**结论** 在斑马鱼中 *zic3* 功能可被 *zic2* 进行代偿,*zic3* 通过抑制 *plvap* 的表达降低胚胎脑血管通透性,通过抑制非经典 Wnt 信号和 VEGF 信号通路调控胚胎脑血管发育。

[关键词] 斑马鱼;锌指转录因子 3;非经典 Wnt 信号;血管内皮生长因子;脑血管发育
[中图法分类号] R322.12; R329.1; R329.26 [文献标志码] A

Molecular mechanism of Zic3 controlling embryonic cerebrovascular development *via* non-classical Wnt and VEGF signaling axes in zebrafish

LI Shuaiting[1], WANG Yunpeng[1], YUAN Zhi[1], WANG Yeqi[2], CHENG Zhi[1], HUANG Huizhe[1] [1]Department of Developmental Biology, Reproductive Medicine Center, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]College of Biological Engineering, Chongqing University, Chongqing, 400030, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effects of zinc finger transcription factor 3 (*zic3*) gene on cerebrovascular development in zebrafish at early stage and its mechanisms. **Methods** CRISPR/Cas9 technique was used to obtain the zebrafish with *zic3* mutation. The proportion of cerebral hemorrhage in embryos of each genotype was counted at 72 h post fertilization (hpf), with wild-type AB zebrafish serving as control. The vasculature-labelled transgenic AB zebrafish (Tg flk1:gfp) was crossed with *zic3* mutants to obtain *zic3*$^{+/-}$(Tg flk1:gfp), which was subsequently inbred for littermate control, and the phenotypes of angiogenesis in embryos ($n=30$) were observed by fluoroscopy at 72 hpf. Finally, RT-PCR was applied to detect the expression of related genes. **Results** *Zic3* homozygous mutants were successfully achieved and validated by DNA sequencing. The mutants manifested an obvious hemorrhagic phenotype and significantly up-regulated expression of plasmalemma vesicle associated protein (Plvap) gene and *zic2* gene as compared with

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31771619)
[通信作者] 黄慧哲,E-mail:66993944@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the control ($P<0.05$). However, this phenotype was not observed in the heterozygous mutants, in which the angiogenesis of hindbrain was significantly inhibited, and the number of vessels was less than that of the wild type by 60% ($P<0.05$), indicating an evident developmental defect. Meanwhile, the expression levels of non-classical Wnt signaling pathway genes (*wnt5a*, *wnt7ba* and *wnt9b*) and vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway genes (*kdrl*, *vegfab* and *ephrlnB2*) were all significantly increased in the heterozygous mutants ($P<0.05$). **Conclusion** In zebrafish, function of *zic3* can be compensated by *zic2*. *Zic3* reduces cerebrovascular permeability in embryos by suppressing the expression of *Plvap*, and regulates cerebral angiogenesis by inhibiting non-classical Wnt and VEGF signaling pathways.

[**Key words**] zebrafish; zinc finger transcription factor 3; non-classical Wnt signaling; vascular endothelial growth factor; cerebrovascular development

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31771619). Corresponding author: HUANG Huizhe, E-mail: 66993944@qq.com

近年来,研究发现一些常见神经疾病(如帕金森病、阿尔茨海默病)的出现都伴随着血脑屏障的异常[1],此类疾病已严重影响患者的生活质量。因此,对血脑屏障的相关机制研究可以为此类疾病的临床治疗提供相应的理论支持。20 世纪初,科学家保罗发现并命名了血脑屏障[2]。血脑屏障存在的作用主要是为了维持大脑环境的稳态,在保证大脑必要的能量与营养供应的同时,进行物质交换,并隔绝随血液循环的代谢废物进入大脑。近年来,对血脑屏障的研究主要集中在脑血管功能和结构的完整性上[3]。在血管发育过程中,Wnt 信号以及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)信号在血管发育过程中扮演着极为重要的角色。Wnt 信号参与了血管内皮细胞的增殖、血管芽生以及血管丛重塑、脉管系统成熟等多个阶段来促进血管发生[4]。此外,VEGF 是人们健康与疾病期间血管发育和血液及淋巴管功能的主要调节因子[5]。Wnt 信号也能够通过上调 VEGF 来刺激血管生成[6]。

锌指转录因子 3(Zic3)基因是 Zic 家族的一员,与果蝇的 *Opa* 基因同源。通过斑马鱼的整胚原位杂交可以发现,*zic3* 在斑马鱼前中脑以及斑马鱼中胚层高表达[7]。同时,*zic3* 基因也被证实参与了 Wnt 信号的调控[8-9]。这提示了 *zic3* 很大可能地参与了斑马鱼早期胚胎脑部血管的发育以及血脑屏障的形成。但到目前为止,关于 *zic3* 以及非经典 Wnt 信号通路对于脑部血管发育的影响研究相对较少,我们认为这是一个非常值得探究的问题。因此,本研究采用 CRISPR/Cas9 技术在斑马鱼体内敲除 *zic3* 基因,观察斑马鱼胚胎血管发育,检测非经典 Wnt 信号以及 VEGF 信号通路基因的表达,以揭示其中的关联,为临床应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物的饲养与繁殖

使用 AB 品系斑马鱼(购自国家斑马鱼资源中心),室温维持在 28.5~29.5 ℃,使用 pH 和电导率测控仪维持饲养系统,pH=7.2~7.6,电导率 500~550 μS/cm,维持鱼房光暗比为 14 h:10 h。斑马鱼胚胎置于 28.5 ℃恒温培养箱进行培养。

1.2 主要试剂及仪器

试剂:天根普通 DNA 产物纯化试剂(DP204-02),mMACHINE® SP6 Transcription Kit(AM1340,Invitrogen,美国),RNase lnhibitor(Roche,瑞士,3335399001),HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit(E2050S,NEB,美国),BM Purple(Roche,瑞士)。

仪器:显微注射器、p-97 微电极拉制仪(Shutter,美国),PCR 仪(Bio-Rad,美国),体式显微镜、激光共聚焦显微镜(Leica SP8,德国)。

1.3 方法

1.3.1 *zic3* 基因敲除 利用网站(http://chopchop.cbu.uib.no/)设计 *zic3* gRNA 靶位点及可测序用的鉴定引物,选择位于斑马鱼 *zic3* 基因外显子上、预测效率较高且 GC 含量相对较高的靶位点序列,并在靶位点前后 200~300 bp 处设计相应测序引物。经 HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒体外转录后,得到其 gRNA。同时,利用 sp6-CAS9 质粒,经 *Not* Ⅰ酶切线性化后,经 mMACHINE® SP6 试剂盒体外转录,得到 Cas9 RNA。随后将两种 RNA 注射进斑马鱼一细胞期胚胎的卵黄内且靠近细胞位置,持续培养,取 48 hpf(hour post fertilization)胚胎提取基因组,每个胚胎单独提取。使用测序引物扩增后送测序用以筛选突变体。

1.3.2　基因组提取　　取整条胚胎或者剪成鱼的一部分尾鳍,置于 200 μL EP 管内,吸去多余水分,加入 50 mmol/L 的 NaOH 50 μL,98 ℃,20 min,加入 1 mol/L 的 Tris-HCl(pH=8.0)5 μL,振荡混匀,即得到基因组 DNA。

1.3.3　荧光定量 PCR 检测　　用 TRIzol® Reagent (Invitrogen,美国)提取斑马鱼总 RNA,将提取的总 RNA 用 TaKaRa 反转录试剂盒(RR047A)按试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA。使用 TaKaRa 定量试剂(RR820A)进行定量 RT-PCR,扩增条件:①95 ℃,5 min;②95 ℃,10 s,60 ℃,30 s,40 个循环。熔解曲线:每 5 s 升高 0.5 ℃,从 65 ℃到 95 ℃。以 *gapdh* 作为内参基因,对相关基因进行相对表达量的定量分析。

1.3.4　原位杂交检测　　收集所需时间段的胚胎进行原位杂交,每管约 30 枚胚胎(24 hpf 以后的胚胎需用含 0.004 5%PTU 的培养水培养,以防止色素生成)。使用 4%PFA 固定胚胎,再用甲醇脱水,使用蛋白酶 K 消化通透,用 Hyb(-)杂交液于 65 ℃进行预杂交 2~3 h,在 Hyb(+)加入 *zic3* 反义 mRNA 探针于 65 ℃过夜。之后用不同浓度梯度的 SSC 液洗去多余的探针,加入封闭液室温封闭 1 h 后,使用地高辛抗体 anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments(Roche)溶液封闭过夜,最后加入 BM Purple 染液进行避光染色,染色完成后,将胚胎移入新的 EP 管中,再经由 4%的 PFA 室温固定后,加入 90%甘油于 4 ℃储存或直接用于拍照观察。

1.3.5　激光共聚焦显微镜观察　　将斑马鱼胚胎使用麻醉剂麻醉后,再用 1%低熔点琼脂糖固定,并在琼脂糖内摆放体位,置于激光共聚焦显微镜下拍照,观察血管发育。

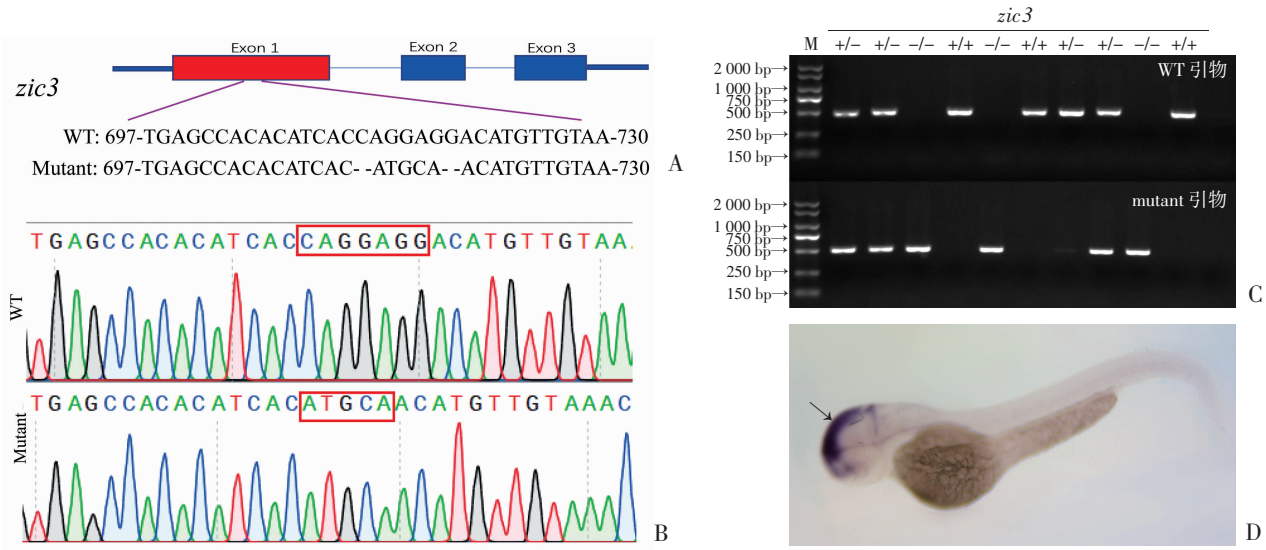
1.4　统计学分析

使用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析结合独立样本 t 检验。对斑马鱼血管数以及斑马鱼出血进行直接计数,荧光定量 PCR 数据由 CFX Manager 软件系统采集。$P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　斑马鱼 zic3 突变体的构建

通过显微注射技术将 Cas9 RNA 和 *zic3* gRNA 注射至一细胞期的野生型斑马鱼胚内,并在 48 hpf 后进行测序。挑取若干胚胎单独提取基因组,鉴定该批次是否存在突变,将存在突变的 F0 代斑马鱼饲养长大,并确定其突变类型。待性成熟后与野生型斑马鱼(WT)杂交得到可遗传的 F1 代斑马鱼突变体。经测序得到有义突变且突变位点(图 1A、B),该位点位于一号外显子上,符合设计靶位点的预期位置。该突变体序列与野生型相比较,原序列 7 个碱基被替换为 5 个突变碱基,在数量上共减少了 2 个碱基,导致所编码的氨基酸在第 155 位开始产生移码突变,并在第 196 氨基酸位置翻译被提前终止,导致该基因功能缺失。后经 F1 自交繁殖得到 F2,并设计相关鉴定引物进行基因型鉴定(图 1C)。同时对 60 hpf 斑马鱼野生型胚胎进行整胚原位杂交,结果显示 *zic3* 在脑部特异表达(图 1D)。



A:斑马鱼 *zic3* 基因突变示意图;B:*zic3* 基因核酸测序结果;C:PCR 鉴定 *zic3* 斑马鱼基因型;D:60 hpf 野生型斑马鱼 *zic3* 基因原位杂交(×10)　箭头示 *zic3* 在脑部特异表达

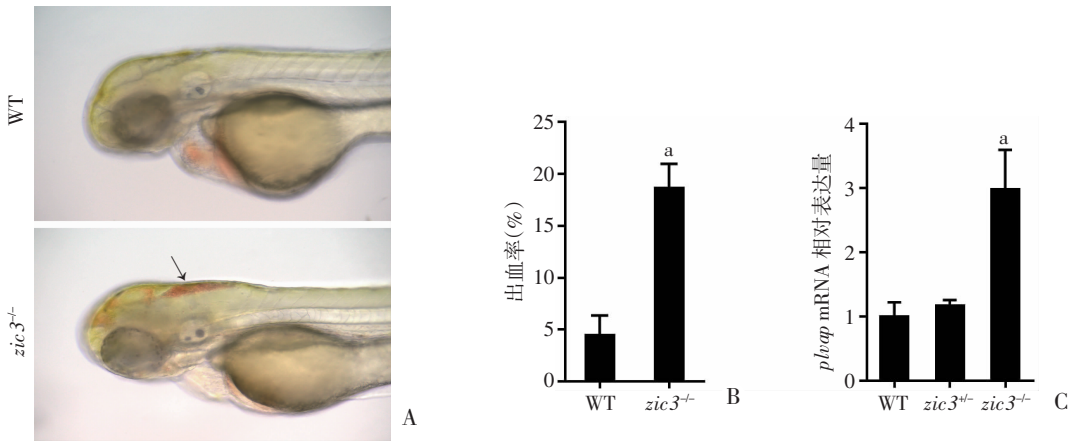
图 1　斑马鱼 zic3 突变体的构建与验证

2.2　斑马鱼 *zic3* 基因缺失导致脑部出血

为了探究 *zic3* 基因的缺失对斑马鱼突早期脑部发育的影响,对斑马鱼胚胎进行持续培养、观察,发现 72 hpf 时纯合突变体($zic3^{-/-}$)存在明显的出血表型(图 2A),且纯合突变体的出血比例明显高于野生型($P<0.05$,图 2B),而且杂合突变体($zic3^{+/-}$)内也无明显出血。RT-PCR 检测结果显示:在纯合突变体胚胎中,质膜小泡相关蛋白(Plvap)基因表达量明显升高($P<0.05$,图 2C),质膜小泡相关蛋白在基底血管通透性内皮膜的形成和维持中至关重要。这一结果表明纯合突变体出血与跨膜运输的过度激活导致的血管通透性增加相关。

2.3　斑马鱼 *zic3* 基因部分缺失特异导致后脑血管缺失

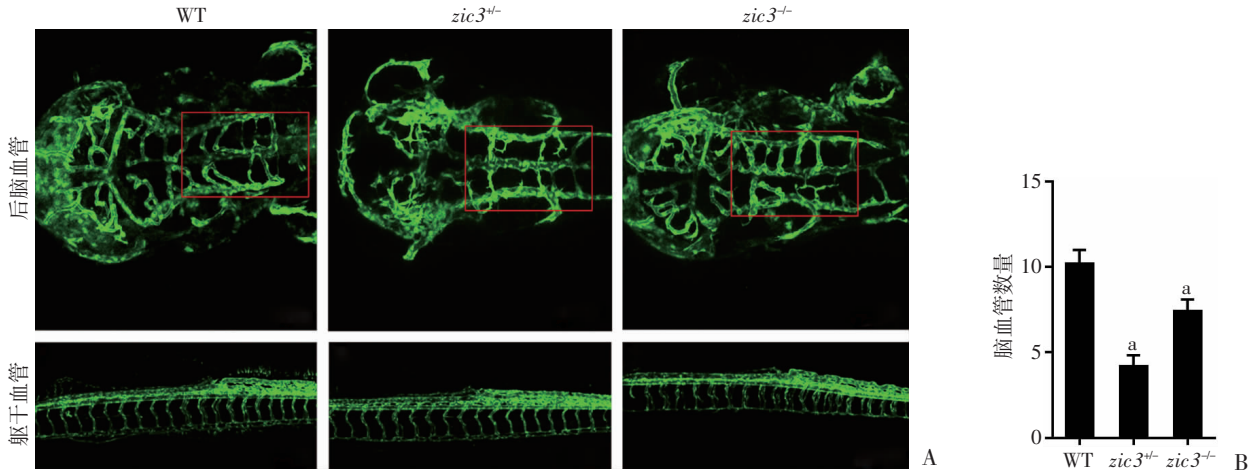
由原位杂交结果可知,斑马鱼早期 *zic3* 基因在脑部血管高表达,因此将斑马鱼突变体($zic3^{-/-}$)与血管转基因鱼 AB(Tg flk1 : gfp)杂交,并将得到的 $zic3^{+/-}$(Tg flk1 : gfp)进行交配,得到同窝对照。于 72 hpf 时使用激光共聚焦显微镜拍照,并在拍照完成后取出胚胎进行基因型鉴定。结果显示:与野生型相比,$zic3^{-/-}$后脑血管存在缺陷,血管减少 25%($P<0.05$)。但 $zic3^{+/-}$的缺失现象最为严重,血管数量减少 60%($P<0.05$),且血管排列混乱,血管明显变细(图 3)。这一现象可能由血管发育异常引起的不完全充血所致。同时观察躯干血管,各个基因型斑马鱼躯干血管排列整齐均匀,均未发现异常(图 3A)。表明 *zic3* 基因特异作用在斑马鱼胚胎的脑血管引起发育异常。



a:$P<0.05$,与 WT 比较

A:斑马鱼 72 hpf 胚胎白光图(×10)　箭头示出血位置;B:斑马鱼 72 hpf 胚胎出血表型统计($n=90$);C:RT-PCR 验证 *plvap* 基因的表达量($n=3$)

图 2　斑马鱼野生型与 *zic3* 基因敲除突变体 72 hpf 胚胎脑出血表型观察以及 *plvap* 基因表达量的检测



A:后脑血管(×25)及躯干血管(×10)发育情况　红框中示后脑血管;B:各基因型后脑血管数量分析($n=30$)

a:$P<0.05$,与 WT 比较

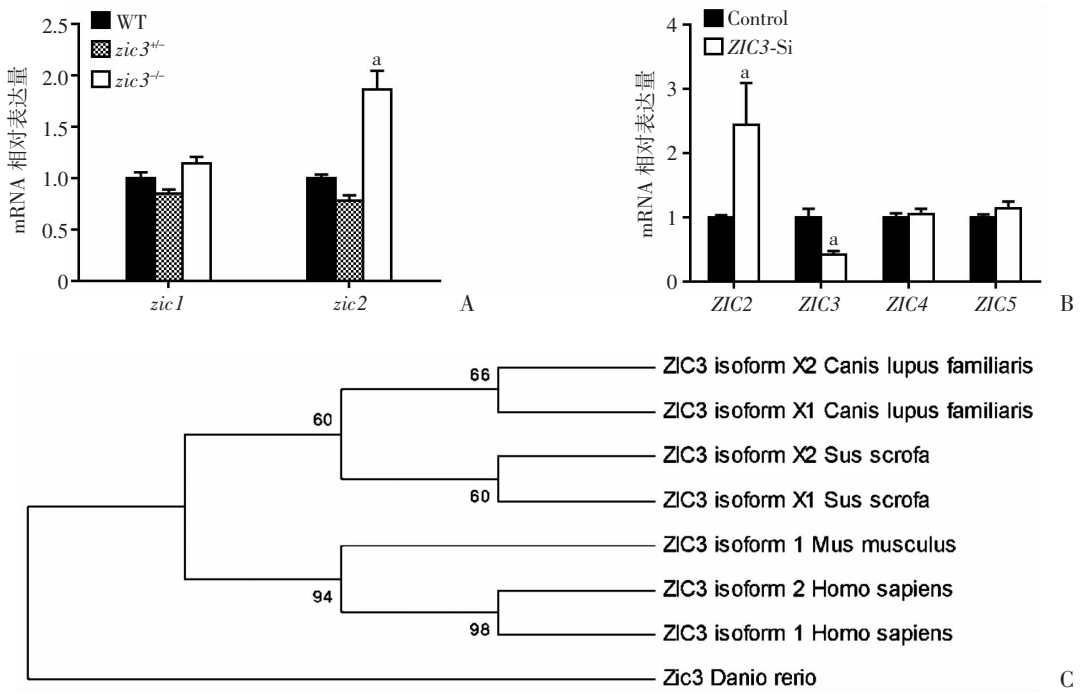
图 3　激光共聚焦显微镜观察 72 hpf 各基因型斑马鱼后脑、躯干血管发育情况

2.4　斑马鱼内 *zic3* 基因缺失导致 Zic 家族代偿机制的出现

鉴于上述斑马鱼 *zic3* 杂合突变体血管缺失要比纯合突变体严重,我们提出 Zic 家族基因存在代偿机制这一假说,且认为在 *zic3* 基因功能缺失后会激活这一代偿机制。首先,通过 RT-PCR 来探究 Zic 家族其他基因在 *zic3* 突变体斑马鱼内的表达情况。结果发现:与野生型相比,*zic1* 和 *zic2* 的基因表达量在杂合子突变体的斑马鱼中无明显上调,但在纯合突变体中 *zic2* 表达量却明显上调(图 4A)。随后,在人源细胞系进行 *ZIC3* 干扰实验,由于人脐静脉内皮细胞系(HUVEC)内的 *ZIC3* 自身表达量不足以被检测(表 1),因此采用人恶性多发性畸胎瘤(NTERA-2)细胞系进行 *ZIC3* 基因的干扰实验,结果显示:在 *ZIC3* 被干扰后,细胞内 *ZIC2* 的表达量也明显上调($P<0.05$),其中 *ZIC1* 未被检测到(图 4B)。以上结果均显示 *zic2* 基因对 *zic3* 基因具有代偿作用。通过 NCBI 查找 ZIC3 蛋白序列并构建进化树比对,结果显示:Zic3 在脊椎动物中均具有较高的保守性(图 4C)。

2.5　在 *zic3* 杂合突变体斑马鱼中通过非经典 Wnt 信号与 VEGF 信号通路的激活抑制血管发育

鉴于在 *zic3* 杂合突变体斑马鱼中具有更加明显的血管异常表型,且能够排除在纯合突变体中 *zic2* 代偿 *zic3* 所带来的干扰。而且 Wnt 信号通路以及 VEGF 信号通路在血管发育中扮演着重要角色。因此,通过 RT-PCR 验证在 *zic3* 杂合突变体中的血管缺失是否与 Wnt 信号通路以及 VEGF 信号通路相关。使用野生型斑马鱼与 *zic3* 纯合突变体($zic3^{-/-}$)交配得到 *zic3* 杂合突变体($zic3^{+/-}$),并以野生型胚胎作为对照,收集 72 hpf 的胚胎提取总 RNA。结果显示:杂合突变体内相较于野生型斑马鱼非经典 Wnt 信号通路 *wnt5a*、*wnt7ba*、*wnt9b* 基因表达量均明显上调($P<0.05$,图 5A)。同时,与野生型斑马鱼相比,杂合突变体中 *kdrl*、*vegfab*、*ephrlnB2* 等 VEGF 信号通路基因表达量也明显上调($P<0.05$),*vegfaa* 表达量无明显变化(图 5B)。以上结果表明:在斑马鱼 *zic3* 杂合突变体中通过激活非经典 Wnt 信号通路与 VEGF 信号通路从而抑制血管发育。

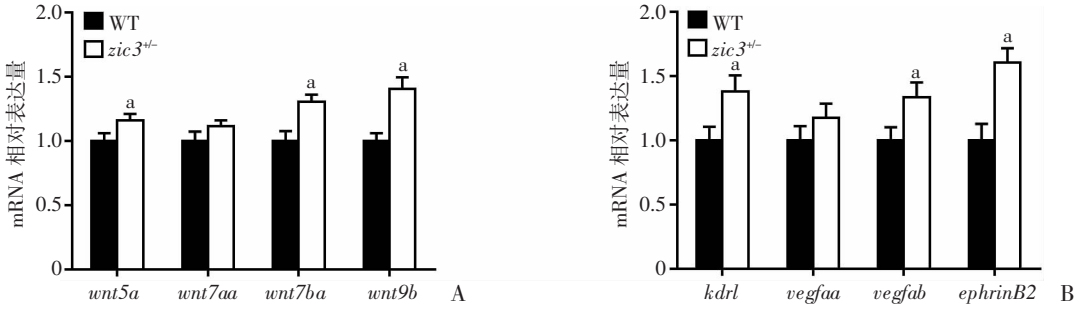


A:斑马鱼 *zic3* 突变体内 Zic 家族基因相对表达量($n=3$)　a:$P<0.05$,与 WT 比较;B:NTERA-2 细胞系内 *ZIC3* 被干扰后 ZIC 家族基因表达量的变化($n=3$)　a:$P<0.05$,与 Control 比较;C:使用蛋白序列通过 mega 构建 ZIC3 进化树

图 4　RT-PCR 验证 Zic 家族基因存在代偿机制

表 1 人脐静脉内皮细胞系(HUVEC)RNA-seq 未能检测出 ZIC 家族基因信号(取自 RNA-seq 部分数据)

基因号	si-1	si-2	NC-1	NC-2	基因名	蛋白家族	蛋白家族注释
ENSG00000152977	4	2	0	0	*ZIC1*	zf-H2C2_2	Zinc-finger double domain.
ENSG00000156925	0	0	0	0	*ZIC3*		
ENSG00000043355	1	0	2	3	*ZIC2*		
ENSG00000174963	0	1	0	2	*ZIC4*		



a:$P<0.05$,与 WT 比较

图 5 RT-PCR 验证非经典 Wnt 信号(A)及 VEGF 信号通路(B)相关基因在 72 hpf 胚胎中的表达 ($n=3$)

3 讨论

斑马鱼以其独特的优势一直是发育生物学研究中经典的模式动物,在血管系统的研究中也做出了突出贡献。与普通血管内皮细胞相比,血脑屏障中的脑血管内皮细胞本身表现出极低的转胞吞作用,这一特点与脑内皮细胞中囊泡的形成受到抑制密切相关[10]。对于脑血管内皮细胞而言,通透性的增强也是导致脑出血的原因之一。质膜小泡相关蛋白(Plvap)在基底血管通透性内皮膜的形成和维持中扮演者重要的角色,并且与转胞吞作用相关[11]。因此,在 *zic3* 纯合突变体中观察到的脑部出血以及 *plvap* 基因的表达量增加,提示 *zic3* 对 *plvap* 的抑制在维持血管较低的通透性中发挥着重要作用。但由于高血压、脑血管畸形等多种因素均可以引起脑出血[12],因此具体机制仍需进一步探究。

据报道,Wnt 信号通路的激活会抑制血管的生成,呈现负调控的趋势[13]。而且 VEGF 信号通路的对血管发育的作用也呈现双面性,在某些病理条件下,VEGF 的表达量上调会导致血管生成受到抑制,因此它不仅仅扮演促进血管生成的角色[14-15]。VEGF 信号通路主要包括 VEGF 及其受体家族。*Kdrl*(kinase insert domain receptor like)又称 flk/vegfr2,是一种 VEGF 的受体,并特异表达于血管内皮细胞。另外,Ephrins 家族是迄今所知的最大的生长因子受体家族——受体酪氨酸激酶亚家族 Eph 的配体,其中 *ephrinB2* 是血管发生的关键基因之一[16]。本研究发现 VEGF 信号通路的相关基因表达量升高,与近期的报道结果一致。非经典 Wnt 信号途径的组成部分包括平面细胞极性(PCP)和 Wnt/Ca^{2+}途径,其中 *Wnt5*、*Wnt7*、*Wnt9* 等均被报道在血管内皮细胞中表达[17]。据报道,*Wnt5a* 参与了神经发育以及细胞的迁徙[18],而中枢神经系统(CNS)内皮细胞内的 Wnt7a/b 可以和 GPR 受体结合,调节斑马鱼血管生成和血脑屏障的发育[19],此外,*Wnt9* 也参与了斑马鱼神经早期形成[20],有趣的是,*zic3* 也被报道参与了早期的神经发育[21]。本研究发现 *zic3* 缺失后,非经典 Wnt 信号相关基因表达明显增强。这可能提示 *zic3* 是通过非经典信号通路调控神经系统,从而进一步调节 VEGF 信号,最终调节血管发育。但其具体机制尚不清晰,仍需进一步探究。

本研究使用 Crispr/Cas9 技术在斑马鱼中成功敲除 *zic3* 基因,且观察到 *zic3* 的完全缺失会引起 *zic2* 的代偿性的高表达。*zic2* 基因本身表达于斑马鱼前脑,在中脑和后脑交界处也有少量表达[22],*zic3* 基因则主要表达与前脑和中脑位置。此外,*zic2* 在肿瘤发生的过程中往往会促进癌症的侵袭转移,因此,*zic2* 在许多癌症中均被认为是促癌因子[23],而这一过程中也同时伴随着血管新生,提示 *zic2* 可能也和血管新生有关。MA 等[24]的报道显示:带有过早终止密码子(premature

termination codons, PTC)的 mRNA 会激活代偿效应,即 *zic3* 因突变导致 mRNA 出现 PTC,从而引起 *zic2* 的代偿。本研究观察到:*zic3* 纯合突变体内的血管数量与野生型相差不大,这意味着纯合突变体比杂合突变体多出的这部分血管极可能是由代偿性的 *zic2* 所诱导生成的,同时纯合突变体内的血管排列构像产生了一定的缺陷。基于此,我们提出以下假说:*zic3* 基因完全缺失后,*zic2* 由于代偿性高表达所引起的血管增生,很大可能标志着斑马鱼脑部血管的发育进入了一种病理性的进展。这一假说也能解释本研究仅在 *zic3* 纯合突变体内观察到出血表型,而在 *zic3* 杂合突变体内尽管血管发育异常却未观察到出血。因此,我们认为这种代偿性所产生的血管在功能上极大可能存在一定缺陷,但具体相关机制有待进一步探究。上述研究表明:*zic3* 在保证斑马鱼胚胎脑部血管正常发育方面扮演着至关重要的角色。

综上所述,本研究证明了 *zic3* 通过抑制 *plvap* 维持脑血管的功能,通过抑制非经典 Wnt 信号以及 VEGF 信号维持血管正常发育,且 *zic3* 的缺失会引起 *zic2* 的代偿机制出现。

参考文献:

[1] OBERMEIER B, DANEMAN R, RANSOHOFF R M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier[J]. Nat Med, 2013, 19(12): 1584-1596. DOI: 10.1038/nm.3407.

[2] SAUNDERS N R, DREIFUSS J J, DZIEGIELEWSKA K M, *et al*. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history[J]. Front Neurosci, 2014, 8: 404. DOI: 10.3389/fnins.2014.00404.

[3] LANGEN U H, AYLOO S, GU C. Development and cell biology of the blood-brain barrier[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2019, 35: 591-613. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062608.

[4] FOULQUIER S, DASKALOPOULOS E P, LLURI G, *et al*. WNT signaling in cardiac and vascular disease[J]. Pharmacol Rev, 2018, 70(1): 68-141. DOI: 10.1124/pr.117.013896.

[5] APTE R S, CHEN D S, FERRARA N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development[J]. Cell, 2019, 176(6): 1248-1264. DOI: 10.1016/j.cell.2019.01.021.

[6] WANG Y, SANG A M, ZHU M H, *et al*. Tissue factor induces VEGF expression *via* activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway in ARPE-19 cells[J]. Mol Vis, 2016, 22: 886-897.

[7] ZHU L R, HARUTYUNYAN K G, PENG J L, *et al*. Identification of a novel role of ZIC_3 in regulating cardiac development[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(14): 1649-1660. DOI: 10.1093/hmg/ddm106.

[8] BORDET G, BERTRAND V. Zic genes in Nematodes: a role in nervous system development and wnt signaling[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1046: 59-68. DOI: 10.1007/978-981-10-7311-3_4.

[9] WINATA C L, KONDRYCHYN I, KUMAR V, *et al*. Genome wide analysis reveals Zic3 interaction with distal regulatory elements of stage specific developmental genes in zebrafish[J]. PLoS Genet, 2013, 9(10): e1003852. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003852.

[10] ANDREONE B J, CHOW B W, TATA A, *et al*. Blood-brain barrier permeability is regulated by lipid transport-dependent suppression of caveolae-mediated transcytosis[J]. Neuron, 2017, 94(3): 581-594. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.03.043.

[11] LANGEN U H, AYLOO S, GU C. Development and cell biology of the blood-brain barrier[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2019, 35: 591-613. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062608.

[12] GOLDBERG J, RAABE A, BERVINI D. Natural history of brain arteriovenous malformations: systematic review[J]. J Neurosurg Sci, 2018, 62(4): 437-443. DOI: 10.23736/S0390-5616.18.04452-1.

[13] CORADA M, NYQVIST D, ORSENIGO F, *et al*. The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling[J]. Dev Cell, 2010, 18(6): 938-949. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.05.006.

[14] ZHAO W C, CAO L, YING H R, *et al*. Endothelial CDS2 deficiency causes VEGFA-mediated vascular regression and tumor inhibition[J]. Cell Res, 2019, 29(11): 895-910. DOI: 10.1038/s41422-019-0229-5.

[15] KIKUCHI R, NAKAMURA K, MACLAUCHLAN S, *et al*. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease[J]. Nat Med, 2014, 20(12): 1464-1471. DOI: 10.1038/nm.3703.

[16] GROPPA E, BRKIC S, UCCELLI A, *et al*. EphrinB2/EphB4 signaling regulates non-sprouting angiogenesis by VEGF[J]. EMBO Rep, 2018, 19(5): e45054. DOI: 10.

15252/embr.201745054.

[17] GOODWIN A M, SULLIVAN K M, D'AMORE P A. Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling [J]. Dev Dyn, 2006, 235(11): 3110-3120. DOI:10.1002/dvdy.20939.

[18] ARREDONDO S B, GUERRERO F G, HERRERA-SOTO A, *et al*. Wnt5a promotes differentiation and development of adult-born neurons in the Hippocampus by noncanonical Wnt signaling[J]. Stem Cells, 2020, 38(3): 422-436. DOI:10.1002/stem.3121.

[19] CHO C, SMALLWOOD P M, NATHANS J. Reck and Gpr124 are essential receptor cofactors for Wnt7a/Wnt7b-specific signaling in mammalian CNS angiogenesis and blood-brain barrier regulation[J]. Neuron, 2017, 95(5): 1221-1225. DOI:10.1016/j.neuron.2017.08.032.

[20] COX A A, JEZEWSKI P A, FANG P K, *et al*. Zebrafish Wnt9a, 9b paralog comparisons suggest ancestral roles for Wnt9 in neural, oral-pharyngeal ectoderm and mesendoderm [J]. Gene Expr Patterns, 2010, 10(6): 251-258. DOI:10.1016/j.gep.2010.05.005.

[21] WINATA C L, KONDRYCHYN I, KUMAR V, *et al*. Genome wide analysis reveals Zic3 interaction with distal regulatory elements of stage specific developmental genes in zebrafish[J]. PLoS Genet, 2013, 9(10): e1003852. DOI:10.1371/journal.pgen.1003852.

[22] GRINBLAT Y, SIVE H. Zic Gene expression marks anteroposterior pattern in the presumptive neurectoderm of the zebrafish gastrula[J]. Dev Dyn, 2001, 222(4): 688-693. DOI:10.1002/dvdy.1221.

[23] SAKUMA K, KASAMATSU A, YAMATOJI M, *et al*. Expression status of Zic family member 2 as a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(4): 553-559. DOI:10.1007/s00432-009-0689-y.

[24] MA Z P, ZHU P P, SHI H, *et al*. PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response *via* Upf3a and COMPASS components[J]. Nature, 2019, 568(7751): 259-263. DOI:10.1038/s41586-019-1057-y.

(**收稿**:2021-04-07;**修回**:2021-05-23)

(编辑 栾 嘉)