

Notch信号通路对干细胞分化的影响

王 荣 徐惠成*

(第三军医大学西南医院妇产科, 重庆 400038)

摘要 干细胞的增殖分化受到自身或外在、远程或近程多种信号通路的调控, 而细胞之间的相互通讯在此过程中起到重要作用。Notch通路就是通过相邻细胞之间相互通讯调控细胞分化的重要信号通路之一, 众多研究显示, 该通路的活化在干细胞分化过程中发挥了重要调节作用, 本文就此相关研究进展作一简要综述。

关键词 Notch通路; 干细胞; 分化

1 Notch及其信号通路

1.1 Notch基因及蛋白

Notch基因于1919年由Morgan及其同事^[1]在果蝇体内发现, 其功能部分缺失可以导致果蝇翅膀边缘出现一些缺口。1983年, 果蝇的Notch基因被克隆^[2]。后来的发现表明, 从果蝇等无脊椎动物到人类, 体内均存在Notch基因。其中, 果蝇体内只有一个Notch基因, 而人Notch家族包括Notch-1、Notch-2、Notch-3、Notch-4四个成员。

Notch基因编码一种膜蛋白受体, 称为Notch蛋白。Notch受体在不同物种, 以及同一物种的不同成员之间都具有高度的结构同源性。它是一个相对分子量约为30 000的I型膜蛋白, 由胞外亚基和跨膜亚基组成, 两个亚基之间通过钙离子依赖的非共价键结合形成异源二聚体。胞外亚基由数量可变的EGF样重复序列(tandem epidermal growth factor-like repeats, EGF-R)和3个LNR(Lin/Notch repeats)组成, 人Notch-1和Notch-2各含有36个EGF-R; Notch3和Notch4分别含有34个和39个EGF-R。EGF-R在Notch受体和配体集合中起关键作用, LNR富含半胱氨酸, 介导了两亚基之间钙离子依赖的相互作用。跨膜亚基包括跨膜区、RAM结构域、6个cdc10/ankyrin(ANK)重复序列、2个核定位信号(NLS)和PEST结构域(proline-glutamate-serine-threonine-rich domain)。RAM结构域是Notch信号效应分子CBF1主要的结合部位, ANK重复序列是deltex等的结合部位, PEST结构域与泛素介导的Notch胞内段降解有关。

1.2 Notch信号通路及其配体

Notch通路的配体也是膜蛋白, 表达在邻近细胞

上。故Notch通路是细胞之间相互通讯的重要信号分子。果蝇体内有Delta和Serrate两种配体, 线虫体内的配体是Lag-2。脊椎动物体内也存在多个Notch配体, 其中与Delta同源的称为Delta或者Delta-like, 与Serrate同源的称为Jagged-1。故Notch通路的配体被统称为DSL蛋白。

Notch通路有CSL依赖途径和CSL非依赖途径两种。CSL是与Notch受体胞内段结合的一种转录抑制子CFB1、Su(H)、Lag-1首字母的缩写。

在果蝇体内, DSL配体通过EGF-R与Notch受体结合, Notch受体胞内段被激活后解离并转入胞核, 通过RAM与转录抑制子Su(H)结合, 使Su(H)转变成成为转录激活子, 激活Notch诱导基因*E(spl)*(*enhancer of Split*), 然后通过*E(spl)*调节其他与细胞分化直接相关基因的转录^[1]。

在哺乳动物体内, CSL依赖途径又称为CFB1/RBP-J κ 依赖途径。如图1所示, 与上述激活Su(H)相同, Notch通路被激活后, 胞内段(ICN)解离释放入胞核, 通过RAM结构域及ANK重复序列与CFB1/RBP-J κ 结合, 从而使CFB1/RBP-J κ 与SMRT、SKIP等蛋白形成的共抑制复合物解离, 进一步激活下游基因如*HES*基因的转录。*HES*家族是*E(spl)*在哺乳动物中的同源基因, 共有6个成员。其中*HES1*和*HES5*在Notch信号通路中发挥作用。*HES1*是转录抑制因子, 它能抑制*E47*分子的活性, 从而抑制了MyoD和MASH1的

收稿日期: 2010-10-13 接受日期: 2010-11-15

国家自然科学基金(No.30772309)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68765902, E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn

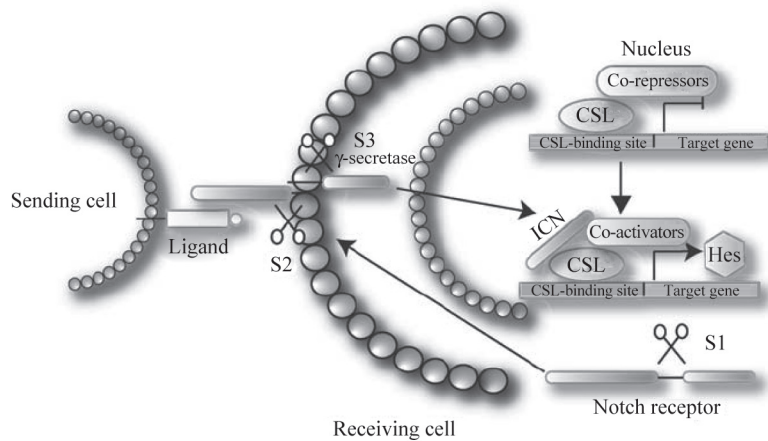


图1 经典Notch通路概略图^[4]

与配体结合后, Notch受体被激活, 并释放胞内段进入到核内。胞内段与CSL及共活化子结合形成蛋白复合物, 从而启动目标基因的转录。具体参考文章所述。

Fig.1 Schematic overview of the canonical Notch signaling pathway (according to reference^[4])

Upon ligand binding, the Notch receptors are activated and release the ICN into the nucleus, ICN forms a protein complex together with CSL and co-activators, and initiates transcription of target genes. See text for further details.

转录激活作用, 影响神经和肌肉形成。

CSL非依赖途径是Arias等^[3]在研究Notch基因突变时在果蝇体内发现的, 后来在哺乳动物细胞体外实验中被证实。随后的研究发现, *deltex*蛋白介导了一部分CSL非依赖的Notch通路。但对于其他的Notch CSL非依赖途径的介导分子及介导途径仍知之甚少。

1.3 Notch通路的作用

Notch信号通路的功能最初是在果蝇神经系统发育的研究中发现的。研究发现, Notch信号会上调细胞膜表面的Notch分子, 同时下调其配体如Delta的表达; 反之, Delta的表达对细胞自身Notch分子的表达则有下调作用。这种正反馈机制使干细胞或发育早期细胞Notch及其配体的细微差别在增殖及发育过程中不断放大, 从而决定了干细胞的不同分化方向^[5]。但也存在Notch通路激活促进干细胞分化的报道, 机制尚不清楚。

Notch通路在免疫系统方面的研究也较多。大量实验证明, Notch信号除了在淋巴细胞的中枢发育阶段起着重要作用外, 也对外周淋巴细胞分化、发育有关键作用。如促进CD4⁺T细胞向Th1/Th2转化^[6], 通过关闭AKT及GSK3 β 抑制T细胞充分活化^[7], 增加外周免疫器官边缘区B细胞的数量^[8]等。

此外, Notch通路对血管发生、肿瘤形成等方面

也有重要的调控作用。

2 Notch通路与干细胞的分化

2.1 Notch通路与胚胎干细胞分化

胚胎干细胞(ESC)属于全能性干细胞, 具有极强的自我更新和分化潜能, 可以分化为任何类型的组织和器官。Notch通路通过细胞间通讯对维持ESC干细胞特性及细胞命运决定方面起着重要作用。

2.1.1 Notch通路上调抑制ESC分化为神经细胞 Xiao等^[9]通过对小鼠ESC诱导分化为神经细胞过程中Notch蛋白的变化发现, 小鼠ESC中Notch1蛋白表达较强, 而随着RA的诱导分化, 神经细胞逐渐增多, 与此同时Notch1蛋白也随之减少。这说明Notch1蛋白的减少与分化诱导时间密切相关, 与神经细胞分化趋势呈负相关。Lodovica等^[10]也发现, 抑制Notch通路, 可以延迟hESNSCs(hESC derived NSCs)G₁/S期的过渡, 并加快其向神经细胞分化。进一步研究表明, Notch1通过上调抗神经分化基因*Hes1*和*Hes5*, 激活两种神经分化抑制因子Mash1和NeuroD, 从而抑制神经细胞分化^[8]。然而最近有文献表明^[11], 持续表达的HES1通过抑制Dll1及Jag1配体抑制Notch通路, 从而抑制ESC向神经细胞分化。因此, Notch通路与HES1之间的反馈调节在调节ESC分化方面的作用仍需进一步的实验证实。

2.1.2 Notch通路上调抑制ESC分化为胰岛B细胞 *Ngn3*是胰岛内分泌细胞形成的关键转录因子之一。Apelqvist等^[12]发现, Notch通路通过激活Hes, 从而抑制*Ngn3*基因的转录, 阻止未成熟分泌细胞的分化。而且CSL、Delta-like1等中间分子或者是*Hes1*基因缺失会加快分泌细胞的分化。相反, Hald等^[13]研究表明, 持久的Notch通路活性将会较强烈地抑制内分泌细胞分化。

2.1.3 Notch通路上调抑制ESC分化为视网膜神经细胞 Thomas等^[14]研究发现, 通过抑制Notch通路可以促进ESCs向视网膜祖细胞分化, 从而促进视网膜祖细胞向视网膜神经细胞分化。

2.1.4 Notch通路促进ESC向平滑肌细胞分化 Kurpinski等^[15]通过ESC与OP9-DL1细胞直接共培养, 发现ESC细胞平滑肌标志物增加, 这种现象不仅出现在ESC早期分化过程中, 而且出现在部分分化的ESC甚至是血管前体细胞中。说明Notch通路上调可以促进ESC向平滑肌细胞分化, 具体机制尚未研究。

2.2 Notch通路与成体干细胞分化

成体干细胞属于专能性干细胞, 是存在于已分化组织中的未分化细胞, 能够自我更新并特化形成该类型组织, 如表皮干细胞、神经干细胞等。Notch通路在调控成体干细胞分化方面发挥重要作用。

2.2.1 表皮干细胞 Lowell等^[16]将高表达Deltal的角质细胞与野生型角质细胞共同培养使之融合成表皮膜片, 发现高水平表达Deltal的表皮干细胞, 对邻近细胞的Delta配体不敏感, 从而阻断了Notch信号的转导, 加强了干细胞簇的黏附, 从而保护了干细胞, 同时干细胞通过自身高水平Deltal激活周边细胞的Notch信号, 使之分化成短暂扩充细胞。这说明阻断Notch通路可以维持表皮干细胞的特性, 阻止其向表皮细胞分化。相反, 增强Notch通路则可促进分化。

2.2.2 神经干细胞 有学者在转基因小鼠中发现, 受巢蛋白基因调控而发生突变的*Notch-3*基因, 出现在中枢神经系统神经干细胞内。这种变异会造成神经管发育缺陷, 导致胚胎死亡, 并且具有中后脑部位神经组织膨出的类似无脑儿的表征^[17]。另外, 与其他系统的旁路抑制机制相同, Notch-1通路可抑制神经干细胞分化, 比如说抑制NSC向少突胶质细胞分化。然而, Prockop等^[18,19]通过hMSC和大鼠NSC共培养发现, hMSCs除了分泌可溶性蛋白如TGF- β 等促进NSC的分化外, Notch通路的激活(Notch受体、配

体Jagged-1以及转录因子Hes1均表达增加)可促进NSCs向胶质细胞分化。其他文献也有类似报道。

2.2.3 脂肪衍生干细胞 近来有实验证明^[18], 通过抑制Notch通路, 可促进小鼠脂肪衍生干细胞(mASCs)的早期分化及脂肪形成。其机制可能为通过抑制Notch-2-Hes-1通路, 从而增强了PPAR- γ 的表达, 降低了DLK-1/Pref-1的表达来实现的。

然而, Paul等^[20]却报道, Notch通路在ASCs分化成为施万细胞样细胞过程中不太可能起作用。

2.3 Notch通路与间质干细胞分化

2.3.1 骨髓间充质干细胞(bMSC)向肝细胞分化 Xu等^[21]采用HGF、FGF-4直接诱导和间接共培养两种方法研究Notch通路在MSC分化为肝细胞过程中的变化。研究发现, MSC均强烈表达Notch-1蛋白, 但随着MSC向肝细胞的分化, Notch-1蛋白的表达逐渐降低, *Notch-1* mRNA也表现降低, 与对照组相比有显著差异。同时, 在共培养培养液中加入Notch通路阻断剂DAPT后, 细胞分化率明显增加。这些都表明, Notch通路的激活可以抑制MSC向肝细胞分化。但是, Notch信号通路通过调节哪些转录因子或者基因来控制MSC向肝细胞分化, 目前尚不清楚。

2.3.2 MSC向平滑肌细胞分化 Kurpinski等^[13]采用了JAG-1包埋、过表达NICD及OP9-DL1细胞共培养三种方法增强Notch信号, 发现MSC中平滑肌标志物如MYH11、 α -SMA、MYOCD等均有所增强。说明Notch通路的激活可促进MSC向平滑肌细胞分化。Tang等^[22]也发现了同样的结果。进一步研究表明^[13], 内皮细胞JAG-1表达是血管平滑肌细胞发育过程中必需的, 故JAG1-Notch通路可能是平滑肌细胞分化的重要信号通路, 但具体机制尚不明确。最新文献报道^[23], 通过增强胞内TGF- β 信号, 采用基因微阵列(DNA microarray)的方法, 检测到平滑肌标志物基因及*JAG-1*基因表达增强。同时利用siRNA阻断*JAG-1*基因后, 发现TGF- β 诱导的平滑肌标志物基因增强明显减弱。从而说明TGF- β 通过JAG1-Notch通路调节MSC向平滑肌细胞分化。这可能是Notch通路调节平滑肌细胞分化的机制之一。

2.3.3 MSC向成骨细胞分化 以往的研究发现, Notch通路促进MSC向成骨细胞分化。最近试验发现^[24], 通过体内外过表达Rbpj蛋白可增强*Runx2*及*Ose2*基因表达, 从而促进MSC分化成为成骨细胞, 而Rbpj是Notch通路的主要核内调节子之一。然而

也有文献证明^[25], 由于Wnt信号通路在骨骼发育过程中起着重要作用, 而Notch通路的激活可抑制Wnt/ β -catenin通路, 从而抑制成骨细胞的分化。因此, Notch通路对MSC向成骨细胞分化的作用及机制仍需进一步研究。

2.3.4 Notch通路抑制MSC向软骨细胞分化 许多的实验数据说明, JAG1介导的Notch信号抑制ESC向软骨细胞分化, 从而保持“软骨前状态”。进一步研究证明, Notch通路的激活是启动软骨细胞分化的关键, 但在分化过程中该通道必须关闭, 以保证分化的正常进行^[26]。

另外, 有学者报道, Notch通路可抑制MSCs分化成为IPCs(insulin producing cells), 而抑制Notch通路则可促进IPCs的分化^[27]。

2.4 Notch通路与肿瘤干细胞分化

有实验证明^[28], Notch-1信号通路的关键蛋白分子Notch-1在脑胶质瘤组织中和细胞株中均有表达, 而正常成人脑组织中仅能检测到微弱的表达, 从而提示Notch-1的表达强弱可能参与了胶质瘤未分化状态的维持和分化的调控。

Dontu等^[29]也发现乳腺干细胞中4种Notch受体的表达均为分化细胞的2~4倍。还有研究证明, 乳腺癌患者的肿瘤组织中检测到Notch-1的表达, 而肿瘤周围正常组织均为阴性。

3 展望

除Notch通路外, 存在其他信号通路如Wnt、Shh(Sonic hedgehog)等, 也参与干细胞的自我更新与分化过程。它们并不是独立的, 而是通过相互协调作用共同调节干细胞的增殖和分化。此外, 一些生长因子也与Notch通路相互作用, 参与干细胞分化, 其中研究较多的是TGF- β (transforming growth factor- β)。Kyle等^[10]发现, 在干细胞分化成为平滑肌细胞过程中, TGF- β 与Notch通路协同作用, 从而促进干细胞的分化。Robinson等^[14]在研究人骨髓干细胞对大鼠神经干细胞分化的实验中, 也发现了TGF- β 与Notch信号的协同作用。因此, 进一步弄清Notch通路与其他信号通路、生长因子等的协同作用, 将会更加确定干细胞分化的影响因素, 从而为进一步的组织工程如干细胞修复, 肿瘤防治如肿瘤干细胞分化抑制等提供更加可靠的依据。

参考文献(References)

- 1 Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; 284(5415): 770-6.
- 2 Allman D, Aster JC, Pear WS. Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev* 2002; 187(1): 75-86.
- 3 Arias AM. New alleles of Notch draw a blueprint for multifunctionality. *Trends Genet* 2002; 18(4): 168-70.
- 4 Stockhausen MT, Kristoffersen K, Poulsen HS. The functional role of Notch signaling in human gliomas. *Neuro Oncol* 2010; 12(2): 199-211.
- 5 Fuwa TJ, Kazuya H, Takeshi S, Jenny H, Martin B, Kenji M. The first deltex null mutant indicates tissue-specific deltex-dependent Notch signaling in *Drosophila*. *Mol Genet Genomics* 2006; 275(3): 251-63.
- 6 Maekawa Y, Shin-ichi T, Shigeru C, Hisamaru H, Yuki H, Hiroko O, *et al.* Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4⁺ T cells. *Immunity* 2003; 19(4): 549-59.
- 7 Eagar TN, Tang Q, Wolfe M, He Y, Warren S, Jeffrey AB. Notch 1 signaling regulates peripheral T cell activation. *Immunity* 2004; 20(4): 407-15.
- 8 Thomas MD, Srivastava B, Allman D. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol* 2006; 239(2): 92-102.
- 9 Xiao Y. Expression of Notch-1 protein in induction of ESCs to nerve cells. *中国组织工程研究与临床康复* 2008; 12(25): 4967-70.
- 10 Lodovica Borghese DD. Inhibition of Notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G₁/S phase transition and accelerates neuronal differentiation *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cells* 2010; 28(5): 955-64.
- 11 Kobayashi T, Kageyama R. Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling. *Genes Cells* 2010; 15(7): 689-98.
- 12 Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, *et al.* Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 1999; 400(6747): 877-81.
- 13 Murtaugh LC, Stanger BZ, Kwan KM, Melton DA. Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(25): 14920-5.
- 14 Thomas A, Lamba D. Directing human embryonic stem cells to a retinal fate cellular programming and reprogramming. *Methods Mol Biol* 2010; 636: 139-53.
- 15 Kurpinski K, Lam H. Transforming growth factor- β and Notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells* 2010; 28(4): 734-42.
- 16 Lowell S, Jones P. Stimulation of human epidermal differentiation by Delta-Notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol* 2000; 10(9): 491-500.

- 17 Lardelli M, Williams R, Mitsiadis T, Lendahl U. Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development. *Mech Dev* 1996; 59(2): 177-90.
- 18 Huang Y, Yang X, Wu Y. c-Cretase inhibitor induces adipogenesis of adipose-derived stem cells by regulation of Notch and PPAR-c. *Cell Prolifer* 2010; 43(2): 147-56.
- 19 Robinson AP, Foraker JE, Ylostalo J, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow enhance glial differentiation of rat neural stem cells: a role for TGF β and Notch signaling. *Stem Cells Dev* 2010; doi:10.1089/scd.2009.0444.
- 20 Paul JK, Mantovani C. Notch independent signalling mediates Schwann cell-like differentiation of Adipose derived stem cells. *Neurosci Lett* 2009; 467(2): 164-8.
- 21 徐洪雨, 王瑞峰, 李宝杰. Notch-1蛋白在诱导骨髓间充质干细胞向肝细胞分化中的表达. *哈尔滨医科大学学报* 2009; 43(2): 122-5.
- 22 Tang Y. Notch and transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling pathways cooperatively regulate vascular smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 2010; 285(23): 17556-63.
- 23 Kurpinski K, Lam H, Chu J, Wang A, Kim A, Tsay E, *et al.* Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells* 2010; 28(4): 734-42.
- 24 Wang S, Kawashimab N, Sakamoto K, Katsubec K, Umezawad A, Suda H. Osteogenic differentiation of mouse mesenchymal progenitor cell, Kusa-A1 is promoted by mammalian transcriptional repressor Rbpj. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 400(1): 39-45.
- 25 Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Stadmeyer L. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia. *Endocrinology* 2008; 149(8): 3890-9.
- 26 Oldershaw RA, Hardingham TE. Notch signaling during chondrogenesis of human bone marrow stem cells. *Bone* 2010; 46(2): 286-93.
- 27 Hu YH, Wu DQ, Gao F, Li GD, Zhang XC. Notch signaling: a novel regulating differentiation mechanism of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells *in vitro*. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123(5): 606-14.
- 28 王春泳, 魏学忠, 薛洪利. 人脑胶质瘤干细胞增殖和分化过程中Notch-1信号通路的调控. *中国组织工程研究与临床康复* 2009; 13(10): 1853-8.
- 29 Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM, Wicha MS. Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res* 2004; 6(6): 605-15.

The Effect of Notch Signal Pathway on Stem Cell Differentiation

Ying-Wang, Hui-Cheng Xu*

(Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract The proliferation and differentiation of stem cells are regulated by a variety of signaling pathways (internal or external, and local or distance), and the communications between cells play an important role in this process. Notch pathway is just one of the important molecules which regulate cell differentiation via the communications between adjacent cells. Through great quantity of research, the important regulatory role of activating this pathway in the process of stem cell differentiation is confirmed. All progresses concerning this researching will be reviewed in the present paper.

Key words Notch signal pathway; stem cell; differentiation

Received: October 13, 2010 Accepted: November 15, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30772309)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68765902, E-mail: xhuicheng@yahoo.com.cn