Notch 信号及其对 T 细胞发育和分化的调节

顾 鹏 周光炎*

(上海交通大学医学院, 上海市免疫学研究所, 上海 200025)

摘要 哺乳动物 Notch 蛋白包括四种(Notch1~Notch4), 其配体分为两个家族: Jagged 家族(Jagged1, Jagged2)和 Delta 样家族(DLL1, DLL3, DLL4)。Notch 信号途径涉及一些蛋白质裂解过程, 随后反式作用因子 RBP-J 及协同激活因子 MAML 等参与, 最终导致靶基因的转录。在早期 T 细胞发育过程中起关键作用, 还调节外周 T 细胞的活化增殖以及诱导 Th 细胞亚群的分化。Notch 信号途径对转录因子 GATA-3 激活而诱导的 Th2 细胞分化非常重要。

关键词 Notch; Jagged 家族; Delta 样家族; T 细胞; GATA-3

Notch 受体最初是在果蝇体内发现的一种跨膜蛋白, 两个相应的跨膜配体称为 Serrate 和 Delta。哺乳类动物 Notch 受体由同一蛋白质前体在向细胞膜转运过程中经过不同的剪切、修饰形成。其配体也分属两个家族: Jagged 和 Delta。近年来, Notch 对淋巴细胞分化的影响引起了广泛的注意。尽管各实验室通过不同的实验系统对 Notch 信号途径进行研究得到的结果并不完全一致, 但可以肯定的是, Notch 信号途径参与了淋巴细胞的发育和对外周 T 细胞活化增殖的调节, 新近的研究发现与 Th 细胞的分化也有关。本文将重点介绍哺乳动物中 Notch 信号途径对 T 细胞发育、活化、增殖和 Th 细胞分化的调节。

1 Notch 及其配体的结构

哺乳动物 Notch 蛋白包括四种: Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4。该蛋白质为细胞表面的单次跨膜蛋白, 分为胞外部分与胞内部分。胞外部分由众多表皮生长因子(EGF)样重复序列和由 Lin12/Notch/Glp-1 组成的近膜重复序列(LNG)所组成。Notch 胞内部分包括近膜 RBP-J 相关分子(RAM)结构域、锚蛋白(ANK)结构域、羧基末端反式激活结构域(TAD), 以及脯氨酸-谷氨酸-丝氨酸-苏氨酸(PEST)富集结构域。其中, RAM 结构域介导胞质蛋白与核蛋白间的相互作用, ANK 结构域在蛋白质间相互作用中非常重要, TAD 在转录激活中起重要作用, PEST 富集结构域调节 Notch 的降解。另外, 在 ANK 结构域的两侧有核定位序列(NLS), 胞外和胞内相互作用区为异二聚体化结构域(heterodimerization domain)。而 Notch3 和 Notch4 则缺少 TAD (图 1)^[1]。

哺乳动物 Notch 蛋白的配体分为两个家族: Jagged 家族(Jagged1, Jagged2)和 Delta 样家族(DLL1, DLL3, DLL4)^[2]。它们都含有 EGF 样重复序列和一个保守的 Delta/Serrate/Lag (DSL)序列, Jagged1 和 Jagged2 还有一个保守的半胱氨酸富集域(CR)^[3]。

2 Notch 信号途径

Notch 合成后在内质网中由岩藻糖基转移酶 FUT1 催化发生岩藻糖基化, 从而有利于进入高尔基体^[4,5], 再在 S1 裂解部位被 furin 样蛋白酶裂解为异二聚体^[6,7], 然后发生糖基化^[8,9]。此异二聚体结合于胞膜, 其胞外部分与 Notch 配体结合从而启动 Notch 信号途径。Notch 与配体结合后在 S2 裂解部位被 ADAM 蛋白酶裂解^[10], 其胞内部分立刻发生泛素化而引起 Notch 内吞, 在 S3 裂解部位被 γ 分泌酶裂解形成 Notch 胞内结构域(NICD)再进入核内^[11]。当未形成 NICD 时, 结合于 DNA 上的反式作用因子 RBP-J (又称 CSL 或 CBF1)与共抑制蛋白(SMRT, HDACs, SHARP 等)结合, 抑制靶基因 *Hes* (hairy and enhancer of split)、*Hey* (Hes with YRPW motif) 和 *Deltex* 的转录^[12~14]。当 NICD 进入核内时便会和 RBP-J 结合, 使共抑制蛋白脱离, 但促进协同激活因子(coactivator)MAML1、p300、GCN5 等与 RBP-J 的结合, 从而有助于靶基因的转录^[15~17]。体外实验表明, NICD 的 RAM 结构域首先与 RBP-J 结合, 并由其 ANK 结构域进一步稳定

收稿日期: 2008-03-04 接受日期: 2008-05-13

国家自然科学基金重点项目(No.30530690)和上海市重点基础研究项目(No.05DZ19734)资助

* 通讯作者。Tel: 021-63846590-776207, Fax: 021-63846383, E-mail: my@shsmu.edu.cn

为进入胸腺的淋巴样祖细胞接受 Notch 信号调控而发育为 T 细胞, 留在骨髓中的淋巴样祖细胞由于未接受 Notch 信号调控而分化为 B 细胞。

Notch1 信号途径也涉及晚期 T 细胞的发育。Washburn 等^[20]提出的 T 细胞发育模型认为, 胸腺细胞在经历 pre-TCR 阶段时若接受 Notch1 信号则发育为 $\alpha\beta$ TCR⁺ 双阳性细胞, 未接受 Notch1 信号则发育为 $\gamma\delta$ TCR⁺ 细胞。

应用 Notch1C 转基因小鼠模型发现 CD8 单阳性 T 细胞比例增加 10 倍而 CD4 单阳性 T 细胞比例轻微下降, 可能是双阳性 T 细胞在与 MHC I 类分子作用时也接受 Notch 信号而分化为 CD8 单阳性 T 细胞, 而双阳性 T 细胞在与 MHC II 类分子作用时未接受 Notch 信号而分化为 CD4 单阳性 T 细胞^[21]。Fowlkes 等^[22]的研究也认为 Notch 活性有利于双阳性 T 细胞向 CD8 单阳性 T 细胞发育而抑制其向 CD4 单阳性 T 细胞发育。Deftos 等^[23]应用 Notch1C 转基因小鼠模型却发现 Notch 信号可以同时促进双阳性 T 细胞向 CD8 单阳性细胞和 CD4 单阳性 T 细胞的发育, 但此 CD8 单阳性细胞由于低水平表达 TCR 而被认为未完全成熟, 并且未出现于外周。然而, Izon 等^[24]用逆转录病毒系统表达 Notch1 活性成分, 可以阻止未成熟双阳性 T 细胞向成熟单阳性 T 细胞的分化, 认为 Notch1 通过抑制 TCR 信号而阻碍 T 细胞的成熟。

4 Notch 信号途径对外周 T 细胞活化增殖的调节

Notch 信号途径的激活可以使淋巴样前体细胞向 T 细胞谱系而不向 B 细胞谱系发育, 但对于促进还是抑制外周 T 细胞的活化增殖目前存在三种观点。

将表达 Notch1 胞内结构域的逆转录病毒载体转入初始 CD4⁺ T 细胞, 可以导致细胞表面 IL-2 受体表达增加, 增强对相关抗原和 IL-2 的敏感性, 通过 IL-2 和 IL-2 受体的正反馈环路促进 T 细胞的增殖。用 γ 分泌酶抑制剂 GSI 抑制 Notch 活性, 可使 IL-2 产生减少、IL-2 受体表达下降, 而导致初始 CD4⁺ T 细胞增殖受抑^[25]。通过 TCR 信号可以诱导 Notch1 和 Notch2 的表达, γ 分泌酶的抑制剂 IL-CHO 可以抑制外周 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的增殖^[26]。以上研究表明 Notch 信号促进外周 T 细胞的活化增殖。

第二种观点则与之相反, 认为 Notch 信号抑制 T 细胞的增殖。用表达 Jagged1 或者 Delta1 的 APC 刺激 T 细胞, 发现 T 细胞增殖显著受抑(分别下降 85.1%

和 82.1%)。若用 Notch 的激发性抗体包被于板上, 再加入初始 T 细胞, 也可检测到 T 细胞增殖受抑(为对照组的 35.6%), 但若加入可溶性抗 Notch 抗体, 与对照组相比则无差别。表明 T 细胞的抑制取决于 Notch 分子间的交联和信号转导。Notch 的抗体使产生 IL-2 的初始 T 细胞减少, CD25 及 CD69 表达也下降, 从而阻碍了初始 T 细胞的活化^[27]。

第三种观点认为 T 细胞增殖与 Notch 受体配体之间的对应关系及剂量有关。应用低浓度 Notch 配体 Delta1-Fc 融合蛋白并未影响 CD4⁺ T 细胞的增殖, 而在高浓度时抑制了 T 细胞的增殖。然而无论是低浓度还是高浓度的 Notch2-Fc 融合蛋白都不影响 CD4⁺ T 细胞的增殖^[28]。

5 Notch 信号途径调节 Th 细胞的分化

Th1 细胞表达转录因子 T-bet, 分泌 IFN- γ , 参与细胞免疫, 抵抗胞内微生物感染。Th2 细胞表达转录因子 GATA-3, 分泌 IL-4、IL-5 和 IL-13, 参与体液免疫, 抵抗胞外寄生虫感染。对于 Notch 信号途径诱导 Th1 细胞分化还是 Th2 细胞分化, 还是诱导两者分化, 目前存有争议。

IL-4 是引起 Th2 细胞分化的一个重要因素, 而 STAT6 又是 IL-4 受体信号途径中的一个关键转录因子, 然而在寄生虫感染的 STAT6^{-/-} 小鼠中能出现强烈的 Th2 反应^[29], 说明还存在其他非 IL-4 受体信号途径可以诱导 Th2 分化。调节 Th2 细胞分化的转录因子有 STAT6、NFAT、c-Maf 和 GATA-3 等^[30], 其中 GATA-3 是诱导 Th2 型应答最为关键的专一性因子^[31,32]。抗原递呈细胞(APC)可以表达 Notch 的配体从而影响 Th 细胞的分化。Amsen 等^[33]证明 APC 通过 Jagged 配体可诱导 Th2 细胞分化, 通过 Delta 配体可诱导 Th1 细胞分化。利用 STAT6 缺失小鼠的 T 细胞与表达 Jagged 的 APC 反应, 仍能产生分泌 IL-4、IL-5 和 IL-10 的 Th2 细胞, 说明 Jagged 引起的 Th2 细胞分化可以不依赖于 IL-4/STAT6。利用逆转录病毒系统将 Notch1 的活性成分转入 STAT6 缺失小鼠的 CD4⁺ T 细胞, 也可以引起 IL-4 的升高。然而 Notch1 缺失的 CD4⁺ T 细胞仍然可以向 Th2 细胞分化, 可能 Notch 家族的其他成员也可起到相同的作用。其中表达 Notch2 活性成分的 STAT6^{-/-} 小鼠可出现 CD4⁺ T 细胞 IL-4 的升高, 所以 Notch1 和 Notch2 都可以不经过 IL-4 受体信号途径而诱导 Th2 细胞分化。表达 Notch1 活性成分的 STAT6^{-/-} 小鼠 CD4⁺ T 细胞 GATA3 表达

增加, T-bet 表达下降, 所以 Amsen 等认为表达 Notch 的 T 细胞与表达 Jagged 的 APC 作用, 通过激活 GATA-3 而引起 Th2 细胞分化。RBP-J 是 Notch 信号途径中的一个重要因素, 曼氏血吸虫卵可以引起强烈的 Th2 反应, 但在 *Rbpj* 基因缺失的小鼠中, IL-4 以及 Th2 依赖型抗体 (IgG1 和 IgE) 分泌消失, 表明 Notch 信号途径在 Th2 反应中起重要作用。转染 Notch1 活性成分的 STAT6⁺ 小鼠 CD4⁺ T 细胞中, *Gata3* 基因的启动子区上游部分被激活, 驱动外显子 1a 发生转录, 但在 *Rbpj* 基因缺失的小鼠中不能出现 1a 转录, 因此认为, Notch 以 RBP-J 依赖的方式激活的是 *Gata3* 基因的上游启动子区, 而并没有影响全长的 *Gata3* 基因。应用 EMSA 证明 *Gata3* 基因的上游启动子区的 R^{G3P1a} 是 RBP-J 的结合部位^[34]。所以, Notch 信号途径中的 RBP-J 通过与 *Gata3* 基因启动子区的 R^{G3P1a} 结合, 激活 *Gata3* 基因而诱导 Th2 细胞分化。

Fang 等^[35]的研究也表明, 当 Notch 信号缺失时不但出现 *Gata3* 的表达缺陷, IL-4 的表达也受损, 提示 Notch 和 GATA-3 协同促进 IL-4 的表达。RBP-J 结合部位位于 *Gata3* 基因翻译起始位点上游 -10 kb 处, 距外显子 1a 200 bp, 接受刺激后该处组蛋白发生高度乙酰化, 使外显子 1a 转录而调控 *Gata3* 基因表达, 从而诱导 Th2 细胞分化。

Tu 等^[36]应用表达 DN MAML 蛋白的小鼠得出类似的结论。此蛋白质可以阻断由 MAML 引起的对协同激活因子的募集作用, 从而阻抑 Notch 信号。IL-4 产生不足可引起鞭虫感染 (Th2 细胞可抵抗鞭虫感染), 但可抵抗利什曼原虫的感染 (Th1 细胞可抵抗利什曼原虫感染), 表明 Notch 信号途径可通过 Th2 细胞的分化参与调控 Th1/Th2 相关的疾病。

然而, Minter 等^[37]在体内、体外试验利用 γ 分泌酶的抑制剂 GSI 抑制 Notch 活性后发现 IFN- γ 分泌受损, 说明抑制 Notch 信号途径也可阻断向 Th1 细胞的分化。

6 展望

Notch 信号途径非常复杂, 精确的机制还未阐明。近些年研究重点逐渐从 Notch 信号途径对胸腺

中 T 细胞发育的影响转移到 Notch 信号途径对外周 T 细胞活化增殖的调节和对 Th 细胞分化的调节上来。其中, Notch 信号途径、GATA-3 信号途径和 Th 细胞分化之间的关联又成为研究的新热点。这些研究在移植排斥、自身免疫性疾病等领域中具有潜在的应用价值。但各研究组得出的结论有差异, 因而实验系统的标准化, 对深入的 Notch 研究显得十分重要。

参考文献 (References)

- [1] Osborne BA et al. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 64
- [2] Maillard I et al. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 945
- [3] Baron M. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14: 113
- [4] Okajima T et al. *Cell*, 2002, 111: 893
- [5] Okajima T et al. *Science*, 2005, 307: 1599
- [6] Logeat F et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 8108
- [7] Brou C et al. *Mol Cell*, 2000, 5: 207
- [8] Panin VM et al. *Nature*, 1997, 387: 908
- [9] Moloney DJ et al. *Nature*, 2000, 406: 369
- [10] Lieber T et al. *Genes Dev*, 2002, 16: 209
- [11] Mumm JS et al. *Mol Cell*, 2000, 5: 197
- [12] Shi Y et al. *Genes Dev*, 2001, 15: 1140
- [13] Oswald F et al. *EMBO J*, 2002, 21: 5417
- [14] Hsieh JJ et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 23
- [15] Wallberg AE et al. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 7812
- [16] Kurooka H et al. *J Biol Chem*, 2000, 275: 17211
- [17] Artavanis-Tsakonas S et al. *Science*, 1999, 284: 770
- [18] Nam Y et al. *Cell*, 2006, 124: 973
- [19] Radtke F et al. *Immunity*, 1999, 10: 547
- [20] Washburn T et al. *Cell*, 1997, 88: 833
- [21] Robey E et al. *Cell*, 1996, 87: 483
- [22] Fowlkes BJ et al. *J Immunol*, 2002, 169: 1817
- [23] Deftos ML et al. *Immunity*, 2000, 13: 73
- [24] Izon DJ et al. *Immunity*, 2001, 14: 253
- [25] Adler SH et al. *J Immunol*, 2003, 171: 2896
- [26] Palaga T et al. *J Immunol*, 2003, 171: 3019
- [27] Eagar TN et al. *Immunity*, 2004, 20: 407
- [28] Maekawa Y et al. *Immunity*, 2003, 19: 549
- [29] Finkelman FD et al. *J Immunol*, 2000, 164: 2303
- [30] Murphy KM et al. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 933
- [31] Zheng W et al. *Cell*, 1997, 89: 587
- [32] Zhu J et al. *Nat Immunol*, 2004, 5: 1157
- [33] Amsen D et al. *Cell*, 2004, 117: 515
- [34] Amsen D et al. *Immunity*, 2007, 27: 89
- [35] Fang TC et al. *Immunity*, 2007, 27: 100
- [36] Tu L et al. *J Exp Med*, 2005, 202: 1037
- [37] Minter LM et al. *Nat Immunol*, 2005, 6: 680

Notch Signaling and Its Role in Regulation of T Cell Development and Differentiation

Peng Gu, Kuang-Yen Chou*

(Shanghai Institute of Immunology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

Abstract Mammalian Notch proteins (Notch1–Notch4) function as membrane receptors with two kinds of ligands: Jagged family (Jagged1, Jagged2) and Delta-like family (DLL1, DLL3, DLL4). Notch signaling is involved in processes of protein cleavage. The components of the signal pathway consist of some special *trans*-acting factors and co-activators such as mastermind-like 1 (MAML1), which result in transcription of target genes Hes, Hey and Deltex. Notch proteins play critical role not only in early development of T cell lineage, but also in activation and proliferation of peripheral T cells, as well as in differentiation of Th subsets. Notch signaling is especially crucial for Th2 differentiation via activation of transcription factor GATA-3.

Key words Notch; Jagged/Delta ligands; T cell; GATA-3

Received: March 4, 2008 Accepted: May 13, 2008

This work was supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (No.30530690) and the Shanghai Science and Technology Foundation (No.05DZ19734)

*Corresponding author. Tel: 86-21-63846590-776207, Fax: 86-21-63846383, E-mail: my@shsmu.edu.cn