

特约综述

Numb 与神经发育

钱文雨 李华顺*

(四川大学华西第二医院, 华西发育与干细胞生物学研究所, 生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

摘要 不对称性细胞分裂是一个母细胞通过一次分裂, 产生两个不同命运的子细胞的分裂方式, 是单细胞生物向多细胞生物进化的关键一步。根据现有的证据推论, 不对称性细胞分裂是在器官发育过程中产生细胞多样化的一种基本方式。Numb是第一个被发现决定多细胞生物不对称细胞分裂的信号蛋白。在果蝇中, Numb通过促进Notch泛素化拮抗Notch信号通路, 从而决定子细胞的命运, 后来的研究表明Numb是细胞内吞调节蛋白, 并用通过内吞参与调节神经细胞的粘附, 轴突的生长及细胞迁移等过程; 并且发现Numb与肿瘤抑制基因p53、泛素化蛋白HDM2形成三聚体抑制p53的泛素化, 从而调节肿瘤的恶性程度。本文系统地分析了Numb发现的历史及后来在脊椎动物中的作用和机制, 重点介绍了Numb在神经发育过程中的功能。

关键词 Numb; 不对称性细胞分裂; 神经发育; Notch; 内吞

细胞多样性可以通过对称性细胞分裂和不对称性细胞分裂(asymmetric cell division, ACD)实现。通过对称性分裂产生的两个子细胞, 由于所接触外界环境的不同, 从而具备不同的命运; 通过不对称性细胞分裂, 由于其内在命运决定因子在两个子细胞中的不对称分配, 成为具有不同命运的子细胞。根据现有证据推论, 不对称细胞分裂是许多器官发生过程中产生细胞多样性的基本方式。Numb是第一个被发现的在多细胞生物中起决定作用的不对称性分裂的决定基因, 此后开启了Numb引导的多细胞生物的不对称细胞分裂的工作。本文系统综述Numb的发现过程以及Numb后来在脊椎动物中的作用和机制。

1 Numb简介

1.1 在果蝇中发现Numb——从果蝇讲起

果蝇外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)由一些感受器组成, 这些感受器通过外周神经元向中枢神经系统(central nervous system, CNS)传递感觉信息。其中一种感受器, 外部感受器(external sensory organ), 即果蝇的感觉刚毛, 主要由四个细胞组成: 神经元、鞘细胞(它形成最内层环绕神经元树突的鞘)、毛细胞和窝细胞(这两个细胞被称为外部支持细胞), 它们来源于同一个感觉器官前体细胞(sensory organ progenitor, SOP)(图1)。

1989年, Uemura等^[1]在果蝇中筛选影响神经发

育的基因时, 发现当某个基因发生突变时, 组成感觉刚毛的神经元减少, 而外部支持细胞反而增加, 暗示着这个基因, 在神经元和支持细胞这两种类型的细胞命运选择过程中起着重要作用, 这个基因就是*d-Numb* (*d*指来源于果蝇)。

接着, Rhyu等^[2]进一步的研究则表明, 在SOP细胞有丝分裂前, *d-Numb*蛋白呈新月状分布于SOP的一侧, 然后随着有丝分裂的完成, 大部分*d-Numb*只进入了两个子细胞中的一个, 从而确定其命运。揭示了*d-Numb*在SOP不对称分裂过程中所扮演的内在命运决定因子的角色。

后来, 在果蝇中枢神经系统的MP2^[3]和成神经细胞(neuroblast, NB)^[2]的不对称分裂过程中, 发现*d-Numb*发挥着相同的内在命运决定因子的功能。说明*d-Numb*通过参与不对称细胞分裂, 在整个果蝇神经系统发育过程中都发挥着重要作用。

1.2 脊椎动物中的Numb

脊椎动物中的Numb则变得相对复杂一些。这是因为: 第一, *d-Numb*在脊椎动物中有两个同源基因, *Numb*和*Numlike*; 第二, 脊椎动物Numb有四个选择性剪切产物: p65、p66、p71及p72。

国家自然科学基金(No.30771102), 国家重点基础研究发展计划(973计划)(No.2007CB947202, No.2009CB941402)资助项目

* 通讯作者。Tel: 028-85503065; Fax: 028-85503072; E-mail: huashunli2@gmail.com

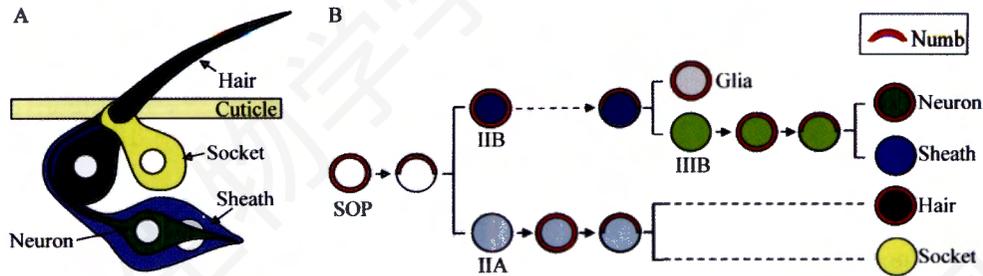


Fig.1 Diagrams of *Drosophila* external sensory organs and SOP cell lineages

A: Schematic drawing of a simple external sensory organ (modified from reference ^[2]); B: Schematic diagram of the SOP cell lineage (Numb is shown in red; modified from reference ^[4]).

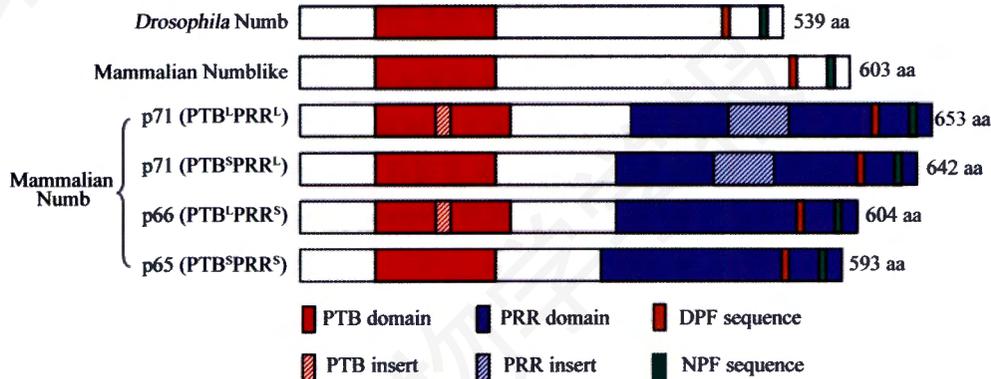


Fig.2 Structures of Numb and Numbl like

Zhong 等先后于1996和1997年在小鼠脑中分离出了 *d-Numb* 的同源基因 *Numb* ^[5]和 *Numbl like* ^[6]。Numb 和 Numbl like 都可以挽救 *d-Numb* 突变果蝇的表型, 说明了 *Numb* 基因的功能在进化上的保守性。

Numb 蛋白在小鼠各组织器官中的表达相当广泛, 小鼠 E9.5 的胚胎中, 可以在包括 CNS 和 PNS 在内的大部分组织结构中检测到 m-Numb 的表达, 这表明了 Numb 功能的广泛性^[5,6]。

Numb 蛋白含有 593 aa, 其前 292 aa 与 *d-Numb* 蛋白含有高达 63.3% 的同源性; 在包含重要的 PTB 结构域 N 端部分, Numbl like 与 *d-Numb* 和 m-Numb 分别有 76% 和 63.7% 的同源性。而 Numbl like 的 C 端序列与 Numb 也有 46.7% 的同源性^[6] (图 2)。

1999 年, 两个研究小组分别在小鼠^[7]和人类细胞^[8]中鉴定出 *Numb* 的四种亚型蛋白, 即同一个 Numb 基因, 在转录后, 经选择性剪切, 可产生四种蛋白产物, 根据分子量的大小, 分别命名为 p65、p66、p71 及 p72, 是否在磷酸酪氨酸结合(phosphotyrosine binding, PTB)结构域及脯氨酸富集区域(proline rich region, PRR)内有插入片段是产生这四种蛋白亚型的原因

(图 2)。

另外, 各物种中的 Numb 蛋白在结构上均含有如下结构域: N 端的 PTB 结构域, C 端的 PRR 结构域, C 端的 DPF 和 NPF 基序。这种结构使得 Numb 成为了一个衔接蛋白或框架蛋白, 可以将几个蛋白联接在一起形成一个多聚复合物(图 2)。

2 Numb在神经发育中的功能

2.1 在果蝇中, Numb 通过参与细胞不对称分裂调控神经发育。

果蝇外周神经系统的感觉刚毛是由四个不同的细胞组成的(图 1), 在发育过程中, SOP 通过一种固定的分裂模式来产生这四个组成细胞, 这四个细胞不仅生成时间有先后, 而且在空间上也有固定的排列方式, 可以很容易的通过形态学或简单的免疫组化方法进行区分, 这使果蝇 SOP 细胞谱系成为研究 ACD 的绝佳模型。SOP 细胞谱系具体的分裂发育过程是: 首先, SOP 分裂产生两个二级前体细胞, IIA 和 IIB; 然后, IIA 细胞分裂产生两个位于表皮面的外部支持细胞, 毛细胞和窝细胞, IIB 细胞分裂产生一个三级

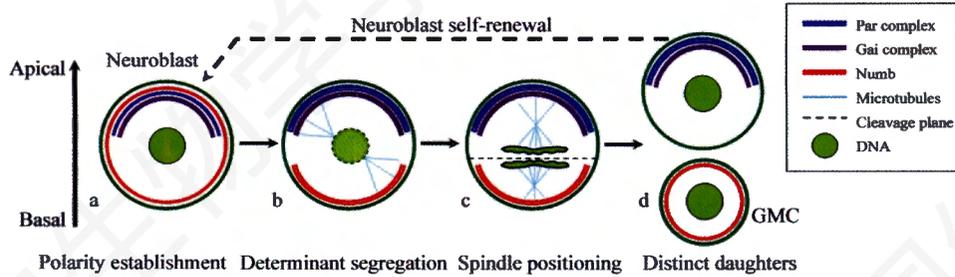


Fig.3 Asymmetric cell division (ACD) of *Drosophila* neuroblast

Three principal steps required for ACD of *Drosophila* neuroblast (NB). a: Polarity establishment. In *Drosophila* embryos, Par complexes (blue) localize apically in the neurogenic ectoderm, causing apical-basal polarity. This apical localization is maintained and recruits Gai complexes (purple) to the apical cortex during NB delamination. Thus, the NB polarity is established. b: Determinant segregation. Through a complex mechanism, Par complexes phosphorylate and release Numb (red) from apical side, thus, only the opposite side, the basal side, Numb is retained, causing its asymmetric segregation. c: Spindle positioning. The Gai complexes direct spindle orientation to keep the spindle axis coordinated to the polarity axis, causing cleavage plane (dashed line) perpendicular to the polarity axis, which ensures the cleavage plane segregate Numb only to the NB's basal half. d: Distinct daughters. At last, cytokinesis happens, segregating Numb only to the small basal daughter cell, which will develop to GMC. The big apical daughter cell will develop to a new NB.

前体细胞 IIIIB 和一个胶质细胞(胶质细胞后来或随着神经元的延伸迁移离开, 或死亡); IIIIB 细胞最后分裂产生位于表皮下的神经元和鞘细胞(图 1)。

在 *d-Numb* 基因发现后不久, Rhyu 等^[2]观察到, 在正在进行有丝分裂的 SOP 细胞中, *d-Numb* 蛋白呈月牙状不对称的分布于细胞膜的一侧。然后, 随着有丝分裂的结束, 大部分的 *d-Numb* 被分隔进入了一个子细胞, 这个子细胞将发育为 IIB 细胞; 而不含有 *d-Numb* 的子细胞, 将发育为 IIA 细胞。如果 *d-Numb* 缺失, SOP 分裂将会产生两个 IIA 细胞, 从而分裂产生四个外部支持细胞, 而神经元则缺失; 反之, 过表达 *d-Numb*, 将会产生两个 IIB 细胞, 从而将产生多余的神经元^[2]。在这里, *d-Numb* 似乎成了 IIB 细胞的命运决定因子。后来发现, 实际上, 在由 SOP 细胞分裂发育为感觉刚毛所经历的三轮、四次不对称分裂, *d-Numb* 在每一次不对称分裂的过程中, 都被不对称的分配进了两个子细胞中的一个, 从而扮演着不同细胞命运的内在命运决定因子的角色: 第一轮分裂, 含有 *d-Numb* 的子细胞将发育为 IIB 细胞; 第二轮分裂, 对于 IIA 的两个子细胞, 含有 *d-Numb*(新合成的)子细胞将发育为毛细胞, 对于 IIB 细胞的的两个子细胞, 含有 *d-Numb* 的子细胞将发育为胶质细胞; 第三轮分裂时, 含有 IIIIB 细胞内新合成的 *d-Numb* 的子细胞将会发育为神经元^[1,2]。这表明, Numb 并非是某一种特殊细胞命运的决定因子, 而是在细胞内外发育信息的共同影响下发挥功能的(图 1)。

在果蝇中枢神经系统中, 最简单的细胞谱系是

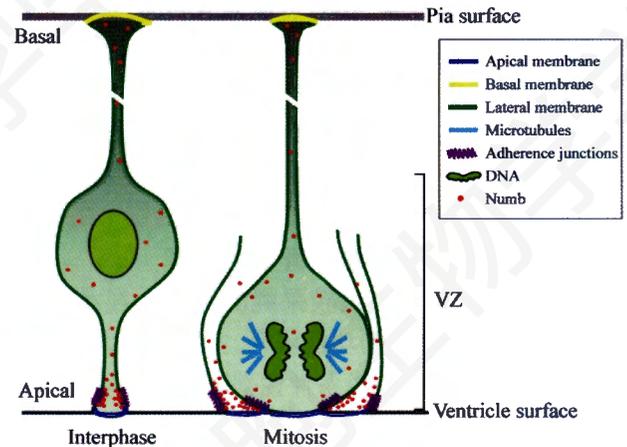


Fig.4 Schematic drawing of interphase and mitotic RGCs (Modified from reference^[9] and reference^[10])

Radial glial cells (RGCs) are radially oriented and highly polarized, extending a short apical process that forms an end-foot attached to the ventricular zone (VZ) surface, and a longer basal (radial) process that forms an end-foot attached to the pia surface. RGCs have clearly identifiable apical (blue), lateral (green) and basal (yellow) cell membrane domains. The apical end-feet anchor adjacent RGCs to each other via adherens junctions, which locate near the apical side. Numb (red) localizes along the basolateral cytoplasm and is especially enriched near the adherence junction of apical endfeet of interphase RGC. In mitotic RGCs, Numb is present in the basolateral cytoplasm, but not at the apical membrane.

MP2 细胞系。MP2 前体细胞通过一次不对称细胞分裂, 产生 dMP2 和 vMP2 两个不同的神经元。在这一分裂过程中, *d-Numb* 作为内在命运决定因子, 被不对称的分配到两个子细胞中的一个, 决定了这个子细

胞将发育为 dMP2, 从而使两个细胞的命运的得到区分, 过表达 d-Numb 将使两个子细胞都变成 dMP2, 而反之, d-Numb 的缺失将导致两个 vMP2 的产生^[3]。

另外, 在果蝇 CNS 中, d-Numb 在成神经细胞 (neuroblast, NB) 的不对称分裂过程中发挥着相同作用。NB 是经离层过程从神经上皮分离出来的, 它的分裂也是不对称的, 产生形态上一大一小的子细胞, Numb 被选择性的分配到小的子细胞中。最终, 小的子细胞将发育成神经节母细胞 (ganglia mother cell, GMC), 大的子细胞则会发育为一个新的 NB (图 3)。在这里, 需要注意, 与前述 SOP 及 MP2 细胞系不同的是: NB 通过不对称细胞分裂, 在产生一个新的、与自己命运不同的子细胞的同时, 还产生了一个与自己命运相同的子细胞, 即在产生新的细胞种类同时, 同时维持了自我细胞种类命运的延续 (图 3)。不论是在果蝇, 还是在脊椎动物的神经发育过程中, 这种类型的不对称细胞分裂, 都有着极为重要的意义, 它使神经前体细胞在产生细胞多样性的同时, 能够维持自我更新, 从而也能使自身数目得到保持。这实际上也是一种平衡, 是神经前体细胞保持自我更新和分化之间的平衡, 这一平衡的打破将会导致神经发育的紊乱, 诱发肿瘤的产生。

2.2 Numb 在鼠神经发育中的功能

小鼠的神经系统远较果蝇的复杂。在小鼠中, Numb 在神经发育中的功能研究, 主要是以大脑新皮质 (neocortex) 为对象, 以条件性基因敲除小鼠为工具进行的。

在这里有必要先简单介绍一下新皮质的发育过程。新皮质负责感知和认知功能, 是小鼠 CNS 中结构最复杂的区域。它主要由胚胎前脑背侧壁发育而来, 包含不同的六层, 与皮质面大致平行。皮质神经元主要是在胚胎 E10~E17 期间, 由位于神经上皮内侧的神经前体细胞通过连续分裂产生的。神经前体细胞构成两个增殖区, VZ (ventricular zone, VZ) 区和 SVZ (subventricular zone, SVZ) 区。VZ 区在整个胚胎神经发育阶段一直存在, SVZ 则在胚胎神经发育的后期出现, 位于 VZ 区上方。在分裂周期中, VZ 前体细胞在细胞核向上移至 VZ 区外侧发生 DNA 复制, 然后, 在 G₂ 期, 细胞核向下转移至靠近脑室表面内侧 (顶侧) 区时, 进行有丝分裂。新生成的神经元离开 VZ, 向皮层迁移出去, 最终定位在较深的层面, 而后生成的则定位在较浅的层面。VZ 的神经前体细胞中, 主要的一类是放射状胶质细胞 (radial glia cell, RGC)。RGC 呈放射状排列在皮层中, 两端分别伸出

细的突起与正在发育中的软脑膜表面和脑室腔表面接触, 分别被称为底部终足 (endfeet) 和顶端终足。相邻 RGC 的顶端终足在最靠近 LV 处相互间形成粘附连接, 表现出明显的顶底极性 (图 4)。

2.2.1 Numb 是大脑皮层神经发生所必需的 d-Numb 基因在小鼠中有两个同源物, 分别是 Numb 和 Numblake。在发育中的新皮质, Numb 蛋白在从 VZ 区到 CP (cortical plate) 的各层都有表达; 而 Numblake 蛋白则主要表达在 CP 层^[6]。

利用传统的敲除方式, 全身敲除 Numb, 将导致小鼠在约 E11.5 死亡。在 E10.5, 当正常小鼠还处于皮层神经发生初期, 仅有极少数的神经元在前脑生成时, 敲除小鼠前脑区域就已经出现了大量早熟的神经元; 另外, 敲除小鼠还出现神经管不能正常闭合, 全身严重出血的症状^[11,12]。相比而言, Numblake 的全身敲除, 除了成年母鼠生育率较低外, 没有其它明显的表型。但是, 如果同时敲除 Numb 与 Numblake, 小鼠会在 E9.5 死亡, 并且与 Numb 单敲除相比, 表现出更广泛的发育缺陷, 表明 Numb 与 Numblake 在功能上有一定的重叠性^[13]。因此后期对 Numb 功能的体内研究, 都是在 Numblake^{-/-} 遗传背景中进行的, 在后文中, 这一点将不再一一赘述。

全身敲除方式因其固有的缺点, 使人难以判断发育初期前脑区大量出现的早熟神经元是因为 Numb 在 CNS 中固有功能的缺失引起的, 还是由于神经管无法闭合或是其它发育缺陷造成的。后来, 条件性敲除的 Cre-loxP 系统的引进, 使得研究者能够选择性的敲除特定脑区, 特定细胞类型中的 Numb 基因, 从而向前大大推进了 Numb 在 CNS 发育中的功能研究。

2.2.2 Numb 和 Numblake 对于维持神经前体细胞的命运是必需的 首先是 Zhong 等^[10]的研究小组运用 nestin-Cre 选择性在神经前体细胞中敲除 Numb, nestin-Cre 在 E8.5 时在大多数神经前体细胞中表达, 到 E12.5 时, 在几乎所有神经前体细胞中全面表达。在 Numblake^{-/-} 背景下, 用 nestin-Cre 敲除 Numb 的条件性敲除 (conditional knock out, cKO) 小鼠没有出现神经管闭合和血管发育缺陷, 能够存活和生育, 从外表上与野生型的同胞没有明显的区别。但是, 组织切片显示, 在 E10.5 时, cKO 小鼠在前脑、中脑、后脑和脊椎等区域, 都出现早熟的神经分化和凋亡, 及由此引起的神经管细化, 和增殖细胞消耗殆尽的现象。这表明, 在神经发生的早期, 几乎所有 CNS 发育的区域, Numb 和 Numblake 可能对于维持神经前体细胞命运都是必须的^[13]。但是, 在发育前期敲

除 *Numb* 的表型,可能不仅是由神经系统缺陷所致,也有可能是由于胎盘发育障碍所致。于是,为了确定 *Numb* 和 *Numblake* 是否在神经发育的中后期也具备同样的功能,该研究小组又选择了 *D6-Cre*, *D6-Cre* 从 E10.5 开始,在背侧前脑区域神经前体细胞表达,这样就可以绕过早期的神经发生阶段,观察 *Numb* 在神经发生中后期的神经前体细胞中的功能。*D6-Cre* cKO 小鼠的早期神经前体细胞发育与野生型没有区别,而中后期神经前体细胞则明显缺失了,表明 *Numb* 和 *Numblake* 在胚胎神经发育的中后期,对于神经前体细胞命运的维持也是必须的^[14]。

2.2.3 *Numb* 和 *Numblake* 对于维持神经上皮结构的完整性是必需的 在 Zhong 等发表他们结果的同时,我们和 Rasin 等先后在 *Emx1-IRESCre* 敲除小鼠中的工作发现了一些与 Zhong 等结果不太一致的现象,并由此揭示了 *Numb* 和 *Numblake* 在神经发育过程中的一个新的重要功能:参与粘附连接,维持神经上皮结构的完整性^[9]。

Emx1-IRESCre 从 E9.5 开始在胚胎背侧前脑神经前体细胞中表达,到 E12.5 时达到完全表达,所以可以研究神经发生中后期的神经前体细胞中 *Numb* 和 *Numblake* 的功能。我们发现,从 E10.5 开始, cKO 小鼠背侧前脑区的神经上皮出现严重的内陷和波折,部分神经上皮内陷进入皮层内部,形成一些玫瑰花结样的结构,分层结构被打乱。另外,值得注意的一个表型是:神经前体细胞过量增殖,这与 Zhong 等的神经前体细胞显著减少的结果相反。

为什么相似的敲除方式(Zhong 等所用的 *D6-Cre* 也是表达在神经发生中后期背侧前脑区的神经前体细胞),却得出似乎矛盾的结果呢?后来 Rasin 和我们利用 *Emx1-IRESCre* 敲除小鼠,并运用免疫电镜技术回答了这个问题。原来, *Numb* 和 *Numblake* 对于 RGC 之间的粘附连接(adherens junctions)也是必需的。免疫电镜结果显示, *Numb* 蛋白在 RGC 的顶端终足处聚集,定位在与粘附连接相连的囊泡上,并与钙粘素相互作用(图 4),因此确立了 RGC 结构上的极性。RGC 的极性和相互间的粘附连接对于大脑皮层的形态发育是至关重要的。当 *Numb* 和 *Numblake* 被敲除后,钙粘素无法正确的插入到基底外侧膜上,从而破坏粘附连接,进而影响 RGC 的极性,由此导致了 RGC 彼此散开,神经上皮破损,部分内陷进入皮层内部,形成玫瑰花结样的结构,从而破坏正常的分层结构。在 *Emx1-IRESCre* 敲除小鼠中的神经前体细胞的过量增殖,可能正是由于神经上皮结构的完整性被破坏所引

发的后果,但是,其中许多具体问题还是不清楚的,还有待进一步的工作进行阐明。

2.2.4 *Numb* 对于(感觉)神经的形态发育是必需的

为了研究 *Numb* 和 *Numblake* 在小鼠感觉神经发生中的功能, Huang 等^[15]和我们利用 *wnt1-cre* 在感觉神经节中敲除 *Numb*。结果发现感觉神经的神经发生并未受到影响,而感觉神经节输入纤维的轴突分支则出现显著减少的现象。用携带有 Cre 重组酶的单纯性疱疹病毒(herpes simplex virus),在体外培养的感觉神经元中敲除 *Numb*,发现也会导致轴突分支减少,总轴突长度变短。反之, *Numb* 的过表达则会得到相反的结果。同时还发现, *Numb* 的敲除将导致内吞囊泡明显减少, Notch1 在核内增加; *Numb* 过表达则导致 Notch1 在具有晚期内吞体/早期溶酶体特征的囊泡中聚集,而同时核内的 Notch1 减少。这表明,在感觉神经中, *Numb* 和 *Numblake* 有可能通过内吞体-溶酶体途径,控制 Notch1 是进入早期内吞体还是晚期内吞体,来实现对 Notch1 的精细调控,并由此影响感觉神经元轴突^[15]。

2.2.5 *Numb* 和 *Numblake* 对于出生后小鼠 SVZ 区神经生成微境(neurogenic niche)的修复和重塑能力是必需的 以上主要讲的是 *Numb* 和 *Numblake* 在小鼠胚胎神经发育过程中的功能。其实, *Numb* 和 *Numblake* 在出生后小鼠的大脑神经发育过程中也发挥着重要作用。

在胚胎神经发育期, RGC 形成与 CNS 脑室相邻的神经上皮层。出生后不久,这个神经上皮层将转变为位于侧脑室(lateral ventricle, LV)和 SVZ 区的神经干细胞 niche^[16]。具体来讲,出生后,一部分 RGC 转化为室管膜细胞,排列在侧脑室边缘,形成室管膜壁(ependymal wall)^[17];其它的 RGC 则转化为位于 SVZ 的 B 型细胞,这些 B 型细胞具有星形胶质细胞的结构特点,是出生后主要的生成新神经元的神经前体细胞^[18]。

为了研究 *Numb* 和 *Numblake* 是否在出生后的 SVZ 发挥功能, Kuo 等^[19]利用 tamoxifen 诱导的 *nestin-creER^m* 系统,敲除出生后的小鼠 SVZ 区的 *Numb* 和 *Numblake*。发现,在 P0 时注射 tamoxifen 诱导敲除后,将在 P7 和 P14 时看到明显的 LV 扩大现象,仔细观察后发现,这是由室管膜壁的结构被破坏造成的。免疫荧光结果显示,排列在室管膜壁上的室管膜细胞相互间的粘附连接被破坏,介导粘附连接的 E-cadherin 缺失。进一步体内的免疫共沉淀结果证明, *Numb* 蛋白与 E-cadherin 相互作用。这些结果表明,在出生后的大

脑内, *Numb* 和 *Numblake* 通过与 *E-cadherin* 相互作用, 介导室管膜细胞之间的粘附连接, 维持室管膜壁的结构完整性。但是, 值得注意的是, 上调 *Notch* 信号, 并不能得到相同的结果, 说明 *Numb* 和 *Numblake* 介导的这一过程是不依赖于 *Notch* 信号通路的。

但是故事并非到此为止, 在约6周后再次观察敲除小鼠的大脑时, 使人惊奇的是, LV的空洞竟然明显缩小了, 室管膜壁也已被修复。为何会出现这种修复呢? 后来, Kuo 等通过精细的实验证明, 这是由于 *tamoxifen* 的诱导敲除不彻底, 有一小部分 SVZ 细胞的 *Numb* 和 *Numblake* 基因未被敲除, 正是这些未被敲除的 SVZ 细胞参与了 LV 及室管膜壁膜破损结构的修复。如果在出生后, 多次注射 *tamoxifen* 进行反复敲除, 则不能出现这种修复结果。这表明, 出生后大脑的 SVZ 神经生成 niche, 在大脑出现损伤后, 具有修复和重塑能力, 而 *Numb* 和 *Numblake* 则是这一修复重塑过程所必需的。除此之外, kuo 等的结果还表明, *Numb* 和 *Numblake* 对于 SVZ 的成神经细胞的存活也是必需的^[19]。

3 *Numb*, 细胞极性 & 不对称性细胞分裂

细胞极性的建立是 ACD 的基础, 在已建立的极性线索下, 细胞命运决定因子才能在细胞的一极恰当的定位。细胞极性的建立和维持是由进化上保守的极性复合物 *Par* 蛋白复合物(*Par3/Par6/aPKC*) 在细胞内的极性分布实现的。纺锤体轴的定位则与 *Inscuteable(Insc)* 和同样进化上保守蛋白复合物(*G α i/Pins/Mud*) 有关, *Insc* 能同时和 *Par3* 及 *Pins* 结合, 从而能将 *Par* 蛋白复合物和 *G* 蛋白复合物联接在一起, 使细胞极性与纺锤体极性得到相互协调。在果蝇中, *Numb* 扮演着命运决定因子的角色, 但在脊椎动物, 它的具体角色还不太明确^[4,20,21]。

3.1 在果蝇中

在果蝇中, ACD 必须经历三个步骤: 1. 建立细胞极性, 使细胞两侧产生差异; 2. 将细胞命运决定因子定位于细胞的一侧; 3. 有丝分裂时, 使纺锤体轴平行于细胞极性轴, 从而使细胞命运决定因子只分配到两个子细胞中的一个(图 3)。前面已经提过, 在果蝇中枢神经系统中, NB 是经离层过程从神经上皮分离出来的。事实上, 在 NB 从神经上皮分离出来之前, 神经上皮细胞本身就具备了细胞极性。在果蝇的胚胎发生过程中, *Par* 蛋白复合物通过定位于神经上皮细胞的顶端, 使神经上皮细胞具备了顶底极性, 后来 NB 分离出来后, 继承了这一顶底极性(图 3)^[20]。

在果蝇中, 细胞命运决定因子共有 3 个, 除了 *Numb* 蛋白之外, 还有 *Prospero* 和 *Brat*^[20], 这里只讨论 *Numb*, 后两者不做叙述。进入有丝分裂期后, 在细胞周期蛋白 *Aurora-A* 的激活下, 位于 NB 顶端皮层的 *Par* 蛋白复合物启动一系列磷酸化级联反应, 使位于同侧皮层的 *Numb* 释放到胞质中, 而对侧的, 即底端的 *Numb* 未受影响, 从而最终呈现出 *Numb* 在底端皮层的分布^[22] (详细内容请看 *Numb* 与细胞周期一节)。

为了确保 *Numb* 的不对称分配, 还需要有丝分裂的纺锤体轴与极性轴相一致, 这一点在 NB 中是通过 *Insc* 来实现的。通过与 *Par3* 结合, *Insc* 得以定位于细胞顶端, 由于 *Insc* 还能与 *Pins* 结合, 所以又将 *Pins* 招募到顶端。接着, 通过与 *Pins* 结合, *G α i* 与 *Mud* 又被招募至细胞顶端皮层, *Mud* 是一个微管和动力蛋白结合蛋白。虽然具体分子机制还不清楚, 但 *Mud* 在 NB 顶端的聚集, 很有可能为星状微管提供了一个对接位点, 将纺锤体的一极吸引过来, 从而使纺锤体轴能够正确的定向^[20]。到有丝分裂末期时, 细胞分裂面将 *Numb* 不对称的分隔到底端的子细胞中去, 这个子细胞将发育成一个新的 NB, 而顶端子细胞则发育成 GMC (图 3)。

与 NB 具有的顶底极性不同, 果蝇外周神经系统的 SOP 细胞的极性轴与前后(头尾)体轴平行, 是一种平面极性。这种极性, 是在 *Wnt* 受体 *Frizzled* 提供的平面极性信号线索引导下, 将 *G* 蛋白复合物(*G α i/Pins/Dlg*) 定位在细胞前侧皮层形成的^[23]。与 NB 的两个蛋白复合物位于同侧不同的是, *G* 蛋白复合物(*G α i/Pins/Dlg*) 在前侧皮层的定位使得 *Par* 蛋白复合物(*Par3/Par6/aPKC*) 定位在其对侧, 即后侧皮层^[4]。随后, *Par* 蛋白复合物又通过与 NB 中相同的机制, 清除了同侧皮层的 *Numb*, 而使对侧皮层, 即前侧皮层的 *Numb* 得以保留, 最终使 *Numb* 不对称的分布在 SOP 前侧皮层^[22]。

比较 NB 与 SOP 细胞的不对称分裂过程, 可以发现, 虽然各关键步骤使用的蛋白元件都是相同的, 但不同前体细胞的使用方式却不一定相同。而对于 *Numb* 来讲, 始终扮演的是命运决定因子的角色, 这一点是不变的。

3.2 在小鼠中

由于哺乳动物神经系统发育的高度复杂性, 在小鼠中, 细胞极性与不对称性细胞分裂之间的关系, 及 *Numb* 在其中发挥的作用, 远比果蝇中复杂的多, 许多问题都模糊不清。

如前所述, 在小鼠胚胎 CNS 发育过程中, VZ 区最主要的一类神经前体细胞是 RGC, 它具有明显的顶底极性, 而且能通过不对称分裂保持自我更新, 同时生成各种神经元(图 4)。

首先是 RGC 细胞极性建立的问题。相邻的 RGC 顶端终足在最靠近 LV 处相互间形成粘附连接, 这是它最主要的极性结构特点, 另外, 顶端终足和底端终足之间的结构差异, 以及面向 LV 的顶端细胞膜 (Apical membrane) 区域与其它区域细胞膜结构组分的差异, 是另外两个可能的极性线索(图 4)。与果蝇中相同, Par 蛋白复合物也是定位在 RGC 的顶端区域, 不过, 与果蝇中不同的是, Par 蛋白复合物集中于粘附连接处^[20]。

接下来是纺锤体的方向与不对称性的关系。同样与果蝇中相似的是, Insc 和 G 蛋白复合物的参与纺锤体的定向。但充满争议的是纺锤体轴的方向, 或分裂面的方向与 ACD 之间的关系。在鼠中, 分裂面垂直于 VZ 平面的分裂称为垂直分裂, 分裂面平行于 VZ 平面的分裂则称之为水平分裂。Chenn 等^[24]早期在雪貂脑皮层中的结果显示, 水平分裂倾向于成为不对称分裂, 而垂直分裂则倾向于成为对称分裂。因此, 当时提出的假说认为, 与果蝇相似, 在 RGC 存在的顶底极性前提下, 纺锤体轴的定向决定了它的不对称性: 纺锤体轴平行于极性轴, 即水平分裂, 使顶侧或底侧膜不对称的分隔到两个子细胞中去, 将导致 ACD; 纺锤体轴垂直于极性轴, 即垂直分裂, 使顶侧或底侧膜对称的分隔到两个子细胞中去, 将导致对称分裂。但是后来 Stricker 等^[25]发现, 实际上, 在神经发生的所有阶段, 垂直分裂都是主要的分裂形式, 而平行分裂只占很少一部分, 这与事实上高比例的不对称分裂并不一致。最近, Konno 等^[26]的活细胞成像结果也证明了这一点, 他们发现 90% 以上的分裂都是垂直分裂, 而且这一比例在整个皮层神经发生的过程中保持不变。这些新的证据证明, 实际上纺锤体或分裂面的方向实际上与不对称性没有关系。

最后是细胞命运决定因子的问题。在哺乳动物神经发育过程中, 是否像果蝇中那样, 存在命运决定因子呢? 早先的认为是有的。在鼠中, Zhong 等早先观察到的现象是: Numb 呈新月状分布于 VZ 区有丝分裂细胞的顶侧皮层区^[9]。这种不对称分布, 再配合上述认为有丝分裂面的方向决定不对称性的假说, 似乎 Numb 就正是一个合适的细胞命运决定因子。由此, Zhong 等提出一个模型: 当 RGC 水平分裂时, Numb 被不对称的分配到顶侧细胞, 使之发育成新的 RGC,

进行自我更新; 而底侧细胞未分配有 Numb, 将发育分化成神经元; 而当垂直分裂时, Numb 被平均分配到两个子细胞中去, 结果两个子细胞都将发育成新的 RGC, 从而完成自我繁殖^[9]。后来, 这个模型面临两个挑战: 第一, 就是近来发现的大部分有丝分裂都是垂直分裂、分裂面的方向与不对称性没有关系的证据; 第二, 是 Rasin 等通过免疫电镜结果发现, Numb 实际上主要定位于分裂间期 RGC 顶端终足间形成的粘附连接处(图 4)。在处于有丝分裂期的 RGC 中, 面向 LV 的顶端膜区域是很狭窄的, 没有 Numb 的分布, Numb 在整个 RGC 中的分布实际上是呈底侧及侧面 (basolateral) 分布的, Zhong 等所观察到的 Numb 在顶侧皮层新月形分布可能是一种假象, 是由两侧相邻的间期 RGC 的顶端终足形成的^[9] (图 4)。所以, Numb 在 RGC 中的功能实际上可能是维持粘附连接。换句话说, 从果蝇到鼠, Numb 在不对称细胞分裂过程中的角色发生了变化: 由果蝇中细胞命运决定因子的角色变成了鼠中维持细胞极性的角色。对于新出现的这些证据, 钟等最近提出了新的假说: 在有丝分裂期, 虽然 Numb 没有分布在狭窄的顶端膜区域, Numb 仍然是呈顶端或顶端及侧面 (apical-lateral) 分布的; 同时, 尽管大部分分裂形式是垂直分裂, 将会把 Numb 同时分配到两个子细胞中去, 但两个子细胞分别接受的 Numb 的含量的是有差异的, 这种差异也可能导致两个子细胞命运的不同^[21]。当然, 这一模型是否合理, 还有待实验证明。

既然 Numb 不大可能成为细胞命运决定因子, 那么果蝇中另外两个命运决定因子在哺乳动物中的同源物是否有可能扮演这个角色呢? Prospero 的同源物 Prox-1 已被证明是不大可能的。目前只剩下 Brat 的同源物 TRIM2、TRIM3 和 TRIM32 了, 如果将来的实验能证明它们可以扮演细胞命运决定因子的角色, 将是令人兴奋的^[20]。

4 Numb 与 Notch 信号通路的关系

不对称细胞分裂产生两个不同命运的子细胞。这一过程中, 子细胞命运的决定可能通过两种机制实现: 一种是细胞内在机制, 即通过细胞内的命运决定因子在两个子细胞中的差异分配实现, Numb 就是这样一种命运决定因子; 另一种是细胞外在机制, 即两个子细胞相互之间的信息传递, 或来自周围相邻细胞的信号对子细胞命运产生决定作用。在 Numb 研究早期提出的一个问题是, 这两种机制是否同时在不对称细胞分裂过程中发挥作用? 后来一系列研究的回

答是肯定的。与 *Numb* 一起在不对称细胞分裂中起作用的外在机制是 *Notch* 信号通路。

Notch 是一个单次跨膜受体蛋白, *Delta* 是其配体, 也是一个跨膜蛋白。 *Notch* 信号通路激活的过程是: 一个细胞的 *Notch* 受体与相邻细胞的 *Delta* 配体结合, 引发 γ -分泌酶复合物在细胞膜内的剪切, 释放出有活性的 *Notch* 胞内结构域(notch intracellular domain, NICD), NICD 再进入核内, 启动 *Hes1*, *Herp* 等目的基因的转录^[27]。由于只有来源于相邻细胞的 *Delta* 配体才能激活 *Notch* 信号, 所以 *Notch* 信号通路在细胞-细胞间的通讯, 及细胞与周围环境间的信号传递过程中起着关键作用。 *Notch* 信号通路在诸如神经发生、眼部发育、肌肉发育、卵子发生和翅膀发育过程中执行重要功能。

4.1 *Notch* 介导神经发育过程中的旁侧抑制机制。

在果蝇的 PNS 神经发育初期, SOP 的特化是通过 *Notch* 与 *Delta* 介导的旁侧抑制(lateral inhibition)机制实现的。具体来讲就是, 在具有相同的成神经细胞潜能的一簇细胞中, 只有一个细胞最终转变为 SOP, 而其余的细胞, 由于受到这个正在形成中的 SOP 的旁侧抑制作用, 被阻止具备相同的命运, 从而转变为表皮细胞^[28]。其分子机制是: 形成中的 SOP 通过表达 *Delta*, 激活周围相邻细胞的 *Notch* 信号通路, 由此抑制其具有促神经前体细胞形成能力的转录因子的表达; 同时, 周围相邻细胞 *Notch* 信号通路的激活也将抑制其 *Delta* 的表达, 从而使 SOP 细胞内的促神经前体细胞形成的转录因子的表达免受抑制。这一负反馈抑制环路, 使得 SOP 细胞得以抑制相邻细胞, 让自己“脱颖而出”^[29]。因此, 如果 *Notch* 基因突变的话, 将会导致多余 SOP 的产生, 而 *Notch* 过表达则会使 SOP 缺失。

值得注意的是, *Numb* 蛋白也同样在上述具有成神经细胞潜能的细胞簇中表达, 但是, *Numb* 的缺失或过表达对 SOP 的正常形成没有任何影响^[2,30,31], 说明, *Numb* 在 *Notch-Delta* 介导的旁侧抑制过程中没有发挥作用。

4.2 *Numb* 通过拮抗 *Notch* 发挥效应

在 SOP 形成后, *Notch* 继续在 SOP 细胞谱系的发育分化过程中扮演重要角色, 而这时, 它是作为 *Numb* 的拮抗对象而发挥作用的。

研究表明, 在果蝇 SOP 的发育过程中, 如果降低 *Notch* 和 *Delta* 的表达, 将使 SOP 的两个子细胞都成为 *Iib* 细胞, 然后再对称分裂形成四个神经元, 这正

好与 *Numb* 过表达的表型相同。实际上, 不论是 *Notch* 的功能获得或是功能缺失, 都将导致对称性细胞分裂, 与 *Numb* 突变的表型相似, 但不同的是, *Notch* 功能缺失的表型与 *Numb* 功能获得的表型相似, 反之亦然。这表明, *Notch* 和 *Delta* 也在不对称细胞分裂过程中执行重要功能, 并且是与 *Numb* 的作用相对抗的^[30,32]。另外, 在果蝇 CNS 的 MP2 细胞谱系的不对称分裂过程中, 也观察到了 *Numb* 与 *Notch* 相反的作用^[33]。事实上, 在果蝇中, 所有已知的实验结果都显示, 无论是在神经系统, 还是在非神经系统, 在所有细胞谱系不对称分裂过程中, *Numb* 和 *Notch* 对细胞命运的影响都是相反的^[34]。而且, *Notch* 与 *Numb* 双突变的表型与 *Notch* 单突变的表型相同, 这表明, *Numb* 在 *Notch* 的上游, 即 *Numb* 是通过拮抗 *Notch* 发挥作用的^[30,33]。生化实验结果显示, 不论是体内还是体外, *Numb* 与 *Notch* 都有直接的蛋白-蛋白相互作用^[5,30]。

近来, 在脊椎动物中的研究反映了 *Numb* 与 *Notch* 间更为复杂的关系: 只有当 *Notch* 信号处于较低水平时, *Numb* 才负调控 *Notch*; 当 *Notch* 信号处于较高水平时, 反而会导致 *Numb* 蛋白水平的下调, 说明 *Numb* 与 *Notch* 信号实际上是处于一种相互拮抗的状态^[35]。

McGill 等发现, 在哺乳动物中, *Numb* 可以通过使细胞膜上 *Notch1* 受体的泛素化来促进 NICD 的降解^[36]。他们最新的研究则揭示了 *Numb* 负调控 *Notch* 的分子机制: 实际上, 在哺乳动物中, 即使未处于激活状态, *Notch1* 受体在细胞膜上也不是静态的, 而是处于一种组成性内吞进入细胞的状态。然后, 或者进入循环途径, 重新回到细胞膜, 或者进入后期内吞体/溶酶体途径, 被降解, 这两种去向的选择决定了 *Notch1* 的命运。 *Numb* 在 *Notch* 内吞后的这两种命运的选择中起着分选作用, *Numb* 通过招募 *Itch* 等泛素化复合物的组件, 将 *Notch* 受体泛素化, 而这种泛素化的修饰, 将促使 *Notch* 进入后期内吞体/溶酶体途径, 从而被降解; 而 *Numb* 的缺失, 将使 *Notch* 免于泛素化, 从而进入循环途径, 重新回到膜上^[37]。

4.3 在果蝇中, *Numb* 实际上是一个选择工具

如图 1 所示, SOP 第一轮分裂, 含有 *Numb* 的子细胞发育为 *IIB*; 第二轮分裂, *IIA* 和 *IIB* 含有 *Numb* 的子细胞分别发育为毛细胞和胶质细胞; 第三轮分裂, *IIIB* 的含有 *Numb* 的子细胞则发育成神经元。经三轮、四次不对称分裂后, 四个含有 *Numb* 的子细胞

最终的命运都不同,这说明 Numb 并非是某种特定命运的决定因子(图 1)。

上面已经提过,各细胞谱系不对称细胞分裂,产生两个不同命运的子细胞,在此过程中,Notch 对细胞命运的影响都与 Numb 相反,而且,Notch 处于 Numb 的下游,即 Numb 是通过拮抗 Notch 发挥作用。由于 Notch 介导的是细胞-细胞间或细胞与环境间的信号传递,所以,实际上 Numb 是通过消除由 Notch-Delta 所介导的、来自周围相邻细胞的信号,从而使细胞选择另外一种命运。但是,除了来自细胞外的信号,细胞内在的固有的发育信号也起着关键作用。正是这些来自细胞外和细胞内的信号交汇在一起,为在某一特定的发育时间段,细胞不对称分裂所产生的子细胞,提供了特定的两种可供选择的命运:同时受胞内信息和胞外信息影响的子细胞是第一种命运;受胞内信息和除 Notch 介导之外的其它胞外信息影响的子细胞是第二种命运。Numb 就类似于一个选择第二种命运的工具,它通过拮抗由 Notch 受体介导的来自胞外的信号,使子细胞获得不同的命运,而且是一个在不同发育时空背景下,反复使用一个工具。

5 Numb 不同蛋白亚型间的表达与功能差异

脊椎动物 Numb 基因的表达,由于转录后的选择性剪切,可能在 PTB 或 PRR 结构域分别插入 11 或 48 个 AA,由此产生四种蛋白亚型: PTB^SPRR^S (Numb65, p65)、PTB^LPRR^S (Numb66, p66)、PTB^SPRR^L (Numb71, p71) 和 PTB^LPRR^L (Numb72, p72)。为什么到了脊椎动物中, Numb 会进化出现了四种蛋白亚型? 这四种亚型的出现是无意义的还是反映了 Numb 在脊椎动物中功能将更加精细和复杂? 为了回答这些问题,在过去十年,研究者们做了这方面有益的尝试,得到了一些有价值的结果(表 1)。但是,可能由于抗体的灵敏度和特异性的问题,或是在统计上出现偏差,一些结果无法重复,相互矛盾。而且,大部分实验数据都是从体外的细胞系或是果蝇中得到的,无法反映体内真实情况,亟需得到体内结果的验证。

5.1 Numb 不同蛋白亚型间的表达差异

Verdi 等^[38]和 Bani-Yaghoub 等^[39]的结果都表明,在神经发育过程中,含有 PRR^L 的蛋白亚型(即 PTB^SPRR^L 或 PTB^LPRR^L)的表达是动态的、受发育调控的:在大鼠中,当胚胎神经发育处于初期时(E8),PRR^L 表达水平较低,接着神经发生到达高峰期(E10),PRR^L 的表达水平也达到顶峰,然后,随着神经发生的

进入后期,PRR^L 的表达水平又慢慢降低,而到 E14 之后,已经无法检测出 PRR^L 表达;在小鼠和人中,PRR^L 的表达也有相同的变化趋势,只能在胚胎期脑中检测到 PRR^L 的表达,而在成年动物的脑中则检测不到。相比而言,在整个神经发育阶段,PRR^S 的表达水平则一直比较持续和稳定。

Bani-Yaghoub 等^[39]还发现,神经前体细胞中的 Numb 亚型,除了少量 PRR^S,主要是 PRR^L,而在神经元中则只有 PRR^S,PRR^L 已检测不到。另外,他们在 P19 细胞系中也印证了上述结果:在视黄酸的诱导下,P19 逐渐分化,随着分化过程的进行,PRR^L 的表达渐弱,而 PRR^S 的变化则不明显。这也与前期 Dho 等^[7]在 P19 细胞系中的结果相同。

此外,研究还发现, Numb 四种亚型在不同组织及不同细胞系中的表达差异很大^[7,8],这其中的功能相关性还不明了,可能意味着不同 Numb 亚型在不同的细胞中执行不同的功能。

5.2 Numb 不同蛋白亚型间的功能差异

5.2.1 PRR^L 与 PRR^S 间的功能差异 如上所述,PRR^L 的表达水平与神经发生的过程相呼应,是否意味着 PRR^L 与神经前体细胞的增殖有关,而 PRR^S 与分化有关? 这个问题可以分为两层。首先第一层是: PRR^L 与 PRR^S 之间是否存在功能上的差异? 有两个研究小组尝试利用果蝇来回答这个问题,他们在果蝇中表达 PRR^L 或 PRR^S,看其对感觉刚毛发育的影响,但两个小组得出结果并不相同:Verdi 等^[8]的结果显示,PRR^S 的过表达导致果蝇翅膀边沿的刚毛显著减少(>87%),而 PRR^L 的过表达只引起很少量的减少(<20%),这意味着两者对 SOP 细胞系的细胞命运转化的影响是存在差异的;而后来 Peterson 等^[34]的结果则显示,PRR^L 和 PRR^S 都会导致果蝇背板感觉刚毛的显著减少,同时神经元增加,两者没有差异。为何出现这种不一致,现在还不清楚,但是,考虑到脊椎动物与果蝇间巨大的种属差异,利用果蝇 SOP 系统来做判断是不合适的,所以,非常需要进一步的确认工作。接下来,第二层的问题是:神经发育过程中,PRR^L 和 PRR^S 是否分别与增殖和分化相关? 很多研究结果的回答是肯定的:(1)在原代培养的小鼠神经前体细胞中,过表达 PRR^L 将促进增殖,同时将不影响或抑制分化;而过表达 PRR^S 则促进分化,同时抑制或不影响增殖^[8];(2)在 P19 细胞系中,PRR^S 能促进分化,而 PRR^L 则不能^[7];在视黄酸的诱导下,PRR^L 将促进 P19 细胞的增殖,而 PRR^S 则不能^[7];(3)在果蝇外视原基(outer optic

anlage, OOA)中, h-PTB^SPRR^L (“h”表示来自人)能促进神经上皮(neuroepithelium, NE)和pNB (postembryonic neuroblasts)细胞增殖,同时不影响分化; h-PTB^SPRR^S则促进 NE 和 pNB 分化,而抑制其增殖^[40]。但是,也有相矛盾的结果,那就是在 1999 年, Wakatatsu 等^[41]将 c-PTB^S PRR^S (“c”表示来自鸡)转染入胚胎期 4 天的鸡胚脑内,发现神经前体细胞数目增加,而神经元数目减少,表明 c-PTB^S PRR^S 促进增殖,抑制分化,这是脊椎动物唯一的体内结果,但至今未有跟进的工作进行验证,致使这一问题至今仍无定论。

5.2.2 PTB^S与PTB^L之间的功能差异 Dho 等^[7]的结果表明,PTB 有可能与细胞内的定位有关。Dho 等构建了 GFP 与含 PTB^S 结构域或 PTB^L 结构域的 Numb 的 N 端片段的融合蛋白,将其在 MDCK 细胞中过表达,发现 GFP-PTB^S 结构域融合蛋白主要定位在胞质与核中,而 GFP-PTB^L 结构域融合蛋白则主要定位在细胞膜上,表明 PTB^L 结构域可能与 Numb 在细胞膜

上的定位有关。最近 Kyriazis 等^[42]的结果显示,PTB^S 与 PTB^L 对细胞内淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的运输与加工有着相反的作用:在 PC12 细胞系中过表达不同的 h-PTB 亚型, h-PTB^S 导致 APP 全蛋白质在早期内吞体中的积累,增加 A β 的分泌; h-PTB^L 则导致 APP 进入溶酶体,被酸水解,由此降低胞内 APP 的积累,抑制 A β 的分泌。另外,还有研究结果表明, h-PTB^S 可促进 PC12 细胞的分化,同时促进分化后的细胞神经突起长度的增加。

综上所述, Numb 不同蛋白亚型间,不论是在发育时空的表达上,还是在功能方面,都有明显的差异。归纳起来, PRR^L 可能与神经前体细胞的增殖有关,而 PRR^S 可能与分化有关;而 PTB^S 与 PTB^L 可能与 Numb 或由 Numb 连接的复合物在胞内的亚细胞定位有关。但这两方面的结果都亟需得到体内结果的验证,在未来,利用基因敲除小鼠及胚胎宫内转染技术将会进一步的揭开各 Numb 蛋白亚型在体内的真面目(表 1)。

Table 1 Functional differences of Numb isoforms

Species /Cell line	Expressed Numb isoforms	Phenotypes	Notes	Reference
<i>Drosophila</i> ; Cell culture (P19/ neuroal crest cells)	h-PRR ^S	<i>Drosophila</i> wing marginal hairs dramatically reduced (>87%), Progenitor numbers -, neuron numbers \uparrow .	h-PRR ^L misexpression phenotypes in <i>Drosophila</i> contradict with 2005 Peterson etc.	[8]
	h-PRR ^L	<i>Drosophila</i> wing marginal hairs slightly reduced (<20%), Progenitor numbers \uparrow , neuron numbers -.		
Cell culture (MDCK/P19)	m-PTB ^S domain	Localize in cytoplasm.	During retinoic acid induced P19 differentiation, m-PRR ^L expression \downarrow .	[7]
	m-PTB ^L domain	Localize to plasm membrane.		
Avian <i>in vivo</i> transfection	c-PTB ^S PRR ^S	Progenitor Numbers \uparrow , neuron numbers \downarrow .	The only <i>in vivo</i> results of vertebrate.	[41]
Cell culture (PC12)	h-PTB ^S	NGF induced differentiation \uparrow , after NGF deprivation, apoptosis \uparrow .	After NGF deprivation, while apoptosis \uparrow , intracellular calcium concentration \uparrow .	[43]
<i>Drosophila</i> SOP	h-PRR ^S	Neurons \uparrow , hairs dramatically \downarrow		[34]
	h-PRR ^L	Neurons \uparrow , hairs dramatically \downarrow		
<i>Drosophila</i> outer optic anlage	h-PTB ^S PRR ^S	NE cells and pNBs proliferation \downarrow , differentiation \uparrow .	NE: neuroepithelial, pNBs: postembryonic neuroblasts.	[40]
	h-PTB ^S PRR ^L	NE cells and pNBs proliferation \uparrow , differentiation -.		
Cell culture (primary neuron culture P19)	h-PRR ^S	Progenitor numbers \downarrow , differentiation \uparrow	Before re-express specific Numb isoforms, create a Numb-null state with antisense morpholino.	[39]
	h-PRR ^L	Progenitor numbers \uparrow , differentiation \downarrow		
Cell culture (PC12)	h-PTB ^S	Cells with neurites \uparrow , neurite length \uparrow	Ca ²⁺ influx through voltage-gated Ca ²⁺ channel may be required for h-PTB ^S phenotypes.	[44]
	h-PTB ^L	Cells remained in a proliferate state.		
Cell culture (PC12)	h-PTB ^S	Accumulation of APP in early Rab5A ⁺ endosomal and recycling compartments \uparrow .		[42]
	h-PTB ^L	Amounts of cellular APP and its proteolytic derivatives \downarrow .		

6 Numb是一个介导内吞的衔接蛋白

如果用一句话来概括 Numb, 那就是: Numb 是个介导内吞的衔接蛋白。这是由 Numb 蛋白的结构决定的: 它在靠近 N 端有一个 PTB 结构域, 靠近 C 端有一个 PRR 结构域, 另外在 C 端还有一个 DPF 基序和一个 NPF 基序(图 2)。已知 PTB 结构域可以和 Notch 受体^[30]及 LNX^[45]结合, PRR 结构域可以和某些含 SH3 结构域蛋白结合^[46]; DPF 可以与 Clathrin 的衔接子 α -Adaptin 结合^[47]; NPF 则可以和含 EH (Eps15 Homology) 结构域的蛋白结合^[48]。正是因为 Numb 含有多个能与不同种类蛋白结合的结构域, 能与多种不同类型的蛋白结合, 使得它能在不同的发育时空背景下, 将相关蛋白连接在一起, 形成蛋白复合物, 在诸多生命活动的过程中(尤其是在内吞过程), 发挥着广泛而重要的作用。

6.1 Numb 是个内吞蛋白

发现 Numb 是个内吞蛋白, 起因于 1997 年, P.P. D.Fiore 实验室发现, Numb 在体内和体外都能与 Eps15 结合, 而 Eps15 是一个内吞元件^[48], 由此联想到 Numb 可能与内吞过程有关。于是, 他们将指数生长期的 A172 细胞切成超薄的冰冻切片, 用免疫金标记内源 Numb, 然后在免疫电镜下观察, 发现在 Clathrin 包被的小窝和囊泡, 以及内吞体上, 都有 Numb 的定位, 而且, Numb 与内吞的受体, 例如表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR), 在整个内吞过程中共转运。生化数据显示, 除了 Eps15, Numb 还能通过 C 端的 DPF 基序与组成 AP2 的元件之一 α -Adaptin 结合, 而 AP2 则是介导 Clathrin 与内吞受体的衔接器。另外, 过表达特定的 Numb 片段将会抑制 Clathrin 介导的内吞过程。这些证据表明, Numb 确实参与了内吞过程^[49]。

6.2 Numb 通过内吞过程调控神经前体细胞不对称分裂

既然 Numb 参与了内吞过程, 那么它在神经发育过程中所扮演的各种角色是否与内吞过程相关呢? 答案是肯定的。到目前为止, 所发现的 Numb 诸多功能, 多数是通过参与内吞过程实现的。其中, 首先就是在神经发育过程中, Numb 所介导的细胞不对称分裂。

在证实 Numb 是个内吞蛋白后不久, J. A. Knoblich 的研究小组就在果蝇中证明, Clathrin 介导的内吞过程中的重要元件 α -Adaptin, 是 Numb 介导的不对称分裂所必需的^[47]: α -Adaptin 能与 Numb 结合, 一起不

对称的定位于正在分裂 SOP 细胞的一端, 然后共同被不对称的分配到两个子细胞中的一个, 影响这个子细胞的命运; 不能与 Numb 结合的 α -Adaptin 蛋白的突变体, 将不能够不对称的定位于正在分裂 SOP 细胞的一端, 并且会导致与 Numb 缺失相同的表型。他们后来又发现, 在 SOP 细胞中, Numb 与 α -Adaptin 能通过诱导 Sanpodo 的内吞来影响 SOP 的 ACD。这是因为, Sanpodo 是一个四次跨膜蛋白, 能与 Notch 受体结合, 它定位在膜上是 Notch 信号正常激活所必需的。所以, Numb 与 α -Adaptin 诱导 Sanpodo 内吞, 使 Sanpodo 离开细胞膜, 从而使 Notch 信号无法正常激活^[50]。但是, 最近 McGill 等研究则表明, 实际上情况更为复杂: 在细胞内, Notch 受体也处于一个持续内吞的状态, 在 Numb 存在的情况下, 可以介导内吞后 Notch 的受体泛素化, 使其进入后期内吞体及溶酶体, 从而被降解; 反之, 如果 Numb 不存在, 内吞后的 Notch 则进入循环内吞体, 重新回到膜上^[37]。

总之, 目前比较确定的是, Numb 确实是通过参与内吞途径影响了细胞不对称分裂, 但是, 其中很多具体的细节, 都还是模糊不清的, 而这正是今后 Numb 研究的一个重要方面。

6.3 Numb 通过内吞过程影响神经元形态发育

Fukata 等^[51]发现, 在体外培养的海马神经元中, CRMP-2 (collapsing response mediator protein-2) 能通过与微管蛋白异二聚体的结合, 促进微管装配, 因此调控轴突的生长与分支。于是, 他们通过酵母双杂交筛选 CRMP-2 的结合蛋白, 发现 Numb 是其结合蛋白之一, Numb 通过 PTB 结构域与 CRMP-2 结合。由于 Numb 能通过 C 端的 DPF 基序与 α -Adaptin 结合, 参与内吞过程, 所以他们怀疑, CRMP-2 是通过 Numb 介导的内吞过程来影响轴突生长的。功能缺失的实验证明情况确实如此, Numb 与 α -Adaptin 的突变都将抑制轴突的生长。但是, Numb 通过内吞途径影响轴突生长的具体分子机制是什么呢? 于是, 他们关注到另一个分子, L1, 一种定位于轴突的神经细胞粘附分子, 能在生长锥的中央区域被内吞并循环至前沿, 已知在背根神经节神经元中, L1 在生长锥的这种循环对于神经突起的生长是必需的。实验结果表明, Numb 不仅能与 L1 共定位, 而且 Numb、 α -Adaptin 与 L1 三者可以共沉淀。CRMP-2、Numb 和 α -Adaptin 的突变都将抑制 L1 的内吞, 从而抑制轴突的生长。所以, 在体外培养的海马神经元中, CRMP-2 能与 Numb 结合, 通过 Numb 介导的 L1 的内吞来调控轴突的生长^[52]。

6.4 Numb 通过内吞过程影响细胞迁移

整联蛋白(integrin)是一种主要的细胞粘附受体,由两个亚基组成: α 亚基和 β 亚基。整联蛋白参与粘着斑(focal Adhesion)的形成,对于很多贴壁细胞的迁移来讲,连续在细胞前方形成粘着斑,同时粘着斑在后方解离是很关键的。已知整联蛋白可以通过内吞过程从细胞的后侧循环至前侧,而且这种循环对于一些贴壁细胞的迁移有重要意义,但是这一过程的分子机制并不清楚。刚才在上文中提到,在神经元中,粘附分子 L1 在生长锥区域的内吞循环对于神经突起的生长是必需的^[52], L1 被运输至生长锥的前沿,插入到细胞膜上,形成新的粘着点^[53],而这些过程,都受到 Numb 内吞的调控。整联蛋白的功能与动态运输过程与 L1 相似,那么它的分子调控机制是否也会与 Numb 有关呢? Nishimura 等的实验结果证实了这个假设,发现 Numb 能通过内吞过程调控整联蛋白的定向运输,从而影响细胞的迁移。Numb 能与整联蛋白的 β 亚基结合,并作用于整联蛋白的内吞过程,两者一起定位于迁移细胞前沿朝向基质的底侧面的 Clathrin 包被结构(Clathrin-coated structures, CCS)上。通过 RNAi 抑制 Numb 的表达,将破坏整联蛋白的内吞,同时影响受整联蛋白刺激的细胞迁移。另外,他们还发现,极性蛋白分子 Par3 和 aPKC 也参与了这一过程, Numb 能与 Par3 结合,而与 Par3 结合的 aPKC 可以使 Numb 磷酸化,磷酸化的 Numb 从 CCS 上脱落下来,并且与整联蛋白解离。Numb 的磷酸化与去磷酸化是一个复杂的动态循环过程,这对于 Numb 对整联蛋白的内吞和细胞迁移的调控功能是很重要的^[54]。

7 Numb与肿瘤的关系

Numb 与肿瘤的研究方向主要是由意大利的 P. P. Di Fiore 实验室所开拓的^[55]。早期的研究提供的线索是,肿瘤发生过程中 Notch 信号会出现变化,在正常的乳房组织中,增强 Notch 信号将促进低分化腺癌的快速发生,严重破坏乳腺形态发生^[56,57]。这提示,Notch 信号的异常可能与乳腺肿瘤有关。考虑到在胚胎发生阶段的 ACD 过程中, Numb 对 Notch 的拮抗作用,他们假设,在正常的乳房组织细胞中,有可能也存在 Numb-Notch 的拮抗关系,而这种拮抗关系的破坏可能是乳房肿瘤发生的诱因之一。他们对 321 例乳房癌样本进行分析,由于样本间 Numb 免疫组化染色的差异性较大,他们根据肿瘤细胞中 Numb 染色阳性细胞的比例,将其分为三类: 1 类, <10% (占总样本数 38.3%); 2 类, 10%~50% (占总样本数 16.8%);

3 类, >50% (占总样本数 44.9%)。同时,又将 1 类和 3 类样本分别定义为 Numb- 阴性样本和 Numb- 阳性样本。结果很明显,超过 50% 样本(1 类+2 类)的 Numb 信号是减弱的。他们对乳房肿瘤细胞进行原代培养,发现在 Numb- 阴性肿瘤细胞中, Numb 蛋白的缺失是由于 Numb 蛋白被泛素化和蛋白酶体降解所导致的,加入蛋白酶体抑制剂 MG132 能恢复 Numb 的蛋白水平。另外, Numb- 阴性肿瘤细胞的 Notch 信号处于增高的水平,向其转染 Numb 可抑制肿瘤细胞增殖,同时下调 Notch 信号。这表明,可能 Notch 信号异常增高才是 Numb- 阴性肿瘤的发生的关键,于是,他们用 Notch 信号的抑制剂 DFP-AA 对其进行处理,果然,在 Notch 信号下调的同时,肿瘤细胞的增殖被明显抑制了^[55]。这表明, Numb-Notch 正常生理条件下的拮抗对于维持乳房组织正常健康是必需的,这种拮抗关系的破坏可能是乳房癌的诱因之一。

后来, P. P. Di Fiore 实验室又揭示了 Numb 更令人兴奋的一个角色: 维持 p53 的稳定^[58]。除了基因突变,间接因素也可导致 p53 的失活, HDM2(即 MDM2)是一种 E3 泛素连接酶,它能与 p53 结合,将 p53 泛素化然后降解,由此影响 p53 的半衰期。而 Numb 能与 p53 以及 HDM2 形成三聚物,通过对抗 HDM2,使 p53 免于被泛素化和降解,从而维持 p53 的稳定。在上述原代培养的 Numb- 阴性乳房肿瘤细胞中, p53 的蛋白水平也是降低的,而且是由于 HDM2 泛素化降解。这表明,在 Numb- 阴性乳房肿瘤中, Numb 似乎具备着双重抗肿瘤作用: 下调 Notch, 维持 p53 的稳定性。

但是, Numb 的抑癌作用还不止于此。Di Marcotullio 等^[59]发现,小脑颗粒细胞前体细胞(granule cell progenitors, GCPs)来源的肿瘤细胞中的 Numb 水平是下调的。进一步的研究表明,原来 Numb 通过 Itch 依赖的泛素化,调控 Hedgehog 的转录因子 Gli1 的降解,从而抑制 Hedgehog 信号通路,而这一调控机制的失去平衡将成为肿瘤发生的诱因之一。

综上所述, Numb 既可以拮抗 Notch 信号,又可以维持 p53 的稳定性,还可以抑制 Hedgehog 信号通路,简直可以算得上是一个潜在的明星抑癌分子。

8 Numb与细胞周期的关系

在果蝇 SOP 中, Numb 的定位随着细胞周期的进行而发生变化: 在分裂间期, Numb 均一地分布在细胞皮层和胞质中; 在有丝分裂期, Numb 集中在前侧皮层; 随着有丝分裂的结束, Numb 被分配到了两个

子细胞中的一个, 进入有丝分裂间期, Numb 又重新呈均一性分布。在这个过程中, Numb 在有丝分裂前期准确地定位在 SOP 细胞的前侧皮层, 是 SOP 不对称分裂正常进行的必要条件之一。Numb 定位的动态变化与细胞周期进程之间所呈现出的这种同步性, 暗示着两者间存在着很强的相关性。

Wirtz-Peitz 等^[22]近期在果蝇中的重要工作印证了这一相关性, 并且揭示了细胞不对称分裂与细胞周期期间所存在的密切联系。将 SOP 不对称分裂与细胞周期联系在一起的关键纽带是 Aurora-A (AurA), 一个有丝分裂激酶。AurA 在有丝分裂开始时被激活, 随后, 对位于 SOP 细胞皮层后侧的 Par 蛋白复合物, 启动一系列的磷酸化级联反应, 最终实现对 Numb 定位的调控: AurA 磷酸化 Par6, 解除 Par6 对 aPKC 的抑制; 活化的 aPKC 磷酸化 Lgl, 使 Lgl 离开 aPKC, 从皮层脱落下来; 同时, 另一个同 Lgl 竞争性的与 aPKC 结合的蛋白, Bazooka (Baz), 进入 Par 蛋白复合物, 与 aPKC 结合; 这种结合改变了 aPKC 的底物选择性, 使其转而磷酸化 Numb, 磷酸化的 Numb 从后侧皮层脱落, 而前侧皮层则未受影响, 从而呈现出 Numb 在细胞前侧皮层的极性定位。因此, AurA 就像一个定时的分子开关, 有丝分裂期开始时被打开, 启动磷酸化级联反应, 使得 Numb 从一侧皮层脱落; 而随着有丝分裂期的结束, AurA 被关闭, Numb 的分布又重新呈现出均一性。

在 ACD 过程中, 不仅 Numb 的定位与细胞周期有关, 而且 Numb 决定细胞命运的活性也是受细胞周期调控的。在果蝇 SOP 细胞的 ACD 过程中, 未接受 Numb 的子细胞, 比如 IIA 细胞, 在分裂后不久也会重新合成出 Numb, 但这时生成的 Numb 并不能使它的命运转变为 IIB 细胞, 它仍将发育成 IIA 细胞; 在老鼠 RGC 的 ACD 过程中也是如此, 新生神经元在分裂后不久也会重新生成 Numb, 但这时它的命运已经决定了, 新生成的 Numb 对于它发挥的是促进分化的活性。这说明, Numb 对子细胞命运的特化活性, 局限在很窄的一个时间段内起作用, 这个时间段大约是从有丝分裂中期到分裂后不久, 在这个时间段之后, Numb 就失去了对细胞命运的特化活性, 转而发挥其它方面的活性, 比如促进分化等。这也意味着, Numb 的特化细胞命运的活性是与细胞周期相关联的。那么, 是什么因素控制着 Numb 仅在细胞周期的特定阶段才发挥这样的活性呢? Zhou 等^[60]最近在小鼠中的工作出人意料地发现, 高尔基体可能扮演着 Numb 活性调控者的角色。他们通过酵母双杂交筛选与

Numb 相互作用的蛋白时, 发现一个后来被命名为 ACBD3 的高尔基体蛋白, 它可以与 Numb 的 N 端的一段 23 个 aa 区域结合。值得注意的是, ACBD3 在神经前体细胞分裂周期的亚细胞定位是变化的: 在分裂间期 ACBD3 是连接在高尔基体上的; 而在有丝分裂期间, 随着高尔基体的片段化, ACBD3 被释放到胞质中; 有丝分裂期结束后, 随着高尔基体的重建, ACBD3 又重新回到高尔基体上。ACBD3 存在于胞质中的这段时间, 正是 Numb 决定子细胞命运的时期。ACBD3 适时出现在细胞质中, 并且还能与 Numb 相互结合, 这意味着什么? 由此, 他们提出一个模型: Numb 和 ACBD3 是两个伙伴蛋白, 它们只能在有丝分裂期, 也就是 Numb 决定子细胞命运的时期相互结合, 这种结合对于 Numb 特化子细胞命运的活性是必需的; 当分裂后, ACBD3 与 Numb 分开, 返回到高尔基体上, 因此 Numb 就失去了特化活性; 然后, 一直到下一次 ACD 开始又重新被激活, 或是转而发挥促进新生神经元分化的功能。为了验证这模型, 他们将 ACBD3 豆蔻酰化, 这样就能使它始终存在于胞质中。正如所假设的, 在果蝇中, 在 Numb 同时存在的情况下, 豆蔻酰化的 ACBD3 也能够特化细胞的命运; 在老鼠中, 在处于神经发生期的神经前体细胞, 豆蔻酰化的 ACBD3 的存在, 通过迫使两个子细胞都选择了神经前体细胞的命运, 抑制神经元的产生。综上所述, 钟等的工作发现了细胞周期与 ACD 协调的新的分子机制, 即通过高尔基体在细胞周期中的形态变化, 调控 Numb 对细胞命运的特化活性。

由上述两个工作来看, 不论是定位, 还是活性, Numb 都受到细胞周期的严格调控。这种调控有不同的形式, 或是通过细胞周期蛋白激活与失活, 或是通过细胞器在细胞周期中的动态变化过程, 这表明了调控的复杂性和多样性。

9 小结与展望

一次细胞分裂产生两种不同的细胞命运, 可以通过对称性细胞分裂和不对称性细胞分裂而实现。通过对称性细胞分裂产生的两个子细胞由于其外界环境因素不同, 成为两种不同的细胞; 而通过不对称性细胞分裂产生的两个子细胞由于两个子细胞遗传了不同的内在决定因子使其一旦分裂即具有不同的细胞命运。Numb 基因是第一个被发现的在多细胞生物中起着决定不对称性分裂的决定基因。Numb 蛋白是一个信号接头蛋白, 具有 N 端的 PTB 结构域和 C 端的 PRR 区域。在果蝇的外周感觉器官前体细胞

分裂中, *d-Numb* 蛋白分布在一侧, 产生两种不同的子细胞, 而 *d-Numb* 突变体产生两个命运相同的子细胞, 从而确定了 *d-Numb* 是决定不对称性分裂的决定基因。随后的工作发现在脊椎动物中, 有两个不同的同源基因 *Numb* 和 *Numbl*。根据 PTB 区域和 PRR 区域分别是否有 11 个氨基酸和 48 个氨基酸插入序列, *Numb* 蛋白有四种不同的剪接分子, 分子量分布为 p65、p66、p71、p72。体外实验表明 p71、p72 促进细胞增殖, p65、p66 促进细胞分化。然而也有相反证据, 所有 *Numb* 剪接分子具有相同的功能。究其原因可能是因为系统不同, *Numb* 不同的剪接分子具有不同的功能。近来发现 *Numb* 是一个参与调节内吞的内吞蛋白, 通过调节细胞粘连分子调控细胞迁移和神经突生长。最新的研究表明 *Numb* 蛋白本身被多重修饰包括多位点磷酸化^[22,54,61]、泛素化^[62,63], 同时与 p53、HDM2 形成三聚体抑制 p53 的泛素化, 有趣的是 *Numb* 也能促进 Notch 被泛素化。尽管近年来, *Numb* 的研究有了新的进展, 但许多问题尚未解决: (1)不同剪接 *Numb* 分子和其同源分子在体内究竟起什么功能? (2) *Numb* 如何调节哺乳动物细胞不对称细胞分裂? (3)是否具有细胞特异性和时空特异性? (4) *Numb* 在体内如何代谢, 其代谢是如何调节的, 有何生理意义? (5)多种修饰的 *Numb* 究竟有何生理意义? (6) *Numb* 如何调节干细胞的自我更新、分化和衰老? (7) *Numb* 如何参与调节不同肿瘤的恶性程度, 对肿瘤治疗有何指导意义? 我们认为, 对于这些问题的回答, 将推动 *Numb* 研究进一步向精细而深入方向的发展。

参考文献(References)

- Uemura T, Shepherd S, Ackerman L, Jan LY, Jan YN. *numb*, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell* 1989; 58(2): 349-60.
- Rhyu MS, Jan LY, Jan YN. Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 1994; 76(3): 477-91.
- Spana EP, Kopczynski C, Goodman CS, Doe CQ. Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS. *Development* 1995; 121(11): 3489-94.
- Zhong WM. Timing cell-fate determination during asymmetric cell divisions. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18(5): 472-78.
- Zhong WM, Feder JN, Jiang MM, Jan LY, Jan YN. Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis. *Neuron* 1996; 17(1): 43-53.
- Zhong WM, Jiang MM, Weinmaster G, Jan LY, Jan YN. Differential expression of mammalian *Numb*, *Numbl* and *Notch1* suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis. *Development* 1997; 124(10): 1887-97.
- Dho SE, French MB, Woods SA, McGlade CJ. Characterization of four mammalian numb protein isoforms-Identification of cytoplasmic and membrane-associated variants of the phosphotyrosine binding domain. *J Biol Chem* 1999; 274(46): 33097-104.
- Verdi JM, Bashirullah A, Goldhawk DE, Kubu CJ, Jamali M, Meakin SO, *et al.* Distinct human NUMB isoforms regulate differentiation vs. proliferation in the neuronal lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(18): 10472-76.
- Rasin MR, Gazula VR, Breunig JJ, Kwan KY, Johnson MB, Liu-Chen S, *et al.* *Numb* and *Numbl* are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors. *Nat Neurosci* 2007; 10(7): 819-27.
- Farkas LM, Huttner WB. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(6): 707-15.
- Zhong WM, Jiang MM, Schonemann MD, Meneses JJ, Pedersen RA, Jan LY, *et al.* Mouse *numb* is an essential gene involved in cortical neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(12): 6844-49.
- Zilian O, Saner C, Hagedorn L, Lee HY, Sauberli E, Suter U, *et al.* Multiple roles of mouse *Numb* in tuning developmental cell fates. *Curr Biol* 2001; 11(7): 494-501.
- Petersen PH, Zou KY, Hwang JK, Jan YN, Zhong WM. Progenitor cell maintenance requires *numb* and *numbl* during mouse neurogenesis. *Nature* 2002; 419(6910): 929-34.
- Petersen PH, Zou KY, Krauss S, Zhong WM. Continuing role for mouse *Numb* and *Numbl* in maintaining progenitor cells during cortical neurogenesis. *Nat Neurosci* 2004; 7(8): 803-11.
- Huang EJ, Li HS, Tang AA, Wiggins AK, Neve RL, Zhong W, *et al.* Targeted deletion of *Numb* and *Numbl* in sensory neurons reveals their essential functions in axon arborization. *Genes Dev* 2005; 19(1): 138-51.
- Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 112-17.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 2005; 25(1): 10-18.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 2004; 41(5): 683-86.
- Kuo CT, Mirzadeh Z, Soriano-Navarro M, Rasin M, Wang D, Shen J, *et al.* Postnatal deletion of *numb/numbl* reveals repair and remodeling capacity in the subventricular neurogenic niche. *Cell* 2006; 127(6): 1253-64.
- Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* 2008; 132(4): 583-97.
- Zhong WM, Chia W. Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18(1): 4-11.
- Wirtz-Peitz F, Nishimura T, Knoblich JA. Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the par complex to regulate *Numb* localization. *Cell* 2008; 135(1): 161-73.

- 23 Gho M, Schweisguth F. Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in *Drosophila*. *Nature* 1998; 393(6681): 178-81.
- 24 Chenn A, McConnell SK. Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* 1995; 82(4): 631-41.
- 25 Stricker SH, Meiri K, Gotz M. P-GAP-43 is enriched in horizontal cell divisions throughout rat cortical development. *Cerebral Cortex* 2006; 16: I121-31.
- 26 Konno D, Shioi G, Shitamukai A, Mori A, Kiyonari H, Miyata T, *et al.* Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol* 2008; 10(1): 93-101.
- 27 Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. A Notch updated. *J Cell Biol* 2009; 184(5): 621-29.
- 28 Jan YN, Jan LY. Genes required for specifying cell fates in *Drosophila* embryonic sensory nervous system. *Trends Neurosci* 1990; 13(12): 493-8.
- 29 Barolo S, Stone T, Bang AG, Posakony JW. Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to suppressor of hairless. *Genes Dev* 2002; 16(15): 1964-76.
- 30 Guo M, Jan LY, Jan YN. Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of numb and notch. *Neuron* 1996; 17(1): 27-41.
- 31 Tang HY, Rompani SB, Atkins JB, Zhou Y, Osterwalder T, Zhong WM. Numb proteins specify asymmetric cell fates via an endocytosis- and proteasome-independent pathway. *Mol Cell Biol* 2005; 25(8): 2899-909.
- 32 Posakony JW. Nature versus nurture: asymmetric cell divisions in *Drosophila* bristle development. *Cell* 1994; 76(3): 415-8.
- 33 Spana EP, Doe CQ. Numb antagonizes notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 1996; 17(1): 21-26.
- 34 Petersen PH, Tang HY, Zou KY, Zhong WM. The enigma of the Numb-Notch relationship during mammalian embryogenesis. *Dev Neurosci* 2006; 28(1-2): 156-68.
- 35 Chapman G, Liu LN, Sahlgren C, Dahlqvist C, Lenclahl U. High levels of Notch signaling down-regulate Numb and Numbl-like. *J Cell Biol* 2006; 175(4): 535-40.
- 36 McGill MA, McGlade CJ. Mammalian numb proteins promote notch1 receptor ubiquitination and degradation of the notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 2003; 278(25): 23196-203.
- 37 McGill MA, Dho SE, Weinmaster G, McGlade CJ. Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *J Biol Chem* 2009; 284(39): 26427-38.
- 38 Verdi J, Schmandt R, Bashirullah A, Jacob S, Salvino R, Craig CG, *et al.* Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signaling adapter protein that specifies cell fate. *Curr Biol* 1996; 6(9): 1134-45.
- 39 Bani-Yaghoob M, Kubu CJ, Cowling R, Rochira J, Nikopoulos GN, Bellum S, *et al.* A switch in numb isoforms is a critical step in cortical development. *Dev Dyn* 2007; 236(3): 696-705.
- 40 Toriya M, Tokunaga A, Sawamoto K, Nakao K, Okano H. Distinct functions of human Numb isoforms revealed by misexpression in the neural stem cell lineage in the *Drosophila* larval brain. *Dev Neurosci* 2006; 28(1-2): 142-55.
- 41 Wakamatsu Y, Maynard TM, Jones SU, Weston JA. NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron* 1999; 23(1): 71-81.
- 42 Kyriazis GA, Wei Z, Vandermeij M, Jo DG, Xin O, Mattson MP, *et al.* Numb Endocytic adapter proteins regulate the transport and processing of the amyloid precursor protein in an isoform-dependent manner - Implications for Alzheimer disease pathogenesis. *J Biol Chem* 2008; 283(37): 25492-502.
- 43 Pedersen WA, Chan SL, Zhu HY, Abdur-Rahman LA, Verdi JM, Mattson MP. Numb isoforms containing a short PTB domain promote neurotrophic factor-induced differentiation and neurotrophic factor withdrawal-induced death of PC12 cells. *J Neurochem* 2002; 82(4): 976-86.
- 44 Lu CB, Fu W, Xu X, Mattson MP. Numb-mediated neurite outgrowth is isoform-dependent, and requires activation of voltage-dependent calcium channels. *Neuroscience* 2009; 161(2): 403-12.
- 45 Dho SE, Jacob S, Wolting CD, French MB, Rohrschneider LR, McGlade CJ. The mammalian Numb phosphotyrosine-binding domain-characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing Numb binding protein, LNX. *J Biol Chem* 1998; 273(15): 9179-87.
- 46 Williamson MP. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J* 1994; 297(Pt 2): 249-60.
- 47 Berdnik D, Torok T, Gonzalez-Gaitan M, Knoblich JA. The endocytic protein alpha-adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Dev Cell* 2002; 3(2): 221-31.
- 48 Salcini AE, Confalonieri S, Doria M, Santolini E, Tassi E, Minenkova O, *et al.* Binding specificity and *in vivo* targets of the EH domain, a novel protein-protein interaction module. *Genes Dev* 1997; 11(17): 2239-49.
- 49 Santolini E, Puri C, Salcini AE, Gagliani MC, Pelicci PG, Tacchetti C, *et al.* Numb is an endocytic protein. *J Cell Biol* 2000; 151(6): 1345-51.
- 50 Hutterer A, Knoblich JA. Numb and alpha-adaptin regulate Sanpodo endocytosis to specify cell fate in *Drosophila* external sensory organs. *EMBO Rep* 2005; 6(9): 836-42.
- 51 Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, *et al.* CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 2002; 4(8): 583-91.
- 52 Nishimura T, Fukata Y, Kato K, Yamaguchi T, Matsuura Y, Kamiguchi H, *et al.* CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat Cell Biol* 2003; 5(9): 819-26.
- 53 Kamiguchi H, Lemmon V. Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J Neurosci* 2000; 20(10): 3676-86.
- 54 Nishimura T, Kaibuchi K. Numb controls integrin endocytosis for directional cell migration with aPKC and PAR-3. *Dev Cell* 2007; 13(1): 15-28.
- 55 Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V, *et al.* Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol* 2004; 167(2): 215-21.

- 56 Jhappan C, Gallahan D, Stahle C, Chu E, Smith GH, Merlino G, *et al.* Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interferes with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivary glands. *Genes Dev* 1992; 6(3): 345-55.
- 57 Gallahan D, Jhappan C, Robinson G, Hennighausen L, Sharp R, Kordon E, *et al.* Expression of a truncated Int3 gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis. *Cancer Res* 1996; 56(8): 1775-85.
- 58 Colaluca IN, Tosoni D, Nuciforo P, Senic-Matuglia F, Galimberti V, Viale G, *et al.* NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature* 2008; 451(7174): 76-80.
- 59 Di Marcotullio L, Ferretti E, Greco A, De Smaele E, Po A, Sico MA, *et al.* Numb is a suppressor of Hedgehog signalling and targets Gli1 for Itch- dependent ubiquitination. *Nat Cell Biol* 2006; 8(12): 1415-23.
- 60 Zhou Y, Atkins JB, Rompani SB, Bancescu DL, Petersen PH, Tang HY, *et al.* The mammalian golgi regulates numb signaling in asymmetric cell division by releasing ACBD3 during mitosis. *Cell* 2007; 129(1): 163-78.
- 61 Tokumitsu H, Hatano N, Yokokura S, Sueyoshi Y, Nozaki N, Kobayashi R. Phosphorylation of Numb regulates its interaction with the clathrin-associated adaptor AP-2. *FEBS Lett* 2006; 580(24): 5797-801.
- 62 Yogosawa S, Miyauchi Y, Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Mammalian Numb is a target protein of Mdm2, ubiquitin ligase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302(4): 869-72.
- 63 Nie J, McGill MA, Dermer M, Dho SE, Wolting CD, McGlade CJ. LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J* 2002; 21(1-2): 93-102.

Numb and Neural Development

Wen-Yu Qian, Hua-Shun Li*

(West China Second University Hospital, West China Developmental & Stem Cell Institute, the State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Asymmetric cell division is a process that one mother cell generates two daughter cells with distinct cell fates, which is a crucial step in evolution from single-cell organism to multi-cellular organism. Based on the current evidence, it is presumed that asymmetric cell division is one of fundamental means in generating cell type diversity during organogenesis. Numb is the first signaling molecules found to determine asymmetric cell division in multi-cellular organisms. Numb promotes the ubiquitination of Notch to antagonize Notch signaling pathway in determining cell fates in *Drosophila* external sensory organ, subsequently found to function as endocytic protein participating in the regulation of neurite extension and cell migration. Recently it has been reported that Numb forms a trimer with p53 and HDM2 to prevent p53 from being ubiquitinated to regulate the malignancy of tumor cell. In this article, we have comprehensively reviewed the discovery history of Numb and subsequent findings of Numb function in vertebrate system.

Key words Numb; asymmetric cell division; neural development; Notch; endocytosis

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30771102), the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2007CB947202, No.2009CB941402)

*Corresponding author. Tel: 86-28-85503065; Fax: 86-28-85503072; E-mail: huashunli2@gmail.com