

• 综 述 •

Notch 信号在免疫系统中的作用

刘 颖,尹 玮,杨晓晖,李荣耀 综述,侯振江[△]审校
(沧州医学高等专科学校,河北沧州 061001)

关键词: Notch 信号; 免疫系统; 信号通路

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 08. 031

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-1009-03

Notch 信号通路调节人体的多个方面,如胚胎发育、分化过程及组织的稳态。Notch 信号通路调节异常与许多疾病的发生有关。越来越多的证据表明,Notch 信号通路在胚胎造血干细胞的发育中起关键作用,并影响淋巴细胞和骨髓细胞的细胞谱系分化倾向。本文综述 Notch 信号通路在造血、淋巴细胞分化中的作用。

1 Notch 信号通路概述

在 1917 年,Morgan 等^[1] 基因学家对果蝇翅膀边缘上的缺口进行了研究,发现这些有缺口表型的翅膀是由于缺少 *Notch* 基因造成的,该基因于 20 世纪 80 年代中期被克隆出来^[2]。果蝇 *Notch* 基因编码一个不寻常的 I 型跨膜受体,该受体是由相邻细胞的 Notch 配体相互触发而激活。

1.1 Notch 信号通路的组成 Notch 信号通路高度保守,存在于蠕虫和人类等多种生物体内,由跨膜的受体、配体和核内结合蛋白及靶基因组成^[3]。哺乳动物具有 4 个 Notch 受体(Notch 1~4),由同一蛋白前体向细胞膜转运过程中经过不同剪切、修饰而形成。Notch 受体是具有细胞表面受体和核内转录调控双重功能的单链跨膜蛋白,包括 Notch 胞外结构域、跨膜区和 Notch 胞内结构域。Notch 配体又称 DSL 蛋白(因其在果蝇中被命名为 Delta 和 Serrate,在线虫中被命名为 Lag-2,取其三者首字母而来),也是表达于细胞表面的单链跨膜蛋白,在哺乳动物中具有 5 个 Notch 配体(Delta 1、3、4,Jagged 1、2)。Notch 信号通路的靶基因多为含有碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix,bHLH)结构域的转录因子,主要包括 HES 和 Herp 家族^[4]。近期出现了关于 Notch 信号通路的分子生物学和生物化学细节描述的综合^[3,5]。

1.2 Notch 信号通路的启动 Notch 信号通路由相邻细胞之间配体-受体的相互作用而启动,两者结合后促使 Notch 胞外区和跨膜区分离,同时激活后续的两次酶切事件。首先在 Notch 胞外结构域靠近细胞膜处,由 ADAM 金属蛋白酶家族的基质金属蛋白酶介导酶切 S2 位点,产生 C 端的酶切产物。这个过程是依赖于 E3 泛素配体的胞质尾区的泛素化连接酶家族^[6]。在分离细胞外域后,第 2 次切分(S3 位点)跨膜结构域由激活的 γ -分泌酶介导。这些释放的 Notch 胞内结构域,随后转移到细胞核以 DNA 异二聚体的形式与转录因子 CSL 结合,形成一个暂时的核转录复合体。一旦与 CSL 结合,Notch 胞内结构域即可激活 MAML1-3 等,继而吸引 MED8 以诱导下游的靶基因。最近通过全基因组表达和染色质免疫沉淀(ChIP)阵列的研究发现,由 Notch 直接调节的基因大量存在^[6-7]。最新的数据表明,Notch 可以与其他信号通路沟通或协作,从而拓宽由 Notch 信号通路影响的靶基因范围^[8]。

2 Notch 信号通路在造血干细胞的发育及其稳态中的作用

造血系统起源于胚胎发育过程中的不同部位,一般与血管

生成密切相关。最原始的造血干细胞产生于外胚层的造血卵黄囊,之后转移到中胚层的主动脉旁胚胎壁(paraaortic splanchnopleura,P-Sp)和主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros,AGM)。后期造血发生于胎儿的肝脏,最后由骨髓造血。最初的造血干细胞能够长期发育成造血细胞系的潜能发现于 AGM 区。这些细胞产生于妊娠中期胚胎背主动脉的具有双向分化能力的成血管细胞(由中胚层起始形成血管的过程中,能发育成血管内皮细胞的前体细胞)。Notch1 缺陷的突变小鼠不能产生造血干细胞,这些突变的小鼠中卵黄囊血细胞的生成是不受干扰的^[9]。这些研究表明 Notch 信号通路的重要性,但对原始的造血细胞并不产生作用。然而,Notch 信号通路在重要的动脉血管生成中也起重要作用^[10]。这些突变胚胎显示,严重的血管缺陷是由动脉细胞的损失产生的。在 AGM 中是 Jagged1 而不是 Jagged2 未能生成造血干细胞^[11]。同样的研究还发现,Jagged1 介导 Notch 信号通路表达 GATA2 和 Runx1,它们是造血系统两个重要的转录因子。上述的重要发现第一次证明了 Notch 信号通路对造血干细胞发育产生的影响,而且独立于动脉的发育过程^[12]。因此,Notch 信号通路在造血干细胞发育中确实必不可少。

Notch 信号的剂量决定了在体外扩增过程中造血祖细胞向 B 和(或)T 细胞分化的方向。造血干细胞共培养中,Notch 配体的表达增加了其向 T 细胞分化的能力。当与 Delta-like1-IgG 融合蛋白共培养时,可以使人类脐带血细胞体外增殖,而且这些细胞在异种移植的分析中细胞频率显著增加(约 15 倍),并可能用于临床检测^[13]。

有证据表明,Notch 在扩大造血干细胞的长期发育中是有限的。缺乏 Notch1 或 Jagged1 的小鼠在造血干细胞能力的维持或移植后的造血能力都没有发现任何缺陷。这些结果并不排除其他 Notch 受体或配体在 Notch1 和(或)Jagged1 缺失情况下发挥了补偿作用。两种互补的方法最近被用来阻止典型的 Notch 信号通路。第一种采用了使 Mastermind 样蛋白阴性表达从而抑制 Notch 信号通路在造血干细胞和骨髓祖细胞(骨髓)转录中的功能,而第二种是使造血干细胞中的 RBP-J 灭活。这些方法分别阻止了 Notch 信号与 Notch 受体或配体的结合^[14]。抑制造血祖细胞的 Notch 信号没有发现任何 HSC 缺陷,证明造血干细胞具有正常的不断重组及在移植后的分化能力^[15]。这些研究表明,正常的 Notch 信号通路对维持骨髓中造血干细胞的动态平衡不是必需的。

3 Notch 信号通路在 T 细胞发育中的作用

Notch 信号通路在胸腺 T 细胞系的功能和成熟中发挥重要作用^[16-17],T 细胞是造血系统中适合研究 Notch 功能的细胞。BM 前体细胞不断在胸腺分化成熟,并在其迁移到周围组织之前进一步分化为成熟的 $\alpha\beta$ T 细胞和 $\gamma\delta$ T 细胞。多个基因

丢失和功能增强的研究表明, Notch1 在 T 细胞谱系中具有重要作用^[18]。Notch1 或 Rbp 的诱导灭活可引起 B 细胞在胸腺中积累, 从而导致 T 细胞在胸腺的发育阻碍。这些研究初步解释了正常的 Notch1 信号决定了早期胸腺 T 细胞, 而不是 B 细胞的分化, 因为其他的髓系或淋巴系不受影响。近期研究显示, Notch1 能抑制多种细胞在胸腺祖细胞的发育, 包括粒细胞和 B 细胞, 以及常规的浆细胞、树突状细胞的潜力, 从而确保 T 细胞系有效率的产生^[19-20]。

4 Notch 信号通路在周围 T 细胞发育和功能中的作用

T 细胞离开胸腺, 迁移到周围组织, 将针对不同病原体发挥免疫调节作用。原始 T 细胞在接收适当的信号后被激活, 并发挥其功能。例如, CD8⁺ T 细胞通过产生干扰素 γ (IFN- γ) 和细胞毒性分子 (包括颗粒酶 B 和穿孔素聚), 集于感染病毒的周围发挥抗病毒作用。病原体如细菌、寄生虫、真菌、病毒都能经此途径呈递给抗原呈递细胞 (APC), 然后激活 CD4⁺ 辅助性 T 细胞 (TH)。这些细胞针对不同的抗原微生物, 诱导其特定的免疫反应^[21]。依据 T 细胞分泌细胞因子的不同分为 Th1 或 Th2 细胞, 以及新近发现的 Th17 细胞。Th1 细胞主要通过产生 IFN- γ 对抗体内的病原体产生抗炎作用, 而 Th2 细胞则主要分泌 IL-4、IL-5 及 IL-13, 并对蠕虫有免疫作用。此外, 一些细菌和真菌通过 Th17 细胞产生的 IL-17 使中性粒细胞向感染部位聚集而发挥作用。一旦免疫反应被激活, 可引起自身免疫反应或超敏反应, 为避免免疫反应的扩大化, 机体将产生对抗其免疫反应的抗体^[22]。

Notch 信号通路周围 T 细胞相关 Notch 受体的表达及 T 细胞的活化、增殖及细胞因子的产生密切相关。体外研究证实, 外周血中 TCR 的激活可导致 Notch1 信号上调, 并与其增殖有关。G-分泌酶抑制剂 (GSI) 通过调节抑制 Notch 信号抑制外周 CD4⁺ 及 CD8⁺ T 细胞, 进而减少 T 细胞增殖并减少 IFN- γ 的分泌。另一项研究表明, NICD 的表达可通过 T 细胞产生 IL-2 及 IL-2 受体增强其正反馈通路。Notch 信号通路也与原始的 CD8⁺ T 细胞分化成杀伤性 T 细胞 (CTL) 有关, 其中的一个途径是通过上调转录因子 Eomes, 从而调节穿孔素和颗粒酶 B 的表达^[23]。此外, 在小鼠模型中, 淋巴细胞表达 Notch1 的反转录基因, 并且能够降低 Eomes、穿孔素和颗粒酶 B 的表达, Notch2 也能调节颗粒酶 B 的表达。Notch2 胞内结构域通过与转录因子 CREB1 结合于颗粒酶 B 启动转录。体外研究显示, Notch2 缺陷的 CD8⁺ T 细胞在受刺激后比对照组产生更少的颗粒酶 B。

5 Notch 信号通路在边缘区 B 细胞发育中的作用

Notch 信号通路在淋巴系统的脾脏边缘区 B 细胞及与之相对的滤泡 B 细胞中也发挥重要的作用。成熟的脾脏 B 细胞是由滤泡 B 细胞和边缘区 B 细胞两个主要亚群组成^[24]。滤泡 B 细胞, 作为脾脏 B 细胞的主要亚群, 是一个再循环细胞, 可返回 B 细胞的滤泡中心。并参与 T 细胞依赖性蛋白抗原的免疫反应。相反, 边缘区 B 细胞不通过再循环, 而集中于脾脏边缘窦和脾脏红髓之间的脾脏骨髓的外缘。脾脏的边缘区 B 细胞及滤泡 B 细胞都是由 BM 中的 B 细胞系造血祖细胞发育而来的。

目前普遍认为脾脏边缘区 B 细胞的发育依赖于 Notch 与 DLL1 之间相互作用, 依此建立的 Notch2 或 DLL1 缺陷小鼠模型中, 边缘区 B 细胞的数量大大降低, 证实 Notch 信号在边缘区 B 细胞的发育中是必需的。通过分析缺失 Notch 信号的小鼠模型发现 RBP-J 或 MAML1 基因的缺失也无法产生边缘区 B 细胞^[25]。与之相对的研究表明, 敲除 MINT (Notch 信号

通路的负调控因子) 导致脾脏边缘区 B 细胞的增加。总之, Notch 信号通路可能通过 Notch2-DLL1 相互作用的强度来控制边缘区 B 细胞的发育速度, 但目前缺乏有效的证据。

尽管有些研究已证实 DLL1 是 Notch2 在边缘区 B 细胞发育中的相关配体, 然而识别 DLL1 在脾脏细胞中的表达非常困难。特别是位于红髓和脾脏边缘区之间特殊的内皮细胞, 可选择性表达 DLL1^[26]。看起来这些表达 DLL1 配体的前体细胞的胞吞作用可能需要通过 Notch2 与边缘区细胞及其前体的有效信号。因为 Mindbomb1 (Mib1) 及 E3 连接酶的缺失被认为是调节 DLL1 胞吞作用及表型模拟的模型中 Notch2 与 DLL1 突变的小鼠^[27]。

6 小 结

近几年来越来越多的证据表明, Notch 在 T 细胞介导的免疫反应中起重要作用, 特别是能够调节辅助性 T 细胞分化。基因功能缺失的研究指出 Notch 信号通路在 Th2 细胞分化中起重要作用。然而, Notch 似乎也影响 Th1 细胞分化。Th1 和 Th2 细胞的分化可能取决于 Notch 激活的配体。配体受体的特异性问题目前还不清楚。还不知道 Jagged 和 DLL 表达的抗原呈递细胞在诱导 Notch 信号通路的能力有何不同, 信号的强度及 Th 细胞分化过程中是如何转化不同的靶基因仍是个难题。

参考文献

- [1] Morgan TH. The theory of the gene[J]. Am Nat, 1917, 51: 513-544.
- [2] Kidd S, Kelley MR, Young MW. Sequence of the notch locus of drosophila melanogaster: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors[J]. Mol Cell Biol, 1986, 6 (9): 3094-3108.
- [3] Gordon WR, Arnett KL, Blacklow SC. The molecular logic of Notch signaling a structural and biochemical perspective[J]. J Cell Sci, 2008, 121(19): 3109-3119.
- [4] 秦亚录, 范忠才. Notch 信号通路与心脏发育的关系[J]. 西南军医, 2011, 13(1): 98-101.
- [5] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: Unfolding the activation Mechanism[J]. Cell, 2009, 137(2): 216-233.
- [6] Palomero T, Lim WK, Odom DT, et al. Notch1 directly regulate a c-MYC and activates a feed-forward-loop tranacriptional network promoting leukemic cell growth[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(48): 18261-18266.
- [7] Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, et al. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma[J]. Genes Dev, 2006, 20(15): 2096-2109.
- [8] Poellinger L, Lendahl U. Modulating Notch signaling by pathway-intrinsic and pathway-extrinsic mechanisms[J]. Curr Opin Genet, 2008, 18(5): 449-454.
- [9] Robert-Moreno A, Espinosa L, Pompa JL, et al. RBPj kappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells [J]. Development, 2005, 132(5): 1117-1126.
- [10] Kume T. Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 727: 210-222.
- [11] Robert-Moreno A, Gulu L, Ruiz-Herguido C, et al. Impaired embryonic haematopoiesis yet normal arterial development in the absence of the Notch ligand Jagged1 [J]. EMBO J, 2008, 27(13): 1886-1895.
- [12] Guiu J, Shimizu R, D'Altri T, et al. Hes repressors are essential

regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling[J]. J Exp Med, 2013, 210(1): 71-84.

[13] Bernstein ID, Boyd RL, van den Brink MR. Clinical strategies to enhance posttransplant immune reconstitution [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2008, 14(1): 94-99.

[14] Sun J, Krawczyk CJ, Pearce EJ. Suppression of Th2 cell development by Notch ligands Delta1 and Delta4[J]. J Immunol, 2008, 180(3): 1655-1661.

[15] Maillard I, Koch U, Dumortier A, et al. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(4): 356-366.

[16] Radtke F, Macdonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch[J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(6): 427-37.

[17] Yashiro-Ohtani Y, Ohtani T, Pear WS. Notch regulation of early thymocyte development [J]. Semin Immunol, 2010, 22(5): 261-269.

[18] Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, et al. Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies[J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28(2): 343-365.

[19] Bell JJ, Bhandoola A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential[J]. Nature, 2008, 452(7188): 764-776.

[20] Feyerabend TB, Terszowski G, Tietz A, et al. Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms [J]. Immunity,

2009, 30(1): 67-79.

[21] Sauma D, Ramirez A, Alvarez K, et al. Notch signalling regulates cytokine production by CD8⁺ and CD4⁺ T cells[J]. Scand J Immunol, 2012, 75(4): 389-400.

[22] Aster JC, Bodnar N, Xu L, et al. Notch ankyrin repeat domain variation influences leukemogenesis and Myc transactivation[J]. PLoS One, 2011, 6(10): 25645.

[23] Cho OH, Shin HM, Miele L, et al. Notch regulates cytolytic effector function in CD8⁺ T cells[J]. J Immunol, 2009, 182(6): 3380-3389.

[24] Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(5): 767-777.

[25] Zhang Z, Zhou L, Yang X, et al. Notch-RBP-J-independent marginal zone B cell development in IgH transgenic mice with VH derived from a natural polyreactive antibody[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e38894.

[26] Tan JB, Xu K, Cretigny K, et al. Lunatic and manic fringe cooperatively enhance marginal zone B cell precursor competition for delta-like1 in splenic endothelial niches [J]. Immunity, 2009, 30(2): 254-263.

[27] Song R, Kim YW, Koo BK, et al. Mind bomb 1 in the lymphopoietic niches is essential for T and marginal zone B cell development [J]. J Exp Med, 2008, 205(11): 2525-2536.

(收稿日期: 2013-12-26)

• 综 述 •

核酸适配体及其应用研究进展^{*}

姚 远 综述, 张 波[△] 审校

(第三军医大学西南医院全军检验医学中心, 重庆 400038)

关键词: 适配体; 指数富集的配基系统进化技术; 核酸

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 08. 032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-1011-03

1990 年 Tuerk 等^[1]报道了一种新的寡核苷酸筛选技术。该技术与 PCR 扩增相结合, 在体外人工构建的短链核苷酸文库中筛选出能与噬菌体 T4DNA 聚合酶特异性结合的 RNA 配体。其原理基于生物自然进化机制, 即: 变异、选择和复制, 故被命名为指数富集的配基系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)技术, 筛选出的短链 DNA 或 RNA 配体称为适配体。由于适配体与相应靶标结合具有较高的特异性和亲和力, 生产技术及分子稳定性方面的优势可与抗体媲美, SELEX 技术已被广泛应用于生物医学众多研究领域, 本文就寡核酸适配体及其筛选技术的研究现状和应用前景做一综述。

1 适配体的筛选

1.1 适配体筛选的基本原理 SELEX 技术利用分子生物学技术, 设计并构建随机单短链核苷酸(single strand DNA/single strand RNA, ssDNA/ssRNA)文库, 通过靶标物质与随机文库混合后形成靶标-ssDNA/ssRNA 复合物; 洗脱掉未结合

的适配体, 分离结合于靶物质上的核酸分子, 以后者为模板进行 PCR 扩增, 进行下一轮筛选过程。通过多轮循环筛选, 与靶标不结合或低亲和性结合的核酸分子被去除, 而与靶分子高亲和性的“适配体”被分离出来, 且纯度随着筛选进程而增高。若在 SELEX 的每轮筛选循环后增加核酸反转录步骤, 则可筛选到 RNA 适配体。将筛选出的高特异性适配体进行人工体外合成, 用于靶物质的识别、实验诊断和治疗研究。

1.2 适配体筛选过程 适配体筛选步骤主要包括, (1)筛选方法的选择: 根据研究目的和靶标特点确定适配体应具有的特性, 以此设计具体的 SELEX 筛选方法; (2)寡核苷酸文库的建立: 依据选择的筛选方法建立具有合适长度和足够容量的寡核苷酸组合文库; (3)循环筛选: 以固态化或游离态的靶标为基础, 通过多次循环筛选获得适配体; (4)SELEX 筛选结束后, 对适配体进行测序和特异性修饰, 以提高适配体的选择性。

1.3 适配体筛选技术发展 自上世纪 90 年代以来, SELEX 筛选技术发展比较迅速, 可满足多种不同的筛选需要, 陆续出

^{*} 基金项目: 重庆市科技攻关课题资助项目(CSTC2012gg-yyjs10046); 第三军医大学回国人员启动基金资助项目(SWH2011LC022); 西南医院临床创新基金资助项目(SWH2012LC12); 第三军医大学成果转化基金资助项目(2013XZHO4)。 作者简介: 姚远, 男, 博士, 主要从事临床检验诊断学研究工作。[△] 通讯作者, E-mail: zhangbocq@aliyun. com。