

# 脊髓损伤后Notch信号对神经再生的研究现状\*

李灵玲<sup>1</sup> 周达岸<sup>2,3</sup>

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后首先表现为脊髓组织及结构直接被破坏,继而在损伤局部发生缺血、缺氧、创伤后炎症反应、细胞凋亡等一系列变化,致使神经元变性坏死、神经胶质细胞修复功能被抑制、损伤部位相连的远端轴突出现慢性脱髓鞘改变,进而导致神经功能障碍。且脊髓损伤后的炎性环境使损伤区域聚集大量胶质细胞,并分泌过多的细胞外基质,从而形成瘢痕组织,再次阻碍神经元再生及神经功能恢复。因此针对于SCI的病理机制,目前的研究途径主要从以下三个方面着手:①减少继发损伤,尽最大程度减轻甚至逆转传导阻滞;②改变受损后中枢神经系统的微环境,使之更容易促进神经再生;③应用电刺激等方法恢复神经功能并促进再生<sup>[1]</sup>。

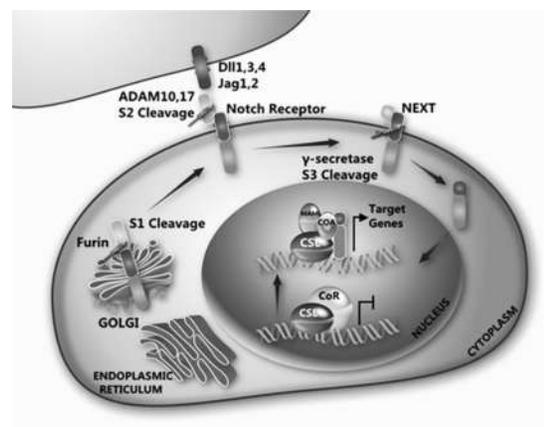
干细胞具有自我更新能力,并可分化为多向干细胞,且具有可塑性生成和修复功能,因此被公认为目前最有前景的疗法,其中神经干细胞、骨髓间充质干细胞、人脐带间质干细胞等均被应用于SCI的治疗<sup>[2-3]</sup>。有研究证实部分低等动物SCI后可自主再生运动神经元,但高等脊椎动物的神经干细胞则不能自主分化为功能性神经元<sup>[4]</sup>,需经分子水平的调控之后,可分化为不同亚型的神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞<sup>[5]</sup>,目前研究中有多种信号通路及细胞因子等调节神经干细胞的自我更新及分化,其中研究最热的莫过于Notch信号,其作为一个高度保守的信号通路,对细胞分化、增殖、凋亡有着决定作用,尤其对中枢神经系统干细胞的维持、分化、体节形成,血管生成等多个发育过程起着十分重要的作用<sup>[6-7]</sup>。

有研究显示在中枢神经系统中,通过敲除小鼠的Notch1受体、RBPj基因,或者 $\gamma$ -分泌酶抑制剂DAPT、配体Delta,使Notch信号被抑制时,神经元可提前生成,若Notch信号激活神经元的分化则会被抑制<sup>[8]</sup>。由此可见Notch信号对细胞生长发育调节起着十分重要的作用。本文基于Notch信号通路对神经再生及神经通路的重建作一综述,以期深入认识神经细胞对SCI的应答机制,给SCI后神经系统损伤的治疗带来新的方向。

## 1 Notch信号通路作用机制

Notch信号通路活化的经典途径为CBF-1/RBP-j依赖途径。当Notch信号通路的受体蛋白和配体相互作用后,Notch基因编码的Notch受体前体蛋白在核糖体合成以后,于S1位点被类 furin 转化酶于反式高尔基车厢切割为位于胞外的N末端片,跨膜的C-末端片段和Notch细胞内结构域(NICD)三部分,其中的两个片段以非共价键形成Notch异源二聚体受体<sup>[9]</sup>。随后Notch受体与其配体于胞外区结合后,经肿瘤坏死因子 $\alpha$ -转化酶(TNF- $\alpha$ -converting enzyme, TACE)作用后,于Notch蛋白的S2位点裂解为2个片段,其中N端的裂解产物(ECN)被配体表达的细胞吞噬,而C端的裂解产物于S3位点进一步被 $\gamma$ -分泌酶( $\gamma$ -Secretase)水解,使Notch胞内结构域(NICD)从质膜转入细胞核,结构域中的RAM域包含一个可与DNA结合蛋白(CSL/RBP-J)高度亲和的位点,而结构域中的锚蛋白重复序列(ANK)与DNA结合蛋白(CSL/RBP-J)形成弱联系,并通过组蛋白乙酰转移酶p300作用,形成转录激活复合体,从而激活碱性-螺旋-环-螺旋(basic helix-loop- helix,bHLH) 家族基因,进而产生Notch信号<sup>[10-12]</sup>,调节神经元分化(图1<sup>[9]</sup>)。

图1 Notch信号通路细胞间的级联反应



DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.04.027

\*基金项目:辽宁医学院校长基金——奥鸿博泽研究生科研创新基金资助

1 辽宁医学院,辽宁省锦州市凌河区松坡路3段40号,121000; 2 辽宁医学院附属第三医院; 3 通讯作者  
作者简介:李灵玲,女,硕士研究生; 收稿日期:2015-01-12

## 2 Notch通路组成

Notch通路的核心组件包括Notch受体、DSL(Delta/serrate/LAG22)配体和CSL[CBF1/Suppressor of Hairless(Su(H))/LAG-1]-DNA结合蛋白三大部分。

Notch受体蛋白是一种约300kD的单链跨膜蛋白,包括胞外区、跨膜区和胞内区三部分,其中胞外区和胞内区为高度保守区域。在哺乳动物体内Notch受体有4个同源基因,即Notch1-4,其各亚型的表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)样重复序列和胞内域的长度不同。其中胞外区含有33—36个EGF样重复序列和3个富含半胱氨酸的Lin12/Notch重复序列(Lin12/Notch repeat, LNR),并具有结合体<sup>[13]</sup>,而胞内区域含有RAM域(RBP2J kappa associated molecular)、锚蛋白重复序列(ankyrin repeats, ANK)、核定位信号(nuclear locating signals, NLS)、翻译启动区(translational active domain, TAD)和PEST[(Proline, P(脯氨酸); Glutamate, E(谷氨酸); Serine, S(丝氨酸); Threonine, T(苏氨酸)]结构域,此结构在细胞间蛋白相互作用,并在细胞信号转导中起着十分重要的作用<sup>[14-15]</sup>。Tatsumi等<sup>[16]</sup>研究发现,冷冻的受伤大脑皮质细胞内有瞬时表达的Notch1阳性细胞,且证实可激活Notch信号并调节神经系统发育;近年的研究也发现Notch1受体及其相关蛋白在成年动物脑内海马区持续表达,表明在成熟分化的神经系统中该信号通路仍然起着作用,且Notch1受体也是最常被检测到的Notch受体家族成员,常用于实验指标检测。

Notch配体又被称为DSL(Delta/serrate/LAG22)蛋白,也是I型跨膜蛋白,包含Delta样配体,分别为Delta-like1,3,4; Serrate样配体,分别为Jagged 1,2,其胞外区含有数量不等的EGF样重复序列及N端DSL结构域<sup>[17]</sup>,并具有数量不同的表皮生长因子样重复序列,而保守的N端为Notch受体结合和活化所必需的DSL基序。其中Serrate样配体还有一个富含半胱氨酸区域,而Delta样配体则无此区域<sup>[18]</sup>。

CSL是哺乳动物中C端启动子联合因子1(C promoter Binding Factor-1, CBF1)、果蝇中Su(H)、线虫中Lag-1首位字母缩写,哺乳动物中CBF1蛋白又称为RBP-J,是Notch信号目前唯一已知的转录因子<sup>[19-20]</sup>。

碱性螺旋-环-螺旋(basic helix loop helix, bHLH)基因的表达是Notch信号通路的直接靶基因,并控制Notch通路活性<sup>[21]</sup>。

bHLH基因有抑制型和促进型两类,前者包括Hes1、Hes3、Hes5等,后者包括math、mash1 /hash1、ngn等,其中Mash-1是哺乳动物早期神经分化发育的关键基因,其在哺乳动物的神经发生中具有非常重要的作用<sup>[22]</sup>。且Mash-1在中枢神经系统发育过程中通过Notch信号调控转录,与bHLH转录因子激活物E47形成异源二聚体并促进NSC向

神经元分化,而抑制型bHLH转录因子与E47形成非功能性异源二聚体,抑制异源二聚体的形成。促进型bHLH基因Mash-1的上游基因为Hes基因,哺乳动物的Hes基因有7个亚型,其中的Hes1亚型是神经元分化的抑制剂,可通过结合启动子部位而抑制Mash1的表达与活性,因其只在神经干细胞中表达,因此可抑制NSC向神经元分化<sup>[22-23]</sup>。在胚胎脑组织中,Hes1基因敲除的小鼠中神经干细胞过早地分化为神经元<sup>[24]</sup>。若神经干细胞中Hes1表达增加,神经干细胞则趋向于分化为神经元,若Hes1缺失,神经元分化则会明显增加<sup>[25]</sup>。由此可见Hes1是Notch信号重要的感受器<sup>[26]</sup>,抑制Hes1基因可促进神经再生。

## 3 Notch通路对神经干细胞的影响

神经干细胞(NSCs)于1992年由Reynolds等<sup>[27]</sup>分离,并指出NSCs可在体外不断增殖并具有多种分化潜能,从而打破了神经细胞不能再生的传统理论,而神经干细胞的增殖和分化的调控均依赖于Notch信号,并通过调控bHLH家族基因调节其分化为胶质细胞或者神经元<sup>[28]</sup>。Notch信号激活后抑制神经元分化,Notch通路对于神经发生有着重要的作用,通过对bHLH家族基因的调控达到对干细胞的调控,当激活型的bHLH基因高表达时,神经干细胞可分化为神经元,若抑制型bHLH基因高表达,神经干细胞则维持其自身特性,并向胶质细胞分化。脊髓损伤后神经干细胞的具体分化机制目前尚不明确,但是通过Notch通路对神经干细胞的调控仍可产生大量的新生神经元,我们称之为神经发生(neurogenesis)现象。随着近年来对神经干细胞的研究不断深入,相关研究也表明神经干细胞自我更新后神经元也会相应的出现增殖现象<sup>[29]</sup>。Pierfelice T等<sup>[30]</sup>通过研究证实,Notch信号通路不仅在胚胎发育过程中,而且在成年动物体内都可使NSCs保持自身细胞特性并抑制神经增殖,从而分化为神经细胞。在中枢神经系统的发育过程中,Notch信号可通过旁侧抑制(lateral inhibition)途径实现不同细胞的分化,即Notch信号激活后可负调控其配体表达,从而使某种细胞的配体表达增加,进而减少Notch信号的配体表达,从而使神经干细胞分化为神经细胞。相反,如果Notch信号被抑制,其配体Jag1的表达量则会增加<sup>[31]</sup>。王凯等<sup>[32]</sup>研究发现,激活Notch通路会抑制人骨髓间充质干细胞分化;而阻断Notch通路,人骨髓间充质干细胞可向神经细胞的分化,若加用分化因子、神经营养因子等处理,则可高效地诱导其分化为神经细胞。由此可看出,若Notch信号通路被抑制,可促进干细胞分化为神经元,使神经再生成为可能。

## 4 Notch通路对胶质细胞的影响

Notch信号对于胶质细胞命运的决定作用体现在时间及

前后环境,在斑马鱼视网膜的发育过程中,过量表达的NICD使神经形成的过程中胶质细胞大量增殖<sup>[33]</sup>。目前研究也发现,Notch通路不仅涉及到神经元的形成,在SCI后的24h内可观察到NSC增殖活化,活化的室管膜细胞也可分化成胶质细胞<sup>[34]</sup>,胶质细胞在SCI的早期可维持局部微环境稳定,但是持续增生的胶质细胞则诱导胶质瘢痕形成,并阻碍神经再生。胶质瘢痕的主要组织为星形胶质细胞,有研究认为其通过Notch通路中的Jagged1介导并调节神经再生<sup>[35]</sup>。反应性增生的星形胶质细胞合成胶质细胞源性神经营养因子,进一步促进神经再生。但是也有部分学者认为Notch信号对于NSCs分化方向的调控未起作用。

### 5 Notch通路对脊髓损伤后神经再生的影响

神经环路的重建涉及轴突、树突、神经元等多个水平,主要通过损伤神经的轴突残端发芽,并逐步延伸至相应的靶细胞,形成具有功能的突触联系,从而使神经环路得以建立,并逐渐恢复神经对靶细胞的支配能力。SCI后虽有大量细胞再生,但其自然病程并不是神经中枢的再生修复而是形成胶质瘢痕,并阻碍轴突的再生修复和组织重建,而髓鞘的大量脱失,也阻碍着神经再生,均使脊髓损伤后患者功能恢复受限<sup>[36]</sup>。现已证明Notch信号参与有丝分裂后神经元结构成熟的过程,刺激轴突分支,抑制其生长<sup>[37]</sup>,而Vanessa等<sup>[33]</sup>研究也发现,若成年斑马鱼Notch信号核转移过程中断,则会使大部分细胞停止于有丝分裂的S期,并导致神经发生增加。Dias等<sup>[38]</sup>还发现,脊髓损伤的斑马鱼中,其Notch信号通路可控制运动神经元的再生。由此可见,神经干细胞的分化方向在很大程度上决定了神经再生的可能性<sup>[39]</sup>。若激活中枢神经系统的Notch信号通路,则会抑制神经元轴突生长,甚至引起其回缩,使神经再生受到阻碍;若Notch信号被抑制则可促进神经元轴突的延伸<sup>[40]</sup>。综上所述,Notch通路对神经环路重建有着重要的影响。但是Notch信号对于神经再生的具体调节机制目前研究不甚清楚,需要我们进一步的探索。

### 6 小结

随着Notch信号作用机制的研究,我们可以肯定其对神经再生有着不可磨灭的重要作用,为神经再生提供了治疗思路及治疗途径,尤其是脊髓损伤后神经环路的重建,涉及患者今后的日常生活,是十分重要的研究思路,但是基于Notch信号对神经损伤后的调控十分复杂,目前研究尚不清晰,故需要深入的对此机制进行深入的研究,为神经重建寻找新的理论支持,并为脊髓损伤提供更广泛的治疗思路。

### 参考文献

[1] Hamid S, Hayek R. Role of electrical stimulation for rehabili-

tation and regeneration after spinal cord injury: an overview [J]. *European Spine Journal*, 2008, 17(9): 1256—1269.

[2] Wang LJ, Zhang RP, Li JD. Transplantation of neurotrophin-3 expressing bone mesenchymal stem cells improves recovery in a rat model of spinal cord injury [J]. *Acta Neurochirurgica*, 2014, 156(7): 1409—1418.

[3] Yasugi T, Fischer A, Jiang Y, et al. A Regulatory transcriptional loop controls proliferation and differentiation in drosophila neural stem cells [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e97034.

[4] Barreiro-Iglesias A. Targeting ependymal stem cells in vivo as a non-invasive therapy for spinal cord injury [J]. *Dis Model Mech*, 2010, 3(11—12): 667—668.

[5] Fleiss B, Guillot PV, Titomanlio L, et al. Stem cell therapy for neonatal brain injury [J]. *Clin Perinatol*, 2014, 41: 133—148.

[6] Lassiter RN, Ball MK, Adams JS, et al. Sensory neuron differentiation is regulated by notch signaling in the trigeminal placode [J]. *Stem Cell*, 2010, 344(2): 836—848.

[7] de Oliveira-Carlos V, Ganz J, Hans S, et al. Notch receptor expression in neurogenic regions of the adult zebrafish brain [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e73384.

[8] Lassiter RN, Ball MK, Adams JS, et al. Sensory neuron differentiation is regulated by notch signaling in the trigeminal placode [J]. *Stem Cell*, 2010, 344(2): 836—848.

[9] Groeneweg JW, Foster R, Growdon WB, et al. Notch signaling in serous ovarian cancer [J]. *Journal of Ovarian Research* 2014, 7(1): 1—24.

[10] Maier E, Nord H, von Hofsten J, et al. A balance of BMP and notch activity regulates neurogenesis and olfactory nerve formation [J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e17379.

[11] Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, et al. Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(6): 733—740.

[12] Gerhardt DM, Pajcini KV, D'altri T, et al. The Notch1 transcriptional activation domain is required for development and reveals a novel role for Notch1 signaling in fetal hematopoietic stem cells [J]. *Genes Dev*, 2014, 28(6): 576—593.

[13] Yoo AS, Bais C, Greenwald I. Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in *C. elegans* vulval development [J]. *Science*, 2004, 303(5658): 663—666.

[14] Rebay I, Fehon RG, Tsakonas AS. Specific truncations of *Drosophila* Notch define dominant activated and dominant negative forms of the receptor [J]. *Cell*, 1993, 74(2): 319.

[15] Radtke F, Schweisguth F, Pear W. The Notch gospel [J]. *EMBO Rep*, 2005, 6(12): 1120—1125.

[16] Tatsumi K, Okuda H, Makinodan M, et al. Transient activation of Notch signaling in the injured adult brain [J]. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2010, 39(1): 15—19.

- [17] Fan RH, Li J, Wu N, et al. Late SV40 factor: a key mediator of Notch signaling in human hepatocarcinogenesis[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(29): 3420—3430.
- [18] 付亚娟, 叶枫. Notch信号通路的研究现状[J]. *医学分子生物学杂志*, 2007, 4(5): 447—450.
- [19] Castel D, Mourikis P, Bartels SJ, et al. Dynamic binding of RBPJ is determined by Notch signaling status[J]. *Genes & Development*, 2013, 27(11): 1313.
- [20] Matsumoto A, Onoyama I, Sunabori T, et al. Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of “stemness” and neuronal-glia differentiation in neural stem cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(15): 13754—13764.
- [21] Radosevic M, Fargas L, Alsina B. The role of her4 in inner ear development and its relationship with proneural genes and Notch signalling[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e109860.
- [22] 赵斌, 汉华, 白登彦. 信号转导通路在神经干细胞分化及其修复脊髓损伤过程中的作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(51): 10159—10162.
- [23] 刘媛, 王止国, 伍亚民. Hes基因在神经干细胞发育中的作用[J]. *中国临床神经科学*, 2010, 18(1): 92—95.
- [24] Glubb DM, Joyce PR, Kennedy MA. Expression and association analyses of promoter variants of the neurogenic gene HES6, a candidate gene for mood disorder susceptibility and antidepressant response[J]. *Neuroscience Letters*, 2009, 460(2): 185—190.
- [25] Bai G, Sheng N, Xie Z, et al. Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1[J]. *Dev Cell*, 2007, 13(2): 283—297.
- [26] 蔚洪恩. Hes基因在神经发育中的作用[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2007, 34(3): 287—289.
- [27] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707—1710.
- [28] Matsumoto A, Onoyama I, Sunabori T, et al. Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of “stemness” and neuronal-glia differentiation in neural stem cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(15): 13754—13764.
- [29] Kaneko N, Sawamoto K. Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions[J]. *Neurosci Res*, 2009, 63(3): 155—164.
- [30] Pierfelice T, Alberi L, Gaiano N. Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks[J]. *Neuron*, 2011, 69(5): 840—855.
- [31] Hartman BH, Reh TA, Bermingham-McDonogh O. Notch signaling specifies prosensory domains via lateral induction in the developing mammalian inner ear[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(36): 15792—15797.
- [32] 王凯, 赵斌, 王栓科, 等. Notch信号转导通路在神经修复与再生中的激活效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 23(14): 4351—4354.
- [33] de Oliveira-Carlos V, Ganz J, Hans S, et al. Notch receptor expression in neurogenic regions of the adult zebrafish brain[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e73384.
- [34] Shah SK, Jimenez F, Walker PA. Progenitor cell therapy for neurological injury[M]. Totowa: Humana Press, 2011. 69—95.
- [35] Wilhelmsson U, Faiz M, de Pable Y, et al. Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated Notch pathway[J]. *Stem Cell*, 2012, 30(10): 2320—2329.
- [36] Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, et al. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(4): 470—482.
- [37] Yoon KJ, Lee HR, Jo YS, et al. Mind bomb-1 is an essential modulator of long-term memory and synaptic plasticity via the Notch signaling pathway[J]. *Mol Brain*, 2012, 5(1): 40.
- [38] Dias TB, Yang YJ, Ogai K, et al. Notch signaling controls generation of motor neurons in the lesioned spinal cord of adult zebrafish[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2012, 32(9): 3245—3252.
- [39] 梁锐超, 方芳. 内源性神经干细胞在中枢神经系统创伤修复中的研究进展[J]. *华西医学*, 2014, 29(1): 150—154.
- [40] Imayoshi I, Sakamoto M, Yamaguchi M, et al. Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains[J]. *Neurosci*, 2010, 30(9): 3489—3498.