

激活 Notch 信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化

鲁茁壮 吴祖泽 张群伟 王 华 贾向旭 段海峰 王立生*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850. * 联系人, E-mail: wangls@nic.bmi.ac.cn)

摘要 Notch 是影响细胞分化的重要信号通路之一. RT-PCR 检测到人骨髓来源的间充质干细胞(MSC)表达 Notch1, 其配体 Jagged1 及下游分子 DTX1, 表明 Notch 信号可能调节 MSC 的增殖分化. Notch1 胞内区(ICN)是 Notch 蛋白的活性形式, 通过载体介导将 ICN 转染细胞就可以在没有配体存在的条件下激活 Notch 信号. 我们克隆了 ICN 基因, 构建了携带 ICN 的逆转录病毒载体, 感染 MSC 后用地塞米松(DEX)诱导其向成骨细胞分化. 转染 ICN 激活 Notch 信号的 MSC 较对照细胞在分化过程中碱性磷酸酶活力升高, 钙的沉积增加, 表明 Notch 信号有促进 MSC 向成骨细胞分化的作用.

关键词 Notch 信号 间充质干细胞 成骨细胞 地塞米松 分化

Notch 信号是细胞与细胞之间直接作用的主要信号通路之一, 并对多细胞生物中细胞命运的决定起关键作用^[1]. Notch 基因编码一种膜蛋白受体, 它的配体也是膜蛋白, 在邻近细胞上表达. 当 Notch 与邻近细胞表面的配体相结合, 其胞内区(the intracellular domain of Notch, ICN)被切割, 从细胞膜上脱离, 转运进入细胞核并与 Notch 下游分子相互作用以传递 Notch 信号^[1,2]. 研究表明, ICN 是 Notch 的活性形式, 通过载体介导将 ICN 转染细胞就可以在没有配体存在的条件下激活 Notch 信号, 为研究 Notch 信号的生物功能提供了方便.

骨髓中除存在造血干细胞外, 其基质中还存在另一类干细胞——间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC), MSC 可以分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞、肌肉细胞甚至神经细胞^[3], 有很好的临床应用前景^[4], 不但是组织工程重要的种子细胞, 也可以作为基因治疗的载体细胞. 目前, 对 MSC 的研究多集中于其分化特性上, 对其分化机理的研究还不多, 对 MSC 分化机理的研究将有助于 MSC 的应用.

由于 Notch 信号对细胞分化调控的广泛性, 推测 Notch 对 MSC 的分化也有调控作用. 我们用 RT-PCR 的方法观察了 Notch 相关分子在 MSC 细胞的表达, 并进一步利用逆转录病毒介导 ICN 转染人骨髓 MSC, 观察了 ICN 对 MSC 向成骨细胞分化的影响.

1 材料和方法

(i) 细胞培养. MSC 的分离培养按标准方法进

行^[5], 在含 10% 胎小牛血清(Hyclone)的低糖 DMEM 培养基中培养; 逆转录病毒包装细胞 GP+E-86 和 PA317 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养. 培养条件均为 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度.

(ii) RT-PCR 检测细胞 Notch1 及相关分子的表达. 提取细胞总 RNA, 以 Oligo(dT)₁₈ 为引物, 用逆转录酶 AMV 于 47 °C 逆转录为 cDNA. 以 cDNA 为模板用 PCR 检测 Notch1, Dll-1, Jagged1 及 DTX1 基因表达, β -actin 基因作对照. 所用引物: Notch1 (AF308602): 上游 5'-ctt tga gac tgg ccc acc t-3', 下游 5'-agt ttt gtg gct gca cct gct-3', 产物长 374 bp; Dll-1 (AF196571): 上游 5'-gac gga gac cat gaa caa cc-3', 下游 5'-ttg cta tga cgc act cat cc-3', 产物长 404 bp; Jagged1 (AF003837): 上游 5'-gaa ccc gat caa gga aat ca-3', 下游 5'-ggc ttt ctg ctg gtg ttt gt-3', 产物长 430 bp; DTX1 (NM_004416): 上游 5'-tca cta tcg gca cgt cca a-3', 下游 5'-ctg gcg aag gag gca ttt-3', 产物长 246 bp; β -actin (NM_001101): 上游 5'-ggg acc tga cta act acc tc-3', 下游 5'-cag tga tct cct tct gca tc-3', 产物长 398 bp. β -actin 的扩增条件为: 97 °C 预变性 3 min, 补加 Ex-Taq (TaKaRa 公司); 95 °C 变性 25 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环. 其他基因的扩增条件(touch-down PCR)为: 97 °C 预变性 3 min, 补加 Ex-Taq; 95 °C 变性 25 s, 60 °C 退火 30 s, 每次循环退火温度均比上次降低 0.3 °C, 72 °C 延伸 30 s, 20 个循环; 95 °C, 25 s, 54 °C, 30 s, 72 °C, 30 s, 25 个循环. 琼脂糖凝胶电泳显示结果.

(iii) 克隆人 Notch1 胞内区基因(ICN)构建逆转录病毒载体(pLXSN-ICN). 提取人白血病细胞 K562 总 RNA, 以 Oligo(dT)₁₈ 为引物用逆转录酶 AMV-XL 在 47°C 逆转录为 cDNA, 再以 cDNA 为模板用 La-Taq, GC 缓冲液 I (TaKaRa 公司) 的扩增体系进行 PCR. 引物为 5'-atg ttc cct gag ggc ttc aa-3' (上游) 和 5'-tta gtt ttg tgg ctg cac ctg ct-3' (下游). 反应条件(Touch-down PCR)为: 98°C 预变性 3 min, 补加 La-Taq; 95°C 变性 30 s, 61°C 退火 60 s, 每次循环退火温度均比上次降低 0.3°C, 72°C 延伸 2 min, 20 循环; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 15 循环. 扩增的人 ICN 连同添加的起始密码子 ATG 与终止密码子 TAA 共长 1869 bp, 编码 Notch1 蛋白的 1769~2390 位氨基酸残基(包括除 PEST 结构域以外的 Notch1 胞内区). 回收 PCR 产物(1869 bp)并克隆到 T 载体(pGEM-T easy)中, 测序后, 用 EcoR I 切下目的基因, 亚克隆到逆转录病毒载体 pLXSN(CLONTECH)得到 pLXSN-ICN.

(iv) 重组逆转录病毒的制备及对 MSC 的感染. 采用了乒乓扩增的方法制备病毒. 脂质体包裹载体质粒先感染包装细胞 GP+E-86, 24 h 后换液, 每 24 h 收获 1 次瞬时病毒上清, 连续 3 次. 将收获的病毒上清再感染包装细胞 PA317, 每 12 h 感染 1 次, 连续 4 次. 培养 24 h 后, 细胞按 1:30~1:150 的比例传代并用 800 µg/mL G418 筛选. 混合得到的抗性克隆, 扩大培养制备病毒上清. 对数生长期的 MSC 用制备的病毒上清连续感染 3 次, 每次间隔 1 d, 用 200~400 µg/mL G418 筛选后, 混合得到的抗性克隆用于诱导分化实验.

(v) Northern blot 检测感染后 ICN 在 MSC 的表达. 用 T 载体上切下的 ICN 片段制备探针, Northern blot 的方法检测 ICN 在病毒感染后 MSC 的表达.

(vi) MSC 向成骨细胞的诱导分化. 按 $3 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 细胞/cm² 的密度将 MSC 接种于 24 孔板, 每孔加入 0.6 mL 培养基(低糖 DMEM, 10% 胎牛血清). 培养 20~24 h 后, 更换新鲜培养基并补加成骨分化诱导液(10 nmol/L 地塞米松, 1 mmol/L β-甘油磷酸钠, 0.05 mmol/L 抗坏血酸磷酸), 每 3~4 d 换液 1 次. 培养 1~4 周, 期间检测 MSC 成骨分化的指标.

(vii) 细胞碱性磷酸酶(ALP)活力的定量测定^[5,6]. 吸出培养有 MSC 的 24 孔培养板中培养基, 用 Tyrode's BBS 每孔 0.8 mL 洗涤细胞 2 次. 加入碱性磷酸酶检测试剂工作液(5 mmol/L 磷酸对硝基苯酚, 1 mmol/L 氯化镁, 50 mmol/L 甘氨酸, pH 10.5), 每孔

0.4 mL, 37°C 放置 5~20 min, 以无细胞的空白孔作对照. 其间, 96 孔培养板每孔预加 25 µL 3 mol/L NaOH 终止液, 从 24 孔板吸出 100 µL 酶促反应液至 96 孔培养板中, 405 nm 波长酶联仪测定光吸收值(A 值). 依据朗伯-比耳定律, 参考酶促反应产物对硝基苯酚(p-nitrophenol)的摩尔吸光系数, ALP 活力可用单位时间内产物的生成量来表示. 用比色法测定培养孔中 MSC 的细胞数. 吸出培养基, 用 Tyrode's BBS 洗涤细胞 2 次, 1% 戊二醛室温固定 15 min. 蒸馏水冲洗, 稍许干燥后每孔加入 0.4 mL 0.1% 结晶紫水溶液染色 30 min. 吸弃染色液, 蒸馏水冲洗, 甩尽水滴晾干. 每孔加入 0.4 mL 1% Triton X-100, 室温振摇 1~4 h 至染料大部分溶解为止. 从各孔吸出 100 µL 加到 96 孔培养板相应的孔中, 570 nm 测定 A 值. A 值与细胞数成正比, 从标准曲线上查得绝对细胞数. 将每孔测得的 ALP 活力除以相应的细胞数即可得到单位细胞数的 ALP 活力.

(viii) 钙沉积的定量测定(邻甲酚酞络合酮比色法)和组化染色(von Kossa 染钙法). 将诱导分化后的 MSC 细胞(24 孔板培养)用 PBS 洗 2 遍, 每孔加入 0.4 mL 0.5 mol/L 的 HCl, 刮下细胞层, 振摇 4~6 h. 将试剂盒(购自北京中生物生物工程高技术公司)R1, R2 液 1:1 混合成工作液. 从振摇后的 24 孔板每孔移取 4 µL 液体至 96 孔培养板, 在 96 孔板相应孔中每孔加入 200 µL 工作液, 室温放置 5 min, 570 nm 波长酶联仪测定 A 值. 用 von Kossa 染钙法进行了钙沉积的组化染色^[5].

(ix) 双侧等方差学生 t 检验统计分析每两组之间数据的差异.

2 结果

2.1 MSC 表达 Notch1, Jagged1 及 DTX1

RT-PCR 检测到人骨髓 MSC 表达 Notch1, 配体 Jagged1 及下游分子 DTX1(图 1), 提示 Notch 信号可能在 MSC 的增殖或分化中发挥作用. Notch 的另一个配体 DIII 的表达在本实验中没有检测到, 说明 MSC 可能不表达 DIII.

2.2 携带 ICN 基因的逆转录病毒载体(pLXSN-ICN)的构建、逆转录病毒的制备及对 MSC 的感染

用 PCR 方法从 K562 细胞 cDNA 扩增得到 ICN 片段, 克隆到 T 载体测序, 序列与报道的一致. 从 T 载体切下 ICN 连接到逆转录病毒载体 pLXSN 上, 限制酶切鉴定, 所得的片段大小与预期的一致(图 2), 说明载体构建成功. 选用 pLEGFP-C1 作为 pLXSN-

ICN 的对照, pLEGFP-C1 与 pLXSN 的区别在于前者多一个以 CMV 为启动子的增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, GFP) 的表达盒, 两种载体的其余序列相同. GFP 是普遍使用的报告基因, 可以方便地检测病毒的感染情况.

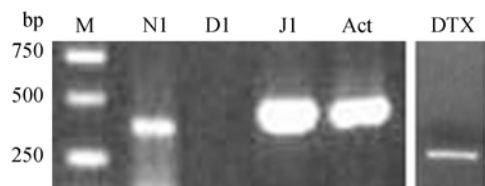


图1 人骨髓间充质干细胞(MSC)Notch1 及相关分子的表达

RT-PCR 检测到 MSC 表达 Notch1(N1), Jagged1(J1)及 DTX1(DTX), 但 Dll1(D1)的表达没有检测到. M 示 DL2000 DNA Marker, Act 示 β -actin 阳性对照

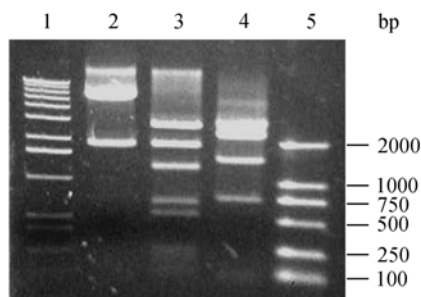


图2 pLXSN-ICN 的酶切鉴定

1 和 5 示 DNA Marker; 2 示 *EcoR* I 酶切(5874, 1889); 3 示 *Pst* I 酶切(2880, 1908, 1273, 678, 529, 227, 176 等); 4 示 *Pvu* II 酶切(3051, 2357, 1468, 741 等)

质粒转染包装细胞, G418 筛选后制备的病毒上清经过测定, 滴度 $0.5 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$, 没有检测到野生型病毒.

按常规的方法从人骨髓中获得 MSC, 流式细胞仪检测到其表达公认的 MSC 表面分子 CD29, CD105, CD166 和 CD44, 不表达 CD34, CD62L, CD62P, CD45 和 HLA-DR. 体外诱导分化实验显示其有向成骨、成软骨和成肌细胞分化的能力(数据未显示), 说明获得的是 MSC 细胞. 病毒上清重复感染 MSC 3 次, G418 筛选仅有小部分细胞死亡, 推测病毒的感染效率较高. 筛选后, 感染 pLEGFP-C1 的对照细胞 MSC-C 经流式细胞仪检测 GFP 阳性细胞大于 80%. 用 Northern blot 方法检测了感染 pLXSN-ICN 细胞(MSC-N)内 ICN 的表达(图 3), 结果表明 MSC-N 细胞有 ICN 的表达, 对照细胞 MSC-C 和未经病毒感染的 MSC 不表达 ICN. 细胞内源性 Notch1 mRNA 与 ICN 的分子量不

同, 杂交条带的位置不同, 由于外源性 ICN 是过表达的, 在保证 ICN 条带被检出的前提下, 本次实验并没有检测到内源性 Notch1 的表达.

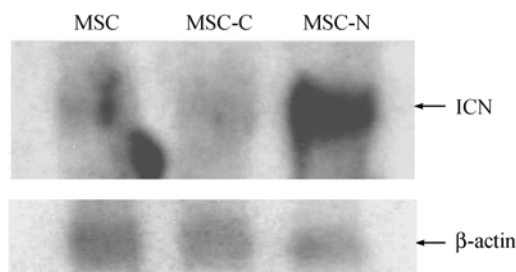


图3 Northern blot 检测 MSC-N 细胞 ICN 的转录

2.3 ICN 促进了 DEX 诱导的 MSC 向成骨细胞分化

向成骨诱导分化 7~10 d 后, 检测细胞 ALP 的活力(图 4), 结果表明, MSC-N 细胞 ALP 活力约为对照细胞(MSC-C 或 MSC)的 1.7 倍, 并有统计学差异($P < 0.05$). 在没有诱导剂存在时, 细胞的 ALP 活力约为有诱导剂时的 1/5~1/10, 仍然是 MSC-N 的 ALP 活力较高.

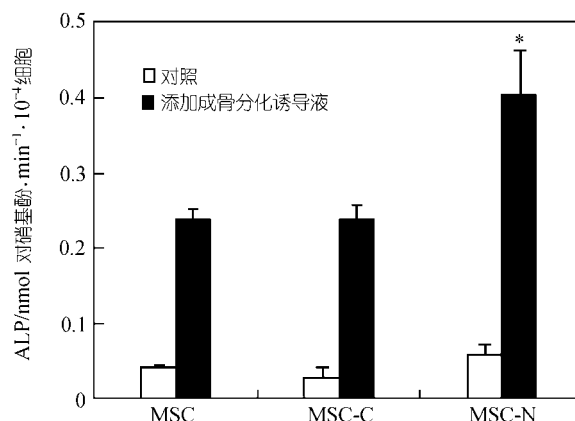


图4 地塞米松诱导分化 8 d 后测定细胞 ALP 活力

* 示添加成骨分化诱导液 MSC-N 细胞 ALP 活力与 MSC 或 MSC-C 相比, $P < 0.05$, $n = 3$

在向成骨诱导分化 3~4 周后, 用定量和组化的方法分别检测细胞外基质中钙的沉积(图 5). 诱导分化后, MSC, MSC-C 和 MSC-N 细胞的钙沉积都增加, 而 MSC-N 的钙沉积较多, 是 MSC 或 MSC-C 的 2 倍以上, 用 von Kossa 染钙法也得出相同结果.

较高的 ALP 活力和细胞外钙沉积是成骨细胞的基本特征, 在 MSC 过表达 ICN, 细胞的 ALP 活力增强, 钙沉积增多, 说明激活 Notch 信号能够促进 DEX 诱导 MSC 向成骨细胞分化.

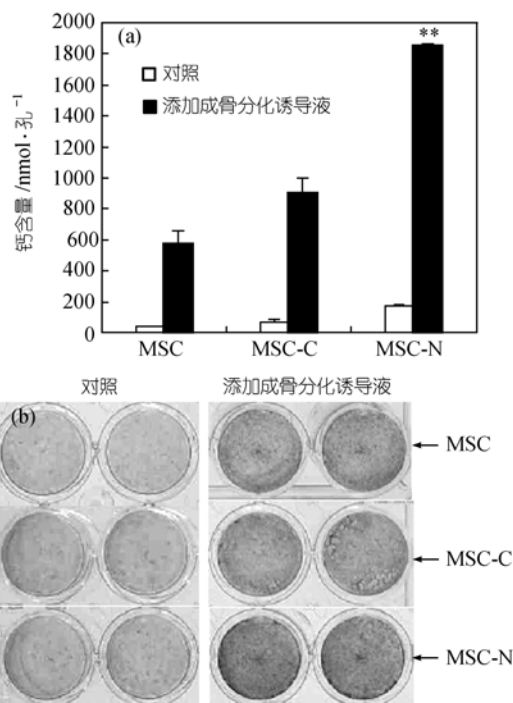


图 5 向成骨诱导分化 3 周后定量和组化检测细胞外基质中钙的沉积

(a) 诱导 3 周后, MSC-N 细胞钙沉积是 MSC 或 MSC-C 的 2 倍以上, 并有统计学差异 ($P < 0.01$, $n = 3$)。 (b) 组化染色的结果也表明 MSC-N 细胞钙沉积较多

3 讨论

在多细胞生物发育过程中, Notch 信号对细胞的命运决定起关键作用^[1], 果蝇眼、肌肉、神经、翅膀, 哺乳动物的神经、肌肉、造血发育均受到 Notch 信号的调控, 几乎所有涉及细胞分化的生命活动都有 Notch 信号的参与。成骨细胞分化的调控已经有较多的研究^[7,8], 但 Notch 信号是否参与其中目前还没有明确的结论。Schnabel 等人^[9]用 RT-PCR 的方法观察了成骨细胞分化过程中 Notch 相关基因的表达情况, 发现 Notch1 在诱导后瞬时升高。Tezuka 等人^[10]利用腺病毒介导将 ICN 转染到成骨细胞系 MC3T3-E1, 培养 50 d 以后 von Kossa 染钙观察到钙沉积较对照高, 在人 MSC 他们也得出类似的结果, 提示 Notch 有促进成骨细胞分化的作用。

骨髓来源的 MSC 是一种多能干细胞, 可以分化为成骨细胞、成软骨细胞、成脂肪细胞、肌肉细胞甚至神经细胞^[3], 目前对 MSC 的研究多集中于其分化特性上, 对其分化机理的研究还不多。我们采用逆转录病毒载体, 用定量的指标观察了 ICN 对 MSC 向成骨细胞分化的影响。RT-PCR 显示 MSC 表达 Notch1, 配体

Jagged1 及下游分子 DTX1, 提示 Notch 信号可能对 MSC 的增殖分化有调控作用。通过逆转录病毒介导转染 ICN 激活 Notch 信号, 在诱导 MSC 向成骨分化过程中, 碱性磷酸酶活力升高, 钙的沉积增加, 表明 Notch 信号有促进 MSC 向成骨细胞分化的作用。实验中, 我们注意到仅仅通过转染 ICN 激活 Notch 信号不足以诱导 MSC 向成骨细胞分化, 还必须有诱导剂的存在, 说明向成骨分化过程中 Notch 信号的调控不是主要的, 它可能对其他信号起协同作用。Notch 信号如何与其他信号相联系? 其是否也影响 MSC 向其他类型细胞分化? 这方面还需要进一步的研究。最近的报道显示 Notch 信号有抑制成骨细胞分化的作用^[11,12], 作者都选用细胞系为模型, 这些细胞系是成骨细胞的前体细胞, 与具有多向分化潜能的 MSC 不同, 它们的分化方向已经决定, 即只能向成骨细胞分化。Notch 信号在不同类型的细胞有不同的生物学作用, 它对 MSC 和这些细胞系分化的影响不同是有可能的。

致谢 本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999053900 和 2002CB7138004)和国家自然科学基金(批准号: 30270500 和 30370528)资助项目。

参 考 文 献

- Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science*, 1999, 284(5415): 770~776[DOI]
- Arias A, Zecchini V, Brennan K. CSL-independent Notch signaling: A checkpoint in cell fate decisions during development? *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(5): 524~533[DOI]
- Minguell J J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood), 2001, 226(6): 507~520
- Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, 2000, 28(8): 875~884[DOI]
- Jaiswal N, Haynesworth S E, Caplan A I, et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J Cell Biochem*, 1997, 64(2): 295~312[DOI]
- 张秀明, 编. 现代临床生化检验学. 北京: 人民军医出版社, 2001. 1243~1244
- Hoffmann A, Gross G. BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2001, 11(1~3): 23~45
- de Crombrughe B, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13(6): 721~727[DOI]
- Schnabel M, Fichtel I, Gotzen L, et al. Differential expression of Notch genes in human osteoblastic cells. *Int J Mol Med*, 2002, 9(3): 229~232
- Tezuka K, Yasuda M, Watanabe N, et al. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(2): 231~239
- Shindo K, Kawashima N, Sakamoto K, et al. Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by Notch signaling. *Exp Cell Res*, 2003, 290(2): 370~380[DOI]
- Sciaudone M, Gazzero E, Priest L, et al. Notch1 impairs osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology*, 2003, 144(12): 5631~5639[DOI]

(2003-12-18 收稿, 2004-03-02 收修改稿)