

文章编号 :1001-4721(2010)02-0006-06

Notch 信号通路在体外培养的鹿茸干细胞中的表达

耿涛^{1,2}, 杨福合², 邢秀梅², 褚文辉², 孙红梅², 李春义^{2*}

(1.江苏科技大学,江苏 镇江 212018; 2.中国农业科学院特产所,吉林 吉林 132109)

摘要 Notch 信号通路是一条进化上十分保守的信号转导系统,在调节干细胞增殖、分化和凋亡方面起到重要作用。研究表明,鹿生茸区骨膜和角柄骨膜分别含有鹿茸发生和再生的干细胞。应用 RT-PCR 的方法对离体培养生茸区骨膜和角柄骨膜细胞进行检测,得出 Notch 信号通路各信号因子在 2 种细胞中的表达情况。结果 Notch-1、Notch-2、Notch-4、Dll-4、Jagged-1、Jagged-2、Hes-1 等信号因子在这 2 种干细胞中均有不同程度的表达,说明 Notch 信号通路可能参与了他们的增殖、分化的调控。

关键词 Notch 信号通路;生茸区骨膜;角柄骨膜;鹿茸再生

中图分类号:Q786

文献标识码:A

Notch Signaling Pathway Expressed in Cultured Antler Stem Cells Cultured in Sika deer

GENG Tao^{1,2}, YANG Fe-he², XING Xiu-mei², CHU Wen-hui²,
SUN Hong-mei², LI Chun-yi^{2*}

(1.Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China;

2.Institute of Special Wild Economic Animals and Plants, CAAS, Jilin 132109, China)

Abstract Notch signaling pathway is an evolutionarily conserved system and plays an important role in stem cell biology including proliferation, differentiation and apoptosis. To isolate, culture and purify deer antler stem cells including AP and PP cells, expression pattern of notch signaling molecules in the cultured AP cells and PP cells were examined using RT-PCR. Data obtained from RT-PCR showed that the mRNA of Notch-1, Notch-2, Notch-4, Dll-4, Jagged-1, Jagged-2 and Hes-1 had different levels of expression in AP and PP cells, which indicates that notch signaling pathway may be involved in the maintenance of the AP and PP cells.

Key words Notch signal pathway; Antlerogenic periosteum; Pedicle periosteum; Regeneration

收稿日期:2010-01-21

基金项目:自然科学基金(309771664)

作者简介:耿涛(1984-),男,硕士研究生,从事鹿茸再生生物学研究。

*通讯作者:李春义, E-mail: chunyi.li@agresearch.co.nz

鹿角是哺乳动物中唯一能够再生的器官,是研究器官再生的良好的生物学模型。鹿茸虽然为鹿头部的骨质衍生物,但其生长和脱落都在永久性的骨桩,即角柄上进行。研究表明,生茸区骨膜(AP)是角柄和鹿茸发生的组织基础,而角柄骨膜(PP)则是鹿茸再生的组织基础。进一步的研究证明,AP和PP细胞是具有多种分化潜能的干细胞^[1,2]。在干细胞增殖分化调控中,信号通路是目前大多数学者研究的方向,并在干细胞中发现了多条信号通路。因此,在AP、PP细胞中可能存在有1条或者多条信号通路来控制其自我增殖和分化。研究AP和PP2种细胞增殖分化的调控机制对研究鹿茸再生,进而研究器官再生具有深远的意义。

与鹿茸再生模型相近的是啮齿类动物的切牙模型。大鼠的切牙终生不断生长萌出,是一类特殊的牙齿^[3]。白玉娣等^[4]研究表明,Notch信号途径存在于体外培养的根尖蕾细胞中,可能与其中干细胞的增殖、分化功能相关,在维持干细胞的分裂、增殖方面起作用。Notch是进化高度保守的细胞间信号分子,决定其邻近细胞命运。通过结合配体Delta或Jagged在干细胞和周围细胞间传递信号,其主要作用是抑制各种干细胞的分化,促进其分裂增殖^[5]。因此,Notch-delta信号通路可能参与了AP、PP细胞增殖、分化的调控。

Notch信号通路是一条进化上十分保守的信号转导系统。大量的研究表明,notch广泛表达于从无脊椎动物到哺乳动物等多个物种。Notch受体在邻近细胞产生的配体的活化作用下,通过一系列分子间的相互作用,精确地调控各谱系细胞的增殖分化。Notch信号转导通路由受体、配体和DNA结合蛋白3部分组成。果蝇中存在Notch受体和2个配体Delta和Serrate。哺乳动物中有4个同源Notch受体和5个同源配体。其中,同源受体是Notch1-4,同源配体有2类:Delta样配体,分别为Dll1、Dll3、Dll4;Serrate样配体,分别为Jagged1和Jagged2^[6]。DNA结合蛋白(hairy enhancer of split, HES)是notch通路中一种重要的下游靶基因的产物。它是一类含有特征性 α 螺旋-环-螺旋(α HLH)结构的DNA结合蛋白^[4]。目前,在脊椎动物中已克隆了HES1-6共6种HES分子,其中HES1分子表达最为广泛,对其研究也较为深入^[5]。HES分子可结合在特定分化效应基因的启动子上,与转录共抑制分子TLE形成复合物,从而抑制靶基因的转录,在调节多种细胞分化、增殖的Notch信号途径中起关键作用^[6]。Notch信号主要通过促进HES1和HES5基因的转录而下传。HES1、HES5的表达受Notch信号的调节^[7],因此检测HES1、HES5的表达水平可间接反映Notch信号的强弱^[8]。

本试验意在研究Notch信号通路在AP和PP细胞的表达情况,为进一步研究该信号通路的表达水平及调控机制,以及鹿茸发生和再生的调控奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 AP、PP细胞的原代培养 用组织块培养法获得细胞。无菌取骨膜组织,去除结缔组织和凝血,剪成1mm×1mm的小块。1g/L型胶原酶37℃消化一定时间,显微镜下观察消化结果。离心吹打成悬液,接种于10mL DMEM (10%的胎牛血清,1×10⁵U/L青霉素和0.1g/L硫酸链霉素)中,37℃CO₂培养箱内培养。每隔2~3天更换1次培养液。细胞生长达80%融合时,2.5g/L胰蛋白酶消化后按1:3传代,留取第3代细胞备用。

1.1.2 试剂 型胶原酶、胰蛋白酶(sigma公司);DMEM、双抗、胎牛血清、RNA提取试剂盒(invtrigen公司);RT-PCR试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒、PCR试剂、DNA Marker(TaKaRa公司);DMEM培养基(含1×10⁵U/L青霉素和0.1g/L硫酸链霉素,Gibco公司);其它常规试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.3 引物设计与合成 在GeneBank上查找人、小鼠、牛、马、羊等物种的notch信号通路的各基因cDNA序列,经过BioEidt软件进行比对,找出保守区段,应用Primer 5.0设计各基因的引物,送与上海生物工程有限公司合成。引物详细序列见表1。

表 1 引物设计结果

引物名称	序列 (5'→3')	长度 (bp)	物种
Notch-1 F	5' CAATGACCCCTGGCAGAAC 3'	59.72	牛、山羊、马
Notch-1 R	5' CGCCATAGTAGGGGAAGAT 3'	59.85	
Notch-2-1 F	5' TTGCCGTGTGTCATTATCTT 3'	51.09	牛、马、小鼠
Notch-2-1 R	5' TGTCCTCCTTGTTGTGCC 3'	57.56	
Notch-2-2 F	5' ACGAGATGTTCCGTATGG 3'	55.02	牛、马、小鼠
Notch-2-2 R	5' AGTCAGAAGCAGAGTGGG 3'	57.30	
Notch-3 F	5' CCCGATTCTCCTGTCGTT 3'	57.30	人、小鼠、褐鼠
Notch-3 R	5' CACAGCGTATGCCCGTAT 3'	57.30	
Notch-4 F	5' GCCTGCCTCAATGGTTATG 3'	57.56	牛、人、恒河猴
Notch-4 R	5' CTGGAGGAGTCTCACAGTCGTA 3'	61.94	
Dll-3 F	5' GGCACCTTCTCCCTCGTCA 3'	61.88	牛、小鼠
Dll-3 R	5' GGATCTTCACCGCCAACAC 3'	59.72	
Dll-4 F	5' GGTGCTCGTGTACTGTGC 3'	59.72	牛、绵羊、马
Dll-4 R	5' TGCCATTCCCTCTTCTC 3'	57.30	
Jagged-1 F	5' AATGGTTATCGCTGTATCTG 3'	53.70	小鼠、人、褐鼠
Jagged-1 R	5' ACTGTTTCGGGCTATGTT 3'	52.74	
Jagged-2 F	5' GCCTGCCAGAGAAGACTTTG 3'	59.72	小鼠、人、褐鼠
Jagged-2 R	5' GCTGTTCTTGGCGATGGT 3'	57.30	
Hes-1 F	5' GCTGAGCACAGACCAAGT 3'	59.72	牛、马、人
Hes-1 R	5' ATGGAGTCCGCCGTAAGC 3'	59.58	

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 按照 TRIZOL RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测纯度和浓度后, 80℃保存备用^[9]。

1.2.2 RT-PCR 检测 取上步总 RNA 以 Oligo(dT)18

为引物, 按照 PrimeScript™RT-PCR Kit 说明书操作并检测 Notch 通路各基因的表达情况。Notch 信号通路各基因 PCR 反应参数见表 2。取 5 μL PCR 产物, 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2

notch 通路各基因 PCR 反应参数

基因名称	预变性	变性	退火	延伸	延伸	保存
Notch- 1	95℃ 5min	95℃ 30s	60.0℃ 30s	72℃ 40s	72℃ 7min	4℃ ,+∞
Notch- 2	95℃ 5min	95℃ 30s	57.8℃ 30s	72℃ 45s	72℃ 7min	4℃ ,+∞
Notch- 3	95℃ 5min	95℃ 30s	57.3℃ 30s	72℃ 40s	72℃ 7min	4℃ ,+∞
Notch- 4	95℃ 5min	95℃ 30s	60.0℃ 30s	72℃ 50s	72℃ 7min	4℃ ,+∞
Dll- 3	95℃ 5min	95℃ 30s	61.0℃ 30s	72℃ 30s	72℃ 7min	4℃ ,+∞
Dll- 4	95℃ 5min	95℃ 30s	60.0℃ 30s	72℃ 60s	72℃ 7min	4℃ ,+∞
Jagged- 1	95℃ 5min	95℃ 30s	54.0℃ 30s	72℃ 60s	72℃ 7min	4℃ ,+∞
Jagged- 2	95℃ 5min	95℃ 30s	59.0℃ 30s	72℃ 50s	72℃ 7min	4℃ ,+∞
Hes- 1	95℃ 5min	95℃ 30s	60.0℃ 30s	72℃ 60s	72℃ 7min	4℃ ,+∞

1.2.3 DNA 回收 紫外线下切取 notch 信号通路各基因电泳条带, 按照 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 说明书进行 DNA 回收, 紫外分光光度计测定纯度和浓度, 20℃保存备用。

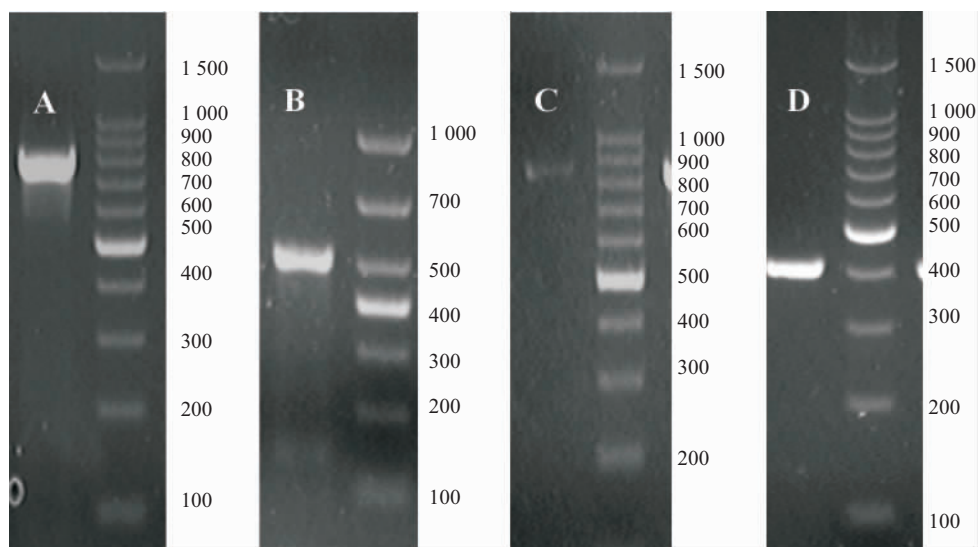
1.2.4 Notch 信号通路各基因克隆与测序 按照 pMDTM19- T Vector Kit 说明书将目的基因片段转移至 pMDTM19- T Vector 中, 送上海生物工程有限公司进行

测序。

2 结果与分析

2.1 Notch 信号通路各节点分子在 AP 细胞中的表达

2.1.1 Notch- 1、2、3、4 基因的表达 在第 2 次传代的 AP 细胞中, Notch- 1、Notch- 2、Notch- 4 基因表达丰富, 没有检测到 Notch- 3 的电泳条带。因此, AP 可能不表达 Notch- 3(见图 1)。

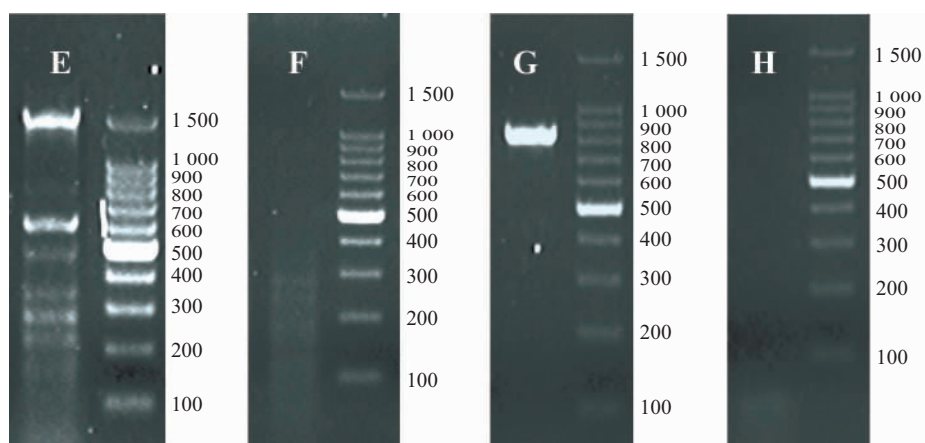


注 :A.notch- 1 ,750 bp ;B.notch- 2 ,513 bp ;C.notch- 3 ,无条带 ;D.notch- 4 ,406bp

图 1 notch- 1、2、3、4 基因在 AP 细胞中的表达

2.1.2 Dll- 3、4 基因的表达 在 AP 细胞中 Dll- 4 分子表达稳定, 并且相比 PP 细胞, AP 细胞多出了 1 条 1500bp 的条带, 而 Dll- 3 分子则几乎检测不到(见图 2)。

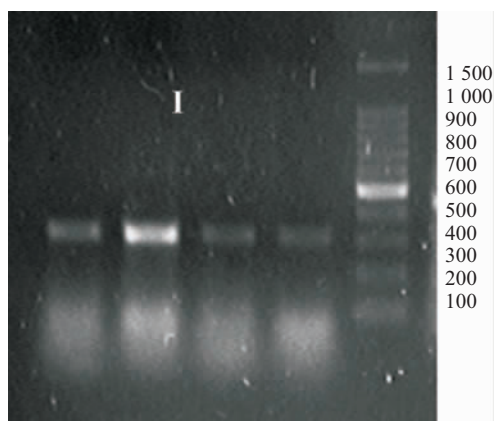
2.1.3 Jagged- 1、2 表达 在 AP 细胞中 Jagged- 1 分子表达丰富而且稳定, 而 Jagged- 2 分子则没有检测到, 见图 2。



注 E.dll-4, 1 500 bp ;F.dll-3, 572 bp ;G.jagged-1, 800bp ;H.jagged-2, 500bp

图 2 Dll-3、4 和 Jagged-1、2 基因在 AP 细胞中的表达

2.1.4 Hes-1 的表达 hes-1 在 AP 细胞中表达, 而且比较稳定, 见图 3。



注 hes-1, 1300bp

图 3 Hes-1 基因在 AP 细胞中的表达

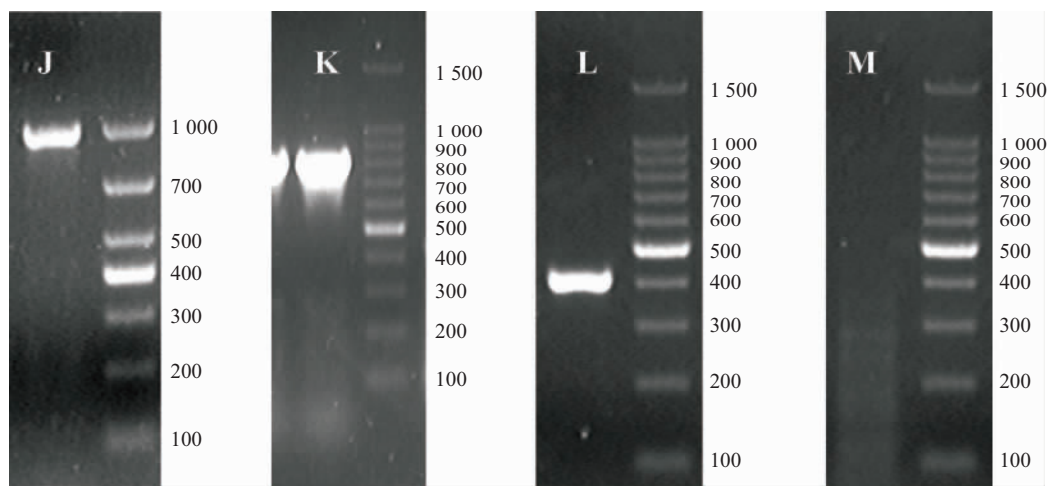
2.2 Notch 信号通路各节点分子在 PP 细胞中的表达

从细胞培养、RNA 提取再到 RT-PCR 均与 AP 细胞同步, 并且使用相同的引物。结果显示 2 种细胞中部分基因的表达有差异。

2.2.1 Notch-1、2、3、4 基因的表达 Notch 基因在 PP 细胞中的表达与 AP 细胞基本一致, 以期通过 Real time-PCR 寻找各基因在表达量上的差异, 见图 4。

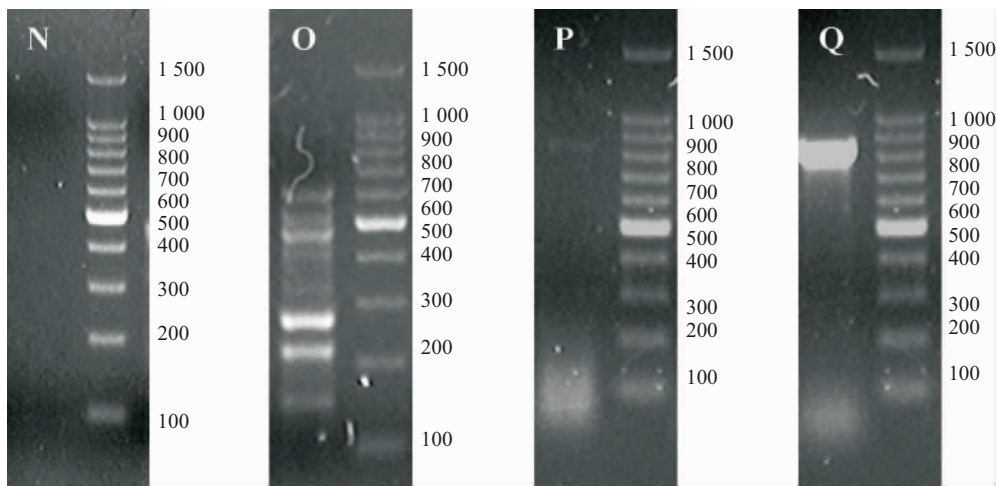
2.2.2 Dll-3、4 基因的表达 Delta 配体家族在 PP 系统中的表达也相对稳定。与 AP 细胞相比, PP 细胞中没有 1 500bp 条带, 而 450 bp 和 270 bp 条带表达丰富。具体的分子机制还有待进一步的研究, 见图 5。

2.2.3 Jagged-1、2 的表达 Jagged 配体家族在 PP 细胞与 AP 细胞中的表达类型基本一致, 有待 Real time-PCR 进一步定量分析, 见图 5。



注 J.notch-2, 986 bp ;K.notch-1, 750 bp ;L.notch-4, 406bp ;M.notch-3, 500bp

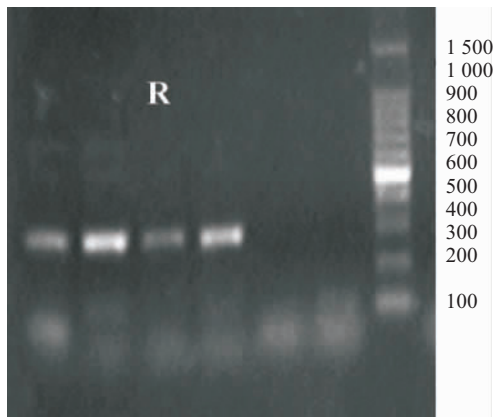
图 4 Notch-1、2、3、4 基因在 PP 细胞中的表达



注 N: dli-3 无条带 O: dli-4 450 bp 270 bp P: jagged-2 无条带 Q: jagged-1 800bp

图5 dli-3、4 和 jagged-1、2 基因在 PP 细胞中的表达

2.2.4 Hes-1 的表达 与 AP 细胞相比,表达条带大小上没有太大的差异,其表达丰度以及二级靶基因还有待进一步的研究。见图 6。



注 hes-1 1300bp

图6 Hes-1 基因在 PP 细胞中的表达

3 讨论

AP、PP 细胞是鹿茸的组织学基础,是研究鹿茸再生模型的出发点。Notch 是进化高度保守的细胞间信号分子,决定其邻近细胞命运。通过结合配体 Delta 或 Jagged 在干细胞和周围细胞间传递信号,其主要作用是抑制各种干细胞的分化,促进其分裂增殖^[5]。

AP、PP 是鹿已分化组织中的细胞,具有干细胞表面标记,并可分化为多种其它组织细胞^[1]。有研究发现,Notch 信号通路对软骨细胞和前列腺上皮细胞的增殖、分化具有重要的调控作用。说明 Notch-delta 信号通路不仅在胚胎干细胞和骨髓充质细胞中起到调控作用,在已分化的组织器官中也同样表达并起到一定的调节作用。Notch 信号可维持关节软骨细胞的增殖,当软骨细胞分化时,该通路中许多分子表达水平明显下降。另外,当

阻断 Notch 信号,则处于增殖状态的细胞显著减少^[13]。而在前列腺上皮细胞中,Notch 信号可平衡细胞的增殖和分化。当信号失活后,上皮细胞持续处于增殖状态,不仅影响正常组织结构的形成,而且在一定程度上促进前列腺肿瘤的发生^[14]。因此,Notch-delta 信号通路很可能调控体外培养的 AP 和 PP 细胞的增殖、分化。

试验结果表明,在 AP 和 PP 细胞中均检测到 Notch-1、Jagged-1 和 Hes-1 的稳定表达,说明 Notch-1/Jagged1/Hes-1 通路^[12]可能参与调控了 AP、PP 细胞的增殖分化。而 notch-4 基因的大量而稳定的表达可能与 PI3K-Akt 通路或者 MAPK 信号通路的调节有关。PI3K-Akt 通路和 MAPK 信号通路可以激活 NF- κ B,而后者可以促进 Notch-delta 信号系统高表达。Dli-4 是 Notch1、2 分子的配体。AP 细胞比 PP 细胞多出一条 1500bp 的条带,说明在 PP 细胞中 dli-4 基因的表达在 mRNA 水平受到了调控,失去了一部分片段的表达,这对下游信号传递与调控可能起到关键作用。Notch-2 基因的稳定表达说明在 AP、PP 细胞中存在有 notch 信号通路的 2 条子通路。目前的研究表明,在哺乳动物中存在有 Notch-1/Jagged-1/Hes-1 和 Notch-4/Dli-4/Hes-1 2 条子通路。而对于 Notch-2/Dli-4 子通路以及该通路的下游调控靶基因还没有见诸报道。鹿中是否存在该条子通路以及是否存在该子通路的并行配体还需要进一步研究。Notch 信号通路在 AP、PP 细胞当中表达的差异,与之相互作用的皮肤细胞是否也表达该通路,是否通过 Notch 通路的节点分子来调控该通路,是否皮肤细胞通过该通路被调控以及该信号通路调控 2 种细胞增殖分化的具体机制还有待进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Chunyi Li. Development of deer antler model for biomedical research[J]. Recent Advances and Research Updates ,2003 ,4 (2) :256-274.
- [2] Chunyi Li ,Fuhe Yang and Allan Sheppard. Adult Stem Cells and Mammalian Epimorphic Regeneration- Insights from Studying Annual Renewal of Deer Antlers[J]. Current Stem Cell Research & Therapy ,2009 ,4(3) :237-251.
- [3] Ohshima H ,Yoshida S. The relationship between odontoblasts and pulp capillaries in the process of enamel and cementum related dentin formation in rat incisors [J]. Cell Tissue Res , 1992 ,268(1) :51-63.
- [4] BAI Yu di et al. Notch 1 expression in the rats' apical bud cells cultured in vitro[J]. Chinese Journal of Conservative Dentistry , 2008 ,18(5) :247.
- [5] Artavan is- Tsakonas S ,Rand M D ,Lake R J , et al. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science ,1999 ,284 :770-776.
- [6] Ito T ,Udaka N ,Ikeda M et al. Significance of proneural basic helix-loop-helix transcription factors in neuroendocrine differentiation of fetal lung epithelial cells and lung carcinoma cells[J]. Histol Histopathol ,2001 ,16(1) :335-343.
- [7] Grynfeld A ,Pahlman S ,Axelson H. Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES- 1 activity and reduced HASH- 1 expression ,is inhibited by Notch1 [J]. Int J Cancer ,2000 ,88(3) :401-410.
- [8] Feder JN ,Jan LY ,Jan YN. A rat gene with sequence homology to the drosophila gene hairy is rapidly induced by growth factors known to influence neuronal differentiation [J]. Mol Cell Biol ,1993 ,13 :105-113.
- [9] Grbavec D ,Stifani S. Molecular interaction between TLE1 and the carboxyl-terminal domain of HES- 1 containing the WR-PW motif[J]. Biochem Biophys Res Commun ,1996 ,223(3) :701-705.
- [10] Beatus P ,Lundkvist J ,Oberg C et al. The origin of the ankyrin repeat region in notch intracellular domains is critical for regulation of HES promoter activity[J]. Mech Dev ,2001 ,104 (1-2) :3-20.
- [11] Karlsson C ,Jonsson M ,Asp J et al. Notch and HES- 5 are regulated during human cartilage differentiation[J]. Cell Tissue Res ,2007 ,327 :539-551.
- [12] Wang X D ,Leow C C ,Zha J et al. Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation[J]. Dev Biol ,2006 ,290 :66-80.
- [13] Purow B W ,Haque R M ,Noel MW et al. Expression of Notch - 1 and its ligands ,delta-like- 1 and jagged- 1 ,is critical for glioma cell survival and proliferation[J]. Cancer Res ,2005 ,65 :2353-2363.
- [14] National Toxicology Program. Carcinogenesis bioassay of melamine(CAS No.108- 78- 1)in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed study) [EB/OL]. (1983) [2009- 12- 10]. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr245.pdf.
- [15] Dobson Roy L M ,Motlagh S ,Quijano M et al. Identification and Characterization of Toxicity of Contaminants in Pet Food Leading to an Outbreak of Renal Toxicity in Cats and Dogs [J]. Toxicological Sciences ,2008 ,106(1) :251-262.
- [16] Lipschitz W L ,Stokey E. The mode of action of three diuretics :Melamine ,adenine and formoguanamine[J].The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics ,1945 ,83(4) :235-249.
- [17] Whitesides G M ,Mathias J P ,Seto C T. Molecular selfassembly and nanochemistry :A chemical strategy for the synthesis of nanostructures[J]. Science ,1991 ,254 :1312-1319.
- (上接第5页)
- and Chemical Toxicology ,2008 ,46 :1196-1200.
- [10] 邹移海,张薇,徐志伟,等. 三聚氰胺泌尿系结石大鼠模型的研究[J]. 中国比较医学杂志 ,2009 ,19(7) :5-10.
- [11] 夏玲琳. 三聚氰胺对 SD 大鼠肾损伤的研究[D].昆明:昆明医学院,2009 :10-25.
- [12] 徐明灯,袁心刚,吴盛德,等. 三聚氰胺(酸)对肾脏毒性的实验研究[J]. 重庆医科大学学报 ,2009 ,34(10) :1362-1366.
- [13] Brown C A ,Jeong K S ,Poppenga R H et al. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007 [J].Journal of Veterinary Diagnostic Investigation ,2007 ,19 :525-531.
- [14] National Toxicology Program. Carcinogenesis bioassay of