

## Notch 信号在大鼠骨髓间充质干细胞向内皮细胞分化中的作用研究

晋金兰 庄汉屏 韦建瑞 冯志顺 邓哲彤 张敏

**【摘要】** 目的 探讨 Notch 信号在大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)向内皮细胞分化中的作用及其对诱导分化后细胞功能的影响。方法 分离、培养大鼠 MSCs, 用含血管内皮生长因子(VEGF<sub>165</sub>)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的细胞培养液培养大鼠 MSCs 2 周, 诱导 MSCs 向内皮细胞分化; 采用免疫荧光技术鉴定细胞, 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测诱导分化前后细胞上 Notch 信号受体和配体的表达。用  $\gamma$ -分泌酶抑制剂阻断细胞 Notch 信号通路的转导, 应用划痕实验检测细胞迁移能力; 将细胞接种在半固体培养基上, 观察其形成毛细血管样结构的能力。结果 诱导 MSCs 向内皮细胞分化后细胞表达 CD31 和 Flk1, 说明其具备内皮细胞的特性。MSCs 上表达有 Notch 信号的受体 Notch1 和配体 Jagged1 的 mRNA; 但诱导前后细胞上 Notch 信号受体 Notch1 mRNA 表达差异无统计学意义( $0.59 \pm 0.01$  比  $0.59 \pm 0.01$ ,  $P > 0.05$ ), 其配体 Jagged1 mRNA 表达稍有上升趋势( $1.01 \pm 0.02$  比  $0.99 \pm 0.03$ ,  $P > 0.05$ )。阻断 Notch 信号通路转导可增强诱导后内皮细胞的迁移能力[划痕空白处细胞数(个):  $44.61 \pm 4.34$  比  $40.06 \pm 2.43$ ,  $P < 0.05$ ]及形成毛细血管样结构的能力(细胞分级:  $3.67 \pm 0.82$  比  $2.00 \pm 0.89$ ,  $P < 0.01$ )。结论 Notch 信号在大鼠 MSCs 向内皮细胞分化过程中可能具有重要作用, 阻断 Notch 信号通路转导可增强诱导后内皮细胞的功能。

**【关键词】** Notch 信号通路; 骨髓间充质干细胞; 内皮细胞

**The role of Notch signaling during the differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into endothelial cells** JIN Jin-lan\*, ZHUANG Han-ping, WEI Jian-rui, FENG Zhi-shun, DENG

Zhe-tong, ZHANG Min. \* Central Intensive Care Unit, Guangzhou Red Cross Hospital, Fourth Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510220, Guangdong, China

Corresponding author: JIN Jin-lan, Email: jinjinlan@163.com

**【Abstract】** Objective To research the role of Notch signaling during the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into endothelial cells and its effect on the functions of the differentiated cells. Methods Rat bone marrow MSCs were isolated and cultured in vitro, then the cells were treated with vascular endothelial growth factor (VEGF<sub>165</sub>) and basic fibroblast growth factor (bFGF) for 2 weeks to induce it to differentiate into endothelial cells. The differentiated cells were identified by fluorescence immunoassay. The receptors and ligands of the Notch signaling were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) before and after the differentiation.  $\gamma$ -secretase inhibitor was used to block Notch pathway. Migration ability of cells were assessed by scarification test. Cells were inoculated on semisolid gel to study their ability of forming the capillary-like structure. Results After inducing MSCs to differentiate into endothelial cells by VEGF<sub>165</sub> and bFGF, MSCs gained the characteristics of the endothelial cells with expression of CD31 and Flk1. There were Notch1 mRNA and Jagged1 mRNA expressions in rat bone marrow MSCs. The expression changes in the receptor Notch1 were not statistically significant on the differentiated cells ( $0.59 \pm 0.01$  vs.  $0.59 \pm 0.01$ ,  $P > 0.05$ ), but there was a trend towards an increase of Jagged1 mRNA ( $1.01 \pm 0.02$  vs.  $0.99 \pm 0.03$ ,  $P > 0.05$ ). When Notch pathway was blocked, the differentiated cells' migration ability was increased (number of cells on the scratched area:  $44.61 \pm 4.34$  vs.  $40.06 \pm 2.43$ ,  $P < 0.05$ ), and the ability of forming capillary-like structure was also increased (cells classification:  $3.67 \pm 0.82$  vs.  $2.00 \pm 0.89$ ,  $P < 0.01$ ). Conclusion Notch signaling may have an important role during the differentiation of MSCs into endothelial cells. The function of differentiated cells were strengthened when Notch pathway was blocked.

**【Key words】** Notch pathway; Bone marrow mesenchymal stem cell; Endothelial cell

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.06.011

基金项目:中央高校基本科研业务费专项基金资助(21611337);广东省广州市医药卫生科技项目(201102A213161);湖南省教育厅科学研究重点项目(湘财[2006]36号)

作者单位:510220 广东,暨南大学第四附属医院,广州市红十字会医院重症医学科(晋金兰、冯志顺、邓哲彤、张敏),心血管内科(韦建瑞);中南大学湘雅医院老年医学科(庄汉屏)

通信作者:晋金兰,Email:jnjinlan@163.com

骨髓间充质干细胞(MSCs)是起源于早期中胚层和外胚层的一类多能干细胞,具有高度异质性和多向分化潜能,理论上可分化成所有中胚层来源的细胞。Oswald 等<sup>[1]</sup>研究表明,血管内皮细胞生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)可诱导大鼠 MSCs 向内皮细胞分化。虽然诱导分化后的细胞具有内皮细胞的一些特性,并且能够在三维结构上形成毛细血管样结构,但是否可将其等同为内皮细胞仍有待进一步研究证实。细胞分化受到微环境、多种细胞因子及各种细胞信号通路的调控。Notch 信号通路在决定细胞分化上起关键性作用<sup>[2]</sup>。目前关于 Notch 信号通路是否在大鼠 MSCs 向内皮细胞诱导分化过程中起作用的文献报道较少。研究表明,缺氧或 VEGF-A 可诱导 Notch 信号的配体 Dll4 mRNA 在内皮细胞上表达,导致内皮细胞增殖和迁移能力降低,说明 Notch 信号的激活会影响内皮细胞的功能<sup>[3-6]</sup>。本实验旨在观察 Notch 信号在大鼠 MSCs 向内皮细胞分化前后的表达变化,通过干扰 Notch 信号通路的转导研究其对诱导后细胞功能的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料与试剂:**4 周龄 SD 大鼠,体重 120 g,由中南大学湘雅医学院动物实验部提供,动物合格证号:SCXK(湘)2006-0002。大鼠干细胞分离液(1.072 g/ml,天津灏洋生物制品科技有限责任公司),低糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(FBS,杭州四季青公司),大鼠 VEGF<sub>165</sub>、重组大鼠 bFGF(美国 Peprotech 公司),兔抗鼠 CD31 抗体、兔抗鼠 Flk1 抗体(武汉博士德公司),异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),蓝色荧光染料 Hoechst-33258(美国 Sigma 公司),体外血管再生分析试剂盒(美国 Chemicon 公司),TRIzol、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(大连宝生物工程公司)。

**1.2 诱导 MSCs 向内皮细胞分化及鉴定<sup>[1,6]</sup>:**分离、培养大鼠 MSCs 后,取生长状态良好的第 3 代细胞,用含有 0.25%胰蛋白酶、0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)的磷酸盐缓冲液(PBS)消化液消化细胞,制成单细胞悬液,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$ /ml,用含有 50 ng/ml VEGF<sub>165</sub>、5 ng/ml bFGF、2%FBS 的正常培养基培养细胞 2 周,诱导其向内皮细胞分化,2 d 换 1 次培养基。采用免疫荧光法鉴定内皮细胞。

**1.3 RT-PCR 检测细胞上 Notch 信号的表达:**实验分为正常 MSCs 对照组和经 VEGF<sub>165</sub>、bFGF 诱

导分化的内皮细胞组。TRIzol 提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,总反应体系 20  $\mu$ l,30  $^{\circ}$ C 保温 10 min,42  $^{\circ}$ C 反应 30 min,99  $^{\circ}$ C 反应 5 min;并进行 PCR 扩增。按 RT-PCR 试剂盒说明书步骤进行操作。Notch 信号受体、配体及  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)引物由上海博尚生物技术有限公司合成。以目的条带与  $\beta$ -actin 灰度值比值代表目的基因表达量。

**1.4 划痕实验:**实验分为正常 MSCs 对照组、诱导后的内皮细胞组和  $\gamma$ -内分泌酶抑制剂组(在诱导内皮细胞培养液中加入 2  $\mu$ mol/L  $\gamma$ -内分泌酶抑制剂 L-685458 作用 72 h)3 组。以  $1 \times 10^5$ /ml 的密度接种细胞在 6 孔培养板中,第 2 日在每个孔的中间划一道线,用 PBS 冲洗细胞 2 次,然后加入培养基并拍照。24 h 后观察各组细胞向空白处迁移的情况,每孔随机取 3 个空白处计数迁移细胞数,取其均数来反映细胞的迁移情况。

**1.5 毛细血管样结构形成能力检测:**实验分组同划痕实验。参照体外血管再生分析试剂盒说明书步骤操作,实验完成 15 h 后观察细胞形成毛细血管样结构的能力,用 0~5 来表示细胞形成毛细血管样结构的强弱。0:单个细胞,细胞间呈分离状态;1:细胞开始移行并排列呈一条直线;2:可以看到毛细血管样结构,但是没有萌芽;3:萌芽形成新的毛细血管样结构;4:开始形成闭合的多边形结构;5:形成复杂的网状结构。

**1.6 统计学分析:**采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 诱导后细胞的形态变化:**MSCs 经 VEGF<sub>165</sub>、bFGF 诱导 24 h 后,可见少部分细胞形态由长梭形变成椭圆形、圆形,细胞间隙变大,有个别细胞脱落的现象;诱导 1 周后,约 50%的细胞呈椭圆形或圆形;诱导 2 周后大部分细胞形态变为圆形或椭圆形,呈现典型内皮细胞“铺路石样”排列。

**2.2 免疫荧光鉴定结果:**经 VEGF<sub>165</sub>、bFGF 诱导培养 2 周后的细胞中 CD31 和 Flk1 表达为阳性,而对照组表达为阴性。说明大鼠 MSCs 经 VEGF<sub>165</sub> 和 bFGF 向内皮细胞方向诱导培养 2 周后已具备了内皮细胞的表面特征。

**2.3 大鼠 MSCs 向内皮细胞诱导分化前后细胞上 Notch 信号表达的变化(图 1~2;表 1):**大鼠 MSCs 上表达有 Notch 信号受体 Notch1 和配体 Jagged1 的 mRNA,其余 Notch 信号受体 Notch 2、3、4 和配

M, Marker; 1~7 依次为 Notch 信号受体 Notch 1、2、3、4 及配体 Dll1、3、4、8、9 分别为 Notch 信号配体 Jagged 1、2  
 图 1 逆转录-聚合酶链反应检测大鼠骨髓间充质干细胞上 Notch 信号受体(a)及配体(b)的 mRNA 表达

体 Dll1、3、4 及 Jagged2 表达阴性。MSCs 向内皮细胞诱导分化后 Notch1 mRNA 表达与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 配体 Jagged1 mRNA 表达较对照组稍有上升趋势 ( $P > 0.05$ )。

表 1 大鼠骨髓间充质干细胞向内皮细胞诱导分化前后细胞上 Notch 信号受体 Notch1 和配体 Jagged1 的 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 样本数 | Notch1 mRNA | Jagged1 mRNA |
|-------|-----|-------------|--------------|
| 对照组   | 6   | 0.59 ± 0.01 | 0.99 ± 0.03  |
| 内皮细胞组 | 6   | 0.59 ± 0.01 | 1.01 ± 0.02  |

2.4 划痕实验结果和毛细血管样结构形成能力 (表 2); 诱导后内皮细胞组划痕空白处细胞数和毛细血管样结构形成能力较对照组明显增加 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ); 给予  $\gamma$ -内分泌酶抑制剂阻断 Notch 信号通路转导后, 可使划痕空白处细胞数和形成毛细血管样结构的能力进一步增加, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。

表 2 各组细胞划痕实验及细胞形成毛细血管样结构能力检测结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别                 | 样本数 | 细胞数 (个)                    | 形成毛细血管样结构的能力              |
|--------------------|-----|----------------------------|---------------------------|
| 对照组                | 6   | 35.83 ± 3.83               | 0.50 ± 0.55               |
| 内皮细胞组              | 6   | 40.06 ± 2.43 <sup>a</sup>  | 2.00 ± 0.89 <sup>b</sup>  |
| $\gamma$ -内分泌酶抑制剂组 | 6   | 44.61 ± 4.34 <sup>ac</sup> | 3.67 ± 0.82 <sup>bd</sup> |

注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与内皮细胞组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

MSCs 具有多向分化潜能, 在体外不同诱导条件下, MSCs 可向成骨细胞、脂肪细胞、神经细胞以及心肌细胞分化<sup>[6-8]</sup>, 然而诱导后的细胞在稳定性及自我复制等方面仍与内皮细胞存在一定的差异, 因此, 如何精确调控 MSCs 向内皮细胞分化尚有待进一步研究探索。

M, Marker; 1, MSCs 对照组; 2, 内皮细胞组;  $\beta$ -actin,  $\beta$ -肌动蛋白  
 图 2 逆转录-聚合酶链反应检测大鼠 MSCs 向内皮细胞诱导分化前后细胞上 Notch 信号受体 Notch1(a) 和配体 Jagged1(b) 的 mRNA 表达

Notch 信号通路在脊椎动物和无脊椎动物中高度保守, 在决定细胞分化上起关键作用<sup>[2]</sup>。在调控细胞发育分化的信号通路中, Notch 信号通路是相邻细胞间互相通讯, 进而对调控细胞发育起重要作用<sup>[9]</sup>。Notch 信号通路由 Notch 受体、Notch 配体和核效应物三部分组成, 哺乳动物中共发现 4 类 Notch 信号受体 (Notch1、2、3、4) 和 5 种配体 (Jagged1、Jagged2 及 Dll1、3、4)<sup>[10]</sup>。当配体与 Notch 信号受体的胞外区结合后, 释放可溶性 Notch 胞内部分 (NICD), 随后 NICD 被转移至核内, 活化 Notch 信号通路的初级效应分子 CSL (即脊椎动物中的 CBF1、果蝇中的 Su(H) 及线虫中的 Lag-1 等转录因子的缩写), 进而激活相关基因的表达<sup>[11]</sup>。

本研究中采用含 VEGF<sub>165</sub> 和 bFGF 的细胞培养液诱导大鼠 MSCs 向内皮细胞分化, 结果诱导后的细胞呈“铺路石样”的内皮细胞形态特征, 细胞表面表达有内皮细胞特异性标志物 CD31 和 Flk1, 并且诱导后的细胞可在半固体培养基上形成毛细血管样结构, 表明诱导后的细胞具备了内皮细胞特征。RT-PCR 结果显示, 大鼠 MSCs 上表达有 Notch 信号的受体 Notch1 和配体 Jagged1 的 mRNA, 而其余受体 Notch2、3、4 和配体 Dll1、3、4 及 Jagged2 表达均为阴性; 诱导后的内皮细胞 Notch1、Jagged1 的 mRNA 表达与 MSCs 相近, 但 Jagged1 的 mRNA 表达有上升趋势。为研究 Notch 信号对诱导后内皮细胞功能的影响, 实验中向诱导后的内皮细胞培养液中加入 Notch 信号通路特异性阻断剂  $\gamma$ -内分泌酶抑制剂 L-685458 阻断 Notch 信号通路转导, 结果发现, 阻断 Notch 信号通路后, 诱导后的内皮细胞迁移能力及形成毛细血管样结构能力均增强。提示 Notch 信号可能在大鼠 MSCs 向内皮细胞诱导分化过程中起作用, 但其具体作用及机制尚不清楚。

目前国内外已有较多关于 Notch 信号对血管生成及内皮细胞功能影响的研究。缺氧或 VEGF-A

可诱导 Notch 信号的配体 Dll4 mRNA 在内皮细胞上表达<sup>[9-5]</sup>, Dll4 在内皮细胞上过表达会导致血管内皮细胞生长因子受体 (VEGFR<sub>2</sub>)、神经菌毛素 (NRP1) 表达减少, 内皮细胞上 Notch 信号靶基因 Hey1 过表达也会降低 VEGFR<sub>2</sub> mRNA 表达水平, 最终导致内皮细胞增殖和迁移能力降低, 这一效应可能是通过降低 VEGFR<sub>2</sub> 启动子的活性来实现的<sup>[5, 12-14]</sup>。Nosedo 等<sup>[16]</sup>研究显示, 激活 Notch 信号通路会抑制人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的增殖, 其作用机制可能与阻遏 P21Cip1 的表达有关; 国内 Lv 等<sup>[16]</sup>的研究结果亦得出一致的结论, 研究中发现抑制 Notch 信号通路的转导可刺激 HUVEC 增殖。新近文献报道, Notch 信号在血管生成中的作用与激活丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 通路有关<sup>[17]</sup>。Quillard 等<sup>[18]</sup>的研究表明, 促炎症细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 可下调内皮细胞上 Notch4 表达及上调 Notch2 表达, 从而促进内皮细胞凋亡, 故认为其机制分别与核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路及磷脂酰肌醇 3-激酶信号通路对 Notch 信号通路的调节有关。

综上所述, 本研究结果表明, 大鼠 MSCs 向内皮细胞诱导分化后细胞上 Notch 信号受体和配体的表达变化不大, 其配体 Jagged1 表达稍有升高趋势, 提示 Notch 信号可能在大鼠 MSCs 向内皮细胞分化过程中起作用, 其具体作用意义及机制目前尚不清楚。阻断 Notch 信号通路后可增强诱导后内皮细胞的功能, 其机制是否与 VEGFR、MAPK 通路及细胞凋亡等有关亦有待进一步实验研究证实。

参考文献

[1] Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 2004, 22, 377-384.  
 [2] Milner LA, Bigas A, Kopan R, et al. Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93, 13014-13019.  
 [3] Shawber CJ, Kitajewski J. Notch function in the vasculature: insights from zebrafish, mouse and man. *Bioessays*, 2004, 26, 225-234.

[4] Zhong TP, Childs S, Leu JP, et al. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature*, 2001, 414, 216-220.  
 [5] Villa N, Walker L, Lindsell CE, et al. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev*, 2001, 108, 161-164.  
 [6] 晋金兰, 庄汉屏. 骨髓间充质干细胞的生物学特性及其向心肌样细胞的分化. *医学临床研究*, 2008, 25, 594-597.  
 [7] 常颖, 齐欣, 卜丽莎, 等. 成人骨髓间充质干细胞体外多向分化潜能特性的研究. *中国危重病急救医学*, 2005, 17, 95-97.  
 [8] 冯敏, 孙荣青, 马爱群. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞向心肌细胞定向分化的研究. *中国危重病急救医学*, 2009, 21, 340-342.  
 [9] Schroeder T, Just U. Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *EMBO J*, 2000, 19, 2558-2568.  
 [10] 姜昕, 周建华. Notch 信号通路及其在肺癌发生中的作用. *国际病理科学与临床杂志*, 2007, 27, 231-234.  
 [11] Fortini ME. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3, 673-684.  
 [12] Mailhos C, Modlich U, Lewis J, et al. Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation*, 2001, 69, 135-144.  
 [13] Shutter JR, Scully S, Fan W, et al. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev*, 2000, 14, 1313-1318.  
 [14] Krebs LT, Xue Y, Norton CR, et al. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev*, 2000, 14, 1343-1352.  
 [15] Nosedo M, Chang L, McLean G, et al. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition, role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 8813-8822.  
 [16] Lv W, Chen L, Zhou DH, et al. Influence of specific blocking of the delta-like ligand 4/Notch signal transduction pathway on the biological behavior of human umbilical vein endothelial cells. *Cancer Biother Radiopharm*, 2010, 25, 449-454.  
 [17] Kiec-Wilk B, Grzybowska-Galuska J, Polus A, et al. The MAPK-dependent regulation of the Jagged/Notch gene expression by VEGF, bFGF or PPAR gamma mediated angiogenesis in HUVEC. *J Physiol Pharmacol*, 2010, 61, 217-225.  
 [18] Quillard T, Devallière J, Coupel S, et al. Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells, implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80, 2032-2041.

(收稿日期: 2011-03-28)  
(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

早期创伤诱导凝血可能与血液稀释和体液中凝血因子减少有关

目前认为, 早期创伤诱导凝血 (ETIC) 是增加创伤患者病死率的因素, 为此, 美国研究人员调查分析了 ETIC 止血方面的变化, 并对有无 ETIC 的创伤患者进行单变量和多变量分析。结果: 与无 ETIC 创伤组相比, ETIC 创伤患者表现出了部分凝血因子 (凝血因子 V 和凝血因子 VI) 活动减少、抑制凝血连锁反应能力降低的现象。与健康对照组比较, 有无 ETIC 的两组创伤患者均出现凝血酶及纤维蛋白增加以及纤维蛋白溶解性增加; ETIC 创伤组病死率和救治所需输血量均显著高于无 ETIC 创伤组。研究人员由此得出结论: ETIC 会减少凝血因子, 但对凝血酶和纤维蛋白的数量无明显影响, 而有无 ETIC 的患者对创伤都表现出了适度的止血反应。因此, 在创伤早期减少晶体的输入量和使用凝血因子可能会阻止病情的发展。

赵莹, 编译自《J Trauma》, 2011-03-21 (电子版); 胡森, 审核