

Notch1 信号通路与血管钙化

龚财判 综述, 欧三桃 审校

(泸州医学院附属医院肾病内科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] Notch1 信号通路; 血管平滑肌细胞; 血管钙化

[摘要] Notch1 信号通路是一个高度保守的信号转导通路, 参与胚胎期血管的形成及发育以及出生后对损伤血管的修复等。血管钙化是羟基磷灰石在血管壁细胞的沉积, 受多种调节因子、信号通路影响, 是一个可主动调节、类似于骨形成的生物学过程。近年来研究表明 Notch1 信号通路与血管钙化存在密切关系。本文就 Notch1 信号通路的组成、效应传递及生理功能, 血管钙化的发生机制及调节, 以及 Notch1 信号通路与血管钙化的关系作一综述。

[中图分类号] R341

[文献标识码] A

Notch1 Signaling Pathway and Vascular Calcification

GONG Cai-Pan, and OU San-Tao

(Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] Notch1 Signaling Pathway; Vascular Smooth Muscle Cell; Vascular Calcification

[ABSTRACT] Notch1 signaling pathway, as an evolutionarily conserved system of signal transduction, plays an important role in cardiovascular development and vascular repair throughout the embryonic period and postnatal day. Vascular calcification results not from a passive deposition of hydroxyapatite on vascular wall, but rather is an active cell-mediated process involving vascular smooth muscle cell (VSMC) transforming into osteoblast-like cells. It can be regulated by multiple factors and many signaling pathway. Recent studies indicate that Notch1 signaling pathway is significantly associated with vascular calcification. In this paper, the composition, effect and physiological function of Notch1 signaling pathway, the mechanism and regulation of vascular calcification, and the relationship between Notch1 signaling pathway and vascular calcification are summarized.

Notch1 信号通路是一个高度保守的信号转导通路, Notch1 基因编码的受体与邻近细胞上配体结合后, 调节细胞的增殖、分化以及凋亡等, 从而参与调节多细胞生物体组织器官的发育; 也参与多种病变如血管钙化、骨骼的异常改变甚至癌症的发生等。血管钙化是一个类似于骨形成的主动调节过程, 并受到多种因素影响。近来研究发现, Notch1 信号通路作为血管和骨形成的共同调节因子, 与血管钙化间存在密切的关系^[1-3]。

1 Notch1 信号通路

1.1 Notch1 信号通路的组成及效应传递

曾有学者在果蝇中发现 Notch 基因突变导致果蝇的翅膀边缘出现刻痕(Notch 本身有“刻痕、凹口”

的含义), 于是将其命名为 Notch 基因。随后大量研究发现, Notch 信号通路广泛存在于各种无脊椎动物和脊椎动物中, 是一个在进化上高度保守的跨膜受体蛋白家族。

Notch 信号转导通路由受体、配体及 CSL 蛋白 3 部分组成。在果蝇体内 Notch 基因只编码了一种受体蛋白, 即 Notch 蛋白; 而在哺乳动物体内有 Notch1, 2, 3, 4 四种同源受体。Notch 受体包含胞内域(intracellular Notch domain, NICD/ICN)、跨膜区(NTM)和胞外区(N-terminal extracellular domain, NECD)三部分。NECD 主要与配体结合, NTM 将受体定位在细胞膜上, NICD 参与细胞内信号的传递。Notch 配体是经典的 DSL(Delta-Serrate-Lag2)家族蛋白, 在脊柱动物包括 5 种 I 型跨膜蛋白: DLL1, 3, 4 和 Jagged1, 2; 还有一些非典型的 Notch 配体, 如 F3/

[收稿日期] 2015-05-25

[修回日期] 2015-07-19

[作者简介] 龚财判, 硕士研究生, 研究方向为糖尿病肾病与血管钙化, E-mail 为 862288369@qq.com。通讯作者欧三桃, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为糖尿病肾病与血管钙化, E-mail 为 ousantao@163.com。

接触蛋白、Dlk1、Dlk2。CSL 是这个蛋白在哺乳动物 (CBF1/RBP-JK)、果蝇 Su(H)、线虫 (Lag-1) 首写字母的缩写。RBP-JK 是转录抑制因子,它识别并结合特定的 DNA 序列 (GTGGGAA),这个序列在 Notch 诱导基因的启动子上。NICD/ICN 能与 RBP-JK 相互作用,使转录激活。

对于 Notch1 信号通路激活,有学者提出“Notch 蛋白三步水解模式”^[4]来概括其信号转导过程。当 Notch1 经过 3 次酶切后,释放出活化形式的 N1-ICD 片段,随即转到细胞核,与核内因子 RBP-JK (CSL/CBF1) 结合,并使其活化。RBP-JK 是一种转录抑制因子,当没有 N1-ICD 生成时,Notch1 的靶基因就被抑制;当 Notch1 被激活产生 N1-ICD 时,就取代其抑制复合体的抑制作用,继而 NICD-RBP-JK 结合体聚合转录激活因子激活下游的目标基因,如 Hes1。上述通路多见于哺乳动物中,为 RBP-JK 依赖型的经典通路。也有研究者提出还存在 RBP-JK 非依赖型通路。

1.2 Notch1 信号通路的生理功能

大量研究发现 Notch1 信号通路可以参与多种组织器官的生长发育,在中枢神经系统,它通过 Notch1-Hes 信号转导抑制神经干细胞分化为神经细胞以及神经胶质细胞,从而维持神经干细胞的未分化状态及自我更新的能力。在脉管系统,Notch1 信号通路参与胚胎期血管的形成及发育,以及出生后对损伤血管的修复^[5];在脑血管内皮细胞中,Notch-RBP-JK 与 Smad4 相互作用共同维持血管稳定^[6]。此外,Notch1 信号通路还参与淋巴管的形成、淋巴系统的发育及 T 细胞分化的调节;Notch1 和 Notch2 参与肾脏形成,通过与 RBP-JK 的结合调节系膜细胞增殖、分化^[7];Notch1 信号通路通过调节间充质干细胞向成骨细胞的转化^[8],从而参与骨骼的发育;另外 Notch1 信号通路在肺、前列腺及胰腺的发育过程中都有重要的作用。

2 血管钙化

2.1 血管钙化的发生机制及调节

既往认为血管钙化是钙磷被动沉积、不可逆转的衰老过程,近来研究发现血管钙化是一个类似于骨矿化、并受多因素影响、主动调节的复杂过程。其中心环节是血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 在高磷等因素刺激下表达 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2),从而向成骨样细胞转化,分泌、合成骨基质

蛋白及基质囊泡或者形成凋亡小体,促进钙盐沉积从而导致钙化的形成^[9]。正常情况下,这个过程受到单核-巨噬细胞、钙化抑制因子的抑制;而当体内平衡被打破,则会导致血管钙化发生。

血管钙化的发生机制至今仍不完全清楚,目前多认为有以下几种因素参与:①遗传易感性导致异位钙化容易发生^[10];②各种诱导物 (磷、氧化脂蛋白、尿毒症毒素、炎症因子等) 刺激 VMSC 向成骨样细胞转化;③骨更新提供钙化所需要的矿物质;④凋亡的细胞为钙盐沉积提供良好的场所;⑤内源性钙化抑制因子如基质 γ -羧基谷氨酸蛋白 (matrix Gla protein, MGP)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、骨保护素 (osteoprotegerin, OPG) 及焦磷酸盐的减少,导致钙盐异位沉积^[11];⑥血管钙化和修复功能的失调。此过程有多种促进因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 等及保护性因子骨保护素/核因子 κ B 的受体活化因子配体/核因子 κ B 的受体活化因子 (osteoprotegerin/receptor activator of NF- κ B ligand/receptor activator of NF- κ B, OPG/RANKL/RANK) 系统、成纤维生长因子 23 (fibroblast growth factor-23, FGF-23)、胎球蛋白 A、焦磷酸盐等的参与;近来又新发现一些与血管钙化相关的影响因子,如:ATP 结合盒 C 亚家族 6 (ATP-binding cassette subfamily C number 6, ABCC6) 基因^[12]、Klotho 蛋白^[13]及锌^[14]等。

2.2 血管钙化对机体的影响

血管壁需具有良好的可扩张性和弹性才能维持正常的血流动力学、自动调节及舒缩的功能。当钙磷矿物质沉积在血管壁,血管壁变硬,血管的硬性及脆性增加,会损害血管的舒缩运动;动脉壁僵硬程度是未来心血管事件发生及全因死亡率强有力的独立预测指标^[15]。当动脉的传递及缓冲效应降低时,组织器官灌注不足,为了保证足够的射血分数,克服因血管钙化增加的后负荷,将导致左心室肥厚、舒张功能紊乱甚至心力衰竭的发生;而周围组织的灌注不足,会进一步导致动脉血流瘀滞、弥散性血栓的形成,甚至深静脉血栓形成。此外,血管钙化会增加动脉粥样斑块破裂的危险^[16];破裂的斑块不仅影响血液流动,还会阻塞血管导致组织器官缺血坏死。再者,心脏瓣膜的钙化会导致主动脉瓣狭窄,阻碍左心室血液流出,从而严重影响血流动力学。总之,血管钙化明显增加了不良临床事件的发生,如收缩性高血压、左心室肥厚、冠状动脉

缺血、充血性心力衰竭;也很有可能导致斑块的破裂、血栓形成以及心肌梗死的发生。

3 Notch1 信号通路与血管钙化

Shimizu 等^[17]通过体外实验,诱导人主动脉平滑肌细胞(human aortic vascular smooth muscle cell, HASMC)向成骨样细胞分化,发现在钙化标志物 ALP 活性明显增加的同时,NICD 及 RBP-JK 的 mRNA 及蛋白水平都显著升高;而将 RBP-JK 敲除,过表达的 NICD 并不能使 ALP 活性增加及促进 HASMC 钙化的形成。提示 Notch1-RBP-JK 与血管钙化存在明显相关性,在血管钙化形成过程扮演着重要的角色。Zhou 等^[1-2]也证实了 Notch1-RBP-JK 的激活与血管钙化紧密相关;且通过 γ -分泌酶抑制剂 DAPT(3,5-二氟苯乙酰-L-丙氨酸-S-苯基甘氨酸 t-丁酯)及阿伦磷酸钠抑制 Notch1-RBP-JK 信号通路后,发现 ALP 的活性及血管钙化程度显著受到抑制,且抑制的程度与阿伦磷酸钠呈剂量依赖性。但也有相反的报道,如有学者发现 Notch1 信号通路在动脉瓣膜中表现出抑制钙化的作用^[18]。

Notch1-RBP-JK 信号通路通过多种方式参与血管钙化,目前认为主要有以下 3 种途径。

3.1 增强 Msx2 表达

Msx2 是血管钙化的核心调节因子,也是 Notch1-RBP-JK 的下游靶基因^[17],Msx2 表达降低将抑制 VSMC 向成骨样细胞分化。Shimizu 等^[17]在体外实验中发现 Notch1 受体、RBP-JK 共同促进调节骨生成的关键基因 Msx2 显著表达,并上调 ALP 活性及基质的矿化;且这一过程可以分别被 DAPT、OPG^[1]、阿伦磷酸钠^[2]所抑制。在动脉粥样硬化患者的颈动脉中也发现 Notch1, Jagged1 及 Msx2 蛋白共同局限在硬化斑块中^[17],提示它们共同参与了血管钙化的病理形成。此外,在糖基化终末产物受体(receptor of advanced glycosylation end product, RAGE)经配体激活后活化细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2)引起 Msx2 表达,进而促进 VSMC 成骨样分化及钙化过程中,发现 Notch1 和 Jagged1 显著表达;而予以 DAPT 培养 VSMC 时,Msx2 及 ALP 的表达明显受抑制;且通过小干扰核糖核酸(small interfering RNA, siRNA)影响 Msx2 表达后,Notch1 和 Jagged1 表达无明显改变,而 ALP 表达及活性明显降低,VSMC 成骨样分化及矿化受抑制^[19]。以上均提示 Notch1-RBP-JK 信

号通路可能通过激活 Msx2 基因参与血管钙化的形成。

3.2 增强骨形成蛋白 2 信号效应

BMP2 是骨祖细胞向成骨细胞分化的必不可少的促进因子,在血管钙化发生发展中发挥重要作用。Notch1-RBP-JK 与 BMP2 共同参与了胚胎期心脏瓣膜的形成,当 Notch1-BMP2 通路异常时,可能会导致动脉粥样硬化或是瓣膜钙化甚至狭窄^[20]。Shimizu 等^[21]发现 Notch1 与 BMP2 一起参与血管钙化的形成,而单独的 BMP2 不会导致钙化发生;在人的主动脉平滑肌细胞中,过量表达的 N1-ICD 显著增强 BMP2 调节 ALP 活性的作用,且促进钙化的发生发展。而分别采用 RBP-JK 表达不足、DAPT 干预以及将 RBP-JK 与 Msx2 的增强子结合位点突变等手段,均能使 Notch1 信号转导异常而不能与 BMP2 发生协同作用,从而抑制钙化的发生^[21];此外,BMP2、Notch1 蛋白共同表达在人颈动脉粥样硬化的斑块中,且在载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠的粥样斑块中也检测到 BMP2、Notch1 和 Msx2 蛋白的表达。提示 Notch1 胞内结构域、RBP-JK 可与 BMP2 信号通路的下游转录因子 Samd1 组成 Msx2 的启动复合物,增强 BMP2 引导的靶基因 Msx2 表达,提高 ALP 活性,从而诱导 VSMC 向成骨细胞转化,促进钙化的形成。

3.3 通过炎症途径介导

大量研究表明,免疫炎症反应在血管病变过程中扮演着重要的角色^[22]。巨噬细胞的旁分泌受到 DLL4、Notch3 及 Notch 受体-DLL4 结合体的调节,从而使巨噬细胞增殖、分化,并释放炎症因子白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2)、IL-6、肿瘤坏死因子等引起炎症反应;同时炎症因子又可影响 Notch1 信号通路,肿瘤坏死因子/核因子 κ B 可以增加配体 Jagged1 表达从而激活 Notch1 通路^[23],肿瘤坏死因子/核因子 κ B 抑制因子则抑制 Hes1 基因表达,释放大量的 IL-2、IL-6;此过程由 Notch1 通路介导炎症途径促进 VSMC 向成骨样细胞分化^[24],促进血管钙化的形成。炎症反应时细胞处在低氧状态,从而产生缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α),HIF-1 α 可以直接与 Notch 受体结合并激活 RBP-JK 表达^[25],进一步促进钙化的发生。Wang 等^[26]通过给予白细胞功能相关因子 1(leukocyte function-associated factor-1, LFA-1)刺激动脉瓣膜间质细胞,发现 BMP2 表达及 ALP 活性均增加,同时也出现钙化结节的形成;在此过程中 LFA-1 是通过激活 Notch1,进而激活核因子 κ B 并与之结合,促进 BMP2 的表

达,从而使炎症信号转变为成骨反应的信号;当抑制核因子 κ B 时或者是加入 γ -分泌酶抑制剂后出现与上述相反的结果。也有研究^[27]发现与炎症密切相关的微小核糖核酸 155 与 Notch1-RBP-JK 信号通路在炎症反应中有相互作用,但具体机制及对血管钙化的影响还不明确。这些都提示 Notch1 信号通路可通过介导炎症反应从而促进钙化的形成。

4 结 语

总之,Notch1 信号通路是一个结构简单、功能复杂的通路,它受多种调节因子的影响,且通过多种途径直接或间接参与血管钙化的形成过程。与其相关的调节因子以及作用途径与临床上多种疾病密切相关,进一步探索 Notch1 信号通路促进血管钙化的机制,可能为临床用药提供新的靶点及可靠依据。

[参考文献]

[1] Zhou S, Fang X, Xin H, et al. Osteoprotegerin inhibits calcification of vascular smooth muscle cell via down regulation of the Notch1-RBP-J kappa/Msx2 signaling pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68 987.

[2] Zhou S, Fang X, Xin H, et al. Effects of alendronate on the Notch1-RBP-J kappa signaling pathway in the osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(1): 89-94.

[3] 周韶琼. Notch1-RBP-JK 信号通路在动脉中膜钙化中的作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013; 1-69.

[4] Weinmaster G. Notch signal transduction: a real rip and more[J]. Curr Opin Genet Dev, 2000, 10(4): 363-369.

[5] Rusanescu G, Weissleder R, Aikawa E. Notch signaling in cardiovascular disease and calcification[J]. Curr Cardiol Rev, 2008, 4(3): 148-156.

[6] Li F, Lan Y, Wang Y, et al. Endothelial Smad4 maintains cerebrovascular integrity by activating N-cadherin through cooperation with Notch[J]. Dev Cell, 2011, 20(3): 291-302.

[7] Boyle SC, Liu Z, Kopan R. Notch signaling is required for the formation of mesangial cells from a stromal mesenchyme precursor during kidney development[J]. Development, 2014, 141(2): 346-354.

[8] 张文文. BMP9 需通过调控 Notch 信号通路诱导间充质干细胞成骨分化及其作用机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013; 1-109.

[9] Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization[J]. Circ Res, 2011, 109(1): e1-e12.

[10] Hofmann BM, McNally EM. Genetic pathways of vascular calcification[J]. Trends Cardiovasc Med, 2012, 22(4): 93-98.

[11] Kapustin AN, Shanahan CM. Calcium regulation of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles[J]. Trends Cardiovasc Med, 2012, 22(5): 133-137.

[12] Jansen RS, Kucukosmanoglu A, de Haas M, et al. ABCG6 prevents ectopic

mineralization seen in pseudoxanthoma elasticum by inducing cellular nucleotide release[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(50): 20 206-211.

[13] Lau WL, Leaf EM, Hu MC, et al. Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet[J]. Kidney Int, 2012, 82(12): 1 261-270.

[14] Shin MY, Kwun IS. Zinc restored the decreased vascular smooth muscle cell viability under atherosclerotic calcification conditions[J]. Prev Nutr Food Sci, 2014, 19(4): 363-366.

[15] Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and Meta-analysis[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(13): 1 318-327.

[16] Kelly-Arnold A, Maldonado N, Laudier D, et al. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(26): 10 741-746.

[17] Shimizu T, Tanaka T, Iso T, et al. Notch signaling induces osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells: role of Msx2 gene induction via Notch-RBP-Jk signaling[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(7): 1 104-111.

[18] Nus M, Macgrogan D, Martinez-Poveda B, et al. Diet-induced aortic valve disease in mice haploinsufficient for the Notch pathway effector RBP-JK/CSL[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(7): 1 580-588.

[19] Suga T, Iso T, Shimizu T, et al. Activation of receptor for advanced glycation end products induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells[J]. J Atheroscler Thromb, 2011, 18(8): 670-683.

[20] Luna-Zurita L, Prados B, Grego-Bessa J, et al. Integration of a Notch-dependent mesenchymal gene program and BMP2-driven cell invasiveness regulates murine cardiac valve formation[J]. J Clin Invest, 2010, 120(10): 3 493-507.

[21] Shimizu T, Tanaka T, Iso T, et al. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of Msx2 gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(21): 19 138-148.

[22] 江高峰, 秦旭平, 李 洁. 免疫炎症反应在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J]. 中南医学科学杂志, 2015, 43(2): 212-216.

[23] Bash J, Zong WX, Banga S, et al. Rel/NF-kappaB can trigger the Notch signaling pathway by inducing the expression of Jagged1, a ligand for Notch receptors[J]. EMBO J, 1999, 18(10): 2 803-811.

[24] Ang HL, Tergaonkar V. Notch and NF-kappaB signaling pathways: Do they collaborate in normal vertebrate brain development and function? [J]. Bioessays, 2007, 29(10): 1 039-047.

[25] Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state[J]. Dev Cell, 2005, 9(5): 617-628.

[26] Wang D, Zeng Q, Song R, et al. Ligation of ICAM-1 on human aortic valve interstitial cells induces the osteogenic response: A critical role of the Notch1-NF-kappa B pathway in BMP-2 expression[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(11): 2 744-753.

[27] Wang L, Zhang H, Rodriguez S, et al. Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF-kappa B-dependent manner[J]. Cell Stem Cell, 2014, 15(1): 51-65.

(此文编辑 曾学清)