DOI:10.16016/j.2097-0927.202204002

S100A9 促进胚胎干细胞向神经前体细胞分化中顶端-基底极化和神经管形成

张 翔,岳建和,黄 宁 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经外科

[摘要] **目的** 探讨胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)向神经前体细胞(neural progenitor cells, NPCs)分化过程中 S100A9 促进顶端-基底极化(apical-basal polarity, ABP)和神经管结构形成的作用。**方法** 采用免疫荧光观察体外培养 ESCs 向 NPCs 分化 1、2、3 和 6 d 时细胞管腔样结构排列,神经巢蛋白(Nestin)和配对盒因子 6(paired box protein 6, Pax-6)表达,以及 S100A9、N-钙粘蛋白(N-cadherin)和 zonula occludens 1(ZO-1)定位变化。慢病毒转染下调 S100A9 及外源性 S100A9 重组蛋白干预细胞后检测对 N-cadherin 和 ZO-1 定位的影响。Western blot 分析 S100A9 在 ESCs 向 NPCs 分化过程中不同时间点表达差异,同时观察 S100A9 对 Notch1 及下游 centromere binding factor 1(CBF1)的调控。**结果** ESCs 在体外定向分化后第 3 天起表达 Nestin 和 Pax-6,N-cadherin 和 ZO-1 定位于顶端侧并呈现出 ABP 特征性神经玫瑰花状结构(neural rosette),细胞在第 6 天形成神经管结构。S100A9 在分化后第 3 天起表达明显增加($P<0.01$)并定位于顶端侧。下调 S100A9 后 ESCs 仍能分化为 NPCs,但 neural rosette 数量明显减少($P<0.01$)。予以外源性 S100A9 重组蛋白可部分恢复 neural rosette 数量($P<0.01$)。在此分化过程中,下调 S100A9 降低 Notch1 及下游 CBF1 表达。**结论** S100A9 可能通过调控 Notch1/CBF1 参与 ESCs 向 NPCs 分化过程中 ABP 和神经管结构形成。

[关键词] 胚胎干细胞;神经前体细胞;顶端-基底极化;神经管;S100A9
[中图法分类号] R322.8;R318;R329.24 [文献标志码] A

S100A9 promotes apical-basal polarity and neural tube formation during differentiation of embryonic stem cells into neural progenitor cells

ZHANG Xiang, YUE Jianhe, HUANG Ning Department of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of S100A9 in the apical-basal polarity (ABP) and neural tube formation during the differentiation of embryonic stem cells (ESCs) into neural progenitor cells (NPCs) *in vitro*. **Methods** Immunofluorescence assay was used to observe the luminal arrangement, expression of Nestin and paired box protein 6 (Pax-6), and localization of S100A9, N-cadherin and Zonula occludens 1 (ZO-1) on days 1, 2, 3 and 6 of the ESCs differentiation into NPCs. In addition, the ESCs were treated with S100A9-downregulation lentivirus as well as subsequential exogenous S100A9 recombinant protein, then the localization changes of N-cadherin and ZO-1 were detected. The S100A9 expression in different time points during ESCs differentiation process was measured by Western blotting, and the effects of S100A9 on Notch1 and downstream centromere binding factor 1 (CBF1) were also tested. **Results** Nestin and Pax-6 were positively expressed after ESCs differentiation for 3 d, N-cadherin and ZO-1 were gathered at the apical side and presented the characteristic neural rosette structure of ABP, and the neural tubes were formed on day 6. The expression of S100A9 was upregulated significantly from day 3 after differentiation ($P<0.01$) and was located on the apical side. Although ESCs were still able to differentiate into NPCs after down-regulation of S100A9, the

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2021jcyj-msxmX0036)
[通信作者] 黄 宁, E-mail: 304237@hospital.cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

number of neural rosettes was greatly reduced ($P<0.01$), which could be partially restored by supplement of exogenous S100A9 recombinant protein ($P<0.01$). Furthermore, declined S100A9 inhibited the expression of Notch 1 and downstream CBF1 during differentiation. **Conclusion** S100A9 may contribute to the ABP and the formation of neural lumen during the differentiation of ESCs into NPCs by regulating Notch 1/CBF1.

[**Key words**] embryonic stem cells; neural progenitor cells; apical-basal polarity; neural tube; S100A9

Supported by the General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2021jcyj-msxmX0036). Corresponding author: HUANG Ning, E-mail: 304237@hospital.cqmu.edu.cn

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)形成内、中和外3个胚层,并分化为各种谱系祖细胞。中枢神经系统的发育主要起源于外胚层,ESCs向神经前体细胞(neural progenitor cells, NPCs)分化并形成神经管结构,在此过程中NPCs围绕神经管放射状排列,细胞内分子或细胞器不对称分布,即顶端-基底极性(apical-basal polarity, ABP)[1]。当构建神经管的NPCs发生ABP,紧密连接蛋白(tight-junction protein)通常定位于管腔侧(apical侧),形成特有的神经玫瑰花状结构(neural rosette)[2]。ABP或Neural rosette在神经发育中扮演重要角色,不仅维持NPCs自我更新,而且促进其向各种神经元或胶质细胞分化[3]。S100A9是一种炎症相关蛋白,与细胞增殖、迁移、代谢和分化等密切相关[4]。近年来,有文献发现S100A9调控NPCs分化,但其中涉及的生理学机制十分复杂[5]。本研究将探讨ESCs向NPCs分化过程中S100A9参与ABP形成和神经管构建的功能,以明确该分子在胚胎神经发育中的重要价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

mTeSR™ Plus 5×Supplement、STEMdiff™ Neural Induction Medium和STEM diff™ SMADi Neural Induction Supplement均购自英国StemCell Technologies公司;Matrigel购于美国Corning公司;si-S100A9慢病毒和对应阴性病毒购买于上海吉凯基因公司;一抗配对盒因子6(paired box protein 6, Pax-6)、神经巢蛋白(Nestin)、S100A9、N-钙粘蛋白(N-cadherin)、zonula occludens 1(ZO-1)和Notch1购买于美国Santa Cruz公司;一抗GAPDH、各种HRP/FITC/TRITC标记二抗、DAPI、Western blot凝胶试剂盒、ECL发光液等购买于上海碧云天公司;人S100A9重组蛋白和DNA连接蛋白CBF1一抗购于美国Abcam公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人胚胎干细胞株H9源于中国科学院干细胞库,每日用mTeSR™ Plus 5×Supplement进行换液。当细胞密度达到70%用0.1%浓度EDTA传代。培养皿使用前用2% Matrigel常温孵育1 h。培养箱设置为37 ℃和5%CO_2。

1.2.2 细胞分化 PBS清洗并用EDTA收集H9细胞,重悬于STEMdiff™ Neural Induction Medium+STEM diff™ SMADi Neural Induction Supplement并种于培养板中,将细胞调整为$3\times10^5/cm^2$。诱导6 d使H9细胞定向分化为NPCs。

1.2.3 细胞转染 6×10^4个H9细胞种于6孔板中,si-S100A9靶向序列为AGGAGTTCATCATGCTGAT。将si-S100A9或阴性对照病毒(NC)与5 μg/mL polybrene孵育细胞,慢病毒不含绿色荧光蛋白基因,72 h后Western blot分析S100A9蛋白表达变化。

1.2.4 Western blot 收集各组细胞,用含有1%蛋白酶抑制剂和0.1%磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液提取细胞总蛋白。BCA法测蛋白浓度,每孔按25 μg蛋白样品电泳,PVDF膜转膜后5%脱脂牛奶封闭1 h并加一抗4 ℃过夜,各种一抗浓度:S100A9(1∶150)、Notch1(1∶200)、CBF1(1∶400)、GAPDH(1∶1 000)。次日加入HRP标记的二抗并在37 ℃孵育1 h后ECL显影。Quantity One 4.6软件分析条带光密度值,目的蛋白与GAPDH比值为目的蛋白表达水平。

1.2.5 免疫荧光 将细胞分为对照组、阴性病毒组、si-S100A9组和si-S100A9+S100A9重组蛋白组。H9细胞向NPCs定向分化后1、2、3和6 d用4%多聚甲醛固定细胞17 min。0.5% Triton X-100透化细胞10 min,5%BSA常温封闭1 h后各种一抗4 ℃孵育过夜。各种一抗浓度:S100A9(1∶50)、Pax6(1∶100)、Nestin(1∶100)、N-cadherin(1∶100)、ZO-1(1∶100)。第2日PBS清洗细胞,FITC(1∶1 000)二抗、TRITC(1∶1 000)二抗和DAPI(1∶2 000)常温孵育细胞1 h,PBS再次清洗后进行观察。

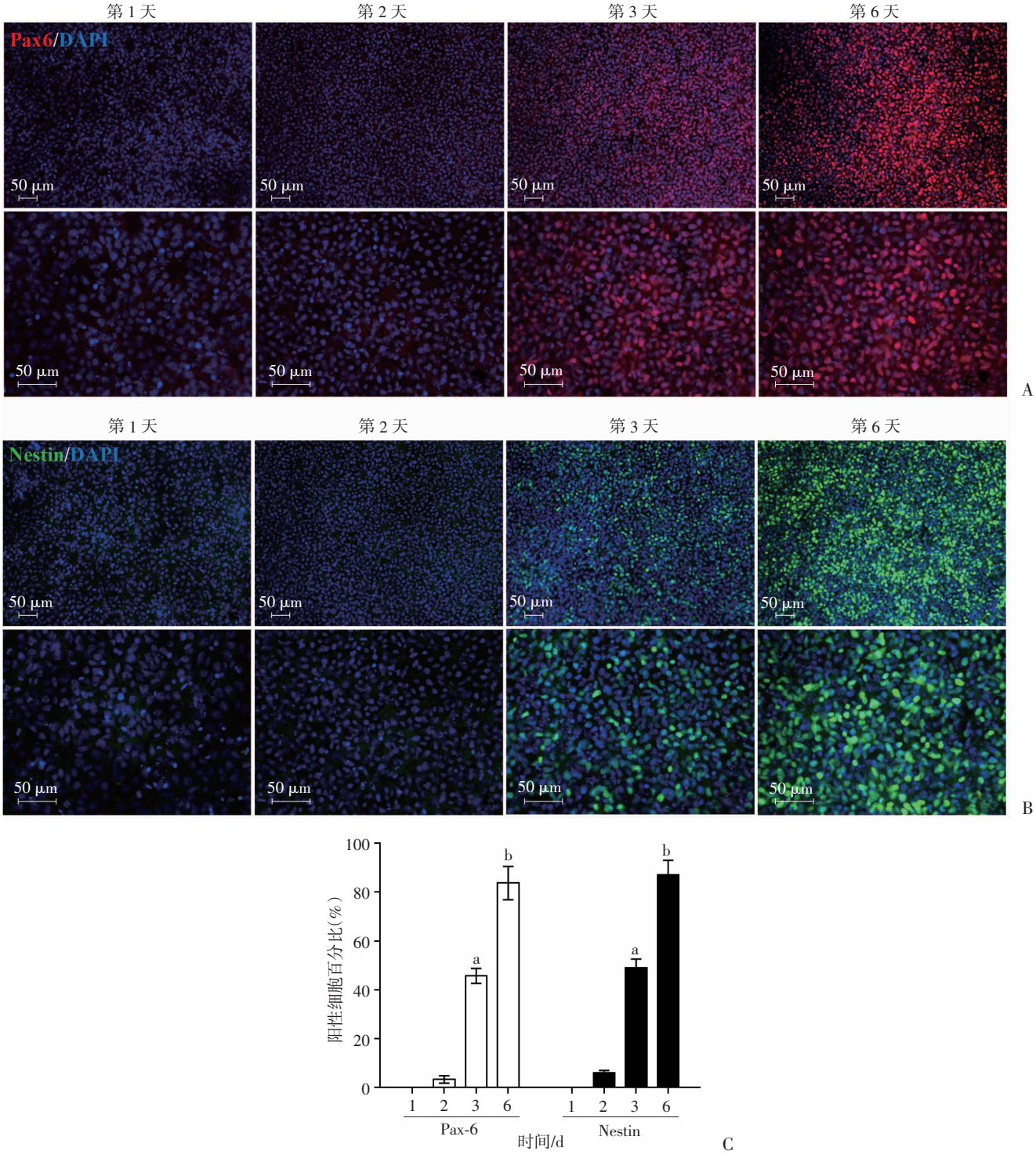
1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。采用单因素方差分析或t检验进行分析,所有数据重复3次,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　体外诱导 ESCs 向 NPCs 分化

ESCs 向 NPCs 分化后第 1、2、3 和 6 天,免疫荧光检测 NPCs 标记物 Pax-6 和 Nestin 表达。结果发现分化后第 3 天起 Pax-6 和 Nestin 表达呈显著阳性($P<0.01$),证实 ESCs 分化为 NPCs。继续培养至第 6 天,Pax-6 和 Nestin 阳性比例进一步增加($P<0.01$)。见图 1。

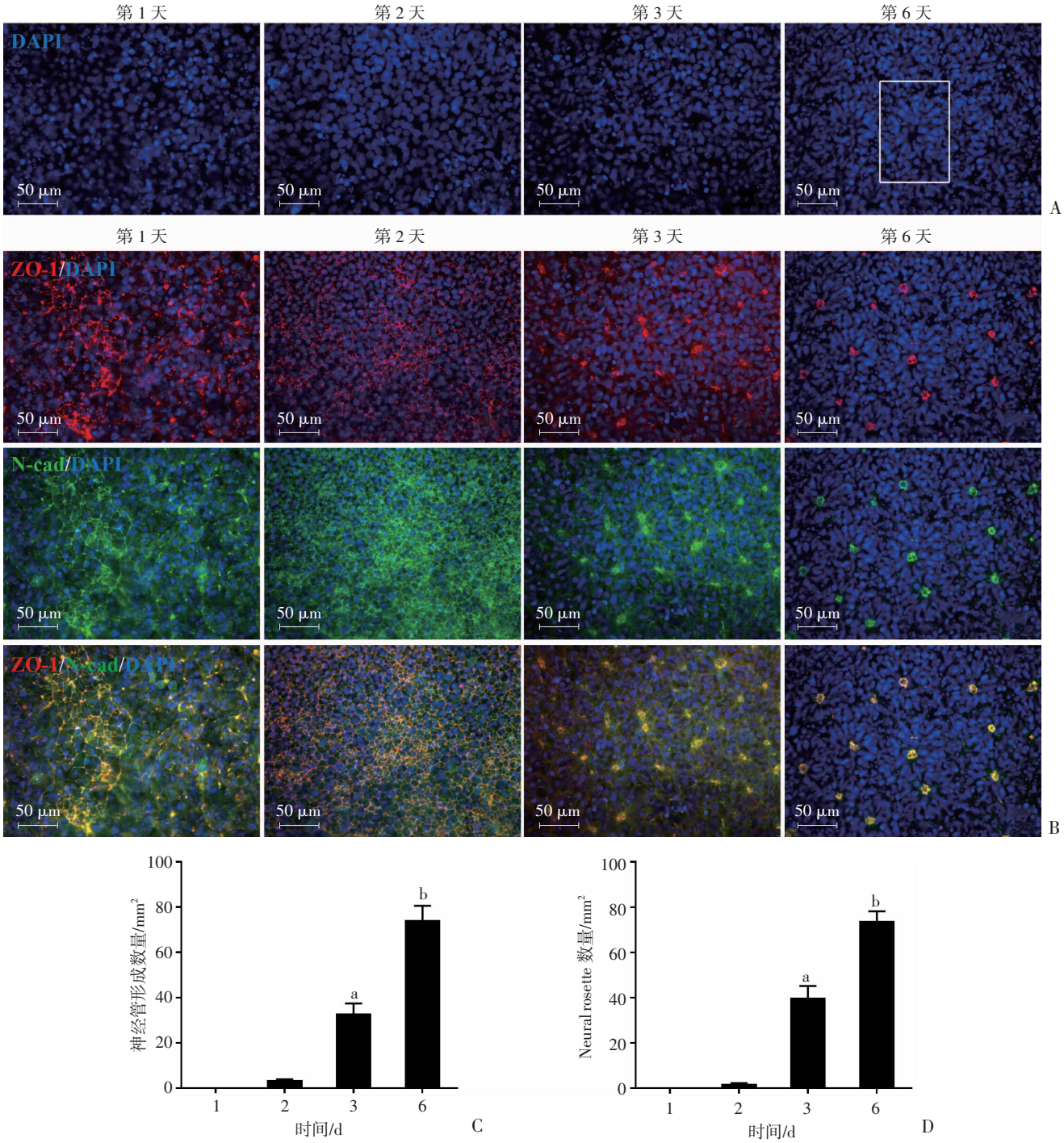


A:不同时间点 Pax-6 表达;B:不同时间点 Nestin 表达　A、B 图下排为上排的放大图;C:不同时间点 Pax-6 和 Nestin 阳性细胞百分比　a:$P<0.01$,与第 2 天比较;b:$P<0.01$,与第 3 天比较

图 1　免疫荧光检测定向分化后不同时间点 NPCs 标记物

2.2　NPCs 发生 ABP 并形成神经管结构

图 2A 显示 ESCs 向 NPCs 分化第 6 天时细胞排列为管腔状结构,说明体外诱导定向分化过程模拟神经管形成。紧密连接蛋白 ZO-1 和 N-cadherin 从定向分化第 3 天起聚集在 NPCs 的管腔侧(apical 侧)形成 neural rosette,证实 ESCs 向 NPCs 分化时细胞发生 ABP(图 2B)。分别对神经管结构和 neural rosette 进行统计学分析,结果发现两者均在分化后第 3 天显著形成($P<0.01$),并在第 6 天进一步增多($P<0.01$,图 2C、D)。



A:不同时间点观察管腔样结构,第 6 天白色方框内为管腔样结构特征;B:不同时间点观察 ABP 形成;C:不同时间点神经管数量统计学分析;D:不同时间点 neural rosette 数量统计学分析;a:$P<0.01$,与第 2 天比较;b:$P<0.01$,与第 3 天比较

图 2　ESCs 向 NPCs 分化中神经管和 ABP 结构形成

2.3 ESCs 向 NPCs 分化过程发生 ABP

为进一步观察分化和 ABP 形成的关系,我们在分化后 1、2、3 和 6 天收集细胞进行 Pax6/ZO-1 双染色。免疫荧光结果发现分化后第 3 天 Pax6 阳性,同时 ZO-1 也在第 3 天起聚集在 apical 侧,说明 ESCs 向 NPCs 分化和形成 ABP 是同时进行(图 3)。

2.4 NPCs 定向分化过程 S100A9 表达和定位变化

收集 ESCs 向 NPCs 分化第 1~6 天细胞,Western blot 证实 S100A9 蛋白水平从第 3 天起明显增高,第 3、4、5、6 天 S100A9 蛋白相对表达量分别与第 1 天比较差异有统计学意义($P<0.01$,图 4A),免疫荧光发现 S100A9 在分化第 1 天和第 2 天分布于包膜或胞浆,从第 3 天起积聚于 apical 侧(图 4B),说明 S100A9 在 NPCs 分化、ABP 发生或神经管形成过程中可能发挥一定作用。

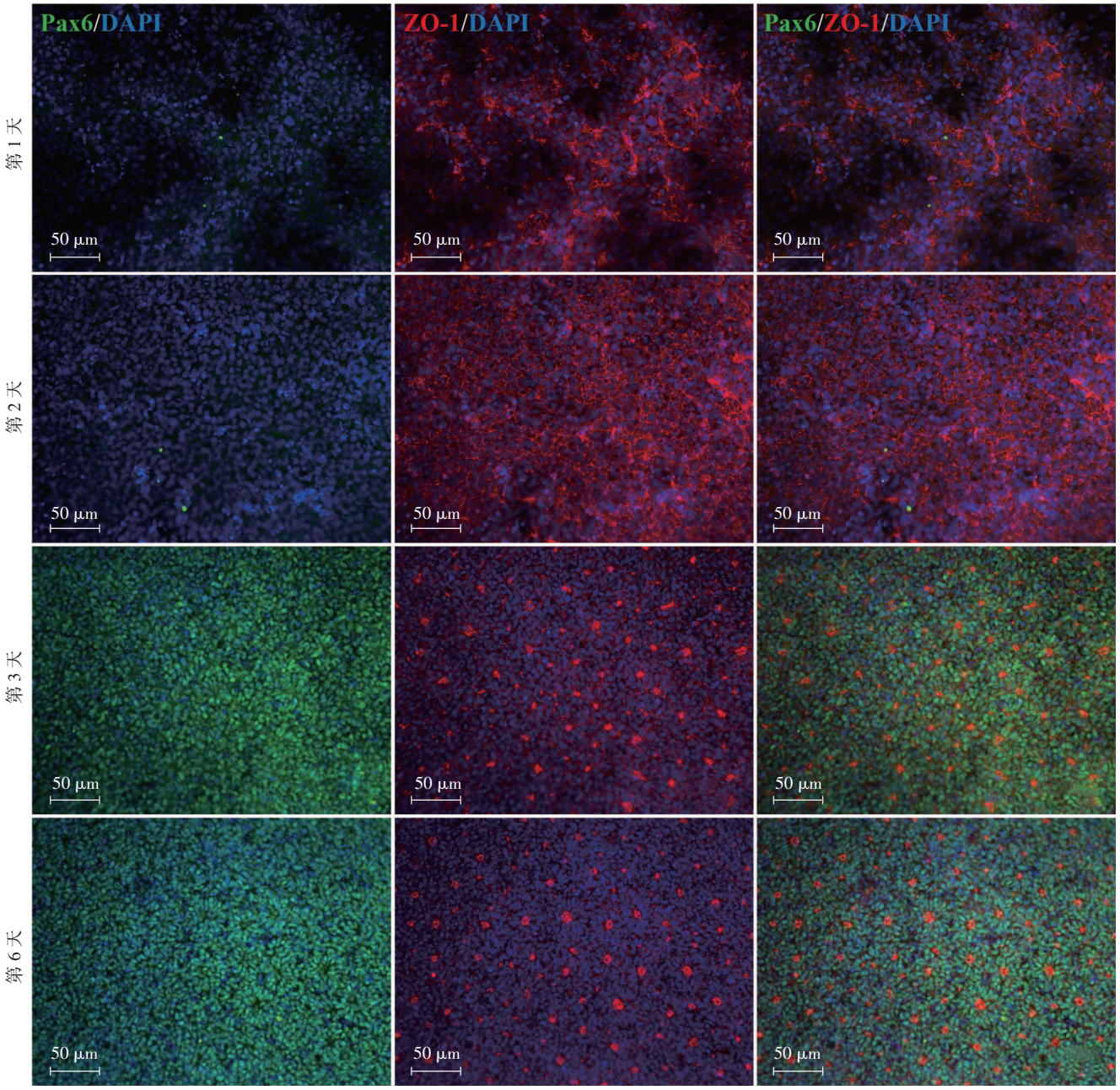
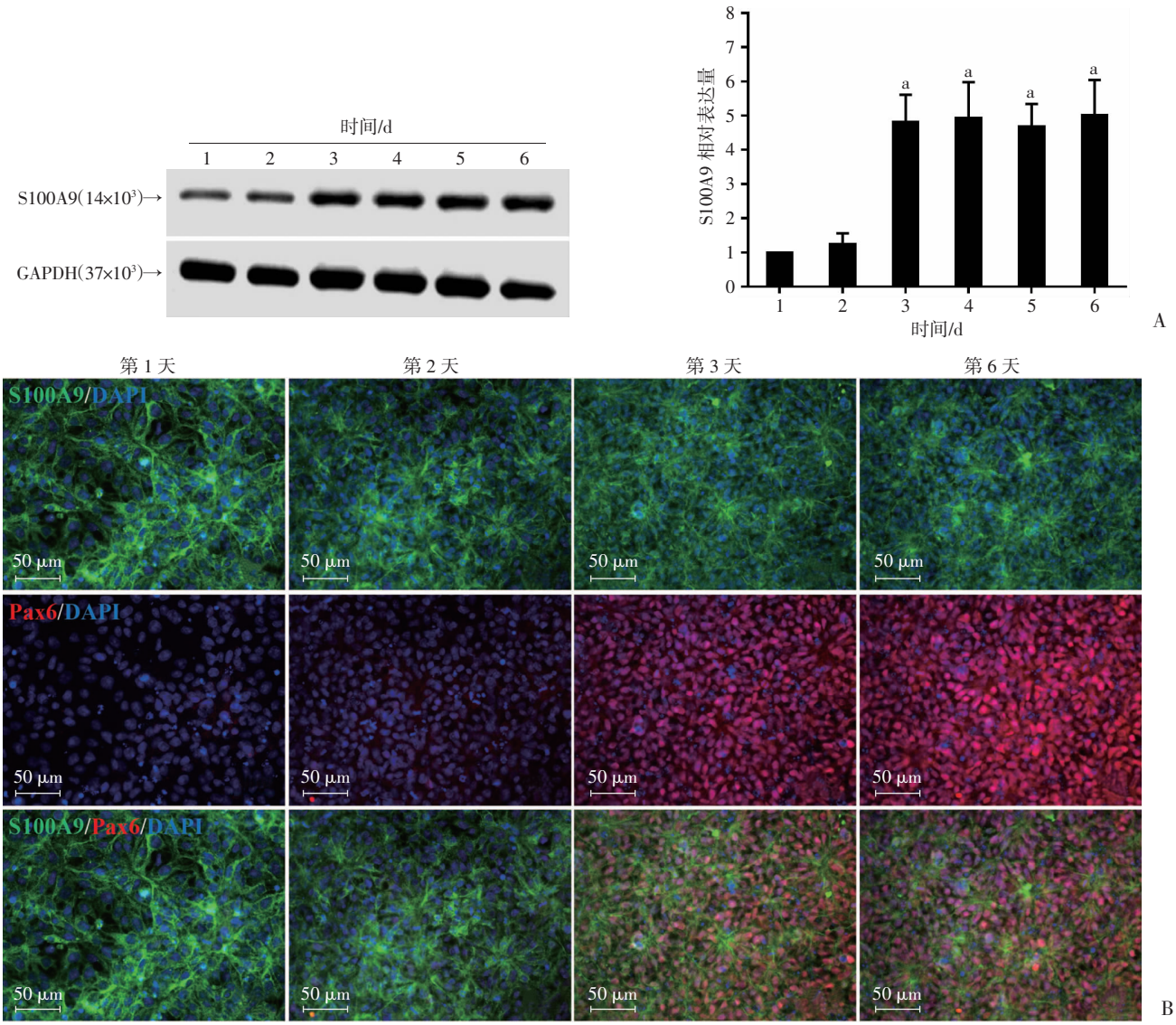


图 3 ESCs 向 NPCs 分化不同时间点 Pax6 和 ZO-1 共表达免疫荧光观察



A:不同时间点 S100A9 蛋白表达水平变化;a: $P<0.01$,与第 1 天比较;B:ESCs 向 NPCs 分化过程不同时间点 S100A9 蛋白定位变化

图 4 NSCs 向 NPCs 分化过程中不同时间点 S100A9 表达与定位

2.5 S100A9 未调控 ESCs 向 NPCs 分化

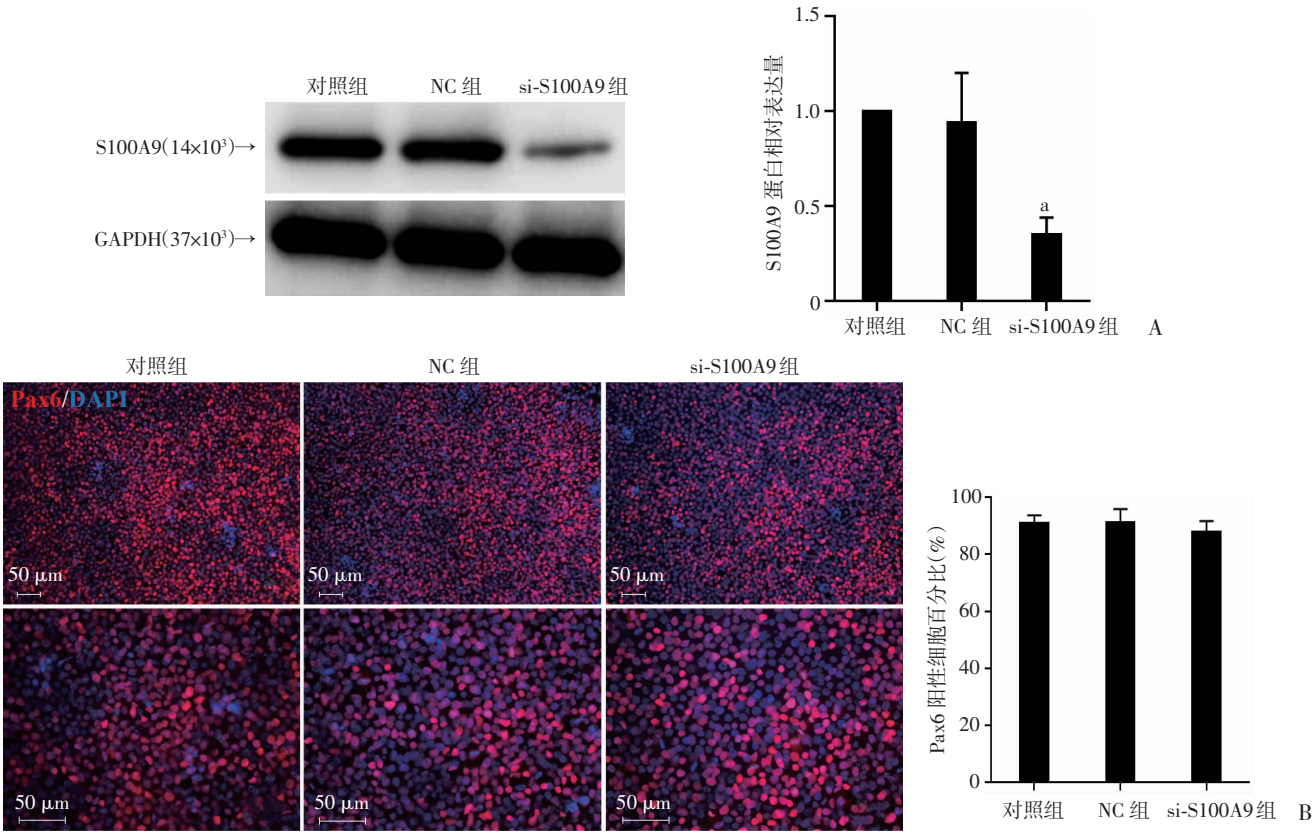
将 ESCs 分为对照组、NC 组和 si-S100A9 组,Western blot 证实 si-S100A9 组中 S100A9 蛋白水平明显下调($P<0.01$,图 5A)。各组 ESCs 向 NPCs 分化第 6 天均表达 Pax-6,说明 S100A9 并未调控 ESCs 定向分化为 NPCs(图 5B)。

2.6 S100A9 促进 ESCs 向 NPCs 分化过程中 ABP 和神经管结构形成

诱导对照组、NC 组和 si-S100A9 组 ESCs 向 NPCs 分化后第 6 天,si-S100A9 组中 neural rosette 密度显著降低($P<0.01$),而分化第 3 天予以外源性 S100A9 重组蛋白(1 μg/mL)处理细胞可部分恢复 neural rosette 密度($P<0.01$,图 6A)。si-S100A9 组细胞分化后第 6 天神经管结构显著下降($P<0.01$),从第 3 天起在 si-S100A9 组细胞加入外源性 S100A9 后该结构再次升高($P<0.01$,图 6B)。以上数据说明 S100A9 促进 ESCs 向 NPCs 分化过程中 ABP 和神经管形成。

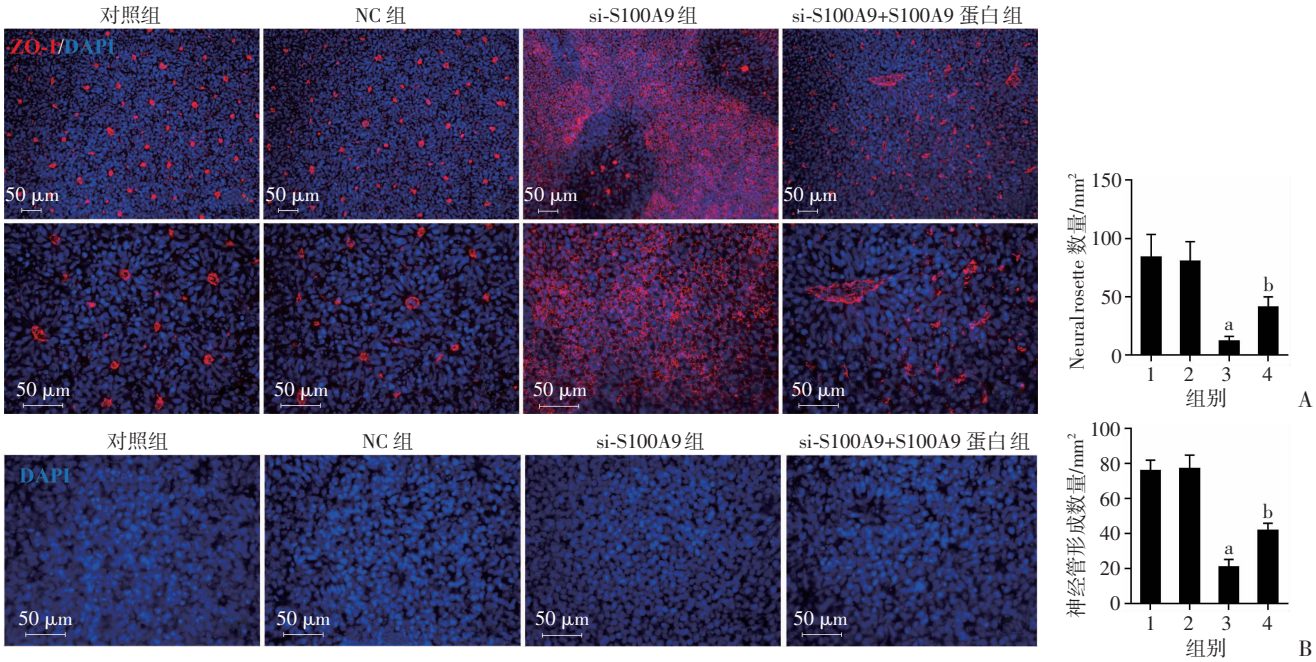
2.7 S100A9 提高 Notch 1 及下游 CBF1 表达

将 ESCs 分为对照组、NC 组和 si-S100A9 组,Western blot 显示下调 S100A9 并定向分化 6 d,NPCs 中 Notch1 和其靶向分子 CBF1 明显下降($P<0.05$,$P<0.01$);在分化后第 3 天 si-S100A9 组加入外源性 S100A9 重组蛋白(1 μg/mL),第 6 天时发现 Notch1 和 CBF1 较 si-S100A9 组升高($P<0.05$,图 7)。



A:Western blot 证实 si-S100A9 下调 S100A9 蛋白表达;a:$P<0.01$,与对照组比较;B:检测下调 S100A9 对 NPCs 定向分化的影响

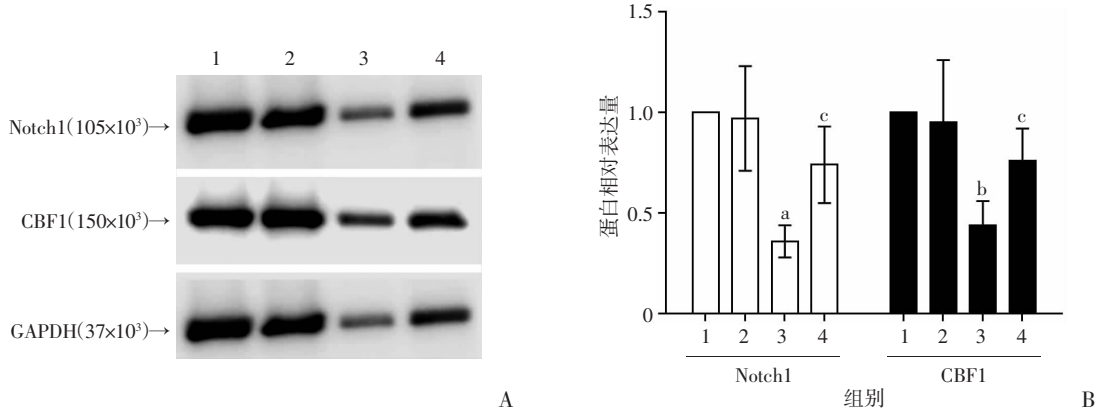
图 5 下调 S100A9 未抑制 ESC 向 NPC 分化



1:对照组;2:NC 组;3: si-S100A9 组;4:si-S100A9+S100A9 蛋白组;a:$P<0.01$, 与对照组比较;b:$P<0.01$,与 si-S100A9 组比较

A:下调 S100A9 和外源性 S100A9 蛋白对 ABP 的影响;B:免疫荧光观察 S100A9 对体外神经管形成的作用

图 6 S100A9 促进 ESCs 向 NPCs 分化过程中 ABP 和神经管形成



1:对照组;2:NC 组;3: si-S100A9 组;4:si-S100A9+S100A9 蛋白组;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$,与对照组比较;c: $P<0.05$, 与 si-S100A9 比较

图 7 下调 S100A9 或外源性 S100A9 蛋白对 Notch1 和 CBF1 表达的影响

3 讨论

小鼠胚胎早期神经板逐渐粗厚和分层,于胚胎期 8.5 d 形成神经管,逐渐发展为前脑、中脑和后脑[6]。由于该阶段在子宫内进行,组织结构细微不典型,对目的基因进行特异性干预十分困难,很少直接有体内研究探索胚胎发育为不同组织器官的分子调控机制。体外培养的 ESCs 具有多分化潜能,在不同定向诱导培养基作用下可分化为不同谱系祖细胞,并进一步形成组织特异性细胞,因此对 ESCs 进行定向分化可在一定程度上帮助我们了解各谱系形成的驱动因素,并提高我们对发育过程中分子调控的认识。目前有学者利用 ESCs 在体外定向诱导模拟早期脑发育和神经管形态,探索 ESCs 向 NPCs 分化和形成神经管的机制[7]。本研究发现 ESCs 定向分化 3 d 出现 Pax-6 和 Nestin 阳性表达,证实 ESCs 分化为 NPCs。6 d 后 NPCs 放射状排列,中间呈现管腔样结构,阐明体外培养 ESCs 能够形成神经管。

在正常生理情况下,构建神经管的 NPCs 通常发生 ABP,apical 侧指向管腔,basal 侧在外缘,紧密连接蛋白移位并聚集于 apical 侧,形成特有的 neural rosette 结构[8]。ABP 或 neural rosette 结构在神经发育过程中十分重要,有助于 NPCs 自我更新和向神经谱系进一步分化[9]。本研究结果显示 ESCs 向 NPCs 分化后第 3 天起 ZO-1 和 N-cadherin 均定位于 apical 侧形成 neural rosette,说明该体外定向分化成功模拟胚胎早期神经管发育。有研究发现,当神经管中 NPCs 丢失 ABP 结构,可能出现脑结构和功能异常,导致多种神经精神系统疾病发生,如狂躁症、自闭症、精神分裂症、抑郁和肿瘤等[10]。因此,本研究所描述的体外 NPCs 分化和 ABP 形成过程有助于我们将来从发育的角度了解神经系统相关疾病的分子病理机制。

近年来,许多研究提出炎症或免疫相关分子可能参与胚胎时期脑发育[11]。S100A9 与炎症调控密切相关,甚至成为了炎症相关疾病的生物标记物,如关节炎、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、红斑狼疮、牛皮癣等[12]。S100A9 的炎症相关功能十分复杂,细胞内 S100A9 能够促进炎症介质代谢和白细胞趋化,而当其定位于细胞外基质则可能成为一种促炎配体,通过与细胞膜上 Toll 样受体 4 或晚期糖基化终产物受体结合,激活 MAPK 或 NF-κb 信号通路触发炎症反应[13-15]。国内学者发现 S100A9 促进 NPCs 分化可补充阿尔兹海默症中损伤的神经元,明确了该蛋白在中枢神经系统发展过程中的价值[5]。然而,目前很少有研究涉及到 S100A9 在早期神经发育中的作用。

本研究首先发现 ESCs 在第 3 天分化为 NPCs 时,S100A9 蛋白表达也明显上升,并开始定位于 apical 侧。慢病毒下调 S100A9 表达后 ESCs 仍然能向 NPCs 分化,但失去 ABP 特征这一形态学改变不利于早期脑发育。当加入 S100A9 重组蛋白后 NPCs 部分恢复 ABP,说明 S100A9 在 NPCs 放射状排列形成神经管过程中发挥重要功能。Notch 参与了胚胎向神经系统发育的调控,但在不同阶段的功能却大相庭径,例如 Notch 有助于 ESCs 向 NPCs 分化,但也能通过维持 NPCs 干性而阻碍其分化为大脑皮质神经元[16-17]。国外学者证实 Notch1 也能促进神经管形成,并且刺激 NPCs 发生 ABP,其主要机制可能是提高下游关键蛋白 CBF1 的表达[3]。CBF1 是一种 DNA 连接蛋白,当 Notch1 与 CBF1 结合能提高后者的转录活性,驱动构建神经管结构的特异性基因扩增,有助于 NPC 发生 ABP 并形成神经管[18]。我们发现下调 S100A9 抑制 neural rosette 数量及 Notch1 和 CBF1 表达,当予以外

源性 S100A9 重组蛋白处理细胞后,Notch1 和 CBF1 水平明显恢复,建议 S100A9 对 ABP 和神经管构建的功能是通过调控 Notch1 和 CBF1 实现的。此外课题组前期也报道了 S100A9 能提高某些脑肿瘤的恶性生长,这些结果表明维持 S100A9 平衡在神经系统稳定发展中的重要性[19-20]。

综上所述,体外 ESCs 向 NPCs 分化过程中细胞发生 ABP 和形成神经管结构,其机制可能涉及 S100A9 对 Notch1 和下游关键分子 CBF1 的调控。本研究有助于我们初步了解早期神经发育的分子机制,为进一步实施体内胚胎脑形成和神经分化打下坚实基础,在推动再生医学应用与临床转化方面具有重要价值。

参考文献:

[1] MOJALLAL M, ZHENG Y J, HULTIN S, *et al*. AmotL2 disrupts apical-basal cell polarity and promotes tumour invasion[J]. Nat Commun, 2014, 5: 4557. DOI:10.1038/ncomms5557.

[2] MEDELNIK J P, ROENSCH K, OKAWA S, *et al*. Signaling-dependent control of apical membrane size and self-renewal in rosette-stage human neuroepithelial stem cells[J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(6): 1751-1765. DOI:10.1016/j.stemcr.2018.04.018.

[3] MAIN H, RADENKOVIC J, JIN S B, *et al*. Notch signaling maintains neural rosette polarity[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62959. DOI:10.1371/journal.pone.0062959.

[4] WANG S W, SONG R, WANG Z Y, *et al*. S100A8/A9 in inflammation[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1298. DOI:10.3389/fimmu.2018.01298.

[5] TIAN Y, CAO R, CHE B C, *et al*. Proinflammatory S100A9 regulates differentiation and aggregation of neural stem cells[J]. ACS Chem Neurosci, 2020, 11(21): 3549-3556. DOI:10.1021/acschemneuro.0c00365.

[6] HOLDHOF D, SCHOOF M, AL-KERSHI S, *et al*. Brahma-related gene 1 has time-specific roles during brain and eye development[J]. Development, 2021, 148(10): dev196147. DOI:10.1242/dev.196147.

[7] JEON K, PARK K, JETTEN A M. Efficient neural differentiation using single-cell culture of human embryonic stem cells[J]. J Vis Exp, 2020(155): 10.3791/60571. DOI:10.3791/60571.

[8] GRABIEC M, HŘÍBKOVÁ H, VAŘECHA M, *et al*. Stage-specific roles of FGF2 signaling in human neural development[J]. Stem Cell Res, 2016, 17(2): 330-341. DOI:10.1016/j.scr.2016.08.012.

[9] BROCCOLI V, GIANNELLI S G, MAZZARA P G. Modeling physiological and pathological human neurogenesis in the dish[J]. Front Neurosci, 2014, 8: 183. DOI:10.3389/fnins.2014.00183.

[10] TOWNSHEND R F, SHAO Y, WANG S C, *et al*. Effect of cell spreading on rosette formation by human pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 588941. DOI:10.3389/fcell.2020.588941.

[11] COULTHARD L G, HAWKSWORTH O A, LI R, *et al*. Complement C5aR1 signaling promotes polarization and proliferation of embryonic neural progenitor cells through PKCζ[J]. J Neurosci, 2017, 37(22): 5395-5407. DOI:10.1523/JNEUROSCI.0525-17.2017.

[12] JUKIC A, BAKIRI L, WAGNER E F, *et al*. Calprotectin: from biomarker to biological function[J]. Gut, 2021, 70(10): 1978-1988. DOI:10.1136/gutjnl-2021-324855.

[13] MA L, SUN P, ZHANG J C, *et al*. Proinflammatory effects of S100A8/A9 *via* TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(1): 31-38. DOI:10.3892/ijmm.2017.2987.

[14] LIU S, XIE Y, LUO W, *et al*. PE_PGRS31-S100A9 interaction promotes mycobacterial survival in macrophages through the regulation of NF-κB-TNF-α signaling and arachidonic acid metabolism[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 845. DOI:10.3389/fmicb.2020.00845.

[15] CREMERS N A J, VAN DEN BOSCH M H J, VAN DALEN S, *et al*. S100A8/A9 increases the mobilization of pro-inflammatory Ly6C high monocytes to the synovium during experimental osteoarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 217. DOI:10.1186/s13075-017-1426-6.

[16] CHEN J C, DONG X X, CHENG X J, *et al*. Ogt controls neural stem/progenitor cell pool and adult neurogenesis through modulating Notch signaling[J]. Cell Rep, 2021, 34(13): 108905. DOI:10.1016/j.celrep.2021.108905.

[17] ZHANG R R, ENGLER A, TAYLOR V. Notch: an interactive player in neurogenesis and disease[J]. Cell Tissue Res, 2018, 371(1): 73-89. DOI:10.1007/s00441-017-2641-9.

[18] NOISA P, LUND C, KANDURI K, *et al*. Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells[J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 9): 2083-2094. DOI:10.1242/jcs.145755.

[19] HUANG N, ZHAO G J, YANG Q, *et al*. Intracellular and extracellular S100A9 trigger epithelial-mesenchymal transition and promote the invasive phenotype of pituitary adenoma through activation of AKT1[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(22): 23114-23128. DOI:10.18632/aging.104072.

[20] HUANG N, CHEN S, DENG J M, *et al*. Overexpression of S100A9 in human glioma and *in-vitro* inhibition by aspirin[J]. Eur J Cancer Prev, 2013, 22(6): 585-595. DOI:10.1097/CEJ.0b013e328364f1c9.

(收稿:2022-04-01;修回:2022-06-08)

(编辑 刘秋池)