基础研究 文章编号:0253-3626(2011)04-0398-03

Notch4信号在小鼠胚胎早期造血发育的表达

张树君[1],陈建斌[1],杨春秀[1],李芳菲[2],姜 蓉[2]
(1.重庆医科大学附属第一医院血液内科;2.重庆医科大学干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨小鼠胚胎发育过程早期造血组织中 Notch4 信号的基因与蛋白的表达情况。方法:采用 PT-PCR 和 Western blot 方法,对小鼠胚胎孕 9.5 d(E9.5)、E10.5、E11.5、E12.5 胚胎的主动脉-性腺-中肾(Aorta-gonad-mesonephros,AGM)区和胎肝中 Notch4 信号基因和蛋白的表达进行检测。结果:2 组小鼠早期造血相关组织的 Notch4 mRNA 与蛋白表达,在 AGM 区 E10.5 组较其它组明显增高($P<0.05$);在 AGM 区和胚胎中都是随着孕龄的增大而逐渐减低($P<0.01$)。AGM 区与胚胎中比较,在 9.5 d 和 12.5 d 有统计学意义($P<0.05$);在 10.5 d 与 11.5 d 无统计学意义($P>0.05$)。PT-PCR 结果显示表达规律相同。结论:Notch4 信号在小鼠胚胎早期造血组织中有表达,但其功能有待进一步研究。

【关键词】Notch4;主动脉-性腺-中肾;胎肝;造血发育
【中国图书分类法分类号】R394.3 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-24

Expression of Notch4 in hematopoietic system during early mouse development

ZHANG Shu-jun, et al
(*Department of Hematology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of Notch4 gene and protein in the hematopoietic system in mouse early embryos. *Methods*: The expression of Notch4 mRNA and protein of the Hematopoietic system form the mouse embryonic aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and fetal liver at embryonic day (E) 9.5, E10.5, E11.5, E12.5 were detected by RT-PCR and Western blot techniques. *Results*: In two groups of mouse early relevant hematopoietic tissue, Notch4 mRNA and protein expression of E10.5 group were significantly higher than other groups ($P<0.05$) in the AGM area, and decreased with the pregnancy in both the AGM and fetal liver ($P<0.01$). There was statistical difference at embryonic day (E) 9.5 and 12.5 in the area comparison between AGM and fetal live ($P<0.05$). There was no statistical significance ($P>0.05$) at embryonic day (E) 10.5 and 11.5. PT - PCR showed the same expression rules. *Conclusion*: The Notch4 signals are expressed in early hematopoietic tissue of mouse embryos, but its function is to be further researched.

【Key words】Notch4; aorta-gonad-mesonephros (AGM); fetal liver; hematopoietic development

小鼠胚胎发育期间,造血发生表现为不同时间点多部位的连续过程,首先起源于卵黄囊和主动脉-性腺-中肾(Aorta-gonad-mesonephros,AGM)区,以后迁移到胎肝、胸腺、脾脏和骨髓[1-3]。有研究表明,AGM区以生成造血干/祖细胞为主要特征[4]。多能造血干细胞不断分化为各系细胞并完成细胞成熟过程,说明原本相同细胞间表达了不同基因。

尽管许多因素造成了基因表达的差异,但细胞之间信号影响是基因及决定细胞分化结果的关键因素。Notch 家族含有 1 组高度保守的蛋白质,其作用即为细胞表面受体,又为基因转录的调节因子,可使细胞群体直接影响邻近细胞的基因表达。在果蝇和线虫中,Notch 信号通路精确调控细胞分化的起始过程,对胚胎发育过程中器官发生和形态建成起重要作用。本实验以小鼠早期胚胎为材料,探讨早期胚胎造血发育阶段 Notch4 信号表达的时空变化模式,以期为哺乳动物胚胎造血发育的 Notch4 信号分子调控机制研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级 C57BL 小鼠,雄性 4~6 周龄,雌性 6~8 周龄,体重 25~30 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。规律光照周期(光照06:00-20:00,黑暗20:00-06:00),室温22℃,自由饮水取食。雌雄(3:1)合笼过夜,次日早晨检查阴栓,见有阴栓日以 0 d 计算胚龄。分别取 E9.5、E10.5、E11.5、E12.5 孕鼠颈椎脱臼处死,立即取出小鼠胚胎,在解剖显微镜下取胚胎的AGM区和胎肝,-70℃冻存,用于提取RNA或提取蛋白。按

作者介绍:张树君(1984-),女,硕士,
研究方向:Notch 信号在小鼠胚胎发育中的作用。
通信作者:陈建斌,男,教授, Email:cqchenjianbin2007@126.com。
基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(编号:2009BB5401)。

照取材部位不同分为AGM区和胎肝2组，每组按孕龄E9.5、E10.5、E11.5、E12.5分为4个时间点。实验过程中对动物的处置符合科学技术部2006年发布的《关于善待实验动物的指导性意见的要求》。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR法检测Notch4基因 首先进行引物的设计和合成，Notch4引物的序列为上游：TGCCCCCTGGTTTCATTCG，下游：GAACCTCCGATTCACACTCCT（273 bp），内参 β-actin 上游：TCCTGTGGCATCCACGAAACT，下游：GAAGCATTTGCG-GTGGACGAT（315 bp），由上海生物工程研究所合成。

分别取各时间点的 AGM 区和胎肝两部分组织，采用 Trizol 试剂提取总 RNA，以提取的总 RNA 为模板进行反转录制备 cDNA 库。以 cDNA 库为模板，分别 PCR 扩增 AGM 区和胎肝组织的 Notch4，每个反应体系中均加入 β-actin 的引物作为 PCR 扩增的内参，以 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 Notch4 扩增产物和 β-actin 扩增产物。应用凝胶图像分析系统对 RT-PCR 产物的电泳条带进行灰度分析。

1.2.2 Western blot 法检测 Notch4 蛋白 快速将 -70℃中的组织取出，放入研钵中研碎，加入蛋白裂解液及蛋白酶抑制剂，室温静置 20 min，4℃ 12 000 r/min 离心 20 min，取待测上清液，样品加入 loading buffer 后沸水煮 8 min 进行蛋白变性。进行 10%SDS-PAGE 电泳 120 min，100 mV 恒压电转膜，8%的脱脂奶粉封闭室温 2 h，浸入兔抗人 Notch4 抗体（用 8%的脱脂奶粉稀释 1:300）中，4℃过夜，TBST 漂洗 10 min × 3 次，浸入二抗山羊抗兔 IgG（1:1 000）中，室温 2 h，TBST 漂洗 10 min × 3 次，按 ECL 发光试剂盒说明书操作显色，X 射线胶片曝光，然后进行条带扫描和分析。

1.3 统计学方法

将RT-PCR和Western blot条带扫描和分析，计算灰度比值。采用 SPSS17.0 版软件进行分析，形成的各组计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用多组计量资料秩和检验分析，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组小鼠早期造血相关组织的 Notch4 mRNA 表达

在 AGM 区，E10.5 组在 Notch4 mRNA 较其它组明显增高，提示 Notch4 mRNA 在第 10.5 天最高（$P<0.05$）。在胎肝中，Notch4 mRNA 随着孕龄的增大而逐渐减低（$P<0.01$）。

AGM 区与胚胎区比较，在 9.5 d 和 12.5 d 有统计学意义；在 10.5 d 与 11.5 d 无统计学意义（表 1 所示）。

表 1 Notch4 mRNA 的灰度比值（$\bar{x} \pm s$）

组别	E9.5	E10.5	E11.5	E12.5
AGM区	0.97 ± 0.06	1.13 ± 0.13	0.94 ± 0.10	0.95 ± 0.05
胎肝	1.46 ± 0.14	1.08 ± 0.11	0.92 ± 0.08	0.67 ± 0.14

注：方差不齐，采用 Kruskal-Wallis 检验：$\chi^2=46.03$，$P<0.001$；各组间采用 Mann-Whitney 检验，AGM 区：E10.5 组与其他 3 组比较 P 值分别为 0.01、0.007、0.006，其它各组间比较 $P>0.05$；胎肝区各组间比较均 $P<0.01$；AGM 区与胚胎区比较 $PE_{9.5}=0.001$、$PE_{10.5}=0.40$、$PE_{11.5}=0.75$、$PE_{12.5}=0.002$

RT-PCR 结果显示，Notch4 mRNA 在 AGM 区所有时相均有表达，表达量较低，但在 E10.5 表达量比其它组高；在胎肝区其 Notch1 mRNA 表达水平不同，随孕龄增大而逐渐减低（图 1 所示）。



A. AGM 区；B. 胎肝；C. β-actin

图 1 Notch4 mRNA 的表达

2.2 2 组小鼠早期造血相关组织的 Notch4 蛋白表达

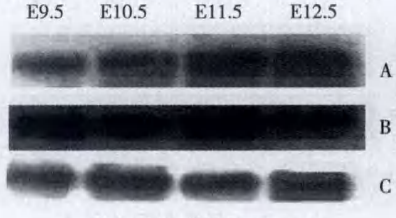
在 AGM 区，E10.5 组在 Notch4 蛋白表达比值较其他组明显增高，提示 Notch4 蛋白表达在第 10.5 天最高（$P<0.05$）。在胎肝中，Notch4 蛋白表达随着孕龄的增大而逐渐减低（$P<0.01$）。AGM 区与胚胎区比较，在 9.5 d 和 12.5 d 有统计学意义；在 10.5 d 与 11.5 d 无统计学意义（表 2 所示）。

表 2 Notch4 蛋白的灰度比值（$\bar{x} \pm s$）

组别	E9.5	E10.5	E11.5	E12.5
AGM区	0.85 ± 0.05	0.91 ± 0.12	0.82 ± 0.11	0.79 ± 0.05
胎肝	0.95 ± 0.08	0.88 ± 0.21	0.79 ± 0.09	0.56 ± 0.07

注：方差不齐，采用 Kruskal-Wallis 检验：$\chi^2=12.95$，$P=0.005$；各组间采用 Mann-Whitney 检验，AGM 区：E10.5 组与其他 3 组比较 P 值分别为 0.03、0.02、0.02，其它各组间比较 $P>0.05$；胎肝区各组间比较均 $P<0.01$；AGM 区与胚胎区比较 $PE_{9.5}=0.02$、$PE_{10.5}=0.53$、$PE_{11.5}=0.66$、$PE_{12.5}=0.007$

Western blot 结果显示，AGM 区的 Notch4 蛋白表达在第 10.5 天高于其它 3 组，胎肝中蛋白表达趋势与 Notch4 mRNA 在胎肝中的趋势相同，E9.5 表达最高，E12.5 表达最低（图 2 所示）。



A. AGM 区；B. 胎肝；C. β-actin

图 2 Notch4 蛋白的表达

3 讨 论

Notch 信号途径在胚胎的发育过程中是一条必需的途径。通常，Notch 的活化能影响前体细胞对多种环境信号的反应，通过一条特殊的途径使细胞能够选择其分化发育的方向。Notch 信号通路在胚胎发生发展中的作用十分复杂，在不同的组织细胞中作用不同，在同一组织细胞的不同发展阶段

作用各不相同。Notch4 具有抑制分化并刺激造血干/祖细胞增殖的能力[5]。Vercauteren 等[6]提出 Notch 对于干细胞与淋巴系祖细胞的生长发育有调节作用。因原始红细胞及同步出现的内皮细胞的密切关系引出了造血细胞和内皮细胞有共同的中胚层祖细胞－成血血管细胞的假说。Lancrin 等[7]认为，小鼠胚胎的成血血管细胞先向生血内皮细胞发育，再由生血内皮细胞生成造血细胞。成血血管细胞分化后的第 1 批标志是内皮细胞标志，例如 TIE2、Kit、CD31 和 VE-钙黏蛋白，其中的一些细胞表达造血细胞的标志 CD41，这些细胞具有生血内皮的特点。在血管组织中，Notch4 和 Delta 高度相似配体（Delta-Like，Dll）是主要受体。在内皮细胞过表达 Notch4 小鼠可发生与 Notch1/4 双基因敲出小鼠类似因严重血管塑性缺陷而导致胚胎死亡的结果[8]。

AGM 区是特定时期内由胚内中胚层的一层细胞向内侧移行[9]，接触内胚层形成的一段解剖区域，在小鼠胚胎发育期间，AGM 区中几乎全部的永久造血干/祖细胞都表达 CD41 抗原。在本实验中，Notch4 在 AGM 区表达比较稳定，推测 Notch4 在 AGM 区可能参与成血血管细胞的生成与发育。

胎肝是造血、免疫和肝脏系统干祖细胞的主要来源。在胚胎发育过程中，肝脏发生一系列形态与生化方面的变化。在本实验中，Notch4 表达含量不断变化，由最初 E9.5 的表达含量最高逐渐减低，其中 E10.5 和 E11.5 间的差异不明显（$P<0.05$）。研究证实 Notch 信号调控血管发生发育，Notch4 调控血管发育后期血管网形成和发育成熟，它抑制后期血管分支发育[10]。有研究证实，Notch4 特异性分布在血管内皮并且是分布在毛细血管内皮上的唯一 Notch 受体，在胚胎期鼠肺组织中分布较高[11,12]。本实验研究发现，Notch4 在 E9.5 表达最明显，其后表达逐渐下降，提示 Notch 信号对血管分支抑制作用减弱，毛细血管发生活跃，促进微血管网大量形成，这与胎肝在此胚胎期迅速发育，大量形成肝窦过程相吻合。这种分布可能与其在胎肝组织血管发育中具有重要关系。

胚胎造血的研究是一个很重要领域，而且造血发育的调控是极为复杂的。选择高度保守的 Notch 信号通路，以 Notch4 为切入点，研究 Notch4 在胚胎造血初期基因及蛋白的表达规律变化，来研究 Notch 与造血祖细胞演变的规律。本实验研究提示 Notch4 在小鼠胚胎早期造血组织中与胚胎血管的发生有密切联系，但其在造血功能中的作用有待进一步研究。为今后从更为细致的分子机制来研究造血发育奠定基础。

参 考 文 献

[1] Bertrand J Y, Chi N C, Santoso B, et al. Haematopoietic stem cells derive directly from aortic endothelium during development[J]. Nature, 2010, 464(7285): 108-111.

[2] Sroczynska P, Lancrin C, Kouskoff V, et al. The differential activities of Runx1 promoters define milestones during embryonic haematopoiesis [J]. Blood, 2009, 114(26): 5279-5289.

[3] Wei B, Yuan S, Gao Y, et al. Haematopoietic potential of mouse placenta with the application of placenta flushing[J]. Biol Res, 2008, 41(3): 261-270.

[4] Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system[J]. An-nu Rev Immunol, 2007, 25: 745-785.

[5] Ye Q, Shieh J H, Morrone G, et al. Expression of constitutively active Notch4 modulates myeloid proliferation and differentiation and promotes expansion of hematopoietic progenitors[J]. Leukemia, 2004, 18(4): 777-787.

[6] Vercauteren S M, Sutherland H J. Constitutively active Notch4 promotes early human hematopoietic progenitor cell maintenance while inhibiting differentiation and causes lymphoid abnormalities in vivo[J]. Blood, 2004, 104(8): 2315-2322.

[7] Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage [J]. Nature, 2009, 457(7017): 892-895.

[8] Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, et al. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(10): 5643-5648.

[9] Morgan K, Kharas M, Dzlerzak E, et al. Isolation of early hematopoietic stem cells from murine yolk sac and AGM[J]. J Vis Exp, 2008, 27(16): 789.

[10] Krebs L T, Xue Y, Norton C R, et al. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice[J]. Genes Dev, 2000, 14(11): 1343-1352.

[11] Favre C J, Mancuso M, Maas K, et al. Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung[J]. Am J Physiol HEART Circ Physiol, 2003, 285: 1917-1938.

[12] Taichman D B, Loomes K M, Schachtner S K, et al. Notch1 and jagged1 expression by the developing pulmonary vasculature[J]. Dev Dyn, 2002, 225: 166-175.

（责任编辑：冉明会）

读者·作者·编者

更 正

本刊 2010 年第 35 卷第 9 期第 1298 页《442 例不同年龄段抑郁症患者的临床特征及治疗回顾性分析》一文中通讯作者胡华性别由男更正为女。

本刊编辑部