

钙黏素亚型 2 在干细胞分化中的作用

柳 鑫 臧春逸

摘 要 细胞间粘连的物理作用和生物化学信号对于干细胞系的分化起至关重要的作用。钙黏素是细胞粘连分子中的重要一员,钙黏素亚型 2(cadherin-2,CDH2)调节的信号在干细胞分化中起重要作用。可以应用表面化学及微拓扑工程技术精准调节细胞间粘连的程度,进而实现调控干细胞的分化。这些研究会促进新技术产生,使实时监控干细胞分化成为可能,并有利于设计出控制干细胞分化的生物材料及支架,其将在组织工程与再生医学方面有潜在的应用价值。

关键词 钙黏素亚型 2 干细胞分化 再生医学

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.10.006

细胞间粘连可以调控单一细胞进一步合成组织,在组织结构与形态发生中起重要作用。细胞与细胞间或细胞与间质间的相互作用通过细胞粘连分子(cell adhesion molecules,CAMs)来调节。这些细胞粘连分子包括钙黏素、整联蛋白、选择蛋白和免疫球蛋白样 CAMs。细胞与细胞或与间质间的相互作用可调节细胞的多种行为,如:增生、分化、凋亡、细胞极化,总体来说其目的是保持组织的完整^[1,2]。

钙黏素亚型 2(cadherin-2,CDH2)是一种钙离子依赖跨膜糖蛋白,是粘连蛋白家族中的一员。它的作用是通过形成粘连带(adherens junctions,AJ)来调节钙离子依赖的亲同种抗原的细胞间的相互作用。细胞在不同状态下钙黏素的表达水平也不同,尤其当细胞从一种状态向另一种状态转换时,例如上皮间充质转换表现为 CDH2 过表达。钙黏素的表达与细胞间的粘连在干细胞分化或成熟细胞向多潜能细胞的转化中起作用^[3,4]。

干细胞分化受局部微环境中可溶性及非可溶性信号的影响。除了可溶性生长因子,许多精炼的研究中还牵扯到细胞与细胞外基质相互作用以及干细胞谱系分化传递的底物动力学^[5]。粘连带在胚胎干细胞再生、细胞重组、造血干细胞植入和间充质干细胞分化成肌肉过程中均起作用^[6,7]。对 CDH2 在干细胞分化中的作用进行介绍,旨在其对指导控制干细胞分化的新技术的产生与设计出纳米仿生材料,并将其应用于组织工程与再生医学方面有潜在价值。

一、粘连带:信号转导与机械感应

CDH2 包含细胞质区域和外功能区,外功能区包含 5 个串联的细胞外钙黏着蛋白(EC)区域^[8]。EC 区域包含钙离子结合位点,3 个钙离子作为区域间的连接者,可稳定外功能区的结构,保护它不被蛋白水解。最外层的 EC1 区域调节相邻细胞间钙黏着蛋白间的相互作用,进而在平行且相反的细胞膜间行成粘连带^[9]。CDH2 特定地在间充质类的细胞如成纤维细胞和心肌细胞上表达,并调节相同细胞间粘连,如肌成纤维细胞,或不同类型细胞间的粘连,如肌成纤维细胞与心肌细胞^[10]。

钙黏着蛋白间的作用会通过板盘突出启动开始,并引起细胞间通路的激活,最终形成钙黏着蛋白间肌动蛋白簇。钙黏着蛋白间的联系促进粘连带的形成并稳固粘连带。而肌动蛋白聚集会使粘连带扩张与成熟,进一步稳固并矫正相邻细胞膜。另外,b 钙黏着蛋白与钙黏着蛋白细胞质尾部相结合并作用于 a 钙黏着蛋白,来调节肌动蛋白细胞骨架^[11]。钙黏着蛋白细胞内的区域与 P120 钙黏着蛋白结合,使钙黏着蛋白与微管相连,并调节 GTP 酶 Rho、Rac1、Cdc42。扰乱 Rac 或 Rho 活性会影响 AJ 合成,Cdc42 则会影响 AJ 稳定^[11]。GTP 酶的功能是与钙黏素相连进而控制不同的细胞活动包括极化、迁移、凋亡^[12]。CDH2 通过 p120 与 b 钙黏着蛋白依赖信号通路来调节极化信号。CDH2 调节的细胞粘连对于组织整体的迁移是重要的。

研究表明钙黏素受生长因子的影响,并与生长因子受体相作用进而激活信号通路。当暴露于切断应激环境,上皮钙黏着蛋白与血小板内皮细胞粘连分子(PECAM-1)和血管内皮生长因子受体(VEGFR2)

基金项目:首都医科大学科研培育基金资助项目(PYZ2018010)
作者单位:100006 首都医科大学附属北京妇产医院妇科微创中心
通讯作者:臧春逸,电子信箱:zangchunyi@126.com

结合,这一复合体会引起整联蛋白激活,致使肌动蛋白细胞骨架重组^[13]。在上皮细胞,表皮生长因子受体(EGFR)与 CDH1 行成复合体进而激活 MAPK 通路,进而与细胞生存或 EMT 相关^[14]。成纤维细胞受体(FGFRs)在神经突生长时可以刺激 CDH2、FGF 通过加强稳固在 AJ 位点的上皮钙黏素对于保持血管的完整性起重要作用^[15]。肝细胞生长因子(HGF)调节细胞粘连分子上皮-钙黏着蛋白的表达,进而影响内皮细胞的活性、迁移与血管再生。最后,转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)可以通过提高 CDH2 水平增加角化细胞迁移,而这一作用可以被 EGF 抵消^[16]。

多项研究表明,钙黏素不仅受化学因素调控也受物理因素调控。近年来研究表明,底物强直可以通过 c-jun 氨基端激酶(JNK)磷酸化水平在培养基及在体内或体外的表皮组织中调节上皮细胞间 AJ 的形成^[17]。强直的底物导致 JNK 激活和 AJ 消失,而柔软的矩阵抑制 JNK 活性导致 AJ 合成。这一结论在生物工程表皮与(jnk1^{-/-}或 jnk2^{-/-})敲除鼠表皮中已得到验证。由此得出结论,JNK 通路所调节的底物的僵硬在体内外均有影响 AJ 合成的效应。这些发现可以帮助理解在组织发育过程中 AJ 的形成与消除的机制,也可以在三维水平上通过控制细胞间与细胞与底物间粘连,从而发现促进组织再生或抑制肿瘤浸润的治疗策略。

众所周知底物僵直可以影响焦点粘连,另有实验证实它也可以影响钙黏素调节的细胞间粘连。通过肌动蛋白收缩,底物僵直可以影响依赖钙黏素的整体细胞迁移。CDH2 被看作是一种机械反应的受体,当压力通过 CDH2 传导,粘连带的作用与整联蛋白-ECM 复合体的支撑作用是相同的。总体说来,僵硬的底物可以造成较大的牵引力,较大的细胞播散区,生成更多的 CDH2 连接带^[18]。

最后,了解以钙黏素为基础的细胞间的相互作用对于发展无支架组织工程相关的新型治疗方案是有帮助的。这些新的治疗方案基于细胞应用无支架技术如形成球体或生物打印进行自我合成,进而形成有结构的组织^[19]。

二、CDH2 在间充质干细胞分化中的作用

钙黏素可以调节干细胞稳定性及分化。间充质干细胞为治疗骨与软骨类疾病、心肌梗死、脑卒中、风湿性关节炎、急性肺损伤、器官移植疾病、皮肤移植排斥等提供细胞治疗的细胞来源^[20-22]。间充质干细胞在组织修复中发挥作用需要迁移到组织损伤的部位,

研究证实多种细胞的迁移与增生的潜能要受 CDH2 调节。间充质干细胞具有分化潜能和抗炎作用。当间充质干细胞培养成球体时它的分化潜能与抗炎作用会加强^[23]。CDH2 对于在关节滑液中成纤维细胞面对炎症时起作用是至关重要的,CDH2 在肌源性细胞分化过程中起重要作用。细胞密度大可以促进成肌细胞分化,提示钙黏素调节的细胞间接触可以影响肌肉生成。CDH2 在创伤愈合中成纤维细胞向肌成纤维细胞转化中起重要作用,可以增加创面的收缩促进创面闭合^[24]。

CDH2 在干细胞分化中起重要作用,因此可以挖掘细胞间的作用来控制干细胞分化的技术。包括以下两方面内容:①钙黏着蛋白表面工程控制干细胞分化;②表面微拓扑工程控制细胞间粘连的范围和信号。

1. 钙黏着蛋白表面工程控制干细胞分化:当 CDH1 在上皮细胞中聚集时,固定的钙黏素会诱发信号发生瀑布反应。钙黏素与 Fc 抗体结合生成融合蛋白可以使钙黏素固定到细胞表面。另外,为了生成有功能的表面物质,固定的钙黏素可以把其他连接蛋白激活的通路钙黏素调节的信号通路分开。钙黏素调节的连接蛋白激活的通路结果是在细胞间接触过程中生成 AJ^[25]。

CDH2 与 Fc 结合形成的固定融合蛋白保留了 CDH2 本身的粘连特性,使 β -联蛋白、 α -联蛋白和 P120 在细胞间接触部位聚集。成肌调节因子 SRF 表达升高可以证明 CDH2-Fc 结合形成的球形蛋白使成肌细胞成熟。在脂肪双层细胞膜中的 CDH2 可以诱导骨软骨前体中的间质细胞凝集^[26]。有研究证实固定的钙黏素以剂量依赖的方式促进 MSC 分化成 SMC。所以可以通过改变表面物质的构成与细胞密度控制干细胞分化。因此,钙黏素制动可以指导或调节干细胞分化,可以在组织工程与再生医学领域中利用这一作用机制制造有功能的生物材料。

2. 细胞表面微拓扑工程控制细胞间粘连范围与信号转导:微细加工技术使得在微米与纳米水平控制细胞间粘连范围成为可能。这种方法在控制细胞-基质间相互作用方面得到广泛应用,而细胞与基质间相互作用对于干细胞分化是至关重要的。鲜有研究应用几何微图形来控制细胞间粘连,并评价细胞间粘连对干细胞分化的影响^[27]。

有研究表明微岛的大小与细胞分散的程度密切相关,在较大的岛上,CDH2 的表达可以引起间充质干细胞向肌源性或软管源性细胞转化,而在小岛上则

向脂源性细胞转化。通过控制微岛的几何形状与大小,细胞间接触会增加,进而增加了软骨源性细胞的分化^[28]。然而控制细胞间的作用除了考虑微图形的大小还要考虑细胞的密度。因此,细胞分散程度会随细胞岛大小改变而变化。所以,细胞间作用对细胞与底物间粘连的影响相矛盾,使得调节它们间的作用具有挑战性。一些新的几何形状已被用来控制细胞间接触的范围,而不需考虑细胞密度或细胞分散区域^[29]。因此可以用来确定细胞间粘连范围与干细胞分化的关系。

三、实时监控细胞间粘连所调节的干细胞分化

理解细胞间粘连如何影响干细胞分化需要找到实时量化监测干细胞分化的方法。尤其是监测微图形表面的单个小细胞的方法是非常有用的。另外,监测单个细胞技术在处理胚胎异质性、诱导干细胞多能性、成人干细胞相关研究上非常有价值,同样对于区分不同分化潜能的细胞是有帮助的。

慢病毒排列技术可以监测在干细胞分化过程中的激活的基因或通路。新型慢病毒双重促进质粒(LVDP),可以定量测量一种基因促进因子(Pr)的活性,或转录因子(TF)结合部位(反应原件,RE),而无需考虑每一个细胞中基因的数量。二代慢病毒质粒(shLVDP)可以通过在多环西素中敲除伴随基因的办法来实现动态监测 Pr 或 RE 活性,由此发现在干细胞分化过程中涉及的基因^[30]。除此之外,在聚合反应中慢病毒粒子的表面可以设计成以共价键的方式与纤维素水凝胶结合,进而生成慢病毒排列,可以测量多种参与炎症反应中 Pr 或 RE 的活性。近年来,笔者发现了一系列 Pr 或 RE 库来监测干细胞向脂源性、软骨源性或肌源性分化过程,并识别出在分化中的新的通路^[30]。这一技术与新的微细加工方法可以确定细胞间粘连程度是如何影响成人干细胞分化,肿瘤干细胞或人诱导多能干细胞(hiPSC)分化,还有如何影响对于细胞重组有重要作用的干细胞多潜能性网络。

四、展 望

尽管一些研究聚焦于底物僵直对干细胞生物学的影响,细胞间粘连在引导干细胞再生或分化中的作用还是不清楚的。此篇聚焦于 CDH2 作为干细胞分化的调节因子作用。需要更多的研究来阐明细胞间粘连如何影响间充质分化,进而了解哪些分子通路参与其中。这些研究也将通过调节钙黏素调控的粘连范围,设计出能够引导间充质分化的产品,将其应用

于组织工程或再生医学。笔者所在团队通过进行子宫内瘢痕组织与正常子宫内膜的基因芯片与 microRNA 芯片检测,筛选出在子宫内瘢痕组织中 CDH2 显著高表达,且子宫内膜损伤越严重,CDH2 的表达水平越高,提示 CDH2 在子宫内膜损伤修复过程中,可能存在 CDH2 通过调节相关分子通路使得子宫内间充质细胞分化成肌肉组织,形成宫腔粘连带即子宫瘢痕。CDH2 的上游靶向负调控 microRNA 为 miRNA543,设想当子宫内膜面临损伤时转染 miRNA543 会使得 CDH2 表达下降,从而间充质细胞分化成肌肉组织减少,即瘢痕组织减少,减少对宫腔形态的影响以及对子宫肌层收缩的功能影响,从而改善致病因素对子宫内膜损伤的结局。最终期望通过对 CDH2 功能的研究,或许可以帮助设计出改善子宫内膜损伤修复结局的产品,应用于子宫内膜损伤的患者中,帮助患者保留子宫的生殖及生理功能。

参考文献

- 1 王源, 李万成. 上皮细胞间质转化促肺纤维化机制及药物干预治疗的研究进展[J]. 成都医学院学报, 2019, 14(2): 267 - 270
- 2 Harris TJ, Tepass U. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11: 502 - 514
- 3 Zhang D, Yang XJ, Luo QD, *et al.* Down - regulation of circular RNA_000926 attenuates renal cell carcinoma progression through miRNA - 411 - dependent CDH2 inhibition[J]. Am J Pathol, 2019, 189(12): 2469 - 2486
- 4 曹学全, 章辉, 卢洪胜, 等. 甲状腺乳头状癌中 FMNL2 和 EMT 相关蛋白的表达及其临床意义[J]. 浙江医学, 2019, 41(1): 14 - 17
- 5 Brasch J, Harrison OJ, Honig B, *et al.* Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion [J]. Trends Cell Biol, 2012, 22: 299 - 310
- 6 Lee EJ, Hwang I, Kim GH, *et al.* Endothelin - 1 augments therapeutic potency of human mesenchymal stem cells via CDH2 and VEGF signalling[J]. Mol Ther Methods Clin Dev, 2019, 17(13): 503 - 511
- 7 Aaron M, Nadeau G, Ouimet - Grennan E, *et al.* Identification of a single - nucleotide polymorphism within CDH2 gene associated with bone morbidity in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors [J]. Pharmacogenomics, 2019, 20(6): 409 - 420
- 8 Thompson SA, Blazeski A, Copeland CR, *et al.* Acute slowing of cardiac conduction in response to myofibroblast coupling to cardiomyocytes through N - cadherin[J]. Mol Cell Cardiol, 2014, 68: 29 - 37
- 9 Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12: 189 - 197
- 10 Turkowski KL, Tester DJ, Bos JM, *et al.* Whole exome sequencing with genomic triangulation implicates CDH2 - encoded N - cadherin as a novel pathogenic substrate for arrhythmogenic cardiomyopathy

- [J]. *Congenit Heart Dis*, 2017, 12(2): 226–235
- 11 Peglion F, Llenze F, Etienne – Manneville S. Adherens junction treadmill during collective migration[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 639–651
 - 12 Tzima E, Irani – Tehrani M, Kiosses, *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress[J]. *Nature*, 2005, 437: 426–431
 - 13 Williams G, Williams EJ, Doherty P. Dimeric versions of two short N – cadherin binding motifs (HAVDI and INPISG) function as N – cadherin agonists[J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 4361–4367
 - 14 Hatanaka K, Lanahan AA, Murakami M, *et al.* Fibroblast growth factor signaling potentiates VE – cadherin stability at adherens junctions by regulating SHP2[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e37600
 - 15 Diamond ME, Sun L, Ottaviano AJ, *et al.* Differential growth factor regulation of N – cadherin expression and motility in normal and malignant oral epithelium[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121: 2197–2207
 - 16 Wen JH, Vincent LG, Fuhrmann A, *et al.* Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation[J]. *Nat Mater*, 2014, 13: 979–987
 - 17 Chopra A, Tabdanov E, Patel H, *et al.* Cardiac myocyte remodeling mediated by N – cadherindependent mechanosensing[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300: H1252–H1266
 - 18 Schiele NR, Koppes RA, Chrisey DB, *et al.* Engineering cellular fibers for musculoskeletal soft tissues using directed self – assembly[J]. *Tissue Eng*, 2013, 19: 1223–1232
 - 19 Augello A, Tasso R, Negrini SM, *et al.* Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen – induced arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56: 1175–1186
 - 20 Black M, Milewski D, Le T, *et al.* FOXF1 inhibits pulmonary fibrosis by preventing CDH2 – CDH11 cadherin switch in myofibroblasts[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(2): 442–458
 - 21 Zhao G, Shi J, Xia J. Analysis of the association between CDH2 gene polymorphism and osteoarthritis risk[J]. *Med Sci (Paris)*, 2018, 34(Focus issue)F1: 105–112
 - 22 冯雪梅. Hey、MCP – 1、VE – cadherin 和 NGB 对急性脑梗死的诊断价值研究[J]. *现代医药卫生*, 2019, 35(15): 2317–2319
 - 23 Borghi N, James Nelson W. Intercellular adhesion in morphogenesis: molecular and biophysical considerations[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2009, 89: 1–32
 - 24 Gavard J, Marthiens V, Monnet C, *et al.* N – Cadherin activation substitutes for the cell contact control in cell cycle arrest and myogenic differentiation: involvement of p120 and beta – catenin[J]. *Biol Chem*, 2004, 279: 36795–36802
 - 25 Evans SF, Docheva D, Bernecker A, *et al.* Solid – supported lipid bilayers to drive stem cell fate and tissue architecture using periosteum derived progenitor cells[J]. *Bio Materials*, 2013, 34: 1878–1887
 - 26 Wang X, Song W, Kawazoe N, *et al.* The osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by controlled cell – cell interaction on micropatterned surfaces[J]. *Biomed Mater Res*, 2013, 101: 3388–3395
 - 27 Tian J, Andreadis ST. Independent and high – level dual gene expression in adult stem – progenitor cells from a single lentiviral vector[J]. *Gene Ther*, 2009, 16: 874–884
 - 28 Alimpteri S, Lei P, Tian J, *et al.* A novel lentivirus for quantitative assessment of gene knockdown in stem cell differentiation[J]. *Gene Ther*, 2012, 19: 1123–1132
 - 29 Padmashali RM, Andreadis ST. Engineering fibrinogenbinding VSV – G envelope for spatially and cell – controlled lentivirus delivery through fibrin hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2011, 32: 3330–3339
 - 30 Padmashali RM, Mistriotis P, Liang MS, *et al.* Lentiviral arrays for live – cell dynamic monitoring of gene and pathway activity during stem cell differentiation[J]. *Mol Ther*, 2014, 22: 1971–1982

(收稿日期: 2020 – 05 – 05)

(修回日期: 2020 – 05 – 05)

(上接第 19 页)

- 16 Higashimori A, Dong Y, Zhang Y, *et al.* Forkhead Box F2 suppresses gastric cancer through a novel FOXF2 – IRF2BPL – β – Catenin signaling axis[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(7): 1643–1656
- 17 Tran Mau – Them F, Guibaud L, Duplomb L, *et al.* De novo truncating variants in the intronless IRF2BPL are responsible for developmental epileptic encephalopathy[J]. *Genet Med*, 2019, 21(4): 1008–1014
- 18 Shelkowitz E, Singh JK, Larson A, *et al.* IRF2BPL gene mutation: expanding on neurologic phenotypes[J]. *Am J Med Genet A*, 2019, 179(11): 2263–2271
- 19 Prilop L, Buchert R, Woerz S, *et al.* IRF2BPL mutation causes nigrostriatal degeneration presenting with dystonia, spasticity and keratoconus[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2020, doi: 10. 1016/j. parkreldis. 2020. 03. 030
- 20 Skorvanek M, Dusek P, Rydzanicz M, *et al.* Neurodevelopmental disorder associated with IRF2BPL gene mutation: expanding the phenotype? [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2019, 62: 239–241
- 21 Ganos C, Zittel S, Hidding U, *et al.* IRF2BPL mutations cause autosomal dominant dystonia with anarthria, slow saccades and seizures[J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2019, 68: 57–59
- 22 Ganos C, Biskup S, Krüger S, *et al.* Dystonia with aphonia, slow horizontal saccades, epilepsy and photic myoclonus: a novel syndrome? [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2014, 20(3): 328–331
- 23 Ginevrino M, Battini R, Nuovo S, *et al.* A novel IRF2BPL truncating variant is associated with endolysosomal storage[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(1): 711–714
- 24 Spagnoli C, Rizzi S, Salerno GG, *et al.* IRF2BPL gene variants: One new case[J]. *Am J Med Genet A*, 2020, 182(1): 255–256

(收稿日期: 2020 – 04 – 24)

(修回日期: 2020 – 05 – 13)