

proton magnetic resonance spectroscopy in patients with amnesic or vascular mild cognitive impairment [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2015, 130 : 80-85.

[21] Saji N, Toba K, Sakurai T. Cerebral Small Vessel Disease and Arterial Stiffness : Tsunami Effect in the Brain [J]. Pulse (Basel), 2016, 3 (3) : 182-189.

[22] Taniguchi Y, Fujiwara Y, Nofuji Y, et al. Prospective Study of Arterial Stiffness and Subsequent Cognitive Decline Among Community-Dwelling Older Japanese [J]. J Epidemiol, 2015, 25 (9) : 592-599.

[23] Wang A, Jiang R, Su Z, et al. A low ankle-brachial index is associated with cognitive impairment : The APAC study [J]. Atherosclerosis, 2016, 255 : 90-95.

[24] Espeland MA, Newman AB, Sink K, et al. Associations Between Ankle-Brachial Index and Cognitive Function : Results From the Lifestyle Interventions and Independence for Elders Trial [J]. J Am Med Dir Assoc, 2015, 16 (8) : 682-689.

[25] Moon JH, Lim S, Han JW, et al. Carotid intima-media thickness is associated with the progression of cognitive impairment in older adults [J]. Stroke, 2015, 46 (4) : 1024-1030.

[26] Yue W, Wang A, Zhu R, et al. Association between Carotid Artery Stenosis and Cognitive Impairment in Stroke Patients : A Cross-Sectional Study [J]. PLoS One, 2016, 11 (1) : e0146890.

[27] Wang T, Mei B, Zhang J. Atherosclerotic carotid stenosis and cognitive function [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2016, 146 : 64-70.

[28] 鲁玲,彭琼,李竞艳,等. 经颅多普勒超声动态评价脑血流动力学与脑卒中后认知功能的关系 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 20 (34) : 5720-5722.

[29] Keage HA, Churches OF, Kohler M, et al. Cerebrovascular function in aging and dementia : a systematic review of transcranial Doppler studies [J]. Dement Geriatr Cogn Dis Extra, 2012, 2 (1) : 258-270.

[30] Lu D, Li P, Zhou Y, et al. Association between serum non-high-density lipoprotein cholesterol and cognitive impairment in patients with acute ischemic stroke [J]. BMC Neurol, 2016, 16 (1) : 154-163.

[31] Qian C, Tan F. Ratio of apoB/LDL : a potential clinical index for vascular cognitive impairment [J]. BMC Neurol, 2016, 16 (1) : 243-252.

[32] Chen Z, Liang X, Zhang C, et al. Correlation of thyroid dysfunction and cognitive impairments induced by subcortical ischemic vascular disease [J]. Brain Behav, 2016, 6 (4) : e00452.

[33] Wallin A, Kapaki E, Boban M, et al. Biochemical markers in vascular cognitive impairment associated with subcortical small vessel disease - A consensus report [J]. BMC Neurol, 2017, 17 (1) : 102-116.

Notch3 信号通路与常染色体显性遗传性 脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病相关性研究现状

丛璐 综述 张俊 审校

北京大学人民医院神经内科,北京市 100044

摘要: Notch3 信号传导通路与神经系统发育和血管结构完整性密切相关,由 Notch3 基因编码的受体蛋白胞外区的表皮生长因子样重复序列 (EGFR) 突变是常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病 (CADASIL) 的决定性发病机制。目前关于 CADASIL 疾病治疗尚无有效的方法,鉴于 Notch3 信号通路在 CADASIL 发病机制中的作用,针对 Notch3 的基因疗法成为研究 CADASIL 治疗的热点。本文针对 Notch3 信号通路与 CADASIL 发病的关系以及潜在的治疗方式进行综合论述,以期对 CADASIL 的临床诊治提供一定的参考。

关键词: Notch3; 信号转导; 受体蛋白; 常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病; 基因治疗

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.04.020

收稿日期:2017-05-03;修回日期:2017-07-20

作者简介:丛璐(1985-),女,住院医师,博士研究生,主要从事神经肌肉病的研究。

通信作者:张俊(1970-),男,主任医师,博士生导师,主要从事神经电生理及神经肌肉病等神经系统疾病的诊治。Email:jun_zhang@bjmu.edu.cn.

常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病 (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy, CADASIL) 是临床中最常见和被广泛认知的表现为反复发作的缺血性脑卒中和进行性智能下降的遗传性脑小血管病, 其发病由 Notch3 单基因突变所致, Notch3 基因具有进化上高度保守的序列, 其编码的 Notch3 受体蛋白与配体相互作用, 构成了 Notch3 信号传导通路, 对神经细胞增殖、分化、成熟以及维持完整血管结构和功能具有极其重要的作用^[1]。因 Notch3 基因发生突变是 CADASIL 的决定性发病机制, 故通过 Notch3 信号通路来寻找 CADASIL 疾病的有效治疗手段倍受关注。本文总结了目前国内关于 Notch3 信号通路及 CADASIL 疾病发生、发展及治疗等方面的相关性研究, 以期对 CADASIL 的临床诊治提供一定的参考。

1 Notch3 信号通路结构及其作用机制

Notch3 基因定位在 19 号染色体短臂, 包含 33 个外显子, 其编码的 Notch3 受体蛋白含 2321 个氨基酸, 是兼有受体和信号转导功能的单链跨膜蛋白^[2]。Notch3 受体蛋白结构由胞外区、跨膜区和胞内区三部分组成。Notch3 受体蛋白胞外区主要负责受体与配体结合, 胞外区包含 34 个表皮生长因子样重复序列 (epidermal growth factor-like repeats, EGFR) 和 3 个富含半胱氨酸的 Notch/LIN-12 重复序列 (Lin-12-Notch repeats, LNR)^[3], 其中 EGFR 序列是 Notch3 受体与配体结合的关键部位, 每个 EGFR 序列均含有 6 个高度保守的半胱氨酸残基, 6 个氨基酸残基可两两结合形成 3 个二硫键, 维持蛋白的稳定性, 而 LNR 序列可以阻止 Notch3 受体与配体结合之前的异常激活^[4], 两类重复序列共同保证配体在 Notch3 受体蛋白胞外区的正常结合。Notch3 受体蛋白的胞外区通过以非共价键结合的跨膜区与胞内区相连, 胞内结构域在基因的转录和翻译有重要作用^[5]。

Notch3 通路中信号的传导主要通过相邻细胞之间受体与配体的识别和结合实现^[6]。细胞中 Notch3 受体蛋白与邻近细胞表面相应的 Notch3 配体结合后, Notch3 受体被激活, 活化的 Notch3 受体蛋白构像改变, 同时连接胞外区与胞内区的跨膜区在蛋白酶的催化作用下发生蛋白裂解, 导致胞内区与胞外区分离, 并产生具有转录活性的胞内段 (Notch intracellular domain, NICD), NICD 被释放后

可直接转移至细胞核内, 与核内其他共转录抑制因子 RBP2 JK (也称为 CSL/CBF1) 结合, 使共抑制复合物解离, 此外核内 NICD 会募集共活化物如 SKIP 和 MAML1 等组成共激活复合物 (也称转录活化因子), 与胞内的 RAM 区域和锚蛋白区域结合, 激活下游靶基因, 从而调控一系列生物过程^[4,7,8]。

Notch3 信号通路是一条高度保守的信号传导通路, 该信号通路可介导细胞间相互作用, 其中 Notch3 信号通路与神经系统发育和血管结构完整性密切相关^[1]。完整的 Notch3 信号通路包括五大要素, 即 Notch3 受体、Notch3 受体的配体、细胞内效应转录因子 (CSL)、调节分子和 Notch3 信号靶分子^[4]。

研究表明由 Notch3 基因编码的 Notch3 受体蛋白主要分布在血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 和周细胞中, 该受体蛋白与配体之间的相互作用对于神经细胞增殖、分化、成熟以及维持完整血管结构和功能具有极其重要的作用^[1,9], 且 Notch3 基因突变对于血管正常的生理功能有重要影响。

Takahashi 等^[10]在研究野生型和突变型 Notch3 基因编码的受体蛋白对于细胞系代谢过程的影响时, 发现与野生型 Notch3 蛋白相比, 突变型 Notch3 蛋白的代谢降解速率明显降低, 而且含突变型 Notch3 蛋白的细胞对蛋白酶抑制剂较敏感, 可导致细胞凋亡。这些发现表明突变型 Notch3 蛋白降低了细胞的成熟速度, 并增加了细胞对于其它压力的敏感性从而促进了细胞凋亡。Domenga 等^[11]研究表明 Notch3 信号通路是通过调节 VSMC 的分化和成熟来形成小鼠功能性动脉的。作为正常收缩型 VSMCs 中含有的与血管收缩和结构稳定有关的蛋白, α -平滑肌肌动蛋白、肌球蛋白和结蛋白在 Notch3 基因缺陷小鼠的微小动脉 VSMCs 中表达量降低, 而未发育成熟的平滑肌细胞中所含有的波形蛋白的表达量相对增加, 这表明 Notch3 基因突变导致小鼠微小动脉平滑肌细胞无法成熟, 进一步表明微小动脉的形成需要 Notch3 基因调节 VSMC 的分化和成熟^[12]。对 CADASIL 患者外周血淋巴细胞和成纤维细胞进行培养发现, 即使在未加入凋亡刺激因子的情况下, 培养的 CADASIL 患者外周血淋巴细胞和成纤维细胞凋亡数目也会明显高于对照组正常细胞凋亡数目, 由此推测 Notch3 是一个重要的凋亡触发因子^[13]。

Notch3 信号通路对于胚胎发育过程中的周细胞募集也至关重要。周细胞可以调控内皮细胞增殖分化,进而调控血管生成,而血管成熟在心肌梗死后创面修复中起重要作用。Tao 等^[14] 在一项针对 Notch3 缺陷是否会损害血管成熟,并阻止心肌梗死后心脏功能恢复的研究中发现,与含野生型 Notch3 基因的小鼠相比,Notch3 基因缺陷小鼠中周细胞和小动脉数量显著减少,且周细胞功能损害,毛细血管覆盖区域缩小,导致冠脉血流储备受损,该研究表明 Notch3 基因突变可通过引发周细胞募集受损和冠状动脉微血管功能障碍的机制损害心肌梗死后心脏功能恢复。

2 Notch3 基因突变与 CADASIL 的发病

常染色体显性遗传性脑动脉病伴皮质下梗死和白质脑病(CADASIL)是由 Notch3 基因突变导致皮质下动脉血管功能障碍^[15] 而引起的遗传性脑小血管病。早期研究发现 Notch3 基因突变主要集中在 3 号和 4 号外显子,后来国内外研究发现 Notch3 基因突变也可发生在 2、5、6、8、11、18 和 20 号外显子上,因此,基因筛选的突变位点应广泛分布在 2~24 号外显子^[16]。据目前的研究报道可知,与 CADASIL 疾病相关的 Notch3 基因突变类型已超过 200 种,且这些突变多数为错义点突变,此外,与 CADASIL 疾病相关 Notch3 基因突变还有一个共同点即所有突变均发生于 Notch3 受体蛋白胞外区结构域的 EGFR 重复序列内。EGFR 重复序列中发生突变后会造一个半胱氨酸改变为其它氨基酸或者其他氨基酸变为半胱氨酸,缺失或增加一个氨基酸将使原有半胱氨酸残基数目改变,导致 EGFR 重复序列内产生奇数半胱氨酸残基,使原有的 6 个半胱氨酸残基两两结合形成二硫键的模式被打破,导致蛋白构象发生改变。受体蛋白构象的变化会严重影响 Notch3 受体蛋白与配体之间的相互作用,并改变胞内信号转导^[5],同时也会导致血管平滑肌细胞中受体蛋白同型二聚体或异型二聚体堆积,并引发细胞破裂,造成血管平滑肌细胞成熟和分化异常^[17],Notch3 受体蛋白可作为血液动力学的压力感受器,并可以参与血管张力调节^[4],由 Notch3 基因突变导致的微小动脉 VSMCs 收缩功能缺乏可进一步影响其肌源性调节功能的发挥,从而引起 CADASIL 患者出现脑血流动力学异常和脑弥漫性低灌注,继而导致脑白质广泛受损和小腔隙性梗死^[12],引发 CADASIL 疾病。

CADASIL 病人的认知障碍首先表现在整合信息的速度和执行功能的改变上^[16],而在小鼠的 CADASIL 模型研究中发现空间记忆整合中必不可少的海马神经功能出现失调。前期研究也发现,表达野生型 Notch3 基因的小鼠和表达突变型 Notch3 基因的 CADASIL 小鼠,在血管病变之前即有新生海马神经元细胞增殖和存活的受损。Klein 等^[9] 研究表明 Notch3 信号通路可能调节新生成神经元的存活,存在缺陷的 Notch3 信号通过改变微环境导致成年海马神经的形成发生改变,推测其可能是 CADASIL 发病过程中的一种独立的血管病变机制,也可能是认知缺陷发展的因素。

CADASIL 的特征性病理变化是可在电镜下可见微小动脉平滑肌细胞表面颗粒状嗜银物质 (granular osmiophilic material, GOM) 沉积^[18]。GOM 的组成成份目前尚未完全明确,前期免疫组织化学研究和电镜研究发现 GOM 可能是 Notch3 受体外侧结构域的堆积^[19],而近期利用免疫电镜分析的研究发现 Notch3 受体外侧结构是 GOM 的主要组成部分^[20]。GOM 沉积最终能够导致微小动脉退行性变,并最终导致脑血流量下降,反复发作腔隙性脑梗死和血管性痴呆。

3 Notch3 信号通路与 CADASIL 的治疗

尽管目前 Notch3 基因突变的小鼠模型已经建立,但突变导致 CADASIL 血管功能障碍的病理机制仍未明确^[15]。在 C455R 基因突变的 CADASIL 小鼠模型中,以 Notch3 信号为靶点的治疗性 Notch3 激动性抗体阻止了周细胞和血管平滑肌细胞的丢失,并修饰了与 Notch3 活性相关的血浆蛋白,包括突变小鼠的内皮抑素/胶原蛋白 18 α 1 和 Notch3 细胞外结构域^[21]。

目前对于 CADASIL 疾病尚无有效的治疗方法,临床主要针对病人表现对症治疗以缓解症状。因 CADASIL 疾病决定性的发病机制与 Notch3 基因突变有关,基因治疗成为研究热点且充满前景,目前推测有可能的基因治疗方法有:①用抑制性 RNA 分子沉默 Notch3 基因中突变的等位基因;②利用反义核苷酸介导的、携带有 Notch3 外显子跳读的缺陷 DNA 序列^[22],治疗性地校正 Notch3 中半胱氨酸数目的不平衡,结果表明 Notch3 外显子跳读编码的受体蛋白保留了正常的蛋白加工特性,可以有效结合配体并被配体活化。目前这项研究尚局限于体外概念研究阶段,Julie 等^[23] 研究者通过设计

针对包含大多数致病性 CADASIL 突变的外显子 2-3、4-5 和 6 反义寡核苷酸,并利用这些反义寡核苷酸转染 CADASIL 患者来源的脑血管平滑肌细胞,成功的实现了外显子跳读而不会影响 NOTCH3 信号传导。

此外,Klein 等^[9]发现通过体育锻炼和环境富集可以激发神经形成,并将这种刺激作为潜在的治疗手段,研究其对 CADASIL 小鼠模型中海马神经形成失调的影响,结果发现跑轮运动或环境强化等刺激并未促进存在 Notch3 基因突变的 CADASIL 小鼠的海马神经形成。

4 总结

CADASIL 是最常见的单基因显性遗传性脑小血管病,偏头痛发作、反复发生的皮质下缺血事件及主要影响执行能力的进行性认知障碍是 CADASIL 的典型临床特点。近年来患病人数不断增加,其作为脑小血管病的研究模型受到了很多学者的关注,但目前临床对该疾病的认识还处于早期阶段,诊断和治疗方法也存在局限性。Notch3 信号传导通路参与了 CADASIL 的发生发展过程,对该信号通路的干预可能会影响 CADASIL 的转归。日后,进一步探索 Notch3 信号传导通路在 CADASIL 确切的发病机制中的作用以及在基因治疗层面寻找更为有效的治疗手段成为研究工作的重点。

参 考 文 献

[1] Lai EC. Notch signaling control of cell communication and cell fate [J]. *Development*, 2004, 131: 965-973.

[2] 王宁,杨子超. CADASIL 的临床研究进展 [J]. *医学综述*, 2012, 18(11): 1704-1706.

[3] 孙一恣,吴志英. CADASIL 患者的临床、影像和 Notch3 基因突变特点及我国研究现状 [J]. *中国卒中杂志*, 2012, 7(2): 136-140.

[4] 梁燕. Notch3 对低氧诱导的人肺动脉平滑肌细胞增殖的作用机制探讨 [D]. 首都医科大学, 2014, 49-51.

[5] 李莹. 颅内动脉粥样硬化及 Notch3 基因多态性与腔隙性脑梗死的相关性分析 [D]. 第三军医大学, 2013, 7-15.

[6] 张美杰,马喆,邢连喜. Notch3 基因突变引起遗传性脑动脉瘤 CADASIL 的研究进展 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(11): 1-3.

[7] 杨忠霞,刘小军,张立婷. Notch3 信号通路与肝癌研究进展 [J]. *肝脏*, 2012, 17(4): 278-279.

[8] 刘杨,杨恭,臧荣余. Notch3 信号通路卵巢癌发生发展关系的研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(12): 1001-1006.

[9] Klein C, Schreyer S, Kohrs FE, et al. Stimulation of adult hippocampal neurogenesis by physical exercise and enriched environment is disturbed in a CADASIL mouse model [J]. *Sci Reports*, 2017, 7: 45372.

[10] Takahashi K, Adachi K, Yoshizaki K, et al. Mutations in NOTCH3 cause the formation and retention of aggregates in the endoplasmic reticulum, leading to impaired cell proliferation [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: 79-89.

[11] Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, et al. Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(22): 2730-2735.

[12] 郑日亮,栾兴华,吕鹤,等. Notch3 基因突变导致动脉平滑肌细胞蛋白表达减少 [J]. *中华神经科杂志*, 2009, 42(2): 91-94.

[13] Formichi P, Rzdi E, Battisti C, et al. Apoptosis in CADASIL: an in vitro study of lymphocytes and fibroblasts from a cohort of Italian patients [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 219: 494-502.

[14] Tao YK, Zeng H, Zhang GQ, et al. Notch3 deficiency impairs coronary microvascular maturation and reduces cardiac recovery after myocardial ischemia [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 236: 413.

[15] 杨昕懋,李峰. CADASIL 小鼠模型的基因表型与其相关临床症状 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2017, 25(3): 196-199.

[16] Di Donato I, Bianchi S, De Stefano N, et al. Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) as a model of small vessel disease: update on clinical, diagnostic, and management aspects [J]. *BMC medicine*, 2017, 15(1): 41-50.

[17] 黄立. NOTCH3 蛋白及 GOM 对 CADASIL 发病机制作用的研究 [D]. 中南大学, 2010, 1.

[18] 袁云. CADASIL 的诊断与鉴别诊断 [J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2007, 33(11): 641-643.

[19] Joutel A, Andreux F, Gaulis S, et al. The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(5): 597-605.

[20] Tikka S, Mykkänen K, Ruchoux MM, et al. Congruence between NOTCH3 mutations and GOM in 131 CADASIL patients [J]. *Brain*, 2009, 132(4): 933-939.

[21] Machuca-Parra AI, Bigger-Allen AA, Sanchez AV, et al. Therapeutic antibody targeting of Notch3 signaling prevents mural cell loss in CADASIL [J]. *J Exp Med*, 2017.

[22] Tikka S, Baumann M, Siitonen M, et al. CADASIL and CARASIL [J]. *Brain Pathol*, 2014, 24(5): 525-544.

[23] Rutten JW, Dauwerse HG, Peters DJM, et al. Therapeutic NOTCH3 cysteine correction in CADASIL using exon skipping: in vitro proof of concept [J]. *Brain*, 2016, 139(4): 1123-1135.