

· 基础研究 ·

乳鼠海马神经干细胞向神经细胞分化过程中 *Notch1* mRNA 的表达*白瑞樱¹,董鑫²,王莉³,盛海燕³

(新乡医学院:1. 生理学与神经生物学教研室;2. 病理学教研室;3. 三全学院生理学教研室,河南新乡 453003)

摘要:目的 建立神经干细胞(NSC)向神经细胞分化的培养体系,探讨 *Notch1* mRNA 在 NSC 分化过程中的表达情况。方法 无菌分离新生(24 h)SD 大鼠海马 NSC,体外扩增、纯化,并诱导 NSC 向神经细胞分化。细胞诱导前、后,采用免疫荧光化学法鉴定巢蛋白(Nestin)和神经元特异性烯醇酶(NSE)的表达;用逆转录-PCR 检测 NSC 中 *Notch1* mRNA 的表达情况。结果 从乳鼠海马分离的 NSC 在体外能克隆增殖,并表达 Nestin。诱导分化后,细胞 NSE 阳性表达;*Notch1* mRNA 在 NSC 诱导分化前、后均有表达。与诱导前相比,NSC 诱导分化后各阶段 *Notch1* mRNA 表达水平均明显降低($P < 0.05$),而 NSC 分化各阶段 *Notch1* mRNA 表达的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 诱导 NSC 向神经细胞分化能抑制其 *Notch1* mRNA 的表达,低水平的 *Notch* 信号可能有利于神经细胞的分化。

关键词:细胞分化;干细胞;海马;巢蛋白;基因;*Notch*

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.013

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)01-0040-03

Notch1 mRNA expression during the differentiation of neural stem cells isolated from hippocampal of rats toward neurons*Bai Ruiying¹, Dong Xin², Wang Li³, Sheng Haiyan³

(1. Department of Physiology and Neurobiology; 2. Department of Pathology; 3. Department of Physiology of Sanquan Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To establish culture system to induce neural stem cells(NSC) differentiation toward neurons and explore the expression of *Notch1* mRNA in NSC during its differentiation. **Methods** NSC in hippocampal of newborn(24 h) SD rats were isolated sterilely, amplified and purified in vitro, and were induced to differentiate toward neurons. Before and after cellular induction, immunofluorescence was employed to identify the expression of Nestin and neuron-specific enolase(NSE), reverse transcription-PCR was utilized to detect the expression of *Notch1* mRNA in NSC. **Results** NSC isolated from hippocampal of newborn rats showed clonal proliferation *in vitro*, and positive Nestin expression. After induced differentiation, the differentiated cells demonstrated positive NSE expression, and *Notch1* mRNA expression was found in NSC both before and after induced differentiation. Compared to induction before, levels of *Notch1* mRNA expression in NSC during different stages of differentiation after induction were significantly reduced($P < 0.05$), and the difference of *Notch1* mRNA expression among these stages of differentiation was not statistically significant($P > 0.05$). **Conclusion** Induction of NSC differentiation toward neurons can inhibit its *Notch1* mRNA expression, and lower level of *Notch* signaling may be beneficial for differentiation of neurons.

Key words: cell differentiation; stem cells; hippocampus; nestin; genes; *Notch*

自 1992 年,Reynolds 等^[1]首先从小鼠纹状体成功分离出神经干细胞(neural stem cells, NSC)以来,有关神经再生的研究迅速成为神经科学领域的研究热点。目前,关于 NSC 定向分化的研究多集中于诱导分化条件、形态学变化及其表面标志物的表达方面,对其分化过程中相关基因的表达与调控仍缺乏深入研究。体内发育研究的实验表明,*Notch* 信号通路进化保守而重要,一些复杂而高级程序,如细胞的存活、增殖、分化和凋亡正是基于正确的 *Notch* 信号转导^[2]。由于 *Notch* 信号对细胞调控的广泛性,推测 *Notch* 信号对 NSC 在体外的增殖分化也具有调控作用。本研究建立体外培养 NSC 的增殖与分化体系,选择 *Notch1* mRNA 作为研究对象,检测它在 NSC 向神经细胞分化过程中的表达情况,以探讨 *Notch* 信号在其分化过程中的作用。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 健康新生 24 h 的 SD(Sprague Dawley)大鼠 50 只,体质量 5~6 g,雌雄不限,由新乡医学院动物中心提供

(证书编号:SYXK 2006-0012)。实验通过新乡医学院动物伦理委员会的许可,实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

1.2 主要试剂 Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)/F12 培养基、B27 培养基购自 Gibco 公司;碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)购自 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;兔抗鼠 Nestin 单克隆抗体、兔抗鼠神经元特异性烯醇酶(neuron-specific enolase, NSE)单克隆抗体、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的山羊抗兔 IgG 抗体均购自碧云天生物技术研究所;RNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒、RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis 试剂盒、PCR Marker 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。所用引物根据 GenBank 序列自行设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 主要仪器 医用净化工作台(C-1112B)购自苏州高新净化工程有限公司;低温高速离心机(PICO- 21)购自德国 Thermo 公司;倒置显微镜(IX-71)购自日本 Olympus 公司;PCR 仪(Trobot)购自德国 Biometra 公司;凝胶成像系统(QUANTUM ST4)购自法国 VILBER 公司;电泳仪(DDY-4 型)购自北京市六一仪器厂。

1.4 NSC 的分离、扩增和传代培养^[3-4] NSC 分离培养过程见图 1。将新生 24 h 的 SD 乳鼠,常规碘酒、乙醇消毒皮肤,置 -20 °C 麻醉 8 min,用眼科剪迅速取出脑组织置于平皿中, Hank's 液漂洗并分离出海马组织,用眼科剪反复剪碎组织,收集到 50 mL 离心管中, Pasteur 吸管反复吹打, 200 μ m 滤网过滤去除组织块,制成单细胞悬液,离心,弃上清液,用无血清培养基(DMEM/F12 + 2% B27 + 20 ng/mL EGF + 20 ng/mL bFGF)重悬细胞。细胞经苔盼蓝染色,计数活细胞,调整细胞密度至 1.0×10^5 /mL,将其接种于 T-75 培养瓶中。置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。每隔 3~4 d 半量换液 1 次。根据细胞生长情况进行传代。将含有神经球的培养液移入离心管, Pasteur 吸管反复吹打,制成单细胞悬液,离心 5 min(离心半径 8 cm, 1 500 r/min),弃上清液,加入上述无血清培养基,计数后,将密度为 1.0×10^4 /mL 的细胞接种于 T-75 培养瓶,重新置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱进行培养。每隔 3~4 d 半量换液 1 次,每隔 7~9 d 机械分离神经球并传代 1 次。倒置显微镜下观察细胞增殖状况。

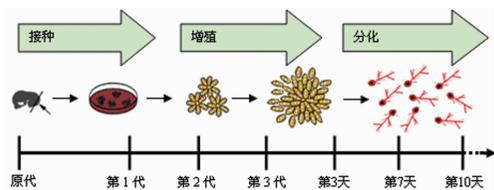


图 1 鼠 NSC 在体外增殖分化的示意图

1.5 NSC 的诱导分化^[5-6] 收集生长良好的第 3 代神经球,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤 3 次,离心 5 min(离心半径 8 cm, 1 500 r/min),弃上清液,加入神经诱导培养基(DMEM/F12 + 2% B27 + 10% 胎牛血清)重悬细胞,将其吹打成小神经球或单细胞悬液,将密度为 1.0×10^4 /mL 的细胞接种于 T-75 培养瓶,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱进行培养。每隔 3~4 d 半量换液 1 次,倒置显微镜下观察细胞分化状况。

1.6 免疫荧光细胞化学染色 将培养的神经球接种于 6 孔板中(孔中预先放置经多聚赖氨酸处理的玻片)。处于增殖未分化状态的神经球于孔板中用无血清培养基培养 4~6 h 后,进行 Nestin 免疫荧光细胞化学染色;将诱导分化的神经球于孔板中用神经诱导培养基培养 7~10 d 后,进行 NSE 免疫荧光细胞化学染色。取生长有细胞的盖玻片,用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 3% H₂O₂ 封闭 10 min, 5% 胎牛血清封闭 10 min, 分别加入抗 Nestin、NSE 单克隆抗体,并设阴性对照,用 PBS 液代替第一抗体, 4 °C 过夜, 37 °C 孵育 1 h。避光条件下,加入 FITC-标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 37 °C 孵育 40 min, 用荧光封片剂封片, 荧光显微镜下观察结果。

1.7 逆转录-PCR (reverse transcription-PCR, RT-PCR) 检测 取第 3 代神经球进行诱导,分别诱导分化至第 3、7、10 天,采用 RT-PCR 检测其 *Notch1* mRNA 的表达。提取细胞总 RNA,以 Oligo(dT)18 为引物,用莫洛尼鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, M-MLV)逆转录酶于 42 °C 逆转录

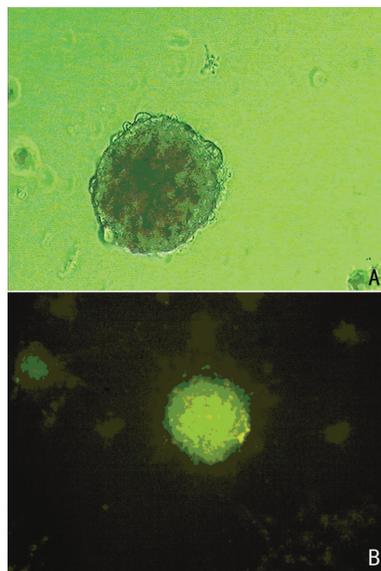
为 cDNA。以 cDNA 为模板, *β actin* mRNA 为对照。所用引物根据 GenBank 所查序列,通过 Primer 5.0 程序自行设计, *Notch1* mRNA 扩增片段(430 bp), F-Primer: 5'-GAA CCC GAT CAA GGA AAT CA-3', R-Primer: 5'-GGC TTT CTG CTG GTG TTT GT-3'; *β actin* 扩增片段(315 bp), F-Primer: 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3', R-Primer: 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'。循环条件: 94.0 °C 预变性 5 min, 94.0 °C 变性 30 s, 57.5 °C 退火 50 s, 72.0 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72.0 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,以 Bander leader 3.0 凝胶图像处理软件进行灰度分析,将目的基因与 *β actin* mRNA 的条带灰度值之比作为反映目的基因表达情况的相对指标。

1.8 统计学处理 应用 SPSS12.0 软件进行统计学分析,量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用最小显著差数法(the least significant difference, LSD)-*t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NSC 的增殖培养与鉴定 原代细胞培养 3 d 后,可见大量体积较小,悬浮生长的细胞团块。培养 10 d 左右,细胞继续增殖形成直径较大的克隆球(即神经球),其边界清晰,质地紧密。培养 18 d 左右,神经球直径继续增加,质地更加紧密,呈规则球状,神经球中心因细胞增殖密度增加而逐渐变暗。为防止神经球内部细胞因营养缺乏而死亡,进行传代。多次传代后神经球仍具有良好的干细胞生长特性,见图 2A。取原代或传代后的神经球进行 Nestin 免疫荧光染色鉴定,染色结果显示神经球呈 Nestin 阳性,见图 2B。

2.2 NSC 的诱导分化与鉴定 取第 3 代神经球进行诱导分化, 2~3 d 后神经球贴壁,有少量细胞开始从神经球边界迁移出来,见图 3A。5~6 d 后,从神经球中迁移出较多细胞,伸展成片,形态不一,突起较短,见图 3B。10~14 d 后,多数细胞已从神经球中迁出,部分神经球已全部分化为单层神经元样细胞。分化的细胞呈神经元样细胞形态,其胞体圆形、饱满,遮光性强,有 1~2 个较长突起,突起之间交互形成网状,见图 3C。免疫荧光染色显示,诱导分化的神经元样细胞多呈 NSE 阳性,见图 3D。



A: 第 3 代神经球($\times 200$); B: 神经球中 Nestin 的阳性表达($\times 100$)。

图 2 NSC 的增殖培养与鉴定

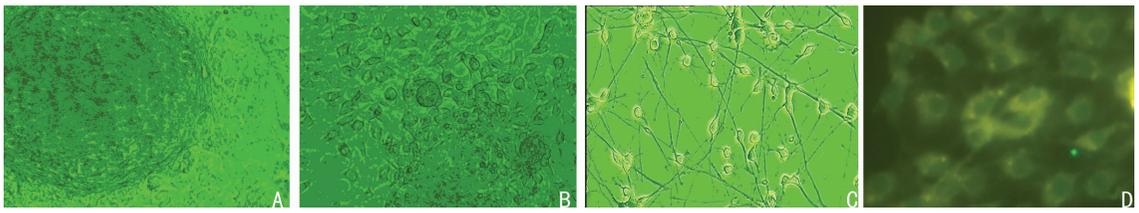


图 3 NSC 的诱导分化与鉴定
A:神经球贴壁生长 3 d($\times 200$);B:诱导分化培养 6 d 的 NSC($\times 200$);C:诱导分化培养 14 d 的 NSC($\times 200$);D:诱导分化的 NSC 中 NSE 的表达($\times 400$)。

图 3 NSC 的诱导分化与鉴定

2.3 NSC 中 *Notch1* mRNA 的表达情况 电泳条带灰度扫描分析结果显示, *Notch1* mRNA 在 NSC 诱导分化前、后均有表达。诱导前, NSC 中 *Notch1* mRNA 水平为 0.437 ± 0.086 ; 诱导分化第 3、7、10 天, *Notch1* mRNA 水平分别为: 0.350 ± 0.004 、 0.351 ± 0.005 及 0.349 ± 0.007 。与诱导前的 NSC 相比, 分化后的 NSC 中 *Notch1* mRNA 的表达量均明显减少 ($P < 0.05$), 而在诱导分化第 3、7、10 天, *Notch1* mRNA 表达水平的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 4。

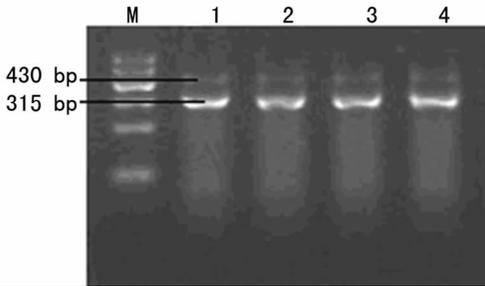


图 4 第 3 代 NSC 中 *Notch1* mRNA 的表达 (RT-PCR)
M:Marker;1:诱导前;2:诱导后第 3 天;3:诱导后第 7 天;4:诱导后第 10 天。

图 4 第 3 代 NSC 中 *Notch1* mRNA 的表达 (RT-PCR)

3 讨 论

NSC 由于具有广阔的应用前景而备受国内、外研究者关注^[7-9]。它可作为研究神经发育机制的体外模型, 应用其结构和功能的可塑性来修复损伤或病变的神经系统, 从而在细胞替代治疗和基因治疗方面具有巨大的应用价值, 能精确调控 NSC 的增殖和定向分化将是 NSC 在临床应用的有效保证。然而, 目前对 NSC 的研究多集中于其培养条件、形态学变化、表面标志物的表达及神经化学等方面, 对其分化机制的研究较少。在细胞增殖分化领域, *Notch* 信号途径近年来备受关注^[10]。*Notch* 信号通路是一条在胚胎发育过程中发挥调控作用的保守途径, 它作为主要的仲裁信号而调节细胞的生长过程, 影响器官的形成和形态发生^[2]。

本实验从乳鼠海马取材, 制得细胞悬液进行体外培养, 细胞增殖形成克隆球; 采用免疫荧光化学法检测增殖细胞 Nestin 的表达, 结果显示细胞 Nestin 呈阳性表达, 表明实验所分离培养的细胞为 NSC; 采用 RT-PCR 技术检测 NSC 内 *Notch1* mRNA 的表达情况, 可见细胞高表达 *Notch1* mRNA, 提示 NSC 的 *Notch* 信号系统处于激活状态, 而这种激活可能参与了 NSC 增殖过程的调控和干细胞状态的维持。这与 Hitoshi 等^[11]在基因敲除小鼠的体内实验中所获得的结果有相似之处, 他们指出没有 *Notch* 信号的作用, NSC 仍然可以存活, 但其自我增殖能力却明显下降。

实验中诱导 NSC 向神经细胞分化, NSC 分化后表现出典型的神经元形态, 且细胞表达神经元标记蛋白——NSE, 提示 NSC 能被诱导分化为神经细胞。*Notch1* mRNA 检测发现, 与增殖期的干细胞比较, 转入分化阶段的细胞中 *Notch1* mRNA 的表达显著减少 ($P < 0.05$), 说明 *Notch1* mRNA 表达与 NSC 向神经元的分化负相关, 提示在 NSC 结束增殖转入分化的过程中, *Notch* 信号系统处于抑制状态, 且在细胞分化的各阶段 (第 3、7、10 天), *Notch1* mRNA 表达均处于较低水平。Sestan 等^[12]通过对鼠大脑皮质神经元成熟过程的研究发现, 低水平的 *Notch* 信号可能与神经细胞的伸展有关, 并有利于神经细胞间连接数目的增加。因此, 本实验提示 NSC 向神经细胞分化时所出现的 *Notch* 信号分子表达抑制, 有利于 NSC 向神经细胞分化。

关于诱导 NSC 分化引起 *Notch* 信号分子表达改变的原因尚不清楚, 有人推测 *Notch* 信号分子表达的下调可能是神经细胞生成相关分子与 *Notch* 信号分子间相互作用的结果^[13]。人们普遍认为, NSC 的自身基因及外来信号的协调作用形成复杂的调控网络, 共同决定了 NSC 的增殖和分化过程。由此可见, *Notch* 信号通路是一个多因素, 多步骤的信号转导过程, 要全面了解 *Notch* 信号在 NSC 增殖和定向分化中的作用, 尚需更深入的分子水平方面的研究。尽管还有不少问题尚待解决, 但研究 *Notch* 信号通路对于以干细胞为中心的组织工程及细胞移植疗法都有重要意义。

参考文献:

- [1] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255(5052):1707-1710.
- [2] Jalali A, Bassuk AG, Kan L, et al. HeyL promotes neuronal differentiation of neural progenitor cells[J]. J Neurosci Res, 2011, 89(3):299-309.
- [3] Isono M, Otsu M, Konishi T, et al. Proliferation and differentiation of neural stem cells irradiated with X-rays in logarithmic growth phase[J]. Neurosci Res, 2012, 73(3):263-268.
- [4] Suyama S, Sunabori T, Kanki H, et al. Purinergic signaling promotes proliferation of adult mouse subventricular zone cells[J]. J Neurosci, 2012, 32(27):9238-9247.
- [5] Gobbel GT, Choi SJ, Beier S, et al. Long-term cultivation of multipotential neural stem cells from adult rat subependyma[J]. Brain Res, 2003, 980(2):221-232.
- [6] Hernández-Benítez R, Ramos-Mandujano G, Pasantes-Morales H. Taurine stimulates proliferation and(下转第 45 页)

期非小细胞肺癌,发现该疗法可明显延长肺癌患者的生存期。

CIK 的疗效取决于是否获得足够数量且具有高效杀伤活性的免疫效应细胞。CD3⁺CD56⁺ 细胞是 CIK 群体中主要的效应细胞^[12]。本实验中 3 种来源的单个核细胞均可增殖为 CIK,且都对食管癌细胞具有一定杀伤效应。其中,脐血来源的 CIK 增殖速度、杀伤活性及主要效应细胞 CD3⁺CD56⁺ 百分比均显著高于其他两种外周血来源的 CIK,这与王家祥等^[13]的研究结果一致。食管癌患者外周血来源的 CIK 增殖效率低,杀伤活性弱,CD3⁺CD56⁺ 百分比低。健康人外周血来源的 CIK 作用介于二者之间。临床上肿瘤患者常伴有恶病质、贫血等症状,存在免疫功能缺陷,不能引发有效抗肿瘤免疫反应,且反复多次输注自体外周血,容易提高感染概率,显著影响患者的疗效及预后^[14]。而脐血来源方便,免疫源性弱,对授、供者移植抗原相符的要求比较低,不易受病毒及残留肿瘤细胞的污染^[15]。因此,脐血来源的 CIK 是食管癌过继细胞免疫治疗的首选。

当然本研究结果仅基于体外实验,为准确评价 CIK 及其临床应用还需提供更多的实验依据。

参考文献:

- [1] 蒋光耀. 食管癌外科的治疗进展[J]. 重庆医学, 2004, 33(2):161-162.
- [2] 曹世龙. 肿瘤学新理论与新技术[M]. 上海: 上海科技教育出版社, 1997.
- [3] 张志凯, 祁岩超. 健康人和肿瘤患者 CIK 细胞的生物学特性[J]. 中国热带医学, 2009, 9(2): 253-255.
- [4] Thorne SH, Negrin RS, Contag CH. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy[J]. Science, 2006, 311(5768): 1780-1784.
- [5] Lu PH, Negrin RS. A novel population of expanded human CD3⁺CD56⁺ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency[J]. J Immunol, 1994, 153(4): 1687-1696.

- [6] 聂鑫, 刘侃峰, 滕少侠. CIK 治疗恶性肿瘤的研究进展及临床应用现状[J]. 中国实用医药, 2007, 2(7): 106-107.
- [7] Weng DS, Zhou J, Zhou QM, et al. Minimally invasive treatment combined with cytokine-induced killer cells therapy lower the short-term recurrence rates of hepatocellular carcinomas[J]. J Immunother, 2008, 31(1): 63-71.
- [8] 李香丹, 孙抒, 杨万山, 等. CIK 细胞对乳腺癌细胞株抗增殖及诱导凋亡的作用[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(12): 872-874.
- [9] 文钦, 张曦, 陈幸华, 等. 父供女 HLA 半相合造血干细胞移植后供者 DC-CIK 细胞输注治疗儿童难治复发性急性髓细胞白血病 1 例并文献复习[J]. 重庆医学, 2010, 39(14): 1852-1853.
- [10] Jiang J, Xu N, Wu C, et al. Treatment of advanced gastric cancer by chemotherapy combined with autologous cytokine-induced killer cells[J]. Anticancer Res, 2006, 26(3B): 2237-2242.
- [11] 徐永茂, 徐冬云, 张南征, 等. 化疗联合过继免疫细胞治疗晚期非小细胞肺癌的临床研究[J]. 实用癌症杂志, 2010, 25(2): 163-166.
- [12] 牟青杰, 王洁, 崔为发, 等. 三种来源 CIK 细胞体外增殖及杀伤活性比较[J]. 山东医药, 2010, 50(11): 7-9.
- [13] 王家祥, 郑树, 刘秋亮. 不同来源 CIK 细胞的体外扩增和杀伤活性的比较[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(7): 616-618.
- [14] 邓笑伟, 徐铭宝, 高锦, 等. 不同来源 CIK 与 DC 细胞联合治疗中晚期肺癌的临床研究[J]. 科技导报, 2008, 26(11): 35-38.
- [15] 席作明, 赵青, 周长辉, 等. 脐血浆在 CIK 细胞培养中的应用[J]. 山东医药, 2011, 51(35): 94-96.

(收稿日期: 2012-07-09 修回日期: 2012-10-13)

(上接第 42 页)

- promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells[J]. Stem Cell Res, 2012, 9(1): 24-34.
- [7] Temple S. The development of neural stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 112-117.
 - [8] Mitome M, Low HP, van den Pol A, et al. Towards the reconstruction of central nervous system white matter using neural precursor cells[J]. Brain, 2001, 124(Pt 11): 2147-2161.
 - [9] Chang KA, Kim JA, Kim S, et al. Therapeutic potentials of neural stem cells treated with fluoxetine in Alzheimer's disease[J]. Neurochem Int, 2012, 61(6): 885-891.
 - [10] Yoon K, Gaiano N. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants

[J]. Nat Neurosci, 2005, 8(6): 709-715.

- [11] Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, et al. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells[J]. Genes Dev, 2002, 16(7): 846-858.
- [12] Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P. Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling[J]. Science, 1999, 286(5440): 741-746.
- [13] Kabos P, Kabosova A, Neuman T. Blocking HES1 expression initiates GABAergic differentiation and induces the expression of p21 (CIP1/WAF1) in human neural stem cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(11): 8763-8766.

(收稿日期: 2012-07-19 修回日期: 2012-09-25)