

· 论 著 ·

# Ascl2 RNA 干扰对结肠癌 LS174T 细胞 EMT 相关 microRNA 表达的影响\*

朱 蓉<sup>1</sup>, 田 音<sup>2</sup>, 汪荣泉<sup>2△</sup>

(1. 遵义医学院附属医院消化内科, 贵州遵义 563000;

2. 第三军医大学西南医院全军消化病研究所, 重庆 400038)

**摘要:**目的 探讨转录因子 Ascl2 对结肠癌细胞上皮间质转化(EMT)相关的微小 RNA(microRNA)的影响。方法 对结肠癌 LS174T 细胞进行 Ascl2 的 RNA 干扰质粒转染, 对照质粒 shRNA-control/EGFP 和干扰质粒 shRNA-Ascl2/EGFP 转染 LS174T 细胞, 经 G418 筛选建立了稳定转染的细胞系, 并分别命名为 shRNA-Ctr/LS174T 和 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞, 实时荧光定量 PCR(real-time PCR)和蛋白印迹(Western-blot)实验确定干扰效果后, 采用 Transwell 小室侵袭实验观察 Ascl2 干扰对细胞侵袭能力的影响, 再进一步行 microRNA 芯片筛选与 EMT 相关的 microRNA 并行 real-time PCR 验证。结果 干扰后细胞中 Ascl2 的 mRNA 和蛋白质表达均明显减少( $P < 0.01$ )。Ascl2 干扰后 LS174T 细胞的侵袭能力明显下降( $P < 0.01$ )。microRNA 芯片筛选出与 EMT 相关的 microRNA-200 家族(包括 microRNA-200b、microRNA-200a、microRNA-429、microRNA-200c、microRNA-141)在 Ascl2 干扰后均出现 2 倍以上的上调( $P < 0.01$ )。结论 Ascl2 可能通过转录调节 microR-200 家族, 进而调控 EMT 从而影响结肠癌的浸润转移。

**关键词:** 转录因子 Ascl2; 微 RNAs; 上皮间质转化; 结肠肿瘤; LS174T 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.36.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)36-4361-03

## Ascl2 knockdown in colon cancer LS174T cells led to expression change of EMT-associated microRNA\*

Zhu Rong<sup>1</sup>, Tian Yin<sup>2</sup>, Wang Rongquan<sup>2△</sup>

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China;

2. Gastroenterology Research Center of Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of transcription factor achaete scute-like 2 (Ascl2) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) associated microRNAs. **Methods** Colon cancer LS174T cells were transfected with shRNA-Ascl2 vector and shRNA-control vector respectively, then the transfected cells were selected with G418 and stably transfected cell lines were established. Real-time PCR and Western-blot analysis were used to determine the interference effect. Transwell invasion experiment were used to observe the effects of Ascl2 RNA interference on cell invasion capability in vitro. MicroRNA chip analysis was used to detect the change of EMT-associated microRNA expression, and real-time PCR experiment was used to validate the microarray results. **Results** The mRNA and protein expressions were significantly reduced after Ascl2 interference ( $P < 0.01$ ). The numbers of invading cells were significantly decreased after Ascl2 interference ( $P < 0.01$ ). MicroRNA chip analysis found microRNA-200 family (including microRNA-200b, microRNA-200a, microRNA-429, microRNA-200c, microRNA-141) was more than 2-fold upregulation after Ascl2 interference ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Ascl2 regulates the invasion and metastasis of colon cancer cell, possibly through transcription regulation of microRNA-200 family, and then regulation of EMT.

**Key words:** achaete scute-like 2; microRNAs; epithelial-mesenchymal transition; colonic neoplasms; LS174T cell

Ascl2(achaete scute-like 2, Ascl2)是一个碱性/螺旋-环-螺旋转录因子, 研究已证实其控制正常成体肠隐窝干细胞“命运”<sup>[1]</sup>。并且, Ascl2 在人结肠癌标本中表达上调<sup>[2-3]</sup>; 在人结肠癌细胞系中干扰了 Ascl2 的表达, 导致了细胞周期的 G2/M 期阻滞<sup>[4]</sup>。本研究前期实验已发现, Ascl2 在维持结肠癌干/前体细胞“干性”方面发挥重要的作用<sup>[5]</sup>。微小 RNA(microRNA)与结肠癌存在着密切而复杂的关系, 有关转录因子 Ascl2 调控 microRNA 研究很少, 本研究前期实验发现下调 Ascl2 后可通过 microRNA-302b 相关的途径抑制结肠癌前体细胞生长<sup>[5]</sup>。本研究发现, 与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关的 microRNA-200 家族在 Ascl2 干扰后

的 LS174T 细胞中发生了一致性的上调, 而新近的研究发现, microRNA-200 家族与结肠癌 EMT 密切相关, 进而与结肠癌的浸润转移密切相关<sup>[6-8]</sup>。因此, 进一步研究 microRNA-200 家族在结肠癌 EMT 中的作用, 可能为结肠癌的治疗提供新的靶点和理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞** 人结肠癌细胞株 LS174T 由第三军医大学消化病研究所保种(引自 ATCC)。

**1.2 主要材料与仪器** Macoy's 5A 培养基购自 Sigma 公司; 胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; Lipofectamine™ 2000 和 Trizol 试剂均购自 Invitrogen 公司; 逆转录和实时荧光定量

PCR(real-time PCR)试剂购自大连宝生物工程有限公司;抗 Ascl2 单克隆抗体购自 Millipore 公司;miRNeasy mini 试剂盒购自 Qiagen 公司;miRCURY™ LNA Array 购自 Exiqon 公司;Transwell 小室购自 Corning 公司。CO<sub>2</sub> 恒温培养箱购自 Thermo 公司;激光共聚焦扫描显微镜购自 Carl Zeiss 公司;PCR 仪和凝胶成像系统均购自 BioRad 公司;GenePix 4000B microarray scanner 和 GenePix Pro 6.0 software 均购自 Axon 公司。对照质粒 shRNA-control/EGFP 和干扰质粒 shRNA-Ascl2/EGFP 由武汉晶赛生物工程有限公司合成,质粒载体为该公司的 pGenesil-1.1 质粒表达载体,Ascl2 干扰序列为 CCG CGT GAA GCT GGT GAA C<sup>[1]</sup>,由此设计合成的 DNA 模板引物为:5'-CAC CGC CGC GTG AAG CTG GTG AAC TTC AAG ACG GTT CAC CAG CTT CAC GCG GTT TTT TG-3',5'-AGC TCA AAA AAC CGC GTG AAG CTG GTG AAC CGT CTT GAA GTT CAC CAG CTT CAC GCG GC-3',合成后经测序验证与预期完全一致。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞培养、质粒转染以及稳定转染细胞系的建立

LS174T 细胞常规培养于含 10% FBS Macoy's 5A 完全培养液中,取处于对数生长期的细胞进行常规消化、离心,接种于 24 孔板,当细胞生长融合至 50%~60%,按 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书进行转染,48 h 后采用激光共聚焦显微镜观察绿色荧光表达情况,并进一步行 G418 筛选(G418 筛选浓度为 400 μg/mL),以后采用低浓度 G418 维持稳定转染(维持浓度为 200 μg/mL)。建立的稳定转染细胞系分别命名为 shRNA-Ctr/LS174T 和 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞。再进一步行 real-time PCR 和蛋白印迹(Western-blot)实验验证 Ascl2 干扰效果,Ascl2 基因上游引物:5'-CGT GAA GCT GGT GAA CTT GG-3',下游引物:5'-GGA TGT ACT CCA CGG CTG AG-3';β-actin 基因上游引物:5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3',下游引物:5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'。

**1.3.2 Transwell 小室侵袭实验** 取处于对数生长期的 LS174T、shRNA-Ctr/LS174T 和 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞,常规消化离心、磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,将细胞重悬于含 1% FBS 的 McCoy's 5A 培养液,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$ /mL,将 100 μL 细胞悬液加入 Transwell 小室的上室,下室加入 600 μL 含 20% FBS 的 McCoy's 5A 培养液,每组设置 3 个复孔。置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 48 h,取出后甲醇固定、0.1% 结晶紫染液染色,倒置显微镜下照相并随机选取 5 个视野计数侵袭细胞数,取平均值。

**1.3.3 microRNA 表达谱的芯片检测** 由上海康成生物技术有限公司采用丹麦 Exiqon 公司的第 6 代 miRCURY™ LNA Array 进行。microRNA 探针序列信息来自于 miRBase 16.0,包含了 1 891 种探针,涵盖了所有人、小鼠和大鼠以及与这些物种相关的所有病毒 microRNA。取 shRNA-Ctr/LS174T 和 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞,按照每份样品  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  细胞,加入 1 mL Trizol,裂解后按试剂说明书抽提总 RNA。然后再按照 miRNeasy mini 试剂盒说明书纯化富集 microRNA。使用 Nanodrop 1000 确定 RNA 的质量,是否满足 microRNA 芯片和实时荧光定量 PCR 的要求。采用 miRCURY™ Hy3™/Hy5™ Power labeling 试剂盒,用标记酶将

Hy3™ 或 Hy5™ 荧光基团标记 microRNA,得到用于与芯片杂交的荧光探针,并将标记好的探针和 miRCURY™ LNA Array 进行杂交。使用 GenePix 4000B microarray scanner 扫描芯片的荧光强度,并将实验结果转换成数字型数据保存,使用 GenePix Pro 6.0 软件对原始数据进行运算分析。

**1.3.4 实时荧光定量 PCR 验证差异表达的 microRNA** 由上海康成生物技术有限公司完成。Trizol 提取总 RNA,miRNeasy mini 试剂盒纯化富集 microRNA。RNA 质量检测合格后,采用 MMLV 反转录酶进行 cDNA 合成,反应条件为:16 °C,30 min;42 °C,40 min;85 °C,5 min。最后采用实时荧光定量 PCR 试剂检测差异表达的 microRNA,反应条件为:95 °C,5 min;95 °C,10 s;60 °C,20 s;72 °C,20 s;78 °C,20 s,40 个循环;最后从 72 °C 缓慢加热到 99 °C(每 5 秒升高 1 °C)。实验结果采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行分析处理。microRNA 引物如下:U6 上游引物 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3',下游引物 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3';miRNA-200b 上游引物 5'-GGG GTA ATA CTG CCT GGT-3',下游引物 5'-TGC GTG TCG TGG AGT C-3';microRNA-200a 上游引物 5'-GGG GTA ACA CTG TCT GGT AG-3',下游引物 5'-TGC GTG TCG TGG AGT C-3';microRNA-429 上游引物 5'-GGG GGT AAT ACT GTC TGG T-3',下游引物 5'-TGC GTG TCG TGG AGT C-3';microRNA-200c 上游引物 5'-GGT AAT ACT GCC GGG TAA T-3',下游引物 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3';microRNA-141 上游引物 5'-GGG GTA ACA CTG TCT GGT AA-3',下游引物 5'-TGC GTG TCG TGG AGT C-3'。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较进行单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

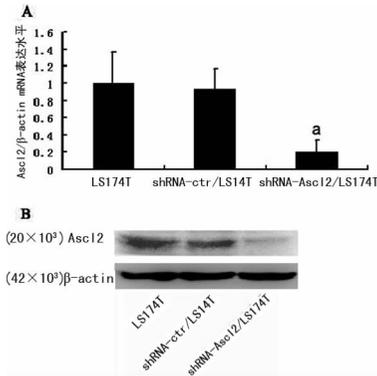
**2.1 质粒转染以及稳定转染细胞系的建立** 对照质粒 shRNA-control/EGFP 和干扰质粒 shRNA-Ascl2/EGFP 瞬时转染 LS174T 细胞 48 h,激光共聚焦显微镜观察绿色荧光蛋白表达情况,结果显示,转染效率低于 20%,进一步行 G418 筛选,3~4 周后形成稳定转染的克隆,再进一步扩增培养得到稳定转染的细胞系,即 shRNA-Ctr/LS174T 和 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞。

**2.2 Ascl2 干扰效果的检测** 对 LS174T、shRNA-Ctr/LS174T 和 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞进行 Ascl2 mRNA 和蛋白质表达水平的检测,实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果均显示,Ascl2 的 mRNA(图 1A)和蛋白质(图 1B)的表达均明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

**2.3 Ascl2 的 RNA 干扰抑制 LS174T 细胞的侵袭能力** 细胞侵袭 48 h,shRNA-Ascl2/LS174T 细胞侵袭细胞数( $84 \pm 14$ )明显少于 LS174T 细胞( $292 \pm 32$ )和 shRNA-Ctr/LS174T 细胞( $296 \pm 30$ ),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )见图 2A、B。

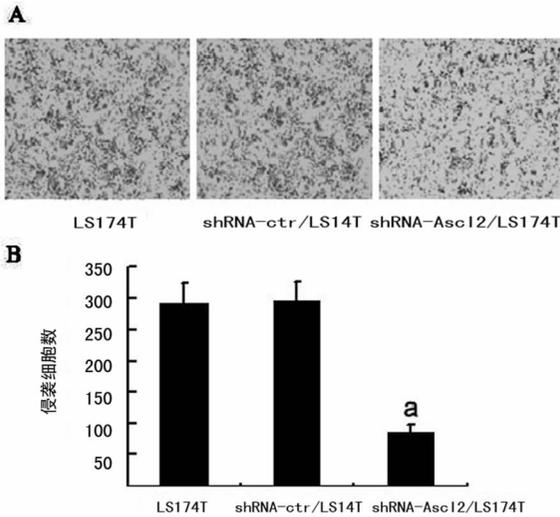
**2.4 Ascl2 的 RNA 干扰改变 LS174T 细胞的 microRNA 表达谱** microRNA 芯片检测 shRNA-Ctr/LS174T 和 shRNA-Ascl2/LS174T 细胞的 microRNA 表达谱,结果显示,350 种 microRNA 发生了显著变化,其中,178 种 microRNA 在 Ascl2 干扰后发生 2 倍以上的上调,172 种 microRNA 在 Ascl2 干扰后发生 2 倍以上的下调。与 EMT 相关的 microRNA-200 家族(包括 microRNA-200b、microRNA-200a、microRNA-429、mi-

croRNA-200c、microRNA-141)在 Ascl2 干扰后的 LS174T 细胞中表达均出现 2 倍以上的上调,分别上调 6.926、9.324、6.584、6.264、5.879 倍。



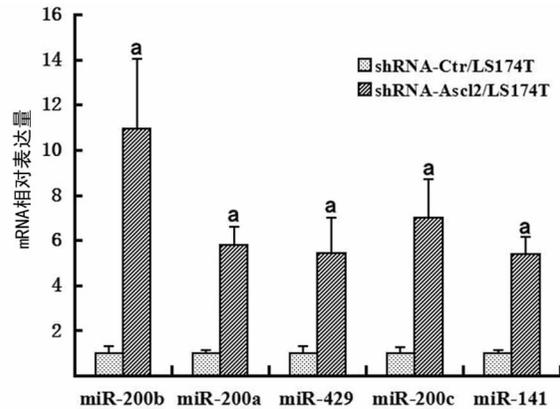
A: Ascl2 mRNA 表达分析图; B: Ascl2 Western blot 鉴定图; a:  $P < 0.01$ , 分别与 LS174T、shRNA-Ctr/LS174T 细胞比较。

图 1 Ascl2 干扰后 LS174T 细胞 Ascl2 mRNA 和蛋白质表达鉴定图



A: 细胞 Transwell 试验图 ( $\times 200$ ); B: Transwell 试验分析图; a:  $P < 0.01$ , 分别与 LS174T、shRNA-Ctr/LS174T 细胞比较。

图 2 Ascl2 干扰后 LS174T 细胞侵袭能力下降



a:  $P < 0.01$ , 与 shRNA-Ctr/LS174T 细胞比较。

图 3 real-time PCR 验证 Ascl2 干扰后上调的 microRNA

2.5 差异表达 microRNA 的实时荧光定量 PCR 验证 为了验证 microRNA 芯片结果,本研究进一步采用实时荧光定量 PCR 技术对与结肠癌细胞 EMT 相关的 microRNA-200 家族

进行验证,结果进一步证实 microRNA-200b、microRNA-200a、microRNA-429、microRNA-200c 以及 microRNA-141 在 Ascl2 干扰后的 LS174T 细胞中发生显著上调,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),见图 3。

### 3 讨论

结肠癌的治疗是一大难题,肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)理论的提出给结肠癌的治疗带来了新的希望。该理论认为,CSCs 是肿瘤的种子和源泉,是肿瘤发生、发展、转移和复发的“起始细胞”或“动力细胞”,在整个肿瘤过程起着关键作用。EMT 是指上皮细胞失去其特征而获得间质细胞的表现,在肿瘤的进展和转移中起着重要的作用。CSCs 特性的获得与 EMT 之间存在联系<sup>[9]</sup>,Mani 等<sup>[10]</sup>将乳腺上皮细胞诱导分化成 EMT 特性的细胞发现了具有干细胞特性的细胞球,提示细胞在获得 EMT 转化的同时,获得了“干性”特征。

Ascl2 不仅控制正常成体肠干细胞“干性”<sup>[11]</sup>,而且参与调节结肠癌前体细胞“干性”,具体机制与抑制 microRNA-302b 相关<sup>[5]</sup>。本研究发现与 EMT 相关的 microRNA-200 家族在 Ascl2 干扰后的 LS174T 细胞出现了一致性的上调,而 microRNA-200 家族与结肠癌 EMT 密切相关<sup>[6-8]</sup>。Hur 等<sup>[7]</sup>研究发现,microRNA-200c 具有调节结肠癌 EMT 和转移的作用,在结肠癌细胞系中过表达 microRNA-200c,导致了上皮标志物 E-cadherin 表达上调和间质标志物 Vimentin 表达下调。本研究还发现 Ascl2 的 RNA 干扰抑制了 LS174T 细胞的侵袭能力。因此,作者推测 Ascl2 可能通过转录调节 microRNA-200 家族,进而调控 EMT,从而调节结肠癌的浸润转移。

microRNA-200 家族包括 microRNA-200a, microRNA-200b, microRNA-200c, microRNA-141 和 microRNA-429 五个成员,它们是在侵袭性肿瘤中表达下调,成为肿瘤细胞侵袭和转移的抑制因子。它们表达是两个不同的多顺反子的 pri-microRNA 转录体:miR-200b-200a-429 和 miR-200c-141,分别定位于人类 1 号和 12 号染色体。关于这些 microRNA 的转录调节机制目前并不清楚,根据 Corcoran 等<sup>[11]</sup>用 RNA 多聚酶 II 连接位点的染色质免疫沉淀芯片分析,microRNA 的转录起始点上游 0~40 kb 存在启动子序列。microRNA-200b-200a-429 簇的启动子近端上游(-657~-653)存在 Smad3 和 p53 的调控序列,microRNA-200c-141 簇的启动子近端上游(-1739~-1185)存在 p53 的调控序列,p53 通过与它们的调控序列相互作用影响 miR-200b-200a-429 簇和 miR-200c-141 簇的转录表达,从而调控 EMT<sup>[12]</sup>。microRNA-200b-200a-429 簇和 microRNA-200c-141 簇上游序列具有丰富的 E-box 元件,结合 Ascl2 能够通过选择性结合 E-box 的结论<sup>[13]</sup>,作者推测 Ascl2 可能直接转录调节 microRNA-200 家族。深入研究 Ascl2-miR-200 家族-EMT-结肠癌浸润转移这一潜在可能的分子机制,将为进一步认识结肠癌的转移进展提供理论依据,同时,可能为结肠癌的治疗提供新的靶点!

### 参考文献:

[1] van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, et al. Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate[J]. Cell, 2009, 136(5):903-912.  
 [2] Jubb AM, Hoeflich KP, Haverly PM, et al. Ascl2 and 11p15.5 amplification in colorectal cancer[J]. (下转第 4367 页)

表 1 各组大鼠不同时相点 AAR 比率( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	术前( $n=24$ )	术后 4 周( $n=12$ )	术后 8 周( $n=12$ )
对照组	91.2 $\pm$ 5.3	90.0 $\pm$ 4.3	92.5 $\pm$ 5.0
模型组	91.1 $\pm$ 4.4	42.1 $\pm$ 4.5 <sup>a</sup>	43.6 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
治疗组	92.5 $\pm$ 5.3	68.6 $\pm$ 4.7 <sup>ab</sup>	70.6 $\pm$ 4.7 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与模型组比较。

**2.3 脑实质的移植细胞免疫组织化学检测** 移植后 4 周, 脑组织石蜡切片免疫组织化学检测, DAB 显色进入脑实质的骨髓间充质干细胞, 其细胞核呈棕黄或黄褐色(BrdU 阳性细胞)。移植细胞在 VD 大鼠脑实质中广泛分布, 富含血管区域多, 围绕在血管周围; 随着时间的延长, 迁移方向集中, 主要聚集至海马、大脑皮质等缺血易损伤区域, 并有局灶聚集现象, 在 VD 大鼠脑内存活至少 8 周以上, 见图 2。

### 3 讨论

VD 是以脑血管疾病引起的学习记忆障碍为主要表现的一种疾病。临床病理基础是多发性脑梗死和皮层下动脉硬化性脑病, 其常见病因是慢性脑灌注不足。本实验采用 Pulsinellis 4VO 改良法反复夹闭双侧颈总动脉造成脑组织反复缺血再灌注, 烧灼双侧椎动脉永久性闭塞造成长期慢性脑灌注不足, 使海马等记忆相关部位受损, 导致认知功能减退。该模型高度模拟了 VD 发病特点, 且缺血后生理指标稳定, 病理改变充分、明确, 无明显肢体运动障碍, 是较理想 VD 动物模型, 可利用其研究 VD 的发病机制、干预治疗、药物筛选及评价。

因脑缺血选择性易损伤, 大脑皮层、丘脑、海马、纹状体都是对缺血损伤敏感的区域, 其中海马区最为敏感。而海马与学习记忆密切相关, 损伤海马直接影响信息贮存和回忆。本研究从大鼠股骨中以密度梯度离心法与贴壁法分离扩增、诱导分化并 BrdU 标记 BMSCs, 通过颈内动脉输注 VD 大鼠体内, 观察到移植细胞在脑内广泛分布, 血管丰富区域多, 围绕血管周围, 并有局灶聚集现象; 随着时间的延长, 迁移方向集中, 主要聚集至海马、大脑皮质等缺血易损伤区域, 至少存活 8 周以上。表明 BMSCs 可透过 BBB 在脑内存活, 并沿着一定的路线迁移聚集至脑缺血易损伤部位。移植细胞集中聚居区域与组织病理学上脑缺血损伤最严重部位相一致, 如海马、大脑皮质, 其定向迁移的发生考虑是由于脑内黏附分子(如 ICAM-1、VCAM、E-selectin 等)的显著上调和一些化学物质及趋化因子(IL-8、单核细胞趋化蛋白-1、巨噬细胞炎症蛋白 1 $\alpha$ )的释放所致<sup>[10-11]</sup>。再者, 海马本是成体干细胞的相对富集区, 损伤后神经递质、神经营养因子、细胞因子浓度发生变化, 有着适合移植入的干细胞生长、分化为神经细胞的微环境, 能使移植的 MSCs 定居、分化并修复损伤的神经组织, 恢复相关神经功能。

本实验观察到 BMSCs 输注后 4、8 周时治疗组大鼠脑内神经细胞变性、坏死数量较模型组减少, 程度明显减轻, AAR 比率也显著提高( $P < 0.01$ )。表明外源性骨髓干细胞可明显缓解脑缺血后神经细胞损伤, 对神经元和神经胶质细胞起到有效的保护作用, 并显著改善 VD 大鼠学习记忆能力。至于 BMSCs 在脑内微环境下影响损伤神经元功能重组或重建的机制, 则可能与显著改善胆碱能系统功能外, 移植细胞在脑内诱导分化后与周围环境中的神经细胞建立有生物功能的突触联系, 上调脑组织多种神经营养因子如脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、脑源性神经(NGF)生长因

子表达, 促进受损神经元的修复、再生, 保护有功能的新生神经元及成熟神经元以免发生迟发性凋亡, 参与脑血管重建, 诱导血管再生等有关<sup>[11-12]</sup>。国内外研究表明, BMSCs 中存在巢蛋白(Nestin)阳性细胞, 其比例约占细胞总数的 50% 以上<sup>[13-16]</sup>。这些具有神经干细胞特性的细胞可能在 BMSCs 治疗 VD 中起到了一定的作用<sup>[17]</sup>。BMSCs 经体外诱导后可产生神经功能最基本的神经解剖结构突触联系<sup>[18]</sup>。文献也报道, 诱导后 BMSCs 具备去甲肾上腺素分泌功能, 调控跨越其表面膜的离子流而产生电信号。 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)能促进神经前体细胞的成熟和迁移, 而 BMSCs 可表达神经细胞 GABA 受体<sup>[19]</sup>。陈剑荣等<sup>[20]</sup>用 BDNF 和 RA 对 BMSCs 进行培养诱导, 12 d 时见大而圆的细胞, Nestin 抗原阳性; 20 d 可见长突起神经元样细胞, 神经元特异性核蛋白(NeuN)检测阳性; 14、20 d 的神经元样细胞及培养液均可检测到 5-羟色胺且随时间增加其浓度也相应增加。BMSCs 神经突触生理结构突触的形成和神经递质的分泌在治疗 VD 中的确切作用和机制, 有待进一步研究。

综上所述, 骨髓干细胞体外贴壁生长获得 BMSCs, 诱导分化后高表达 Nestin、NeuN 及胶质纤维酸性蛋白(GFAP)<sup>[3-8]</sup>。本实验表明, 颈内动脉移植的 BMSCs 可透过 BBB 在损伤脑组织中存活、迁移, 促进缺血损伤后脑组织的修复与再生, 显著改善神经功能缺失, 明显增强 VD 大鼠学习记忆能力。因此, 是理想的移植治疗卒中、VD 等神经系统疾病以及其他损伤性、遗传缺陷性或退行性疾病的种子细胞。

### 参考文献:

- [1] Tao H, Rao R, Ma DD, et al. Cytokine induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell free condition[J]. Dev Growth Differ, 2005, 47(6): 423-433.
- [2] Binle E, Chau DY, Alexander MR, et al. The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles [J]. Biomaterials, 2009, 30(16): 2985-2994.
- [3] Long X, Olszewski M, Huang W, et al. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2005, 14(1): 65-69.
- [4] Rivera FJ, Sierralta WD, Minguell JJ, et al. Adult hippocampus derived soluble factors induce a neuronal-like phenotype in mesenchymal stem cells [J]. Neurosci Lett, 2006, 406(1/2): 49-54.
- [5] Yang H, Xia Y, Lu SQ, et al. Basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation of mouse bone marrow stromal cells requires FGFR-1, MAPK/EPK, and transcription factor AP-1[J]. J Biol Chem, 2008, 283(9): 5287-5295.
- [6] Delcroix GJR, Curtis KM, Schiller PC, et al. EGF and BF-GF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells [J]. Differentiation, 2010, 80(4-5): 213-227.
- [7] Mihaela C, Simona OD, Cosmin IS, et al. In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem