

· 论 著 ·

ERK1/2 信号转导通路对骨髓基质细胞条件培养液诱导大鼠中脑神经干细胞分化作用的影响

顾平^{1,2*}, 王彦永^{1,2}, 马芹颖^{1,2}, 温雅^{1,2}, 崔冬生¹, 刘力¹, 王铭维^{1,2}, 张振清^{1,2}
(1. 河北省脑老化与认知神经科学实验室, 石家庄 050031; 2. 河北医科大学第一医院神经内科, 石家庄 050031)

[摘要] **目的:**探讨 ERK1/2 信号转导通路在骨髓基质细胞条件培养液(BMSCs-CM)诱导大鼠中脑神经干细胞(NSCs)分化中的作用。**方法:**将神经干细胞球种植于预先包被多聚赖氨酸的 35 mm 的培养皿中,神经干细胞球约 30 min 后贴壁,自然分化组将培养液换为含 2% B27 的 neurobasal 培养液,对照组换为 BMSCs-CM,抑制剂组将培养液换为含有信号转导通路抑制剂 PD98059(5 μ mol/L)的 BMSCs-CM,7 d 后采用免疫荧光染色方法观察 NSCs 后代细胞中神经元和星形胶质细胞的数量比例与形态差别。**结果:**用成年大鼠 BMSCs-CM 体外培养新生大鼠中脑 NSCs,自然分化组 NSCs 分化的神经元为(15.7 $\pm$ 10.3)%[低于对照组(51.17 $\pm$ 10.30)%, $P<0.05$],星形胶质细胞为(66.9 $\pm$ 14.8)%[高于对照组(23.26 $\pm$ 5.60)%, $P<0.05$]。而抑制剂组神经元所占比例为(39.48 $\pm$ 7.29)%[明显低于对照组, $P<0.01$],星形胶质细胞的比例为(31.01 $\pm$ 8.96)%[高于对照组, $P<0.01$]。**结论:**BMSCs-CM 可以提高神经干细胞分化为神经元的比例,并且同时降低了其分化为星形胶质细胞的比例,这两种作用很可能是通过 ERK1/2 信号转导通路实现的。

[关键词] ERK1/2 信号转导通路;骨髓基质细胞;条件培养液;神经干细胞

[中图分类号] R 329.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)06-0589-04

Influence of ERK1/2 signal-transduction pathway on differentiation of mesencephalic neural stem cells induced by bone marrow stromal cell-conditioned medium

GU Ping^{1,2*}, WANG Yan-yong^{1,2}, MA Qin-ying¹, WEN Ya¹, CUI Dong-sheng¹, LIU Li¹, WANG Ming-wei^{1,2}, ZHANG Zhen-qing^{1,2} (1. Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, China; 2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of the ERK1/2 signal-transduction pathway on differentiation of rat mesencephalic neural stem cells(NSCs) in presence of bone marrow stromal cell-conditioned medium(BMSCs-CM) *in vitro*. **Methods:** NSCs were cultured on poly-L-lysine (PLL) coated 35 mm dishes. The neurospheres adhered to the bottom 30 min later; then the culture medium of natural differentiation group was replaced by neurobasal medium containing 2% B27; the control group was replaced with BMSCs-CM; and the inhibition group was replaced with BMSCs-CM containing PD98059 (5 μ mol/L). The proportions of neurons and astrocytes and their morphological difference were observed by immunocytochemistry technique 7 d later. **Results:** We successfully cultured NSCs from adult rat BMSCs-CM. The proportion of neurons in the natural differentiation group (15.70 $\pm$ 10.3)% was lower than that in the control group ([51.17 $\pm$ 10.30]%, $P<0.05$); the proportion of astrocytes in the natural differentiation group (66.9 $\pm$ 14.8)% was higher than that in the control group ([23.26 $\pm$ 5.60]%, $P<0.05$). The proportion of neurons in the inhibition group (39.48 $\pm$ 7.29)% was lower than that in the control group ([51.17 $\pm$ 10.30]%, $P<0.05$); the proportion of astrocytes in the inhibition group (31.01 $\pm$ 8.96)% was higher than that in the control group ([23.26 $\pm$ 5.60]%, $P<0.01$). **Conclusion:** BMSCs-CM can up-regulate the proportion of neurons in cultured NSCs and down-regulate the proportion of astrocytes, which might be mediated by the ERK1/2 signal-transduction pathway.

[KEY WORDS] ERK1/2 signal-transduction pathway; bone marrow stromal cells; conditioned medium; neural stem cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(6): 589-592]

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)广泛存在于胚胎及成年个体中枢神经系统内,在体内外能分裂、增殖、成熟、分化形成神经元及胶质细胞,对脑损伤有较强的修复作用,为临床治疗神经系统疾病带来了新的希望。为此,NSCs 的体外培养及其定向分化研究显得尤其重要。骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是从骨髓中分离培养的

一种多潜能干细胞,研究表明它所提供的微环境可

[基金项目] 国家自然科学基金(30400138);河北省自然科学基金(C2004000583). Supported by National Natural Science Foundation of China(30400138) and Natural Science Foundation of Heibei Province (C2004000583).

[作者简介] 顾平,博士,副教授,硕士生导师.

* Corresponding author. E-mail: gpwh2000@yahoo. com. cn

调节 NSCs 的发育和分化^[1]。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)是细胞内的一类丝氨酸和(或)苏氨酸蛋白激酶,是细胞应激和损伤反应的主要信号通路。在真核细胞中,目前已确定有4条MAPK通路^[2],其中细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK)是最早被发现的,而且是最具特征性的,认为其与细胞的增殖、转化和分化有关。ERK信号转导通路的大致模式为:多种生长因子→Ras→Raf→MEK1/2→ERK→有丝分裂、分化^[3-4]。ERK被激活后,可以磷酸化一系列胞质蛋白,包括磷脂酶A₂、c-Raf-1和MEK;转移至胞核后可以磷酸化一系列转录因子,如ELK-1、SAP-1a和STAT等^[5]。由于ERK通路的这些特性,使其成为目前细胞分化研究的热点。

本实验室的前期研究已证实 BMSCs 能够诱导中脑 NSCs 分化为高比例神经元^[6-7],而且是BMSCs分泌的可溶性物质在这一过程中发挥了重要作用^[8]。骨髓基质细胞条件培养液(BMSCs-CM)内含有这些物质,但其究竟是通过什么途径发挥作用的,目前国内外关于这方面的研究甚少。本研究通过在 NSCs 的培养体系中加入 ERK1/2 信号转导通路抑制剂 PD98059,进而观察该通路是否在这一过程中发挥作用,同时还观察了该通路对中脑 NSCs 分化为星形胶质细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂和动物 B27 添加剂、DMEM/F12(1:1)、neurobasal 培养液和 DMEM 为 Gibco 公司产品。胎牛血清为杭州四季青公司产品。PD98059 为 Promega 公司产品。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、Hoechst33258、抗胶质原纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)、抗微管相关蛋白-2(microtubule associated protein-2, MAP-2)抗体和 FITC 标记的抗小鼠 IgG 抗体购于 Sigma 公司。成年和新生 SD 大鼠均购自河北医科大学实验动物中心。

1.2 BMSCs 的分离培养 以 4% 水合氯醛(0.8 ml/100 g)将体质量约为 120 g 的 SD 大鼠麻醉致死,75%乙醇浸泡大鼠 10 min;无菌条件下取出大鼠的股骨和胫骨,剪去骨的两端,用解剖液冲洗骨髓腔 2~3 次;将冲出的骨髓用刨光的玻璃吸管吹打数次后,把细胞悬液移入离心管,800 r/min($r=8$ cm)离心 5 min,弃去上清;用含 20% 胎牛血清的 DMEM 重悬,吹打成单细胞悬液,种于培养瓶内,置于 37℃

5%CO₂培养箱内培养;48 h 后,可见有一层细胞贴壁,细胞为扁平的多角形;轻轻摇晃培养瓶,将瓶内液体及其悬浮的其他细胞弃掉,更换新的培养基;7 d 左右细胞可均匀长满瓶底,此时细胞的形态为长梭形,形似柳叶。根据需要,可进行细胞传代。

1.3 BMSCs 条件培养液的制备 将 BMSCs 接种于 80 ml 培养瓶中,待细胞大约铺满瓶底面积的 85%后,弃培养液,更换为含 2% B27 的 neurobasal 培养液 6 ml,培养 24 h 后收集上清,2 500 r/min($r=8$ cm)离心 5 min,上清液即为 BMSCs 的条件培养液。

1.4 NSCs 的分离培养 取新生大鼠中脑,解剖液漂洗,解剖显微镜下剥离脑膜后,将脑组织在 300 目的不锈钢滤网上研磨,所得悬液移入离心管;用火焰抛光的玻璃吸管反复吹打,机械分离制成单细胞,800 r/min($r=8$ cm)离心 5 min;弃去上清,加入 2 ml 培养液,用吸管反复吹打,然后用 400 目的细胞筛过滤细胞悬液,将细胞种入 25 ml 培养瓶中,培养液采用 DMEM/F12(1:1)添加 2% B27 的无血清培养基,同时加入 20 ng/ml bFGF;将培养瓶置于 CO₂ 孵箱(37℃, 5% CO₂) 孵育。此后,每 3 d 换液 1 次,每次更新培养液的一半;每 5~7 d 传代 1 次。传代时采用机械分离的方法,培养液同前。一般在分离培养 7 d 左右单个的 NSCs 便可增殖形成球体。

1.5 实验分组和培养方法 将二代或三代神经球种植于直径为 35 mm、预先包被多聚赖氨酸的培养皿中,在神经球贴壁后更换培养液。实验共分为如下 3 组:(1)自然分化组:用含 2% B27 的 neurobasal 培养液培养神经干细胞球;(2)对照组:用 BMSCs 条件培养液培养神经干细胞球;(3)抑制剂组:用 BMSCs 条件培养液中加入信号转导通路抑制剂 PD98059 (5 μmol/L)的培养液培养神经干细胞球。此后每 3 d 更换 1 次培养液。光镜观察细胞生长情况并进行免疫细胞化学染色,在荧光显微镜下观察。

1.6 免疫细胞化学染色和细胞计数 为确定表达 MAP-2 抗原和 GFAP 抗原的细胞数量,常规进行免疫细胞化学染色。在倒置荧光显微镜(Nikon TE2000)下每孔随机选择 10 个不同的视野,使用 ACT-1 软件采样,应用 Imagepro-Plus 软件计数阳性细胞数。通过计数 Hoechst33258 染色阳性细胞决定每一视野内细胞总数,然后计算 MAP-2 和 GFAP 阳性细胞在分化细胞中所占的比例。

1.7 统计学处理 采用 SAS 6.12 统计软件,各组间采用 *t* 检验进行比较。

2 结果

2.1 ERK1/2 信号转导通路对 BMSCs-CM 诱导

NSCs 分化为后代细胞的动态观察 将神经干细胞球种植于培养皿中,神经干细胞球约 30 min 后贴壁;1 h 后可见有细胞从神经干细胞球中移行出来,这时 3 组细胞的数量以及形态并无明显差异,24 h 后光镜下可见体积小、轮廓清晰、边缘整齐、立体感强、周围有光晕并在两极有突起的细胞从神经干细胞球中移行出来,进行免疫荧光染色,表明这类细胞为 MAP-2 阳性的神经元(图 1A、1B);另一类细胞

突起较粗大且多,不规则,多聚集在神经球的中央,呈放射状排列,免疫荧光染色表明这类细胞为 GFAP 阳性的星形胶质细胞(图 1C、1D),这两种细胞占神经干细胞球中分化出的细胞的大多数。约 3~4 d 后,可见对照组中神经元迁移距离较远,立体感较强;而抑制剂组神经元多聚集在神经干细胞球周围,立体感差。自然分化组神经元数量较少,多聚集在神经干细胞球周围,立体感不强。

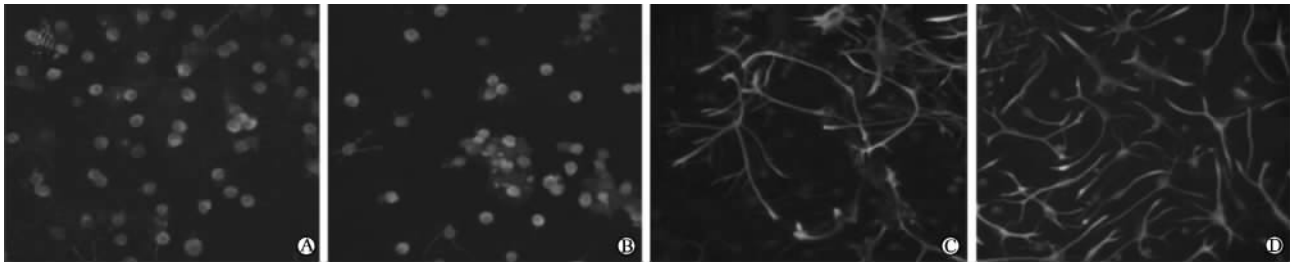


图 1 ERK 1/2 信号转导通路抑制 BMSCs-CM 诱导 NSCs 分化为神经元

Fig 1 ERK1/2 signal-transduction pathway inhibited BMSCs-CM induced NSCs differentiation into neurons(×300)
A:MAP-2 positive neurons in control group; B:MAP-2 positive neurons in inhibitor group; C:GFAP positive astrocytes in control group; D: GFAP positive astrocytes in inhibitor group

2. 2 ERK 1/2 信号转导通路对 BMSCs-CM 诱导 NSCs 分化为后代细胞的影响 干预 7 d 后,抑制剂组 NSCs 分化的神经元(39.48 ± 7.29)%明显低于对照组[(51.17 ± 10.30)%, $P < 0.01$],而星形胶质细胞(31.01 ± 8.96)%明显高于对照组[(23.26 ± 5.60)%, $P < 0.01$].自然分化组 NSCs 分化的神经元为(15.7 ± 10.3)%,星形胶质细胞为(66.9 ± 14.8)%,与对照组相比均有统计学差异($P < 0.05$)。

3 讨 论

有研究表明体外培养的 BMSCs 可分泌多种细胞因子,如 IL-6、IL-7、IL-8、IL-11、IL-12、IL-14、IL-15、白血病抑制因子(LIF)和神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF) 等神经营养因子^[9-11],其中,有学者研究表明 NGF 可以通过激活 ERK1/2 信号转导通路调节细胞内某些因子的表达^[12],而 BDNF 也可通过该通路发挥作用^[13],但 BMSCs 分泌至细胞外的这些细胞因子是通过哪一种信号转导通路来调控 NSCs 的分化,目前相关报道甚少。本实验在 BMSCs-CM 中加入 ERK 信号转导通路抑制剂 PD98059 培养 NSCs,发现与对照组相比,明显减少 NSCs 分化为神经元的比例($P < 0.01$),星形胶质细胞所占比例明显提高($P < 0.01$)。由此我们推断,BMSCs-CM 在促进 NSCs 分化为神经元的同时抑制了其分化为星形胶质细胞,是在转录水平上影响了 NSCs 的分化,而 ERK

信号转导通路在这一过程中发挥了十分重要的作用。在这一过程中是否还有其他途径在发挥作用,还需要进一步的实验验证。

[参 考 文 献]

[1] Lou S J, Gu P, Chen F, et al. The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats[J]. Brain Res, 2003, 968:114-121.
[2] Wang L, Kwak J H, Kim S I, et al. Transforming growth factor- β 1 stimulates vascular endothelial growth factor 164 via mitogen-activated protein kinase kinase-p38 α and p38 δ mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in murine mesangial cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279:33213-33219.
[3] Kolch W. Meaningful relationships; the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions [J]. Biochem J, 2000, 351:289-305.
[4] Dudley D T, Pang L, Decker S J, et al. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:7686-7689.
[5] Adachi T, Kar S, Wang M, et al. Transient and sustained ERK phosphorylation and nuclear translocation in growth control[J]. J Cell Physiol, 2002, 192:151-159.
[6] 姜淑杰,顾 平,李 怡,等. 骨髓基质细胞对神经干细胞分化为神经元的影响[J]. 中国神经科学杂志, 2002, 18:490-494.
[7] 姜淑杰,顾 平,李 怡,等. 骨髓基质细胞对中脑神经干细胞分化为神经元的诱导作用 [J]. 解剖学杂志, 2002, 25:509-512.
[8] 顾 平,姜淑杰,王铭维,等. 骨髓基质细胞条件培养液对中脑神经干细胞分化的影响[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24:295-297.
[9] Deans R J, Moseley A B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses[J]. Exp Hematol, 2000, 28: 875-884.
[10] Dormady S P, Bashayan O, Dougherty R. Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment

[J]. J Hematocher Stem Cell Res, 2001,10: 125-140.

[11] Yaghoobi M M, Mowla S J. Differential gene expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of rat bone marrow stromal cells[J]. Neurosci Lett,2006,397:149-154.

[12] Park S Y, Lee J Y, Choi J Y, et al. Nerve growth factor activates brain-derived neurotrophic factor promoter via extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 in PC12 cells[J]. Mol Cells, 2006, 21:237-243.

[13] Traver S, Marien M, Martin E, et al. The phenotypic differentiation of locus ceruleus noradrenergic neurons mediated by brain-derived neurotrophic factor is enhanced by corticotropin releasing factor through the activation of a cAMP-dependent signaling pathway[J]. Mol Pharmacol, 2006, 70: 30-40.

[收稿日期] 2006-12-13 [修回日期] 2007-04-19

[本文编辑] 尹 茶