

• 论 著 •

维 A 酸对人胎肝细胞神经组织特异基因表达的影响及其信号途径

刘革修, 张 涇*, 何冬梅

(暨南大学医学院血液病研究所, 广州 510632)

[摘要] **目的:**了解维 A 酸对人胎肝细胞神经组织特异基因表达的影响及其信号途径。**方法:**采用免疫磁珠法分离人胎肝 CD34⁺ 细胞, 培养 4 d 后, 蛋白激酶 C 特异抑制剂 chelerythrine chloride (3 μmol/L) 处理 24 h, 再加入维 A 酸处理 24 h (5 × 10⁻⁷ mol/L), 无血清培养基培养 5 d, Western 印迹和半定量 RT-PCR 法分析维 A 酸处理前后神经特异基因表达。**结果:**维 A 酸诱导处理使胎肝细胞表达神经组织细胞特异蛋白如 Nestin、NeuN 和 NF-M 显著增加, 分别增加 4.09 倍、5.12 倍和 7.27 倍 (P < 0.01)。而 chelerythrine chloride 能明显抑制维 A 酸诱导的神经组织细胞特异蛋白 Nestin、NeuN 和 NF-M 的表达。MAP-2 蛋白在维 A 酸处理前后均无明显表达。**结论:**维 A 酸通过蛋白激酶 C 途径促进人胎肝 CD34⁺ 细胞表达神经组织细胞特异基因。

[关键词] 维 A 酸; 胚胎; 肝细胞; 神经组织特异基因; 蛋白激酶 C

[中图分类号] Q 254 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0831-04

Influence of tretinoin on neural specific gene expression in fetal liver cells and its signaling pathways

LIU Ge-Xiu, ZHANG Huan*, HE Dong-Mei (Institute of Hematology, Medical College, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the mechanism of tretinoin-induced neural differentiation in fetal liver CD34⁺ cells *in vitro*. **Methods:** CD34⁺ cells from fetal liver were isolated with a magnetic cell sorting kit and were cultured. Cells pretreated with or without protein kinase C (PKC) inhibitor chelerythrine chloride (3 μmol/L) were induced by 5 × 10⁻⁷ mol/L tretinoin for 24 h, and then incubated in serum-free medium. Expressions of genes in treated cells were assayed by Western blotting and RT-PCR. **Results:** Tretinoin significantly promoted expression of neural specific genes such as Nestin, neuron-specific nuclear protein (NeuN), neuron-specific neurofilament-M (NF-M), and MAP-2 in fetal liver CD34⁺ cells, with Nestin increased by 4.09 folds, NeuN by 5.12 folds, and NF-M by 7.27 folds (all P < 0.01 vs untreated cells). However, tretinoin-induced gene expression was obviously inhibited by chelerythrine chloride. No MAP-2 were detected in tretinoin-treated cells and untreated cells. **Conclusion:** Tretinoin-induced neural differentiation in fetal liver CD34⁺ cells is through PKC.

[KEY WORDS] tretinoin; embryo; liver cells; neural specific genes; protein kinase C

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 831-834]

最近研究显示, 骨髓或者脐带血细胞不仅能分化神经组织细胞, 而且采用骨髓或者脐带血细胞移植治疗某些神经系统疾病模型能够改善神经症状^[1~4]。为了进一步了解其分化调节因素, 科学家们建立了骨髓或者脐带血细胞分化成神经组织细胞模型^[5~8]。研究显示维 A 酸在体外可以诱导造血组织细胞向神经组织细胞分化。而目前尚没有有关维 A 酸诱导造血组织来源细胞向神经组织细胞分化的作用机制报道。本研究发现维 A 酸通过蛋白激酶 C 途径促进人胎肝 CD34⁺ 细胞表达神经组织细胞特异基因。

1 材料和方法

1.1 胚胎肝细胞单细胞悬液的制备 自然流产胎儿来源于暨南大学第一附属医院, 18~25 周龄, 流产 0.5 h 内。无菌操作取出胎肝, 4℃ PBS 洗涤 3

次, 然后置于 4℃ 含 2% FCS 的 Hank's 平衡盐溶液中, 以眼科剪剪成 1 mm³ 小块, 然后用滴管反复吹打, 使细胞分散, 过 4 号针头制成单细胞悬液。

1.2 胎肝 CD34⁺ 细胞的免疫磁珠分离 按免疫磁珠分离试剂盒说明进行。胎肝细胞用含 1% 牛血清白蛋白组分 5 的 PBS 洗涤; 0.4 ml MACS 缓冲液悬浮细胞 (密度 ≤ 1.0 × 10⁸ / 800 μl); 100 μl 偶联磁珠的小鼠抗人 CD34 抗体 4℃ 孵育 30 min; 用分离柱在高强度磁场中分离细胞; PBS 洗涤 500 μl × 3 次; 在无磁场区用 1 ml MACS 缓冲液冲洗分离柱, 收获纯化的 CD34⁺ 细胞。细胞计数和锥虫蓝染色以观察

[基金项目] 广东省科技计划基金 (99M01204G); 广州市科技计划基金 (2001-2-037-01)。

[作者简介] 刘革修 (1968-), 男 (汉族), 博士, 讲师。

* Corresponding author. Email: tzyuan@jnu.edu.cn

细胞活性。经3次实验统计,CD34⁺细胞得率为81%,分离后纯度为57%。

1.3 胎肝 CD34⁺ 细胞培养及维 A 酸处理 将分离的细胞以含 2% 胎牛血清的 Hank's 液洗 2 次,接种在 10 cm 塑料平皿或者培养瓶中(密度 $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$),以 DMEM/F12+10% 胎牛血清培养液培养(含 100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素、0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 两性霉素 B)。接种后第 4 天首次换液,弃去未贴壁细胞。培养液中加入或者不加入蛋白激酶 C 抑制剂 chelerythrine chloride (3 $\mu\text{mol}/\text{L}$, Sigma), 第 2 天加入维 A 酸 (5×10^{-7} mol/L, Sigma) 继续培养 5 d。然后 PBS 洗 2 遍,用终浓度为 0.125% 胰酶和 0.01% EDTA 的消化液室温消化收集细胞进行 RNA 和蛋白检测吸出培养液。塑料平皿和培养瓶经 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 纤维粘连蛋白(Sigma)包被处理。

1.4 引物设计及合成 引物设计参见文献^[9],由上海生工生物工程技术有限公司合成。Nestin 基因(Accession No. X65964):上游引物为 5'-AGG ATG TGG AGG TAG TGA GA-3'(1791-1810)、下游引物为 5'-TGG AGA TCT CAG TGG CTC TT-3'(2040-2021),预期扩增大小 251 bp; NeuN 基因(Accession No. 007828):上游引物为 5'-TAA TCC CAC TGC CCA CTA CC-3'(2374-2393)、下游引物为 5'-TCT ACC CCA ACA CAC ATC ATC-3'(2767-2747),预期扩增大小 394 bp; NF-M 基因(Accession No. Y00067):上游引物为 5'-GAG CGC AAA GAC TAC CTG AAG A -3'(1510-1531)、下游引物为 5'-CGA CTC TAG CTC GAT GCT CTT G-3'(1719-1740),预期扩增大小 231 bp; MAP-2 基因(Accession No. XM002387):上游引物为 5'-TCA GAG GCA ATG ACC TTA CC-3'(1401-1420)、下游引物为 5'-GTG GTA GGC TCT TGG TCT TT-3'(1720-1701),预期扩增大小 321 bp; β -actin 上下游引物:5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA-3'、5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3',预期扩增大小 541 bp。

1.5 细胞总 RNA 的提取和纯化 收集处理的培养细胞,加入 800 μl TRIzol RNA 提取试剂裂解,200 μl 氯仿抽提,高速离心(10 min, $12\,000 \times g$),上清加等体积异丙醇离心沉淀,75%乙醇洗涤,室温晾干沉淀,加入 DEPC 处理水溶解 RNA,测定其浓度及其纯度。然后调节每管 RNA 浓度使一致。保存于 -70°C 或者将 RNA 逆转录为 cDNA。

1.6 逆转录反应和 PCR 扩增 取 2 μg RNA、随机引物、RNasin,混合,65 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min,4 $^\circ\text{C}$ 冰浴 3

min,然后依次加入下列试剂:5 \times Buffer 4 μl 、10 mmol/L dNTP 1 μl 、0.1 mol/L DTT 2 μl 、RNasin 20 U、M-MLV 20 U,用去离子水补至总体积,37 $^\circ\text{C}$ 反应 60 min,90 $^\circ\text{C}$ 加热 5 min。PCR 扩增反应总体积为 50 μl :200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ dNTP、上下游引物(1 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、 β -actin 上下游引物(25 $\mu\text{mol}/\text{L}$)、cDNA、Taq 酶 2.5 U。PCR 条件:94 $^\circ\text{C}$ 30 s、57 $^\circ\text{C}$ 45 s、72 $^\circ\text{C}$ 60 s。循环 27 次后,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。电泳产物在 2.5% 的琼脂糖凝胶上电泳、在凝胶成像仪上观察并成像。

1.7 Western 印迹法 在 chelerythrine chloride 和(或)维 A 酸处理后胰酶消化离心收集细胞,PBS 洗涤,1 mol/L Na_3VO_4 的 PBS(pH7.4)洗涤,2 000 r/min \times 10 min 离心收集细胞,细胞沉淀加入裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-Cl pH7.5、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L PMSF、5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ EDTA、1 mmol/L Na_3VO_4 、1% NP-40、10 mg/ml aprotinin),冰浴 30 min,4 $^\circ\text{C}$ $12\,000 \times g$ 离心 10 min,弃沉淀,以蛋白检测试剂盒测定浓度(Bio-Rad)。上清保存于 -70°C 。取 30 μg 加入等体积蛋白上样缓冲液,100 $^\circ\text{C}$ 煮沸 5 min,于 8%~12% 变性聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离,随后转移到硝酸纤维素膜上,与特异性一抗(Nestin、NeuN、NF-M、MAP-2 和 β -actin)和相应辣根过氧化物酶标记二抗(1%:2 000)孵育。采用化学荧光法检测免疫活性(Boehringer Mannheim)。显影后采用光密度扫描仪(Perkin-Elmer Co.)检测信号强弱。(Nestin,1:200~400,美国 Chemicon 公司;NeuN,1:100~200,美国 Chemicon 公司,MAB 377;TuJ-1,1:100,美国 Chemicon 公司,MAB 1637;tau 蛋白,1:100,美国 Sigma 公司;MAP-2,1:100,美国 Sigma 公司;BDNF,1:1 000,美国 Promega 公司;NF-M,1:200,美国 Chemicon 公司,AB1987)。

1.8 图像分析和数据处理 实验重复 3 次。将电泳凝胶在凝胶图像分析仪检测光密度,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS10.0 进行数据处理。用配对 *t* 检验统计实验诱导组和对照组基因表达(半定量 RT-PCR 产物)的差异。

2 结果

2.1 维 A 酸促进人胎肝 CD34⁺ 细胞 Nestin、NeuN 和 NF-M mRNA 的表达 维 A 酸处理 5 d 后的和未经维 A 酸处理的胎肝细胞的总 RNA 转录成 cDNA 后经 Nestin、NeuN、NF-M 和 β -actin 基因特异引物分别扩增,电泳显示均分别产生预期大小的特异目的条带(图 1):Nestin 基因为 251 bp、NeuN 基

因为 394 bp、NF-M 基因为 231 bp、 β -actin 基因为 541 bp, 光密度值分析显示维 A 酸处理后的扩增信号(目的基因密度值/ β -actin 基因密度值)较处理前的扩增信号显著增加: 0.82 ± 0.13 vs 0.19 ± 0.07 、 0.76 ± 0.11 vs 0.15 ± 0.05 、 0.56 ± 0.07 vs 0.13 ± 0.05 , 两者有统计学意义($P < 0.01$), 说明 Nestin、NeuN 和 NF-M 基因表达显著增加。而 MAP-2 基因特异引物 RT-PCR 扩增、电泳显示未经维 A 酸处理的和维 A 酸处理 5 d 后的胎肝细胞的总 RNA 均未产生明显的特异目的条带(321 bp), 光密度值分析显示两者无统计学意义: 0.07 ± 0.02 vs 0.05 ± 0.02 , 说明 MAP-2 基因表达无显著增加。这些结果说明维 A 酸促进了人胎肝细胞神经组织结构功能蛋白基因 Nestin、NeuN 和 NF-M 的 mRNA 的表达显著增加, 而 MAP-2 的 mRNA 表达无明显增加。

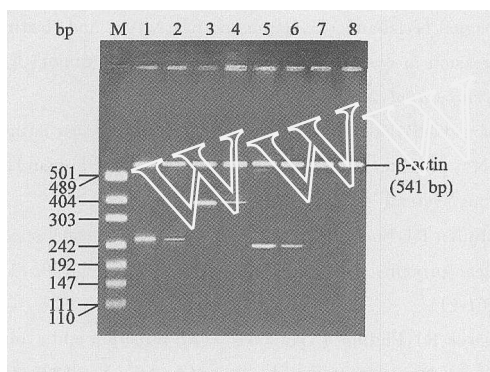


图 1 RT-PCR 检测维 A 酸诱导的胎肝细胞神经特异基因的表达

Fig 1 RT-PCR assay of neural specific gene expression in fetal liver cells induced by tretinoin

M: pUC19 DNA/Msp I marker; 1, 3, 5: RT-PCR products from total RNA of cells treated by tretinoin; 2, 4, 6, 8: RT-PCR products from total RNA of cells untreated by tretinoin; 1, 2: Amplified by specific primers for Nestin gene(251 bp); 3, 4: Amplified by specific primers for NeuN gene(394 bp); 5, 6: Amplified by specific primers for NF-M gene(231 bp); 7, 8: Amplified by specific primers for MAP-2 gene(321 bp); β -actin is internal control

2.2 维 A 酸促进人胎肝 CD34⁺ 细胞 Nestin、NeuN 和 NF-M 蛋白的表达 Western 印迹显示未经维 A 酸处理的胎肝细胞表达有较弱的 Nestin、NeuN 和 NF-M 蛋白, 而经维 A 酸处理的胎肝细胞表达 Nestin、NeuN 和 NF-M 蛋白的水平均有显著增加(图 2), 光密度值分析显示 Nestin、NeuN 和 NF-M 蛋白分别增加 4.09、5.12 和 7.27 倍, 有统计学意义($P < 0.01$)。MAP-2 蛋白免疫印迹显示未经维 A 酸处理和经维 A 酸处理的胎肝细胞均无明显表达, 光密度值分析显示两者无统计学意义。这些结果说明维 A 酸促进了人胎肝细胞神经组织细胞结构功能

蛋白 Nestin、NeuN 和 NF-M 表达的显著增加, 而 MAP-2 的表达无明显增加。

2.3 Chelerythrine chloride 抑制维 A 酸诱导胎肝细胞表达 Nestin、NeuN 和 NF-M 免疫印迹显示维 A 酸和 chelerythrine chloride($3 \mu\text{mol/L}$) 共同处理的细胞表达 Nestin、NeuN 和 NF-M 水平较单纯维 A 酸处理的细胞水平显著降低(图 3)。光密度值分析显示 Nestin 下降至 24%、NeuN 下降至 32%、NF-M 下降至 33% ($P < 0.01$), 而 MAP-2 表达下降不明显。说明蛋白激酶 C 抑制剂 chelerythrine chloride 阻止了维 A 酸诱导的神经组织基因 Nestin、NeuN 和 NF-M 表达, 即维 A 酸诱导胎肝细胞内神经组织基因表达与蛋白激酶 C 活性有关。

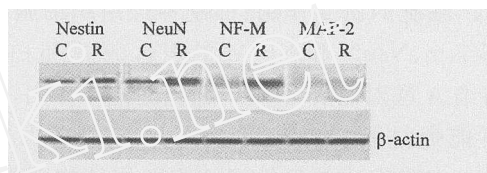


图 2 维 A 酸诱导的胎肝细胞神经特异蛋白 Nestin、NeuN、NF-M、MAP-2 的表达

Fig 2 Expression of Nestin, NeuN, NF-M, and MAP-2 proteins in tretinoin-induced fetal liver cells

C: Control cells; R: Tretinoin-treated cells

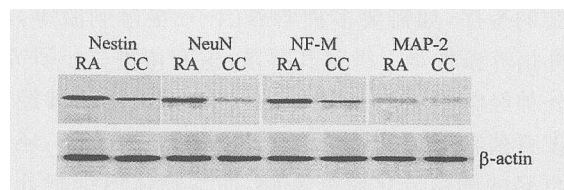


图 3 Chelerythrine chloride 对维 A 酸诱导胎肝细胞表达 Nestin、NeuN、NF-M 和 MAP-2 蛋白的抑制作用

Fig 3 Effects of chelerythrine chloride on expression of tretinoin-induced Nestin, NeuN, NF-M, and MAP-2 proteins in fetal liver cells

CC: Chelerythrine chloride-treated cells; RA: Tretinoin-treated cells

3 讨论

Nestin(巢蛋白)是属于中间丝蛋白, 是神经干/祖细胞的特异标志抗原^[10]。NeuN(神经元特异性核蛋白)是早期胚胎神经发育的特异性标记, 同时也表达于发育成熟脑组织绝大部分神经元^[11, 12]。NF-M(中分子量神经丝蛋白)是神经细胞骨架中间丝蛋白的一种, 神经细胞特有的成分, 存在于神经细胞发育早中期和成熟期^[13~16]。MAP-2 是神经细胞特异微管相关蛋白, 成熟神经元特有的结构, 位于神经元的胞体和树突, 出现在神经系统发育晚期及成年期, 有稳定神经元微管和保持神经元形态的作用^[17], 使神

经细胞维持正常的形态和功能。蛋白激酶 C 属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族,对细胞增殖分化、细胞周期、细胞骨架重建、离子通道、分泌以及凋亡有重要的调节作用^[18~20]。本实验显示在维 A 酸处理前的胎肝 CD34⁺ 细胞中,有 Nestin、NeuN 和 NF-M mRNA 极低水平表达,但是没有明显检测到它们相应蛋白及 MAP-2 表达,说明其中可能存在少量具有神经干/祖细胞样的干细胞,但不存在早期神经细胞。维 A 酸处理能使 Nestin、NeuN 和 NF-M mRNA 和蛋白表达水平显著增加,说明维 A 酸可能促进了胎肝 CD34⁺ 细胞中的部分干细胞向神经前体细胞以及早期神经细胞分化。而蛋白激酶 C 特异性抑制剂 chelerythrine chloride 能明显抑制维 A 酸对胎肝 CD34⁺ 细胞的诱导作用;抑制神经组织细胞特异蛋白 Nestin、NeuN 和 NF-M 的表达,说明蛋白激酶 C 参与维 A 酸对胎肝 CD34⁺ 细胞的诱导作用,即维 A 酸可能通过蛋白激酶 C 途径诱导或者促进胎肝 CD34⁺ 细胞表达神经组织细胞特异结构功能蛋白,使其向神经细胞分化。

维 A 酸促进或者诱导分化出的神经干/祖细胞分化为早期神经细胞后,为何不能继续分化为完全成熟的神经元呢?其原因可能是神经系统发育需要复杂的程序,如需要多种营养因子、接触刺激等,而体外培养条件难以满足其要求。这有待进一步研究。体外神经细胞诱导分化模型的建立将有助于神经系统发育药物筛选。要建立完善的体外诱导模型,还需要更多的细胞分化研究基础,而动物体内细胞分化研究也是不可缺少的。

致谢:感谢暨南大学医学院中心实验室廖继东、赵忻、马秀君老师,组织胚胎学教研室夏潮涌老师在实验中的帮助!

[参考文献]

- [1] Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells [J]. *Gene Ther*, 2002, 9(11): 754-758.
- [2] Zigova T, Song S, Willing AE, et al. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain [J]. *Cell Transplant*, 2002, 11(3): 265-274.
- [3] Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow [J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1779-1782.
- [4] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice [J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1775-1779.
- [5] Mahmood A, Lu D, Wang L, et al. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells [J]. *Neurosurgery*, 2001, 49(5): 1196-1203.
- [6] Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2199-2204.
- [7] Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury [J]. *Cell Transplant*, 2002, 11(3): 275-281.
- [8] Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function [J]. *Circulation*, 1999, 100(19 Suppl): II247- II256.
- [9] Whysner J, Williams GM. Butylated hydroxyanisole mechanistic data and risk assessment: conditional species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferation, and tumor promotion [J]. *Pharmacol Ther*, 1996, 71(1-2): 137-151.
- [10] Duggal N, Iskander S, Hammonid RR. MAP2 and Nestin co-expression in dysembryoplastic neuroepithelial tumors [J]. *Clin Neuropathol*, 2003, 22(2): 57-65.
- [11] Sarnat HB, Nochlin D, Born DE. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in early human fetal nervous system [J]. *Brain Dev*, 1998, 20(2): 88-94.
- [12] Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates [J]. *Development*, 1992, 116(1): 201-211.
- [13] Lasek RJ, Phillips L, Katz MJ, et al. Function and evolution of neurofilament proteins [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1985, 455: 462-478.
- [14] Carden MJ, Trojanowski JQ, Schlaepfer WW, et al. Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns [J]. *J Neurosci*, 1987, 7(11): 3489-3504.
- [15] Benson DL, Mandell JW, Shaw G, et al. Compartmentation of alpha-internexin and neurofilament triplet proteins in cultured hippocampal neurons [J]. *J Neurocytol*, 1996, 25(3): 181-196.
- [16] Al-Chalabi A, Miller CC. Neurofilaments and neurological disease [J]. *Bioessays*, 2003, 25(4): 346-355.
- [17] Tucker RP, Binder LI, Matus AI. Neuronal microtubule-associated proteins in the embryonic avian spinal cord [J]. *J Comp Neurol*, 1988, 271(1): 44-55.
- [18] Kanashiro CA, Khalil RA. Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1998, 25(12): 974-985.
- [19] Wooten MW. Function for NF- κ B in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C [J]. *J Neurosci Res*, 1999, 58(5): 607-611.
- [20] Keenan C, Kelleher D. Protein kinase C and the cytoskeleton [J]. *Cell Signal*, 1998, 10(4): 225-232.

[收稿日期] 2004-01-14

[修回日期] 2004-05-10

[本文编辑] 孙岩