论著

文章编号:1000-5404(2010)21-2290-04

Notch-1 对大鼠嗅球成鞘细胞神经生长因子表达的影响

卓 飞,孙善全,余维华,刘 辉,邱国平,杨 美 (400016 重庆,重庆医科大学人体解剖学教研室,神经科学研究中心)

【摘要】 目的 观察 Notch-1 对嗅球成鞘细胞(olfactory ensheathing cells,OECs)神经生长因子(nerve growth factor,NGF)表达的影响。方法 原代培养大鼠 OECs,用有活性的 Notch 质粒($Notch^{ICV}$),无活性的 Notch 质粒($Notch^{VK}$)以及空质粒分别转染 OECs,将实验对象分成 $Notch^{ICV}$ 转染组,$Notch^{VK}$ 转染组和空白质粒组,应用免疫荧光双标、Western blot 及 RT-PCR 技术,检测各组 OECs 中 NGF 及其 mRNA 的表达变化。结果 转染 Notch-1 后,OECs 中 NGF 的表达明显增高。免疫荧光双标结果显示,$Notch^{ICV}$ 转染组 OECs 中 NGF 的表达较 $Notch^{VK}$ 转染组和空白质粒组均明显增高($P<0.05$);RT-PCR 结果显示,$Notch^{ICV}$ 转染组 OECs 中 NGF mRNA 的表达(0.496 1±0.026 9)均高于 $Notch^{VK}$ 转染组(0.244 5±0.013 4)及空白质粒组(0.245 9±0.016 0)($P<0.01$);Western blot 结果显示,$Notch^{ICV}$ 转染组 OECs 中 NGF 的表达(0.887 5±0.016 6)均高于 $Notch^{VK}$ 转染组(0.686 2±0.059 2)和空白质粒组(0.682 1±0.067 0)($P<0.01$)。结论 Notch-1 转染 OECs 后,其 NGF 的表达上调,提示 Notch-1 能增强 OECs 中 NGF 的合成。

【关键词】 嗅球成鞘细胞;神经生长因子;Notch-1

【中图法分类号】 R741.05;R322.81;R329.25;R394.2 【文献标志码】 A

Effect of Notch-1 on expression of NGF in olfactory ensheathing cells of rats

Zhuo Fei, Sun Shanquan, Yu Weihua, Liu Hui, Qiu Guoping, Yang Mei (Department of Anatomy, Institute of Neuroscience, College of Basic Medical Sceinces, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of Notch-1 on expression of nerve growth factor (NGF) in olfactory ensheathing cells (OEC) of rats. **Methods** Rats were divided into active Notch plasmid ($Notch^{ICV}$) group, inactive Notch plasmid ($Notch^{VK}$) group, and empty plasmid group. $Notch^{ICV}$, $Notch^{VK}$, and empty plasmid were transfected into OEC of rats. Immunofluorescence, Western blotting and RT-PCR were used respectively to detect the expression of NGF and NGF mRNA in OEC of rats. **Results** Immunofluorescence showed that the expression level of NGF was significantly higher in $Notch^{ICV}$ group than in $Notch^{VK}$ group and empty plasmid group ($P<0.05$). RT-PCR demonstrated that the expression level of NGF mRNA was significantly higher in $Notch^{ICV}$ group (0.496 1±0.026 9) than in $Notch^{VK}$ group (0.244 5±0.013 4) and empty plasmid group (0.245 9±0.016 0) ($P<0.01$). Western blotting displayed that the expression level of NGF was significantly higher in $Notch^{ICV}$ group (0.887 5±0.016 6) than in $Notch^{VK}$ group (0.686 2±0.059 2) and empty plasmid group (0.682 1±0.067 0) ($P<0.01$). **Conclusion** Expression of NGF is up-regulated in Notch-1 transfected OEC, and Notch-1 can increase the synthesis of NGF in OEC.

【Key words】 olfactory ensheathing cells; nerve growth factor; Notch-1

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670743) and the National Natural Science Foundation of China (CSTC,2008BB5224).
Corresponding author: Sun Shanquan, Tel: 86-23-68485763, E-mail: sunsq2151@sohu.com

嗅球成鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)是存在于嗅黏膜的嗅神经根丝以及嗅球表面的嗅神经纤维层和嗅小球层的一种特殊类型的胶质细胞。OECs 不仅能分泌 NGF、BDNF 等多种神经营养因子[1],而且还能分泌 NCAM、Laminin 等细胞黏附分子[2]。研究显示,NGF 能保护受损的神经元,维持其存活,进而促进受损神经的再生[3,4]。OECs 兼有雪旺细胞和星形胶质细胞的生物学特性[5],与两者均能很好的共存。由于 OECs 具有其他细胞不可取代的优势,因而成为目前治疗中枢神经系统(central nervous system,CNS)损伤最具前景的种植细胞。然而有研究[6]显示,OECs 的修复能力有一定的局限性,制约了 OECs 的广泛应用。因此,如何提高 OECs 的修复能

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30670743);重庆市自然科学基金(2008 BB5224)
【通信作者】 孙善全,电话:(023)68485763,E-mail:sunsq2151@sohu.com

力,成为一个亟待解决的重要课题。目前也有人曾将 NT-3、NT-4、NGF、BDNF 等基因中的 1 种或者 2 种转入 OECs,以修复神经损伤,但其效果并不显著。其原因可能在于,体内神经修复是一个极其复杂的过程,是多因素相互作用的结果,如仅仅增加其中 1 种或者 2 种神经营养因子,其效果是有限的。研究表明,Notch 信号通路能影响细胞的增殖、分化,可以增强 Nestin 等基因的表达[7],然而 Notch 能否影响 NGF 的表达,目前尚少见报道。有鉴于此,本实验利用分子生物学技术,将 Notch-1 转染至 OECs,观察 OECs 中 NGF 的表达变化,以对增强 OECs 成鞘能力的途径进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用出生 24 h 以内的新生 SD 乳鼠,雌雄不拘,共 120 只,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 OECs 原代培养和纯化

将 SD 乳鼠浸于 75% 酒精中消毒,断颈处死,无菌条件下取出双侧嗅球,解剖显微镜下仔细去除嗅球表面的被膜和血管,分离出嗅神经纤维层和嗅小球层,用眼科剪剪成约 1 mm^3 大小的碎片,D-Hanks 液(Hyclone)洗涤 2 次后,用 0.25% 胰蛋白酶(Sigma)37 ℃分离消化 25 min,加入含有 10% 胎牛血清(Hyclone)的 DMEM/F12(1∶1)(Hyclone)培养基终止消化,用吸管轻轻吹打,1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清,加入含 10% 胎牛血清的 DF12 培养基轻轻吹打,制成单细胞悬液,以 1×10^6 个细胞/ml 接种于培养瓶中,37 ℃,5% CO_2 培养 1 h 后,将细胞悬液小心转移到另一培养瓶中,继续培养。培养 24 ~ 36 h 后,更换培养液,加入阿糖胞苷(2.5×10^{-7} mol/L)作用 48 h,离心后弃去阿糖胞苷,加入 10% 胎牛血清的 DF12 培养基继续培养。培养好的 OECs 用低亲和力神经营养因子受体(p75 neurotrophic receptor,p75NTR)抗体(武汉博士德)进行鉴定,纯度达 90% 以上的细胞用于后续实验。

1.3 质粒的转染

将纯化培养 15d 后的 OECs,1×10^6 个细胞/ml 接种于 6 孔培养板中,按照 Lipofectamine™2000(Invitrogen)的使用说明,将有活性的 Notch 质粒 $Notch^{ICV}$、无活性的 Notch 质粒 $Notch^{VK}$ 以及空白质粒转入 OECs 中[质粒由加拿大大不列颠哥伦比亚大学脑研究中心赠送,$Notch^{ICV}$ 为可释放 Notch 胞内结构域(Notch intracellular domain,NICD)的 PZ 质粒,转染细胞后,无需水解,NICD 可直接进入核内;$Notch^{VK}$ 为不能释放 NICD 的 PZ 质粒,可作为阴性对照。其报告基因均为 c-myc],由此将实验对象分成活性质粒组($Notch^{ICV}$ 转染组)、非活性质粒组($Notch^{VK}$ 转染组)和对照组(空白质粒组)。37 ℃,5% CO_2 培养 48 h 后,用免疫细胞化学方法检测细胞中 c-myc 的表达,进行转染率的鉴定。转染率较高的细胞用于免疫荧光双标、RT-PCR 及 Western blot 的检测。

1.4 免疫荧光双标

将转染了质粒的细胞片,用 0.1 mol/L PBS 洗涤 15 min × 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1mol/L PBS 洗涤 15 min × 3 次,10% 马血清封闭 2 h,加兔抗大鼠 NGF 抗体(1∶400,Santa Cruz)和羊抗大鼠 p75NTR 抗体(1∶400,Santa Cruz),4 ℃孵育过夜,0.1 mol/L PBS 洗涤 15 min × 3 次,加 FITC 标记的山羊抗兔荧光二抗(1∶400)和 TRITC 标记的小鼠抗山羊荧光二抗(1∶400),常温下 6 h,0.1 mol/L PBS 洗涤 15 min × 3 次,50% 甘油封片,激光共聚焦扫描成像。

1.5 RT-PCR

按 Trizol(TaKara)试剂说明书提取细胞总 RNA,并用紫外分光光度计测定总 RNA 含量。按 AMV 逆转录试剂盒(杭州博日)的操作说明将 mRNA 逆转录为 cDNA。用以下引物对 NGF 和 β-actin 的 cDNA 进行扩增:NGF 上游引物:5′-GCGGCAGATAAAAAGACTGC-3′,下游引物:5′-GCCAGCCAATTCTCTTTTTG-3′,扩增产物长 237bp;β-actin 上游引物:5′- CTGCCGCATCCTCTTCCTC -3′,下游引物:5′- CTCCTGCTTGCTGATCCACAT -3′,扩增产物长 398 bp。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,紫外分析仪下观察并照相,电泳结果用 Bandscan5.0 分析软件进行光密度分析,将 NGF 与 β-actin 产物光密度的比值作为 mRNA 的表达水平。

1.6 Western blot

收集 1×10^6 细胞,按照蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白。经 BCA 法测定蛋白含量后,取 30 μl 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,并电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温振荡封闭 1 h,兔抗大鼠 NGF 抗体(1∶400,Santa Cruz)4 ℃孵育过夜,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1∶2000,武汉博士德)室温孵育 2 h,DAB 进行显色,选用 β-actin 为内参。

1.7 统计学方法

运用 SPSS 10.0 统计软件对实验数据进行分析。在方差齐同的条件下,进行两独立样本 t 检验,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 细胞形态学

倒置显微镜下发现大部分 OECs 接种 24 h 后贴壁,呈球形,培养 2 d 后逐渐长出突起,7 d 后,突起变得细长,细胞呈双极、三极或油煎鸡蛋状。

2.2 免疫细胞化学

2.2.1 p75 p75 染色均匀分布于整个胞体和突起(图 1),大部分细胞均呈阳性染色,本实验获得了纯度较高的 OECs。

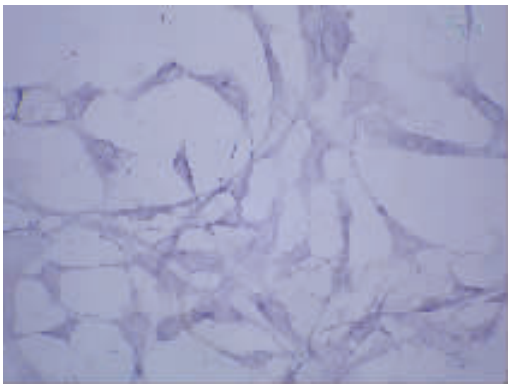
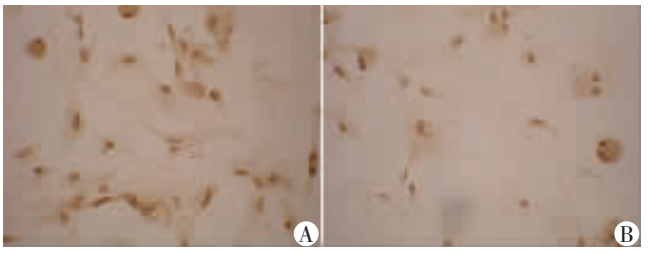


图 1 p75 在纯化培养后的 OECs 中的表达 (ICC ×400)

2.2.2 c-myc　c-myc是显示质粒转染是否成功的报告基因，Notch^{ICV}和Notch^{VK}转染组均含有c-myc阳性细胞（图2），提示转染是成功的，转染率约75%，c-myc主要表达于细胞核，而空白质粒组由于不含c-myc基因而呈阴性。



A：c-myc在Notch^{ICV}转染的OECs中的表达；B：c-myc在Notch^{VK}转染的OECs中的表达

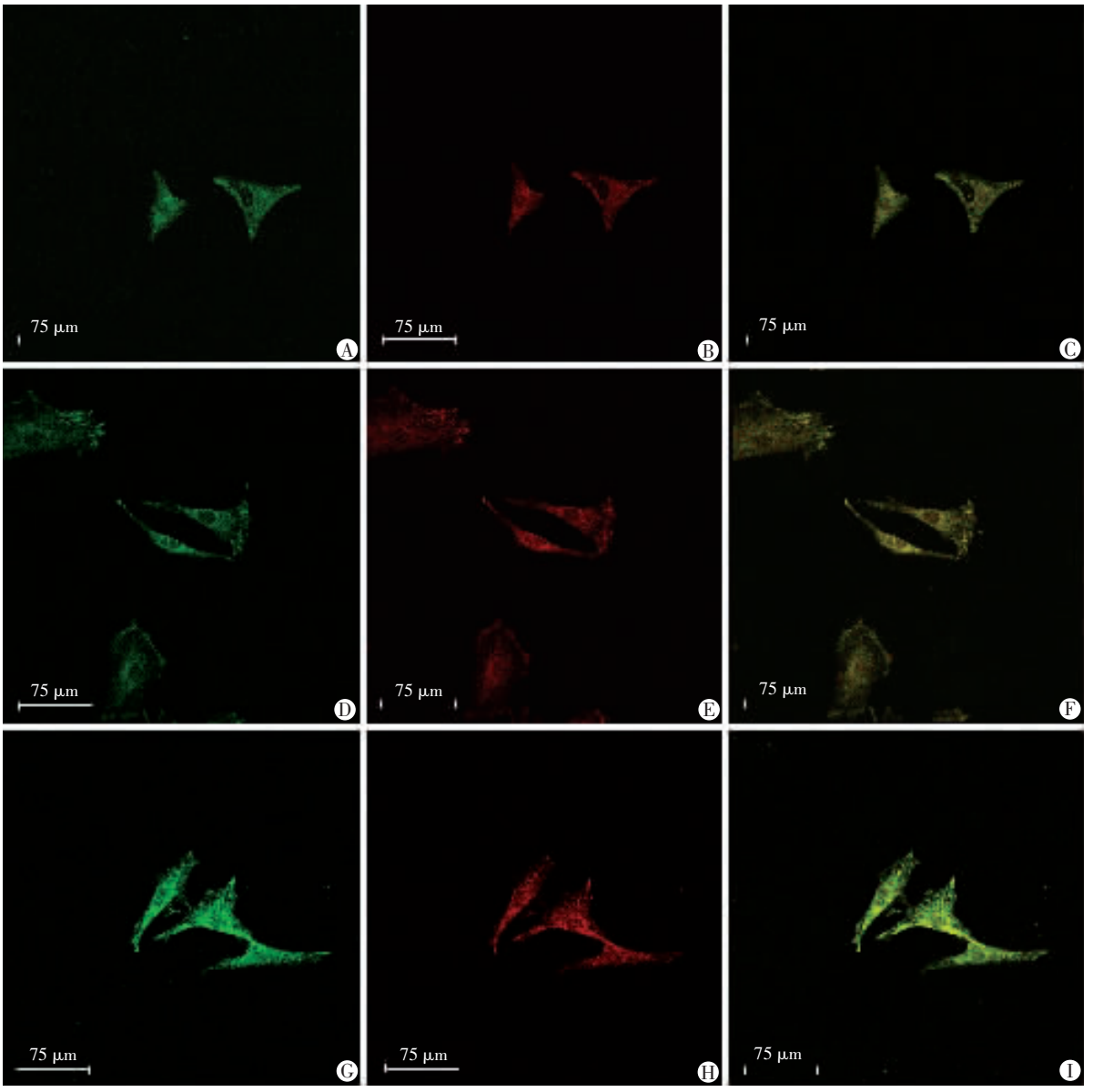
图2　c-myc在OECs中的表达　（ICC ×400）

2.3　免疫荧光双标检测Notch-1对OECs中NGF表达的影响

经过平均光密度值比较发现，Notch^{ICV}转染组NGF的表达较Notch^{VK}转染组和空白质粒组均增高（$P<0.05$），而Notch^{VK}转染组与空白质粒组比较无明显差异（$P>0.05$），Notch^{ICV}转染组OECs中NGF的荧光强度明显高于Notch^{VK}转染组及空白质粒组（图3）。

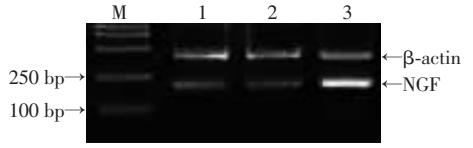
2.4　RT-PCR检测Notch-1对OECs中NGF mRNA表达的影响

结果显示，Notch^{ICV}转染组NGF mRNA的表达（0.496 1 ± 0.026 9）均高于Notch^{VK}转染组（0.244 5 ± 0.013 4）及空白质粒组（0.245 9 ± 0.016 0）（$P<0.01$），而Notch^{VK}转染组与空白质粒组比较无明显差异（$P>0.05$），Notch^{ICV}转染组OECs中NGF mRNA的表达较Notch^{VK}转染组和空白质粒组均明显增高（图4）。



A：NGF在空白质粒组OECs中的表达；B：p75在空白质粒组OECs中的表达；C：NGF和p75在空白质粒组OECs中的共表达；D：NGF在Notch^{VK}转染组OECs中的表达；E：p75在Notch^{VK}转染组OECs中的表达；F：NGF和p75在Notch^{VK}转染组OECs中的共表达；G：NGF在Notch^{ICV}转染组OECs中的表达；H：p75在Notch^{ICV}转染组OECs中的表达；I：NGF和p75在Notch^{ICV}转染组OECs中的共表达

图3　免疫荧光观察NGF在Notch^{ICV}、Notch^{VK}转染组和空白质粒组OECs中的表达变化

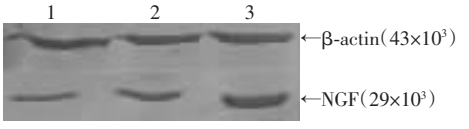


M：标准 1：空白质粒组 2：Notch^{VK}转染组 3：Notch^{ICV}转染组

图 4　RT-PCR 检测 NGF mRNA 在 Notch^{ICV}、Notch^{VK}转染组和空白质粒组 OECs 中的表达变化

2.5　Western blot 检测 Notch-1 对 OECs 中 NGF 表达的影响

β-actin 和 NGF 在相对分子质量为 43×10^3 和 29×10^3 处有表达。经 Bandscan 5.0 分析软件进行积分光密度值比较后发现，Notch^{ICV}转染组（0.8875 ± 0.0166）OECs 中 NGF 的表达均高于 Notch^{VK}转染组（0.6862 ± 0.0592）和空白质粒组（0.6821 ± 0.0670）（$P<0.01$），而 Notch^{VK}转染组和空白质粒组比较无明显差异（$P>0.05$），Notch^{ICV}转染组 OECs 中 NGF 的表达较 Notch^{VK}转染组和空白质粒组均明显增高（图 5）。



M：标准 1：空白质粒组 2：Notch^{VK}转染组 3：Notch^{ICV}转染组

图 5　Western blot 检测 NGF 在 Notch^{ICV}、Notch^{VK}转染组和空白质粒组 OECs 中的表达变化

3　讨论

OECs 是起源于嗅黏膜基底膜的一种特化的胶质细胞，主要位于嗅黏膜的嗅神经以及嗅球表面的嗅神经纤维层和嗅小球层。实验表明[8-11]，OECs 能够使受损的轴突重新桥接并形成髓鞘，从而使脊髓损伤动物的神经功能（运动、感觉）得到恢复。近年来的研究[11]表明，OECs 所分泌的 NGF 等各种营养因子，在神经纤维损伤修复的过程中发挥着极其重要的作用。研究显示，NGF 不仅能够保护神经元免受低糖低氧所致的损伤，维持其存活，而且还能促进轴突的再生[3,4]。

Notch 信号通路是决定细胞命运的重要通路[12]。Notch 蛋白是细胞膜上一种保守的跨膜受体蛋白，在通常情况下，与相邻的配体蛋白结合后才能被激活，经过 γ-分泌酶的水解，NICD 从膜上脱落，直接进入核内与 CSL 蛋白结合，启动相应目的基因的转录[7]。目前已发现 NICD 可增强 Wnt、Nestin 等多种基因的表达[13,14]，但 Notch-1 是否对 NGF 的表达产生影响还少见报道。为此，本实验构建了 Notch 活性质粒 Notch^{ICV}和非活性质粒 Notch^{VK}和空白质粒。Notch^{ICV}质粒是 NICD 的类似物，不依赖于配体激活和 γ-分泌酶水解，能直接进入细胞核内，启动相应基因转录，代表了 Notch 通路的激活形式；由于 Notch^{VK}质粒 S3 位点上的缬氨酸为赖氨酸所替换，不能为 γ-分泌酶所识别，使 NICD 无法从细胞膜上释放，Notch 通路也就无法激活，代表了 Notch 通路的失活形式。在本实验过程中，将上述 3 种质粒分别转染 OECs，观察 OECs 细胞 NGF 的表达变化，以探讨 Notch-1 对 NGF 表达的影响。

免疫荧光双标及 Western blot 的结果显示，Notch^{ICV}转染组 NGF 的表达水平较其余两组明显增高，而将 Notch^{VK}转染组与空白质粒组相比较，两者无明显差异。在 OECs 转入有活性的 Notch 质粒后，NGF 的蛋白表达水平上调。RT-PCR 的结果表明，Notch^{ICV}转染组 NGF mRNA 的表达较 Notch^{VK}转染组和空白质粒组均有明显差异，而 Notch^{VK}转染组和空白质粒组之间却并无明显差异。上述结果提示，Notch-1 能够增强 OECs 内 NGF 及其 mRNA 的表达；转染了 Notch-1 的 OECs 可能具有更好的促进受损神经纤维再生的能力。

参考文献：

[1] Woodhall E, West A K, Chuah M I. Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 88(1/2): 203-213.

[2] Franceschini I A, Barnett S C. Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage [J]. Dev Biol, 1996, 173(1): 327-343.

[3] Shimohama S, Ogawa N, Tamura Y, *et al*. Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons [J]. Brain Res, 1993, 632(1/2): 296-302.

[4] 陈燕涛，何清，刘尚礼，等. 神经生长因子治疗周围神经损伤的前瞻性研究[J]. 中华创伤骨科杂志，2006，8(8)：744-746.

[5] Chuah M I, Au C. Olfactory cell cultures on ensheathing cell monolayers [J]. Chem Senses, 1994, 19(1): 25-34.

[6] Aoki M, Kishima H, Yoshimura K, *et al*. Limited functional recovery in rats with complete spinal cord injury after transplantation of whole-layer olfactory mucosa: laboratory investigation [J]. J Neurosurg Spine, 2010, 12(2): 122-130.

[7] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415): 770-776.

[8] Ramer L M, Au E, Richter M W, *et al*. Peripheral olfactory ensheathing cells reduce scar and cavity formation and promote regeneration after spinal cord injury [J]. J Comp Neurol, 2004, 473(1): 1-15.

[9] Li Y, Field P M, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells [J]. Science, 1997, 277(5334): 2000-2002.

[10] 游华，矫树生，冯帅南，等. OEC-SC-ECM-PLGA 桥接体对大鼠坐骨神经缺损的解剖学修复作用[J]. 第三军医大学学报，2008，30(21)：2015-2019.

[11] 钟环，蔡小娴，陈继铭. NTFs 基因修饰的人胚 OECs 植入促进大鼠 SCI 神经再生及功能恢复的研究[J]. 中国医疗前沿，2009，4(6)：13-14.

[12] 姬振伟，钱济先，韩建伟，等. 嗅鞘细胞对正常及损伤脊髓神经元的保护作用[J]. 中国修复重建外科杂志，2009，23(1)：21-25.

[13] Mumm J S, Kopan R. Notch signaling: from the outside in [J]. Dev Biol, 2000, 228(2): 151-165.

[14] Liu Y, Pathak N, Kramer-Zucker A, *et al*. Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros [J]. Development, 2007, 134(6): 1111-1122.

[15] Koyanagi M, Bushoven P, Iwasaki M, *et al*. Notch signaling contributes to the expression of cardiac markers in human circulating progenitor cells [J]. Circ Res, 2007, 101(11): 1139-1145.

（收稿 2010-06-23 修回 2010-08-01）
（编辑　王　红）