论著

文章编号:1000-5404(2011)10-1036-04

血管内皮生长因子促进少突胶质前体细胞增殖及其机制的初步研究

张 波,胡 俊,焦 岩,黄河清,陈康宁 (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经内科)

【摘要】 **目的** 观察不同浓度血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)增殖的影响,探索VEGF促进OPCs体外增殖与Notch信号通道上相关蛋白的关系。**方法** 分离纯化培养OPCs,MTT法检测不同浓度VEGF(50、100、200 ng/ml)促进OPCs增殖的作用以及加入Notch通路γ-分泌酶抑制剂DAPT(VEGF 100 ng/ml + DAPT 50 μmol/ml)后OPCs增殖变化情况,RT-PCR、Western blot技术检测VEGF处理OPCs后Notch信号通道上Notch-1、Hes-1的基因表达和蛋白表达情况。**结果** 50、100、200 ng/ml VEGF处理组的细胞增殖率分别为(107 ± 2)%、(124 ± 2)%、(142 ± 7)%,与空白对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$);VEGF + DAPT处理组的增殖率下降至(103 ± 4)%($P < 0.05$)。RT-PCR及Western blot分析显示VEGF处理OPCs后,Notch-1、Hes-1蛋白在基因水平和蛋白水平表达均增加($P < 0.05$),γ-分泌酶抑制剂DAPT能抑制其表达($P < 0.05$)。**结论** VEGF对OPCs具有促进增殖的作用,其促增殖作用与Nocth信号通路相关蛋白有关。

【关键词】 血管内皮生长因子;少突胶质前体细胞;增殖;Notch
【中图法分类号】 R322.81;R329.26;R329.28 【文献标志码】 A

Mechanism of vascular endothelial growth factor promoting *in vitro* proliferation of oligodendrocyte precursor cells

Zhang Bo, Hu Jun, Jiao Yan, Huang Heqing, Chen Kangning (Department of Neurology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To observe the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) with different concentrations on the proliferation of oligodendrocyte precursor cells (OPCs), and to study the relationship between the promotion effect of VEGF on OPCs *in vitro* proliferation and relevant proteins in Notch signaling pathway. **Methods** OPCs were isolated, purified, and cultured. The influences of VEGF with different concentrations (50, 100, and 200 ng/ml) and Notch signaling pathway γ-secretase inhibitor DAPT on OPCs proliferation were detected with MTT assay. The influences of VEGF on the expression of Notch-1 and Hes-1 in Notch signaling pathway at mRNA level and protein level were detected with RT-PCR and Western blotting. **Results** OPCs treated with 50, 100, and 200 ng/ml VEGF had proliferation rates of (107 ± 2)%, (124 ± 2)%, and (142 ± 7)%, respectively, which were significantly different from the proliferation rate (100%) of untreated OPCs ($P < 0.05$). After γ-secretase inhibitor addition, the proliferation rate of OPCs treated with 100 ng/ml VEGF decreased to (103 ± 4)%. RT-PCR and Western blot results showed that the expression of Notch-1 and Hes-1 in OPCs treated with VEGF was significantly higher than those in the untreated OPCs ($P < 0.05$), and lower than those in OPCs treated with VEGF and γ-secretase inhibitor ($P < 0.05$). **Conclusion** VEGF can directly promote the proliferation of OPCs, associated with proteins in Notch signaling pathway.

【**Key words**】 vascular endothelial growth factor; oligodendrocyte precursor cells; proliferation; Notch signaling pathway

Corresponding author: Chen Kangning, Tel 86-23-68754154, E-mail: ckn640827@126.com

少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells,OPCs)是哺乳动物脑内一类特殊表达硫酸软骨素多聚糖蛋白(neuron-glia antigen2,NG2)的胶质细胞,NG2阳性少突胶质前体细胞对中枢神经系统损伤能迅速做出反应。在缺血性脑卒中、神经退行性疾病中均可见NG2阳性的OPCs快速增殖[1-2]。目前研究认为血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)除传统的促进血管内皮细胞增殖,参与

【通信作者】 陈康宁,电话:(023)68754154,E-mail:ckn640827@126.com

血管生成作用外，还具有神经保护和神经新生作用[3]。我们前期在动物模型中研究发现VEGF与NG2阳性OPCs的增殖有关[4]。本研究拟通过观察体外环境下不同浓度VEGF处理后OPCs增殖的变化情况，初步探索VEGF促进OPCs增殖作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

倒置相差显微镜、紫外分光光度仪(Bio Rad)、荧光显微镜(Leica)，电泳仪(Bio Rad)、PCR仪(Biometra)、台式恒温振荡器(江苏太仓)。新生SD大鼠(鼠龄<48 h，雌雄不限，体质量30~50 g)购自第三军医大学实验动物中心。DMEM高糖培养基、DMEM/F12培养基、青链霉素购自HyClone公司，胎牛血清FBS购自Gibco公司，血小板源性生长因子PDGF-AA、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自Peprotech公司，转铁蛋白、牛血清白蛋白、胰岛素、γ-分泌酶抑制剂DAPT购自Sigma公司，大鼠单克隆抗体NG2、Notch-1抗体、hes-1抗体、β-actin抗体、羊抗小鼠IgG-HRP、羊抗仓鼠IgG/HRP购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 少突胶质前体细胞的体外培养及鉴定 少突胶质前体细胞的取材及混合胶质细胞培养：新生SD大鼠低温麻醉消毒后无菌取出大脑半球，去除基底节、海马及脑膜等结构，将大脑皮层转入冰PBS液中，剪碎组织后加胰酶置于37 ℃培养箱中消化15 min，终止消化后离心(1 000 r/min，10 min)，吹打制成细胞悬液，筛网过滤后以基本培养基悬浮细胞并接种于多聚赖氨酸包被的培养瓶内。置入5% CO_2，37 ℃培养箱内2~3 d换液1次，第9~10天根据混合胶质细胞生长情况进一步振荡分离。

少突胶质前体细胞的分离纯化：将装有混合胶质细胞的培养瓶转移至振荡器上初步振荡(200 r/min，37 ℃，1 h)去除小胶质细胞，重新加入基本培养基后继续振荡(200 r/min，37 ℃，18~20 h)，消毒培养瓶后收集上清于无菌的培养皿中，将培养皿在培养箱中放置1 h，利用小胶质细胞与星形胶质细胞容易贴壁生长的特性分离OPCs。筛网过滤上清液后将上清液离心(1 000 r/min，10 min)，使用基本培养基悬浮细胞并以$1\times10^4/cm^2$接种细胞于多聚赖氨酸包被的培养瓶。24 h后更换少突胶质前体细胞培养基继续培养细胞，根据培养液颜色变化情况每2~3天换液1次。

少突胶质前体细胞的鉴定：分离后少突胶质前体细胞置于包被有多聚赖氨酸的细胞培养皿中，48 h后去除培养基，常规用4%多聚甲醛固定后，加入大鼠单克隆抗体NG2(1∶400)，DAPI染色，漂洗(5 min×3次)，室温下晾干，免疫荧光电镜观察OPCs的细胞纯度。

1.2.2 MTT检测不同浓度VEGF作用下OPCs细胞增殖变化 振荡分离OPCs后以$(8\sim10)\times10^3$/孔接种于96孔板，12 h后去除基本培养基，加入少突胶质前体细胞培养基180 μl，置37 ℃、5% CO_2培养24 h后倒置显微镜下观察证实细胞贴壁生长良好。加入VEGF后使其终浓度分别为50、100、200 ng/ml，每组浓度设4个复孔，设空白对照组(加PBS)，继续孵育48 h后各孔加入MTT(5 mg/ml)，继续培养4 h，去上清，然后加入DMSO，37 ℃孵箱放置15 min，用酶标仪测光密度值[D(490)]。计算不同浓度VEGF对OPCs细胞增殖的影响。

增殖率=VEGF处理组D(490)值/空白对照组D(490)值×100%

1.2.3 MTT检测加入γ-分泌酶抑制剂处理后OPCs增殖变化 同1.2.1方法处理OPCs细胞，待其贴壁生长良好后设空白对照组(加PBS)、VEGF+DAPI处理组阻滞剂处理组(VEGF 100 ng/ml+DAPT 50 μmol/ml)、VEGF单独处理组(100 ng/ml)，继续孵育48 h后各组加入MTT(5 mg/ml)，继续培养4 h，去上清，然后加入DMSO，37 ℃培养箱放置15 min，用酶标仪测光密度值[D(490)]。同1.2.2方法计算OPCs细胞增殖率。

1.2.4 RT-PCR检测 设空白对照组、VEGF+DAPT处理组(VEGF 100 g/ml+DAPT 50 μmol/ml)、VEGF单独处理组(100 ng/ml)，Trizol试剂法提取细胞总RNA，逆转录成cDNA，进行PCR。大鼠Notch-1基因在GenBank的序号为NM_001105721.1，上、下游引物分别为5′-TGCTCCCTCAACTTCAATG-3′、5′-AGGCTCCACCGTCTCACT-3′，产物大小720 bp；Hes-1基因在GenBank的序号为NM_024360.3，上、下游引物分别为5′-GGGCAAGAATAAATGAAAGT-3′、5′-AAAGCAACAAAGTAACCACC-3′，产物大小827 bp；β-actin基因在GenBank的序号为NM_031144.2，上、下游引物分别为5′-CAGCCTTCCTTCCTGGGTA-3′、5′-TGTCAAAGAAAGGGTGTAAAA-3′，产物大小384 bp。反应条件：94 ℃预变性2 min；94 ℃变性30 s，58 ℃退火60 s，72 ℃延伸1 min，30个循环，最后72 ℃延伸10 min。取10 μl RT-PCR产物于1%琼脂凝胶中电泳，紫外灯下照射，凝胶成像扫描仪进行分析。用Quantity one软件分析凝胶灰度值。

1.2.5 Western blot检测 细胞处理方法及分组同1.2.4，三去污裂解液提取总蛋白；海泳道调整蛋白量至20 μg，以8%的分离胶行SDS-PAGE，转移至PVDF膜上；封闭2 h后分别加入一抗(利比亚仓鼠抗大鼠NOTCH-1抗体，1∶200；小鼠抗大鼠Hes-1抗体，1∶200)，4 ℃过夜，TBST溶液漂洗；相应的辣根酶过氧化物酶标记的二抗(1∶1 000)室温孵育1 h，TBST溶液漂洗；加入ABC混合液，室温孵育1 h。DAB液显色。化学发光底物显色法显影，分析条带吸光值×面积(Int×mm^2)。用Quantity one软件对条带进行分析，以目标条带和β-actin参照条带积分吸光度比值作为测量结果。

1.3 统计学处理

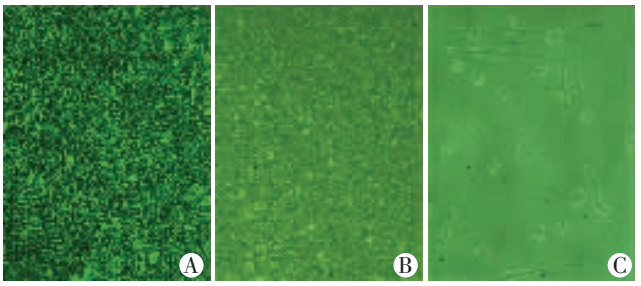
采用SPSS 18.0统计软件，数据以$\bar{x}\pm s$表示，不同浓度VEGF对OPCs的促增殖作用采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 OPCs的纯化及鉴定

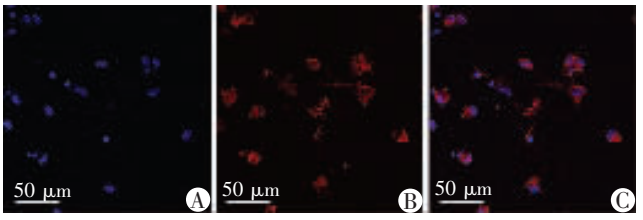
混合胶质细胞培养4~6 d时混合细胞出现分层，下层呈火焰状的星形胶质细胞，胞体较大；上层胞体较小，呈对称双极或三极突起表现的少突胶质前体细胞(OPCs)(图1A)。6~10 d分层更加明显，下层星形胶质细胞逐渐融合成片铺满培养瓶瓶底，星形胶质细胞层上可见较多OPCs散在或成簇分布(图1B)。混合胶质细胞经两次分离振荡后去除小胶质细胞和星形

胶质细胞，纯化出 OPCs（图 1C），加入少突胶质前体细胞培养基培养 2 d 后，免疫荧光染色后经鉴定 OPCs 特异性抗原 NG2 阳性细胞占细胞总数 90% 以上（图 2）。



A：混合细胞培养 4～6 d（×200）；B：混合细胞培养 6～10 d（×200）；C：纯化后 OPCs 细胞（×400）

图 1　倒置显微镜下观察 OPCs 生长变化情况



A：DAPI 染色；B：NG2 染色；C：重叠

图 2　OPCs 特异性抗原 NG2 鉴定 OPCs 纯度

2.2　VEGF 对 OPCs 增殖的影响

不同浓度 VEGF 作用 OPCs 48 h 后使用酶标仪检测，发现 D(490) 值均升高。50、100、200 ng/ml 组与 PBS 空白对照组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。随着 VEGF 浓度增高，各组细胞增殖率逐渐升高。提示 VEGF 对 OPCs 的增殖促进作用具有一定的浓度依赖性（表 1）。

表 1　不同浓度 VEGF 对体外 OPCs 增殖的影响（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	D(490) 值	增殖率(%)
空白对照组	0.457 ± 0.020	–
VEGF 50 ng/ml	0.487 ± 0.011[a]	107 ± 2
100 ng/ml	0.568 ± 0.018[ab]	124 ± 2
200 ng/ml	0.647 ± 0.060[abc]	142 ± 7

a：$P<0.05$，与空白对照组比较；b：$P<0.05$，与 VEGF 50 ng/ml 组比较；c：$P<0.05$，与 VEGF 100 ng/ml 组比较

2.3　加用 γ-分泌酶抑制剂 DAPT 后 OPCs 增殖变化情况

继续培养 48 h 发现 VEGF + DAPT 处理组与 VEGF 单独处理组相比，OPCs 的体外增殖受到明显的抑制（$P<0.05$），VEGF + DAPT 处理组与空白对照组相比无明显差别（$P>0.05$，表 2）。

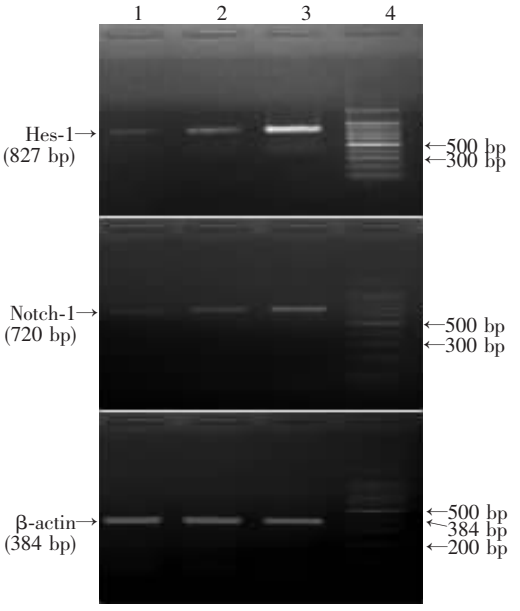
表 2　加用 γ-分泌酶抑制剂 DAPT 后 100 ng/ml VEGF 对 OPCs 增殖作用（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	D(490) 值	增殖率(%)
空白对照组	0.437 ± 0.026	–
VEGF + DAPT	0.449 ± 0.016	103 ± 4
VEGF	0.536 ± 0.031[a]	123 ± 4

a：$P<0.05$，与 VEGF + DAPT 处理组、空白对照组比较

2.4　PR-PCR 检测

Notch-1、Hes-1 及 β-actin 基因 RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，分别在 720、827、384 bp 处可见一清晰条带。与空白对照组相比，100 ng/ml VEGF 处理 OPCs 后 Notch-1、Hes-1 的基因表达明显增高，加入 50 μmol/ml γ-分泌酶抑制剂处理后 Notch-1、Hes-1 的基因表达受到抑制（图 3）。表明 VEGF 影响 OPCs 中 Notch 信号通道 Notch-1、Hes-1 基因水平的表达变化，加入 γ-分泌酶抑制剂后这两种蛋白的基因表达受到了抑制。

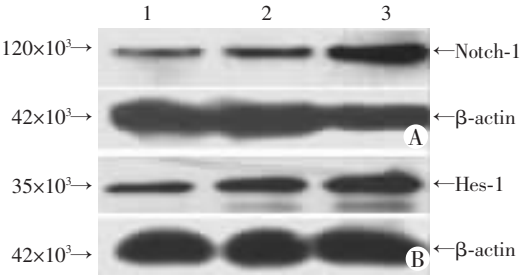


1：空白对照组；2：γ-分泌酶抑制剂处理组；3：VEGF 单独处理组；4：标准

图 3　RT-PCR 检测 OPCs 中 Notch-1 和 Hes-1 mRNA 的表达

2.5　Western blot 检测

100 ng/ml VEGF 处理 OPCs 后 Notch-1、Hes-1 的蛋白表达（0.15 ± 0.02，0.37 ± 0.08）与对照组（0.06 ± 0.02，0.11 ± 0.02）比明显增高（$P<0.05$，图 4），加入 50 μmol/ml γ-分泌酶抑制剂 DAPT 处理后 Notch-1、Hes-1 的蛋白表达（0.08 ± 0.01，0.23 ± 0.05）下降。显示 VEGF 能够影响 OPCs 中 Notch 信号通道相关蛋白的表达变化，γ-分泌酶抑制剂处理后相关蛋白变化受到抑制。



1：空白对照组；2：γ-分泌酶抑制剂处理组；3：VEGF 单独处理组

图 4　Western blot 检测 OPCs 中 Notch-1（A）及 Hes-1（B）蛋白的表达

3　讨论

近年来缺血性脑血管病已逐渐成为危害人类生命健康的主要疾病之一，但是当前对于缺血性脑损伤的

治疗仍然不能令人满意。目前缺血性脑损伤的治疗方法主要是通过药物等手段增强机体对损伤的自身修复能力。缺血性脑损伤的主要病理表现是缺血缺氧导致的脑细胞死亡和白质的脱髓鞘损伤。少突胶质前体细胞(OPCs)是脑内一类分布广泛的特殊胶质前体细胞,它能够根据微环境不同进行自我更新或分化为少突胶质细胞、星形胶质细胞甚至神经元。文献[5]报道脑损伤后局部OPCs反应性增殖,为深入研究急性脑缺血损伤提供了帮助,但是脑损伤后仅靠机体自身OPCs反应性增殖是远远不足的。本研究试图发现某种可以直接促进脑内OPCs增殖的方法来为缺血缺氧、脱髓鞘等脑损伤的治疗提供一种新的思路。

有研究发现在中枢神经系统中VEGF除了具有促脑血管生成和神经营养作用外,还对神经干细胞、神经前体细胞,甚至胶质细胞的增殖分化有着直接作用。Sun等[6]通过上调或下调幼生大鼠体内VEGF表达的方法证实VEGF参与促进神经干细胞增殖和分化。Kim等[7]发现将分泌VEGF的人类永生神经干细胞系F3细胞移植入脊髓损伤后大鼠体内能促进胶质前体细胞增殖。这些在体动物实验从生理发育或病理损伤角度阐述了体内VEGF与神经干细胞之间的关系,但均未系统阐述VEGF对OPCs的具体作用。本课题前期研究发现在大鼠脑缺血后各个时相点,NG2和VEGF染色双阳性细胞均表现为增多趋势,使用VEGF拮抗剂贝伐单抗后双阳性细胞都明显减少[4],提示VEGF可能与OPCs增殖有关。本研究利用不同浓度VEGF体外直接刺激OPCs的方法,明确观察到VEGF对OPCs的促增殖作用,而且发现这种促增殖作用具有一定的浓度依赖性。实验结果进一步阐明了VEGF对OPCs的促增值作用。

为了研究VEGF对OPCs促增殖作用的相关机制,我们使用Notch信号通路的特异阻断剂:γ-分泌酶阻滞剂DAPT。DAPT能够特异性阻断Notch-1蛋白及其下游Hes-1蛋白的表达。Notch信号通路是广泛存在于动物体内的重要信号传导通路,涉及多种细胞的增殖和分化活动,尤其在中枢神经系统发生发育和损伤后修复过程中具有重要意义[8]。在少突胶质系发育过程中,Notch信号起到抑制神经干细胞或前体细胞向少突胶质细胞方向发育,维持神经前体细胞自我更新的作用。近年来多项研究将重点放在了VEGF对脑损伤后神经前体细胞促增殖迁移及抗凋亡作用上,而我们认为应该进一步明确VEGF对神经前体细胞促增殖作用及其发生机制,这样才能更好地研究其在损伤后的作用。因此本实验采用了体外VEGF直接刺激OPCs的实验方案,结果发现VEGF处理时OPCs增殖率增高且同时Notch-1、Hes-1蛋白表达升高,而加入γ-分泌酶抑制剂后OPCs的增殖率明显下降且Notch-1、Hes-1蛋白表达明显下降。这些结果将VEGF对OPCs促增殖作用与Notch信号通路的相关蛋白关联在一起,OPCs的增殖可能与Notch信号通路蛋白表达有关。这一点与Sun等[9]的研究结果相吻合,他们采用基因芯片技术发现Notch信号通路参与VEGF促进神经干细胞增殖分化过程。

综上所述,OPCs广泛存在于发育及成熟的中枢神经系统中,对中枢神经系统损伤能迅速做出反应。研究发现除针刺、脊髓半切伤外,缺血、兴奋性中毒实验诱导的脱髓鞘等中均可出现NG2阳性的OPCs增殖反应[10]。本研究在体外环境下观察到VEGF能促进OPCs的增殖,其增殖过程与Notch信号通路Notch-1、Hes-1蛋白相关,进一步明确了VEGF对OPCs的促增殖作用,为研究大脑损伤的早期修复打下了一定基础。

参考文献:

[1] Wilson H C, Scolding N J, Raine C S. Co-expression of PDGF alpha receptor and NG2 by oligodendrocyte precursors in human CNS and multiple sclerosis lesions[J]. J Neuroimmunol, 2006, 176(1/2): 162-173.

[2] Pivonkova H, Benesova J, Butenko O, *et al*. Impact of global cerebral ischemia on K^+ channel expression and membrane properties of glial cells in the rat hippocampus[J]. Neurochem Int, 2010, 57(7): 783-794.

[3] Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential[J]. Neurosignals, 2005, 14(5): 207-221.

[4] 焦岩,胡俊,范沁林,等. 大鼠脑缺血血管内皮生长因子与NG2细胞增殖关系的初步研究[J]. 第三军医大学学报,2010, 32(2): 123-126.

[5] Staugaitis S M, Trapp B D. NG2-positive glia in the human central nervous system[J]. Neuron Glia Biol, 2009, 5(/4): 35-44.

[6] Sun J, Sha B, Zhou W, *et al*. VEGF-mediated angiogenesis stimulates neural stem cell proliferation and differentiation in the premature brain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(1): 146-152.

[7] Kim H M, Hwang D H, Lee J E, *et al*. *Ex vivo* VEGF delivery by neural stem cells enhances proliferation of glial progenitors, angiogenesis, and tissue sparing after spinal cord injury[J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4987.

[8] Ehebauer M, Hayward P, Arias A M. Notch, a universal arbiter of cell fate decisions[J]. Science, 2006, 314(5804): 1414-1415.

[9] Sun J, Zhou W, Ma D, *et al*. Endothelial cells promote neural stem cell proliferation and differentiation associated with VEGF activated Notch and Pten signaling[J]. Dev Dyn, 2010, 239(9): 2345-2353.

[10] Rhodes K E, Raivich G, Fawcett J W. The injury response of oligodendrocyte precursor cells is induced by platelets, macrophages and inflammation-associated cytokines[J]. Neuroscience, 2006, 140(1): 87-100.

(收稿 2010-10-23 修回 2011-01-22)
(编辑 龙 亮)