论著

文章编号:1000-5404(2013)04-0280-04

白藜芦醇诱导大鼠骨髓基质细胞的神经元样细胞分化伴Shh信号激活

黄家贵,沈长波,刘 舒,徐 兰,杨 琴 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[摘要] **目的** 研究Sonic Hedgehog(Shh)信号在白藜芦醇诱导大鼠骨髓基质细胞(marrow stromal cells,MSCs)分化为神经元样细胞中的作用。**方法** 采用全骨髓贴壁法分离培养MSCs。MSCs分为3组,白藜芦醇诱导组:用含白藜芦醇的无血清DMEM/F12诱导MSCs分化;对照组:用无血清DMEM/F12诱导MSCs分化;正常组:不做诱导处理。倒置显微镜下观察细胞形态,免疫荧光法、免疫印迹法检测NSE、MAP-2、GFAP、Smo和Gli1蛋白的表达和移位。**结果** 白藜芦醇诱导后细胞胞体收缩,伸出长突起,类似神经元。免疫荧光显示正常组及对照组MSCs轻度表达神经元NSE蛋白,白藜芦醇诱导组MSCs NSE、MAP-2阳性,但诱导前后细胞始终未表达胶质细胞GFAP蛋白。免疫荧光显示,MSCs具有初级纤毛,并表达Smo和Gli1。白藜芦醇诱导组Smo从细胞质进入初级纤毛,Gli1从细胞质进入细胞核,同时,Smo、Gli1蛋白的表达增加($P<0.01$)。对照组则无明显变化。**结论** 白藜芦醇能诱导MSCs分化为神经元样细胞;此过程中Shh信号通路被激活,推测Shh信号在MSCs分化过程中可能发挥着重要作用。

[关键词] 白藜芦醇;Shh信号;骨髓基质细胞;神经元样细胞;细胞分化

[中图法分类号] R282.71;R322.8;R329.26 [文献标志码] A

Resveratrol induces differentiation of rat bone marrow stromal cells into neuron-like cells *via* Shh signaling activation *in vitro*

Huang Jiagui, Shen Changbo, Liu Shu, Xu Lan, Yang Qin (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To determine the role of sonic hedgehog (Shh) signaling in the differentiation of rat bone marrow stromal cells (MSCs) into neuron-like cells induced by resveratrol *in vitro*. Methods The rat MSCs were isolated and cultured by whole bone marrow adherent culture, and then induced to differentiate into neuron-like cells with serum-free DMEM/F12 medium containing resveratrol. Cell morphology was observed with invert microscopy. Indirect immunofluorescence assay and Western blotting were applied to detect the protein expression of NSE, MAP-2, Smo and Gli1, and the translocation of Smo and Gli1. Results Almost all MSCs and the control cells were poor positive for NSE. The differentiated cells showed neuron-like morphology with the cell body shrinkage and extend long processes after by resveratrol induction, and were positive to NSE and MAP-2 but negative to GFAP. Immunofluorescence assay confirmed that MSCs had primary cilia, and expressed Smo and Gli1 in the cytoplasm. After resveratrol induction, Smo entered into the primary cilia from the cytoplasm while Gli1 translocated to the nucleus from the cytoplasm. Meanwhile, Western blot analysis indicated that the expression of Smo and Gli1 protein was gradually enhanced with the prolongation of induction ($P<0.01$). However, the control cells had no such marked changes. Conclusion Resveratrol induces MSCs to differentiate into neuron-like cells. Moreover, Shh signaling pathway is activated during induced process, suggesting that Shh signaling may play an important role in the differentiation.

[**Key words**] resveratrol;Shh signaling;bone marrow stromal cell;neuron-like cells; cell differentiation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071119) and the Foundation of Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-359). Corresponding author: Yang Qin, Tel: 86-23-89012008, E-mail: xyqh200@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071119);重庆市卫生局科研基金(2009-2-359)

[通信作者] 杨 琴,E-mail:xyqh200@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121219.0854.003.html(2012-12-19)

骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)是一类具有自我复制能力的多潜能细胞。在一定条件下,它可以分化成多种功能细胞,包括可诱导分化为神经干细胞,神经干细胞又可以分化为神经元、胶质细胞和少量的少突细胞[1]。目前,用抗氧化剂[2]、生长因子诱导以及通过共培养[3]等方法使MSCs分化为神经元样细胞,但其分化机制尚需完善。

白藜芦醇是多酚化合物,广泛存在于葡萄、虎杖、花生等多种植物中,具有抗肿瘤、抗氧化、清除体内自由基、增强机体免疫以及发挥抗菌、抗病等作用,也有诱导肿瘤细胞分化作用[4],具有心脑保护作用。

Sonic hedgehog(Shh)是存在于初级纤毛上的信号通路之一[5]。研究发现Shh信号在中枢神经系统的发育中起多重作用[6]。它参与调节胚胎、出生后及成体神经干细胞的增殖和分化;维持大脑神经前体细胞生存的微环境。而且,在Shh信号通路的各个阶段激活,Shh信号都可以促进神经干细胞的增殖,从而增加相应的神经细胞。Shh信号在MSCs分化为神经细胞的过程中是否也有类似作用,目前尚不清楚。因此本实验拟观察Shh信号在白藜芦醇诱导MSCs分化为神经元样细胞中的作用,旨在为干细胞移植领域的应用提供部分依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

20只健康4周龄SD大鼠,雌雄不限,体质量100 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。动物合格证号:SCXK(渝)20070001。DMEM/F12培养基购自HyClone公司,胎牛血清、B27添加剂购自Gibco公司,碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)购自Peprotech公司,白藜芦醇(纯度99%)购自陕西慈缘生物有限公司,鼠抗Ac-Tu单克隆抗体购自Sigma公司,兔抗Smo多克隆抗体购自Abcam公司,兔抗Gli1多克隆抗体购自Santa Cruz公司,兔抗NSE、MAP-2、GFAP多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓基质细胞的培养 参考文献[7]方法,无菌条件下取出大鼠的双侧股骨和胫骨,剔除附着于骨上的其他组织,将骨从中间剪断,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基液冲洗骨髓腔2~3次,吸管吹打制成单细胞悬液,接种于培养瓶,37 ℃ 5% CO_2孵箱原代培养,24 h后去除未贴壁细胞和杂质,更换培养液,以后每3天换液1次,贴壁细胞85%以上融合时,用含0.25%胰酶消化细胞,并按1∶2或1∶3进行传代培养,取第3~4代状态良好的细胞进行实验。

1.2.2 白藜芦醇诱导骨髓基质细胞向神经元样细胞分化的实验 参考文献[7]方法,将第3代的MSCs达到50%融合后,除去DMEM/F12完全培养基,PBS液清洗3次。白藜芦醇诱导组加入预诱导液(DMEM/F12培养基,10 μg/L bFGF)培养24 h,换用诱导液(DMEM/F12培养基,15 μmol/L白藜芦醇)诱导6 h,再换用维持液(DMEM/F12培养基,15 μmol/L白藜芦醇,10 μg/L bFGF,2% B27)继续维持至72 h;对照组预诱导同白藜芦醇诱导组,诱导时仅加入DMEM/F12培养基诱导6 h,换用维持液(DMEM/F12培养基,10 μg/L bFGF,2% B27)继续维持72 h;正常组不做任何处理,继续给予含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基液培养。各组分别于诱导前、诱导后2、6、24、72 h吸去培养液,PBS缓冲液冲洗3次,将细胞用于各种检测。

1.2.3 免疫细胞化学染色 PBS洗涤3次,每次5 min;4%多聚甲醛室温下固定15 min,PBS洗涤3次;0.3% Triton X-100室温下破膜5~10 min,再用PBS洗涤3次,每次5 min;10%山羊血清封闭30 min,吸去血清,不洗;加入一抗4 ℃过夜,对照组用PBS液代替一抗;PBS缓冲液洗涤3次,加入荧光标记二抗,室温孵育1 h,PBS洗涤3次,用DAPI或PI染核2 min,PBS洗涤3次,50%甘油封片,荧光显微镜观察拍照。

1.2.4 Western blot 收取细胞,提细胞后蛋白或核蛋白。Bradford法检测蛋白浓度,1∶4加入5×Loading buffer 100 ℃煮沸10 min。取30~40 μg蛋白用SDS-PAGE分离后电转移至PVDF膜上。取出膜用脱脂奶粉封闭1 h,然后置于杂交袋中,加入一抗4 ℃孵育过夜。TBST漂洗10 min×3次,HRP标记的二抗37 ℃孵育1 h,TBST漂洗10 min×3次。PVDF膜上覆盖足量ECL发光试剂,化学发光显色,照相。以Quantity One4.6.2图像分析软件对图像进行分析,以目的条带与β-actin光密度的比值作为蛋白表达相对含量。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 白藜芦醇诱导MSCs分化为神经元样细胞

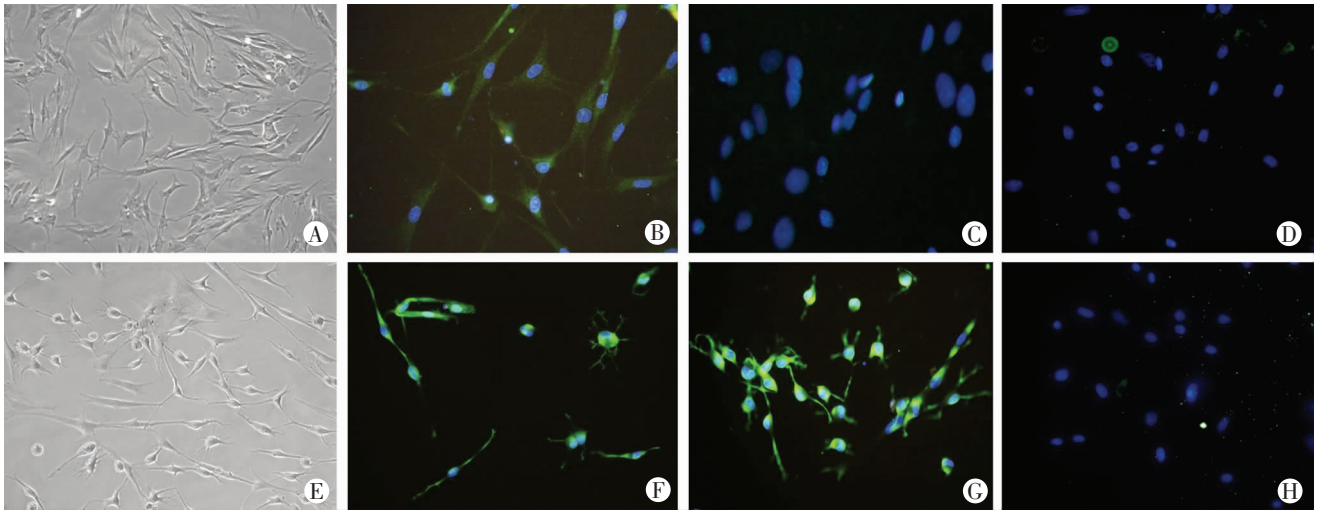
正常培养的MSCs呈梭形,少部分呈多角形,折光性强。白藜芦醇诱导后6 h,细胞质向细胞核收缩,胞体折光性增强,伪足形成细长突起,相邻突起接触连接成网状,随着诱导时间增加,发生变化的细胞数量达到60%,而对照组中细胞无明显形态变化。免疫荧光证实,正常组及对照组细胞轻度表达神经元NSE蛋白,白藜芦醇诱导组细胞表达神经元NSE、MAP-2蛋白,但是诱导前后细胞始终未表达胶质细胞GFAP蛋白(图1)。

2.2 诱导分化过程中Smo和Gli1蛋白的表达

Western blot检测结果显示,未诱导的MSCs有Shh信号通路成分Smo和Gli1蛋白的表达。白藜芦醇诱导后,Smo及Gli1蛋白表达较对照组和正常组增加,且随着诱导时间的延长其表达逐渐增加(与对照组比较,$P<0.01$),见图2。

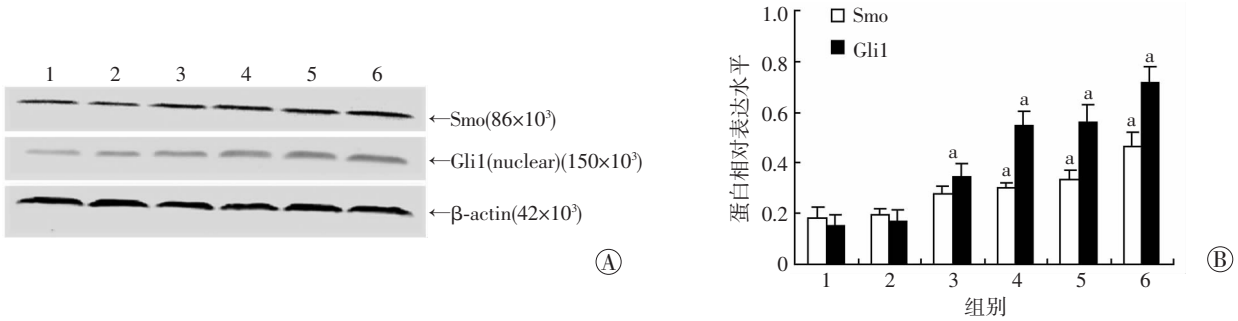
2.3 白藜芦醇对Smo和Gli1蛋白定位的影响

Shh信号通路的激活表现为效应蛋白Smo从细胞质进入初级纤毛,转录因子Gli家族由细胞质转移到细胞核,进而激活相应的靶基因。免疫荧光显示,MSCs存在初级纤毛。在正常组及对照组,Smo和Gli1蛋白主要表达于细细胞质。白藜芦醇诱导后,Smo蛋白从细胞质进入初级纤毛,同时Gli1蛋白转移到细胞核(图3、4)。



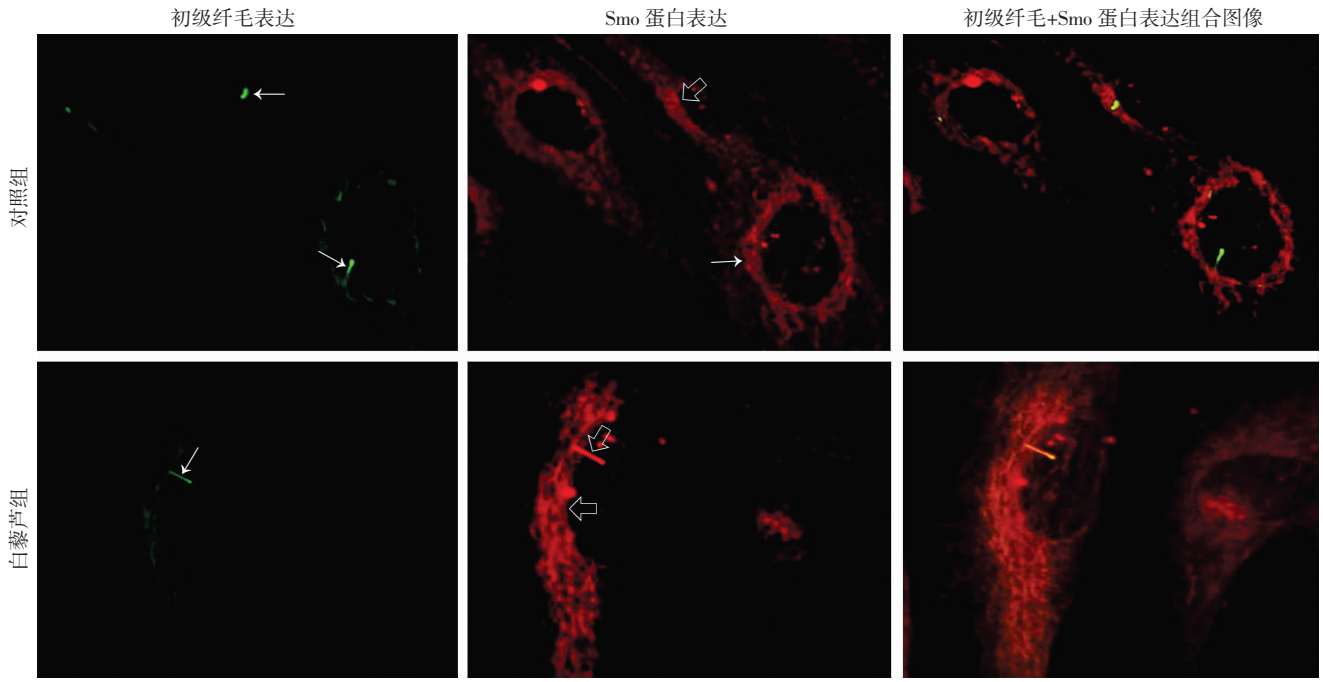
A：对照组细胞形态(倒置显微镜 ×100)；B：对照组 NSE(FITC DAPI ×200)；C：对照组 MAP-2(FITC DAPI ×200)；D：对照组 GFAP(FITC DAPI ×200)；E：白藜芦醇组细胞形态(倒置显微镜 ×100)；F：白藜芦醇组细胞 NSE(FITC DAPI ×200)；G：白藜芦醇组 MAP-2(FITC DAPI ×200)；H：白藜芦醇组 GFAP(FITC DAPI ×200)

图1 白藜芦醇诱导后大鼠骨髓基质细胞形态学变化和神经元标记物的表达



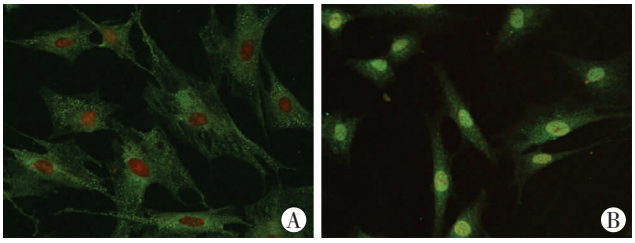
1：正常组；2：对照组；3：白藜芦醇组 2 h；4：白藜芦醇组 6 h；5：白藜芦醇组 24 h；6：白藜芦醇组 72 h；A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果($n=3$, $\bar{x}\pm s$)　a：$P<0.01$，与对照组比较

图2 Western blot 检测白藜芦醇诱导后蛋白 Smo、Gli1 的表达



↑：示初级纤毛表达；⇧：示 Smo 蛋白表达

图3 白藜芦醇诱导后大鼠骨髓基质细胞 Smo 蛋白自细胞质转移至初级纤毛上的观察 (FITC TRITC ×400)



A:对照组;B:白藜芦醇组

图 4 白藜芦醇诱导后大鼠骨髓基质细胞 Gli1 蛋白的核转移
(FITC PI ×400)

3 讨论

骨髓基质细胞在一定条件下可以分化成多种功能细胞,包括可诱导分化为神经元,替换受损的细胞进而促进神经系统的康复[8]。Sanchez-Ramos 等[9]证明生长因子和视黄酸可以诱导 MSCs 分化为神经元样细胞,但以上方法诱导率还有待于提高,以及其细胞毒性,难以用于临床。白藜芦醇具有清除自由基、抗氧化、神经保护、抗炎、抗癌、抗衰老等多种药理活性。研究发现白藜芦醇通过上调核因子 E2-相关因子 2(Nrf-2)基因和蛋白的表达可减轻脑缺血再灌注损伤[10];上调 Wnt 信号通路而促进 MSCs 的成骨分化[11]。本实验以白藜芦醇诱导 MSCs 后,60% 的细胞形态发生变化,类似神经元细胞。NSE 及 MAP-2 为神经元特异的标志蛋白,GFAP 为星形胶质细胞标志蛋白,免疫荧光证实,MSCs 及对照组细胞轻度表达神经元 NSE 蛋白,白藜芦醇诱导后的神经元样细胞 NSE 及 MAP-2 表达阳性,但是诱导前后细胞始终未表达 GFAP 蛋白,说明其不是单纯的细胞形态学改变,而是具有质的变化。对照组细胞形态无变化,而且表达亦无明显变化。

黄芩甙、刺五加、丹参[12]等中药也都可使 MSCs 分化为神经元样细胞,它们都具有抗氧化性,但是否具有某一共同的诱导通路引起了我们的关注。Shh 是 Hedgehog (Hh)家族成员之一,主要介导细胞的增殖、分化,参与神经系统发育、肿瘤形成等生理病理过程。Shh 信号传导通路主要由 Shh 配体、2 个跨膜蛋白质受体 Patched1 (Ptc1) 和 Smoothened (Smo)以及下游的锌指转录因子 Gli 蛋白(Gli1、Gli2 、Gli3)等组成。研究显示 Shh 信号能调节海马神经元的生成[13],决定成人大脑神经干细胞的定位特性[14];调节外周神经系统髓鞘的形成[15]。本实验观察到 MSCs 具有初级纤毛,其位置靠近细胞核,同时在细细胞质表达 Smo 和 Gli1,表明 Shh 信号存在于 MSCs。当白藜芦醇诱导 MSCs 分化为神经元样细胞时,白藜芦醇可能通与初级纤毛上的受体作用,解除 Smo 的被抑制状态,Smo 从细胞质转运到初级纤毛上;进入初级纤毛的 Smo 通过尚不明确的途径使 Gli1 进入细胞核,从而启动和调控相应基因的转录,进而参与 MSCs 的神经分化。本实验中发现 Smo 从细胞质转移到初级纤毛,Gli1 从细胞质转移到细胞核,同时伴随 Smo 和 Gli1 蛋白表达的增加,而对照组 Smo 及 Gli1 仍表达于细胞质,其量也无明显变化,这表明 Shh 信号通路被激活。

本实验结果表明,白藜芦醇可诱导 MSCs 分化为神经元样细胞。在此诱导过程中,Shh 信号通路被激活。据此推测 Shh 信号在 MSCs 分化过程中可能发挥着重要作用。

参考文献:

[1] Yang Q, Mu J, Li Q, *et al*. A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 372(4): 520 - 524.
[2] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, *et al*. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4): 364 - 370.
[3] Ni W F, Yin L H, Lu J, *et al*. *In vitro* neural differentiation of bone marrow stromal cells induced by cocultured olfactory ensheathing cells [J]. Neurosci Lett, 2010, 475(2): 99 - 103.
[4] Wang Q, Li H, Liu N, *et al*. Correlative analyses of notch signaling with resveratrol-induced differentiation and apoptosis of human medulloblastoma cells[J]. Neurosci Lett, 2008, 438(2): 168 - 173.
[5] Rohatgi R, Milenkovic L, Scott M P. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium[J]. Science, 2007, 317(5836): 372 - 376.
[6] Doherty D. Joubert syndrome: insights into brain development, cilium biology, and complex disease[J]. Semin Pediatr Neurol, 2009, 16 (3): 143 - 154.
[7] 杨琴, 谢鹏, 曾志磊, 等. 刺五加注射液体外诱导骨髓基质细胞分化为神经元样细胞的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (15): 1859 - 1865.
[8] Bae J S, Han H S, Youn D H, *et al*. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration[J]. Stem Cells, 2007, 25(5): 1307 - 1316.
[9] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, *et al*. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro[J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247 - 256.
[10] 任俊伟, 杨琴, 范层层, 等. 白藜芦醇减轻脑缺血再灌注损伤及其机制[J]. 第三军医大学学报,2010, 32(24): 2586 - 2590.
[11] Zhou H, Shang L, Li X, *et al*. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(17): 2953 - 2962.
[12] 胡琳燕, 余加林, 李 芳, 等. 丹参诱导骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的突触功能研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31 (2):144 - 147.
[13] Breunig J J, Sarkisian M R, Arellano J I, *et al*. Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(35): 13127 - 13132.
[14] Ihrie R A, Shah J K, Harwell C C, *et al*. Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity [J]. Neuron, 2011, 71(2): 250 - 262.
[15] Yoshimura K, Takeda S. Hedgehog signaling regulates myelination in the peripheral nervous system through primary cilia[J]. Differentiation, 2012, 83(2): S78 - S85.

(**收稿**:2012-10-19;**修回**:2012-12-02)
(编辑 王小寒)