论著

文章编号:1000-5404(2013)22-2430-05

ERK途径可能参与抗坏血酸诱导的神经干细胞向多巴胺能细胞分化

邓小兰[1],晋贞超[1],王 健[2],郑 敏[1] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院干细胞与组织工程研究室,组织学与胚胎学教研室[1];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院神经内科[2])

[摘要] **目的** 探讨抗坏血酸(ascorbic acid,AA)诱导神经干细胞(neural stem cells,NSCs)向多巴胺能神经元方向分化的作用并初步探索其机制。**方法** 从12.5 d胚胎大鼠中脑获得NSCs,培养扩增后分为对照组和分别加入1、10、50、100、200 μmol/L AA处理组,比较NSCs向多巴胺能神经元分化结果;采用免疫细胞化学对NSCs以及分化后神经元进行鉴定和检测,RT-PCR检测酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH)、多巴胺转运子(dopamine transporter,DAT)、SHH、Nurr1、Ptx3 mRNA表达;在AA诱导分化中加入ERK阻断剂PD98059,以探讨ERK通路在分化中的作用。**结果** 获得大量的神经球并且表达nestin强阳性;AA处理组比对照组表现出较强的多巴胺能分化,其中100 μmol/L AA诱导组表达TH和DAT阳性细胞数量比对照组明显增加($P<0.05$),增加30~50倍;AA诱导增加了Nurr1、TH、DAT、SHH mRNA的表达,ERK抑制剂PD98059能抑制AA诱导后Nurr1、TH、DAT mRNA的表达而不影响SHH mRNA表达($P<0.05$)。**结论** 抗坏血酸能诱导神经干细胞分化为多巴胺能神经元,ERK途径可能是AA诱导过程中参与多巴胺能分化的途径之一,Nurr1基因可能参与到ERK途径中或者是其下游基因。

[关键词] 神经干细胞;分化;促分裂原活化蛋白激酶;细胞外信号调节激酶通路;信号转导

[中图法分类号] R322.8;R329.21;R329.26 [文献标志码] A

ERK pathway possibly involved in ascorbic acid-induced neural stem cell differentiation todopaminergic neuron

Deng Xiaolan[1], Jin Zhenchao[1], Wang Jian[2], Zheng Min[1] ([1]Department of Stem Cells and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Science, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the ascorbic acid (AA)-induced differentiation of neural stem cells (NSCs) to dopaminergic neurons and explore the mechanism preliminarily. **Methods** NSCs derived from 12.5 d rat embryo mesencephalon were maintained and amplified. Cells were divided into a control group and AA-induced groups with AA concentration of 1, 10, 50, 100 μmol/L, and 200 μmol/L. The differentiation results of NSCs to dopaminergic neurons in the groups were compared. Immunocytochemistry was carried out to identify NSCs and cell differentiation. The mRNA expression levels of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine transporter (DAT), SHH, Nurr1, and Ptx3 were tested by RT-PCR. PD98059, an ERK inhibitor, was added during AA-induced differentiation to study the ERK pathway's role. **Results** A large number of nestin-positive neurospheres were obtained. Comparing with the control, AA treatment led to a higher degree of dopaminergic differentiation. TH- and DAT-positive cells were increased by about 30 – 50 folds in the 100 μmol/L AA group as compared to the control group ($P<0.05$). The induction of AA enhanced the mRNA expression of Nurr1, SHH, TH, and DAT. PD98059 could block the mRNA expression of Nurr1, TH, and DAT but not affect the expression of SHH mRNA after AA induction ($P<0.05$). **Conclusion** AA can induce differentiation of NSCs into dopaminergic neurons. ERK cascade may be one of the pathways involved in AA-induced

[基金项目] 国家自然科学基金(31100985);重庆市自然科学基金(CSTC2010BB5096)

[通信作者] 郑 敏,E-mail:zmdwj625@gmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130912.1525.005.html(2013-09-12)

dopaminergic differentiation. Nurr1 gene may be the downstream gene of ERK pathway or involved in ERK pathway.

[**Key words**] neural stem cells; differentiation; mitogen-activated protein kinase; extracellular signal-regulated kinase pathway; signal transduction

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100985) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5096). Corresponding author: Zheng Min, E-mail: zmdwj625@gmail.com

随着干细胞生物学研究的不断发展,干细胞应用于神经退行性疾病被证明是一种新的、可行的、具有很大潜力的治疗方式。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)用于治疗帕金森病主要是通过细胞替代和营养支持两种方式实现。细胞替代治疗是帕金森病的理想策略[1],但这种方法需要足够具有特殊功能的多巴胺能神经元。NSCs作为一种多能干细胞,在特定条件下便可分化为多巴胺能神经元,因此是可供选择的良好细胞来源。然而,可靠的诱导NSCs成为多巴胺能神经元的方式还远远不能让人满意。如果我们能寻找到一种有效的诱导方式并阐明其机制将为干细胞移植提供突破性的进展。研究结果发现,多种因素能够影响干细胞的分化过程[2]。由于神经元中特殊的运输系统的存在,脑中抗坏血酸(ascorbic acid, AA)水平比其他任何器官都高,其中在前脑(包括多巴胺末端较丰富的新纹状体)中尤其高,在纹状体中黑质控制着AA的释放[3]。研究发现AA不仅具有神经保护和抗氧化作用[4],还能增加胚胎干细胞向神经方向的分化[5];影响模型动物体内、体外神经干细胞的分化[3]。AA在脑中的高含量提示AA很可能参与了多巴胺能神经元的发生。本研究主要关注AA诱导多巴胺分化的效果和分化过程中的相关基因表达,同时用ERK抑制剂——PD98059初步分析了分化可能的信号通路。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

Wistar孕鼠由重庆医科大学实验动物中心提供;培养基和生长因子(DMEM/F12、B27、EGF、bFGF)购自Gibco公司;小鼠抗大鼠nestin、多巴胺转运子(dopamine transporter, DAT)购自Chemicon公司;兔抗大鼠酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)抗体、AA购自Sigma公司;RNA提取和逆转录试剂购自Promega公司。北航CM-2000B图像分析系统,美国GelDoc XR+凝胶成像分析系统(Quantity One软件)由本校生命科学院提供。

1.2 神经干细胞培养

从12.5 d胎鼠分离获得中脑,切成小块后用0.125%胰酶消化30 min后获得单细胞悬液,用无血清培养基[DMEM/F12、2% B27、青霉素60 μg/mL、链霉素100 μg/mL、bFGF (20 ng/mL)、EGF(20 ng/mL)]培养。细胞以4×10^5/mL的起始浓度接种在25 cm培养瓶中待长成球,每3~4天换1次培养液。每7~8天用胰酶消化后传代培养。免疫细胞化学检测神经球nestin表达以及分化为神经元的能力。

1.3 AA处理

在24孔板中放入盖玻片,以多聚赖氨酸进行包被,NSCs以5×10^4/mL浓度接种于孔板中。2~3 d后改培养条件为分化培养基,将细胞分为对照组(D/F、B27)和AA处理组(D/F、B27、不同浓度的AA:1、10、50、100、200 μmol/L),第3天半量换液,第6天分析不同组的细胞多巴胺能神经元表型标记TH和DAT。

1.4 分化后基因表达

NSCs分为不同条件培养组。对照组:在含有DMEM/F12、2% B27、EGF、bFGF条件下培养;血清诱导组:在5%血清、DMEM/F12、2% B27、条件下培养;AA处理组:在DMEM/F12、2% B27、100 μmol/L AA条件下培养。培养基第3天半量换液,第6天收集细胞分析几个可能的相关基因表达。酪氨酸羟化酶、多巴胺转运子、SHH、Ptx3、Nurr1 mRNA的表达用RT-PCR检测。

1.5 ERK阻断剂PD98059的作用

为了检测ERK通路是否被AA激活,特定ERK抑制剂PD98059被加入到100 μmol/L AA诱导培养液中,使其终浓度为25 μmol/L[6],培养基3 d后半量换液,6 d后收集细胞分析基因表达。

1.6 免疫细胞化学检测

细胞以4%多聚甲醛固定后0.3%的过氧化氢处理30 min,以消除内源性过氧化物酶,5%山羊血清封闭后加入一抗以37 ℃孵育2 h或4 ℃过夜。一抗稀释浓度如下:TH(1∶500)、DAT(1∶1 000)、nestin(1∶200)。PBS洗3次每次5 min,加生物素标记的二抗工作液37 ℃孵育30 min,PBS清洗后加辣根酶标记的链霉卵白素工作液37 ℃ 30 min,DAB染色,PBS清洗后封片观察。nestin表达的检测:一抗后加入荧光二抗孵育30 min,用荧光显微镜观察结果。

1.7 RT-PCR分析

每个诱导组收集2×10^6个细胞用于检测相关基因的mRNA表达。细胞用PBS洗涤后Trizol溶解,总细胞mRNA提取、纯化按照生产商的说明书操作。MMLV试剂盒(Promega)用于逆转录,引物用于扩增目标cDNA。PCR在94 ℃,30 s;52 ℃

(TH)/55 ℃(DAT、Nurr1、SHH、Ptx3),30 s;72 ℃,30 s 条件下进行32个循环。使用 GENEAMP System 2400 PCR 仪进行操作。引物序列见表1。

表1 各基因引物序列表

基因	引物序列	产物大小(bp)
TH	上游:5′-CAGAGTCTCATCGAGGATGC-3′	376
	下游:5′-CTTGTCCTCTCTGGCACTGC-3′	
DAT	上游:5′-TGCTGGTCATTGTTCTGCTC-3′	202
	下游:5′-ATCCACACAGATGCCTCACA-3′	
Nurr1	上游:5′-CTTGTACCAAATGCCCCTG-3′	196
	下游:5′-CATCGGGCTATGCTGTACC-3′	
SHH	上游:5′-AAAAGCTGACCCCTTTAGCC-3′	198
	下游:5′-TGCACCTCTGAGTCATCAGC-3′	
Ptx3	上游:5′-GAGCACAGTGACTCGGAGAA-3′	201
	下游:5′-CTCAGTGAGGTTGGTCCACA-3′	
α-tublin	上游:5′-CACCCGTCTTCAGGGCTTCTTGGTTT-3′	450
	下游:5′-CATTTCACCATCTGGTTGGCTGGCTC-3′	

1.8 统计学分析

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

2 结果

2.1 体外 NSCs 增殖

原代培养中少量细胞能迅速分裂,形成小的细胞球并不断增大。7 d 后可见到许多由数百个细胞组成的球团,球团表现出规则的形状(图1)。

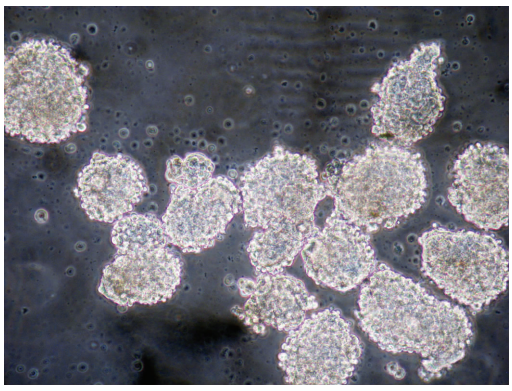


图1 倒置相差显微镜观察无血清培养基中增殖的神经球 (×100)

15代后细胞总数增加 2.4×10^4 倍。对培养获得的神经球做 nestin(干祖细胞表达的中间丝状体蛋白)表达的检测。结果:神经球细胞质几乎都能见到表达 nestin 红色荧光阳性,细胞核呈 DAPI 蓝色荧光。见图2。

2.2 AA 在 NSCs 分化中的作用

NSCs 经血清诱导分化后 TH^+ 细胞不多,而在用 AA 处理后,TH^+ 细胞数量出现了变化。通过图像分析软件进行处理,发现与对照组比较,1 μmol/L AA 组未表现出明显的区别,10 μmol/L组约增加5倍,100 μmol/L AA 组阳性细胞数量约增加30倍(图3)。当以 100 μmol/L 以上浓度 AA 处理时,随浓度增加 TH^+ 细胞比值不再改变。此外,DAT 对照组几乎无阳性细胞,AA 处理后 DAT^+ 细胞数量有明显增加(图3)。与对照组比较,100 μmol/L AA 组差异有统计学意义($P<0.05$)。

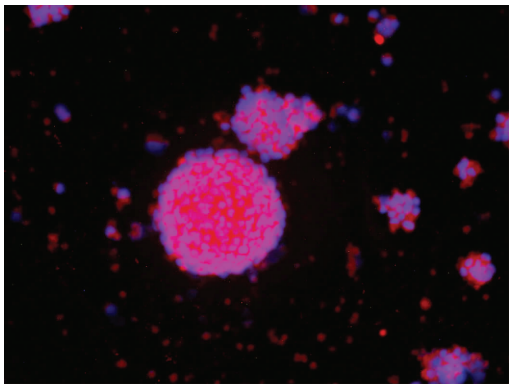
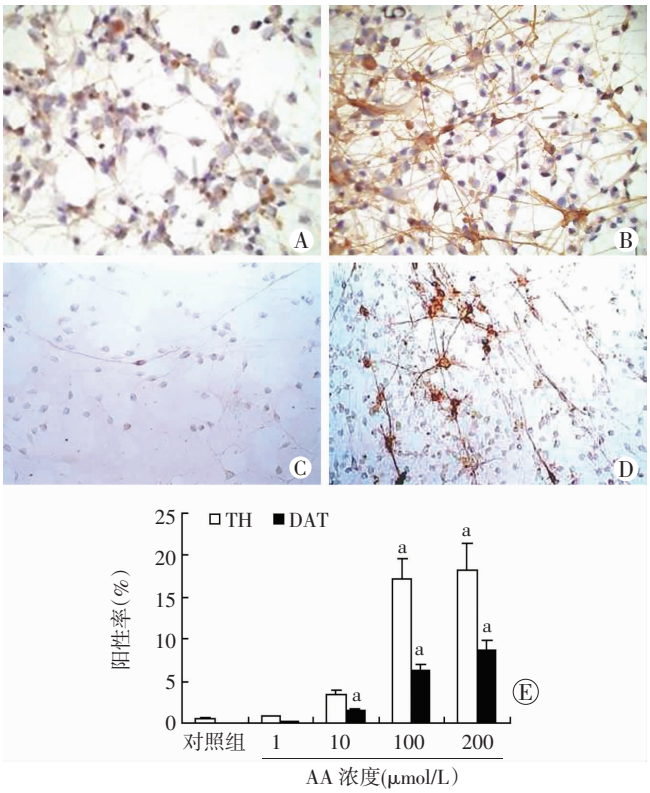


图2 免疫荧光观察神经球 nestin 表达 (荧光显微镜 ×400)



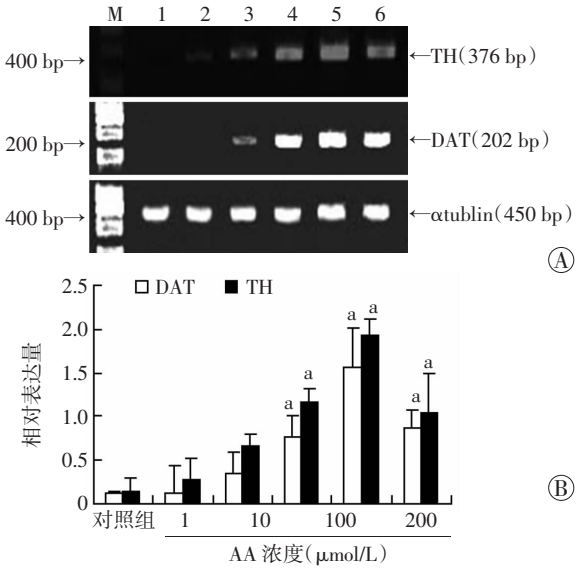
A:对照组 TH^+(×200);B:AA 100 μmol/L 组 TH^+(×200);C:对照组 DAT^+(×100);D:AA 100 μmol/L 组 DAT^+(×100);E:不同浓度 AA 诱导后 TH 和 DAT 阳性表达率 a:$P<0.05$,与对照组比较

图3 免疫细胞化学检测 AA 诱导后 TH 和 DAT 的阳性表达

2.3 分化后基因表达

RNA 提取和完整性确认后,检测 AA 诱导分化后 TH 和 DAT mRNA 表达水平。通过凝胶成像系统进行分析 mRNA 表达的灰度值,结果与免疫组化数据一致,AA 能够明显增加 TH 和 DAT

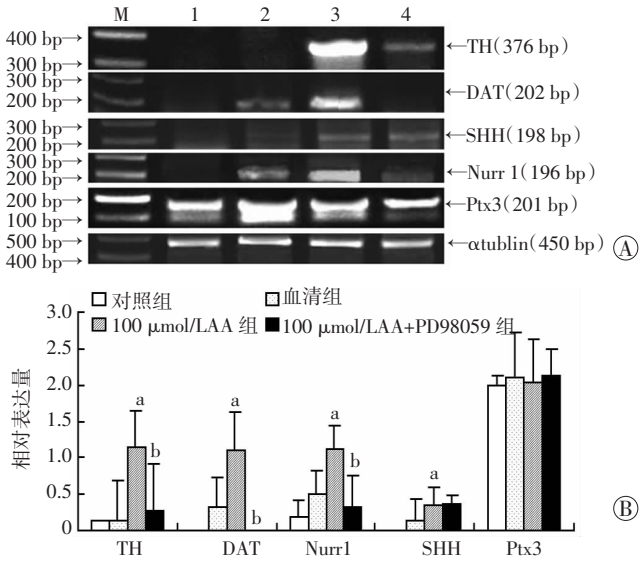
mRNA 表达水平(图 4)。统计分析结果表明:与对照组比较,50、100、200 μmol/L AA 组差异都有统计学意义($P<0.05$)。



A:电泳图　M:标准;1:对照组;2:1 μmol/L AA 组;3:10 μmol/L AA 组;4:50 μmol/L AA 组;5:100 μmol/L AA 组;6:200 μmol/L AA 组;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4　RT-PCR 检测 AA 诱导后 TH、DAT mRNA 的表达

来自中脑的 NSCs 表达 Ptx3 和少量的 Nurr1 而无 TH、DAT、SHH 表达。血清和 AA 诱导都不能影响 Ptx3 的表达,5% 血清诱导使 DAT 有表达并加强了 Nurr1 的表达而不影响 TH 和 SHH。100 μmol/L AA 处理后 Nurr1、TH、DAT 和 SHH 表达较血清和对照组显著增加($P<0.05$, 图 5)。



A:电泳图　M:标准;1:对照组;2:血清组;3:100 μmol/L AA 组;4:100 μmol/L AA + PD98059 组;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$, 与 100 μmol/L AA 组比较

图 5　RT-PCR 检测 AA 诱导分化及加入抑制剂 PD98059 后 TH、DAT、SHH、Nurr1、Ptx3 mRNA 的表达

2.4　PD98059 处理结果

加入到培养基中后,许多细胞出现死亡。收集存活细胞进行 PCR 检测,发现 AA 诱导的 TH、DAT mRNA 表达完全被抑制。PD98059 处理后 Nurr1 表达下降,而 SHH 表达几乎无变化(图 5)。统计分析结果表明:与对照组比较,除了 SHH 外,100 μmol/L AA 组差异都有统计学意义($P<0.05$);与 100 μmol/L AA 组比较,AA + PD98059 组中 TH、DAT、Nurr1 差异都有统计学意义($P<0.05$)。

3　讨论

细胞移植治疗神经退行性疾病具有广阔的前景,已成为未来这类疾病治疗的新策略[7]。NSCs 是多能干细胞,能分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞。干细胞移植可以帮助克服神经组织本身的缺陷,代替失去的元素,并能分泌一些有用的因子,提供宿主细胞营养支持。同时,由于血脑屏障的存在,机体几乎将不存在排斥异己的免疫反应,可以说它是一种理想的种子细胞[8]。

怎样才能使 NSCs 具有我们所需的功能? 这是我们所要解决的问题。调节 NSCs 让其向特定的细胞表型分化对于其临床应用是非常重要的。在胚胎后期,不同部位的神经干细胞并不是都是全能的,有神经元分化的特异性。余小强等[9]认为在中脑本身就存在相对更为接近多巴胺神经元的分化晚期的神经干细胞,因此,选择中脑来源的神经干细胞,更有利于诱导分化出多巴胺能神经元。移植的神经祖细胞受到体内微环境信号的调控后能分化为神经元,但是 NSCs 的存活率以及分化为功能性神经元的概率却很小。体内微环境的调控可能是一方面的,而在移植前探索诱导分化对于增加细胞体内的存活和分化可能更重要[10]。本研究旨在探索体外将 NSCs 诱导为多巴胺能神经元的最适方法及其机制,以特定诱导剂 AA 和血清做比较,结果显示 AA 的诱导效果明显优于血清,说明了 AA 可以作为一种定向的体外诱导剂用于 NSCs 的诱导。本研究结果表明 0 ~ 100 μmol/L AA 作用后阳性率呈进行性增加,100 μmol/L 以上浓度 AA 作用后 TH、DAT 阳性率无明显增加趋势,而 mRNA 表达反而有所下降,因此,选择 100 μmol/L 为 AA 最佳诱导浓度。

Ptx3 是一种包含同源结构域的转录因子,在胚胎 11 d 的中脑多巴胺能神经元前体细胞中开始表达[11]。研究结果显示,来自中脑的 NSCs 表达 Ptx3 和少量的 Nurr1,不表达 TH、DAT 和 SHH。AA 诱导后也不影响

Ptx3的表达,而增加了Nurr1、SHH、TH、DAT的表达。在血清和AA处理后,Ptx3并没有表现出显著变化,这就提示我们Ptx3可能并没有参与NSCs的分化。Nurr1在中枢多巴胺系统中有显著表达,对于多巴胺能神经元的发育和存活起着重要作用[12]。体外培养和大鼠帕金森模型中,胚胎干细胞过表达Nurr1时,能分化为多巴胺能神经元[13]。与TH和DAT表达相一致,Nurr1的表达在AA诱导后也有增强,而且Nurr1基因在AA组中比血清组有高表达,提示Nurr1可能参与了AA诱导分化。SHH基因被认为是神经干向神经元分化的调制基因[14],本研究结果也证实它的表达在神经干细胞分化激活后有加强。

MAPK家族已被证实在细胞存活中至关重要[15]。MAPK超家族成员中,ERK在细胞增殖、周期阻滞、终端分化中发挥着重要作用[16]。为了解ERK在AA诱导分化中的作用,我们使用了ERK高效抑制剂PD98059。PD98059主要是通过抑制ERK的激活和随后的基板磷酸化,使其不能结合到SAPK/JNK和P38MAPK通路上而阻断ERK通路[17]。加入PD98059后TH、DAT表达被完全阻滞,说明ERK信号通路可能与AA诱导分化有关。PD98059作用后Nurr1表达下降,进一步提示Nurr1可能参与了ERK途径或是其下游的一个基因。ERK信号转导的细节和准确的机制我们仍然还不明确,其中是否有其他的信号通路参与了转导,还有待进一步研究。

抗氧化剂(包括AA在内)被证明了在原代细胞培养中能够增加中脑多巴胺能神经元的存活率,同时也能抵消体内外的毒性作用[18]。Yan等[19]发现AA在分化中的作用不能用其他抗氧化剂替代,而其影响多巴胺能分化的机制是否与其抗氧化作用有关还需要进一步探索。通过将NSCs诱导为所需表型细胞的研究,我们发现了高效诱导剂AA,并初步探讨其分子机制,这将为我们解决临床上用细胞治疗神经退行性疾病(如帕金森病)所存在的细胞功能性分化问题提供一种新思路。

参考文献:

[1] Arenas E. Towards stem cell replacement therapies for Parkinson's disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(1): 152-156.

[2] Ling Z D, Potter E D, Lipton J W, *et al*. Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines[J]. Exp Neurol, 1998, 149(2): 411-423.

[3] Bagga V, Dunnett S B, Fricker-Gates R A. Ascorbic acid increases the number of dopamine neurons in vitro and in transplants to the 6-OHDA-lesioned rat brain[J]. Cell Transplant, 2008, 17(7): 763-773.

[4] Rice M E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain[J]. Trends Neurosci, 2000, 23(5): 209-216.

[5] Shin D M, Ahn J I, Lee K H, *et al*. Ascorbic acid responsive genes during neuronal differentiation of embryonic stem cells[J]. Neuroreport, 2004, 15(12): 1959-1963.

[6] 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 U S A, 1995, 92(17): 7686-7689.

[7] De-Feo D, Merlini A, Laterza C, *et al*. Neural stem cell transplantation in central nervous system disorders: from cell replacement to neuroprotection[J]. Curr Opin Neurol, 2012, 25(3): 322-333.

[8] Pardal R, López-Barneo J. Neural stem cells and transplantation studies in Parkinson's disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 741: 206-216.

[9] 余小强, 阮怀珍, 蔡文琴, 等. PD大鼠纹状体提取液诱导中脑神经干细胞分化为多巴胺能神经元的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(1): 18-21.

[10] Yang M, Stull N D, Berk M A, *et al*. Neural stem cells spontaneously express dopaminergic traits after transplantation into the intact or 6-hydroxydopamine -lesioned rat[J]. Exp Neurol, 2002, 177(1): 50-60.

[11] Lebel M, Gauthier Y, Moreau A, *et al*. Pitx3 activated mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site[J]. J Neurochem, 2001, 77(2): 558-567.

[12] Kim J Y, Koh H C, Lee J Y, *et al*. Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression[J]. J Neurochem, 2003, 85(6): 1443-1454.

[13] Chung S, Sonntag K C, Andersson T, *et al*. Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons[J]. Eur J Neurosci, 2002, 16(10): 1829-1838.

[14] Balaskas N, Ribeiro A, Panovska J, *et al*. Gene regulatory logic for reading the Sonic Hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube[J]. Cell, 2012, 148(1/2): 273-284.

[15] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade[J]. FASEB J, 1995, 9(9): 726-735.

[16] Peyssonnaux C, Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation[J]. Biol Cell, 2001, 93(1/2): 53-62.

[17] Ueda Y, Saijo N. Signal transduction inhibitor[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2001, 28(5): 591-600.

[18] Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, *et al*. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. J Neurochem, 2000, 74(4): 1605-1612.

[19] Yan J, Studer L, McKay R D. Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors[J]. J Neurochem, 2001, 76(1): 307-311.

(收稿:2013-05-28;修回:2013-07-16)

(编辑 吴培红)