DOI:10.16016/j.1000-5404.202107102

膜联蛋白 A6 促进神经祖细胞定向少突胶质细胞分化发育的机制研究

乐一帆[1],范睿诚[1],徐 扬[2],李红丽[1,3] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)基础医学院:组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学重点实验室[1],教学实验中心[3];400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院妇产科[2]

[摘要] **目的** 探讨膜联蛋白 A6(annexin A6,AnxA6)调控神经祖细胞(neural progenitor cells,NPCs)定向少突胶质细胞(oligodendrocytes,OLs)分化的作用机制。**方法** 构建 AnxA6 基因敲减(AnxA6 敲减组)和过表达(AnxA6 过表达组)病毒载体,以空载体作为对照组。运用 qRT-PCR、Western blot、免疫荧光染色、活细胞钙成像等技术,对比检测 AnxA6 敲减与过表达后,体外培养的 NPCs 胞内 Ca^{2+} 的动态变化差异及其对定向分化转录因子 Olig2(定向 OLs)、Hes1、Ascl1 等表达的影响,评估 AnxA6 对 NPCs 分化过程的影响。**结果** 与对照组相比,AnxA6 敲减组未见明显 AnxA6 蛋白条带($P<0.05$),而 AnxA6 过表达组阳性蛋白条带光密度值显著升高($P<0.01$);NPCs 分化 1 d 后在静息状态下,AnxA6 过表达组细胞可见胞内 Ca^{2+} 自发振荡的频率和振幅均高于对照组和 AnxA6 敲减组;在 NPCs 分化 3 d 的细胞中,可见 AnxA6 过表达组 Olig2 mRNA 表达升高,而 Hes1、Ascl1 mRNA 则表达减少;Olig2 荧光阳性细胞的百分率升高,CNPase 荧光信号代表的髓鞘分布增大;同时突起形成相关细胞骨架因子 Vimentin、Fyn mRNA 的表达显著上调($P<0.05$)。**结论** 过表达 AnxA6 不仅能增强 NPCs 分化早期细胞内 Ca^{2+} 的动力变化,还促进 OLs 定向转录因子的表达,加快髓鞘形成。

[关键词] 膜联蛋白 A6;神经祖细胞;少突胶质细胞;钙离子;细胞分化;髓鞘形成

[中图法分类号] R322.85;R329-33;R329.25 [文献标志码] A

Mechanism of annexin A6 promoting differentiation and development of neural progenitor cells into oligodendrocytes

LE Yifan[1], FAN Ruicheng[1], XU Yang[2], LI Hongli[1,3] [1]Department of Histology and Embryology, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology, [3]Teaching Experiment Center, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] Objective To explore the mechanism of annexin A6 (AnxA6) regulating neural progenitor cells (NPCs) to differentiate into oligodendrocytes (OLs). Methods AnxA6 gene knockout and AnxA6 overexpression viral vectors were constructed in freshly isolated and cultured NPCs, and then qPCR, Western blotting, immunofluorescence staining and calcium imaging in living cells were used to detect the changes of AnxA6 knockout and overexpression on the expression of transcription factors Olig2, Hes1 and Ascl1 in NPCs differentiation *in vitro*, to observe the dynamic changes of intracellular Ca^{2+}, and to evaluate the effect of AnxA6 on NPC differentiation and maturation. Results Compared with the normal control group, there was no obvious positive band of AnxA6 protein in the knockdown group ($P<0.05$), but the OD value of the protein band in the overexpression group was significantly increased ($P<0.01$). Under the resting state of NPCs (differentiation for 1 d), the frequency and amplitude of spontaneous oscillation of intracellular calcium ions were higher than those in the control group and the knockdown group. In the NPCs cells differentiated for 3 d, the mRNA level of Olig2 was increased and those of Hes1 and Ascl1 were decreased in

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31471148)

[通信作者] 李红丽,E-mail:lihongli@tmmu.edu.cn

1000-5404/Copyright © 2021,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the AnxA6 overexpression group. The percentage of Olig2 positive cells and the immunofluorescence signal intensity of CNPase were higher than those in the control group and knockdown group, and the up-regulated expression of the myelin formation-related factor Vimentin and Fyn mRNA was also elevated ($P<0.05$). **Conclusion** Over expression of AnxA6 not only enhances the dynamic changes of Ca^{2+} in NPCs at the early stage of differentiation, but also promotes the expression of directed transcription factors in OLs and accelerates the formation and myelin sheath.

[**Key words**] annexinA6; neural progenitor cells; oligodendrocytes; Ca^{2+}; cell differentiation; myelination

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31471148). Corresponding author: LI Hongli, E-mail: lihongli@tmmu.edu.cn

膜联蛋白 A6(annexin A6,AnxA6)属于膜联蛋白 Annexin 家族的成员,相对分子量大小为 68×10^3,是该家族中分子质量最大的一个亚型[1-2]。近年研究表明 AnxA6 在细胞内通过与钙离子结合发挥伴侣分子的作用[3],参与细胞内的信号转导并引起磷酸化等反应[4-5]。有实验证实 AnxA6 表达增多可稳定激活细胞表面受体[6],参与神经嵴内细胞的迁移过程[7]。相反,AnxA6 功能受到抑制会延缓软骨生长板内细胞终末分化能力[8]。可见 AnxA6 在部分未分化组织细胞的发育中起着重要的调节作用。由此,我们推测 AnxA6 可能与神经细胞的早期发育分化也有关联,但相关实验证据尚少。

神经祖细胞(neural progenitor cells, NPCs)是胚胎新皮层发育过程中一种具有自我更新和定向分化能力的多能干细胞[9]。体外研究显示在自然条件下,NPCs 分化为星型胶质细胞占 70%以上,分化为神经元比例占 25%左右,仅有不到 5%的细胞分化为少突胶质细胞(oligodendrocytes, OLs),表明 NPCs 定向分化为 OLs 的能力是有限的[10]。临床孕晚期胎脑白质发育主要由少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)分化为 OLs。已有研究证实孕晚期脑白质的发育极易受到缺氧、缺血、高糖等损伤因素的影响,造成转录因子 Olig2 等表达降低伴随 OLs 分化受阻,产生不可逆的神经损伤[11]。而 NPCs 是 OPCs 的主要来源,因此,NPCs 向 OLs 的定向分化调控及其机制的研究对于脑白质发育及相关疾病防治具有重要意义。然而,AnxA6 是否在 NPCs 的命运决定和定向 OLs 分化过程中也起着调控作用,目前国内外仍缺少相关报道。本实验通过构建 AnxA6 敲减以及过表达病毒载体,采用体外 NPCs 分化模型,探究 AnxA6 在 NPCs 定向 OLs 发育过程的调控作用,为探寻神经系统发育早期定向 OLs 分化的调控新靶点提供实验室证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 健康清洁级新生至 3 d SD 大鼠,由本校动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂 DME/F-12 培养基、胎牛血清购自 HyClone 公司;B27 Supplement 购自 Gibco 公司;bFGF、EGF 购自 Invitrogen 公司;免疫荧光二抗 dylight488,550 购自武汉博士德公司;0.25%胰酶购自上海碧云天生物技术有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、SYBR Green 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原代 NPCs 的体外培养和诱导分化 取新生 3 d SD 大鼠,剥离脑组织除去脑膜及表面血管后,漂洗并装入含无菌 PBS 的培养皿内,碾碎脑组织后加入 0.25%胰酶细胞消化液消化 5 min,1 400 r/min 离心 5 min,弃上清,加入无血清的 NPCs 培养液(DME/F12 培养液,青霉素-链霉素溶液(100 倍稀释),b27(50 倍稀释),bFGF(5 000 倍稀释),EGF(5 000 倍稀释)重悬,接种到 25 cm^2 培养瓶中(细胞数约 1×10^6 个/瓶),置于 37 ℃,5% CO_2 培养箱中。NPCs 在培养 3~5 d 后,可形成神经球,呈悬浮生长,每 2 天换半量培养基,7 d 后吹打神经球为单细胞悬液,以 1×10^6 个/瓶接种到培养瓶中,每 4~5 天传代 1 次用于后续分化实验。诱导分化时,更换为含 10% FBS 的 DME/F12 的分化培养基,作用 24 h 计为分化 1 d。

1.2.2 过表达/敲减病毒感染细胞 AnxA6 过表达病毒、AnxA6 CRISPER-Cas9 基因敲减病毒及其相应的空白对照病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司。将细胞分为空载体对照组、AnxA6 敲减组、AnxA6 过表达组。感染前 1 d,将 NPCs 接种于 6 孔板,每孔接种 1×10^6 个细胞,各自加入相应的病毒浓缩液,病毒感染 12 h 后弃去上清,更换为新鲜培养基继续培养。

1.2.3 qRT-PCR 检测 设计引物(少突胶质细胞分化相关因子 Olig2 正义链:5′-GGCGGTGGCTTCAAGTCATCTT-3′,反义链:5′-GCGAGTTGGTGAGCATCAGGAT-3′;星形胶质细胞分化相关因子 Hes1 正义链:5′-CTGGAGAGGCTGCCAAGGTT-3′,反义链:5′-

GAAGGCGACACTGCGTTAGGA-3′;神经元分化相关因子 Ascl1 正义链:5′-ACTTCAGTGGCTTCGGCTACAG-3′,反义链:5′-GCGTCTCCACCTTGCTCATCTT-3′;Vimentin 正义链:5′-GACATCATGCGGCTGCGAGAA-3′,反义链:5′-TCATACTGCTGGCGGACATCAC-3′;Fyn 正义链:5′-AGCGAAACTGACGGAGGAGAGG-3′,反义链:5′-CGGCTGCGTGGAAGTTGTTGTA-3′。传统 TRIzol 法提取细胞总 RNA,用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒逆转录成 cDNA,以 GAPDH 为内参,用 SYBR Green 试剂盒进行扩增,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

1.2.4 活细胞钙成像 将 3 组细胞种植于玻底培养皿中培养 24 h,取 1 mL Fluo-4^{AM} 工作液(Fluo-4 母液 5 μL 用培养基稀释至 1 mL)覆盖在细胞表面,37 ℃孵育 30 min;在共聚焦显微镜下记录 Fluo-4 荧光信号及动态变化曲线。

1.2.5 免疫荧光染色 NPCs 及分化各阶段细胞用-20 ℃无水甲醇固定 20 min,PBS 漂洗 3 次,用 5% BSA 室温封闭 1 h 后,加入一抗(Nestin、CNPase、Olig2,稀释比例均为 1∶400,购自武汉博士德公司),4 ℃过夜。PBS 清洗 3 次后,加入对应的二抗,室温避光孵育 1 h,然后加入 DAPI 进行细胞核染色,室温避光孵育 20 min,洗涤后以 50%甘油溶液封片。荧光染色细胞镜下随机选取 10 个视野/组测定。统计分析荧光阳性细胞的百分率和荧光信号的分布面积。

1.2.6 Western blot 检测 收集细胞样品裂解、离心提取蛋白,予以 BCA 蛋白定量后,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和转膜,用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,加入相应的一抗(AnxA6,1∶500,购自武汉博士德公司)4 ℃过夜,过夜后用 TBST 漂洗 3 次并加入对应的 HRP IgG,室温孵育 1 h 后用 TBST 洗涤 3 次,最后经 ECL 液曝光并拍照留存。采用 Image J 软件进行灰度分析,以 GAPDH 作为内参,用目的蛋白与 GAPDH 的比值表示目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学分析

采用 Graphpad Prism 7 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,每组实验至少重复 3 次。组间差异采用 t 检验和卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

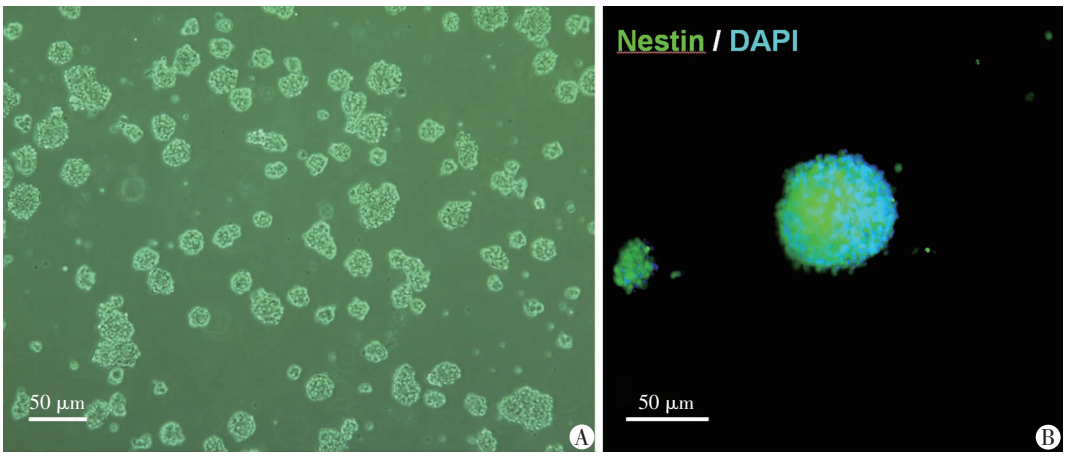
2 结果

2.1 大鼠 NPCs 的分离鉴定

在无血清 NPCs 培养基中培养 24 h 后,观察到单个悬浮细胞和不规则悬浮细胞团。2~3 d 后,可见呈悬浮生长的数目、大小形态不同的细胞球,具有强烈折射率且没有突起,5 d 后可见大量细胞球(图 1A)即为神经球。免疫细胞荧光染色可见神经球内显示 Nestin 阳性信号(图 1B)。

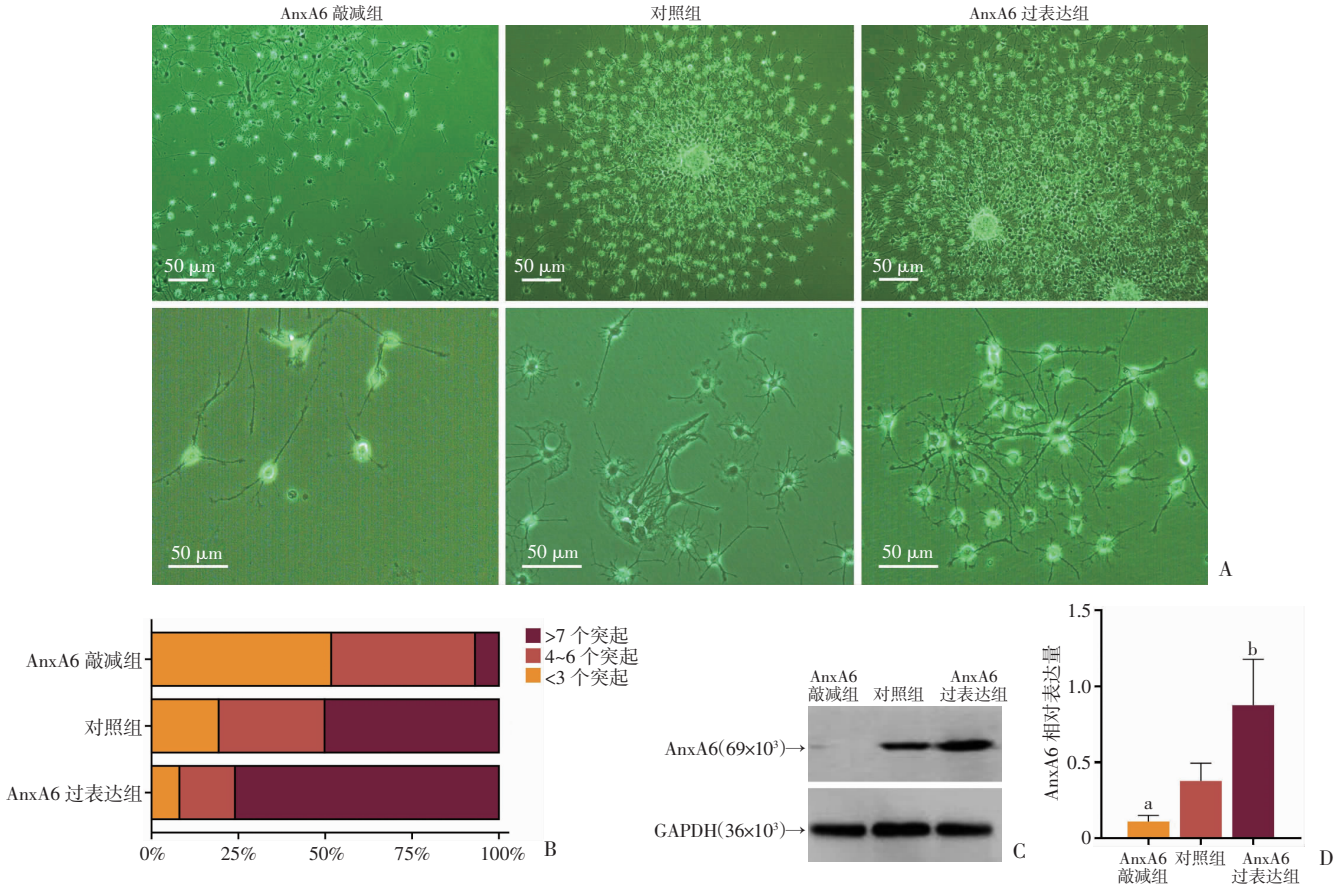
2.2 AnxA6 过表达加快 NPCs 形态分化

NPCs 分化 3 d 后,在对照组中,神经球细胞团贴壁生长,直径扩大,周边见较多有突起的细胞(图 2A)。AnxA6 过表达组可见神经球周边分化细胞较多且多为>7 分支突起的细胞;而 AnxA6 敲减组神经球周边分化细胞较少,胞体较大且突起及分支较少,多为<3 分支(图 2B)。运用 Western blot 检测 3 组分化细胞中 AnxA6 蛋白表达,AnxA6 过表达组 AnxA6 蛋白条带的光密度值显著高于对照组($P<0.01$),AnxA6 敲减组 AnxA6 蛋白条带较对照组减弱($P<0.05$,图 2C、D)。



A:体外培养 5 d 后见神经祖细胞呈球状悬浮生长;B:神经球内见 Nestin 荧光阳性信号

图 1 大鼠 NPCs 体外培养与鉴定



A:NPCs 分化 3 d 后,低倍镜(上)和高倍镜(下)显示 3 组细胞发育成熟形态;B:分化细胞中<3 突起、4~6 突起及>7 突起的细胞所占百分率;C:Western blot 检测各组 AnxA6 蛋白表达结果;D:Western blot 检测各组 AnxA6 蛋白相对表达量　a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较

图 2　AnxA6 对 NPCs 形态分化的影响

2.3　AnxA6 过表达诱导分化细胞内 Ca^{2+} 自发性震荡

NPCs 分化 1 d 后活细胞钙成像检测结果显示,在静息状态下,AnxA6 过表达组中细胞内 Ca^{2+} 信号呈现出较多的自发性震荡反应,且振荡活动的频率和幅度均较对照组细胞显著增强($P<0.01$),相反,AnxA6 敲减组相较于对照组,细胞内 Ca^{2+} 信号的自发性振荡反应较少,钙振荡波形幅度明显低平(图 3A)。钙振荡峰值数以对照组均值 800 为对照,统计学分析显示 AnxA6 过表达组中幅度超过均值的钙反应分布率明显较多,AnxA6 敲减组较对照组显著减少($P<0.01$,图 3B)。提示 AnxA6 增多促使细胞钙应答功能更加活跃。

2.4　过表达 AnxA6 上调早期分化细胞中 Olig2 表达

免疫荧光结果显示 AnxA6 过表达组分化 1 d 细胞中 Olig2 荧光阳性细胞的百分率显著高于对照组,AnxA6 敲减组百分率明显降低($P<0.05$,图 4A、B)。同样,采用 qRT-PCR 检测 NPCs 分化 1 d 后细胞,结果显示:AnxA6 过表达组分化细胞中 OLs 分化相关转录因子 Olig2 mRNA 的表达显著升高($P<0.01$),反之,AnxA6 敲减组 Olig2 mRNA 水平显著低于对照组($P<0.01$);且 AnxA6 敲减组星形胶质细胞分化相关因子 Hes1 以及神经元分化相关因子 Ascl1 mRNA 水平显著高于对照组($P<0.05$,图 4C)。提示 AnxA6 过表达促进 NPCs 向 OLs 定向分化。

2.5　过表达 AnxA6 上调 CNPase,同时促进 Vimentin、Fyn 的 mRNA 表达

进一步采用免疫荧光检测 NPCs 分化 3 d 细胞中髓鞘标志物 CNPase 的表达,结果显示 AnxA6 过表达组细胞突起及分支中可见大量红色荧光信号分布,包绕胞体周边。相反,AnxA6 敲减组细胞中 CNPase 阳性信号仅分布在胞体周边区域,阳性信号面积明显低于对照组($P<0.05$,图 5A~C),提示 AnxA6 过表达诱导 NPCs 向 OLs 定向分化,且加快 OLs 髓鞘发育成熟进程,而 AnxA6 表达受抑制则显著减少 NPCs 向 OLs 的分化。

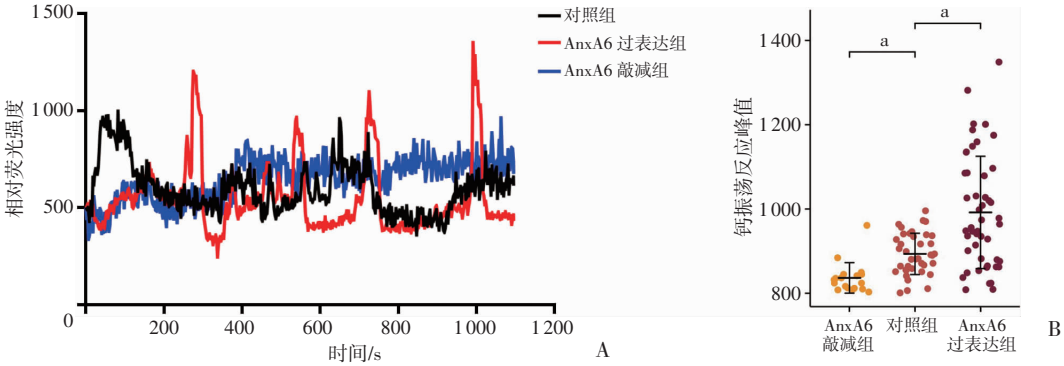
采用 qRT-PCR 检测 3 组细胞分化 3 d 后,结果显示 AnxA6 过表达组 Vimentin 和 Fyn mRNA 表达均明显增高($P<0.05$);其中,Vimentin 较对照组增加近

3 倍,而 AnxA6 敲减组较对照组未见明显差异;Fyn mRNA 较对照组增加约 0.6 倍,而 AnxA6 敲减组较对照组减少约 1 倍。提示 AnxA6 的增多可能促进分化细胞中 Vimentin、Fyn 表达,与定向分化后 OLs 的突起发育成熟加快有关(图 5D)。

3　讨论

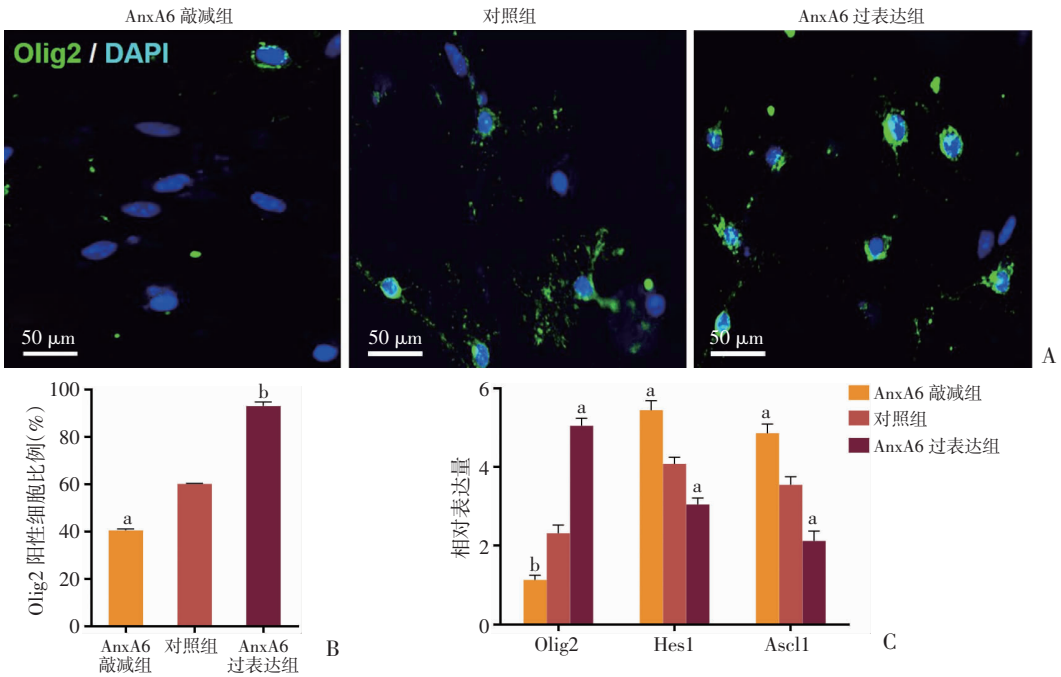
AnxA6 是近年发现的一个能与蛋白和受体相结合的膜联蛋白伴侣分子[1]。研究证实 AnxA6 能够通过招募相应分子调控细胞骨架稳定、突起延长,参与细胞的多种功能活动,如干细胞分化、细胞迁移等[7]。已有较多研究证实在 NPCs 分化过程中,常伴随着胞膜上相应受体的激活启动,是细胞命运决定的关键环节,这一调控过程需要标志性的转录因子的启动。新生儿脑白质软化症相关研究表明,在发育早期少突胶质前体细胞极易受缺血缺氧等氧化应激性因素的损伤,使定向分化为 OLs 能力受到抑制,该过程与转录因子 Olig2 表达降低密切相关[12],故转录因子 Olig2 表达高低可作为评价 NPCs 向 OLs 分化能力的指标。

本研究通过运用体外培养的 AnxA6 CRISPER-Cas9 基因敲减的 NPCs 以及 AnxA6 过表达的 NPCs[13],探究 AnxA6 在定向 OLs 分化中的调控作用,



A:活细胞钙成像检测静息状态下分化 1 d 后,各组细胞胞内[Ca^{2+}]反应的动力变化曲线;B:各组细胞钙振荡的荧光峰度值的对比统计分析　a:$P<0.01$

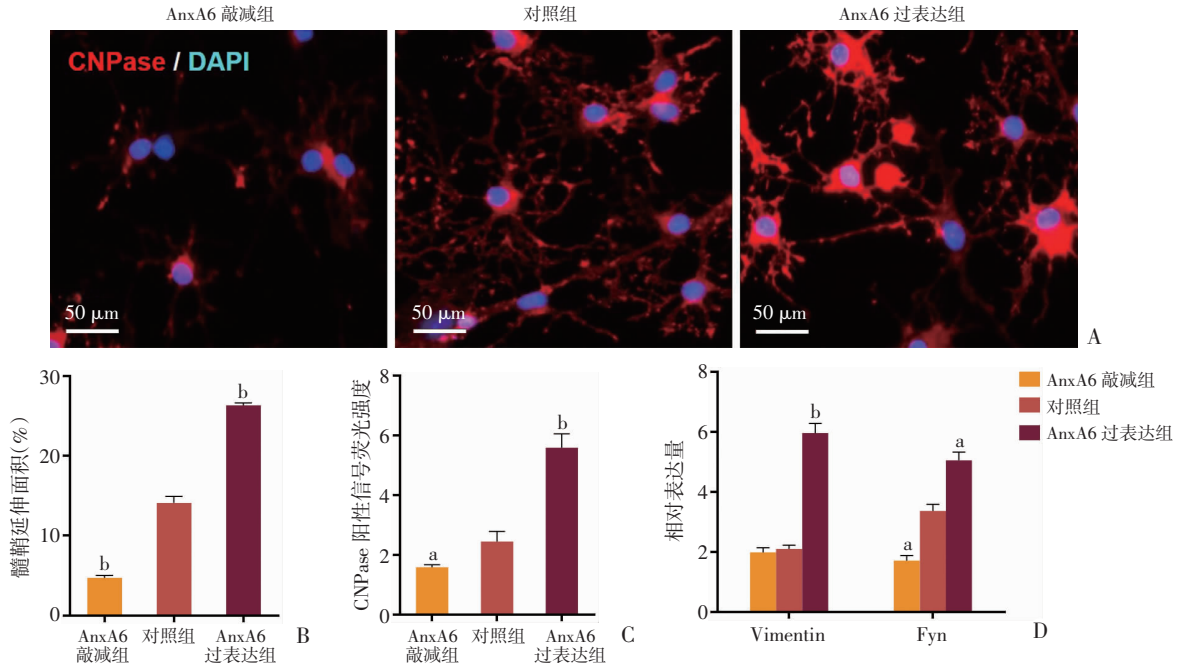
图 3　AnxA6 对分化细胞内[Ca^{2+}]信号的影响



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

A:免疫荧光染色观察 3 组中 NPCs 分化 1 d 后 Olig2 阳性细胞;B:Olig2 荧光阳性细胞的百分率统计;C:qRT-PCR 分析 3 组 NPCs 分化早期胞内定向分化转录因子 mRNA 的表达差异

图 4　AnxA6 对 NPCs 早期分化 1 d 细胞中转录因子表达的影响



a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与对照组比较

A:分化 3 d 后 3 组细胞 CNPase 免疫荧光染色观察;B、C:3 组 CNPase 阳性荧光信号的分布面积和荧光强度;D:qPCR 检测 3 组分化 3 d 细胞中细胞骨架相关因子 mRNA 的表达差异

图 5 AnxA6 对 NPCs 分化及髓鞘形成的影响

结果显示过表达 AnxA6 后可使 NPCs 分化细胞中 Olig2 的 mRNA 表达增强,但 AnxA6 敲减组显示 Olig2 mRNA 表达量显著减少。提示 AnxA6 的表达可能参与 NPCs 定向 OLs 分化过程。另外,AnxA6 敲减组中观察到星形胶质细胞分化相关转录因子 Hes1[14] 以及神经元分化相关因子 Ascl[15] 的 mRNA 表达增高,表明 AnxA6 的降低在减少 NPCs 向 OLs 分化的同时,可引发更多 NPCs 向星形胶质细胞以及神经元分化。故推测 AnxA6 可能是 NPCs 定向 OLs 分化过程中不可或缺的一环。AnxA6 的减少可能作为一种应激性损伤因素,导致其相关转录因子表达增多,刺激星形胶质细胞以及神经元发生反应性变化,尤其是应激下星形胶质细胞常发生形态变大、数目增多等系列反应[16-17]。而 Ascl1 表达见于神经元分化启动等阶段,对后续神经元分化的影响及其相关具体机制有待进一步研究。

既往生物信息学研究结果显示,AnxA6 蛋白中存在具有 Ca^{2+} 结合相关的结构域[5]。有研究表明 AnxA6 与 Ca^{2+} 结合后,能减少胞内蛋白的降解,从而表现出稳定胞内蛋白的作用,提示 AnxA6 作为分子伴侣必须与细胞内 Ca^{2+} 结合才能引发下游信号转导和引起磷酸化反应[18-19]。本研究发现在静息状态下,AnxA6 过表达组细胞内呈现出明显的自发性钙振荡,且振幅较强;而 AnxA6 敲减组钙振荡较弱。Fluo-4 作为与 Ca^{2+} 结合探针,钙振荡荧光信号越强,表明胞内 Ca^{2+} 浓度越高,提示细胞功能更加活跃,Ca^{2+} 作为第 2 信使,进一步启动下游转录因子的表达[20]。有研究认为 AnxA6 与 Ca^{2+} 结合后形成的复合物能使其本身构象发生变化,暴露疏水基团,后者作为与靶蛋白相互作用的位点能够招募一些小分子蛋白,参与膜表面一系列依赖于钙调蛋白的活动,包括囊泡运输、胞吐作用、信号传导、细胞分化、细胞凋亡[21]等。本实验也观察到 AnxA6 表达增强的同时,细胞中 Vimentin、Fyn 的表达较对照组均有显著提高,而 AnxA6 敲减组较对照组显著下降。对 OLs 的研究提示 Vimentin、Fyn 的表达与髓鞘膜形成以及髓鞘扩展有关[22-23],进一步提示 AnxA6/Ca^{2+} 复合物可能增强与 Fyn 等的结合,加快了髓鞘的成熟。本研究采用 CRISPR 技术敲减 AnxA6 基因,观察到细胞分化成熟受阻,滞后于对照组和 AnxA6 过表达组,qRT-PCR 检测结果显示转录因子 Olig2 表达显著低于对照组,提示敲减 AnxA6 基因可能导致蛋白构象中的疏水基团 Ca^{2+} 结合区错构,从而失去加速 NPCs 分化功能。

综上,本研究观察在 NPCs 分化过程中过表达或敲减 AnxA6 后对其定向分化的影响,结果显示在增强 AnxA6 的表达后,OLs 的分化比例较对照组有明显提高。本实验结果提示在 NPCs 的分化早期调控 AnxA6 的表达可促进其定向 OLs 分化,并能加快髓鞘的形成。本研究为寻找脑白质分化发育早期 NPCs 定向分化的新的调控靶点提供实验证据。但 AnxA6 是如何

与其他基因或分子协同作用,相关机制尚不明确,需进一步深入研究。

参考文献:

[1] CORNELY R, RENTERO C, ENRICH C, *et al*. Annexin A6 is an organizer of membrane microdomains to regulate receptor localization and signalling[J]. Iubmb Life, 2011, 63(11): 1009-1017.

[2] TEBAR F, GELABERT-BALDRICH M, HOQUE M, *et al*. Annexins and endosomal signaling[J]. Methods Enzymol, 2014, 535: 55-74. DOI: 10.1016/B978-0-12-397925-4.00004-3.

[3] CHOW A, DAVIS A J, GAWLER D J. Identification of a novel protein complex containing annexin VI, Fyn, Pyk2, and the p120GAP C2 domain[J]. FEBS Lett, 2000, 469(1): 88-92. DOI:10.1016/S0014-5793(00)01252-7.

[4] KOESE M, RENTERO C, KOTA B P, *et al*. Annexin A6 is a scaffold for PKCα to promote EGFR inactivation[J]. Oncogene, 2013, 32(23): 2858-2872. DOI:10.1038/onc.2012.303.

[5] ZHOU Y B, XUE S H, CHEN Y Y, *et al*. Probing Ca^{2+}-binding capability of viral proteins with the EF-hand motif by grafting approach[J]. Methods Mol Biol, 2013, 963: 37-53. DOI:10.1007/978-1-62703-230-8_3.

[6] CROISSANT C, GOUNOU C, BOUVET F, *et al*. Annexin-A6 in membrane repair of human skeletal muscle cell: a role in the cap subdomain[J]. Cells, 2020, 9(7): E1742. DOI: 10.3390/cells9071742.

[7] WU C Y, TANEYHILL L A. Annexin a6 modulates chick cranial neural crest cell emigration[J]. PLoS ONE, 2012, 7(9): e44903. DOI:10.1371/journal.pone.0044903.

[8] MINASHIMA T, SMALL W, MOSS S E, *et al*. Intracellular modulation of signaling pathways by annexin A6 regulates terminal differentiation of chondrocytes[J]. J Biol Chem, 2012, 287(18): 14803-14815. DOI:10.1074/jbc.M111.297861.

[9] GROCHOWSKI C, RADZIKOWSKA E, MACIEJEWSKI R. Neural stem cell therapy-Brief review[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2018, 173: 8-14. DOI: 10.1016/j.clineuro.2018.07.013.

[10] FRAICHARD A, CHASSANDE O, BILBAUT G, *et al*. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons[J]. J Cell Sci, 1995, 108(Pt 10): 3181-3188.

[11] NESS J K, ROMANKO M J, ROTHSTEIN R P, *et al*. Perinatal hypoxia-ischemia induces apoptotic and excitotoxic death of periventricular white matter oligodendrocyte progenitors[J]. Dev Neurosci, 2001, 23(3): 203-208. DOI:10.1159/000046144.

[12] MA T, LI B C, LE Y F, *et al*. Demyelination contributes to depression comorbidity in a rat model of chronic epilepsy *via* dysregulation of Olig2/LINGO-1 and disturbance of calcium homeostasis[J]. Exp Neurol, 2019, 321: 113034. DOI: 10.1016/j.expneurol.2019.113034.

[13] PENA S A, IYENGAR R, ESHRAGHI R S, *et al*. Gene therapy for neurological disorders: challenges and recent advancements[J]. J Drug Target, 2020, 28(2): 111-128. DOI:10.1080/1061186X.2019.1630415.

[14] HSIEH M C, PENG H Y, HO Y C, *et al*. Transcription repressor Hes1 contributes to neuropathic pain development by modifying CDK9/RNAPII-dependent spinal mGluR5 transcription[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17): E4177. DOI:10.3390/ijms20174177.

[15] DENG M, XIE P, CHEN Z, *et al*. Mash-1 modified neural stem cells transplantation promotes neural stem cells differentiation into neurons to further improve locomotor functional recovery in spinal cord injury rats[J]. Gene, 2021,781:145528. DOI:10.1016/j.gene.2021.145528.

[16] PEKNY M, NILSSON M. Astrocyte activation and reactive gliosis[J]. Glia, 2005, 50(4): 427-434. DOI: 10.1002/glia.20207.

[17] PEKNY M, WILHELMSSON U, TATLISUMAK T, *et al*. Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke? [J]. Neurosci Lett, 2019, 689: 45-55.

[18] MONASTYRSKAYA K, BABIYCHUK E B, HOSTETTLER A, *et al*. Plasma membrane-associated annexin A6 reduces Ca^{2+} entry by stabilizing the cortical actin cytoskeleton[J]. J Biol Chem, 2009, 284(25): 17227-17242. DOI: 10.1074/jbc.M109.004457.

[19] DEMONBREUN A R, FALLON K S, OOSTERBAAN C C, *et al*. Recombinant annexin A6 promotes membrane repair and protects against muscle injury[J]. J Clin Invest, 2019, 129(11): 4657-4670. DOI:10.1172/JCI128840.

[20] PCHITSKAYA E, POPUGAEVA E, BEZPROZVANNY I. Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases[J]. Cell Calcium, 2018, 70: 87-94. DOI:10.1016/j.ceca.2017.06.008.

[21] HOQUE M, ELMAGHRABI Y A, KÖSE M, *et al*. Annexin A6 improves anti-migratory and anti-invasive properties of tyrosine kinase inhibitors in EGFR overexpressing human squamous epithelial cells[J]. FEBS J, 2020, 287(14): 2961-2978. DOI:10.1111/febs.15186.

[22] O'MEARA R W, MICHALSKI J P, ANDERSON C, *et al*. Integrin-linked kinase regulates process extension in oligodendrocytes *via* control of actin cytoskeletal dynamics[J]. J Neurosci, 2013, 33(23): 9781-9793. DOI:10.1523/JNEUROSCI.5582-12.2013.

[23] MATRONE C, PETRILLO F, NASSO R, *et al*. Fyn tyrosine kinase as harmonizing factor in neuronal functions and dysfunctions[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): E4444. DOI:10.3390/ijms21124444.

(收稿:2021-07-16;修回:2021-09-01)

(编辑 张 维)