维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0781 - 06

Notch - 1 在骨髓间质干细胞分化为神经细胞中的作用

杨 军[1],贾延劼[2],杨 琴[1],承欧梅[1]
(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016;
2. 郑州大学附属第一医院神经内科,河南 450052)

【摘 要】目的:采用 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术,抑制 Notch - 1 基因的表达,从而观察 Notch - 1 基因在骨髓间质干细胞(MSCs)分化为神经细胞后的存活及分化中的作用。方法:构建 mNotch - 1 短发夹状 RNA(short hairpin RNA, mNotch - 1shRNA);然后对 mNotch - lshRNA 转染的 MSCs 进行形态学观察;MTT 检测转染前、转染 24h、转染 3 天的 MSCs 的存活率;体外条件下采用 BDNF、全反式维甲酸等诱导 mNotch - lshRNA 转染的 MSCs 分化,采用免疫细胞化学染色,检测 Nestin、NSE 及 NF200(神经元标记物)、GFAP(神经胶质细胞标记物)的表达。结果:mNotch - lshRNA 转染成功的细胞立体感增强,Notch - 1 基因表达消失,转染后 24h 和 3 天的 MSCs 细胞存活率下降,与未转染和转染对照组比较有显著性差异($P < 0.01$);转染 mNotch - 1shRNA 的 MSCs 向神经细胞的分化效率显著提高, NSE、NF200 的表达均高于未转染的和转染对照组的,且未见 GFAP 表达。结论:mNotch - lshRNA 抑制 Notch - 1 基因的表达,促进 MSCs 向神经细胞的分化效率,提示 MSCs 的横向分化过程可能与神经干细胞类似,阻断 Notch 信号通路,会加 MSCs 向神经细胞分化的效果。

【关键词】骨髓间质干细胞;Notch - 1 基因;神经细胞;shRNA
【中国图书分类法分类号】R745 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 09 - 13

Role of Notch - 1 in the Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells into Neurons

YANG Jun, et al
(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】Objectives: To identify the roles of Notch - 1 gene for survivaland differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into neurons by way of RNA interference (RNAi) technique to suppress expression of Notch - 1 gene. Methods: Firstly, construct mNotch - 1 short hairpin RNA(mNotch - lshRNA) and then to oberve configuration of MSCs transfected by mNotch - 1shRNA; MTT was employed to evaluate the survival ratio of MSCs before transfection, 24 hours and 3 days after transfection, respectively; agents, such as BDNF, retinoid acid, were obtained to induce MSCs transfected by mNotch - 1shRNA in vitro and expression of Nestin, NSE and NF200(neuron marker agent) and GFAP(neural glial cell marker agent) were determined by immunocytochemistry stain technique. Results: The cell cubic configuration was enforced and expression of notch - 1 gene vanished by transfection of mNotch - 1shRNA. The survival ratio of MSCs by transfection decreased and there was significant differences between non - ransfection and transfection - controlling group after 24 hours and 3 days of transfection ($P < 0.01$). The differentiation efficacy of MSCs transfected by mNotch - 1shRNA into neurons and the expression of NSE,NF200 were increased significantly than non - ransfection and transfection - controlling group, and there was no expression of GFAP. Conclusions: The differentiation efficacy of MSCs can be enforced by mNotch - lshRNA to suppress Notch - 1 expression, which implies that the transverse differentiation of MSCs is similar to that of neural stem cells. The blocking of Notch - 1 signal pathway might promote differentiation of MSCs into neural stem cells.

【Key words】Mesenchymal stem cells (MSCs) ;Notch - 1 gene; Neuron;shRNA

骨髓间质干细胞(mesenchymalstemcells,MSCs)能够横向分化为神经细胞[1]。在多细胞生物发育过程中,Notch 信号对细胞的命运决定起关键作用,几乎所有涉及细胞分化的生命活动都有 Notch 信号的参与。由于 Notch 信号对细胞分化调控的广泛性,据此推测 Notch 对 MSCs 的分化也有调控作用。

作者介绍:杨 军(1971 -),男,主治医师,
主要研究方向:脑血管疾病基础与临床。

基金项目:重庆市卫生局科学基金(03 - 2 - 070)、重庆市卫生局中医处科学基金(2004 - B - 064)、中国博士后科学基金项目(第 29 期,2003033363)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究采用 RNA 干扰(RNA interference,RNAi)技术,抑制 Notch - 1 基因的表达,从而观察 Notch - 1 基因在 MSCs 横向分化中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物

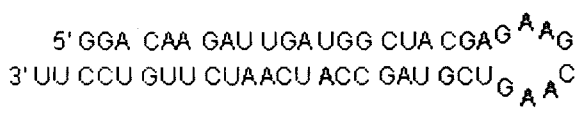
清洁级昆明小鼠,8 ~ 10 周,雌雄不限,由第三军医大学大坪医院动物中心(许可证号:SCXK(渝)20020003)提供。

1.2 主要试剂

DMEM、OPTI - MEM 培养基、Neurobasal - A(Gibco 公司);人 bFGF(北京晶美公司);SiPORTlipid(Ambion 公司);mNotch - lshRNA、mGAPDHshRNA(上海康成生物有限公司);山羊抗 Notch - 1 多克隆抗体(M - 20)(SantaCruz 公司);小鼠 GAPDH 单克隆抗体(上海康成生物有限公司);Insulin - Transferrin - Selenite mix(ITS)、维甲酸、兔抗 GFAP 多克隆抗体(Sigma 公司);小鼠 BDNF(PeproTech 公司);噻唑蓝(MTT)(BIB 公司)

1.3 mNotch - 1 短发夹状 RNA(short hairpin RNA, mNotch - 1shRNA)的构建

合成模板 DNA(由上海康成生物有限公司设计构建)经退火[T7promoter Oliog (70pmol) 1.5μl + 模板 DNA (50pmol) 1μl + 5 × Annealing Buffer2μl + RNnase - Free Water5.5μl,75℃孵育 2min;冷却至室温,放置 2min]、补平[退火反应液 10μl + 10 × Klenow Fragment exo - Fill - In Buffer2μl + dNTP Mix(2.5mM each dNTP) 2μl + Klenow Fragment exo - DNA Polymerase(20U/μl) 1μl + RNnase - Free Water5μl,37℃孵育 30min;0℃灭活酶 15min;冷却至室温]、体外转录[补平反应液 4μl + AmpliScribe T7 - Flash 10 × Reaction Buffer 2μl + DNTP Mix(2、5mol/L each dNTP) 7.2μl + DTI(100mol/L) 2μl + AmpliScribeT7 - Flash Enzyme Solution2μl 42℃孵育 70min]、纯化(体外转录反应液 20μl 加 RNase - FreeDNAnaseI(1U/μl) 1μl 混合后 37℃孵育 15min;70℃孵育 15min 灭活酶;酚:氯仿抽提;上清中加入 1/10 体积的 3M 醋酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇;冰浴 15min 沉淀 shRNA;去上清,沉淀用 70% 乙醇小心清洗一次;空气干燥 2 ~ 5min ;加入 100μl 的无 RNA 酶水溶解 shRNA;进一步用 MicroSpin™ G - 25 柱脱盐纯化),得到 mNotch - lshRNA 为 20.3gmol/L, - 80℃保存。mNotch - lshRNA 的序列为



1.4 MSCs 培养

无菌条件下取小鼠双侧胫骨,0.5mlDMEM 完全培养基(添加 10% 胎牛血清,10mol/L HEPES,1ng/mlbFGF)冲洗骨髓腔,制备成细胞悬液,调整密度为 2×10^6/ml,接种于 6 孔培养板(部分内有盖玻片),37℃,5% CO_2 培养。48h 换液,去除未贴壁细胞。以后每隔 72h 换液。待贴壁细胞完全融合后,0.25% 胰蛋白酶/0.04% EDTA 消化传代,按 1×10^4/ml 的密度接种,每隔 72h 换液,传至 3 ~ 4 代后备用。

1.5 mNotch - 1shRNA 转染

OPTI - MEM 培养基清洗细胞 3 次,每孔加入新鲜 OPTI - MEM 培养基 800μl;加入 SiPORT lipid(3μl 加 OPTI - MEM 培养基 12μl 混匀,室温放置 20min)与 mNotch - lshRNA(5μl 加 OPTI - MEM 培养基 180μl)的混合液,终体积为 1000μl;37℃,5% CO_2,孵育 4h;加入 3ml 无抗生素的 DMEM 培养基(添加 10% 胎牛血清),继续培养 24h 后检测。

对照实验采用 mGAPDHshRNA 代替 mNotch - lshRNA,其余步骤同前。

1.6 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞存活率

将转染 mNotch - lshRNA 前后各时间点的 MSCs 移入 96 孔培养板,MTT(5.0mg/ml)50μl/孔、37℃共同孵育 4h,离心弃上清,再加入二甲基亚砜 200μl,酶联免疫检测仪测定各孔吸光值(波长 490nm),评价细胞线粒体内琥珀酸脱氢酶的活性。由于该酶的活性与活细胞数目密切相关,也可以用于间接评价细胞存活率。

1.7 体外诱导 MSCs 分化为神经细胞(Sanchez - Ramos 法[2])

将正常 MSCs 或转染 mNotch - lshRNA 的 MSCs 去除培养基,D - Hank's 液清洗 3 次,换为 Neurobasel 培养基(添加 5% 马血清,1% 标准胎牛血清,2% ITS,0.5μmol/L 维甲酸,lOng/ml BDNF)培养 6 天。

1.8 MSCs 诱导后细胞鉴定

1.8.1 形态学观察 倒置显微镜下,动态观察 MSCs 诱导前后形态学变化。

1.8.2 免疫细胞化学染色 将 MSCs 细胞经 HistoChoice MB 固定 2h 后,0.5% H_2O_2 - 甲醇处理 30min,1% 牛血清白蛋白 - 0.3% TritonX - 100 37℃处理 30min;正常山羊血清(1:50)湿盒内室温孵育 30min,倾去血清,不洗;加入一抗(1:200)37℃孵育 60min 后,再加入山羊抗兔 IgG - Cy3(1:64)37℃,30min,0.01mol/L PBS 充分冲洗以终止反应,水溶性封片剂封片,荧光显微镜观察。阴性对照将一抗或二抗换为 0.01 mol/LPBS,其余步骤同前。每张玻片采用双人双盲随机记数 200 个细胞,计算阳性细胞百分比例。其中阳性细胞 ≥61% 为强阳性(+++),30% ~ 60% 为阳性(++),6% ~ 30% 为弱阳性(+),1% ~ 5% 为可疑(±),<1% 为阴性(-)。

1.9 统计处理

数据资料应用 ANOVAS 分析组间差异的显著性,如果组间差异有显著性,则应用 Student's t test 分别检验各组之间差异的显著性。对于计量数据采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结 果

2.1 培养的 MSCs 形态观察

细胞接种 24～48h，细胞出现纺锤形改变，即开始贴壁生长，随着培养时间延长，贴壁细胞明显增多，并分裂增殖。7～10 天细胞呈多种形态：星形，三角形，多角形，梭形等，胞体膨大，伸出长短不一、粗细不均多种形态的突起，细胞呈团簇状生长，分布不均，显示出集落生长趋势。中心细胞轮廓不清，体积变小，而周边细胞形态不变。经 3～4 次传代后，形成较典型的 MSCs(图 1，2)。



图 1 培养 7 天的小鼠 MSCa(×100)

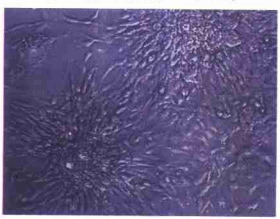


图 2 培养 14 天的小鼠 MSCa(×40)

2.2 mNotch－1shRNA 转染后细胞形态观察及 Notch－1 的表达

mNotch－1shRNA 转染后部分细胞脱落、死亡，转染成功的细胞立体感增强，胞体收缩呈球形、梭形，细长，交织呈网状(图 3，4)。免疫细胞化学染色，转染前 MSCs 中可见 Notch－1 的表达，转染成功的细胞 Notch－1 表达消失(图 5，6)。

2.3 mNotch－1shRNA 转染对细胞存活率的影响



图 3 mNothch－1shRNA 转染 24h 后 MSCa(×100)



图 4 mNothch－1shRNA 转染 7 天后 MSCa(×100)



图 5 mNothch－1shRNA 转染前 MSCa，免疫细胞化学 Notch－1 染色(Cy3，×150)

转染前各组 MTT 无显著性差异($P>0.05$)；转染 24h，转染 mNotch－1shRNA 组 MTT 值下降，与未转染和转染 mGAPDHshRNA 组有极显著性差异($P<0.01$)；转染 3 天，虽然 MTT 值较转染 24h 有所上升($P<0.01$)，但是仍较未转染和转染 mGAPDHshRNA 组有极显著性差异($P<0.01$)(表 1)。提示 mNotch－1shRNA 转染后细胞存活率下降。

维普资讯 http://www.cqvip.com

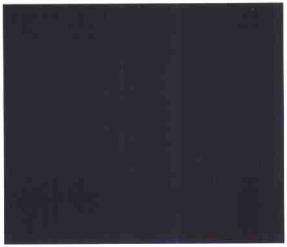


图 6 mNotch－1shRNA 转染 7 天后 MSCs，免疫细胞化学 Notch－1 染色(Cy3，×150)

表 1 转染对各组细胞存活率的影响

	转染前	转染 24h	转染 3d
未转染组	0.725±0.041	0.715±0.020	0.729±0.020
转染 mNotch－1shRNA 组	0.723±0.053	0.485±0.041*#	0.512±0.018*#
转染 mGAPDHshRNA 组	0.710±0.017	0.689±0.032	0.695±0.024

注：* 与未转染和转染 mGAPDH－shRNA 组相应的时间点相比有极显著性差异($P<0.01$)；

与同组转染 24h 相比有极显著性差异($P<0.01$)

2.4 体外诱导 MSCs 后细胞鉴定

未转染组诱导后细胞形态结构变化较慢。诱导 24h，少数细胞胞体收缩成锥形，形成细长突起，立体感强；诱导 6 天，部分细胞胞体收缩成多角形，周围有光晕，突起细长，有数个分支，类似神经细胞，个别细胞脱落、死亡。多数仍保持原有的形态，扁平，无突起(图 7)。

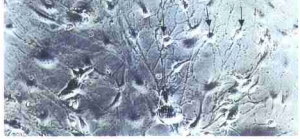


图 7 未转染的 MSCs，诱导 6 天后细胞形态，注意箭头所示的少数细胞形态类似于神经细胞，但是多数细胞仍保留原有的形态(×100)

转染 mNotch－1shRNA 组诱导后细胞形态结构变化明显。诱导 24h，部分细胞成球形、锥形，立体感强，形成细长的突起，局部交织成网，有些细胞周围有光晕，类似神经细胞，少量细胞脱落、死亡；诱导 6 天，多数细胞成锥形，交织成网，形成较典型的神经细胞结构，同时部分细胞脱落、死亡(图 8)。转染 mGAPDHshRNA 组诱导后变化类似未转染组。



图 8 转染的 mNotch－1shRNA 的 MSCs 诱导 6 天后细胞形态，注意多数细胞形态类似于神细胞，少数细胞仍保留原有的形态(×100)

免疫细胞化学染色提示未转染组诱导 24h，Nestin 蛋白表达达到最高，与此同时，出现少量的神经细胞早、中期标记物 NSE、神经胶质细胞标记物 GFAP 的表达；诱导 6 天，Nestin 表达减弱，部分细胞出现 NSE 表达，少量细胞出现 NF200 表达，同时许多细胞表达 GFAP(图 9、10)。



图 9 未转染的 MSCs 诱导 6 天，NSE 染色结果(Cy3，×300)

转染 mNotch－1shRNA 组诱导 24h，Nestin 表达增强，NSE 表达高于未转染组，同时出现少量 NF200 表达；诱导 6 天，Nestin 表达消失，NSE、NF200 的表达均高于未转染组。此外，未见 GFAP 表达(图 11～14)。转染 mGAPDHshRNA 组诱导后染色结果类

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 10 未转染的 MSCs 诱导 6 天，CFAP 染色结果(Cy3，×300)

似未转染组(表 2)。提示转染 mNotch－1shRNA 的 MSCs 向神经细胞的分化效率显著提高。

表 2 转染对各组神经细胞和胶质细胞表达特异性蛋白的影响

	未转染组	转染组	转染对照组
Nestin	－/＋＋/±	±/＋＋/－	－/＋＋/±
NSE	±/＋/＋＋	±/＋＋/＋＋＋	±/＋/＋＋
NF200	－/－/±	－/＋/＋＋	－/－/±
GFAP	－/±/＋＋	－/－/－	－/±/＋＋

注：数据分别代表诱导前/诱导 24h/诱导 6 天的表达率



图 11 mNotch－1shRNA 转染 MSCs 诱导 24h，NSE 染色结果(Cy3，×150)

3 讨 论

1998 年，Fire 等首次提出 RNA 干扰(RNA interference，RNAi)，即引入双链小的 RNA，通过特异性结合互补链，促使 mRNA 降解，高效、特异的阻断体内特定基因表达/引发转录后沉默[3]。RNAi 技术比传统方法(反义核苷酸技术、基因敲除等)更快更方便地使基因表达沉默或基因表达降低，从而为干细胞相关基因功能的研究提供了更有效的工具[4,5]。RNAi 技术不仅有利于干细胞基因调控机制的研究，而且有利于研究干细胞的分化及其细胞、基因治疗。



图 12 mNotch－1shRNA 转染 MSCs 诱导 6 天，NSE 染色结果(Cy3，×150)



图 13 mNotch－1shRNA 转染 MSCs 诱导 6 天，NSE 染色结果(Cy3，×150)

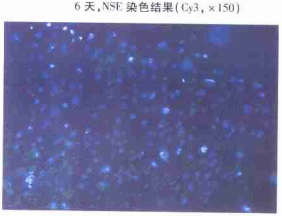


图 14 mNotch－1shRNA 转染 MSCs 诱导 6 天，CFAP 染色结果(Cy3，DAPI 复染×150)

本研究设计了针对小鼠 Notch－1 基因的 mNotch－1shRNA，利用转染技术将其导入 MSCs 中，通过免疫细胞化学染色等检测，发现转染成功的细胞立体感增强，Notch－1 表达消失。证实所设计 mNotch －1shRNA 可以成功的引发特异性

维普资讯 http://www.cqvip.com

Notch－1 基因沉默，为研究 MSCs 分化为神经细胞的机制建立了一个类似于 Notch－1“基因敲除”的体外模型。

Notch 信号途径是在多种细胞的特化(specification)中起关键作用的传导细胞间相互作用信号的途径，主要介导细胞的分化抑制信号，在胚胎发育、血细胞发育、肿瘤形成等生理病理过程中起重要作用。

大量的体内外实验证实，起源于外胚层的神经系统神经细胞和中胚层的造血系统的 MSCs 之间存在某种联系，可以彼此跨系统的横向分化[6-7]。但是，对 MS Cs 分化为神经细胞的机制了解甚少，是否与神经干细胞有类似机制，Notch 信号通路是否参与了分化过程等问题报道很少。本研究首次采用转染 mNotch－lshRNA，阻断 Notch 信号通路，观察该信号通路在 MSCs 分化中的作用。

为了排除其他信号通路的潜在影响，本研究选择了 Sanchez－Ramos 等建立的体外诱导 MSCs 分化为神经细胞方法。该方法模拟神经干细胞自然分化过程，在有血清条件下采用 BDNF、全反式维甲酸等诱导 MSCs 分化，诱导后细胞可以表达 Nestin、NSE、GFAP 等神经细胞或胶质细胞标记物。本研究发现，未转染和转染 mGAPDHshRNA 的 MSCs 诱导后，诱导效率比较低，定向性较差，同时分化为神经细胞和胶质细胞，与 Sanchez－Ramos 等报道相同[2]。而转染 mNotch－1shRNA 的 MSCs 向神经细胞的分化效率显著提高，无论是神经细胞早、中期标记物 NSE 还是成熟神经细胞标记物 NF200 的表达均高于未转染的和转染 mGAPDHshRNA 的，且未见 GFAP 表达。提示与神经干细胞类似，Notch 信号通路也可能参与了 MSCs 的横向分化过程，激活 Notch 信号通路会抑制 MSCs 的横向分化；阻断 Notch 信号通路后，MSCs 向神经细胞的分化则增加。

MSCs 不仅可以表达 Notch－1，而且表达配体 Jagged－1 及下游分子 DTX1，提示 Notch 信号可能对 MSCs 的增殖分化有调控作用[7]。本研究结果发现，mNotch－lshRNA 转染后 MSCs 细胞存活率下降，而且细胞形态发生变化；但是，转染 mGAPDHshRNA 对 MSCs 存活率影响不大，证实了 Notch－1 在 MSCs 保持自我更新、分裂等生理功能起到一定作用。

综上所述，本研究采用 RNAi 技术，抑制 Notch－1 基因的表达，从而促进了 MSCs 向神经细胞的分化效率，提示 MSCs 的横向分化过程可能与神经干细胞类似，阻断 Notch 信号通路，会增加 MSCs 向神经细胞分化的效果。本研究结果为 MSCs 定向诱导分化的应用提供了新的理论和实验依据。

(通讯作者：贾延劼，联系电话 0371－6664852)

参 考 文 献

[1]. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. Science, 2000; 290: 1775－1779.

[2]. Sanchez－Ramos JR, Song S, Cardozo－Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro[J]. Exp Neurol, 2000; 164:247－256.

[3]. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double－stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature, 1998; 391: 806－811.

[4]. Hannn GJ. RNA interference[J]. Nature, 2002; 418: 244－251.

[5]. Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash[J]. Science, 2002; 298:2296－2297.

[6]. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002; 418: 41－49.

[7]. Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, et al. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study[J]. Lancet, 2004; 363:1432－1437.

[8]. Artavanis－Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284: 770－776.