

骨髓基质细胞条件培养液诱导神经干细胞分化的信号转导机制

马芹颖^{1,2} 温雅² 顾平^{1,2*} 王彦永^{1,2} 王铭维^{1,2} 崔冬生² 刘力²

(¹河北医科大学第一医院神经内科, 石家庄 050031; ²河北省脑老化与认知神经科学实验室, 石家庄 050031)

摘要 研究MAPK信号转导通路在骨髓基质细胞条件培养液诱导神经干细胞分化中的作用及机制。用骨髓基质细胞条件培养液培养神经干细胞,并在培养体系中加入MAPK信号转导通路抑制剂PD98059 (ERK1/2通路抑制剂)、SB203580 (p38通路抑制剂)和genistin (JNK通路抑制剂),7天后经免疫荧光染色鉴定其后代中神经元和星形胶质细胞的比例,并将骨髓基质细胞条件培养液进行蛋白质微阵列检测。结果发现与对照组相比,PD98059和SB203580组神经干细胞分化为神经元比例降低,而星形胶质细胞比例增高,蛋白质微阵列检测发现骨髓基质细胞条件培养液中含有IL-4、IL-6、LIX和TNF- α 4种细胞因子。研究结果显示骨髓基质细胞分泌的IL-4、IL-6、LIX和TNF- α 4种细胞因子可能通过ERK1/2和p38信号转导通路调节神经干细胞的分化。

关键词 MAPK信号转导通路;神经干细胞;骨髓基质细胞;细胞因子;蛋白质微阵列分析

骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是骨髓来源的间充质干细胞,具有多分化潜能,其主要功能是支持和营养造血细胞^[1]。许多研究已证实BMSCs能分泌多种细胞因子,如白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-11(interleukin-11, IL-11)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)、粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)和干细胞因子(stem cell factor, SCF)等造血功能必需的细胞因子^[2]以及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)^[3]、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)^[4]等神经营养因子和一些炎症因子。本实验室的前期研究已证实BMSCs能够诱导中脑神经干细胞(neural stem cells, NSCs)分化为高比例神经元,并且还利用BMSCs条件培养液(BMSCs conditioned medium, BMSCs-CM)证实BMSCs分泌至培养液中的细胞因子等可溶性物质在这一过程中发挥了重要作用^[5]。而分化成的神经元具有必需的生理功能,如表达突触体素^[6]等。进一步研究还发现BMSCs分泌的可溶性物质可以抑制NSCs分化为星形胶质细胞^[7]。

促分裂酶原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)普遍存在于包括酵母和哺乳动物在内的多种生物细胞内,MAPK将细胞外信号转导至胞内,从而参与细胞的生长和分化、调节细胞周期和细胞凋亡等过程^[8]。MAPK信号转导通路以往在

肿瘤生长及转移的过程中研究较多,而MAPK超家族参与许多重要生长因子的调节,则是近年来生命科学的研究热点之一。本研究通过在培养体系中加入MAPK信号转导通路的抑制剂,观察其对NSCs分化为神经元和星形胶质细胞的影响,确定在这一过程中起作用的信号转导通路,并且对BMSCs-CM进行蛋白质微阵列分析,确定其中所含的细胞因子,初步探讨BMSCs调节NSCs分化的信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和动物

B27添加剂、DMEM/F12 (1:1)、Neurobasal和DMEM培养液为Gibco公司产品;胎牛血清为杭州四季青公司产品;碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、Hoechst 33258、抗微管相关蛋白-2 (microtubule associated protein-2, MAP-2)抗体、抗胶原原纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)和FITC标记的抗小鼠IgG抗体购于Sigma公司;含19种大鼠细胞因子抗体芯片的试剂盒购自美国Ray-Biotech公司;成年和新生SD大鼠均购自河北医科大学实验动物中心。

1.2 BMSCs的分离培养和条件培养液的制备

120 g SD大鼠麻醉致死,无菌条件下取出大鼠

收稿日期: 2009-01-02 接受日期: 2009-04-15

国家自然科学基金(No.30400138)和河北省自然科学基金(No.2008000993)资助项目

*通讯作者。Tel: 0311-85917258, E-mail: gpwh2000@yahoo.com.cn

分化状态: (1) BMSCs-CM 组: 细胞生长状况良好, 细胞核大小均一、饱满, 很少有破碎。MAP-2 阳性的神经元着色明显, 立体感强, 突起较长。神经元迁移距离远, 分布较均匀。GFAP 阳性的星形胶质细胞扁平无固定形态, 胞体细长, 分布较分散。(2) PD98059 组和 SB203580 组: 细胞生长状况略差, 与 BMSCs-CM 组相比, 视野中 MAP-2 阳性的神经元数量较少, GFAP 阳性的星形胶质数量较多, 胞体较大。Genistin 组则与 BMSCs-CM 组观察结果无明显差异。

2.2 各组中 NSCs 分化为神经元和星形胶质细胞的比例以及统计分析结果

培养 7 天后, 进行常规的 MAP-2 和 GFAP 免疫荧光化学染色并进行阳性细胞计数, 统计学结果显示: PD98059 组和 SB203580 组 NSCs 分化为神经元的比例明显低于对照组 ($P < 0.01$), 而 genistin 组与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 具体数据见表 2。

2.3 BMSCs-CM 蛋白质微阵列检测结果

BMSCs-CM 组和对照组 (含有 2% B27 的 Neurobasal 培养液) 大鼠细胞因子表达谱见图 1。抗体芯片检测结果表明, 与对照组相比, BMSCs-CM 组有 IL-4、IL-6、LIX (lipopolysaccharide-induced CXC chemokine) 和 TNF- α (tumor necrosis factor- α) 4 种细胞因子表达上调了 1.5 倍。

3 讨论

MAPK 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 普遍存

在于包括酵母和哺乳动物在内的多种生物细胞内, 其主要功能是将细胞外信号转导至胞内。MAPK 主要包括细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases, ERK1/2)、c-jun 氨基末端激酶 (c-jun terminal kinase, JNK)、p38 MAPK 等 MAPK 亚族, 主要分布在胞质区及核区, 其靶蛋白广泛分布在细胞内^[9]。MAPK 信号转导通路在进化中采用高度保守的三级激酶级联传递信号^[10]。MAPK 是该信号通路的枢纽, 能被生长因子、炎症因子、环境压力等多种刺激信号激活, 激活的 MAPK 通过磷酸化核转录因子、细胞骨架蛋白及酶类等, 参与细胞的增殖、分化、转化及凋亡的调节。ERK1/2 是所有 MAPK 家族成员中最早被认识, 而且是最具特征性的, 其被认为与细胞的增殖、转化和分化密切相关^[11]。JNK 信号转导途径在细胞应激反应中起重要作用, 并被多种细胞外应激信号激活, 因而 JNK 也被称为应激活化蛋白激酶 (SAPK)^[12]。P38 MAPK 在炎症、应激反应中具有重要作用, 此外其还参与细胞的存活、分化和发育等过程。

在本研究中, 在 NSCs 的 BMSCs-CM 培养体系中加入 3 种 MAPK 转导通路抑制剂后, 发现加入 PD98059 (ERK1/2 通路抑制剂) 和 SB203580 (p38 通路抑制剂) 培养 7 天后, NSCs 分化为神经元的比例明显低于对照组 ($P < 0.01$), 而 genistin (JNK 通路抑制剂) 组与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。从这一结果可以推断 BMSCs-CM 中的可溶性分子可能是通过

Table 2 The comparison of the percentages of neurons and astrocytes in different groups

The percentage of positive cells	BMSCs-CM group	PD98059 group	SB203580 group	Genistin group
MAP-2*	(55.52±11.35)%	(39.45±7.29)%*	(45.80±10.14)%*	(53.73±10.73)%#
GFAP*	(23.26±5.60)%	(31.01±8.96)%*	(32.39±3.91)%*	(25.09±6.20)%#

Compared with the BMSCs-CM group, * $P < 0.01$, # $P > 0.05$.

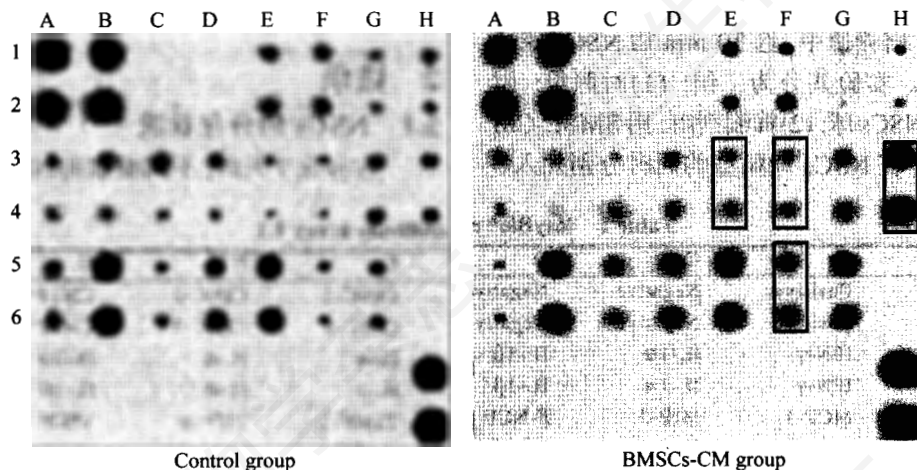


Fig.1 Protein express spectra of the two groups

ERK1/2 和 p38 通路促进 NSCs 向神经元方向分化, 加入抑制剂后, 这两条通路的某些环节被阻断, 因此神经元的比例明显降低。与此同时, 还发现加入 PD98059 和 SB203580 后, 星形胶质细胞的比例较对照组升高 ($P < 0.01$), 而 genistin 组与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明 ERK1/2 和 p38 通路可能还参与了抑制 NSCs 向星形胶质细胞方向分化的作用。为了进一步明确到底是 BMSCs-CM 中的何种物质激活了 ERK1/2 和 p38 通路, 我们对所用的 BMSCs-CM 进行了蛋白质微阵列分析。

蛋白质微阵列又称蛋白质芯片, 抗体芯片是一种特殊的蛋白质芯片, 芯片上固定的是特异性抗体, 可以通过特异性的免疫反应捕获待测样品中的抗原, 从而实现高通量免疫检测, 具有特异性和敏感性高(可达到 pg/ml)、检测范围广等优点, 是目前检测细胞因子的一种比较公认的方法。美国 Ray-Biotech 公司生产的大鼠细胞因子抗体芯片目前可以同时检测 19 种细胞因子, 在实验过程中为了保证结果的真实性, 我们将同批次的 Neurobasal 培养基中加入 2% B27 作为对照。蛋白质微阵列结果提示, 与对照组相比, BMSCs-CM 组有 4 种细胞因子的表达量上调了 1.5 倍, 分别是 IL-4、IL-6、LIX 和 TNF- α 。目前已有文献报道证实 BMSCs 可以分泌 IL-6^[2]、LIX^[13]、TNF- α ^[14]。IL-4 是一种抗炎细胞因子, 目前还没有其他证据表明 BMSCs 能够分泌 IL-4, 但已有研究表明 IL-4 可以调节 BMSCs 的分泌, 减少 LIF 的分泌, 并且能促进血清以及细胞因子诱导的 IL-6 和 IL-8 的分泌^[15]。

IL-6 是一种促炎症反应因子, 能够促进多种靶细胞分化和生长, 并且可以通过 MAPK 信号转导通路的激活发挥其作用。Westberg 等^[15]研究表明, 脑缺氧时星形胶质细胞分泌 IL-6 含量增多, IL-6 通过 MAPK 信号转导通路使神经元细胞内的 Stanniocalcin-1 (STC-1) 增多, 从而增加脑细胞对缺氧的耐受性。对糖尿病人患严重牙龈炎的分子机制的研究提示, IL-6 可以通过 p44/42 MAPK 通路(对应抑制剂为 PD98059) 和 JNK 通路的激活促进在高糖环境下成纤维细胞分泌血管内皮生长因子^[16]。TNF- α 是一种致炎细胞因子, 它不但可以诱导神经前体细胞的凋亡, 还能通过 p38 MAPK 信号转导通路使人的神经前体细胞分泌两种与大脑的炎症感染和炎症疾病有关的趋化因子 MCP-1/CCL2 和 IP-10/CXCL10^[17]。Luo 等^[18]研究表明, TNF- α 能激活成纤维样滑膜细胞中的 ERK、JNK 和 p38 MAPK 信号转导通路诱发炎症反应, 而热休克蛋白(HSP70)则可以抑制这种作用, 并且减少炎症因子 IL-6、IL-8 和 MCP-1 的分泌。LIX 是一个

被认为与细胞迁移和白细胞激活有关的趋化因子, Choong 等^[13]在蛋白质芯片发现造血微环境中存在 LIX 后, 经过半定量 PCR 证实 LIX 来源于造血基质细胞, 而进一步的研究发现 LIX 具有促进原始造血细胞增殖的作用。目前还没有明确证据表明 LIX 能够通过激活 MAPK 信号转导通路发挥作用。

在前期实验中, 当培养基为单纯的 Neurobasal 时我们运用同一种蛋白质芯片分析发现 BMSCs 分泌 7 种细胞因子, 分别为中性粒细胞趋化因子-3 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-3, CINC-3)、睫状神经营养因子(cholinergic neuronotrophic factor, CNTF)、干扰素- γ (immunoreactive fibronectin, IFN- γ)、白细胞介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、单核细胞的趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein, MCP-1)、金属蛋白酶组织抑制剂-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)^[19]。而本研究中加入 B27 添加剂之后, 发现 BMSCs 分泌的物质却完全不同, 提示 BMSCs 分泌的物质极其复杂, 甚至在不同的培养环境下分泌的物质也会有所不同。

而 MAPK 信号转导通路也是十分复杂的, 上述实验结果初步得出 BMSCs 提供的微环境能够提高 NSCs 分化为神经元的比例并降低其分化为星形胶质细胞的比例, 这些作用可能与 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号转导通路有关, 初步揭示了 NSCs 分化的信号转导机制, 而通过蛋白芯片分析发现的 BMSCs 分泌的 4 种细胞因子中部分因子也可以通过 MAPK 信号转导通路起作用, 则进一步加强了这种机制的可信度。研究 MAPK 通路在中枢神经系统疾病发生、发展过程中的变化规律, 对于弄清多种相关疾病发生、发展的分子机制, 从而采取合理的信号传导激活或阻断手段进行治疗具有重要价值。而本文对于 MAPK 通路在调节 NSCs 分化过程中所起作用的研究并不充分, 有待于进一步完善。

参考文献(References)

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells, *Science*, 2000, 287 (5457): 1433-1438
- [2] Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*: effects of dexamethasone and IL-1 alpha, *J Cell Physiol*, 1996, 166(3): 585-592
- [3] Chen X, Katakowski M, Li Y, *et al.* Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production, *J Neurosci Res*, 2002, 69 (5): 687-691
- [4] Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells increases the expression of growth factors

- in rat brain after traumatic brain injury, *J Neurotrauma*, 2004, 21(1): 33-39
- [5] Lou S, Gu P, Chen F, *et al.* The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats, *Brain Res*, 2003, 968(1): 114-121
- [6] 王彦永, 娄淑杰, 顾平, 等。中脑神经干细胞分化的神经元体外表达突触素的动态分析, *解剖学杂志*, 2005, 28(3): 255-257
- [7] 顾平, 王彦永, 马芹颖, 等。ERK1/2 信号转导通路对骨髓基质细胞条件培养液诱导大鼠中脑神经干细胞分化作用的影响, *第二军医大学学报*, 2007, 28(6): 589-592
- [8] Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade, *FASEB J*, 1995, 9(9): 726-735
- [9] Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation, *Oncogene*, 2004, 23(16): 2838-2849
- [10] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases, *Science*, 2002, 298(5600): 1911-1912
- [11] Adachi T, Kar S, Wang M, *et al.* Transient and sustained ERK phosphorylation and nuclear translocation in growth control, *J Cell Physiol*, 2002, 192(2): 151-159
- [12] Borsello T, Forloni G. JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration, *Curr Pharm Des*, 2007, 13(18): 1875-1886
- [13] Choong ML, Yong YP, Tan AC, *et al.* LIX: a chemokine with a role in hematopoietic stem cells maintenance, *Cytokine*, 2004, 25(6): 239-245
- [14] Denizot Y, Besse A, Raheer S, *et al.* Interleukin-4 (IL-4), but not IL-10, regulates the synthesis of IL-6, IL-8 and leukemia-inhibitory factor by human bone marrow stromal cells, *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1449(1): 83-92
- [15] Westberg JA, Serlachius M, Lankila P, *et al.* Hypoxic preconditioning induces neuroprotective stanniocalcin-1 in brain via IL-6 signaling, *Stroke*, 2007, 38(3): 1025-1030
- [16] Omori K, Naruishi K, Nishimura F, *et al.* High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts, *J Biol Chem*, 2004, 279(8): 6643-6649
- [17] Sheng WS, Hu S, Ni HT, *et al.* TNF- α -induced chemokine production and apoptosis in human neural precursor cells, *J Leukoc Biol*, 2005, 78(6): 1233-1241
- [18] Luo X, Zuo X, Zhou Y, *et al.* Extracellular heat shock protein 70 inhibits tumour necrosis factor- α induced proinflammatory mediator production in fibroblast-like synoviocytes, *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(2): R41
- [19] 顾平, 马芹颖, 王彦永, 等。骨髓基质细胞条件培养液调节神经干细胞分化有效成分的蛋白质微阵列分析, *解剖学杂志*, 2008, 39(6): 70-74

The Signal Transduction Pathway of NSCs' Differentiation Induced by BMSCs Conditioned Medium

Qin-Ying Ma^{1,2}, Ya Wen², Ping Gu^{1,2*}, Yan-Yong Wang^{1,2}, Ming-Wei Wang^{1,2}, Dong-Sheng Cui², Li Liu²

¹Department of Neurology, First Hospital Affiliated Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China;

²Hebei key Laboratory for Brain Ageing and Cognitive Neuroscience, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract To explore the effect and mechanism of mitogen-activated protein kinase (MAPK) on the procedure that bone marrow stromal cells (BMSCs) conditioned medium regulate the differentiation of neural stem cells (NSCs). BMSCs conditioned medium was used to culture NSCs, MAPKs signal transduction pathway inhibitor, PD98059 (an inhibitor of ERK1/2 signal transduction pathway), SB203580 (an inhibitor of p38 signal transduction pathway) and genistin (an inhibitor of JNK signal transduction pathway) was added in the conditioned medium, respectively. Immunocytochemistry was performed to identify the neurons and astrocytes in the offspings at the 7th day and the percentage of each type further as worked out, then BMSCs conditioned medium was detected by protein microarray for a further study for the mechanism. The percentage of neurons in the PD98059 group and SB203580 group was significantly decreased, but the percentage of astrocytes was significantly increased compared with the control group. Four cytokines including IL-4, IL-6, LIX and TNF- α were detected in the BMSCs conditioned medium. The dissolvable molecules of IL-4, IL-6, LIX and TNF- α secreted by BMSCs could regulate the differentiation of NSCs probably via the ERK1/2 and p38 signal transduction pathway.

Key words MAPK signal transduction pathway; neural stem cells; bone marrow stromal cells; cytokines; protein array analysis

Received: January 2, 2009 Accepted: April 15, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30400138) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.2008000993)

*Corresponding author. Tel: 86-311-85917258, E-mail: gpwh2000@yahoo.com.cn