

# THBS4上调转录因子Ngn1影响NG2细胞的体外神经元分化

杨海杰\* 付启冉 雷冰冰 袁昕 尚思楠 冯志伟\*

(新乡医学院生命科学技术学院, 新乡 453003)

**摘要** NG2细胞作为中枢神经系统中的第四类胶质细胞群体, 具备分化成神经元的潜力, 或许可为神经细胞的再生治疗提供细胞来源。但NG2细胞向神经元转分化的具体机制尚未完全明了。该研究发现, 血小板反应蛋白4(thrombospondin 4, THBS4)参与了NG2细胞的神经元分化。THBS4过表达时, NG2细胞中的多个神经元标志物的mRNA和蛋白质表达水平均显著上调, 如Tuj1、MAP2、NeuN。相对应地, 胶质细胞的标志物表达则出现明显下调, 如GFAP和Olig2。当THBS4基因沉默后, 这些标志物的表达趋势刚好相反。对NG2细胞分化过程中转录因子的研究表明, THBS4介导的NG2细胞分化可能与转录因子Ngn1、ATF6、Olig2有关。研究结果表明, THBS4可以促进NG2细胞向神经元转分化, 这为NG2细胞应用于神经损伤的治疗提供有利的理论依据。

**关键词** NG2细胞; 血小板反应蛋白4; 转录因子; 神经分化; 胶质细胞

## Upregulation of Ngn1 by THBS4 Affects Neuronal Differentiation of NG2 Cells *In Vitro*

YANG Haijie\*, FU Qiran, LEI Bingbing, YUAN Xin, SHANG Sinan, FENG Zhiwei\*

(School of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

**Abstract** As the fourth type of glial cell population in central nervous system, neuron-glia antigen 2 (NG2)-positive cells have the potential to differentiate into neurons and provide a potential source of cells for the regenerative treatment of neural injuries. However, the specific mechanism underlying neuronal transdifferentiation of NG2 cells is still unclear. In this study, we founded that thrombospondin 4 (THBS4) was involved in neuronal differentiation in NG2 cells. When THBS4 was overexpressed, the mRNA and protein expression levels of neuronal markers in NG2 cells were significantly up-regulated, such as Tuj1, MAP2, and NeuN. The expression of markers of glial cells was down-regulated, such as GFAP and Olig2. Conversely, when THBS4 was silenced, the expression pattern of these markers was just the opposite. Studies on transcription factors during NG2 cell differentiation indicated that THBS4-mediated NG2 cell differentiation may be associated with transcription factors Ngn1, ATF6, and Olig2. Our results suggest that THBS4 can promote the trans-differentiation of NG2 cells to neurons. It may support a theoretical basis for applying NG2 cells to the treatment of neurological diseases.

**Keywords** NG2 cells; thrombospondin 4; transcription factors; neuronal differentiation; glial cell

收稿日期: 2019-04-29 接受日期: 2019-06-17

国家自然科学基金(批准号: 81671226、81771336)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0373-3831165, E-mail: hjyang\_wmd@hotmail.com; xxyxy\_fzw@163.com

Received: April 29, 2019 Accepted: June 17, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81671226, 81771336)

\*Corresponding authors. Tel: +86-373-3831165, E-mail: hjyang\_wmd@hotmail.com; xxyxy\_fzw@163.com

网络出版时间: 2019-09-30 10:39:30 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190930.1037.014.html>

成年哺乳动物的大脑皮层再生神经组织的能力有限,这是由于神经前体细胞(neural progenitor cell, NPC)迁移分化的能力有限。为了打破这一限制,近年来有学者将注意力投向胶质细胞。NG2(neuroglial antigen 2)细胞,亦称为少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cell, OPC)。作为中枢神经系统中的第四类胶质群体<sup>[1]</sup>, NG2细胞广泛存在于中枢神经系统中,占成年白质细胞总数的8%~9%,成年灰质细胞总数的2%~3%<sup>[2]</sup>。早期人们发现,在体外培养条件下, NG2细胞能够分化为少突胶质细胞和少许星形胶质细胞<sup>[3]</sup>,故被认为是少突胶质细胞的前体细胞。随着研究的不断深入,人们发现NG2细胞还能够重新编程为中枢神经系统的多能干细胞<sup>[4]</sup>,使得NG2细胞具备分化成神经元的潜能<sup>[5-6]</sup>。我们前期利用胚胎大鼠的NG2细胞构建了NG2的永生化细胞系,并证实该细胞系在体内、体外均能转分化为神经样细胞<sup>[7-9]</sup>。欲将NG2细胞应用于神经损伤的临床治疗,需要对其神经转分化的分子机制进行深入了解,但目前人们对此了解甚少。

血小板反应蛋白4(thrombospondin 4, THBS4)是细胞外基质分泌的蛋白质,参与调控诸如伤口愈合、血管生成、细胞增殖、黏连、黏附、迁移、神经发育等多种生理过程<sup>[10]</sup>。THBS4是THBS家族的成员之一,最初在非洲爪蟾胚胎中被发现<sup>[11]</sup>。有证据表明, THBS4与神经-肌肉接头的正常结构形成有关,并且在肌肉去神经后表达量显著增加<sup>[12]</sup>。大脑处理信息的功能单位是突触,而THBS4与突触的形成有关,在神经元中发现了高水平的THBS4,这可能跟神经系统中富含突触有关<sup>[13]</sup>。这些研究提示, THBS4可能影响NG2细胞的分化,但具体机制尚不清楚。

神经元再生能力差,一旦损伤难以恢复,因此目前临床上缺乏治疗神经损伤的有效手段。相比较,当前最有希望的治疗方法是替代治疗<sup>[14]</sup>。该研究中,我们使用永生化的大鼠NG2细胞作为模型<sup>[7-9]</sup>,深入研究了THBS4对NG2细胞分化的影响及其内在机制。该研究旨在为NG2细胞应用于神经损伤的临床治疗提供一定的理论和实验依据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料及主要试剂

神经元标志物——微管相关蛋白2(microtu-

bule-associated protein 2, MAP2)、NeuN、Tuj1的抗体购自美国Cell Signaling Technologies公司;胶质细胞标志物——髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、2',3'-环核苷酸磷酸二酯酶(2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase, CNPase)、活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)、Olig2及内参GAPDH的抗体购自美国Proteintech公司; THBS4的抗体购自美国RD systems公司;山羊抗兔、抗鼠IgG购自美国CST公司; DME/F12基础培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自HyClone公司;胰蛋白酶、青霉素-链霉素购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;实时荧光定量PCR(qPCR)与逆转录试剂盒购自南京爱必梦生物材料有限公司;细胞裂解液RIPA与蛋白酶抑制剂购自上海生工生物工程有限公司;转染试剂聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)购自Sigma公司。

HBLV-THBS4-GFP-PURO重组慢病毒和HBLV-GFP-PURO对照慢病毒由上海汉恒生物科技有限公司制备,病毒滴度 $1 \times 10^8$  TU/mL。THBS4的siRNA和阴性对照的siRNA由上海吉玛基因公司制备。

### 1.2 细胞培养

我们使用构建的永生化大鼠NG2细胞系G23作为模型<sup>[12-14]</sup>。在DME/F12培养基中加5% FBS并加入青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 mg/mL)制成完全培养基,使用全培养基在37 °C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养细胞。当细胞密度接近90%时,按照1:3比例传代。

### 1.3 病毒感染

细胞传代时将NG2细胞铺与6孔板中,细胞贴壁后取出一半体积的培养基,加入基因转染试剂Polybrene(6 μg/mL)后,加入7 μL病毒。Veh(Vehicle)表示空病毒感染的阴性对照细胞, THBS4表示THBS4重组病毒感染的细胞。培养4 h后补足培养基,24 h后更换培养基。病毒感染细胞48 h后,收集细胞提取蛋白以及RNA样品,在-80 °C中保存待用。

### 1.4 siRNA转染

siRNA转染时,将0.4 μg siRNA和4 μL PEI混合于无血清培养基中,室温静置20 min后,加入预先铺有NG2细胞的36 mm培养皿中,4 h后更换培养基。为了提高转染效率,24 h后按照上述方法再次转染。二次转染24 h后收集细胞提取蛋白以及RNA样品,保存

于-80°C中待用。Scr(Scrambled siRNA)表示阴性对照的siRNA转染的细胞, siRNA表示THBS4特异性siRNA转染的细胞。

### 1.5 蛋白免疫印迹

在病毒感染及siRNA转染NG2细胞48 h后收集细胞, 然后用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液裂解细胞。每5 min旋涡振荡15 s, 振荡6次后4 °C、12 000 r/min离心10 min, 弃去沉淀后通过Bradford法检测蛋白质浓度。进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 上样量为10 μg/孔。根据蛋白marker电泳情况适时终止电泳, 将凝胶转移至PVDF膜上。5% BSA室温下封闭1 h, 特异性一抗4 °C孵育过夜。用辣根过氧化物酶缀合的二抗室温孵育1 h后, 用发光剂ECL显色曝光, 用ImageJ 1.48软件(National Institutes of Health, 美国)进行灰度分析。

### 1.6 RNA提取与qRCR

使用Trizol试剂提取总RNA, 将RNA按照逆转录试剂说明书将其逆转录为cDNA。再按照qPCR试剂盒说明书进行qPCR检测各种神经标志物信使RNA水平。使用的引物如表1所示。

### 1.7 统计分析

使用GraphPad Prism 6统计软件进行统计分析。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。*t*检验来分析组间的差异。概率值 $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 THBS4过表达病毒感染NG2细胞

为了探讨THBS4慢病毒对NG2细胞分化的影响, 使用HBLV-GFP-PURO及HBLV-THBS4-GFP-PURO重组慢病毒分别感染NG2细胞。如图1所示, 10倍镜视野下, 病毒感染48 h后的效率为55%~60%。

### 2.2 THBS4过表达能够促进NG2细胞的神经元分化

为了验证THBS4对NG2细胞分化的影响, 我们将THBS4过表达后, 用蛋白质免疫印迹实验分析THBS4对几种神经元相关标志物的蛋白质表达水平的影响(图2A)。相对于对照组而言, 神经标志物Tuj1、MAP2、NeuN、Synapsin的蛋白质表达水平分别提高至1.40倍( $P<0.01$ , 图2C)、1.80倍( $P<0.001$ , 图2D)、1.48倍( $P<0.05$ , 图2E)和1.25倍( $P<0.05$ , 图2F)。使用qPCR检测神经元相关标志物的mRNA水平(图2G), 神经标志物Tuj1、NeuN、MAP2、NF200的mRNA表达水平分别是对照的5.40倍( $P<0.001$ )、4.30倍( $P<0.01$ )、5.40倍( $P<0.001$ )和3.50倍( $P<0.01$ )。

### 2.3 THBS4沉默能够抑制NG2细胞的神经元分化

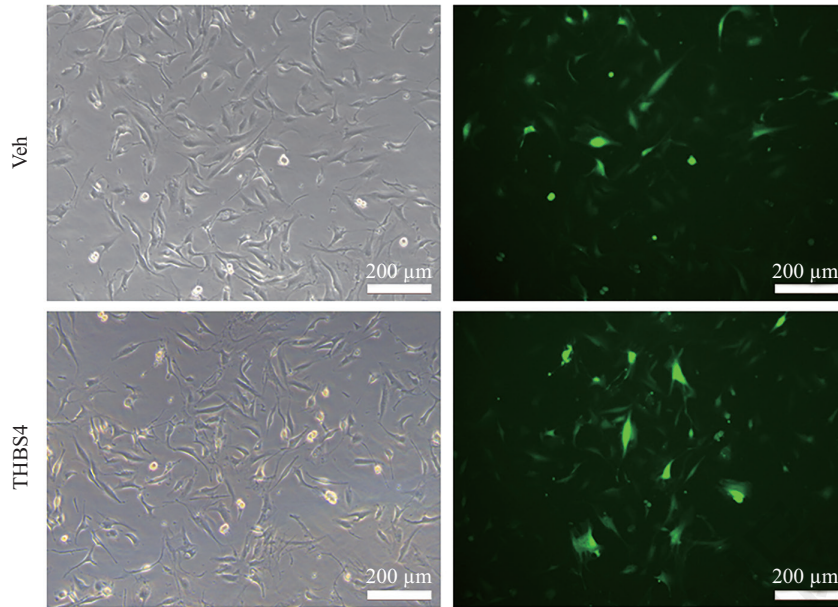
与预期结果相符, 使用siRNA可以有效沉默NG2细胞中THBS4的表达。我们发现, 神经标志物MAP2、Tuj1、NeuN的表达被抑制了(图3A~图3E), 分别是对照的0.54倍( $P<0.01$ )、0.65倍( $P<0.01$ )以及0.36倍( $P<0.001$ )。同时, 神经标志物mRNA的

表1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

基因 Genes	正向引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>GAPDH</i>	GGT CGG TGT GAA CGG ATT TG	GCT TCC CAT TCT CAG CCT TGA
<i>THBS4</i>	ATG TGA CGT GTG TGT GCG GT	GCG TCT TCT TGG CCG GAT TT
<i>NF200</i>	ACC TAT ACC CGA ATG CCT TCT	AGA AGC ACT TGG TTT TAT TGC AC
<i>NeuN</i>	CAG GCC TCA GAA ACA CAC AA	AGC ACC AGT AGA AAT GGA TGA
<i>Tuj1</i>	TGA CGA GCA TGG CAT AGA CC	TGT TGC CAG CAC CAC TCT GA
<i>NeuroD1</i>	CTT GGC CAA GAA CTA TAT CTG G	GGA GTA GGG ATG CAC CGG GAA
<i>MAP2</i>	ACT TAG TCG AAG CTT GGG GC	GGG TAG TTT GCC CTC CAG TC
<i>Reelin</i>	ATG TGA CGT GTG TGT GCG GT	GCG TCT TCT TGG CCG GAT TT
<i>GFAP</i>	ACG TTA AGC TAG CCC TGG ACA T	CTT GAG GTG GCC TTC TGA CA
<i>S100β</i>	GCC CTC ATT GAT GTC TTC CAT	CAG GAA GTG AGA GAG CTC GTT G
<i>MBP</i>	AGA GAC CCT CAC AGC GAC AC	GCC GTA GTG GGT AGT TCT TGT G
<i>SOX10</i>	CCA TCC GGA CTA CAA GTA CCA A	AGT GAG CCT GGA TAG CAG CA
<i>CNPase</i>	GTT CCG AGA CCC TCC GAA AA	GCC TTG CCG TAA GAT CTC CT
<i>Olig2</i>	CTG GCG CGA AAC TAC ATC CT	TGG GTA GAG GCG TCG AGT GT
<i>ATF6</i>	TCA AAA GCT CCT CGG TTC CC	CTGACCACATGGGTCGTCTC
<i>Ngn1</i>	AGC GCA ACC GTA TGC ATA AC	AAG CGC AGC GTC TCA ATC T



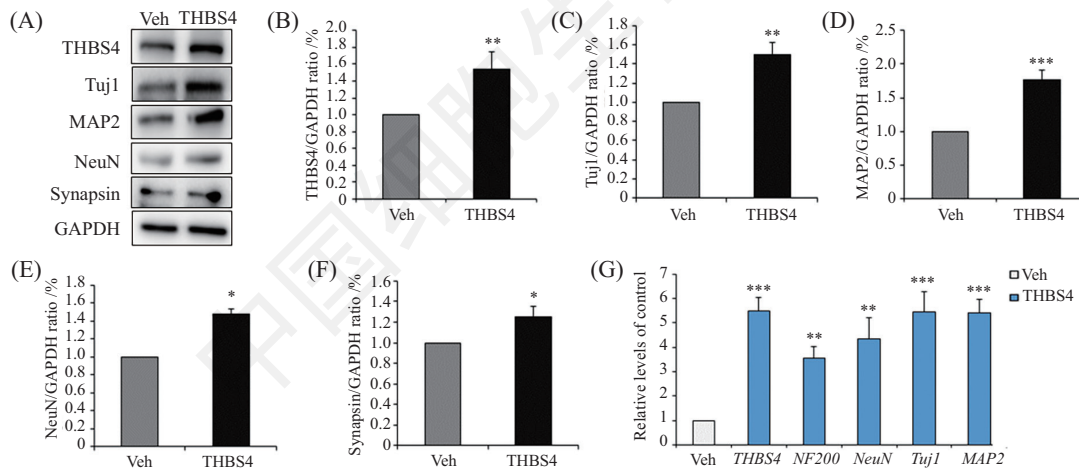


THBS4重组病毒(HBLV-THBS4-GFP-PURO, THBS4)和对照空病毒(HBLV-GFP-PURO, Veh)分别转染NG2细胞, 48 h后在可见光显微镜和荧光显微镜下观察转染效率。

NG2 cells were transfected with recombinant lentivirus containing plasmid HBLV-THBS4-GFP-PURO or HBLV-GFP-PURO, respectively. The transfection efficiency was observed under fluorescent microscope 48 h later, and the white light and fluorescent pictures were taken.

图1 THBS4重组慢病毒转染NG2细胞效率分析

Fig.1 Analysis of transfection efficiency of recombinant THBS4 lentivirus in NG2 cells



A: 病毒感染NG2细胞48 h后, THBS4和神经标志物蛋白的表达以及相对水平; B~F: 基于图A的灰度分析; G: 病毒感染NG2细胞48 h后, 神经标志物的mRNA相对表达水平。GAPDH设为内参。n=3, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与Veh组比较。

A: expression and relative levels of THBS4 and neural markers protein after 48 h of virus infection of NG2 cells; B-F: grayscale analysis of Figure A; G: relative expression level of mRNA of neural markers after virus-infected NG2 cells for 48 h. GAPDH is an internal reference. n=3, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with Veh group.

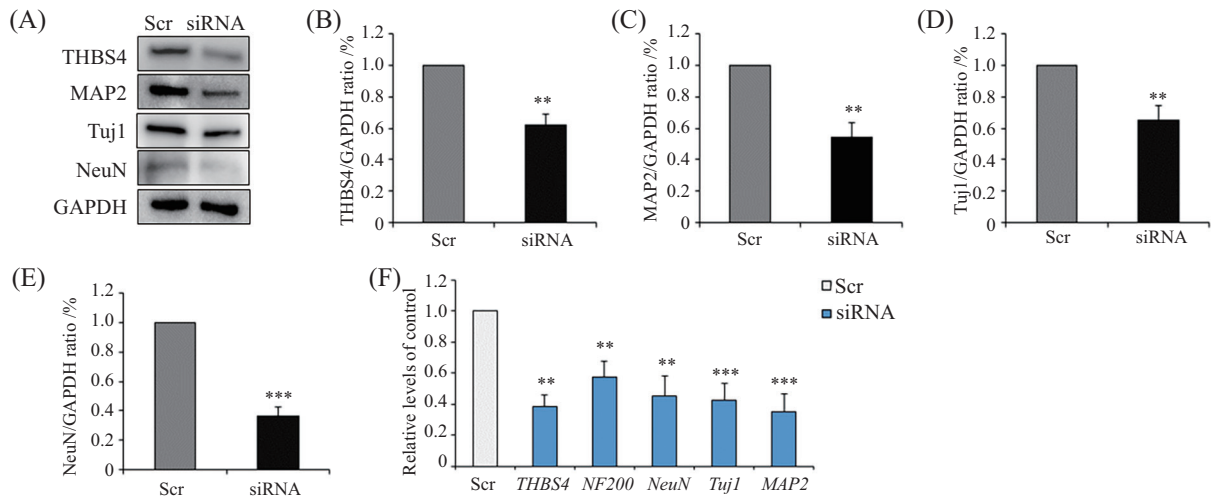
图2 THBS4过表达可以促进NG2细胞神经标志物的表达

Fig.2 Overexpression of THBS4 promotes expression of neuronal markers in NG2 cells

表达量也呈下调趋势, MAP2、Tuj1、NeuN、NF200的mRNA表达水平分别是对照的0.35倍( $P<0.001$ )、0.42倍( $P<0.001$ )、0.46倍( $P<0.01$ )和0.58倍( $P<0.01$ , 图3F)。这些结果说明, THBS4能够在体外促进NG2细胞的神经元分化。

## 2.4 THBS4过表达能够抑制NG2细胞的胶质细胞分化

接下来, 我们探讨THBS4对NG2细胞的胶质细胞分化是否有影响。我们用THBS4重组病毒感染NG2细胞后, 用蛋白免疫印迹实验检测胶质细胞

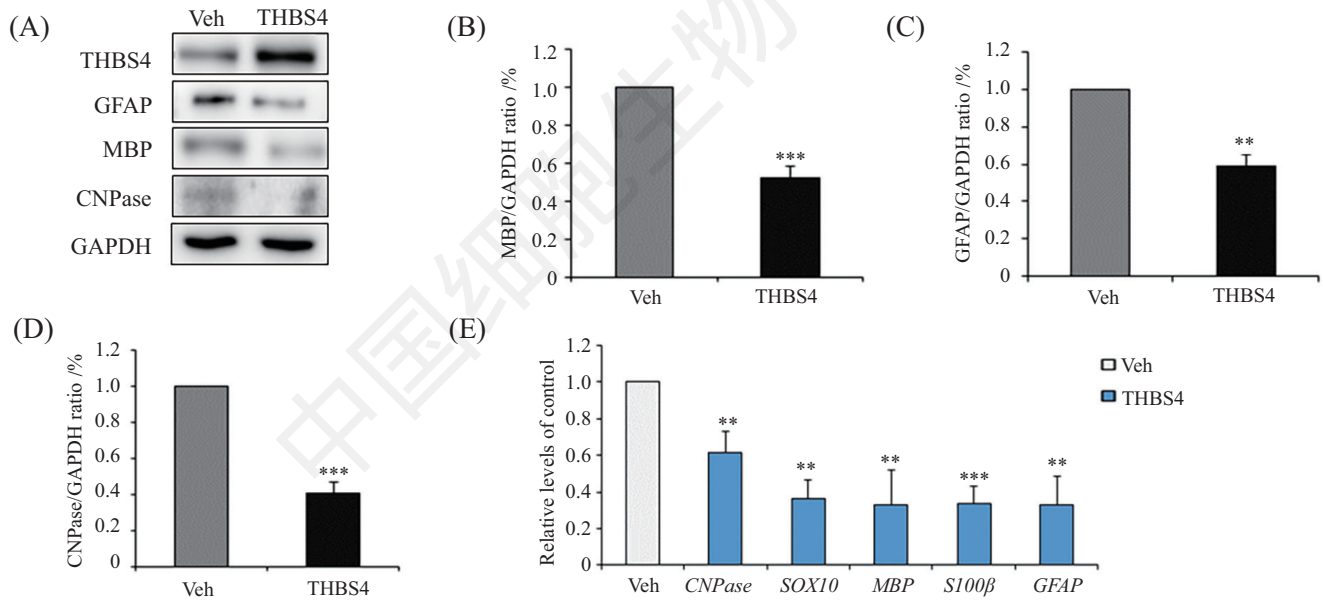


A: siRNA处理NG2细胞48 h后, THBS4和神经标志物蛋白的表达以及相对水平; B-E: 基于图A的灰度分析; F: siRNA处理NG2细胞48 h后, 神经标志物的mRNA相对表达水平。GAPDH设为内参。n=3, \*P<0.01, \*\*\*P<0.001, 与Scr组比较。

A: expression and relative levels of THBS4 and neural markers proteins after siRNA treatment of NG2 cells for 48 h; B-E: grayscale analysis of Figure A; F: relative expression level of mRNA of neural markers after 48 h of siRNA NG2 cells. GAPDH is an internal reference. n=3, \*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with Scr group.

图3 THBS4沉默抑制NG2细胞神经元标志物的表达

Fig.3 Silencing of THBS4 inhibits the expression of neuronal markers in NG2 cells



A: 病毒感染NG2细胞48 h后, THBS4和胶质细胞标志物蛋白的表达以及相对水平; B-D: 基于图A的灰度分析; E:病毒感染NG2细胞48 h后, 神经标志物的mRNA相对表达水平。GAPDH设为内参。n=3, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, 与Veh组比较。

A: expression and relative levels of THBS4 and glial markers protein after 48 h of virus infection of NG2 cells; B-D: grayscale analysis of Figure A; E: relative expression level of mRNA of glial markers after virus-infected NG2 cells for 48 h. GAPDH is an internal reference. n=3, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with Veh group.

图4 THBS4抑制NG2细胞中胶质细胞标志物的表达

Fig.4 THBS4 blocks the expression of glial markers in NG2 cells

标志物的表达(图4A)。结果发现, 当THBS4过表达时, 星形胶质细胞标志物GFAP下调为对照的0.58倍(P<0.01, 图4C)。少突胶质细胞的标志物MBP和CNPase分别是对照的0.52倍(P<0.001, 图4B)和0.40

倍(P<0.001, 图4D)。同时, 这些胶质细胞标志物的mRNA的表达也有不同程度的下调(图4E)。MBP、SOX10、CNPase、GFAP、S100β的mRNA水平分别是对照的0.33倍(P<0.01)、0.37倍(P<0.01)、0.63倍

( $P < 0.01$ )、0.33倍( $P < 0.01$ )和0.40倍( $P < 0.001$ )。

## 2.5 THBS4沉默能够促进NG2细胞的胶质细胞分化

用 siRNA 干扰 NG2 细胞中 THBS4 的表达。在蛋白免疫印迹实验中我们发现, 胶质细胞的标志物随着 THBS4 的下调, 出现了上调(图 5A)。相比对照, GFAP 的表达增加至 1.55 倍( $P < 0.01$ , 图 5B)。MBP 和 CNPase 的表达分别增加至 1.40 倍( $P < 0.05$ , 图 5C)和 2.40 倍( $P < 0.001$ , 图 5D)。使用 qPCR 检测胶质细胞标志物的 mRNA 水平(图 5E), 我们发现 MBP、SOX10、CNPase、GFAP、S100 $\beta$  的 mRNA 水平分别是对照的 4.40 倍( $P < 0.01$ )、3.20 倍( $P < 0.05$ )、3.80 倍( $P < 0.01$ )、5.80 倍( $P < 0.01$ )和 7.90 倍( $P < 0.001$ )。这些结果说明, THBS4 可在体外抑制 NG2 细胞的胶质细胞分化。

## 2.6 THBS4可能通过上调转录因子Ngn1, 下调Olig2、ATF6影响NG2细胞的分化

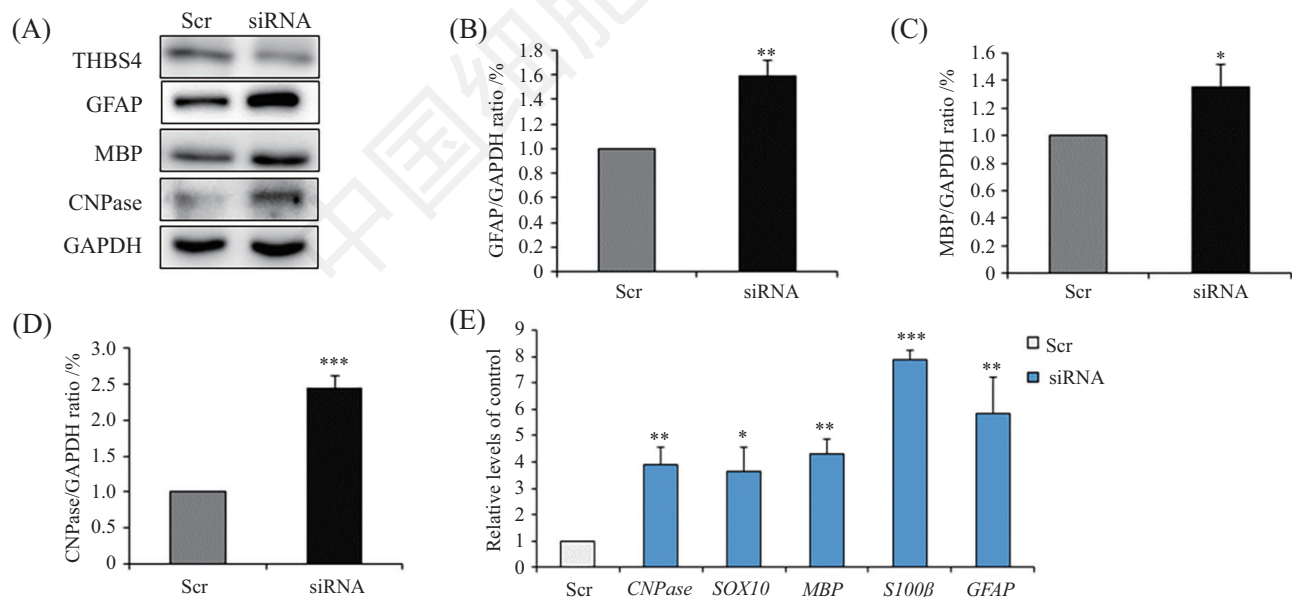
最后, 我们研究了 THBS4 过表达对转录因子表达的影响。通过 qPCR 实验, 我们发现, THBS4 介导的 NG2 细胞分化可能与转录因子 Ngn1、ATF6、Olig2 有关。当 THBS4 过表达时, 神经元分化相关转录因子 Ngn1 的 mRNA 表达水平是对照的 3.20 倍( $P < 0.05$ , 图 6G)。星形胶质细胞相关转录因子 ATF6 与少突胶质细胞谱系转录因子 Olig2 的蛋白质表达

水平分别是对照的 0.41 倍( $P < 0.001$ , 图 6C)和 0.53 倍( $P < 0.01$ , 图 6B)。与此结果对应, ATF6 与 Olig2 的 mRNA 表达水平分别降至对照的 0.31 倍( $P < 0.001$ , 图 6G)以及 0.42 倍( $P < 0.01$ , 图 6G)。而当 THBS4 沉默时, Ngn1 的 mRNA 水平是对照的 0.45 倍( $P < 0.01$ , 图 6H), ATF6 和 Olig2 的 mRNA 水平是对照的 8.80 倍( $P < 0.001$ , 图 6H)和 8.60 倍( $P < 0.001$ , 图 6H), 蛋白水平是对照的 2 倍( $P < 0.01$ , 图 6F)和 1.70 倍( $P < 0.001$ , 图 6E)。这些数据说明, THBS4 可能通过上调 Ngn1 表达促进 NG2 细胞的神经元分化, 且通过下调 ATF6 与 Olig2 表达来抑制 NG2 细胞的胶质细胞分化。

## 3 讨论

越来越多的证据显示, NG2 细胞可在体内、体外分化为神经元样细胞乃至神经元, 提示在神经系统疾病中使用内源性的 NG2 细胞促进神经再生的可能性<sup>[15-16]</sup>。然而, NG2 细胞属于少突胶质前体细胞, 其分化结局多数是少突胶质细胞和小部分星形胶质细胞<sup>[17]</sup>。寻找新的分子, 用来促进 NG2 细胞的神经转分化, 成为当前 NG2 细胞分化研究的一个热点。

该研究中, 我们发现血小板反应蛋白家族成员 THBS4 可以有效地促进 NG2 细胞向神经细胞分化,



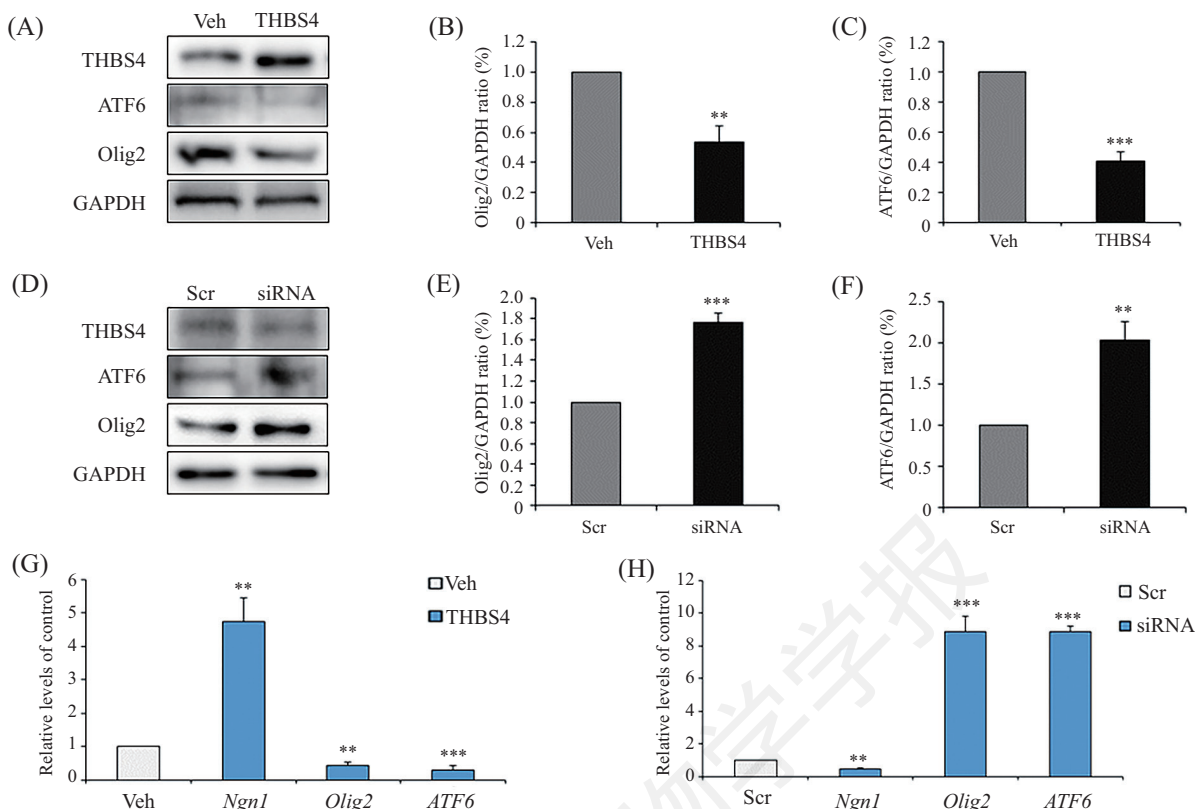
A: siRNA 处理 NG2 细胞 48 h 后, THBS4 和胶质细胞标志物蛋白的表达以及相对水平; B-D: 基于图 A 的灰度分析; E: siRNA 处理 NG2 细胞 48 h 后, 胶质细胞标志物的 mRNA 相对表达水平。GAPDH 设为内参。n=3, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与 Scr 组比较。

A: expression and relative levels of THBS4 and glial markers proteins after siRNA treatment of NG2 cells for 48 h; B-D: grayscale analysis of Figure A; E: relative expression level of mRNA of glial markers after 48 h of siRNA NG2 cells. GAPDH is an internal reference. n=3, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with Scr group.

图5 THBS4沉默促进NG2细胞胶质细胞标志物的表达

Fig.5 Silencing of THBS4 promotes expression of glial markers in NG2 cells





A~C: 病毒感染NG2细胞48 h后, 转录因子ATF6、Olig2的蛋白表达水平; D~F: siRNA处理NG2细胞48 h后, 转录因子ATF6、Olig2的蛋白表达水平; G: 病毒感染NG2细胞48 h后, 转录因子*Ngn1*、*ATF6*、*Olig2*的mRNA表达水平; H: siRNA处理NG2细胞48 h后, 转录因子*Ngn1*、*ATF6*、*Olig2*的mRNA表达水平。GAPDH设为内参。n=3, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, 与Scr组比较。

A~C: protein expression of transcription factors ATF6 and Olig2 after virus-infected NG2 cells for 48 h; D~F: protein expression of transcription factors ATF6 and Olig2 after siRNA treatment of NG2 cells for 48 h; G: mRNA expression of transcription factors *Ngn1*, *ATF6*, and *Olig2* after infection of NG2 cells for 48 h; H: mRNA expression of transcription factors *Ngn1*, *ATF6*, and *Olig2* after siRNA treatment of NG2 cells for 48 h GAPDH is an internal reference. n=3, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 compared with Scr group.

图6 THBS4上调转录因子Ngn1表达

Fig.6 Transcription factor Ngn1 is up-regulated by THBS4

同时还能显著抑制NG2细胞向胶质细胞分化。一般情况下, 当中枢神经系统受损时, NG2细胞活化增生, 迁移到病灶部位, 产生新生的星形胶质细胞和小胶质细胞, 形成胶质瘢痕<sup>[18]</sup>。一方面, 胶质瘢痕的形成可以封闭损伤部位, 保护受损神经组织, 另一方面, 胶质瘢痕也能够损害轴突生长, 导致神经元功能异常或者死亡<sup>[19]</sup>。结合我们的研究结果, 提示在神经损伤部位的NG2细胞中过表达THBS4后, 理论上可能同时诱发NG2细胞的神经转分化及抑制胶质细胞的过度产生。这将意味着在神经损伤部位, 同时实现了神经元的再生及胶质瘢痕的抑制。因此可以设想, 利用重组病毒或药物刺激神经损伤部位的NG2细胞表达THBS4, 或许可以作为神经损伤治疗的一种新策略。

THBS4作为THBS家族的一员, 迄今为止, THBS4有许多功能, 有一些功能使其与其他的THBS有所区

分。在某些方面, THBS4的作用与其他THBS成员恰恰相反, 诸如THBS1和THBS2因为其有效的抗血管生成而闻名<sup>[20]</sup>, 而THBS4的主要功能则是促血管生成<sup>[21]</sup>。THBS1促进纤维化<sup>[22]</sup>而THBS4抑制成纤维细胞的生长。该研究中, 我们发现THBS4作为一种信号分子(配体), 对NG2细胞的体外分化潜能具有明显的调节功能。THBS4不但促进NG2细胞的神经转分化, 还同时抑制NG2细胞的胶质分化潜能。该研究拓展了THBS4的生物学功能: THBS4不仅具有促进血管生成功能, 还可以调节NG2细胞的体外分化能力。

THBS4如何调节NG2细胞的神经转分化呢? 接下来, 我们研究了THBS4过表达对神经元特异性的转录因子Ngn1的影响, 发现THBS4可通过对转录因子Ngn1的诱导促进NG2细胞的神经转分化。Ngn1作为公认的促神经发生因子, 可以促进神经祖细胞以

及间充质干细胞生成神经元<sup>[23-24]</sup>。在体外研究表明,在Ngn1激活的同时会与启动子miR-9结合,下调Jak-Stat途径上的关键成分,实现Stat磷酸化的抑制,从而抑制星形胶质细胞的形成<sup>[25]</sup>。考虑到NG2细胞本质上也是一种胶质祖细胞<sup>[2]</sup>或前体细胞<sup>[4]</sup>,因此该研究结果进一步验证了转录因子Ngn1对多种祖细胞、干细胞的神经分化或转分化具有重要的促进作用。

THBS4又是如何调节NG2细胞的胶质细胞分化潜能呢?我们的研究发现,THBS4可显著下调星形胶质细胞转录因子ATF6及少突胶质细胞转录因子Olig2的表达,进而抑制NG2细胞在体外向胶质细胞的分化。以往研究发现,ATF6在帕金森综合征小鼠模型中能够促进星形胶质细胞活化与神经元的存活<sup>[26]</sup>。有趣的是,ATF6被抑制的同时可以起到抗细胞凋亡的作用<sup>[27]</sup>。结合我们的研究,THBS4在促进NG2细胞神经元分化的同时,又下调了转录因子ATF6的表达,这是否意味着THBS4在促进NG2细胞神经元分化的过程中同时能够起到神经保护的作用呢?当然这需要人们进行更深入的研究。作为少突胶质细胞系谱系转录因子,许多证据显示,过表达Olig2后可促进少突胶质细胞的形成<sup>[28-29]</sup>。弥漫性脑桥胶质瘤(diffuse intrinsic pontine glioma, DIPG)是一种预后不良的儿童高级脑干胶质瘤,在最新的研究中发现,Olig2是DIPG发生的必需因子,并建议将Olig2靶基因作为DIPG治疗中的新候选者<sup>[30]</sup>。结合我们的发现,过表达THBS4后可以降低Olig2的表达,这是否意味着THBS4对DIPG的治疗也是有益的?

该研究提供的证据表明,THBS4在体外环境中诱导NG2细胞的神经元分化。THBS4能够上调神经元标志物Tuj1、MAP2以及转录因子Ngn1的表达,而且THBS4还能抑制胶质细胞的标志物GFAP、Olig2以及转录因子ATF6和Olig2的表达。在以后的研究中,我们将借助体内实验,如大鼠脊髓或脑损伤动物模型,移植THBS4过表达的NG2细胞,或者用过表达THBS4的病毒感染神经损伤部位,深入评价基于THBS4过表达策略的实际疗效。总之,我们的研究结果支持NG2细胞能作为一个潜在的种子细胞用于神经损伤的治疗。

### 参考文献 (References)

- Butt AM, Hamilton N, Hubbard P, Pugh M, Ibrahim M. Synantocytes: the fifth element. *J Anat* 2005; 207(6): 695-706.
- Dawson MR, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 2003; 24(2): 476-88.
- Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 1983; 303(5916): 390-6.
- Kondo T, Raff M. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science* 2000; 289(5485): 1754-7.
- Berninger B. Making neurons from mature glia: a far-fetched dream? *Neuropharmacol* 2010; 58(6): 894-902.
- Lu HZ, Wang YX, Zou J, Li Y, Fu SL, Jin JQ, *et al.* Differentiation of neural precursor cell-derived oligodendrocyte progenitor cells following transplantation into normal and injured spinal cords. *Differentiation* 2010; 80(4/5): 228-40.
- Ju PJ, Liu R, Yang HJ, Xia YY, Feng ZW. Clonal analysis for elucidating the lineage potential of embryonic NG2<sup>+</sup> cells. *Cytotherapy* 2012; 14(5): 608-20.
- Ju P, Zhang S, Yeap Y, Feng Z. Induction of neuronal phenotypes from NG2<sup>+</sup> glial progenitors by inhibiting epidermal growth factor receptor in mouse spinal cord injury. *Glia* 2012; 60(11): 1801-14.
- Liu R, Zhang S, Yang H, Ju P, Xia Y, Shi Y, *et al.* Characterization and therapeutic evaluation of a Nestin<sup>+</sup>CNP<sup>+</sup>NG2<sup>+</sup> cell population on mouse spinal cord injury. *Exp Neurol* 2015; 269: 28-42.
- Stenina-Adognavi O. Thrombospondins: old players, new games. *Cur Opin Lipidol* 2013; 24 (5): 401-9.
- Lawler J, Duquette M, Whittaker CA, Adams JC, McHenry K, DeSimone DW. Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family. *J Cell Biol* 1993; 120(4): 1059-67.
- Arber S, Caroni P. Thrombospondin-4, an extracellular matrix protein expressed in the developing and adult nervous system promotes neurite outgrowth. *J Cell Biol* 1995; 131(4): 1083-94.
- Ebrahimi A, Keske E, Mehdipor A, Ebrahimi-Kalan A, Ghorbani M. Somatic cell reprogramming as a tool for neurodegenerative diseases. *Biomed Pharmacother* 2019; 112: 108663.
- Zhang S, Ju P, Tjandra E, Yeap Y, Owlansj H, Feng Z. Inhibition of epidermal growth factor receptor improves myelination and attenuates tissue damage of spinal cord injury. *Cel Mol Neurobiol* 2016; 36(7): 1169-78.
- Torper O, Ottosson DR, Pereira M, Lau S, Cardoso T, Grealish S, *et al.* *In Vivo* reprogramming of striatal NG2 glia into functional neurons that integrate into local host circuitry. *Cel Rep* 2015; 12(3): 474-81.
- Rivera A, Vanzuli I, Arellano JJ, Butt A. Decreased regenerative capacity of oligodendrocyte progenitor cells (NG2-glia) in the ageing brain: a vicious cycle of synaptic dysfunction, myelin loss and neuronal disruption? *Cur Alzheimer Res* 2016; 13(4): 413-8.
- Richardson WD, Young KM, Tripathi RB, McKenzie I. NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron* 2011; 70(4): 661-73.
- Schafer MKE, Tegeder I. NG2/CSPG4 and progranulin in the posttraumatic glial scar. *Matrix Biol* 2018; 68-69: 571-88.
- Moeendarbary E, Weber IP, Sheridan GK, Koser DE, Soleman S, Haenzi B, *et al.* The soft mechanical signature of glial scars in the central nervous system. *Nat Commun* 2017; 8: 14787.
- Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(10): a009712.



- 21 Muppala S, Xiao R, Krukovets I, Verbovetsky D, Yendamuri R, Habib N, *et al.* Thrombospondin-4 mediates TGF-beta-induced angiogenesis. *Oncogene* 2017; 36(36): 5189-98.
- 22 Zhou Y, Poczatek MH, Berecek KH, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin 1 mediates angiotensin II induction of TGF-beta activation by cardiac and renal cells under both high and low glucose conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 339(2): 633-41.
- 23 Han S, Dennis DJ, Balakrishnan A, Dixit R, Britz O, Zinyk D, *et al.* A non-canonical role for the proneural gene Neurog1 as a negative regulator of neocortical neurogenesis. *Development* 2018; 145(19).
- 24 Schack L, Budde S, Lenarz T, Krettek C, Gross G, Windhagen H, *et al.* Induction of neuronal-like phenotype in human mesenchymal stem cells by overexpression of Neurogenin1 and treatment with neurotrophins. *Tissue Cell* 2016; 48(5): 524-32.
- 25 Zhao J, Lin Q, Kim KJ, Dardashti FD, Kim J, He F, *et al.* Ngn1 inhibits astroglialogenesis through induction of miR-9 during neuronal fate specification. *Elife* 2015; 4: e06885.
- 26 Hashida K, Kitao Y, Sudo H, Awa Y, Maeda S, Mori K, *et al.* ATF6 $\alpha$  promotes astroglial activation and neuronal survival in a chronic mouse model of Parkinson's disease. *PLoS One* 2012; 7(10): e47950.
- 27 Zhang WG, Chen L, Dong Q, He J, Zhao HD, Li FL, *et al.* Mmu-miR-702 functions as an anti-apoptotic mirtron by mediating ATF6 inhibition in mice. *Gene* 2013; 531(2): 235-42.
- 28 Li P, Li M, Tang X, Wang S, Zhang YA, Chen Z. Accelerated generation of oligodendrocyte progenitor cells from human induced pluripotent stem cells by forced expression of Sox10 and Olig2. *Sci China Life Sci* 2016; 59(11): 1131-8.
- 29 Deng T, Postnikov Y, Zhang S, Garrett L, Becker L, Racz I, *et al.* Interplay between H1 and HMGN epigenetically regulates OLIG1&2 expression and oligodendrocyte differentiation. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(6): 3031-45.
- 30 Anderson JL, Muraleedharan R, Oatman N, Klotter A, Sengupta S, Waclaw RR, *et al.* The transcription factor Olig2 is important for the biology of diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro Oncol* 2017; 19(8): 1068-78.

中国细胞生物学学报