

· 基础研究 ·

Hes1 mRNA 在神经干细胞向神经细胞分化过程中表达变化的研究*

白瑞樱, 卢娜

(新乡医学院生理学与神经生物学教研室, 河南新乡 453003)

摘要:目的 探讨 Hes1 mRNA 在神经干细胞(NSC)向神经细胞分化过程中的表达变化。方法 构建乳鼠海马 NSC 的细胞培养模型,对 NSC 增殖分化进行形态学观察。细胞分化前后,采用免疫化学染色法分别检测巢蛋白(Nestin)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达,以鉴定细胞类型。流式细胞仪检测细胞周期以确定细胞增殖活性。用逆转录-PCR(RT-PCR)检测 NSC 中 Hes1 mRNA 的表达变化情况。结果 从海马分离培养的细胞生长状态良好,有克隆增殖能力,呈 Nestin 表达阳性,细胞分化后呈 NSE 表达阳性。流式细胞仪检测结果显示,诱导前 NSC 增殖活跃,其 S 期的细胞比例明显高于诱导分化各阶段的细胞比例($P < 0.01$)。与诱导前 NSC 相比,分化细胞各阶段 G_0G_1 期细胞比例则显著增多($P < 0.01$),细胞停滞于 G_0G_1 期。RT-PCR 结果表明,Hes1 mRNA 在 NSC 诱导分化前后均有表达,与诱导前相比,分化后的各阶段 Hes1 mRNA 表达量均明显减少($P < 0.05$),而分化各阶段 Hes1 mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 Hes1 mRNA 的高表达可能与 NSC 的增殖有关,而 Hes1 mRNA 表达的减弱则有利于神经细胞的大量分化。

关键词: 海马; Hes1; 神经分化; 神经干细胞; 逆转录-聚合酶链反应

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.029

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)33-4048-03

Study on expression of Hes1 mRNA during the differentiation of neural stem cells toward neurons*

Bai Ruiying, Lu Na

(Department of Physiology and Neurobiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To explore the expression of Hes1 mRNA during neural stem cells(NSC) differentiation toward neurons. **Methods** To establish the model of cultivation NSC in the hippocampal of newborn(24 h) SD rats, and then to observe the morphology of NSC in the course of proliferation and differentiation. Before and after cellular induction, the expression of Nestin and NSE were respectively measured to detect cell types by immunochemistry method. And flow cytometry was used to determine cell cycle phases, so as to detect proliferative activity of these cells. Meanwhile, the expression of Hes1 mRNA in NSC was determined by reverse transcription-PCR(RT-PCR). **Results** The results demonstrated that NSC isolated from hippocampal showed vigorously clonal proliferation in vitro, and positive Nestin expression. In addition, the differentiated cells demonstrated positive NSE expression. Flow cytometry analysis showed that the percentage of NSC in S phase was obviously higher than that of induced differentiation of all time($P < 0.01$), which indicated that NSC were actively dividing induction before. Compared to NSC, the percentages of cells in G_0G_1 phases were increased significantly after neuronal differentiation($P < 0.01$), which indicated that differentiated cells have arrested in G_0G_1 phases. Meanwhile, the results from RT-PCR showed that: Hes1 mRNA was expressed in NSC both before and after induced differentiation. Compared to induction before, the level of Hes1 mRNA expression in NSC during different stages of differentiation after induction were significantly decreased($P < 0.05$), and Hes1 mRNA did not show any obvious changes among these stages of differentiation($P > 0.05$). **Conclusion** The high level of Hes1 mRNA was probably involved proliferation of NSC. However, low level of Hes1 mRNA might contribute to neuronal differentiation.

Key words: hippocampus; Hes1; neuronal differentiation; neural stem cells; RT-PCR

研究表明,内源性神经干细胞(NSC)在信号分子的调控下能够分化为成熟神经细胞^[1]。体内 NSC 的发育受多种信号通路的调控,但其确切的调控机制仍尚未阐明,其中 Notch 信号通路是当前的热点之一^[2]。作为一个高度保守的信号通路,Notch 信号在多种细胞的发育过程中作为主要的仲裁信号调控细胞的生长发育、分化凋亡^[3]。Hes1 是 Notch 信号通路下游的一个信号分子,有关 Hes1 在 NSC 分化过程中作用的研究报道甚少。本实验选取 Hes1 作为研究对象,观察其在 NSC 向神经细胞分化中的表达情况,以了解 Hes1 信号分子与增殖分化的关系,并探讨 Notch-Hes 信号途径在 NSC 向神经分化中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康新生(24 h)SD 大鼠,体质量 5~6 g,雌雄不限,由新乡医学院动物中心提供,许可证号:SYXK 2006-0012。对实验动物的处置符合科技部 2006 年《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[4]。

1.1.2 主要试剂 Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)/F12 培养基、B27(Gibco 公司);bFGF、EGF(Sigma 公司);FBS(Hyclone 公司);兔抗鼠巢蛋白(Nestin)多克隆抗体、兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶(NSE)多克隆抗体、FITC 标记山羊抗兔 IgG、Rabbit SP 试剂盒(北京中杉生物技术有限公司);碘化丙啶(PI)、RNaseA(碧云天生物技术研究所);RNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒、RevertAidT First Strand cDNA Synthesis Kit、PCR Marker[生物工程(上海)股份有限公司合成]。

* 基金项目:河南省新乡医学院高学历人才科研资助项目(2007502002)。作者简介:白瑞樱(1978~),讲师,主要从事干细胞分化与调控的研究。

1.2 方法

1.2.1 NSC 的分离和传代培养 无菌条件下迅速分离海马组织,200 目滤网过滤,无血清完全培养基(DMEM/F12+2% B27+EGF 20 ng/mL+bFGF 20 ng/mL)重悬细胞制成单细胞悬液,调整细胞密度至 1×10^5 /mL 接种于培养瓶,置于 37 °C,5%CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。根据细胞生长情况进行传代。收集生长良好的第 3 代神经球,分别接种于培养瓶和 6 孔板中(孔中预先放置用多聚赖氨酸处理的盖玻片)。6 孔板中的神经球培养 4~6 h 后,进行 Nestin 免疫荧光化学染色。

1.2.2 NSC 的诱导分化 将第 3 代神经球机械分离后,用神经诱导培养基(DMEM/F12+2%B27+10%FBS)重悬细胞,分别接种于培养瓶和 6 孔板中(盖玻片处理同上)培养。取分化细胞进行 NSE 免疫化学染色。

1.2.3 Nestin 免疫荧光化学染色 取黏附有神经球的盖玻片,4%多聚甲醛固定,0.5% TritonX-100 孵育,5% BSA 封闭,滴加兔抗鼠 Nestin 多克隆抗体(1:200),湿盒内 4 °C 过夜,37 °C 孵育。以下操作需避光进行,加入 FITC-标记的山羊抗兔 IgG,37 °C 孵育,荧光封片剂封片。

1.2.4 NSE 免疫细胞化学染色 取黏附有分化细胞的盖玻片,4%多聚甲醛固定,3% H₂O₂,0.3% TritonX-100 孵育,2% 山羊血清封闭,滴加兔抗鼠 NSE(1:100),湿盒内 4 °C 过夜,加入生物素化二抗,37 °C 孵育。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.2.5 细胞增殖活性的测定 收集不同发育阶段的细胞:第 3 代 NSC,诱导分化 3 d、7 d 和 10 d 的细胞,4 °C 的 70%乙醇固定透膜 24 h,RNaseA 酶缓冲液(100 μg/mL RNaseA+20 μg/mL PI)重悬细胞,室温避光孵育 30 min,上机测试。

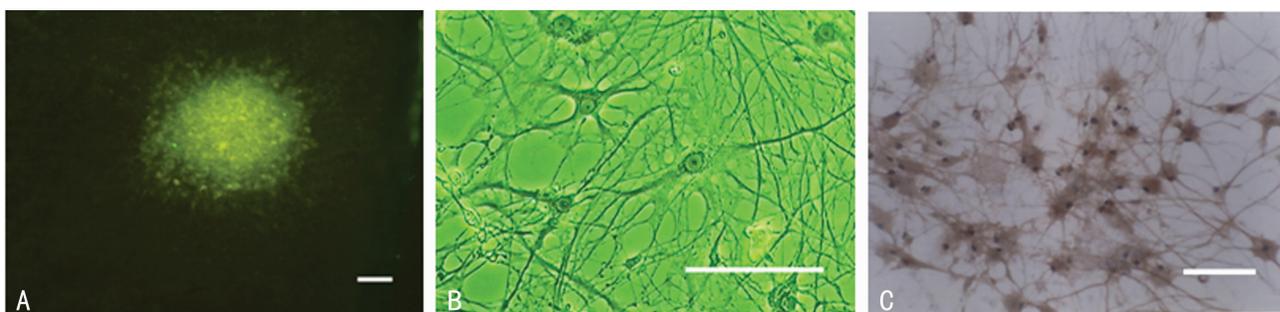
1.2.6 逆转录-PCR(reverse transcription-PCR,RT-PCR)检测 取上述各阶段细胞,提取细胞 RNA,用莫洛尼氏鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus,M-MLV)逆转录酶逆转录为 cDNA,PCR 检测 Hes1 mRNA 的表达,β-actin mRNA 做内对照。所用引物通过 Primer 5.0 程序自行设计,Hes1 mRNA 扩增片段(186 bp),F-Primer:5'-GCA CGA GCA GTT CGA AGC TC-3',R-Primer:5'-TTC CAT TTG CTT TTA TGT CC-3';β-actin mRNA 扩增片段(315 bp),F-Primer:5'-TCG TTC GGC CAC ATC GAA ACT-3',R-Primer:5'-GAC GAA TTT GTG GCG GAC GAT-3'。循环条件为 94 °C 5 min,94 °C 30 s,51 °C 50 s,72 °C 30 s,共 30 个循环,72 °C 5 min。PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,以 Bander leader 3.0 凝胶图像处理软件进行灰度值分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NSC 的传代和扩增培养 原代细胞接种培养 24 h 后,多数细胞死亡,少数细胞分裂增殖。6~9 d 后细胞增殖成球状,悬浮生长。传代后,细胞增殖迅速,随培养时间延长,神经球体积明显增大。Nestin 免疫荧光化学染色,神经球呈 Nestin 抗原阳性(图 1A),表明实验分离培养的细胞是 NSC。

2.2 NSC 的诱导分化及鉴定 对 NSC 进行诱导培养,1~3 d 后神经球贴壁生长,细胞从神经球周围迁出。6~8 d 后,细胞外迁生长明显,呈放射状,球体逐渐消失,代之以分散成片的细胞。10~14 d 后,细胞逐渐分化成熟,细胞突起交织成丛(图 1B)。NSE 免疫化学染色,分化细胞呈 NSE 抗原阳性(图 1C),说明 NSC 能被诱导分化为神经元样细胞。



A: Nestin 免疫荧光阳性的神经球;B:分化细胞的突起并交互形成网络状;C: NSE 免疫染色阳性的神经元样细胞;标尺:30 μm。

图 1 NSC 的增殖分化和免疫染色鉴定

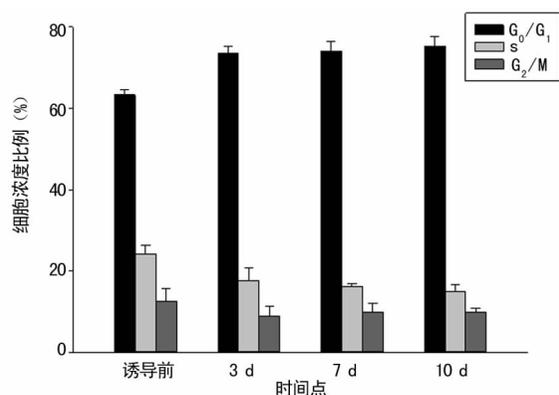


图 2 流式细胞仪检测细胞周期

2.3 细胞增殖活性的测定 NSC 处于 S 期的细胞比例明显高于诱导分化细胞的比例($P < 0.01$),与诱导前 NSC 相比,诱

导分化各阶段 G₀G₁ 期的细胞浓度比例显著增多($P < 0.01$)。这些结果表明,诱导前 NSC 处于较为活跃的 DNA 合成期,细胞处于增殖状态。而诱导后,分化细胞发生 G₀G₁ 期阻滞,细胞增殖发生抑制,细胞处于分化状态。见图 2。

2.4 NSC 分化前后 Hes1 mRNA 的表达情况 电泳条带灰度扫描分析结果显示,Hes1 mRNA 在 NSC 诱导分化前、后均有表达。诱导前,NSC 中 Hes1 mRNA 水平为 0.470 ± 0.009 ;诱导分化 3 d、7 d 和 10 d Hes1 mRNA 水平分别为: 0.241 ± 0.006 、 0.256 ± 0.007 及 0.266 ± 0.005 。与诱导前的 NSC 相比,分化细胞的 Hes1 mRNA 的表达量均明显减少($P < 0.05$),而分化各阶段之间 Hes1 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

在细胞增殖分化的领域,Notch 信号途径近年来备受关注^[3,5],Hes1 是 Notch 信号的靶基因,属于 bHLH 基因家族,在机体组织细胞系发育过程中短暂表达,与各系组织的发育有

关^[6-7]。但 Hes1 对成体 NSC 的调控机制还有待于更深入、细致的研究。因此,本实验建立体外乳鼠海马 NSC 增殖和分化的细胞模型,检测 Hes1 mRNA 的表达情况,以期观察和探讨 Hes1 对 NSC 增殖分化调控的内源性机制。

本实验从乳鼠海马取材获得细胞悬液进行体外培养,细胞增殖旺盛形成克隆球。免疫荧光化学方法检测增殖细胞 Nestin 的表达,结果显示克隆球呈 Nestin 抗原阳性。表明实验分离克隆的细胞为 NSC。实验进一步诱导 NSC 向神经细胞分化,NSC 分化后表现出典型的神经元形态,且细胞多表达神经元标记蛋白 NSE,提示 NSC 能被诱导分化为神经元样细胞。

为进一步探讨细胞的增殖与分化状态,采用流式细胞仪观察诱导前后细胞周期的变化。细胞周期进程受到严密调控,在 S 期与 G₁ 期之间存在一个关键的调控点,这是决定细胞究竟是进入 DNA 合成的 S 期,还是选择转入 G₁ 期走向分化的关键点^[8]。实验结果显示,诱导前 NSC 处于 S 期的细胞比例高于分化细胞 S 期的比例($P < 0.01$),证实 NSC 具有较强的分裂增殖能力,细胞处于增殖状态。与诱导前相比,分化各阶段的 G₀G₁ 期细胞比例显著增多($P < 0.01$),提示诱导过程参与细胞 S 期/G₁ 期的转换,干扰了 DNA 合成,使细胞阻滞于 G₀G₁ 期,增殖发生抑制,细胞进入分化状态。

同期,在 NSC 增殖分化的过程中,RT-PCR 检测细胞 Hes1 mRNA 的表达情况。结果表明,Hes1 mRNA 在 NSC 诱导分化前后均有表达。诱导前,在增殖旺盛的第 3 代 NSC 内 Hes1 mRNA 表达量较高。说明 Hes1 通过基因的转录将 Notch 信号下传,使 NSC 处于活跃的增殖状态,并稳定于干细胞的未分化状态。Arvidsson 等^[9]通过对脑缺血后受损部位内源性 NSC 的研究发现,脑缺血后 NSC 的确被 Notch-Hes 途径激活发生了细胞的增殖和迁移,这与本实验的结果是一致的。与诱导前相比,转入分化阶段的细胞,其 Hes1 mRNA 表达较增殖期明显减少($P < 0.05$),而分化各阶段之间 Hes1 mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。实验中观察到,NSC 从神经球迁出分化时,伴随细胞逐步分化成熟的过程,Hes1 mRNA 表达均处于低水平状态。说明 NSC 在向神经细胞分化的过程中,Notch 信号表达减弱,旁路抑制作用降低,细胞增殖发生抑制,细胞逐渐进行分化。这与 Ishibashi 等^[10]、Bai 等^[11]分别在 Hes1 基因敲除的小鼠胚胎和鸡胚实验中获得的实验结果有相似之处,他们指出,胚胎期神经系统发育过程中,Hes1 基因敲除会导致 Hes1 蛋白对 NSC 的旁侧抑制作用缺失,致使 NSC 的增殖能力明显下降,而进一步造成干细胞的耗竭,最终出现神经胚的发育缺陷。

综上所述,作为调控细胞发育的基因,Hes1 信号分子在不同情况下发挥着不同的调控效果。在 NSC 的克隆增殖阶段,Notch-Hes 信号转导途径通过调控 Hes1 mRNA 高表达,促进 NSC 的增殖。而在其分化阶段,Notch-Hes 信号会通过一些调控机制减弱 Hes1 mRNA 的表达,从而有利于神经元样细胞的大量分化。本实验初步观察并探讨了 Hes1 mRNA 与 NSC 增殖分化的关系,但 Hes1 基因在 NSC 中的功能还有许多问题需要研究^[12-13],如何人工调控不同时期 Hes1 信号的表达,从而实现对内源性 NSC 增殖分化的调控,对研究 Notch-Hes 信号

在干细胞发育过程的调控有着重要作用和意义。

参考文献:

- [1] Issei S, Matthew D, Matthew D, et al. Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke[J]. *Neurosci*, 2012, 32(23): 7926-7940.
- [2] Hirokazu Y, Takuya S, Makoto Y, et al. Lewis x-carrying n-glycans regulate the proliferation of mouse embryonic neural stem cells via the notch signaling pathway[J]. *Biol Chem*, 2012, 287(29): 24356-24364.
- [3] Yoon K, Gaiano N. Notch signaling in the mammalian central nervous system; insights from mouse mutants[J]. *Neurosci*, 2005, 8(6): 709-715.
- [4] 科技部. 关于善待实验动物的指导性意见[S]. 2006-09-30.
- [5] 白瑞樱,董鑫,王莉,等. 乳鼠海马神经干细胞向神经细胞分化过程中 Notch1 mRNA 的表达[J]. *重庆医学*, 2013, 42(1): 40-42, 45.
- [6] Aoife K, Sinead R, Eimer M, et al. Tumour necrosis factor- α impairs neuronal differentiation but not proliferation of hippocampal neural precursor cells; role of Hes1[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 43(1): 127-135.
- [7] Sang L, Collier HA, Roberts JM. Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1[J]. *Science*, 2008, 321(5892): 1095-1100.
- [8] Planas-Silva MD, Weinberg RA. The restriction point and control of cell proliferation[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(6): 768-772.
- [9] Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O. N-methyl-D-aspartate receptor mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke[J]. *Neurosci*, 2001, 14(1): 10-18.
- [10] Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, et al. Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects[J]. *Genes Dev*, 1995, 9(24): 3136-3148.
- [11] Bai G, Sheng N, Xie Z, et al. Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1[J]. *Dev Cell*, 2007, 13(2): 283-297.
- [12] Kobayashi T, Kageyama R. Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling[J]. *Genes Cells*, 2010, 5(7): 689-698.
- [13] Aujla PK, Bora A, Monahan P, et al. The Notch effector gene Hes1 regulates migration of hypothalamic neurons, neuropeptide content and axon targeting to the pituitary[J]. *Dev Biol*, 2011, 353(1): 61-71.

(收稿日期:2013-07-18 修回日期:2013-08-15)

(上接第 4047 页)

- sealing system[J]. *Arch Surg*, 2008, 143(6): 575-580.
- [10] Kontos M, Petrou A, Prassas E, et al. Pressure dressing in breast surgery; is this the solution for seroma formation[J]. *J BUON*, 2008, 13(1): 65-67.
 - [11] Kuroi K, Shimozuma K, Taguchi T, et al. Effect of me-

chanical closure of dead space on seroma formation after breast surgery[J]. *Breast Cancer*, 2006, 13(3): 260-265.

- [12] 何兆群. 乳晕边缘切口在乳腺纤维腺瘤手术中的应用[J]. *中华乳腺病杂志*, 2011, 5(1): 25-27.

(收稿日期:2013-07-21 修回日期:2013-08-19)