

EPO/EPOR 信号通路 对成体脊髓神经干细胞分化作用的实验研究

王少滨¹, 张辉², 李小波², 刘杰², 杜怡斌², 尹宗生¹

摘要 目的 研究促红细胞生成素(EPO)及其受体(EPOR)信号通路对大鼠成体脊髓神经干细胞(NSCs)分化的影响。方法 取成年SD大鼠脊髓细胞,在培养基DMEM/F12中进行培养,取第3代NSCs作为研究对象;在实验组的培养液中再加入重组人促红细胞生成素(rhEPO),同时在培养液中使用等体积生理盐水作为对照组。采用免疫荧光染色方法和Western blot法,检测NSCs上EPOR蛋白表达情况;采用免疫荧光染色法检测NSCs的分化现象。结果 免疫荧光染色结果显示实验组与对照组NSCs中均有EPOR蛋白表达,实验组较对照组增强;Western blot结果显示实验组EPOR蛋白表达水平较对照组增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);免疫荧光染色法显示实验组NSCs分化为神经元的

比例高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 rhEPO能激活EPO/EPOR信号通路,从而提高成体脊髓NSCs向神经元分化的能力。

关键词 神经干细胞;促红细胞生成素;分化;促红细胞生成素受体

中图分类号 R 651.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0804-05

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种人体肾小管周围细胞分泌的糖蛋白激素,具有刺激骨髓造血的功能。EPO/EPO受体(EPOR)不仅存在于红细胞,在非造血组织中也广泛存在^[1-3]。研究^[4]表明,EPO与其特异性受体EPOR结合,形成二聚体,触发邻近的JAK2酪氨酸激酶分子磷酸化,使其激活,进一步引发下游信号转导通路,从而发挥生物学效应。既往研究^[5-6]表明,适当浓度EPO可促进胚胎神经干细胞(neural stem cells, NSCs)向神经元分化。然而,目前国内外尚未见EPO在成体脊髓神经干细胞中的相关研究。该研究以成体脊髓NSCs

2016-01-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171173);安徽省自然科学基金(编号:11040606Q25)

作者单位:¹安徽医科大学第四附属医院骨科,合肥 230022

²安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:王少滨,男,硕士研究生;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

Research on the mice podocyte apoptosis and expression of the associated protein caused by TWP intervene sunitinib

Jiang Chao, Chen Yingxia, Qin Shukui, et al

(Dept of Medical Oncology, 81st Clinical Medical College of Anhui Medical University, Nanjing 210002)

Abstract Objective To observe the effect of sunitinib culturing mice podocyte *in vitro*, moreover, probe into the protective effect of *Tripterium wilfordii* polyglycosidium (TWP) to the cell trauma which caused by sunitinib and its mechanisms. **Methods** Cultured mice podocyte *in vitro*, after given medicine to different groups, detected the proliferation inhibiting rate, apoptosis rate and the expression status of the mice podocyte related protein (Nephrin, CD2AP) by MTT, FCM and Western blot methods. **Results** The proliferation inhibition rate of the mice podocyte was increased with the increasing of sunitinib dose and treated time ($P < 0.01$). The apoptosis rate of mice podocyte increased with the increasing of the dose of sunitinib at 48 h ($P < 0.01$). TWP could decrease the proliferation inhibition and apoptosis of the mice podocyte which caused by sunitinib at 48 h ($P < 0.05$), at the same time it could inhibit the decrease of the mice podocyte related protein (Nephrin, CD2AP) expression which caused by sunitinib ($P < 0.05$). **Conclusion** Sunitinib can damage mice podocyte, but TWP can induce the mice podocyte cell trauma caused by sunitinib through up-regulating Nephrin and CD2AP expression.

Key words sunitinib; anti-angiogenesis; *Tripterium wilfordii* polyglycosidium; mice podocyte; proteinuria

为研究对象,借助重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)作用于成体脊髓 NSCs,通过 EPO 激活 EPO/EPOR 信号通路,对成体脊髓 NSCs 的分化过程进行研究,为进一步研究 EPO 用于神经损伤修复提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 成体脊髓神经干细胞供体动物 成年 SD 大鼠 SPF 级 200 g 左右,雌雄不限,由安徽省实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 rhEPO 购自上海麒麟生物公司; DMEM/F12 (1:1) 培养基、B₂₇、左旋谷氨酸(L-glutamine) 购自美国 Gibco 公司;碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) 购自美国 Peprotech 公司; EPOR 抗体购自北京博奥森生物公司;大鼠抗巢蛋白(Nestin) 抗体、大鼠抗微管相关蛋白 2(microtubule associated protein 2, MAP-2) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗神经胶质原纤维酸性蛋白(glia fibrillary acid protein, GFAP) 抗体购自英国 Abcam 公司;多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物公司;二抗购自北京中杉金桥生物公司。

1.3 方法

1.3.1 成体脊髓 NSCs 分离、培养与鉴定

1.3.1.1 成体脊髓 NSCs 分离与培养 200 g 左右 SD 大鼠,颈椎脱臼处死后,无菌条件下取出胸腰段脊髓,剥离除去软脊膜和血管,剪碎并吹打成单细胞悬液,加入 NSCs 培养基(DMEM/F12 + 2% B₂₇ + 20 μg/ml EGF + 20 μg/ml bFGF) 中,根据细胞状态每 2~3 d 半量换液 1 次,培养 7 d 形成原代神经球;原代神经球经机械吹打后,形成神经干细胞的单细胞悬液,接种于新的培养瓶中培养,并通过培养液调整使其细胞密度为 1×10^5 /ml,再次传代培养 7 d 后得到第 3 代神经球。

1.3.1.2 NSCs 的免疫荧光鉴定 取培养的第 3 代神经球液体,放入 24 孔培养板中的预选包被多聚赖氨酸玻片上,置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 3 h,使其充分贴壁且不分化。然后吸尽液体,用多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗,加入羊血清封闭 40 min 后,吸弃血清,加入一抗 Nestin (1:100) 4 °C 孵育过夜,次日 PBS 洗 3 次,加入相应二抗进行荧光染色,避光条件下作用 1 h, Hoechst 33258 标记细胞核,取出玻片并封片,在荧光显微镜下观察 NSCs 标

记物的荧光。

1.3.2 实验分组、EPOR 检测与神经元数目比值计算方法

1.3.2.1 神经球实验分组 分为两组:实验组,为了激活 EPO/EPOR 信号通路,在第 3 代 NSCs 增殖期间,根据前期工作及参考文献^[5],培养液中加入浓度为 10 IU/ml 的 rhEPO,作用 24 h 后,将培养液重新更换为 NSCs 培养基,以消除培养液中 rhEPO 的影响,继续培养形成实验组神经球;对照组,用等量生理盐水替代 rhEPO,相同条件下形成对照组神经球。

1.3.2.2 NSCs 及其 EPOR 的免疫荧光观测 分别将实验组、对照组神经球吸出,移入到 24 孔培养板中的玻片上,置于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 3 h,使其充分贴壁且不分化,再加入一抗 Nestin (1:100) 及 EPOR 抗体(1:100) 4 °C 孵育过夜,次日 PBS 洗 3 次,加入相应二抗进行荧光染色,在显微镜下观测两组实验中的 NSCs 以及 EPOR 标志物的荧光。

1.3.2.3 NSCs 中 EPOR 的蛋白表达 分别将实验组和对照组神经球吸出,提取各自 NSCs 总蛋白,采取 Western blot 法检测 EPOR 蛋白表达量,先进行 SDS-PAGE 电泳、PVDF 膜转膜,脱脂牛奶封闭,加一抗 EPOR(兔抗 1:500) 以及内参一抗 β-actin(鼠抗 1:1000) 4 °C 孵育过夜,次日 TPBS 洗膜 3 次, PBS 洗膜 1 次,再加入辣根过氧化物酶标记的 EPOR 对应二抗(羊抗兔 1:10000) 以及 β-actin 对应二抗(羊抗鼠 1:10000),室温孵育 2 h, TPBS 洗膜 3 次, PBS 洗膜 1 次,加 ECL 显影液,获得实验 Western blot 条带图,并用 Image J 软件测量蛋白条带的灰度值,以 EPOR 蛋白与内参 β-actin 的灰度值比值作为 EPOR 蛋白的相对表达量,重复 4 次。

1.3.2.4 NSCs 分化实验与神经元比值计算 将实验组和对照组神经球吸出,分别转移到 24 孔培养板中的玻片上,加入含血清的 NSCs 分化培养基(DMEM/F12 + 2% B₂₇ + 10% 胎牛血清),培养 7 d 后,加入一抗 MAP-2 和 GFAP 4 °C 孵育过夜,次日 PBS 洗 3 次,加入相应二抗进行荧光染色,对 NSCs 分化形成的神经元和星型胶质细胞进行荧光染色,再加入 Hoechst 33258(10 μg/ml) 处理 40 min,对所有的细胞核进行荧光染色,在显微镜下观察并拍照。神经元数目比值计算方法:在显微镜下,随机取 20 个视野,计算 MAP-2 与 Hoechst 33258 双标阳性的细胞数,以及仅 Hoechst 33258 阳性细胞数目,计算

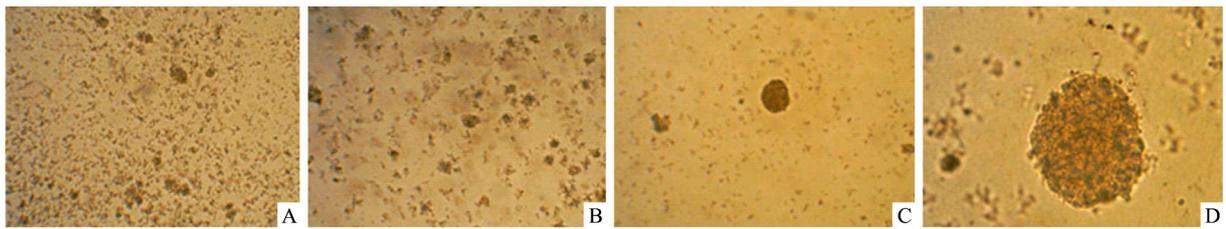


图1 第2代 NSCs 生长情况

A: 1 d ×200; B: 3 d ×200; C: 6 d ×200; D: 6 d ×400

其比值,定义为神经元数目比值。两组实验分别获得实验组、对照组的神经元数目比值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间资料比较采取 *t* 检验。

2 结果

2.1 成体脊髓 NSCs 分离、培养与鉴定 第3代 NSCs 培养过程中光镜下可见, 培养1 d 时存在大量圆形悬浮细胞, 培养第3 天出现了大量细胞聚集, 呈不规则团状, 培养至第6 天时, 增殖聚集成为体积更大的球状细胞团(图1)。倒置荧光显微镜下观察球状细胞团荧光染色的结果, 可见细胞球内存在大量通过 Nestin 标记的 NSCs, 以及被 Hoechst 33258 标记的有核细胞, 表明所见的球状细胞团包含 NSCs (图2)。

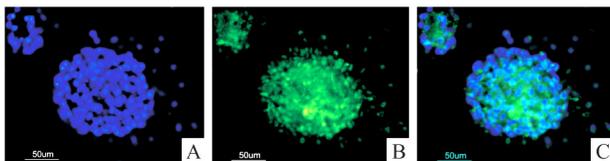


图2 NSCs 的免疫荧光鉴定结果 ×400

A: Hoechst 33258 标记细胞核; B: Nestin 标记 NSCs; C: 合成图像

2.2 NSCs 及其 EPOR 的免疫荧光观测 在倒置荧光显微镜下观察到的实验组和对照组 NSCs 及其 EPOR 荧光染色结果(图3), 被 EPOR 抗体标记的 EPOR 显示为红色, 被 Nestin 标记的 NSCs 显示为绿色, 并且两者形态相同, 表明 NSCs 上有 EPOR 表达; 对照组 NSCs 中存在 EPOR; 图3A1 单个神经球表面的 EPOR 抗体标记的荧光强度较图3A2 强。

2.3 NSCs 中 EPOR 蛋白表达 Western blot 结果 实验组和对照组 NSCs 均可表达 EPOR 蛋白(图4); 定量分析结果显示, 实验组 EPOR 蛋白相对表达量(0.96 ± 0.12) 较对照组(0.63 ± 0.13) 显著升高,

差异有统计学意义($t = -3.81, P < 0.01$), 见图4。

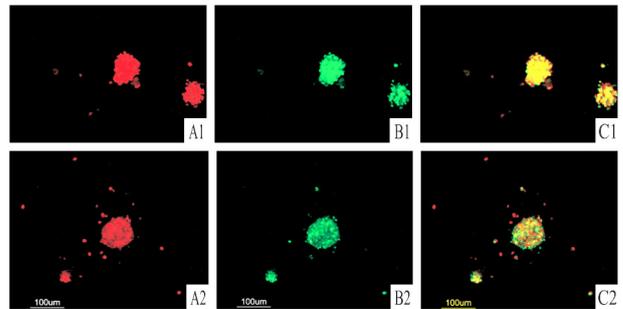


图3 EPOR 的免疫荧光观察 ×200

A: EPOR 抗体标记 EPOR; B: Nestin 标记 NSCs; C: 合成图像; 1: 实验组; 2: 对照组

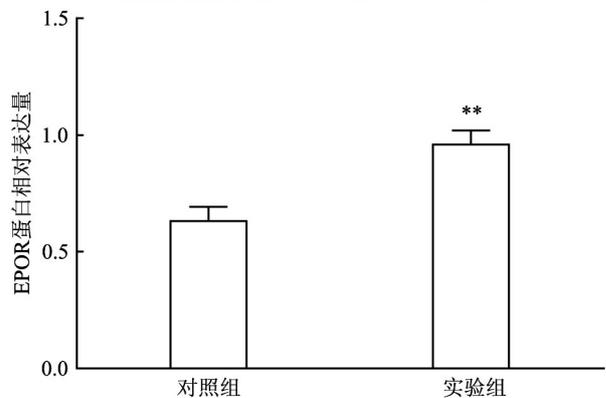
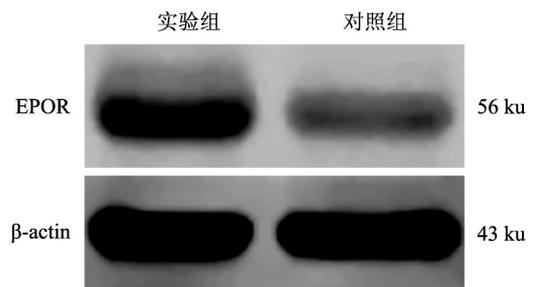


图4 EPOR 蛋白表达情况
与对照组比较: ** $P < 0.01$

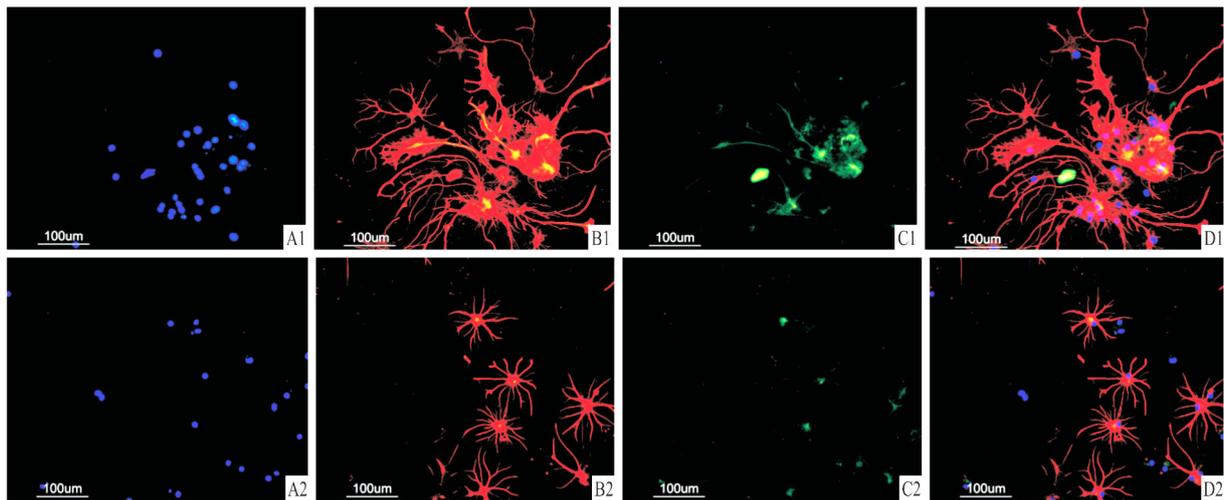


图5 NSCs分化显微镜观测结果 ×200

A: Hoechst 33258 标记细胞核; B: GFAP 标记星形胶质细胞; C: MAP-2 标记神经元; D: 合成图像; 1: 实验组; 2: 对照组

2.4 NSCs 分化实验与神经元数目比值计算结果

分化实验免疫荧光结果显示: 被 Hoechst 33258 标记的细胞核呈蓝色, 被 GFAP 标记的星型胶质细胞呈红色, 并具有星型特征, 被 MAP-2 标记的神经元呈绿色, 表明实验组和对照组 NSCs 已分化为星型胶质细胞及神经元, 但实验组 NSCs 分化能力较对照组强(图5)。实验组神经元数目比值为(29.51 ± 5.27)%, 对照组对应的比值为(20.20 ± 6.55)%, 差异有统计学意义($t=4.95$, $P<0.01$)。

3 讨论

成体神经干细胞是一种存在于成体动物神经组织区的 NSCs, 具有分裂增殖、自我维护以及分化为多种神经细胞的能力^[7]。由于成年哺乳动物的神经组织中广泛存在成体 NSCs, 获取简便, 且其具有潜在的神经生发作用, 成体 NSCs 在再生医学中有广阔的应用潜力。EPO 是一种人体肾小管周围细胞分泌的糖蛋白激素, 具有刺激骨髓造血的功能。EPO 作用于红细胞的机制现已阐明是和细胞膜上的 EPOR 受体相结合, 形成二聚体, 触发邻近的 JAK2 酪氨酸激酶分子磷酸化, 使其激活, 进一步引发下游信号转导通路, 包括磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt)、信号转导与转导活化因子 5 (STAT5)、蛋白激酶 C 以及 MAP 激酶, 从而发挥生物学效应^[4]。EPO 及其受体被发现存在于成熟神经元及胶质细胞^[8-9], EPO 对中枢神经系统的神经保护逐渐成为近年来的热点^[10]。EPO 在 NSCs 方面的研究^[5-6]目前集中在 EPO 促进胚胎 NSCs 增殖及

分化, 但对成体 NSCs 的分化研究未见报道。作为 EPO 的重组形态, rhEPO 的理化 and 生物学特性与 EPO 无差别。故本研究以成体脊髓 NSCs 为研究对象, 采用 rhEPO 作用于成体脊髓 NSCs, 研究 EPO/EPOR 通路在成体脊髓 NSCs 分化过程中的作用, 为探讨 rhEPO 在神经损伤修复中的可能作用机制提供实验依据。

本研究探讨了 EPO/EPOR 通路在成体脊髓 NSCs 中的作用。首先依照课题组前期方法^[11], 从成年 SD 大鼠脊髓内分离出 NSCs, 检测 NSCs 表面标记物 Nestin, 结果证实其为 NSCs。成体脊髓 NSCs 的 EPOR 免疫荧光染色结果显示, 实验组及对照组 NSCs 上均可表达 EPOR, 且实验组表达较对照组增强; Western blot 法对成体脊髓 NSCs 中的 EPOR 进行定量检测, 显示实验组及对照组均有 EPOR 蛋白表达, 且实验组表达较对照组显著增强。通过定性及定量两种检测方法均显示 rhEPO 可促进 NSCs 上的 EPOR 表达。成体 NSCs 的分化实验显示, 成体 NSCs 能在体外条件下分化为神经元及星型胶质细胞, 且加入 rhEPO 后, NSCs 分化为神经元数目比值显著增高, 表明 rhEPO 能促进成体脊髓 NSCs 向神经元方向分化, 这与 EPO 对胚胎来源神经干细胞的作用相一致^[5]。以上研究结果表明, rhEPO 能使 EPOR 蛋白表达增加, 并促进成体 NSCs 向神经元分化, 这可能是 rhEPO 通过激活 NSCs 的 EPO/EPOR 通路, 引起 EPOR 表达上调, 进而影响了成体 NSCs 的分化过程, 具体作用机制有待于进一步探讨。

综上所述, 成体大鼠脊髓组织分离培养可获得

NSCs 在 rhEPO 作用下,可能通过激活 EPO/EPOR 信号通路,促进 NSCs 向神经元方向定向分化。

参考文献

- [1] Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(9): 3974-8.
- [2] Teng R, Gavrilova O, Suzuki N, et al. Disrupted erythropoietin signalling promotes obesity and alters hypothalamus proopiomelanocortin production[J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 520.
- [3] Tsai P T, Ohab J J, Kertesz N, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(4): 1269-74.
- [4] Tanaka T, Nangaku M. Recent advances and clinical application of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(9): 1068-73.
- [5] 袁丽丽, 冯登殿, 孔佑华. EPO 促进胚胎神经干细胞向神经元分化的形态学研究[J]. *济宁医学院学报* 2014, 37(5): 313-5.
- [6] 赵舒武, 高英茂, 张晓丽, 等. EPO 对外体培养神经干细胞增殖、分化和凋亡的影响[J]. *神经解剖学杂志* 2007, 23(5): 549-53.
- [7] Bellenchi G C, Volpicelli F, Piscopo V, et al. Adult neural stem cells: an endogenous tool to repair brain injury? [J]. *J Neurochem*, 2013, 124(2): 159-67.
- [8] Bernaudin M, Bellail A, Marti H H, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain[J]. *Glia*, 2000, 30(3): 271-8.
- [9] Sirén A L, Knerlich F, Poser W, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain [J]. *Acta Neuropathol*, 2001, 101(3): 271-6.
- [10] Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, et al. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury[J]. *FASEB J*, 2005, 19(12): 1701-3.
- [11] 张辉, 张硕, 江正, 等. 组织块法体外分离培养大鼠脊髓成体神经干细胞[J]. *安徽医科大学学报* 2014, 49(12): 1815-8.

Experimental study on the effect of EPO/EPOR signaling pathway on the differentiation of neural stem cells in adult spinal cord

Wang Shaobin¹, Zhang Hui², Li Xiaobo², et al

¹Dept of Orthopaedics, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To study the influence of the erythropoietin(EPO) and erythropoietin receptor(EPOR) signaling pathway on the differentiation of adult rat spinal cord neural stem cells(NSCs) . **Methods** Adult SD rat spinal cord cells were cultured in DMEM/F12 medium and the 3rd generation of the NSCs was chosen as the experimental object: in the experimental group the recombinant human erythropoietin(rhEPO) was further added into the culture medium, meanwhile in a control group only using saline with an equal volume. By using immunofluorescence staining and Western blot, we measured EPOR expression in the NSCs, while we observed the differentiation of NSCs by immunofluorescence staining. **Results** The results of immunofluorescence staining showed that EPOR expression could be measured in both NSCs of the experimental group and the control group, and the experimental group EPOR protein maintained at a higher level than that of the control group. Western blot results showed that the expression level of EPOR protein in the experimental group was higher than that in the control group, the difference was statistically significant($P < 0.01$). Immunofluorescence staining results of differentiation showed the NSCs of experimental group could differentiate into neurons, whose different proportion was more than the control group, the difference was significant($P < 0.01$). **Conclusion** rhEPO can activate EPO/EPOR signaling pathway, thereby enhancing the differentiate ability of adult neural stem cells of spinal cord into neurons.

Key words neural stem cells; erythropoietin; differentiation; erythropoietin receptor