研究报告

VEGF 调控 Wnt/β-catenin 信号通路对少突胶质前体细胞增殖迁移的影响

孟祥武,陈　娟,黄　淼,瞿昌华,郑　龙*

(湖北民族学院附属民大医院神经内科,湖北 恩施　445000)

【摘要】　目的　探讨血管内皮细胞生长因子(VEGF)对少突胶质前体细胞增殖迁移的影响。**方法**　分离培养小鼠少突胶质前体细胞,VEGF 作用于少突胶质前体细胞 48 h,同时设置对照组,对照组不加 VEGF。MTT 检测细胞增殖情况,Boyden chamber 小室检测细胞迁移情况,Western blot 检测细胞中 MMP-9、MMP-2、β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白表达水平。用 Wnt/β-catenin 信号通路激活剂 LiCl 作用于少突胶质前体细胞 48 h,检测细胞增殖迁移情况。**结果**　VEGF 作用后的少突胶质前体细胞存活率和迁移细胞数均明显高于对照组($P < 0.01$)。VEGF 后的少突胶质前体细胞中 MMP-9、MMP-2、β-catenin、C-myc、cyclin D1 表达水平高于对照组($P < 0.01$)。Wnt/β-catenin 信号通路激活剂 LiCl 作用后的细胞增殖迁移情况与 VEGF 作用后的细胞增殖迁移情况趋势一致。**结论**　VEGF 促进少突胶质前体细胞增殖和迁移,作用机制与 Wnt/β-catenin 信号通路有关。

【关键词】　少突胶质前体细胞;Wnt/β-catenin 信号通路;VEGF;迁移
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 06-0040-06
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.06.008

Effect of VEGF-regulated Wnt/β-catenin signaling pathway on the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells

MENG Xiangwu, CHEN Juan, HUANG Miao, QU Changhua, ZHENG Long*
(Department of Internal Neurology, University Hospital of Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China)

【Abstract】　Objective　To investigate the effect of VEGF on proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells. **Methods**　To isolate and culture of oligodendrocyte precursor cells from mice. VEGF acts on the oligodendrocyte precursor cells for 48 h, meanwhile, the control group was set up and treated without VEGF. The proliferation of cells was detected by MTT assay, the cell migration was detected with a Boyden chamber, the levels of MMP-9, MMP-2, β-catenin, C-myc, cyclin D1 proteins in the cells were detected by western blotting. Wnt/β-catenin signaling pathway activator LiCl treated the oligodendrocyte precursor cells for 48 h, and the cell proliferation and migration were detected. **Results**　The survival rate and number of migrated oligodendrocyte precursor cells were significantly higher than those of the control group after treated with VEGF ($P < 0.01$). The levels of MMP-9, MMP-2, β-catenin, C-myc and cyclin D1 in the oligodendrocyte precursor cells after treated with VEGF were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). The cell proliferation and migration after treated with Wnt/β-catenin signaling activator LiCl

[基金项目]湖北省自然科学基金课题(2015CFB476)。
[作者简介]孟祥武(1975—),男,硕士研究生。研究方向:脑血管疾病。E-mail: hbmxw555@163.com
[通信作者]郑龙,主任医师。研究方向:脑血管疾病。

were consistent with the proliferation and migration of cells after treated with VEGF. **Conclusions** VEGF promotes proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells. The mechanism of action is related to Wnt/β-catenin signaling pathway.

【**Key words**】 oligodendrocyte precursor cells; Wnt/β-catenin signaling pathway; VEGF; migration

少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs)广泛存在于中枢神经系统中,具有分化为星形胶质细胞和少突胶质细胞的潜能[1]。少突胶质前体细胞属于神经胶质细胞,是除少突胶质细胞、小胶质细胞和星状胶质细胞外的第四种神经胶质细胞[2]。少突胶质前体细胞与中枢神经系统的发育、修复、重建等都具有密切关系[3]。

血管内皮生长因子(VEGF)在脊椎动物的发育过程中发挥调节作用,参与胚胎神经发生及血管形成过程[4]。有研究表明,VEGF 能够促进小胶质细胞、星形胶质细胞和皮质神经元的增殖和迁移[5-6]。而 VEGF 对少突胶质前体细胞的增殖和迁移影响是否同其他神经胶质细胞一样? 本研究以少突胶质前体细胞为研究对象,探讨血管内皮生长因子对少突胶质前体细胞增殖和迁移的影响,以期为治疗中枢神经系统疾病提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

12 只出生 24 h 的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,雌雄各半,体重 8 ~ 10 g,购于北京维通利华实验动物有限公司[SCXK(京)2015 - 0001],饲养于湖北民院附属民大医院动物实验中心[SYXK(鄂)2014 - 0035],所有实验流程均经动物伦理委员会通过(伦理审查证号:2015 - 0065)。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM 培养基、LiCl 均购自于美国 Sigma; VEGF 购自于美国 Peprotech; MMP-9 单克隆抗体、MMP-2 单克隆抗体、β-catenin 单克隆抗体、C-myc 单克隆抗体、cyclin D1 单克隆抗体、GAPDH 单克隆抗体、辣根过氧化物标记的二抗均购自于上海研卉生物科技有限公司;酶标仪、CO_2 培养箱购自于美国 Thermo;BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自于上海酶联生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 少突胶质前体细胞分离及实验分组

少突胶质前体细胞分离方法参照参考文献[7],取出生 24 h 的 SPF 级 C57BL/6J 小鼠,腹腔麻醉以后,无菌状态下取其脑皮质,剪碎后,加入胰蛋白酶消化 15 min,1000 r/min 离心 5 min,弃上清液。在沉淀中加含有 20% FBS 的 DMEM 细胞培养液混合后,过筛(70 μm 细胞筛),接种到多聚赖氨酸提前包被的细胞瓶中,放在 37℃,5% CO_2 培养箱中培养,每隔 72 h 更换一次培养液,培养 9 d 后,将培养瓶放在振荡器上震荡 1 h,弃细胞培养液,再加入 10 mL 新鲜的细胞培养液,放在振荡器上震荡 1 h,收集上清液接种到细胞培养瓶中培养 1 h。过筛(20 μm 细胞筛),吸取细胞悬浮液,1000 r/min,离心 10 min,在细胞沉淀中加入细胞培养液混匀后,接种到细胞瓶中培养,分离培养的细胞特异性表达 NG2,鉴定为少突胶质前体细胞。取少突胶质前体细胞,用 100 ng/mL 的 VEGF 作用于少突胶质前体细胞记为 VEGF 组,以加入 0 ng/mL 的 VEGF 处理后的少突胶质前体细胞记为对照组。

1.3.2 MTT 检测细胞增殖

取出少突胶质前体细胞,用 100 ng/mL 的 VEGF 作用于少突胶质前体细胞记为 VEGF 组,每孔中加入 100 μL 的 VEGF。每组设置 8 个复孔,同时设置空白组和对照组,空白组不加细胞,对照组中不加 VEGF,其它步骤同 VEGF 组。放在 37℃,5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后,吸除孔内 VEGF,每孔中加入 50 μL 的 MTT 溶液(5 mg/mL),放在 37℃,5% CO_2 培养箱中孵育反应 4 h。吸除细胞培养液,在细胞中加入 DMSO 溶液 150 μL,震荡反应 10 min,待结晶物完全融化后,酶标仪检测每孔的 OD 值,计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值)/(对照组 OD 值 - 空白组 OD 值)

1.3.3 Boyden chamber 小室检测细胞迁移

取少突胶质前体细胞,在多聚赖氨酸提前包被好的 Boyden chamber 小室的上室加入 5×10^4 个细胞,在小室的下室加入 0 ng/mL、100 ng/mL 的 VEGF 培养液,放在 37℃,5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后,用棉签小心擦掉没有穿过膜的少突胶质前体细胞。用甲醇固定穿膜的细胞 20 min。用 0.1% 的结晶紫染色 15 min 后,加入 PBS 洗涤后,随机选取 6 个视野对迁移的细胞计数,实验重复三次。

1.3.4 Western blot 检测细胞中 MMP-9、MMP-2、β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白水平

少突胶质前体细胞与 100 ng/mL 的 VEGF 作用 48 h 后,在细胞中加裂解液,在冰上裂解 20 min 后,4℃,10 000 r/min 离心 15 min,吸取蛋白上清,BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测提取的蛋白样品浓度。蛋白样品与 loading buffer 混合煮沸变性后,80 V 电压电泳 30 min 后,待溴酚蓝到达浓缩胶和分离胶边缘时,调整电压至 120 V 继续电泳。取出蛋白凝胶在 300 mA,4℃转膜 90 min。经 5% 脱脂奶粉封闭后(37℃封闭 2 h)。加入一抗(500 倍稀释),室温下孵育 2 h,PBST 洗涤后,加二抗(1000 倍稀释)孵育过夜。滴加 DAB 显色液,暗室中曝光,以 GAPDH 为内参,分析蛋白表达水平。

1.3.5 激活 Wnt/β-catenin 信号通路对细胞增殖迁移影响

少突胶质前体细胞与含有终浓度为 20 μmol/L 的 Wnt/β-catenin 信号通路激活剂 LiCl 作用 48 h 后,记为激活剂组,以加入 0 μmol/L 的 Wnt/β-catenin 信号通路激活剂 LiCl 作用 48 h 后的少突胶质前体细胞记为未处理组,检测细胞增殖迁移情况,Western blot 检测细胞中 MMP-9、MMP-2、β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白水平。

1.4 统计学方法

所得的实验数据均采用 SPSS 22.0 统计学软件分析,数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据间的比较用 t 检验,多组数据以上用单因素方差表示,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 少突胶质前体细胞形态

显微镜下观察分离培养的少突胶质前体细胞呈圆形或者呈球形存在,多数聚集成块状,有典型的双极或者三级突起。(图 1)

2.2 细胞增殖结果

少突胶质前体细胞与 VEGF 作用后,MTT 检测 48 h 的细胞存活率。结果显示,VEGF 组细胞存活率明显高于对照组($P < 0.01$)。(图 2)

2.3 细胞迁移结果

少突胶质前体细胞与 VEGF 作用后,Boyden chamber 小室检测 48 h 细胞迁移情况。结果显示,VEGF 组细胞迁移数目明显高于对照组($P < 0.01$)。VEGF 组细胞中迁移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显高于对照组($P < 0.01$)。(图 3)

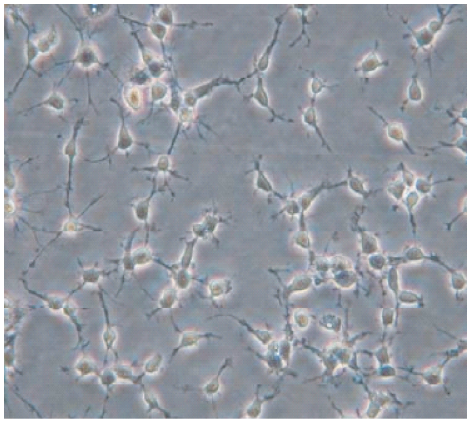
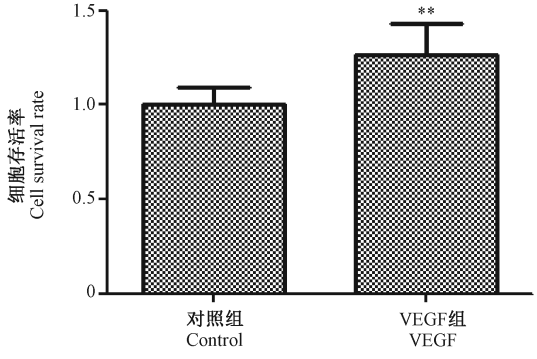


图 1 分离培养的少突胶质前体细胞(×200)

Fig. 1 Isolation and culture of the oligodendrocyte precursor cells



注:与对照组比,$^{**}P < 0.01$。

图 2 VEGF 对少突胶质前体细胞增殖影响结果

Note. Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$.

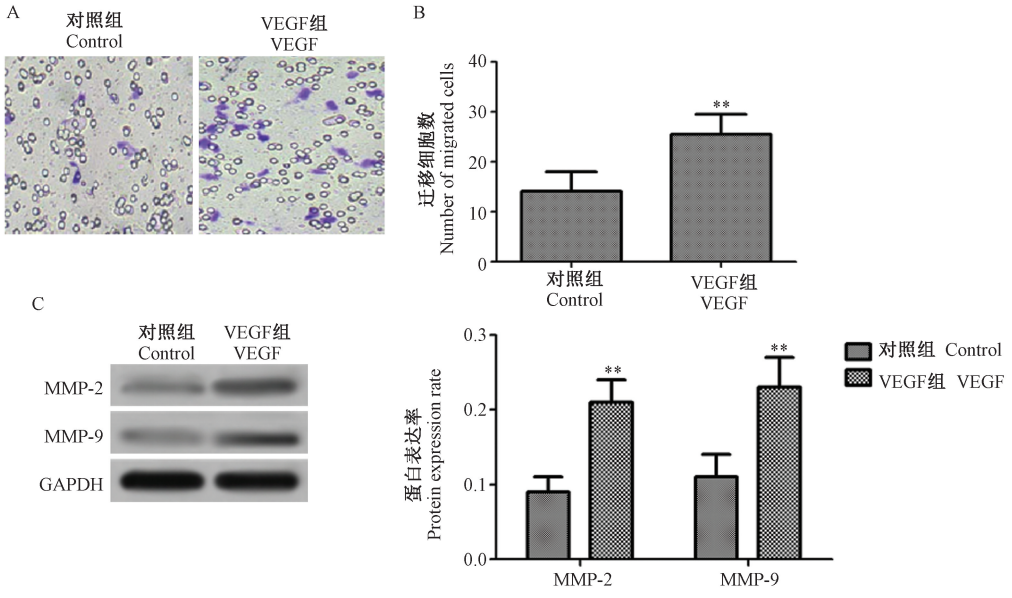
Fig. 2 Effect of VEGF on the proliferation of the oligodendrocyte precursor cells

2.4 VEGF 对细胞中 β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白表达影响结果

Western blot 检测了 VEGF 作用 48 h 后的少突胶质前体细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白 β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白水平。结果显示,VEGF 组细胞中 β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白水平均明显高于对照组($P < 0.01$)。(图 4)

2.5 激活 Wnt/β-catenin 信号通路对细胞中 β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白表达影响结果

收集 Wnt/β-catenin 信号通路激活剂 LiCl 作用后的少突胶质前体细胞,Western blot 检测细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白 β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白水平。结果显示,激活剂组细胞中 β-

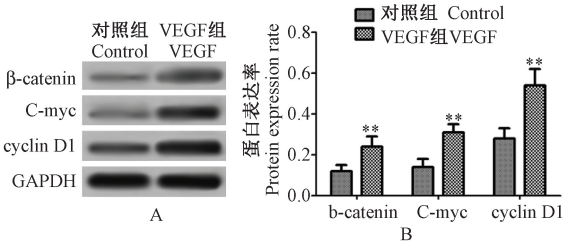


注:(A)迁移结果图;(B)迁移细胞数目;(C)Western blot 结果图;(D)蛋白表达率;与对照组比,$^{**}P < 0.01$。

图 3　VEGF 对少突胶质前体细胞迁移影响结果

Note. (A) Migration results map. (B) The number of migrated cells. (C) Western blot results. (D) Protein expression rate. Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 3　Effect of VEGF on the migration of oligodendrocyte precursor cells

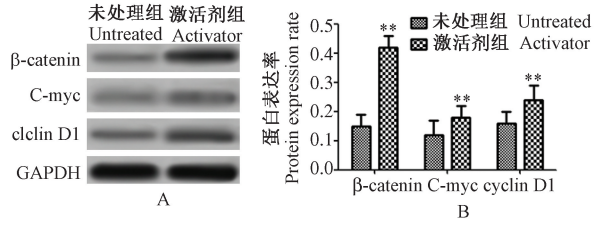


注:(A)Western blot 结果图;(B)蛋白表达率;与对照组比,$^{**}P < 0.01$。

图 4　VEGF 对 β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白表达影响结果

Note. (A) Western blot results. (B) protein expression rate. Compared with the control group, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 4　Effect of VEGF on the expression of β-catenin, C-myc and cyclin D1



注:(A)Western blot 结果图;(B)蛋白表达率;与未处理组比,$^{**}P < 0.01$。

图 5　激活 Wnt/β-catenin 信号通路对 β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白表达影响结果

Note. (A) Western blot results. (B) Protein expression rate. Compared with the untreated group, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 5　Effect of activation of Wnt/β-catenin signaling pathway on the expression of β-catenin, C-myc, and cyclin D1

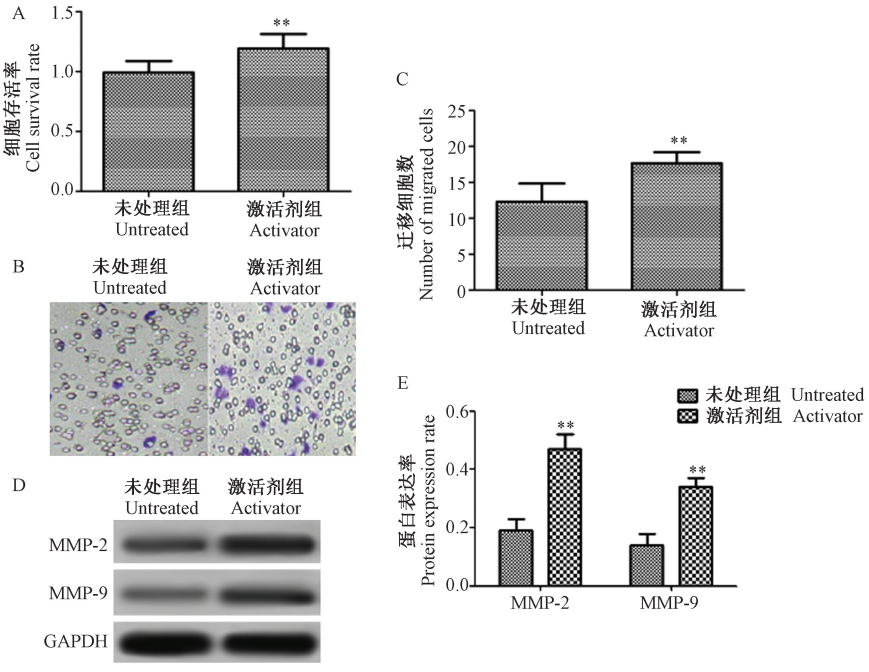
catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白水平明显高于未处理组($P < 0.01$)。(图 5)

2.6　激活 Wnt/β-catenin 信号通路对细胞增殖迁移影响结果

MTT 检测 Wnt/β-catenin 信号通路激活剂 LiCl 作用后的少突胶质前体细胞 48 h 的细胞存活情况,Boyden chamber 小室检测 48 h 细胞迁移情况。结果显示,激活剂组细胞存活率和迁移细胞数目均明显高于未处理组,差异有显著性($P < 0.01$)。激活剂组细胞中迁移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显高于未处理组,差异有显著性($P < 0.01$)。(图 6)

3　讨论

少突胶质前体细胞在中枢神经系统疾病的发生过程中发挥重要作用[8]。少突胶质前体细胞能够促进神经系统损伤修复及重建。中枢神经系统髓鞘的生长和少突胶质细胞密不可分,而髓鞘在中枢神经系统损伤修复中发挥积极作用[9-10]。有研究表明,在脱髓鞘病灶四周有许多少突胶质前体细



注:(A)细胞存活率;(B)迁移结果图;(C)迁移细胞数;(D)Western blot 结果图;(E)蛋白表达率;与未处理组比,$^{**}P < 0.01$。

图 6 激活 Wnt/β-catenin 信号通路对细胞增殖迁移影响结果

Note. (A) Cell survival rate. (B) Migration results map. (C) Number of migrated cells. (D) Western blot results. (E) Protein expression rate. Compared with the untreated group, $^{**}P < 0.01$.

Fig. 6 Effect of activation of Wnt/β-catenin signaling pathway on the cell proliferation and migration

胞存在,这些细胞是从室管膜的下区增殖迁移而来[11-12]。研究少突胶质细胞的增殖和迁移是研究中枢神经系统发育的重要组成部分。

VEGF 相对分子量为 34 ~45 × 10^3,编码 VEGF 的基因约为 14 kb,该基因含有 7 内含子和 8 个外显子[13]。VEGF 能够促进血管生长,促进血管内皮细胞的分裂。近年来有研究表明,VEGF 能够促进神经元的延伸[14]。用 VEGF 作用于移植的脑皮层,组织中神经元延伸及神经元存活情况均明显增加[15]。过表达小鼠体内的 VEGF,神经干细胞增殖速度增加[16]。VEGF 能够在一定程度上逆转缺氧对神经元的损害[17]。背根神经移植实验证明,VEGF 还具有促进雪旺细胞的增殖[18]。这些研究结果都表明,VEGF 对神经系统具有一定的保护作用。除此之外还发现,VEGF 能够促进脊髓损伤小鼠胶质前体细胞的增殖和迁移,对星形胶质细胞的分裂也具有促进作用[19]。本研究中,通过体外分离培养小鼠少突胶质前体细胞,经 VEGF 作用后,发现细胞增殖和迁移能力均明显增高。这提示,VEGF 具有促进少突胶质前体细胞增殖和迁移的作用。

Wnt/β-catenin 信号通路在细胞的生长过程中发挥重要作用。Wnt/β-catenin 信号通路是一种高度保守的信号通路,在真核生物体内广泛存在。β-连环蛋白(β-catenin)是 Wnt/β-catenin 信号通路中的效应因子,在信号转导过程中起关键作用[20]。C-myc 和 cyclin D1 是 Wnt/β-catenin 信号通路中的靶基因[21]。Wnt/β-catenin 信号通路激活时,β-catenin、C-myc、cyclin D1 表达增多[22]。有研究表明,Wnt/β-catenin 信号通路在中枢神经系统中具有保护作用,参与神经系统的发育[23]。VEGF 能够通过调控 NOTCH、PI3K、ERK 信号通路对少突胶质前体细胞的增殖和迁移发挥促进作用[24]。与 NOTCH、PI3K、ERK 信号通路一样参与细胞生长的 Wnt/β-catenin 信号通路是否也与少突胶质前体细胞的增殖和迁移有关。本研究中,Western blot 检测了与 VEGF 作用后的少突胶质前体细胞中 Wnt/β-catenin 信号通路相关蛋白 β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白的表达,结果发现,VEGF 作用后的少突胶质前体细胞中 β-catenin、C-myc、cyclin D1 蛋白水平表达上调。进一步用 Wnt/β-catenin 激活剂处理少突胶质前体细

胞,发现细胞的增殖和迁移能力均明显升高。

综上所述,VEGF 能够促进少突胶质前体细胞的增殖和迁移,作用机制与 Wnt/β-catenin 信号通路有关。这为进一步研究中枢神经系统的组成奠定了基础,为治疗中枢神经系统疾病提供了新思路。

参考文献:

[1] Kuboyama K, Fujikawa A, Suzuki R, et al. Inactivation of protein tyrosine phosphatase receptor type Z by pleiotrophin promotes remyelination through activation of differentiation of oligodendrocyte precursor cells [J]. J Neurosci, 2015, 35(35): 12162 - 12171.

[2] Werneburg S, Buettner FF, Mühlenhoff M, et al. Polysialic acid modification of the synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 in human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte precursor cells [J]. Stem Cell Res, 2015, 14(3): 339 - 346.

[3] Kawabata S, Takano M, Numasawa-Kuroiwa Y, et al. Grafted human iPS cell-derived oligodendrocyte precursor cells contribute to robust remyelination of demyelinated axons after spinal cord injury [J]. Stem Cell Reports, 2016, 6(1): 1 - 8.

[4] Muench V, Trentin L, Herzig J, et al. Migration of acute lymphoblastic leukemia cells into the central nervous system is regulated by VEGF [J]. Blood, 2015, 126(23): 2634 - 2634.

[5] Fangusaro J, Gururangan S, Poussaint TY, et al. Bevacizumab (BVZ)-associated toxicities in children with recurrent central nervous system tumors treated with BVZ and irinotecan (CPT-11) [J]. Cancer, 2013, 119(23): 4180 - 4187.

[6] Bucher T, Colle MA, Wakeling E, et al. scAAV9 intracisternal delivery results in efficient gene transfer to the central nervous system of a feline model of motor neuron disease [J]. Human Gene Ther, 2013, 24(7): 670 - 682.

[7] Gonzalez-Cordero A, West EL, Pearson RA, et al. Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(8): 741 - 747.

[8] Romanyuk N, Amemori T, Turnovcova K, et al. Beneficial effect of human induced pluripotent stem cell-derived neural precursors in spinal cord injury repair [J]. Cell Transplant, 2015, 24(9): 1781 - 1797.

[9] Sandner B, Ciatipis M, Motsch M, et al. Limited functional effects of subacute syngeneic bone marrow stromal cell transplantation after rat spinal cord contusion injury [J]. Cell Transplant, 2016, 25(1): 125 - 139.

[10] Kim JB, Lee H, Araúzo-Bravo MJ, et al. Oct4-induced oligodendrocyte progenitor cells enhance functional recovery in spinal cord injury model [J]. EMBO J, 2015, 34(23): 2971 - 2983.

[11] Pomeshchik Y, Puttonen KA, Kidin I, et al. Transplanted human induced pluripotent stem cell-derived neural progenitor cells do not promote functional recovery of pharmacologically immunosuppressed mice with contusion spinal cord injury [J]. Cell Transplant, 2015, 24(9): 1799 - 1812.

[12] Kanno H, Pearse DD, Ozawa H, et al. Schwann cell transplantation for spinal cord injury repair: its significant therapeutic potential and prospectus [J]. Rev Neurosci, 2015, 26(2): 121 - 128.

[13] Powles T, Staehler M, Ljungberg B, et al. Updated EAU guidelines for clear cell renal cancer patients who fail VEGF targeted therapy [J]. Eur Urol, 2016, 69(1): 4 - 6.

[14] Nishida-Fukuda H, Araki R, Shudou M, et al. Ectodomain shedding of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 (LYVE-1) is induced by vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) [J]. J Biol Chem, 2016, 291(20): 10490 - 10500.

[15] Clark AR, Carter AB, Hager LE, et al. In vivo neural tissue engineering: Cylindrical biocompatible hydrogels that create new neural tracts in the adult mammalian brain [J]. Stem Cells Dev, 2016, 25(15): 1109 - 1118.

[16] Li Q, Ford MC, Lavik EB, et al. Modeling the neurovascular niche: VEGF- and BDNF-mediated cross-talk between neural stem cells and endothelial cells: An in vitro study [J]. J Neurosci Res, 2006, 84(8):1656 - 1668.

[17] Sanchez A, Tripathy D, Luo J, et al. Neurovascular unit and the effects of dosage in VEGF toxicity: role for oxidative stress and thrombin [J]. J Alzheimers Dis, 2013, 34(1): 281 - 291.

[18] Lange C, Storkebaum E, de Almodóvar CR, et al. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases [J]. Nat Rev Neurol, 2016, 12(8): 439 - 454.

[19] Qu J, Wang D, Wang H, et al. Electrospun silk fibroin nanofibers in different diameters support neurite outgrowth and promote astrocyte migration [J]. J Biomed Mater Res A, 2013, 101(9): 2667 - 2678.

[20] 陈飞, 王皓香, 向鑫, 等. 姜黄素对神经干细胞 Wnt/β-catenin 信号通路表达影响的离体研究 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(8): 764 - 768.

[21] 邹慧娟, 郑航, 李明君, 等. Wnt 信号通路在结肠癌中的表达及其作用机制 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(14): 3373 - 3374.

[22] Koehler A, Schlupf J, Schneider M, et al. Loss of Xenopus cadherin-11 leads to increased Wnt/β-catenin signaling and up-regulation of target genes c-myc and cyclin D1 in neural crest [J]. Dev Biol, 2013, 383(1): 132 - 145.

[23] Bowman AN, van Amerongen R, Palmer TD, et al. Lineage tracing with Axin2 reveals distinct developmental and adult populations of Wnt/β-catenin-responsive neural stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(18): 7324 - 7329.

[24] Kirby ED, Kuwahara AA, Messer RL, et al. Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(13): 4128 - 4133.

〔收稿日期〕2018 - 01 - 08