

王雨晴,陈志刚,张斯佳,等. 神经干细胞在缺氧后的分化情况及相关信号通路初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 7-15.

Wang YQ, Chen ZG, Zhang SJ, et al. A preliminary study on the differentiation of neural stem cells after hypoxia and related signaling pathways [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 7-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.01.002

神经干细胞在缺氧后的分化情况及相关信号通路初探

王雨晴^{1,2}, 陈志刚², 张斯佳¹, 王荣亮¹, 罗玉敏¹, 赵海莘^{1*}

(1.首都医科大学宣武医院,脑血管病研究室,北京 100053;

2.北京中医药大学东方医院,脑病一科,北京 100078)

【摘要】 目的 观察缺氧缺糖后神经干细胞在不同时间点的分化趋势,以及与信号通路促红细胞生成素受体(EPOR和 β CR)和PDZ连接激酶(PBK)的相关性。方法 分离小鼠原代神经干细胞,制备氧糖剥夺(OGD)模型,缺氧3h,复氧1h、2h、4h、6h、8h,观察神经干细胞OGD的分化趋势,采用RT-PCR技术检测少突胶质细胞标志物CNP和MBP、星形胶质细胞标志物GFAP和S100B、神经元标志物RBFOX3、MAP2和TUBB3以及信号分子EPOR、CSF2RB、PBK的基因表达,并进行了Pearson相关性分析。结果 (1)OGD处理促进神经干细胞向少突胶质细胞方向分化,Cnp和Mbp表达呈升高趋势,复氧4hCnp显著升高。(2)OGD处理促进神经干细胞向星形胶质细胞方向分化,复氧2~8hS100b显著升高,复氧2h和6hGfap表达显著降低,复氧8h表达显著增加。(3)OGD处理减少神经干细胞向神经元方向分化,Rbfox3以及Tubb3表达显著降低,复氧2h和6h最为显著。(4)Pbk在复氧1h和8h显著降低,Epor、Pbk与Cnp的表达呈正相关,Pbk与Mbp的表达呈正相关。结论 缺氧缺糖损伤显著促进神经干细胞向少突胶质细胞和星形胶质细胞新生,同时抑制向神经元方向的分化。EPOR以及PBK可能参与到脑缺血后神经干细胞向少突胶质细胞分化的调控过程,为进一步研究相关信号通路在缺血后神经再生中的调控机制提供了基础。

【关键词】 神经干细胞分化;缺氧;促红细胞生成素受体;T-LAK细胞源蛋白激酶

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)01-0007-09

A preliminary study on the differentiation of neural stem cells after hypoxia and related signaling pathways

WANG Yuqing^{1,2}, CHEN Zhigang², ZHANG Sijia¹, WANG Rongliang¹, LUO Yumin¹, ZHAO Haiping^{1*}

(1. Cerebrovascular Diseases Research Institute, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China.

2. Department of Encephalopathy, Dongfang Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078)

【Abstract】 Objective To observe the trend of differentiation of neural stem cells (NSCS) at different time points after oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) and its correlation with Erythropoietin Receptor (EPOR), β -Common Receptor (β CR) and PDZ-binding-kinase (PBK). **Methods** The primary neural stem cells of mice were isolated and the OGD model was made. The OGD was hypoxia for 3 hours, reoxygenation for 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours and

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81771412,81801149)。

【作者简介】 王雨晴(1992—),女,博士研究生,研究方向:脑血管病发病机制。E-mail:BUCMWYQ@163.com

【通信作者】 赵海莘(1979—),女,副研究员,研究方向:脑血管病发病机制。E-mail:zhaohaiping1980@163.com

8 hours. The differentiation trend of neural stem cells was observed. CNP and MBP, GFAP and S100B, RBFOX3, MAP2 and TUBB3, EPOR, CSF2RB and PBK were detected by RT-PCR and Pearson correlation analysis was carried out.

Results 1, OGD treatment promoted the differentiation of neural stem cells to oligodendrocytes, and the expressions of *Cnp* and *Mbp* were increased obviously at 4 h after OGD. 2, OGD treatment promoted the differentiation of neural stem cells to astrocytes, and the expression of *Gfap* was decreased at 2~6 h after OGD, while the expression of *Gfap* was increased at 1 h and 8 h after OGD. The expression of *S100b* was significantly increased at 2~8 h after OGD. 3, OGD treatment reduced neuronal differentiation of neural stem cells, and the expression of *Rbfox3* and *Tubb3* were decreased after OGD significantly at 2 h and 6 h after OGD. 4, *Pbk* was reduced at 1 h and 8 h after OGD. *Epor* and *Pbk* were positively correlated with the expression of *Cnp*, and *Pbk* was positively correlated with the expression of *Mbp*. **Conclusions** Hypoxia injury significantly promoted the formation of oligodendrocytes and astrocytes and inhibited the neuronal differentiation of neural stem cells. EPOR and PBK may be involved in the differentiation of neural stem cells to oligodendrocytes. These result may provide a basis for the further research on the related mechanism of nerve regeneration after ischemia.

【Keywords】 neural stem cell differentiation; hypoxia; erythropoietin receptor; T-Lak cell derived protein kinase

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是存在于神经系统中,具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的潜能以及自我更新能力的细胞群。上世纪 60 年代科学家发现成体哺乳动物脑内一些区域分布着神经干细胞,即神经再生区域。目前成体大脑内公认的神经再生区域主要为侧脑室室管膜下区(subependymal ventricular zone, SVZ)以及海马齿状回颗粒下区(subgranular zone, SGZ)。其中 SVZ 区的神经干细胞在增殖分化为不同的子代后可迁移至脑内其他区域,在损伤后的神经功能恢复中具有重要意义。影响 NSCs 增殖及分化的方式包括调节胞内转录因子、改变神经发生微环境以及激活胞外 Eph/ephrin、Notch、Wnt/ β -catenin、PI3K/Akt 多种信号通路等^[1-4]。研究表明,促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)对脑缺血具有神经保护作用,体内体外实验均证明 EPO 具有促进神经干细胞分化的作用, EPO 主要通过 EPOR (erythropoietin receptor) 和 β CR (β -common receptor) 组成同二聚体和异二聚体的受体发挥作用,但是具体介导神经干细胞分化的受体类型还不清楚。众所周知,MAPK 级联反应几乎控制着所有细胞功能,包括适应、增殖、分化、存活、凋亡等。PBK (PDZ-binding-kinase) 是丝裂原活化蛋白激酶 MAPKK 家族的新成员,有研究表明 PBK 对脑缺血具有一定的保护作用^[5-6]。然而 PBK 是否参与缺血性损伤后神经再生即神经干细胞的分化目前尚不清楚。在本实验中我们通过原代神经干细胞氧糖剥夺模型(oxygen and glucose deprivation, OGD)初步分析了神经干细胞向不同成熟神经细胞方向分化的趋势以及 EPO 受体和

PBK 与神经细胞标志物表达的相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 孕鼠 1 只,孕龄为 12~14 d,体重 23 g 左右,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],实验于首都医科大学宣武医院脑血管病实验室动物实验屏障设施中进行[SYXK(京)2015-0016]。动物实验中涉及的动物所有操作程序已经得到首都医科大学宣武医院实验动物管理和使用委员会的批准(XWH20190603),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DMEM/F12、Neurobasal 培养基,购于 Invitrogen 公司;TRIzol 试剂、无 RNA 酶的水、无 RNA 酶的糖原购于 Invitrogen life technologies;三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl)、乙二胺四乙酸(EDTA)、3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)、溴化乙锭(ethidium bromide, EB)购于华美生物工程公司;乙酸钠、甲醛、氯仿、异丙醇、100%乙醇购于上海化学试剂有限公司;甲醛上样染液购于 Ambion;琼脂糖购于生工生物工程技术有限公司;RNA 酶抑制剂购于 Epicentre; SuperScriptTM III Reverse Transcriptase、5 × RT 缓冲液购于 Invitrogen; 2.5 mmol/L dNTP 混合液购于 HyTest Ltd; 2×PCR master mix 购于 Arraystar。

洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司);Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems);ViiA 7 Real-time PCR System (Applied Biosystems)。

1.3 实验方法

1.3.1 神经干细胞的培养和分组

参考文献^[7-10]选择孕龄为 12~14 d 的 C57BL/6 孕鼠,断颈处死后取出胚胎置于清洁的 PBS 中,分离胚胎脑的皮层神经干细胞,用 0.25% 胰酶消化 5 min 后离心除去胰酶,加入含 DNase 的培养基轻柔吹打细胞团块至单细胞状态,900 r/min 离心 4 min 后用完全培养基(DMEM/F12+Neurobasal+B27+PS+GlutaMax+EGF+FGF)重悬,后接种于低吸附六孔培养板。2~3 d 后传代,用 Accutase 消化神经球至单细胞,后离心除去 Accutase,完全培养基重悬细胞并继续置于低吸附六孔培养板。连续传代两次后收集细胞,消化至单细胞后接种至 PDL 包被过的细胞板,使细胞在单层贴壁状态下生长。将细胞分为 6 组,即对照(control)组,OGD/R 处理后 1 h 组,2 h 组,4 h 组,6 h 组以及 8 h 组。每组 3 孔细胞。

1.3.2 神经干细胞氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型

将单层贴壁原代神经干细胞换至无糖培养基中并置于密闭缺氧盒中,向盒内持续通入 95% N₂+5% CO₂ 的混合气体 5 min,使盒内的空气被完全置换成不含氧气的混合气体。将缺氧盒置于 37℃ 培

养箱,3 h 后将细胞板从缺氧盒中取出并将培养基置换成完全培养基(DMEM/F12+Neurobasal+B27+PS+GlutaMax+EGF+FGF),放入培养箱继续培养,后分别于不同时间点(OGD/R 后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h)收集细胞。

1.3.3 RT-PCR 法检测转录水平

分别于 OGD 3 h 复氧后不同时间点收集神经干细胞,采用 TRIzol 法提取 RNA,使用 NanoDrop[®] ND-1000 测定 RNA 浓度和纯度。根据 SuperScript[™] III Reverse Transcriptase 试剂盒进行 cDNA 合成。使用 Primer 5.0(英骏生物技术有限公司)设计引物,*β-actin*(*Actb*)做为内参(见表 1)。使用 2×PCR master mix 试剂盒及 ViiA 7 Real-time PCR System 进行实时定量 PCR 检测 2',3'-环核苷酸 3'-磷酸二酯酶(*Cnp*)、髓鞘碱性蛋白(*Mbp*)、胶质纤维酸性蛋白(*Gfap*)、中枢神经特异性蛋白(*S100b*)、神经元核抗原(*Rbfox3*)、微管相关蛋白 2(*Map2*)、微管蛋白(*Tubb3*)、促红细胞生成素受体(*Epor*)、共 β 亚基异源受体(*Csf2rb*)以及 PDZ 连接激酶(*Pbk*)的转录水平。技术重复 3 次。

表 1 引物列表
Table 1 List of primers

基因名 Gene	引物序列 Primer sequence	产物长度(bp) Product length
<i>Cnp</i>	F:5' GCCTTCAAGAAAGAGCTTCG 3' R:5' CAGATCACTGGGCCACAAC 3'	291
<i>Mbp</i>	F:5' TCCGACGAGCTTCAGACCA 3' R:5' ACCCCTGTCACCGCTAAAGA 3'	207
<i>Gfap</i>	F:5' AACAACTGGCTGCGTAT 3' R:5' CTGCCTCGTATTGAGTGC 3'	235
<i>S100b</i>	F:5' CCCTCATTGATGTCTTCCACC 3' R:5' TTCCTGCTCCTTGATTTCCTC 3'	128
<i>Rbfox3</i>	F:5' TGGATTTTATGGTCTGAGATT 3' R:5' CATAACTGCTACTGTAGGCTGCT 3'	95
<i>Map2</i>	F:5' TCTCTAAAGAACATCCGTCAC 3' R:5' ATCTTACATTACCACCTCC 3'	143
<i>Tubb3</i>	F:5' GCGCCTTTGGACACCTATT 3' R:5' CCAGCACCCTCTGACCAA 3'	58
<i>Epor</i>	F:5' TCCTGGAGCACCTATGACC 3' R:5' CGAGATGAGGACCAGAATGA 3'	283
<i>Csf2rb</i>	F:5' TGGAGCAAGTGGAGCGAA 3' R:5' CACAGCCAAAGCGAAGGAT 3'	121
<i>Pbk</i>	F:5' AGAGGGTTGTCTATTCTCC 3' R:5' CTTTGTTCGGCTCTTCTATT 3'	238
<i>Actb</i>	F:5' GTACCACCATGTACCCAGGC 3' R:5' AACGCAGCTCAGTAACAGTCC 3'	247

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 以及 GraphPad Prism 8.0 软件分析数据及作图。组间比较采用单因素方差分析 (One Way ANOVA), 结果以平均数 \pm 标准误差 ($\bar{x}\pm s\bar{x}$) 表示。相关性分析采用 Pearson 相关检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD 处理促进神经干细胞向少突胶质细胞方向分化

神经干细胞 OGD 3 h, 分别于复氧后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 收集细胞, 用 RT-PCR 检测少突胶质细胞标志物 CNP 及 MBP 的基因表达。结果提示在 OGD 复氧后各时间点, *Cnp* 及 *Mbp* 的表达水平较 control 组均有升高的趋势, 在 OGD 复氧后 4 h 时 *Cnp* 升高最为显著, 与 control 组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (见图 1)。综上, 缺氧缺糖损伤增加了神经干细胞向少突胶质细胞方向的分化。

2.2 OGD 促进神经干细胞向星形胶质细胞方向分化

神经干细胞 OGD 3 h, 分别于复氧后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 收集细胞, 用 RT-PCR 检测星形胶质细胞标志物 GFAP 及 S100B 的基因表达。神经干细胞 OGD 复氧后 2 h 和 6 h *Gfap* 的表达水平显著降低, 8 h 表达水平显著升高, 与 control 组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 各时间点 *S100b* 的表达水平均有升高, 2 h、4 h、6 h、8 h 与 control 组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (见图 2)。

2.3 OGD 处理减少了神经干细胞向神经元方向的分化

神经干细胞 OGD 3 h, 分别于复氧后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 收集细胞, 用 RT-PCR 检测神经元标志物 RBFOX3、MAP2 以及 TUBB3 的基因表达。OGD 复氧后 2~8 h 三者的 mRNA 表达水平均有降低, 其中 *Rbfox3* 及 *Tubb3* 在 2 h、4 h、6 h 时降低最为显著且与 control 组相比差异均具有统计学意义 ($P<0.05$) (见图 3)。综上, OGD 损伤减少了神经干细胞向神经元方向分化从而损伤神经元再生。

2.4 *Epor* 及 *Pbk* 的转录水平与少突胶质细胞分化呈正相关

神经干细胞 OGD 3 h, 分别于复氧后 1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 收集细胞, 用 RT-PCR 检测信号分子 EPOR、CSF2RB(β CR) 以及 PBK 的基因表达情况。

与 control 组相比, *Epor* 和 *Csf2rb* 在神经干细胞 OGD 复氧后 1 h 有降低趋势, 4 h、6 h、8 h 时有升高趋势; *Pbk* 在神经干细胞 OGD 复氧后各时间点表达均降低, 其中 1 h 及 8 h 较为显著, 与 control 组相比差异具有统计学意义 ($P<0.05$) (见图 4)。

通过分析比较三类神经细胞分化标志物与三种信号分子的转录水平相关性, 我们发现 EPOR 与少突胶质细胞标志物 CNP 的基因表达呈正相关 ($r=0.52, P<0.05$); 蛋白激酶 PBK 与少突胶质细胞标志物 CNP、MBP 的基因表达也呈正相关 ($r=0.51$ 和 $r=0.5, P<0.05$)。三种信号分子的基因表达与星形胶质细胞标志物、神经元标志物均无明显的相关性 (图 5、图 6)。以上结果表明 EPOR 及 PBK 可能参与神经干细胞向少突胶质细胞分化的过程。

3 讨论

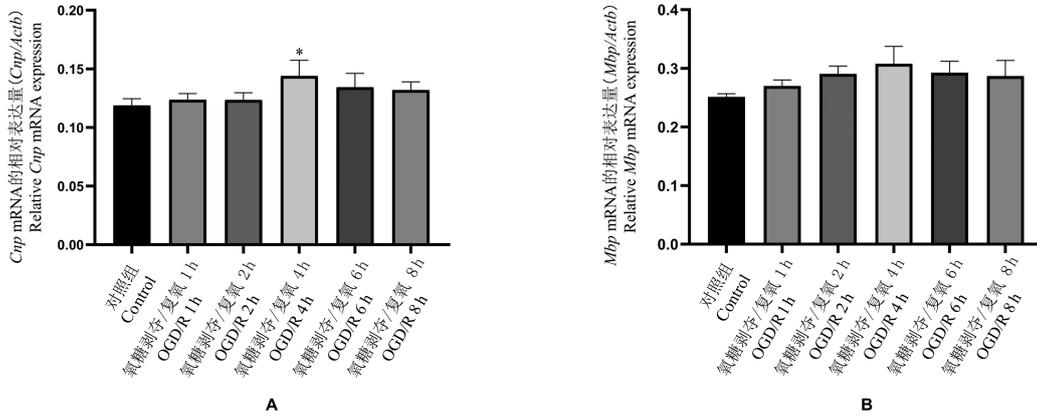
本实验结果显示缺氧缺糖损伤促进神经干细胞向少突胶质细胞以及星形胶质细胞方向的分化, 同时抑制其向神经元方向的分化。另外, 本研究发现 *Epor* 以及 *Pbk* 的表达与少突胶质细胞的分化呈正相关, 提示 EPOR 与 PBK 可能参与少突胶质细胞新生。

少突胶质细胞是中枢神经系统的主要胶质细胞之一, 其主要功能是在中枢神经系统中包绕轴突、形成绝缘的髓鞘结构、协助生物电信号的跳跃式高效传递并维持和保护神经元的正常功能。少突胶质细胞对氧化损伤、兴奋性毒性和其他类型的缺血诱导损伤具有独特的敏感性。已有研究证实, 在缺血性中风急性期和亚急性期轴突均会发生快速和显著的损伤^[11-13]。而卒中也会在一定程度上诱导轴突再生^[14]。在本实验中少突胶质细胞分子标志物 CNP 的 mRNA 水平在 OGD/R 处理后 4 h 明显上升, 证实了卒中后的轴突再生作用可能是由少突胶质细胞新生的增强所引发。轴突再生是损伤后神经功能恢复的重要基础, 因此促进轴突再生被视为缺血性卒中的治疗策略之一。

本研究通过检测 OGD/R 后不同时间点各种细胞分化标志物与 *Epor*、*Csf2r*(β CR) 以及 *Pbk* 的转录水平并分析数据发现, 少突胶质细胞的标志物之一 *Cnp* 与受体 *Epor* 以及蛋白激酶 *Pbk* 的转录水平均呈正相关, 另一标志物 *Mbp* 与蛋白激酶 *Pbk* 的转录水平呈正相关。PBK 被证实在多个系统的恶性肿瘤组织中高表达, 通过激活下游 MAPK (p38、ERK、

JNK) 信号通路,对恶性肿瘤的发生发展、治疗预后起到重要作用^[15-16]。在脑缺血相关的研究中也同样发现 MAPK 及上游 MAP2K、MAP3K 具有新的潜在药物靶点^[17]。研究证明大鼠缺血 24 h 脑组织芯片中, PBK 的 mRNA 水平变化较其上游 MAP3Ks、

其他 MAP2Ks、下游 MAPK 家族成员更为显著^[18]。在脑缺血-再灌注早期, TOPK (PBK) 在大鼠脑缺血皮层神经元中活化,可以起到抗氧化及神经保护作用^[5]。以上研究证实 PBK 能够减轻缺血性神经损伤。EPOR 是一种广泛表达的细胞表面受体,既往

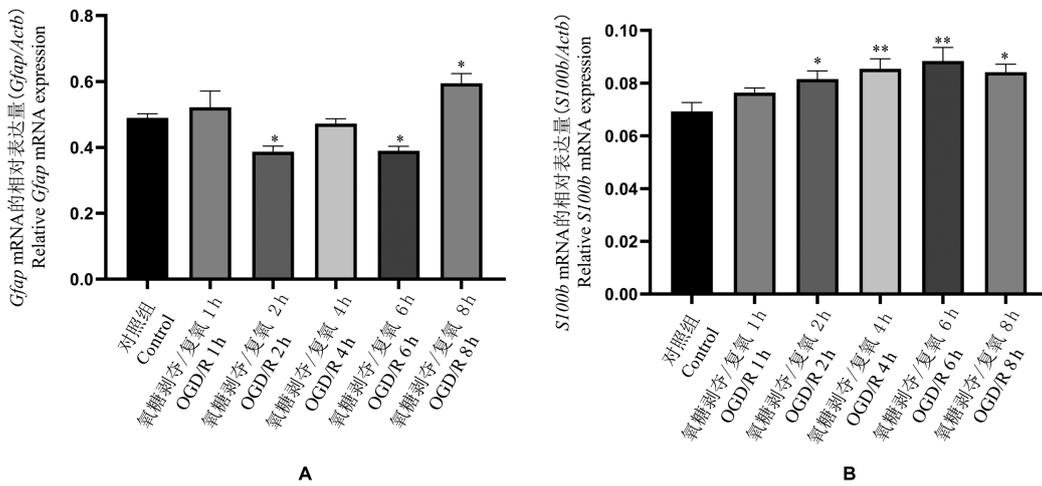


注:A:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点少突胶质细胞标志物 CNP 的基因表达情况;B:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点少突胶质细胞标志物 MBP 的基因表达情况。Cnp:2',3'-环核苷酸 3'-磷酸二酯酶基因。Mbp:髓磷脂碱性蛋白基因。与对照组相比,*P<0.05。

图 1 Cnp、Mbp 在神经干细胞 OGD/R 后不同时间点的表达水平

Note. A, The gene expressions of oligodendrocyte marker CNP in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. B, The gene expressions of oligodendrocyte marker MBP in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. Cnp, 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene. Mbp, Monobutyl phthalate gene. Compared with the control group, *P<0.05.

Figure 1 Expression levels of Cnp and Mbp at different time points after OGD/R in neural stem cells



注:A:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点星形胶质细胞标志物 GFAP 的基因表达情况;B:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点星形胶质细胞标志物 S100B 的基因表达情况。Gfap:胶质纤维酸性蛋白基因。S100b:S100β 蛋白基因。与对照组相比,*P<0.05;与对照组相比,**P<0.01。

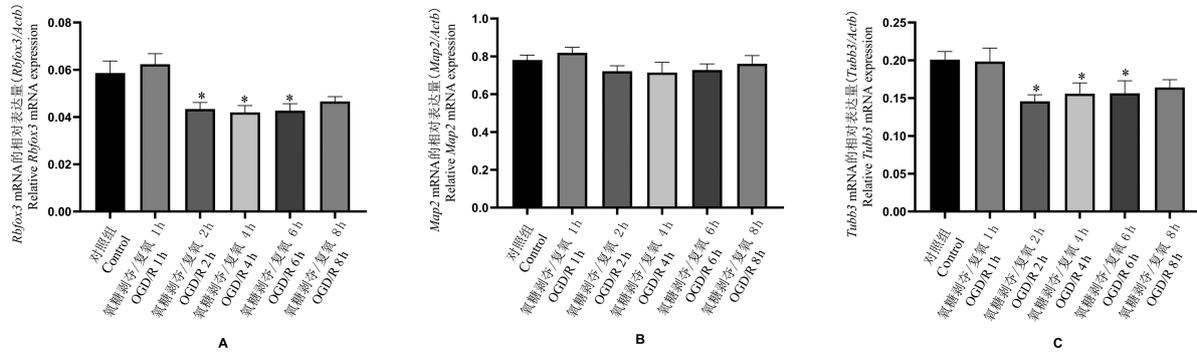
图 2 Gfap、S100b 在神经干细胞 OGD/R 后不同时间点的表达水平

Note. A, The gene expressions of astrocyte marker GFAP in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. B, The gene expressions of astrocyte marker S100B in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. Gfap, Glial fibrillary acidic protein gene. S100b, S100 beta protein gene. Compared with the control group, *P<0.05. Compared with the control group, **P<0.01.

Figure 2 Expression levels of Gfap and S100b at different time points after OGD/R in neural stem cells

其形成的异源二聚体被认为主要参与介导 EPO 促进红系祖细胞生成成熟红细胞,最近的研究表明 EPO 除了具有造血活性外,还具有广泛的组织保护活性。它可作用于机体除造血细胞外的多种组织

和细胞,包括神经系统、心脏、肾等,通过减少细胞凋亡、抑制炎症反应、促进血管生长、促进功能恢复等发挥其保护作用^[19-20]。CSF2RB 通过与 EPOR 相关联形成 EPO 敏感的组织保护性异质二聚体受体

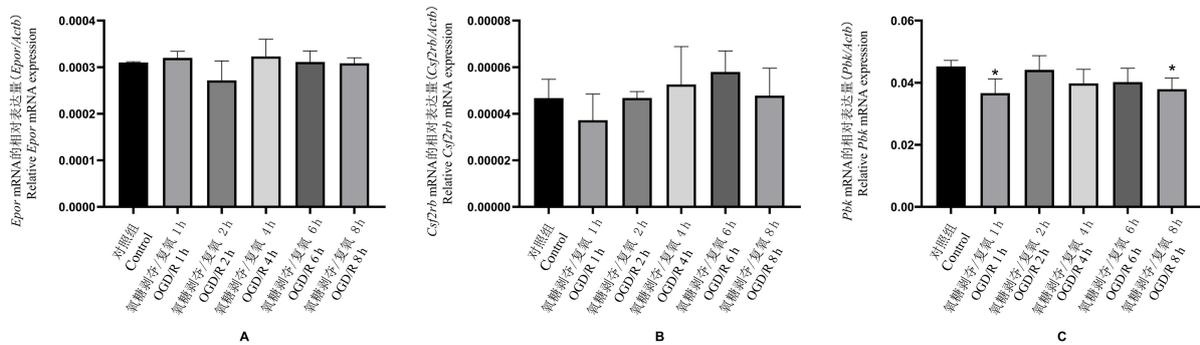


注:A:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点神经元标志物 RBFOX3 的基因表达情况;B:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点神经元标志物 MAP2 的基因表达情况;C:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点神经元标志物 TUBB3 的基因表达情况。*Rbfox3*:神经元核蛋白基因;*Map2*:微管相关蛋白-2 基因;*Tubb3*: β III 微管蛋白基因。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 *Rbfox3*、*Map2* 以及 *Tubb3* 在神经干细胞 OGD/R 后不同时间点的表达水平

Note. A, The gene expressions of neuron marker RBFOX3 in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. B, The gene expressions of neuron marker MAP2 in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. C, The gene expressions of neuron marker TUBB3 in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. *Rbfox3*, Neuronal nuclear protein gene. *Map2*, Microtubule-associated protein-2 gene. *Tubb3*, Beta III-tubulin gene. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Expression levels of *Rbfox3*, *Map2* and *Tubb3* at different time points after OGD/R in neural stem cells

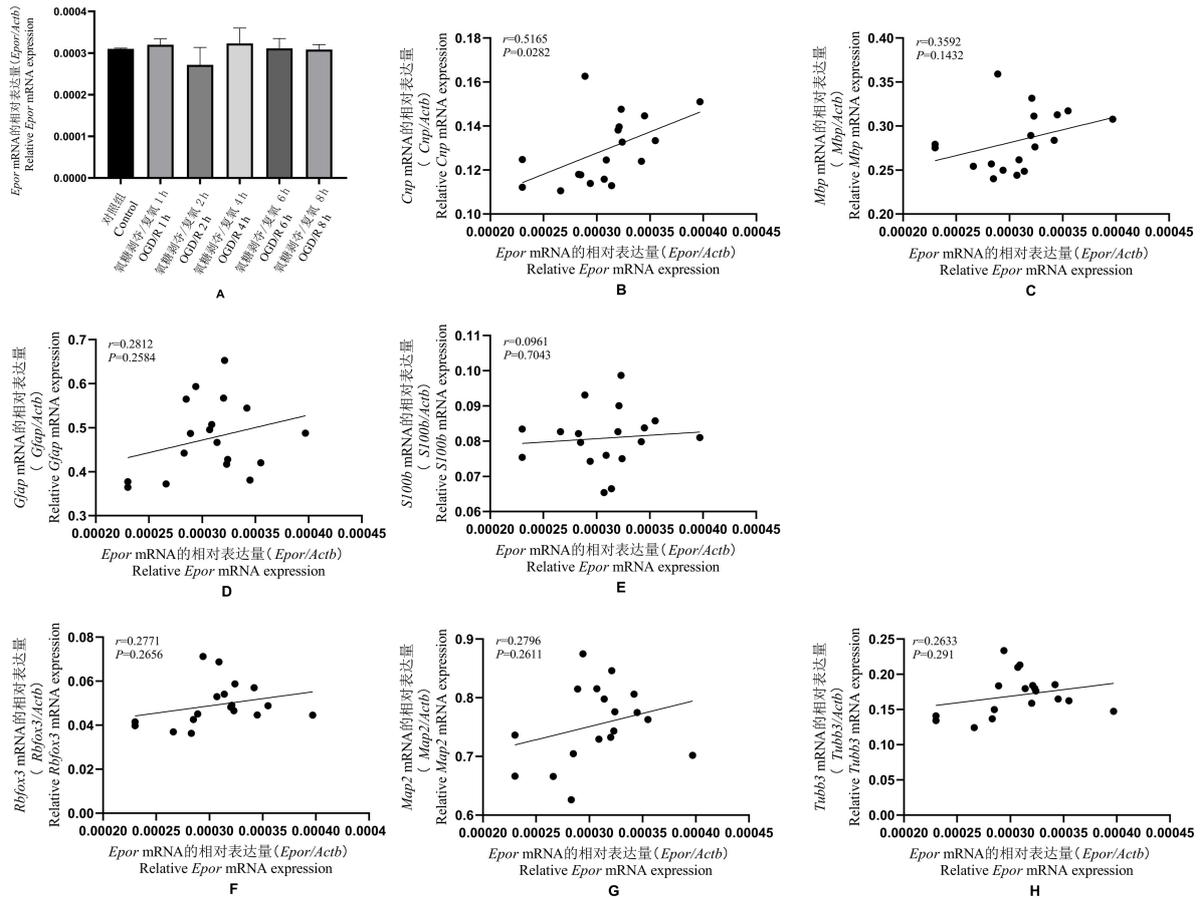


注:A:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点信号分子 EPOR 的基因表达情况;B:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点信号分子 CSF2RB 的基因表达情况;C:采用 RT-PCR 法比较神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点信号分子 PBK 的基因表达情况。*Epor*:促红细胞生成素受体基因;*Csf2rb*:共 β 亚基异源受体基因;*Pbk*:PDZ 连接激酶基因。与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 *Epor*、*Csf2rb* 以及 *Pbk* 在神经干细胞 OGD/R 后不同时间点的表达水平

Note. A, The gene expressions of the signal molecule EPOR in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. B, The gene expressions of the signal molecule CSF2RB in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. C, The gene expressions of the signal molecule PBK in neural stem cells at different time points after OGD 3 h/reoxygenation were compared. *Epor*, Erythropoietin receptor gene. *Csf2rb*, Common beta-subunit heteroreceptor gene. *Pbk*, PDZ-binding-kinase gene. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

Figure 4 Expression levels of *Epor*, *Csf2rb* and *Pbk* at different time points after OGD/R in neural stem cells



注:A; *Epor* 在神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点的表达水平;B:信号分子 *Epor* 和少突胶质细胞标志物 *Cnp* 的相关性;C:信号分子 *Epor* 和少突胶质细胞标志物 *Mbp* 的相关性;D:信号分子 *Epor* 和星形胶质细胞标志物 *Gfap* 的相关性;E:信号分子 *Epor* 和星形胶质细胞标志物 *S100b* 的相关性;F:信号分子 *Epor* 和神经元标志物 *Rbfox3* 的相关性;G:信号分子 *Epor* 和神经元标志物 *Map2* 的相关性;H:信号分子 *Epor* 和神经元标志物 *Tubb3* 的相关性。

图 5 各类细胞标志蛋白与信号分子 EPOR 的相关性分析

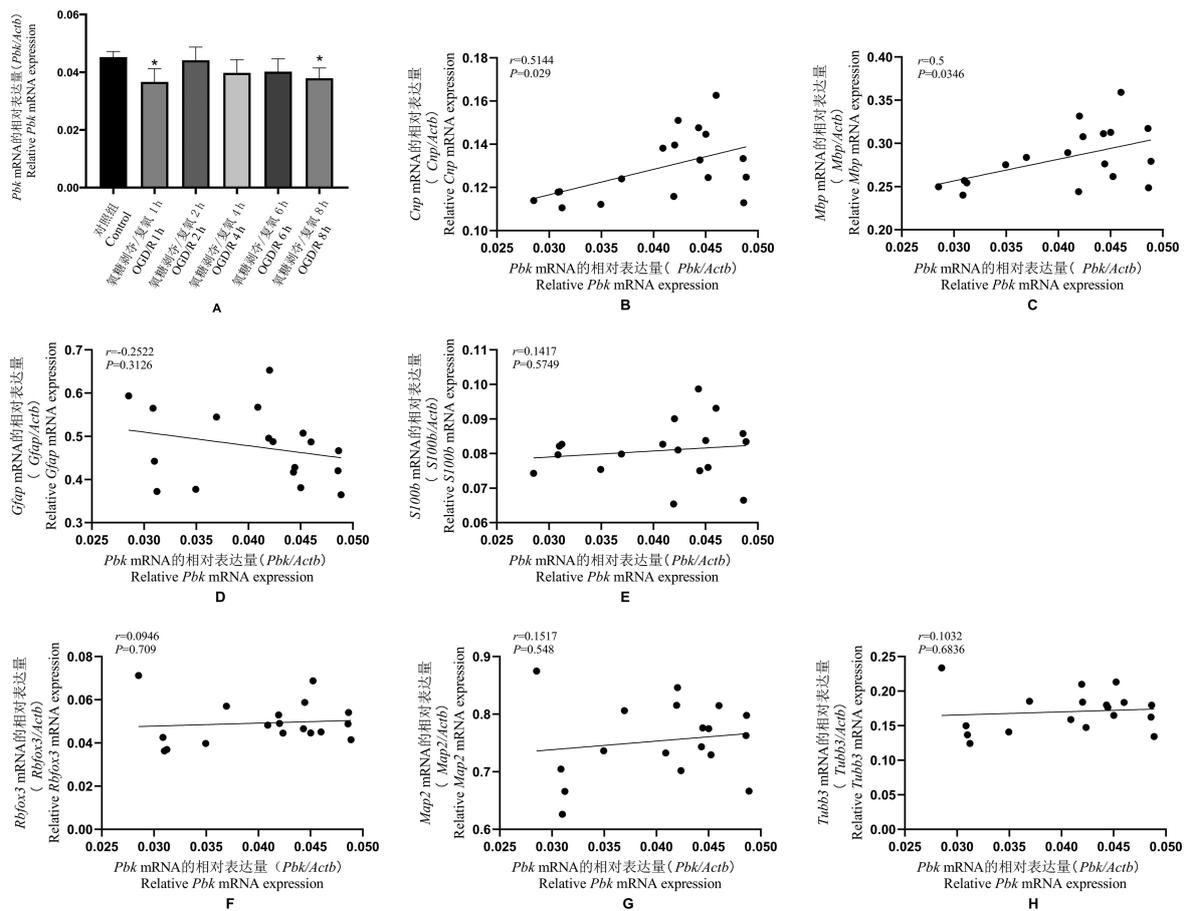
Note. A, Expression levels of *Epor* at different time points after OGD/R in neural stem cells. B, Correlation between *Epor* and *Cnp*. C, Correlation between *Epor* and *Mbp*. D, Correlation between *Epor* and *Gfap*. E, Correlation between *Epor* and *S100b*. F, Correlation between *Epor* and *Rbfox3*. G, Correlation between the *Epor* and *Map2*. H, Correlation between the *Epor* and *Tubb3*.

Figure 5 Correlation analysis of cell marker proteins with signal molecule EPOR

进行信号传导,起到神经保护作用^[21-22]。我们的实验结果进一步提示 PBK、EPOR 可能参与缺血性损伤后神经干细胞向少突胶质细胞方向的分化,即少突胶质细胞新生的过程,从而促进了卒中后轴突再生以及神经功能恢复。两个分子之间是否存在作用关系尚需进一步的研究探讨。

星形胶质细胞起支持和分隔神经细胞的作用。GFAP 是一种 III 型中间丝状蛋白,参与细胞骨架的构成并维持其张力强度,是星形胶质细胞活化的标志物^[23]。S100B 蛋白主要在星形胶质细胞中表达,其过量释放可促进脑损伤后神经炎症反应的激活和进展^[24]。本实验结果提示神经干细胞缺氧缺糖

后 2 h 和 6 h *Gfap* 的表达减少,8 h 时表达升高;*S100b* 的表达水平则于神经干细胞损伤后逐渐增加,6 h 时达到最高,8 h 时较前稍有下降。既往学者研究发现,体外培养星形胶质细胞损伤后 S100B 的总体表达呈单峰变化趋势,损伤后 6 h 达到高峰,具有时序性变化的规律^[25]。大鼠脑缺血再灌注后 S100B 和 GFAP 的表达时间变化关系研究也有说明,缺血再灌注早期 S100B 可因星形胶质细胞受损而渗漏到外周微环境,进而刺激其合成水平上升,表达增加且呈双峰趋势;而 GFAP 则于 S100B 达高峰后,反应性星形胶质细胞开始参与损伤后修复和胶质瘢痕形成时表达增加^[26]。结合本研究实验结



注: A: *Pbk* 在神经干细胞 OGD 3 h/复氧后不同时间点的表达水平; B: 信号分子 *Pbk* 和少突胶质细胞标志物 *Cnp* 的相关性; C: 信号分子 *Pbk* 和少突胶质细胞标志物 *Mbp* 的相关性; D: 信号分子 *Pbk* 和星形胶质细胞标志物 *Gfap* 的相关性; E: 信号分子 *Pbk* 和星形胶质细胞标志物 *S100b* 的相关性; F: 信号分子 *Pbk* 和神经元标志物 *Rbfox3* 的相关性; G: 信号分子 *Pbk* 和神经元标志物 *Map2* 的相关性; H: 信号分子 *Pbk* 和神经元标志物 *Tubb3* 的相关性。

图 6 各类细胞标志蛋白与信号分子 PBK 的相关性分析

Note. A, Expression levels of *Pbk* at different time points after OGD/R in neural stem cells. B, Correlation between *Pbk* and *Cnp*. C, Correlation between *Pbk* and *Mbp*. D, Correlation between *Pbk* and *Gfap*. E, Correlation between *Pbk* and *S100b*. F, Correlation between *Pbk* and *Rbfox3*. G, Correlation between *Pbk* and *Map2*. H, Correlation between *Pbk* and *Tubb3*.

Figure 6 Correlation analysis of cell marker proteins with signal molecule Pbk

果考虑缺血性损伤后神经干细胞可向星形胶质细胞分化,参与炎症反应,继而发生凋亡、坏死。8 h 后更多的星形胶质细胞生成、激活,成为反应性星形胶质细胞参与到胶质瘢痕的形成。后续我们可以进一步探究神经干细胞氧糖剥夺/复氧 8 h 以后的星形胶质细胞标志物变化情况。

大量研究结果已表明缺血性脑损伤后成体神经再生作用增强,对神经功能的恢复具有促进作用^[27-28]。然而其机制目前尚不清楚。在本实验中,利用体外神经干细胞氧糖剥夺模型模拟缺血性脑损伤后神经干细胞的变化。结果显示 OGD/R 后 2~6 h 神经元的再生被抑制,表明脑缺血会直接抑制

成体神经再生,即缺血后成体神经再生的增强并不是由缺血刺激直接引发的,可能是由周围微环境的变化引起。具体的作用机制还需要进一步探究。

综上所述,本实验结果提示缺氧缺糖损伤显著促进了少突胶质细胞和星形胶质细胞新生,同时抑制了神经干细胞向神经元方向的分化。转录分析结果提示 EPOR 以及 PBK 可能参与神经干细胞向少突胶质细胞方向的分化,为进一步研究缺血后神经再生机制提供了基础。未来的研究应继续探讨 EPOR 以及 PBK 参与缺血后少突胶质细胞再生的机制以及其他的调节通路,为临床转化提供更多可干预的分子靶点。

参考文献:

- [1] 刘正, 邵子玮, 袁文华, 等. Eph/ephrin 信号通路与神经干细胞的增殖和分化 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(13): 2101-2106.
- [2] Chen L, Huang K, Wang R, et al. Neuroprotective effects of cerebral ischemic preconditioning in a rat middle cerebral artery occlusion model; the role of the notch signaling pathway [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 8168720.
- [3] Bowman AN, Van AR, 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.
- [4] Zhou Z, Dun L, Wei B, et al. Musk Ketone induces neural stem cell proliferation and differentiation in cerebral ischemia via activation of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Neuroscience, 2020, 435: 1-9.
- [5] Zhao H, Wang R, Tao Z, et al. Ischemic postconditioning relieves cerebral ischemia and reperfusion injury through activating T-LAK cell-originated protein kinase/protein kinase b pathway in rats [J]. Stroke, 2014, 45(8): 2417-2424.
- [6] Han Z, Zhao H, TAO Z, et al. TOPK promotes microglia/macrophage polarization towards M2 phenotype via inhibition of HDAC1 and HDAC2 activity after transient cerebral ischemia [J]. Aging Dis, 2018, 9(2): 235-248.
- [7] 顾恩妍, 哈福, 李林凤, 等. 神经干细胞分离培养方法的介绍 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(11): 53-57.
- [8] 张凤兰, 杨璐军, 朱红梅, 等. 不同胎龄小鼠脑组织中神经干细胞所占比例的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(7): 48-52.
- [9] 卢延华, 管博文, 刘旭, 等. 模拟衰老大鼠星形胶质细胞条件培养基对神经干细胞增殖能力的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 153-160.
- [10] 王菲, 原一桐, 高渊涛, 等. tdTomato 转基因小鼠的建系及其在细胞示踪方面的应用研究 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 1-9.
- [11] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death [J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 913-922.
- [12] Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, et al. The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage [J]. Brain Res, 2000, 886(1-2): 190-207.
- [13] Hinman JD. The back and forth of axonal injury and repair after stroke [J]. Curr Opin Neurol, 2014, 27(6): 615-623.
- [14] Li S, Overman JJ, Katsman D, et al. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke [J]. Nat Neurosci, 2010, 13(12): 1496-1504.
- [15] 曾晨曦, 袁萍, 孙军. 抗肿瘤药物: Pbk/TOPK 抑制剂的研究进展 [J]. 生命的化学, 2018, 38(1): 150-155.
- [16] 高志, 陈军梅, 陈迪, 等. TOPK 与部分常见恶性肿瘤关系的研究进展 [J]. 微循环学杂志, 2019, 29(4): 88-91.
- [17] Mao LM, Wang JQ. Synaptically localized mitogen-activated protein kinases; local substrates and regulation [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(9): 6309-6315.
- [18] Zhao H, Wang R, Tao Z, et al. Activation of T-LAK-cell-originated protein kinase-mediated antioxidation protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. FEBS J, 2014, 281(19): 4411-4420.
- [19] Nguyen AQ, Cherry BH, Scott GF, et al. Erythropoietin: powerful protection of ischemic and post-ischemic brain [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2014, 239(11): 1461-1475.
- [20] Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. *In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(8): 4635-4640.
- [21] Bennis Y, Sardon-Bartoli G, Guillet B, et al. Priming of late endothelial progenitor cells with erythropoietin before transplantation requires the CD131 receptor subunit and enhances their angiogenic potential [J]. Thromb Haemost, 2012, 10(9): 1914-1928.
- [22] Ding J, Wang J, Li QY, et al. Neuroprotection and CD131/GDNF/AKT pathway of carbamylated erythropoietin in hypoxic neurons [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(7): 5051-5060.
- [23] Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology [J]. Acta Neuropathol, 2010, 119(1): 7-35.
- [24] Belozor OS, Yakovleva DA, Potapenko IV, et al. Extracellular S100 β disrupts bergman glia morphology and synaptic transmission in cerebellar purkinje cells [J]. Brain Sci, 2019, 9(4): 80.
- [25] 胡玲, 余彬华, 陈晓刚, 等. S100 β 在体外培养大鼠大脑皮质星形胶质细胞损伤后的表达研究 [J]. 华西医学, 2009, 24(9): 2367-2369.
- [26] Yasuda Y, Tateishi N, Shimoda T, et al. Relationship between S100 β and *Gfap* expression in astrocytes during infarction and glial scar formation after mild transient ischemia [J]. Brain Res, 2004, 1021(1): 20-31.
- [27] Wiltrot C, Lang B, Yan Y, et al. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis [J]. Neurochem Int, 2007, 50(7-8): 1028-1041.
- [28] Williamson MR, Jones TA, Drew MR. Functions of subventricular zone neural precursor cells in stroke recovery [J]. Behav Brain Res, 2019, 376: 112209.

[收稿日期] 2020-04-28