

研究论文

黄芪诱导人羊膜上皮细胞WISH细胞株向神经细胞分化并抑制Notch1表达及促进细胞存活

陈旭东^{1,*}, 王建国²

河南漯河医学高等专科学校¹组织胚胎学教研室; ²分子医学实验室, 漯河 462002

摘要: 本研究旨在探讨黄芪(*astragalus*)对人羊膜上皮细胞WISH细胞株向神经细胞分化、Notch1基因表达和细胞活力的影响。将人羊膜上皮细胞WISH细胞株分为3组, 即黄芪诱导组(设立4个浓度亚组)、全反式维甲酸(alltransretinoic acid, RA)组和对照组。分别采用化学诱导剂RA和黄芪注射液诱导WISH细胞株分化为神经细胞, 在诱导前后, 应用免疫细胞化学方法染色鉴定神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)、微管相关蛋白2 (microtubule associated protein 2, MAP-2)、神经干细胞巢蛋白(Nestin)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)进一步鉴定细胞多能性基因Oct4、Notch1、Hes1、神经干细胞标记物Nestin基因和神经元标记物NSE, 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT法)观察细胞活力。倒置显微镜观察显示, WISH细胞株分别经RA诱导12 h后、黄芪诱导24 h后, 由胞体伸出较长的轴突样和树突样突起, 且有分支。诱导48 h时, 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 黄芪诱导组NSE和MAP-2阳性率低于RA诱导组($P < 0.05$), 细胞活力较RA组高($P < 0.05$), 两诱导组NSE、MAP-2和GFAP阳性率均高于对照组; 而黄芪诱导组Nestin和GFAP阳性率高于RA组($P < 0.05$), 两诱导组Nestin阳性率均低于对照组。同时RT-PCR检测到黄芪(100 $\mu\text{L}/\text{mL}$)和RA诱导后多能基因Oct4、Notch1、Hes1表达低于对照组, 而NSE表达增多。以上结果提示, 黄芪和RA都可诱导WISH细胞株在体外分化为神经元样细胞, 且黄芪于100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 浓度时效果较好, 黄芪诱导对细胞毒性较小, 诱导过程中能抑制Notch1信号分子的表达。

关键词: 人羊膜上皮细胞(WISH); 维甲酸; 黄芪; 诱导分化

中图分类号: R338

Astragalus induces human amniotic epithelial cells (WISH) to differentiate toward neurons, inhibits the expression of Notch1 and promotes cell survival

CHEN Xu-Dong^{1,*}, WANG Jian-Guo²

¹Department of Histology and Embryology; ²Molecular Medicine Laboratory, Luohe Medical College, Luohe 462002, China

Abstract: The aim of the study was to investigate the effect of astragalus on differentiation of human amniotic epithelial cell line WISH into neurons, the expression of Notch1 gene and cell viability. WISH were randomly divided into astragalus group (4 sub-groups), alltransretinoic acid (RA) group and control group. Astragalus group and RA group were induced to differentiate into neurocytes by using chemical inducer RA and astragalus, respectively. The expression of neuron-specific enolase (NSE), microtubule associated protein 2 (MAP-2), Nestin and GFAP of induced cells in three groups were detected using immunocytochemical method. RT-PCR was further used to detect the expression of Oct4, Notch1, Hes1, Nestin and NSE. The cell viability was measured by methyl thiazolyl tetrazolium methods. Under the convert microscope it was observed that WISH cells started to change their shape, and there were several axon or dendrite-like processes out from the cell body induced by astragalus for 24 h or RA for 12 h. The positive cell rates of NSE and MAP-2 in 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ astragalus-induced group were less than those in RA-induced group at 48 h ($P < 0.05$), but higher than those in control group. Cell viability in astragalus group was higher than that of RA group ($P < 0.05$). While the positive

Received 2012-04-20 Accepted 2012-07-30

This work was supported by the Natural Science Foundation of Department of Education, Henan Province, China (No. 2011C310011).

*Corresponding author. Tel: +86-395-2112459; E-mail: lichenyue3@yahoo.com.cn

cell rates of Nestin and GFAP in 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ astragalus-induced group were higher than those in RA-induced group at 48 h ($P < 0.05$). The positive cell rates of Nestin in the two induced groups were lower than those in control group. RT-PCR showed that the expressions of Oct4, Notch1 and Hes1 in RA and astragalus (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) groups were less than those in control group, but the expression of NSE was higher than that in control group. These results suggest that astragalus (especially at 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 48 h) and RA can both induce human amniotic epithelial cell line WISH cells into neuron-like cells, but astragalus induction has a higher cell survival rate than RA induction, and the expression of Notch1 signal molecules is inhibited during the induction.

Key words: human amniotic epithelial cells (WISH); alltransretinoic acid; astragalus; induced differentiation

人羊膜上皮细胞源于外胚层成羊膜细胞, 具有部分胚胎干细胞特性^[1,2], 可分化为3个胚层不同类型的细胞^[3-5], 但目前研究人羊膜上皮细胞向神经细胞方向分化的很少。本研究组^[6]前期研究发现化学诱导剂全反式维甲酸 (alltransretinoic acid, RA) 可诱导人羊膜上皮细胞 WISH 细胞株分化为神经样细胞, 但化学诱导剂有一定的毒性, 而寻找一种安全高效的诱导剂, 是细胞治疗应用于临床的前提。有研究证实在胚胎干细胞、神经干细胞向神经细胞分化过程中 Notch 信号转导通路的活化状态对细胞分化过程起重要作用^[7]。以往的研究表明, 神经干细胞的分化受 Notch-Hes1/Hes5-Mash1 信号通路调控, Hes1、Hes5、Mash1 均属 bHLH 转录调控因子家族, 该家族在动物体内许多器官的发育过程中发挥重要作用, Hes1 (Hairy and enhancer of split 1) 为负调控型, 维持神经干细胞的增殖, 抑制神经干细胞过早分化为神经元, 在大脑神经元正常数量构筑发面发挥重要作用^[8]。但 Notch 通路在人羊膜上皮细胞向神经细胞分化调控中的影响目前少有报道。本研究拟在培养的人羊膜上皮细胞 WISH 细胞株中施加黄芪注射液, 选取 Notch 通路中的 Notch1 和相关靶基因 Hes1 作为对象, 观察它们在体外培养的 WISH 细胞株向神经样细胞分化过程中的表达, 以探讨该信号途径在分化中的作用, 以及黄芪对 WISH 细胞株向神经样细胞分化过程中神经样细胞分化效率及细胞活力的影响, 为将人羊膜上皮细胞应用于神经系统疾病的治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人羊膜上皮细胞 WISH 细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院; 免疫细胞化学染色所用一抗小鼠抗人神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE)、微管相关蛋白 2 (microtubule associated protein 2, MAP-2)、Nestin 单克隆抗体 (稀

释浓度为 1:500) 和小鼠抗人 GFAP 单克隆抗体 (稀释浓度为 1:600)、SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒 (棕黄色) 均购于北京中杉生物工程公司; MEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 和表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 购自 Gibco 公司; B27 购自 Gibco 公司; RA、胰酶购自 Sigma 公司; RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物公司), TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), Oct4、NSE、Nestin、 β -actin、Notch1、Hes1 引物 (大连宝生物公司)。CO₂ 培养箱 (Precision Scientific 公司, USA); 倒置相差显微镜及拍照系统 (Olympus); 黄芪注射液 (神威药业有限公司, 批号: 10091342)

1.2 WISH 细胞系的复苏及传代培养 冻存的 WISH 细胞, 37 °C 水浴融化。细胞悬于 10% 胎牛血清的 MEM 生长培养基中。调节细胞浓度至 10⁸ 个/L, 接种于培养瓶中, 置 37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。2~3 天后, 待细胞生长状态良好、细胞生长至 80% 融合时用 0.25% 胰酶消化传代, 准备诱导。

1.3 WISH 细胞系向神经细胞分化及免疫细胞化学检测 将传 3~5 代 WISH 细胞按 0.25 \times 10⁹ 个/L 浓度接种在预置玻片的 24 孔板中, 待细胞接近 70% 融合时, 用含 bFGF (10 $\mu\text{g}/\text{L}$)、EGF (10 $\mu\text{g}/\text{L}$)、B27 (2%)、谷氨酰胺 (2 mol/L) 的 MEM 培养基换液, 向神经干细胞方向分化, 观察形态变化。36 h 时取出玻片, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗, 3% 过氧化氢室温 10 min, 血清封闭 20 min, 滴加 NSE 一抗, 4 °C 过夜; PBS 冲洗, 加二抗, 37 °C 孵育 20 min, DAB 染色, 脱水, 透明, 中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作为空白对照。

1.4 黄芪和 RA 定向诱导 WISH 细胞系向神经样细胞分化 细胞撤去含 bFGF (10 $\mu\text{g}/\text{L}$)、EGF (10 $\mu\text{g}/\text{L}$)、

B27 (2%)、谷氨酰胺 (2 mol/L) 的 MEM 培养基换液, 将细胞分为 3 组: (1) 黄芪诱导组: 每孔加入预诱导液 (10% 胎牛血清 + 10 $\mu\text{g/L}$ bFGF + 10 $\mu\text{g/L}$ EGF + MEM 培养基) 培养 24 h, 加入含黄芪的 MEM 培养基进行培养, 黄芪注射液按浓度设 4 个亚组: 20、50、100、150 $\mu\text{L/mL}$; (2) RA 诱导组: 加入预诱导液培养 24 h, 用含 1 $\mu\text{mol/L}$ RA 的 MEM 培养基进行培养; (3) 对照组: 加入预诱导液培养 24 h, 加入 MEM 培养基进行培养。密切观察 3 组细胞的形态变化。

1.5 WISH 细胞系诱导分化的免疫细胞化学检测

诱导至 48 h 时, 取出玻片, PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗, 3% 过氧化氢室温 10 min, 血清封闭 20 min, 滴加 NSE、MAP-2、Nestin 和 GFAP 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBS 冲洗, 加二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, DAB 染色, 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。以 PBS 代替一抗作为空白对照。随机选取 5 个视野, 分别计数 Nestin、NSE、MAP-2、GFAP 阳性细胞数, 计算其阳性率。

1.6 MTT 法测定 WISH 细胞系细胞活力

对照组、RA 组和黄芪诱导组 (4 个浓度亚组) 每组 8 个复孔, 将已 80% 融合的细胞消化成单细胞, 按每孔 3 000 个细胞加到 96 孔培养板中。诱导至 24 h、48 h 时, RA 组、黄芪诱导组以及对照组细胞, 每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL , 继续培养 4 h 后, 小心吸弃培养液, 每孔加入 150 μL DMSO 在振荡机上振荡 10 min, 使吸附在细胞上的蓝紫色结晶充分溶解。在酶联免疫检测仪上测定光吸收值, 测定波长为 490 nm, 以空白孔调零。

1.7 RT-PCR 检测鉴定诱导前后的 WISH 细胞系

RT-PCR 检测诱导前后各组细胞 Oct4、Nestin、NSE、Notch1 和 Hes1 的特异性序列的表达。TRIzol 试剂提取诱导前后 WISH 细胞的总 RNA。引物序列: Oct4 (205 bp): 上游 (F) 5'-ACAGGCCGATGTGGGGCTCA-3', 下游 (R) 5'-CTTTCGGGCCTGCACGAGGG-3'; Nestin (209 bp): 上游 (F) 5'-CAGCTGGCGCACCTCAAGATG-3', 下游 (R) 5'-AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG-3'; NSE (420 bp) 上游 (F) 5'-GCAGTCCCGAGATCCC-AGCCATCAT-3', 下游 (R) 5'-GGCGATACAGGGG-CAGTTCCC-3'; β -actin (283 bp): 上游 (F) 5'-GC-ACAGAGCCTCGCCTTTGCC-3', 下游 (R) 5'-CG-ATGCCGTGCTCGATGGGG-3'; Notch1 (245 bp): 上游 (F) 5'-GATCGAGGAGGCGTGCGAGC-3',

下游 (R) 5'-CTTCCGCACGCTGGCAGTCA-3'; Hes1 (143 bp): 上游 (F) 5'-CAGGTGGTACCGGCTCCCG-3'A, 下游 (R) 5'-GGGCCGCTGGAAGGTGACAC-3'。PCR 扩增条件: Oct4、Nestin、 β -actin、Notch1 和 Hes1: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; NSE: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 均为 30 个循环。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶 150 V 电压电泳 20 min, Genefinder 染色, 用 Tanon 凝胶电泳图像分析系统扫描电泳, 采用 ImageJ 软件对 PCR 产物图像进行半定量分析, 得出的目的基因的光密度 (OD) 值与相应的 β -actin 的比值作为最终数据。所有实验均重复 3 次。

1.8 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件处理, 各組间比较用方差分析, 两两比较用 LSD 法检验, $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 WISH 细胞系细胞的生长和形态特征及干细胞特性

WISH 细胞系细胞种植后 2 h 已经贴壁并开始生长, 呈不规则形状, 散在生长, 培养 2 天后单层排列, 形似铺路石 (图 1A)。WISH 细胞系细胞经含 bFGF (10 $\mu\text{g/L}$)、EGF (10 $\mu\text{g/L}$)、B27 (2%)、谷氨酰胺 (2 mol/L) 的 MEM 培养基换液诱导后, 由不规则贴壁的细胞体收缩成球形, 部分细胞悬浮生长, 并开始聚集成球团样生长, 48 h 后形成明显的神经干细胞样克隆球, 细胞免疫组化表现为 Nestin 阳性 (图 1B)。

2.2 WISH 细胞系在条件培养基诱导后的形态观察

RA 诱导剂组: WISH 细胞系细胞经预诱导液作用, 无明显形态变化。加入 1 $\mu\text{mol/L}$ RA 后, 12 h 部分细胞出现两极或多极的细胞突起, 24 h 少数细胞突起末端还出现分支, 转变为类似神经元的形态, 48 h 后神经元样细胞未见明显增多, 但少量细胞突起连接成网状 (图 1C), 3 d 后有的开始脱落。黄芪 (100 $\mu\text{L/mL}$) 诱导剂组: 诱导 6 h 后, 细胞形态无明显变化; 12 h 后部分细胞胞体收缩, 细胞体成锥形或球形; 24 h 后见部分伸出两极或多极的细胞, 少量细胞在突起末端出现分支, 转变为类似神经元的形态。诱导 48 h 后, 神经元样细胞的数量未见明显增多, 但少量神经元样细胞的突起相互连接成网状 (图 1D)。对照组: 细胞一直保持宽大扁平的状态, 无明显增殖。

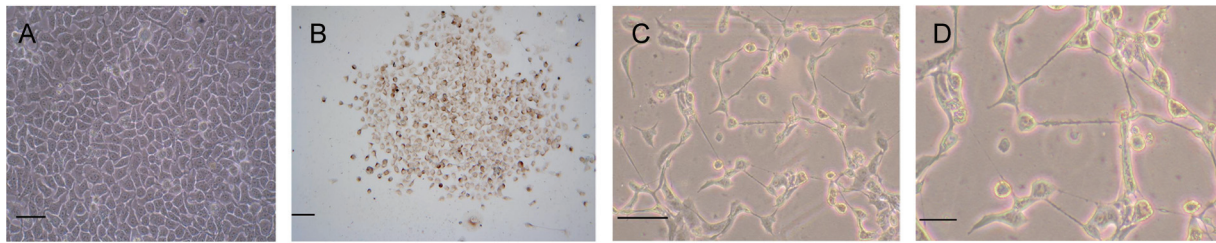


图 1. WISH细胞的培养及向神经样细胞诱导分化

Fig. 1. WISH cells were cultured and differentiated to neuron-like cells. *A*: WISH cells culture. *B*: WISH cells were induced to neural stem cells (NSCs) 48 h later. *C*: WISH cells were induced to neuron-like cells by 1 $\mu\text{mol/L}$ RA 48 h later. *D*: WISH cells were induced to neuron-like cells by 100 $\mu\text{L/mL}$ astragalus 48 h later. Scale bar, 20 μm .

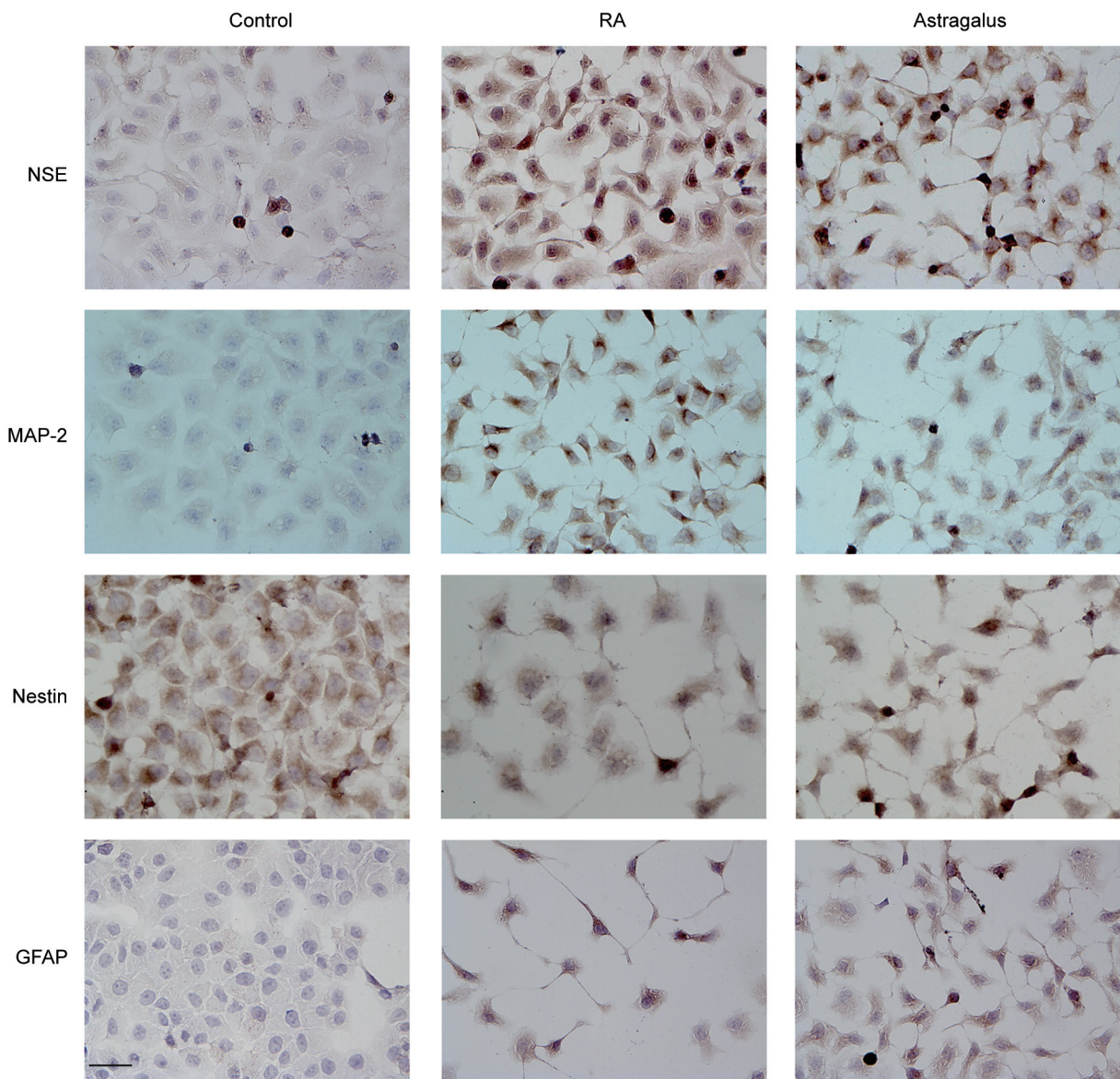


图 2. WISH细胞诱导分化48 h时各组NSE、MAP-2、Nestin、GFAP表达情况

Fig. 2. Differentiation of WISH to neurocytes and expression of NSE, MAP-2, Nestin and GFAP by immunocytochemical staining after being induced for 48 h. Scale bar, 20 μm .

表1. 三组细胞48 h时Nestin、NSE、MAP-2和GFAP阳性率
Table 1. Nestin, NSE, MAP-2 and GFAP-positive cell rates in three groups at 48 h

Group	Positive cell rate (%)			
	Nestin	NSE	MAP-2	GFAP
Astragalus	45.36 ± 1.25 ^{*#}	83.35 ± 2.43 ^{*#}	68.40 ± 1.56 ^{*#}	16.02 ± 1.35 ^{*#}
RA	23.10 ± 0.36 [#]	91.23 ± 0.54 [#]	89.36 ± 0.47 [#]	8.14 ± 0.56 [#]
Control	92.16 ± 0.43	3.02 ± 0.57	1.12 ± 0.46	1.05 ± 0.57

Means ± SD. *n* = 5. ^{*}*P* < 0.05 vs RA group, [#]*P* < 0.01 vs control group.

2.3 WISH细胞系在条件培养基诱导后的免疫细胞化学鉴定

对照组阳性细胞成不规则宽大样生长, 免疫细胞化学显示 NSE 和 MAP-2 表达很少, 几乎不表达 GFAP, 明显少于 RA 诱导组和黄芪诱导组 (*P* < 0.01), 而对照组大量表达 Nestin (*P* < 0.01); RA 诱导剂组经预诱导液、诱导液诱导 48 h 后, 几乎全部细胞表现为 NSE 阳性, 大部分细胞表现为 MAP-2 阳性, NSE 和 MAP-2 阳性率显著高于对照组 (*P* < 0.01), 胞浆呈棕黄色, Nestin 阳性细胞率较对照组明显减少 (*P* < 0.01), 少量表达 GFAP (*P* < 0.01); 黄芪 (100 μL/mL) 诱导剂组在诱导 48 h 后, 大部分细胞表现为 NSE 和 MAP-2 阳性, 其阳性率比对照组显著增加 (*P* < 0.01), 但比 RA 组有所降低 (*P* < 0.05); Nestin 和 GFAP 阳性细胞率较 RA 组增多 (*P* < 0.05) (图 2、表 1)。

2.4 诱导后细胞活力改变

MTT 实验结果见表 2。各实验组与相应对照组之间细胞活力有差异 (*P* < 0.05); 24 h 时黄芪各浓度组与 RA 组之间, 只有 20 和 100 μL/mL 黄芪组与 RA 组之间有差异 (*P* < 0.05), 24 h 时黄芪浓度组 20、100 μL/mL 与 50、150 μL/mL 之间有差异 (*P* <

0.05); 48 h 时, 黄芪 20、50、100 μL/mL 浓度组与 RA 组之间有差异 (*P* < 0.05 或 0.01), 150 μL/mL 黄芪组与 RA 组之间无差异 (*P* > 0.05), 48 h 时黄芪各浓度组中, 100 μL/mL 组与 20、50、150 μL/mL 组之间有差异 (*P* < 0.05); 24 h 组与 48 h 组之间各组纵向比较, 除了对照组和 20 μL/mL 浓度组外 (*P* > 0.05), 其它各组都有差异 (*P* < 0.05)。

2.5 诱导后 Nestin、Oct4、Notch1、Hes1 和 NSE 的表达

RT-PCR 结果显示 WISH 细胞系表达神经干细胞标志物 Nestin, 对照组 Nestin 的 OD 比值为 0.656 ± 0.062, 神经干细胞诱导后 Nestin 的 OD 比值为 1.825 ± 0.264, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 而黄芪 (100 μL/mL) 诱导组和 RA 组 48 h 时 Nestin 的 OD 比值分别明显减少为 0.132 ± 0.056, 0.086 ± 0.067, 具有统计学意义 (*P* < 0.05) (见图 3A); 同时 WISH 细胞系表达多能性基因 Oct4、Notch1、Hes1 和神经元标记物 NSE, 而经 RA 和黄芪 (100 μL/mL) 诱导分化后 Oct4、Notch1、Hes1 的 OD 比值明显下降, NSE 的 OD 比值经 RA 和黄芪诱导后都高于对照组 (*P* < 0.05, 图 3B-F, 表 3)。

表2. 各组细胞活力改变
Table 2. Vitality of three groups cells at different timepoints

Group	Control	20 μL/mL astragalus	50 μL/mL astragalus	100 μL/mL astragalus	150 μL/mL astragalus	RA
24 h	0.592 ± 0.17	0.514 ± 0.38 ^{▲*}	0.502 ± 0.68 [#]	0.515 ± 0.71 ^{▲*}	0.501 ± 0.62 [#]	0.498 ± 0.54 [#]
48 h	0.589 ± 0.20	0.512 ± 0.54 [▲]	0.516 ± 0.47 ^{▲△}	0.537 ± 0.56 ^{▲△}	0.431 ± 0.37 [△]	0.429 ± 0.62 [△]

Means ± SD. *n* = 8. [#]*P* < 0.05 or 0.01 vs control group, [▲]*P* < 0.05 or 0.01 vs RA group, ^{*}*P* < 0.05 or 0.01 vs 50 μL/mL and 150 μL/mL astragalus groups at 24 h, [△]*P* < 0.05 or 0.01 vs other astragalus groups at 48 h, [△]*P* < 0.05 vs 24 h group.

表3. 各组细胞目的基因与β-actin的OD比值
Table 3. Aim gene and β-actin OD ratio in every group

Group	Oct4/β-actin	NSE/β-actin	Notch1/β-actin	Hes1/β-actin
Astragalus	0.676 ± 0.056 [#]	1.156 ± 0.186 [#]	0.786 ± 0.186 [#]	0.657 ± 0.053 [#]
RA	0.714 ± 0.063 [#]	1.063 ± 0.231 [#]	0.624 ± 0.046 [#]	0.586 ± 0.057 [#]
Control	1.173 ± 0.271	0.665 ± 0.067	1.192 ± 0.175	1.184 ± 0.231

Means ± SD. *n* = 5. ^{*}*P* < 0.05 vs RA group, [#]*P* < 0.05 vs control group.

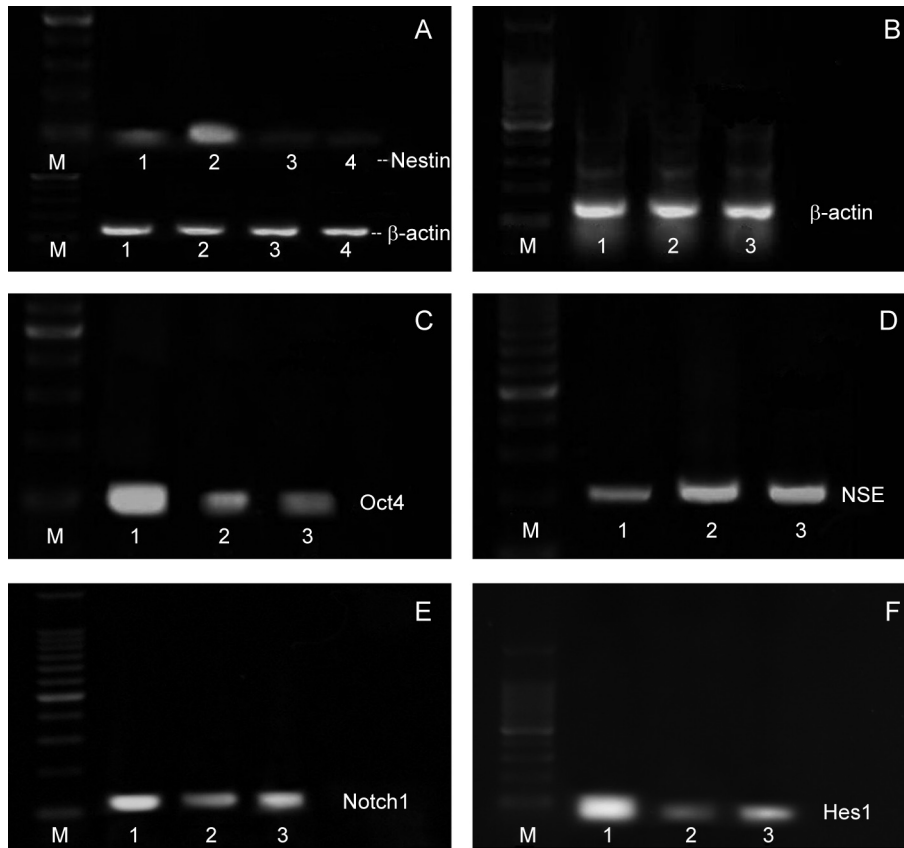


图 3. RT-PCR法检测基因结果

Fig. 3. RT-PCR results. *A*: Detection of Nestin mRNA fragment by RT-PCR analysis. M: marker; 1: control; 2: neural stem cell induced group; 3: RA group; 4: astragalus group. *B-F*: Detection of mRNA fragment by RT-PCR analysis in each group after being induced with astragalus and RA for 48 h. *B*: β -actin; *C*: Oct4; *D*: NSE; *E*: Notch1; *F*: Hes1; M: marker; 1: control; 2: RA group; 3: astragalus group.

3 讨论

人羊膜上皮细胞是一群具有多向分化潜能的细胞^[9,10], Okawa等^[11]发现人羊膜上皮细胞表达神经干细胞标记物 Nestin, 表明羊膜中可能含有神经干细胞。Mikil等^[12]研究发现人羊膜上皮细胞含 Oct4 和 Nanog 基因, 这两种基因是使胚胎干细胞保持分化潜力的关键基因。为探明人羊膜上皮细胞向神经细胞分化是否要经历神经干细胞阶段以及多能干细胞特异标志在分化过程中的变化, 本实验观察到加入神经干细胞培养液后细胞逐渐形成神经球样集落, 一个一个的球团样生长, 且有部分细胞悬浮样生长, 免疫组化鉴定 Nestin 阳性, RT-PCR 结果表明, 人羊膜上皮细胞向神经干细胞分化过程 Nestin 表达增多, 但当撤去神经干细胞培养液, 加入黄芪诱导液和 RA 诱导后 Nestin 的表达明显下降, 与 Nestin 免疫组化结果一致。提示人羊膜上皮细胞向神经细

胞分化要经历神经干细胞阶段, 随着分化神经干细胞标志物 Nestin 表达逐渐减少。

Notch 信号系统涉及很多细胞的增殖、分化^[13], 是影响胚胎发育中各种组织中未分化细胞命运的重要信号通路之一^[14], 正常情况下, Notch 信号的功能是使多种不成熟细胞暂时维持在未分化状态, 以调节细胞对分化诱导因子的反应, Notch 信号主要通过促进 Hes1 和 Hes5 等基因的转录而向下作用^[15], 并使未分化细胞保持一定的数量, Hes1 为 Notch1 的负调控下游靶基因, 激活后产生抑制因子, 从而抑制细的分化, 保持其干细胞特性, 本研究 RT-PCR 结果显示, 加入黄芪诱导液和 RA 诱导后 Notch1 和 Hes1 的 mRNA 和对照组相比都明显表达下降, 提示黄芪诱导液和 RA 诱导 WISH 向神经细胞分化时 Notch 信号表达的抑制, 有利于 WISH 向神经细胞的分化。

本实验小组^[6]前期使用化学诱导剂RA和BHA诱导人羊膜上皮细胞向神经样细胞分化,48 h时几乎全部的细胞都表达NSE阳性,但3 d后倒置显微镜下见到部分细胞漂浮,RA化学诱导剂虽然转化率高,诱导分化时间短,神经细胞标记物表达率高,但分化细胞存活时间短,可能RA启动了某些凋亡程序,且RA是有毒的化学物质,临床应用受到限制。很多传统的中药有着强身健体、抗衰老作用,在神经治疗上有着显著的疗效,近年中药诱导细胞分化的研究也在进行。研究表明黄芪有体外诱导骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)定向神经分化的作用^[16,17]。黄芪是临床常用的中药之一,具有抗氧化,延缓衰老,增强机体免疫功能的作用,黄芪注射液主要含有黄芪皂甙类和异黄酮类成分,这两种成分均有抗脂质过氧化,清除自由基,增加组织细胞抗缺血缺氧能力^[18]。近年来,黄芪越来越多地被用于治疗脑血管意外引起的神经系统疾病,说明黄芪对神经细胞的生理功能有一定的作用^[19,20]。但关于黄芪注射液诱导人羊膜上皮细胞向神经样细胞分化的研究报道甚少。

本研究结果显示黄芪具有诱导WISH细胞向神经细胞分化的作用,黄芪诱导12 h后,部分细胞胞体收缩,细胞体成锥形或球形;24 h时见部分伸出双极或多极的细胞,少量细胞在突起末端出现分支,转变为类似于神经元的形态。诱导48 h后少量神经元的突起相互连接成网状,结合免疫细胞化学鉴定在诱导48 h后大部分细胞表现为NSE和MAP-2阳性,少量细胞表达GFAP阳性,对照组NSE、MAP-2和GFAP阳性细胞率明显少于RA诱导组和黄芪诱导组,因NSE、MAP-2为神经元的特异性标记物,GFAP为神经胶质细胞的特异性标记物,Nestin为神经干细胞标记物,结合RT-PCR结果,撤去神经干细胞培养液,加入黄芪诱导培养液后,Nestin明显表达减少而NSE和MAP-2表达明显增多,提示WISH细胞系在黄芪注射液的诱导后,从形态和表型上都有向神经细胞分化的改变。

RA是常用诱导化学试剂。本实验黄芪组设置了4个浓度亚组,MTT实验结果对比表明,150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 浓度组48 h细胞活力明显下降,提示150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 浓度的黄芪对细胞产生了较大的毒性,100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 浓度组48 h时细胞活力明显高于同时的RA诱导组,结合免疫组化结果,100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 浓度组48 h组NSE和MAP-2表达高于其它浓度组,黄芪注射液的诱

导作用较RA缓和,诱导细胞出现神经元样变化的时间晚于RA诱导组,NSE和MAP-2阳性率也低于RA诱导组,但细胞活性明显高于RA诱导组。在RA组细胞诱导至96 h时,几乎全部脱落、萎缩,而黄芪注射液诱导组在24 h、48 h时,细胞存活率都较高,提示黄芪注射液对细胞的存活影响较小。

综上所述,黄芪注射液以其低毒性可直接用于体内,是一种更加理想的诱导分化剂,大部分细胞定向分化为神经干细胞和神经元,但黄芪注射液的诱导效率还是低于化学诱导剂RA,黄芪注射液和羊膜上皮细胞可以作为体外诱导向神经样细胞分化及神经系统疾病干细胞移植研究的模型细胞,本研究结果为黄芪联合人羊膜上皮细胞应用于临床神经系统疾病研究提供了依据。

参考文献

- 1 Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23(10): 1549–1559.
- 2 Insausti CL, Blanquer M, Bleda P, Iniesta P, Majado MJ, Castellanos G, Moraleda JM. The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol* 2010; 25(1): 91–98.
- 3 Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G. Isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(2): 300–311.
- 4 Marongiu F, Gramignoli R, Dorko K, Miki T, Ranade AR, Paola Serra M, Doratiotto S, Sini M, Sharma S, Mitamura K, Sellaro TL, Tahan V, Skvorak KJ, Ellis EC, Badylak SF, Davila JC, Hines R, Laconi E, Strom SC. Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology* 2011; 53(5): 1719–1729.
- 5 Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Cicione C, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation* 2011; 81(3): 162–171.
- 6 Chen XD (陈旭东), Liu HM, Hu XY, Yuan KL. *In vitro* differentiation of human amniotic epithelial cell into neuron like cells. *J Pract Med (实用医学杂志)* 2011; 27(8): 1336–1338 (Chinese, English abstract).
- 7 Fior R, Henrique D. A novel hes5/hes6 circuitry of negative regulation controls Notch activity during neurogenesis. *Dev Biol* 2005; 281(2): 318–333.
- 8 Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara SH, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the tim-

- ing of neural stem cell differentiation. *Development* 2004; 131(22): 5539–5550.
- 9 Zhang L (张路), Fang N, Chen DX, Liu ZL, Wan WH, Liu JW, Zhang T. Differentiation of human amniotic epithelial cells into cardiomyocyte-like cells. *J Clin Rehabil Tissue Engineer Res (中国组织工程研究与临床康复)* 2008; 12(3): 401–405 (Chinese, English abstract).
 - 10 Lu Y, Hui G, Wu Z, Liu T, Ji X, Guo L. Transformation of human amniotic epithelial cells into neuron-like cells in the microenvironment of traumatic brain injury *in vivo* and *in vitro*. *Neural Regen Res* 2011; 6(10): 744–749.
 - 11 Okawa H, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Sato K. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. *Neuroreport* 2001; 12(18): 4003–4007.
 - 12 Miki T, Strom SC. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2006; 2(2): 133–142.
 - 13 Ann EJ, Kim HY, Choi YH, Kim MY, Mo JS, Jung J, Yoon JH, Kim SM, Moon JS, Seo MS, Hong JA, Jang WG, Shore P, Komori T, Koh JT, Park HS. Inhibition of Notch1 signaling by Runx2 during osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2011; 26(2): 317–330.
 - 14 Kobayashi T, Kageyama R. Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling. *Genes Cells* 2010; 15(7): 689–698.
 - 15 Murata J, Ohtsuka T, Tokunaga K, Nishiike S, Inohara H, Okano H, Kageyama R. Notch-Hes1 pathway contributes the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down-regulation of p27Kip1. *J Neurosci Res* 2009; 87(16): 3521–3534.
 - 16 Huang J (黄进), Zhang J, Xu ZW. Effect of astragalus polysaccharide on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and the expression of stem cell factor *in vitro*. *Fudan Univ J Med Sci (复旦学报医学版)* 2011; 38(4): 343–348 (Chinese, English abstract).
 - 17 Cao H (曹慧), Zhong JF, Chen ZH, Jing J, Tan XL. Research on neuron-like differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of rat induced by Astragalus effective composition. *J Nantong Univ (Medical Sciences) (南通大学学报医学版)* 2012; 32(2): 89–92 (Chinese, English abstract).
 - 18 Xuejiang W, Ichikawa H, Konishi T. Antioxidant potential of qizhu tang, a Chinese herbal medicine, and the effect on cerebral oxidative damage after ischemia reperfusion in rats. *Biol Pharm Bull* 2001; 24(5): 558–563.
 - 19 Yu Q (余勤), Li PP, Zhou LP, Xuan XB, Sheng LX. Effect of Astragalus injection combined with intrathecal transplantation of rat mesenchymal stem cells for repairing hypoxic-ischemic brain damage in rats. *Chin Arch Trad Chin Med (中华中医药学刊)* 2011; 29(7): 1455–1458 (Chinese, English abstract).
 - 20 Zhu ZH, Wan HT, Li JH. Chuanxiong-zine-astragaloside IV decreases IL-1 β and Caspase-3 gene expressions in rat brain damaged by cerebral ischemia/reperfusion: A study of real-time quantitative PCR assay. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2011; 63(3): 86–94.