

DSCAM 在大鼠骨髓间质干细胞分化为神经细胞中的表达变化

王明闯, 贾延劫, 文全庆, 关文娟, 赵二义, 王留东, 张博爱

(郑州大学第一附属医院神经内科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 研究唐氏综合征细胞粘附分子(DSCAM)在大鼠骨髓间质干细胞(MSCs)分化为神经细胞中的作用。**方法** 在建立黄芩苷诱导大鼠 MSCs 分化为神经细胞的基础上,采用免疫细胞化学法、Western blot 法等检测 DSCAM 的表达变化;同时采用 RNA 干扰技术,观察 DSCAM-siRNA 转染 MSCs 后诱导分化情况。**结果** 诱导前大鼠 MSCs 不表达 DSCAM;预诱导液诱导 24 h, MSCs 开始少量表达 DSCAM($1.71 \pm 0.67\%$);黄芩苷诱导 6 h, 部分表达 DSCAM($15.79 \pm 4.24\%$);诱导后 3 d, DSCAM 表达最高($53.16 \pm 5.94\%$);诱导后 6 d, DSCAM 表达明显下降($28.99 \pm 6.72\%$)。DSCAM-siRNA 转染 MSCs, DSCAM 表达显著下降。而且,诱导前 MSCs 不表达神经细胞特异性标记蛋白 β -III-tubulin;诱导 6 h, β -III-tubulin 表达为($1.40 \pm 0.79\%$),诱导 3 d 达到($41.59 \pm 3.17\%$),诱导 6 d 为($59.11 \pm 4.76\%$)。但是, DSCAM-siRNA 转染 MSCs, 诱导 3 d, 6 d, β -III-tubulin 蛋白的表达显著下降,分别为($28.57 \pm 2.91\%$)和($43.90 \pm 12.31\%$)。**结论** DSCAM 可能在 MSCs 分化为神经细胞中起到重要的作用。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(6):486-489]

[关键词] 唐氏综合征细胞粘附分子;骨髓间质干细胞;神经细胞;RNA 干扰;大鼠
[中图分类号] R-33;R741 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)06-0486-04

Effects of DSCAM on differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into neurons *in vitro*

WANG Ming-Chuang, JIA Yan-Jie, WEN Quan-Qing, GUAN Wen-Juan, ZHAO Er-Yi, WANG Liu-Dong, ZHANG Bo-Ai.
Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Jia Y-J, Email: jiayanjie1971@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effects of Down syndrome cellular adhesion molecule (DSCAM) on differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells (MSCs) into neurons *in vitro*. **Methods** MSCs from Sprague-Dawley rats were induced into neurons by baicalin. The expression of DSCAM before and after induction was evaluated by immunocytochemical staining and Western blot assay. After knockdown of DSCAM by siRNA transfection, the differentiation rate of neurons derived from MSCs was measured. **Results** Before induction, the expression of DSCAM was not detectable in MSCs. After bFGF preinduction for 24 hrs, DSCAM was slightly expressed in MSCs ($1.71 \pm 0.67\%$). The DSCAM expression increased 6 hrs after baicalin induction ($15.79 \pm 4.24\%$), reached a peak at 3 days ($53.16 \pm 5.94\%$) and then decreased gradually. The DSCAM expression 6 days after baicalin induction ($28.99 \pm 6.72\%$) was significantly lower than that at 3 days ($P < 0.01$). However, after DSCAM-siRNA transfection, the DSCAM expression in MSCs was significantly reduced. MSCs did not express neuron-specific β -III-tubulin before induction. After baicalin induction for 6 hrs, 3 days and 6 days, the expression of β -III-tubulin was $1.40 \pm 0.79\%$, $41.59 \pm 3.17\%$ and $59.11 \pm 4.76\%$ respectively. But the β -III-tubulin expression significantly decreased 3 and 6 days after DSCAM-siRNA transfection ($28.57 \pm 2.91\%$ and $43.90 \pm 12.31\%$ respectively). **Conclusions** DSCAM may play an important role in MSCs differentiation into neural cells. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(6):486-489]

Key words: Down syndrome cellular adhesion molecule; Marrow mesenchymal stem cell; Neuron; RNA interference; Rats

唐氏综合征细胞粘附分子(Down syndrome cell adhesion molecule, DSCAM)的基因位于 21q22,其过量表达,如 21 号染色体的三体化,即唐氏综合征(Down syndrome),造成神经细胞迁移、增殖、分化的异常,最终导致先天性智能发育障碍^[1]。而且, DSCAM 是神经细胞连接中必须的细胞粘附分子,对神经网络的形成和维持有重要作用^[2]。本研究在体外诱导骨髓间质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MSCs)分化为神经细胞的过程中,首次观察到 DSCAM 的表达变化,初步探索 DSCAM 在

[收稿日期]2008-12-09;[修回日期]2009-04-01
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30770758);河南省教育厅自然科学研究计划项目(2008A320032)。
[作者简介]王明闯,男,硕士研究生。主攻方向:神经病学基础与临床。
[通讯作者]贾延劫,男,教授,郑州大学第一附属医院神经内科,邮编:450052。

MSCs 诱导过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和细胞

DMEM 液体培养基、B₂₇、胎牛血清、Trizol 购自 Gibco 公司;碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)购自 Pepro Tech EC 公司;小鼠抗多克隆 DSCAM、神经细胞标记蛋白 β-III-tubulin、CD90 抗体购自 Abnova 公司;山羊抗小鼠二抗购自 Sigma 公司;大鼠 Rn-DSCAM-siRNA(FITC 标记)、转染试剂 HiPerFect、阳性对照 Rn-MAPK1 Control siRNA、阴性对照 AllStars Negative Control siRNA(FITC 标记)购自 Qiagen 公司;RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司;其余生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

MSCs 由我们实验室从 SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠股骨中分离提取,连续传至少 10 代,常规冻存,置于液氮中备用。

1.2 体外诱导 MSCs 分化为神经细胞

参照贾延劼等^[3]的方法,进行 MSCs 培养和诱导分化。取培养第 10 代以上 MSCs,复温,按照 2 × 10⁴ 个/孔的比例接种于预先置有塑料盖玻片的 6 孔培养板,培养 3 d,达到 80% ~ 90% 融合后,进行诱导实验。D-Hank's 液清洗 3 次,加入预诱导液(DMEM 培养基,10% 胎牛血清,10 ng/mL bFGF) 培养 24 h。预诱导后,加入诱导液(DMEM 培养基,200 ~ 400 μM 黄芩甙) 诱导 6 h。诱导后加入维持液(DMEM 培养基,200 ~ 400 μM 黄芩甙,10 ng/mL bFGF,B₂₇)继续维持 6 d。

1.3 siRNA 转染 MSCs

按照 Qiagen 公司的操作说明进行 MSCs 转染,将 1 250 ng Rn-DSCAM-siRNA 溶于 100 μL 无血清 DMEM 培养基,再加入 12 μL HiPerFect 转染试剂,混匀;室温孵育 10 min;将复合物均匀滴于 MSCs 表面,然后再加入 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清),使 siRNA 的终浓度达到 24 nM,孵育 12 ~ 24 h。阳性对照 Rn-MAPK-1 Control siRNA 和阴性对照 AllStars Negative Control siRNA 采用同样的方法。

1.4 免疫细胞化学法和图像采集、分析

将各组细胞用 PBS 清洗之后,迅速经 4% 多聚甲醛的固定液中于 4℃ 固定 20 min,用 0.2% 的 Triton X-100 处理 10 min,并用 10% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 1 h。然后用 Anti-DSCAM(1:200)、Anti-CD90(1:200)或 Anti-β-III-tubulin(1:800)4℃ 孵育 24 h。用 PBS 洗 3 遍后,用二抗(1:1 000)在室温下进行染色标记、观察。

细胞图像通过显微镜用 10 × 或 20 × 摄取,图像均采用 300 dpi 分辨率。每组独立的实验都会采集超过 30 个区域的细胞。而且,在明视野下所采集的每幅图像都尽量包含相同的细胞数目。采用双人双盲随机记数阳性细胞,计算阳性细胞百分比例。

1.5 Western 免疫印记法分析

收集各组细胞在预冷的细胞裂解液(50 mM Tris-Cl, pH 6.8, 10 mM EDTA, 2% SDS, 5 mM DTT,0.5 mM PMSF) 100 μL 中裂解、变性、离心。以 BSA 作为标准,根据 Bradford 法对蛋白质进行定量分析。蛋白裂解液加入 4 × 凝胶上样缓冲液进行 SDS-丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,转移到 PVDF 膜上。以含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 1 h,然后用相应的抗体(用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 配制)4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。再用相应的辣根过氧化物酶标记的 IgG(用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 配制)室温反应 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 15 min。然后进行 ECL 反应,并曝光显影。对于相同的实验重复至少 3 次(n = 3)。

1.6 RT-PCR 法

Trizol 试剂提取细胞总 RNA,常规 RNA 定量。RT-PCR 扩增反应条件参照 Promega 试剂盒操作手册,反应体系为 50 μL,逆转录与 PCR 一步完成,35 ~ 40 个循环,扩增产物 10 μL 加样于 1.5% 的琼脂糖凝胶,电泳,紫外透射仪观察照相。引物由上海生工有限公司合成(表 1)。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	产物
DSCAM	Forward 5'-AGAAGTGTCCCAACCAATTGAG-3'	135 bp
	Reverse 5'-CACCCAGGTTCCTTCTGATC-3'	
β-III-tubulin	Forward 5'-TGCGTGTGTACAGGTGAATGC-3'	240 bp
	Reverse 5'-GGCTGCATAGTCATTTCCAAG-3'	
GADPH	Forward 5'-CCCACGGCAAGTTCAACGGCA-3'	430 bp
	Reverse 5'-TGGCAGGTTTCTCCAGCGGC-3'	

1.7 统计学处理

所有的图形由 ImagePro Express 软件采集和处理。处理的数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 GraphPad Prism 5.01 作图,并根据不同的要求进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 体外诱导 MSCs 分化为神经细胞

培养 10 代的大鼠 MSCs 主要是以梭形、扁平细胞为主,可以表达 MSCs 标记物(图 1A)。黄芩甙诱导 6 h 后,部分细胞成三角形,细胞微丝收缩,伪足

形成细长突起,局部交织成网,类似神经细胞;6 d后多数细胞成锥形,交织成网,形成较典型的神经细胞结构(图1B)。本研究选择 β -III-tubulin蛋白作为成熟神经细胞标记物,发现诱导前MSCs不表达 β -III-tubulin蛋白,诱导6 h, β -III-tubulin蛋白的表达为 $(1.40 \pm 0.79)\%$ 。随着诱导后细胞的继续分化, β -III-tubulin蛋白表达迅速增加,诱导3 d达到 $(41.59 \pm 3.17)\%$ 。诱导6 d, β -III-tubulin蛋白出现强表达 $(59.11 \pm 4.76)\%$ (图1C)。Western blot结果也有类似的结果(图2)。

2.2 DSCAM 的表达变化

诱导前大鼠 MSCs 不表达 DSCAM。预诱导 24 h,MSCs 开始少量表达 DSCAM $(1.71 \pm 0.67)\%$,

主要位于细胞膜或突起上;诱导 6 h,部分表达 DSCAM $(15.79 \pm 4.24)\%$;而且随时间延长表达持续增加,峰值在诱导 3 d 为 $(53.16 \pm 5.94)\%$ 。但是诱导 6 d,DSCAM 表达明显下降 $(28.99 \pm 6.72)\%$,与诱导 3 d 差异有显著性 $(t = 8.516, P < 0.01)$ 。Western blot 法也有类似的结果(图3)。

2.3 DSCAM-siRNA 转染 MSCs

DSCAM-siRNA 转染后 MSCs 无明显的形态学改变,在荧光显微镜下,转染 24 h 后,可见在细胞内出现绿色颗粒样荧光,可以持续表达 1 周以上(图4A,4B);通过阳性和阴性转染对照计算,转染效率为 $(78 \pm 12.9)\%$ 。转染后 MSCs 经诱导后,细胞分化较差,突起短、直、分支少,神经网络形成稀疏(图4C,4D)。

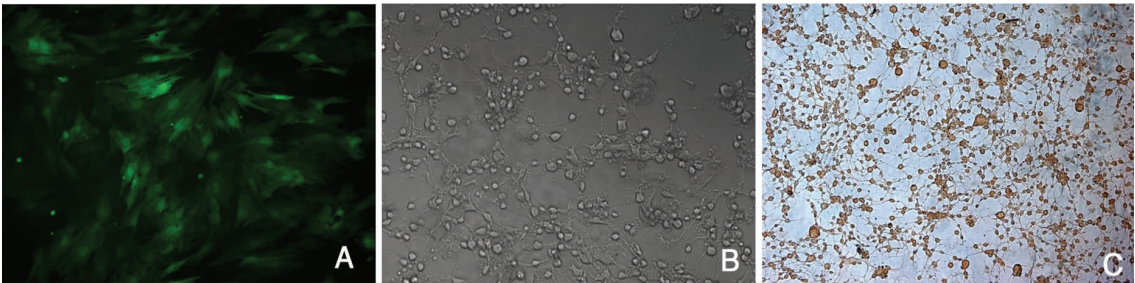


图1 MSCs 分化为神经细胞 A:诱导前,培养第10代的MSCs(CD90染色,FITC,×200);B:诱导6 d后,细胞形态学的变化(×100),细胞呈锥形,类似神经细胞;C:诱导6 d后,分化后细胞 β -III-tubulin 的表达(DAB显色,×100),多数细胞呈锥形,交织成网, β -III-tubulin 蛋白出现强表达。

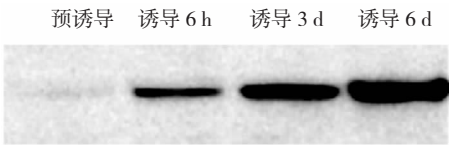


图2 诱导前后 β -III-tubulin 的表达变化 (Western blot 结果) 随时间推移,细胞分化 β -III-tubulin 蛋白表达迅速增加。

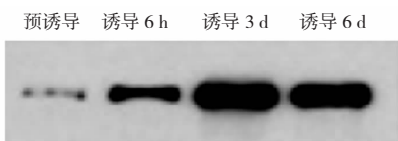


图3 诱导前后 DSCAM 的表达变化(Western blot 结果) 诱导 6 h 后部分表达 DSCAM,随诱导时间延长,表达持续增加,诱导后 3 d 达峰值,诱导第 6 天,DSCAM 表达明显下降。

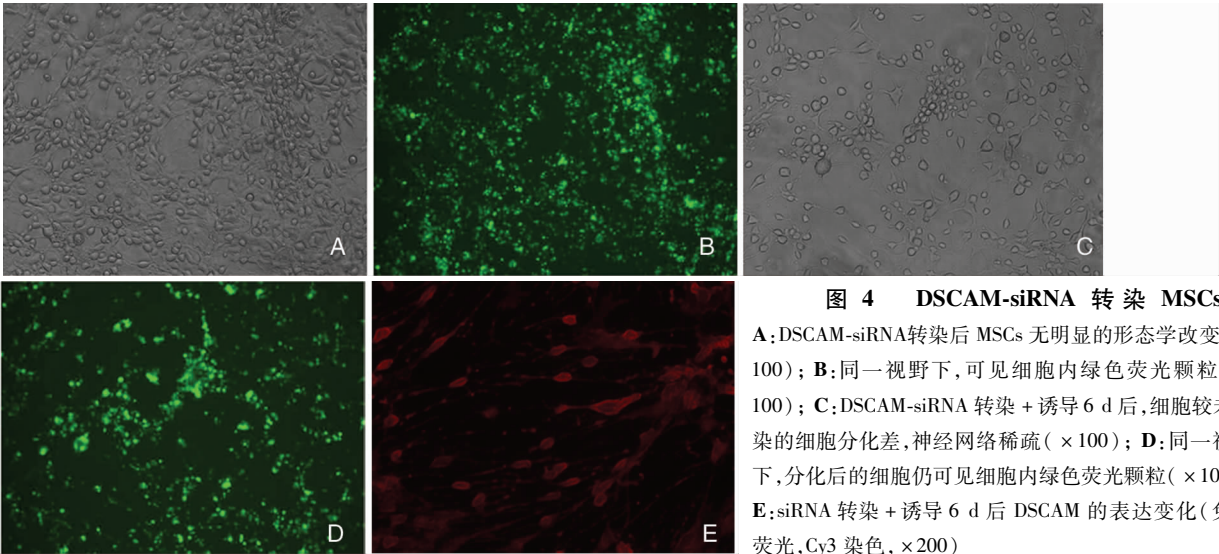


图4 DSCAM-siRNA 转染 MSCs A;DSCAM-siRNA转染后 MSCs 无明显的形态学改变(×100);B:同一视野下,可见细胞内绿色荧光颗粒(×100);C:DSCAM-siRNA 转染+诱导6 d后,细胞较未转染的细胞分化差,神经网络稀疏(×100);D:同一视野下,分化后的细胞仍可见细胞内绿色荧光颗粒(×100);E:siRNA 转染+诱导6 d后 DSCAM 的表达变化(免疫荧光,Cy3 染色,×200)

免疫细胞化学染色(图4E)和 RT-PCR 提示(图5), DSCAM-siRNA 转染后,DSCAM 表达显著下降。但是 DSCAM-siRNA 转染,诱导3 d 和6 d, β -III-tubulin 蛋白的表达显著下降(28.57 ± 2.91)% 和(43.90 ± 12.31)%,与未转染的细胞相比,差异有显著性($P < 0.01, P < 0.05$)。

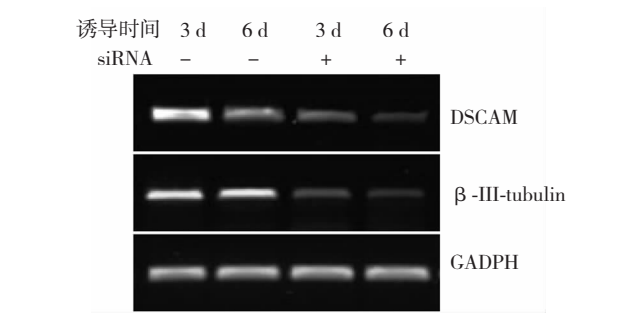


图5 诱导前后 DSCAM mRNA 的表达变化(RT-PCR 结果) siRNA 转染后 DSCAM β -III-tubulin 均较未转染组表达显著下降($P < 0.01, P < 0.05$)

3 讨论

DSCAM 是免疫球蛋白超级家族的粘附分子。1998 年,Yamakawa 等^[4]分离出 DSCAM 基因,发现大部分在发育期的神经系统中表达。序列分析表明,DSCAM 由 N 端信号肽,10 个免疫球蛋白域,6 个 3 型纤连蛋白域,1 个跨膜区,和 1 个胞内域。DSCAM 能够通过 RNA 剪切形成 38 000 余种异构体,可能该蛋白在神经网络的形成过程中帮助神经细胞进行精确的连接。DSCAM 的过量表达直接造成神经细胞迁移、增殖、分化的异常,是导致唐氏综合征的分子遗传学基础^[1]。

近十年的研究发现,MSCs 可以定向分化为神经细胞和胶质细胞,作为一类理想的“种子细胞”,MSCs 具有取材方便、增殖能力强、安全、自体移植无免疫排斥等独特的自身优势,特别适用于临床神经系统损伤和退行性病等疾病的细胞移植治疗^[5],但是 MSCs 向神经细胞分化的机制尚不清楚,涉及多条信号转导通路。本研究首次发现,作为神经系统发育中重要的功能性蛋白之一,诱导前大鼠 MSCs 不表达 DSCAM,随着诱导时间的延长,DSCAM 的表达逐渐增加,峰值在诱导 3 d,然后开始下降。与此同时,神经细胞标记蛋白 β -III-tubulin 在分化后的细胞表达持续增加。这些结果提示,MSCs 诱导分化

后的细胞具有一定的神经细胞功能,而且诱导过程也可能重演或沿袭了神经细胞发育的过程,进一步讲,DSCAM 主要在神经系统发育期表达,包括脊髓、皮层、小脑等,其在轴突分支的生长和定向延伸过程中起着至关重要的作用,以确保神经细胞准确、紧密的连接^[6,7]。MSCs 在分化过程中 DSCAM 的表达逐渐增加,可能与诱导后细胞轴突分支的生长和建立细胞连接有关,使诱导后细胞具有神经细胞的网络结构和功能。当采用 DSCAM siRNA 干扰后,影响了 DSCAM 的表达,最终导致诱导分化效果下降,神经细胞间连接减少。

最近研究发现,DSCAM 在视网膜特定层联结的形成中能发挥一定作用。另外两种粘附分子,即 Sidekick-1 和 Sidekick-2,以一种类似的方式发挥作用。这些分子广泛分布在神经系统中,可能是使大脑中神经连接形成的一个粘附代码(IgSF code)的构成部分^[8]。因此,MSCs 诱导分化为神经细胞是否也涉及类似的机制有待深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Zinn K. Dscam and neuronal uniqueness[J]. Cell, 2007, 129 (3): 455-456.
- [2] Schmucker D. Molecular diversity of Dscam; recognition of molecular identity in neuronal wiring[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8 (12): 915-920.
- [3] 贾延劫, 杨于嘉, 宋健辉, 刘丽旭. NF- κ B 在黄芩甙诱导大鼠骨髓基质细胞分化为神经细胞中的作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(1): 1-4.
- [4] Yamakawa K, Huot YK, Haendelt MA, Hubert R, Chen XN, Lyons GE, et al. DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(2): 227-237.
- [5] Dezawa M, Hoshino M, Ide C. Treatment of neurodegenerative diseases using adult bone marrow stromal cell-derived neurons[J]. Expert Opin Biol Ther, 2005, 5(3): 427-435.
- [6] Hughes ME, Bortnick R, Tsubouchi A, Bäumer P, Kondo M, Uemura T, et al. Homophilic Dscam interactions control complex dendrite morphogenesis[J]. Neuron, 2007, 54(3): 417-427.
- [7] Ly A, Nikolaev A, Suresh G, Zheng Y, Tessier-Lavigne M, Stein E. DSCAM is a netrin receptor that collaborates with DCC in mediating turning responses to netrin-1[J]. Cell, 2008, 133(7): 1241-1254.
- [8] Yamagata M, Sanes JR. Dscam and Sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina[J]. Nature, 2008, 451(7177): 465-469.

(本文编辑:吉耕中)