

氯倍他索促进鼻粘膜间充质干细胞成神经样细胞分化

史文涛¹, 戴瑶², 毕士奇², 陆浩², 吕德民², 张志坚²

摘要 目的:研究氯倍他索(Clo)对鼻粘膜外胚层间充质干细胞(EMSCs)向神经样细胞分化的影响。方法:贴壁筛选法分离培养EMSCs,免疫荧光法鉴定体外扩增的EMSCs;MTT法检测Clo对EMSCs增殖能力的影响;成神经样细胞诱导实验分为Clo组、音猬因子(SHH)组和空白对照组,采用全反式维甲酸(ATRA)诱导各组细胞向神经样细胞分化;倒置显微镜观察细胞形态的变化;免疫荧光和免疫印迹方法检测神经元细胞相关蛋白。结果:体外分离培养的EMSCs高表达间充质干细胞和神经嵴源干细胞标志物 Vimentin 和 Nestin。各组EMSCs成神经样细胞诱导7 d后,Clo组和SHH组EMSCs呈现双极和多极的典型神经样细胞形态并且高表达神经元细胞相关蛋白。Clo组EMSCs表达SHH和SMO的水平明显高于空白对照组,与SHH组比较差异无统计学意义($P>0.05$);Clo可促进EMSCs分泌内源性脑神经营养因子(BDNF)和神经生长因子(NGF)。结论:Clo可通过激活SHH信号通路和上调内源性神经营养因子水平促进EMSCs向神经样细胞分化。

关键词 鼻粘膜外胚层间充质干细胞;氯倍他索;神经样细胞;音猬因子

中图分类号 R741;R741.02 文献标识码 A DOI 10.16780/j.cnki.sjsgncj.2019.01.001

史文涛,戴瑶,毕士奇,等.氯倍他索促进鼻粘膜间充质干细胞成神经样细胞分化[J].神经损伤与功能重建,2019,14(1):1-5.

Effect of Clobetasol on Differentiation of Nasal Ectomesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells SHI Wen-tao¹, DAI Yao², BI Shi-qi², LU Hao², LV De-min², ZHANG Zhi-jian². 1. Department of Orthopaedics, Nanjing Gaochun People's Hospital, Nanjing 211300, China; 2. Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Jiangsu University, Jiangsu 212001, China

Abstract Objective: To study the effect of Clobetasol propionate (Clo) on the differentiation of nasal mesenchymal stem cells (EMSCs) into neuron-like cells. **Methods:** EMSCs were isolated and cultured by the adherent screening method, and the EMSCs amplified in vitro were identified by immunofluorescence. The effect of Clo on the proliferation of EMSCs was examined by MTT assay. Induced neuroblast-like cells were divided into the Clo group, Sonic hedgehog (SHH) group, and control group. All-trans retinoic acid (ATRA) was used to induce differentiation into neuron-like cells. Changes in cell morphology were observed under inverted microscope, and detection of neuronal cell-associated proteins was accomplished by immunohistochemistry and immunoblot methods. **Results:** EMSCs isolated and cultured in vitro displayed high expression levels of mesenchymal and neural stem cell markers vimentin and nestin. After induction of EMSCs into neuroblast-like cells for 7 days, the EMSCs in the Clo and SHH groups showed bipolar and multipolar typical neuron-like cell morphology and high expression of neuronal cell-associated proteins. At the same time, the expression levels of SHH and SMO in the EMSCs of the Clo group were significantly higher than those of the control group, and there was no significant difference compared with that of the SHH group ($P>0.05$). Data showed that Clo could promote the secretion of endogenous brain derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) by EMSCs. **Conclusion:** Clo can promote the differentiation of EMSCs into neuron-like cells by activating the SHH signaling pathway and up-regulating the levels of endogenous neurotrophic factors.

Key words nasal ectomesenchymal stem cells; Clobetasol; neuron-like cells; sonic hedgehog

作者单位

1. 南京市高淳人民医院骨科
南京 211300

2. 江苏大学医学院组织学与胚胎学教研室
江苏 镇江 212001

基金项目

国家自然科学基金地区科学基金(No. 81571830);

镇江市科技局发展项目(No. SH2008044)

收稿日期

2018-05-21

通讯作者

张志坚

zzj570515@163.

com

脊髓损伤(spine cord injury, SCI)是脊椎骨折最严重的并发症,常导致脊椎损伤部位以下的肢体瘫痪,高位SCI甚至会导致患者四肢全瘫^[1]。SCI及其并发症不仅给患者带来极大的身心痛苦,同时也给社会带来巨大的经济负担。现阶段治疗SCI的医疗措施较为局限,一般治疗方法包括急性损

伤期使用大剂量的糖皮质激素冲击疗法和急诊手术摘除脊椎骨碎片以解除对脊髓的压迫^[2]。然而,这些保守治疗手段收获的效果较差,只有极少部分患者可恢复脊髓功能。因此,SCI的治疗是医疗工作人员急需攻克的难题。

在动物SCI损伤模型中,层出不穷的新

兴治疗理念和治疗手段给治愈SCI带来新的希望。在这些方法中,干细胞移植疗法是科研工作者研究的热点,干细胞疗法中常用种子细胞包括骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)、嗅鞘细胞(Olfactory ensheathing cells, OECs)和神经干细胞(neural stem cells, NSCs)^[3,4]。各类干细胞均有其利弊,比如BMSCs具有分泌多种神经营养因子和促进SCI功能修复的潜能,然而该细胞取材较为困难^[5];神经嵴来源的OECs移植治疗SCI已取得巨大的成功,但是OECs取材同样面临着破坏嗅觉的困扰;NSCs则被作为研究中枢神经系统损伤的最佳研究对象^[6]。在笔者以往的研究中,笔者发现下鼻甲呼吸粘膜固有层含有丰富的外胚层间充质干细胞(ectomesenchymal stem cells, EMSCs),其来源于胚胎时期的神经嵴,该细胞保留多向分化潜能^[7]。

最近的相关文献报道多种小分子化合物具有激活音猬因子(sonic hedgehog, SHH)信号通路的功能^[8,9], SHH信号通路的激活不仅有利于各类干细胞向神经样细胞分化形成神经网络结构,而且可促进细胞增殖^[10]。氯倍他索(Clobetasol Propionate, Clo)是强效的局部皮质激素,临床上常用于治疗湿疹、唇疱疹、牛皮癣和硬化性苔癣^[10]。研究表明,Clo可通过激活SHH信号通路促进神经祖细胞增殖^[11],并且Clo可促进少突胶质细胞前体细胞向成熟少突胶质细胞分化^[12,13]。值得注意的是,体内实验同样证实Clo具有拮抗脱髓鞘病变的功能^[14,15]。以往的研究表明Clo可能具有SHH样功能^[16]。然而,Clo是否可促进EMSCs向神经样细胞分化,尚无具体报道。本研究通过体外培养EMSCs,分别用Clo和SHH诱导EMSCs向神经样细胞分化;通过数据对比表明,Clo可能通过SHH信号通路促进EMSCs向神经样细胞分化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD大鼠10只,雌雄不限,由江苏大学动物实验中心提供。

1.1.2 主要试剂和材料 全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)、0.25%胰酶购自美国Sigma公司; Neurobasal培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司; Western-blot仪购自美国Bio-rad公司; GAP-43和MAP2购自美国Abcam公司, TUBB3、 β -tubulin、Nestin、Vimentin和所有二抗购自武汉博士德公司; SHH和Smoothed (SMO)抗体购自美

国R&D生物公司;神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)抗体由美国Santa Cruz公司提供;所用其他试剂及实验所需仪器均为江苏大学基础研究所2408实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 鼻粘膜EMSCs的分离、原代培养及传代 将SD大鼠处死,解剖充分暴露大鼠下鼻甲,完整取出鼻中隔并分离全层鼻粘膜,弃去鼻中隔软骨;漂洗鼻粘膜3次,洗去血红细胞,然后用眼科剪充分剪碎,组织碎片大约1 mm²大小,然后接种于细胞培养瓶,加入4 mL 10% FBS的DMEM/F12(含青霉素100 U/mL和链霉素100 U/mL),置于CO₂培养箱内(37℃, 5% CO₂, 饱和湿度)培养。每隔2 d半量换液,当细胞铺满瓶底85%时,标记为第一代并进行消化传代;本研究选用第3代EMSCs进行所有的实验。

1.2.2 EMSCs表面标志鉴定 取培养的第3代细胞,接种于96孔板,待细胞铺满培养板底的75%时,用4%多聚甲醛4℃固定8 h,然后2% BSA封闭30 min, 0.1% Triton破膜30 min, PBS洗3遍,加入一抗Nestin和Vimentin, 4℃孵育过夜;然后加入荧光二抗, 37℃孵育1 h, DAPI染核,甘油封片后于荧光显微镜下拍摄图片。

1.2.3 MTT实验 EMSCs接种于96孔板,设计测定Clo浓度分别为0、2.5、5、7.5、10、12.5、15 μ mol/L;用PBS洗去未贴壁的细胞,然后每孔加入0.01 mol/L MTT溶液100 μ L, 37℃孵育4 h;移除培养基后每孔加入二甲基亚砷500 μ L,充分震荡10 min后,转入96孔板,选择波长460 nm,测定各孔光吸收值(OD值)。同时测定对照组吸光值,每组复4孔,以上实验重复至少3遍,计算每组吸光值均数和标准误进行统计学分析。

1.2.4 EMSCs向神经样细胞分化的诱导方法 EMSCs接种于6和96孔细胞培养板,当细胞铺满培养板底的60%时,弃去培养液, PBS洗2次,加入DMEM/F12饥饿处理4 h;然后加入诱导培养液(Neurobasal medium+ ATRA),随机分为空白对照组、Clo组和SHH组,空白对照组加入等体积PBS。MTT实验结果表明5 μ mol/L的Clo促进EMSCs增殖能力最强(见结果2.2), Clo组选定Clo浓度为5 μ mol/L, SHH组SHH浓度为20 ng/mL。倒置显微镜下记录细胞形态变化;诱导72 h后换用完全培养基继续培养,继续培养4 d后收取6孔板内的细胞蛋白和固定96孔板内的细胞。

1.2.5 成神经样细胞诱导分化 免疫荧光和Western-

blot方法检测神经元细胞相关蛋白表达,免疫荧光步骤同上。收取蛋白具体步骤:使用二巯基乙醇+Loading buff(1:20)提取液,冰上收取各组细胞蛋白;刮取各组蛋白置于EP管中,水浴煮沸 10 min,超声裂解后 4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,取上清。蛋白电泳步骤:样品蛋白上样于 10% SDS-PAGE,100 V 恒压 90 min,350 mA 恒流转膜 90 min;3% 脱脂奶粉封闭 1 h;将膜分别与对应的一抗 GAP-43、 β -tubulin、MAP2、SHH、SMO 和 TUBB3 4 ℃ 孵育过夜;TBST 漂洗 3 次,10 min/次。加入抗兔或抗鼠 IgG-HRP (1:5 000),37 ℃ 孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次,10 min/次。用超敏 ECL 发光液显示阳性条带,在 Typhoon 系统上扫描结果。Image J 软件分析灰度值。

1.2.6 Clo 作用 EMSCs 实验 考虑到神经营养因子在成神经分化中的重要性,以及为了进一步探讨 Clo 促进 EMSCs 向神经样细胞分化的潜在机制,将 Clo 以 5 $\mu\text{mol/L}$ 直接作用于饥饿处理 4 h 的 EMSCs,同时设定对照组;通过免疫荧光和 Western-blot 检测 EMSCs 表达 BDNF、NGF 的水平。

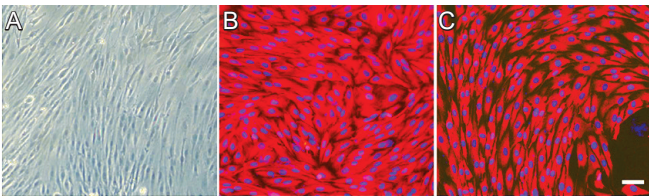
1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析数据,计量资料以(均数 $\pm$ 标准误)表示,单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EMSCs 的鉴定

贴壁的 EMSCs 呈长梭形,鱼群样,形态均匀;免疫荧光结果显示 90% 的 EMSCs 表达 Nestin 和 Vimentin,提示获得较高纯度的 EMSCs(图 1)。



注:A 示第三代 EMSCs;B、C 示间充质干细胞和神经嵄源干细胞标志物 Vimentin 和 Nestin(免疫荧光染色,标尺=25 μm)

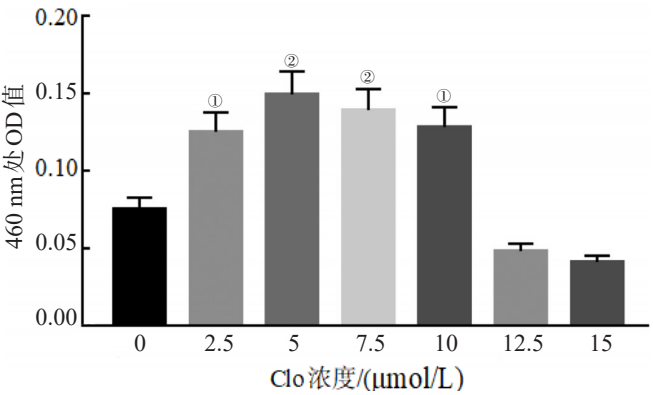
图 1 EMSCs 鉴定

2.2 MTT 实验结果

MTT 实验结果显示低浓度的 Clo 可促进 EMSCs 增殖;相反,高浓度的 Clo 则抑制 EMSCs 增殖;数据显示 5 $\mu\text{mol/L}$ 为最适增殖浓度(图 2)。

2.3 免疫荧光结果

Clo 和 SHH 组的 EMSCs 诱导 72 h 后可见 EMSCs 细胞体变圆,细胞体周围出现长的突起,对照组 EMSCs 形态未发生明显改变;免疫荧光数据显示 Clo 和 SHH 组 EMSCs 高表达 GAP-43、TUBB3 和 MAP-2,对照组表达 GAP-43、TUBB3 和 MAP-2 相对较弱;免疫荧光数据显示 Clo 组与 SHH 组 EMSCs 表达 GAP-43、TUBB3 和 MAP-2 无明显差异(图 3)。



注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,① $P<0.05$,② $P<0.01$

图 2 不同浓度 Clo 对 EMSCs 增殖的影响

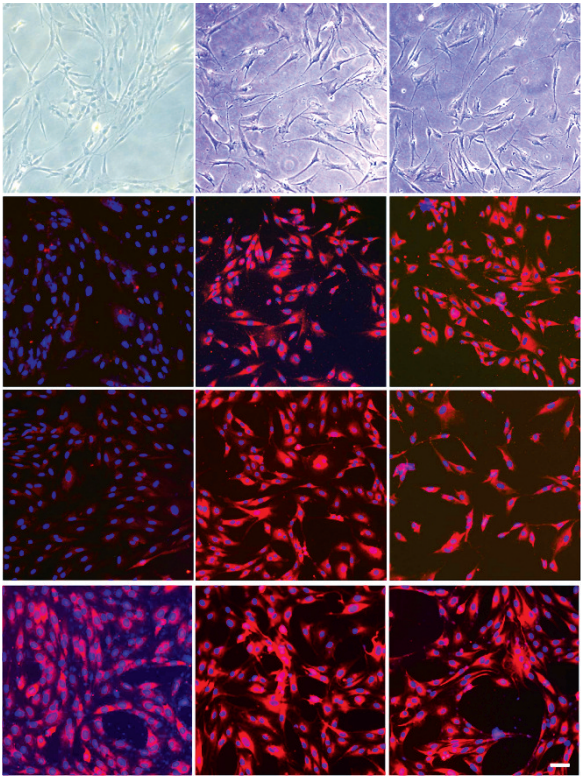


图 3 免疫荧光示各组 EMSCs 成神经样细胞分化结果(免疫荧光染色,标尺=25 μm)

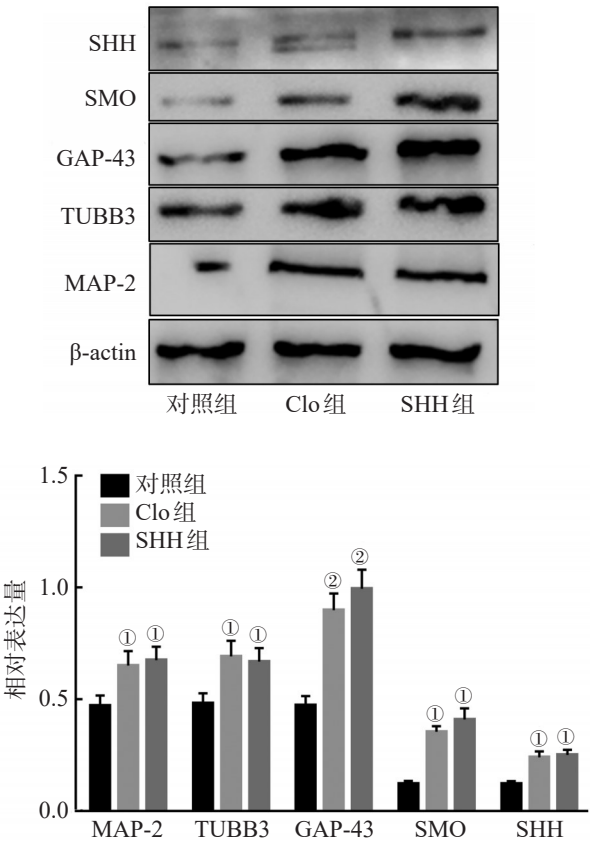
2.4 Western-blot 结果

Clo 组和 SHH 组 EMSCs 表达 GAP-43、TUBB3 和 MAP-2 水平高于对照组,SHH 和 SMO 的表达水平也较对照组高,差异有统计学意义($P<0.05$);Clo 组和

SHH 组表达上述相关蛋白的水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)(图4)。

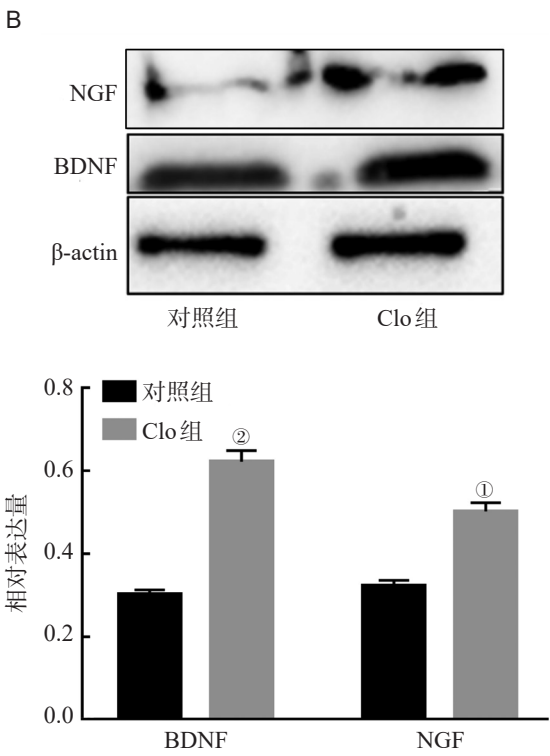
2.5 Clo 促进EMSCs表达神经营养因子

免疫荧光(图 5A)和 Western-blot(图 5B)结果显示 Clo 可促进EMSCs分泌BDNF 和NGF。



注:与对照组比较, ^① $P<0.05$, ^② $P<0.01$

图4 EMSCs 成神经样细胞诱导培养 7 d 后 3 组表达神经元细胞相关蛋白的水平



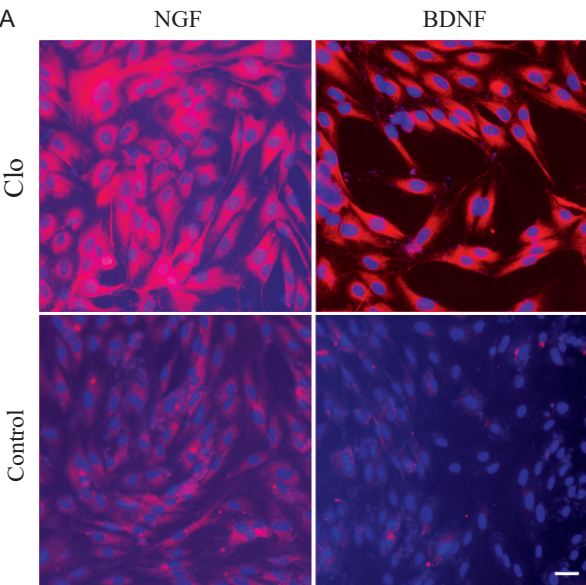
注:与对照组比较, ^① $P<0.05$, ^② $P<0.01$

图5 Clo 作用EMSCs 后,免疫荧光标记(A,免疫荧光染色,标尺=25 μm)和 Western-blot(B)检测EMSCs 表达神经营养因子 BDNF 和NGF 的水平

3 讨论

EMSCs 属于多功能干细胞,实验证明该细胞在体外特殊的培养环境中可被诱导分化其他类型细胞,这些不同胚层系的细胞包括神经样细胞(神经元样细胞和胶质样细胞)、成骨和软骨细胞以及脂肪细胞。笔者课题组发现SD 大鼠 EMSCs 具有取材简便,贴壁筛选法培养出的EMSCs 纯度高等特点。另外,笔者进一步发现人的下鼻甲呼吸粘膜部同样存在该细胞,并且该细胞取材对供体鼻部几乎没有破坏性损伤^[17]。

Clo 是临床上常用的皮质类固醇激素,最近研究表明,Clo 具有激活 SHH 信号通路的功能^[15]。本研究通过 MTT 实验证实低浓度的 Clo 可有效促进 EMSCs 增殖,高浓度 Clo 则抑制 EMSCs 增殖,这可能与药物毒性有关。本研究发现 Clo 组和 SHH 组的 EMSCs 表达 SHH 和 Hedgehog(Hh)信号通路中的关键受体 SMO 蛋白的水平高于对照组,这说明 Clo 可能具有激活 SHH 信号通路的能力并且与 SHH 组相比无明显差异;同时,数据表明 5 μmol/L 的 Clo 与 20 ng/mL 的 SHH 可能具有相同的功效。尽管 Clo 促进 EMSCs 增殖的具体机制尚未完全阐述,但 SHH 信号通路的激活可能是其原因之一。



筛选出最适浓度后,选择 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Clo 作用于 EMSCs,结合 ATRA 神经样细胞诱导分化培养基诱导分化 7 d。倒置显微镜观察 3 组细胞形态学改变,对照组细胞形态改变不明显,Clo 和 SHH 组细胞出现细胞体变圆,伸出长突起的典型性神经样细胞形态,形态学的改变在一定程度上可认为 EMSCs 已向神经样细胞分化。本研究通过免疫荧光标记神经元相关蛋白 TUBB3、MAP-2 和 GAP-43;TUBB3 是微管蛋白家族,几乎仅在神经元细胞表达,是公认的神经元细胞标志蛋白;MAP-2 是神经元细胞特异性细胞骨架蛋白,在神经元细胞发育过程中具有稳定树状突的作用;GAP-43 是神经组织特异性的蛋白质,该蛋白被认为在神经突形成,再生和可塑性中起关键作用^[18,19]。本研究发现 Clo 组和 SHH 组均高表达神经元细胞相关蛋白,这说明 Clo 可有效促进 EMSCs 向神经样细胞分化。与此同时,本研究发现 Clo 和 SHH 组表达相关蛋白之间无明显差异,SHH 和 SMO 的上调提示 Clo 可能具有激活 SHH 信号通路的能力,SHH 和 SMO 则是形成神经网络以及神经轴突再生强效促进因素^[20],SHH 和 SMO 表达水平的增高提示 Clo 促进 EMSCs 向神经样细胞分化通过激活 SHH 信号通路导致。以往研究报道 Clo 可激活 SMO 受体,从而促进神经祖细胞增殖^[15];鉴于 Clo 此特性,本研究首次报道 Clo 不仅可促进 EMSCs 增殖,同时,研究数据提示 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Clo 与 20 ng/mL 的 SHH 在促进 EMSCs 向神经样细胞分化的功能上无明显差异。

笔者以往的研究报道 EMSCs 可表达内源性 BDNF 和 NGF;BDNF 不仅可支持中枢和外周神经系统的神经元细胞存活,而且可促进神经元细胞分化和突触再生;NGF 主要涉及神经细胞(神经元)的生长以及维持,增殖和存活^[21,22]。免疫荧光和 Western blot 数据显示 Clo 可刺激 EMSCs 表达内源性 BDNF 和 NGF,两种神经营养因子表达水平的增高,从另一个角度阐释 Clo 促进 EMSCs 向神经样细胞分化的原因。

综上所述,Clo 可通过 SHH 信号促进 EMSCs 向神经样细胞分化,作为临床常用的皮质类固醇药物,Clo 可能为细胞移植治疗中枢神经系统损伤提供新的治疗理念。然而,本研究尚有不足之处,比如缺乏抑制试验反面证明 Clo 可激活 SHH 信号通路以及缺乏体内验证实验;关于应用 Clo 治疗 SCI 相关的研究,笔者课题组

将继续深入探讨。

参考文献

- [1] 董源基,喻志源,谢敏杰,等. 脊髓损伤和炎症[J]. 神经损伤与功能重建, 2018, 13: 142-145.
- [2] Gómez RM, Sánchez MY, Portela-Lomba M, et al. Cell therapy for spinal cord injury with olfactory ensheathing glia cells (OECs) [J]. Glia, 2018, 66: 1267-1301.
- [3] 汪大彬,文益民,蓝旭,等. 壳聚糖-藻酸盐支架复合 BMSCs 修复急性脊髓损伤的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24: 190-196.
- [4] Luo Y, Zou Y, Yang L, et al. Transplantation of NSCs with OECs alleviates neuropathic pain associated with NGF downregulation in rats following spinal cord injury [J]. Neurosci Lett, 2013, 549: 103-108.
- [5] Cai X, Lin Y, Hauschka PV, et al. Adipose stem cells originate from perivascular cells [J]. Biol Cell, 2011, 103: 435-447.
- [6] Song K, Yang Y, Li S, et al. In vitro culture and oxygen consumption of NSCs in size-controlled neurospheres of Ca-alginate/gelatin microbead [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014, 40: 197-203.
- [7] Chen Q, Zhang Z, Liu J, et al. A fibrin matrix promotes the differentiation of EMSCs isolated from nasal respiratory mucosa to myelinating phenotypical Schwann-like cells [J]. Mol cells, 2015, 38: 221-228.
- [8] Zhang XM, Ramalho-Santos M, McMahon AP. Smoothened mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R asymmetry by the mouse node [J]. Cell, 2001, 105: 781-792.
- [9] Zhang Z, Li Z, Deng W, et al. Ectoderm mesenchymal stem cells promote differentiation and maturation of oligodendrocyte precursor cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 480: 727-733.
- [10] 毕志刚,倪容之,秦万章,等. 复方丙酸氯倍他索软膏治疗寻常性银屑病临床疗效观察[J]. 临床皮肤科杂志, 2004, 33: 310-312.
- [11] Najm FJ, Madhavan M, Zaremba A, et al. Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo [J]. Nature, 2015, 522: 216-220.
- [12] Yao X, Su T, Verkman AS. Clobetasol promotes remyelination in a mouse model of neuromyelitis optica [J]. Acta Neuropathol Commun, 2016, 4: 42-42.
- [13] Harlow DE, Honce JM, Miravalle AA. Remyelination therapy in multiple sclerosis [J]. Front Neurol, 2015, 6: 257.
- [14] Mullard A. Remyelination researchers regroup after proof-of-concept setback in multiple sclerosis [J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15: 519-521.
- [15] Wang J, Lu J, Bond MC, et al. Identification of select glucocorticoids as Smoothened agonists: potential utility for regenerative medicine[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107: 9323-9328.
- [16] Zhang Z, He Q, Deng W, et al. Nasal ectomesenchymal stem cells: multi-lineage differentiation and transformation effects on fibrin gels [J]. Biomaterials, 2015, 49: 57-67.
- [17] 黄秋生,陆汉强,周月鹏,等. 成人鼻黏膜间充质干细胞的体外培养和多向诱导分化[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2012, 26: 490-493, 498.
- [18] Benowitz LI, Routtenberg A. GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity[J]. Trends Neurosci, 1997, 20: 84-91.
- [19] Tischfield MA, Baris HN, Wu C, et al. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance [J]. Cell, 2010, 140: 74-87.
- [20] Zhao L, Yu Y, Deng C. Protein and mRNA expression of Shh, Smo and Gli1 and inhibition by cyclopamine in hepatocytes of rats with chronic fluorosis [J]. Toxicol Lett, 2014, 225: 318-324.
- [21] Hyman C, Hofer M, Barde Y A, et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra [J]. Nature, 1991, 350: 230.
- [22] Rizzi C, Tiberi A, Giustizieri M, et al. NGF steers microglia toward a neuroprotective phenotype [J]. Glia, 2018, 13: 1395-1416.

(本文编辑:王晶)