

## 基础研究

Notch1 信号通路对小鼠触液神经元  
体外增殖能力的调节作用何宇祺<sup>1</sup>, 林宗龙<sup>2</sup>, 王 硕<sup>3</sup>, 陈 立<sup>4</sup>, 王洪超<sup>1</sup>, 施晓会<sup>1</sup>, 豆晓伟<sup>5</sup>, 李 青<sup>6</sup>

(1 贵州医科大学临床医学院 550025 贵阳市; 2 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院骨科 445000 恩施市;  
3 山东省日照市莒县人民医院骨科 276500; 4 四川省达州市中心医院骨科 635001; 5 贵州医科大学附属医院  
临床研究中心 550004 贵阳市; 6 贵州医科大学附属医院创伤骨科 550004 贵阳市)

**【摘要】目的:**探讨 Notch1 信号通路在调节小鼠触液神经元增殖中的作用。**方法:**(1)取出生 24h 内 C57BL/6 小鼠延髓组织,消化后提取细胞,经流式细胞分选得到触液神经元(cerebrospinal fluid-contacting neurons, CSF-cNs)。将 CSF-cNs 悬浮培养并传代。(2)将 CSF-cNs 传至第 2 代,培养 0h、24h、48h、72h、96h、120h 时应用 CCK-8 法检测 CSF-cNs 光密度(optical density, OD)值,培养 5d 时应用免疫荧光检测 CSF-cNs 特异性标志物多囊肾病 2 型 1 通道蛋白(polycystic kidney disease 2 like 1, PKD2L1)与神经干细胞标志物 Nestin、Sox2 及增殖标志物 Ki67 共表达情况。(3)将第 3 代 CSF-cNs 分为 4 组:对照组、Jagged-1 组、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)组、 $\gamma$ -分泌酶抑制剂(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基-L-2-苯基甘氨酸叔丁酯[(3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-L-2-phenylglycine tert-butyl ester, DAPT]组。对照组采用无血清神经培养液培养; Jagged-1 组采用无血清神经培养液+5 $\mu$ mol/L Jagged-1 培养; DMSO 组采用无血清神经培养液+0.05% DMSO 培养; DAPT 组采用无血清神经培养液+50 $\mu$ mol/L DAPT 培养。培养 0h、24h、48h、72h、96h、120h 时应用 CCK-8 法检测各组 CSF-cNs 的 OD 值;培养 5d 时应用 Western Blot 检测各组 CSF-cNs PKD2L1、Notch1、Notch 受体胞内段(NICD)、Hes1、 $\beta$ -actin 蛋白表达情况,应用免疫荧光法检测各组 CSF-cNs 增殖标志物 Ki67 蛋白荧光强度(arbitrary unit, A.U.)值。**结果:**(1)提取的细胞经流式细胞分选后得到的 CSF-cNs 纯度为(94.5 $\pm$ 2.03)%,存活率为(93.64 $\pm$ 2.35)%。CSF-cNs 可连续传代并形成神经球。(2)第 2 代 CSF-cNs 培养 0h、24h、48h、72h 及 96h 时的 OD 值具有统计学差异( $P<0.05$ ),96h 与 120h 的 OD 值无统计学差异( $P=0.44$ )。CSF-cNs 中 PKD2L1 可与 Nestin、Sox2 或 Ki67 共表达。(3)第 3 代 CSF-cNs 分组处理后各组细胞 PKD2L1 蛋白表达量无统计学差异( $P=0.27$ )。Jagged-1 组细胞 Notch1、NICD、Hes1 蛋白表达量均较对照组升高( $P<0.01$ );72h、96h、120h 的 OD 值较对照组均显著性升高( $P_{72h}=0.03, P_{96h}=0.02, P_{120h}=0.01$ );Ki67 蛋白 A.U. 值较对照组显著性升高( $P<0.01$ )。DAPT 组细胞 Notch1、NICD、Hes1 蛋白表达量较对照组均显著性减低( $P<0.01$ );72h、96h、120h 的 OD 值与对照组比较均显著性降低( $P<0.01$ );Ki67 蛋白 A.U. 值较对照组显著性降低( $P<0.01$ )。DMSO 组各项指标与对照组比较均无统计学差异( $P>0.05$ )。**结论:**CSF-cNs 在体外具有神经干细胞潜能;激活 Notch1 信号通路可增强 CSF-cNs 的增殖能力,抑制 Notch1 信号通路可降低 CSF-cNs 的增殖能力。

**【关键词】**触液神经元;神经干细胞;Notch1 信号通路;增殖;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2021.03.10

中图分类号:Q507, Q813 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2021)-03-0262-09

Notch1 signal pathway promotes the proliferation of cerebrospinal fluid-contacting neurons in vitro/HE Yuqi, LIN Zonglong, WANG Shuo, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2021, 31(3): 262-270

**【Abstract】 Objectives:** To explore whether Notch1 signaling pathways regulate the proliferation of cerebrospinal fluid-contacting neurons(CSF-cNs). **Methods:** (1) The peripheral nerve tissue of the upper central canal of the cervical spinal cord of C57BL/6 mice was extracted within 24 hours after birth, and the CSF-

基金项目:国家自然科学基金(81960234),贵州省自然科学基金[QKH-J(2020)1Y323]

第一作者简介:男(1994-),医师,医学硕士,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(0851)86760914 E-mail: num1ryan@foxmail.com

通讯作者:李青 E-mail: liq168@gmc.edu.cn; 豆晓伟 E-mail: douxw@gmc.edu.cn

cNs were sorted and purified by fluorescence-activated cell sorter (FACS). CSF-cNs were cultured in suspension and subcultured. (2)The CSF-cNs was passaged to the second generation, and the CSF-cNs' optical density(OD) value was detected by CCK-8 at 0h, 24h, 48h, 72h, 96h, and 120h. After 5 days of culture, the co-expression of CSF-cNs specific marker polycystic kidney disease-2-like-1(PKD2L1) and neural stem cell markers(Nestin and Sox2), and proliferation marker(Ki67) was detected by immunofluorescence. (3)The third generation CSF-cNs suspended in vitro were divided into 4 groups. Control group: serum-free nerve culture medium; Dimethyl sulfoxide(DMSO) group: serum-free nerve culture medium + 0.05%DMSO; (3, 5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-L-2-phenylglycine tert-butyl ester(DAPT) group: serum-free nerve culture medium + 50umol/L DAPT (0.05% DMSO configuration); Jagged-1 group: serum-free nerve culture medium + 5umol/L Jagged-1. The OD value of CSF-cNs was detected by CCK-8 at 0h, 24h, 48h, 72h, 96h, and 120h. After 5 days of culture, the expression of PKD2L1, Notch1, NICD, Hes1, and  $\beta$ actin proteins was detected by Western Blot. The fluorescence intensity arbitrary unit(A.U.) value of Ki67 protein, a marker of cell proliferation, was detected by immunofluorescence. **Results:** (1)After FACS, the purity of CSF-CNS was  $(94.5 \pm 2.03)\%$ , and the survival rate was  $(93.64 \pm 2.35)\%$ . CSF-cNs can be continuously passaged down and form the neurospheres. (2)The OD value of the second-generation CSF-cNs was statistically different at 0h, 24h, 48h, 72h, and 96h ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between 96h and 120h ( $P = 0.44$ ). PKD2L1 can be co-expressed with Nestin, Sox2 or Ki67 in CSF-cNs. (3)There was no statistical difference in the expression of PKD2L1 protein among different groups ( $P = 0.27$ ). In Jagged-1 group, the expression of Notch1, NICD and Hes1 proteins was higher than control group( $P < 0.01$ ). At 72h, 96h and 120h, the OD value was significantly higher than control group( $P_{72h} = 0.03$ ,  $P_{96h} = 0.02$ ,  $P_{120h} = 0.01$ ). The A.U. value of Ki67 protein was significantly higher than control group( $P < 0.01$ ). In DAPT group, the expression of Notch1, NICD and Hes1 proteins was lower than control group( $P < 0.01$ ). At 72h, 96h and 120h, the OD value was significantly lower than control group( $P < 0.01$ ). The A.U. value of Ki67 protein was significantly lower than control group( $P < 0.01$ ). There was no statistical difference in all indexes between the DMSO group and the control group( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** Activating Notch1 signal pathway can enhance the proliferation ability of CSF-cNs, while silencing Notch1 signal pathway can reduce the proliferation ability of CSF-cNs.

**【Key words】** Cerebrospinal fluid-contacting neurons; Neural stem cells; Notch1 signal pathway; Proliferation; Rat

**【Author's address】** School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang, 550025, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种高度致残性疾病,目前尚无有效治疗方法<sup>[1]</sup>。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)移植为治疗 SCI 带来了新的曙光。触液神经元(cerebrospinal fluid-contacting neurons, CSF-cNs)是脊髓 NSCs 巢中的一种特殊细胞<sup>[2,3]</sup>,其特异性标志物为多囊肾病 2 型 1 通道蛋白 (polycystic kidney disease 2 like 1, PKD2L1)<sup>[4]</sup>。有研究发现 CSF-cNs 具有 NSCs 潜能<sup>[5]</sup>,能表达 NSCs<sup>[6-9]</sup>及不成熟神经细胞<sup>[10]</sup>标记物,在 SCI 大鼠中其 NSCs 潜能可被激活<sup>[5]</sup>。Notch 信号通路是调节 NSCs 增殖能力的经典通路,由 Notch 受体、配体、CSL 蛋白和下游靶基因组成<sup>[11,12]</sup>,可简单概括为:Notch 配体→Notch 受体→酶切→Notch 受体胞内段 (NICD)→进入细胞核→DNA 结合蛋白→NICD 复合体→目的基因转录<sup>[13]</sup>。其中 Notch1 蛋白介导的 Notch1 信号通路在保持 NSCs

数量、自我更新及促进向神经细胞分化上发挥重要作用<sup>[14,15]</sup>,但其在 CSF-cNs 中的作用仍不清楚。本研究旨在探讨 Notch1 信号通路在体外对 CSF-cNs 增殖能力的作用,为 CSF-cNs 应用于 SCI 的治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器

B27 神经细胞生长添加剂(B27)、Neurobasal-A 培养基、伯克改良伊格尔高糖培养基(Dulbecco modified eagle medium-high glucose, DMEM-HG)、L-谷氨酰胺(L-glutamine)、碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)(美国 Gibco 公司)、Jagged-1、 $\gamma$ -分泌酶抑制剂(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酸-L-2-苯基甘氨酸叔

丁酯 [(3,5-difluorophenylacetyl)-L-alanyl-L-2-phenylglycine tert-butyl ester, DAPT],多聚-D-赖氨酸(poly-D-Lys,PDL)、木瓜蛋白酶、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide,DMSO)(美国 Sigma 公司),兔抗 PKD2L1 抗体(美国 Millipore 公司),鼠抗 Nestin 抗体、鼠抗 Sox2 抗体(美国 Proteintech 公司),鼠抗 Notch1 抗体、鼠抗 Hes1 抗体(美国 abcam 公司),鼠抗 Ki67 抗体(北京博奥森生物技术有限公司),4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(北京索莱宝科技有限公司),细胞计数试剂盒-8(Cell Counting Kit-8,CCK-8)[东仁化学科技(上海)有限公司],24 孔超低黏附培养皿(美国 Corning 公司),多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),流式细胞分选仪(美国 BD 公司),倒置荧光显微镜(德国蔡司公司),通用型 Western Blot 仪(美国 Bio.Rad 公司)。

## 1.2 实验动物

出生 24h 内 C57BL/6 小鼠,SPF 级,雌雄不限,体重约 1.5~2.0g,贵州医科大学实验动物中心提供[实验动物许可证号:SYXK(黔)2018-0001]。本研究获得贵州医科大学附属医院实验动物伦理委员会许可。

## 1.3 CSF-cNs 的提取与纯化

将出生 24h 内 C57BL/6 小鼠置于冰上低温麻醉,在 SPF 级动物房生物安全柜内用 75%酒精浸泡 5min 后断头处死。冰上分离小鼠延髓组织,放于解剖液(DMEM-HG 培养基+2%B27、1%青链霉素+20ng/ml bFGF+20ng/ml EGF)中,用无菌眼科剪将目标组织块反复、均匀剪碎成约 0.5~1mm<sup>3</sup>的碎块。将碎块转移至木瓜蛋白酶溶液中,消化 30min 后 1000 转/min 离心 5min,弃上清,加入新鲜无血清神经培养液(Neurobasal-A 培养基+2%B27+1%青链霉素+1%L-Glutamine+20ng/ml bFGF+20ng/ml EGF),分步吹打后转移至离心管中<sup>[16,17]</sup>。将离心管中细胞放入流式细胞分选仪中进行分选,得到 PKD2L1 阳性 CSF-cNs。吸取 1ml 细胞悬液重新放入流式细胞分选仪中分选,检测细胞纯度。吸取 10μl 细胞悬液行台盼蓝染色,重复 5 次,检测细胞活性。

## 1.4 CSF-cNs 的悬浮培养及成球实验

将细胞悬液以每孔 500μl 接种于 24 孔超低黏附培养板中,每孔再添加 500μl 新鲜无血清神经培养液,置于 37℃、5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每

隔 3d 添加半量培养液。培养至第 7 天传代。

## 1.5 CSF-cNs 活性检测

将第 2 代 CSF-cNs 调整至 1×10<sup>5</sup> 个/ml,吸取 100μl 细胞悬液接种至 96 孔板中,放入 37℃细胞培养箱内预培养。在培养第 0h、24h、48h、72h、96h、120h 时,每孔加入 10μl CCK-8 试剂(注意不要在孔中产生气泡),设 5 个平行对照孔。继续培养 2h 后,用酶标仪测定在 450nm 处的光密度(optical density,OD)值。

## 1.6 CSF-cNs 增殖标志物检测

将第 2 代 CSF-cNs 培养至第 5 天时接种于由 PDL 包被的爬片中,自然生长 2h 贴壁。用 4%多聚甲醛室温下固定 15min,磷酸缓冲液(PBS)洗涤。0.5%Triton X-100 破膜 10min,(PBS)冲洗。10%山羊血清进行封闭,室温封闭 60min。吸除封闭液,不洗。滴加兔抗 PKD2L1 一抗(浓度为 1:500)及鼠抗 Nestin(浓度为 1:200)一抗混合液、兔抗 PKD2L1 一抗(浓度为 1:500)及鼠抗 Sox2(浓度为 1:200)一抗混合液、兔抗 PKD2L1 一抗(浓度为 1:500)及鼠抗 Ki67(浓度为 1:200)一抗混合液,同时取等量 1×PBS 取代一抗作阴性对照,4℃过夜。PBS 洗后加 Alexa Fluor 594 荧光二抗(浓度为 1:500,溶解于 1%BSA 中)及 Alexa Fluor 488 荧光二抗(浓度为 1:500,溶解于 1%BSA 中)孵育 1h,PBS 洗后滴加 DAPI 溶液 5min。通过荧光显微镜摄片,Image J 软件分析蛋白荧光强度(arbitrary unit,A.U.)值。

## 1.7 实验分组及干预

将第 3 代 CSF-cNs 分为 4 组:对照组、Jagged-1 组、DMSO 组、DAPT 组。CSF-cNs 传代后立即放入各组培养液中进行培养。对照组采用无血清神经培养液培养;Jagged-1 组采用无血清神经培养液+5μmol/L Jagged-1 培养;DMSO 组采用无血清神经培养液+0.05%DMSO 培养;DAPT 组采用无血清神经培养液+50μmol/L DAPT(用 0.05%DMSO 配置)培养。

## 1.8 干预后各组 CSF-cNs 信号通路和增殖情况检测

**1.8.1 Western Blot 检测** 各组 CSF-cNs 培养第 5d 时提取蛋白,进行 Western Blot 检测。在待测细胞中加入蛋白裂解液,裂解 30min 提取蛋白。经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白转移到聚偏氟乙(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜上,在含有 5%

脱脂奶粉的 PBS Tween-20 (PBST) 中室温保存 2h。然后用 PKD2L1、Notch1、NICD、Hes1、 $\beta$ -actin 一抗(1:1000 稀释)在 4℃孵育过夜。PBST 洗涤 3 次后,用辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)偶联的第二抗体 37℃孵育膜 2h。PBST 充分洗涤后,用增强型化学发光试剂进行显色。定量分析时,用  $\beta$ -actin 为内参,进行半定量分析。

**1.8.2 CCK-8 检测及免疫荧光检测** 第 3 代各组 CSF-cNs 培养 0h、24h、48h、72h、96h、120h 时,行 CCK-8 检测,检测方法同 1.5。第 3 代各组 CSF-cNs 培养 5d 时行免疫荧光检测,一抗为兔抗 PKD2L1(浓度为 1:500)及鼠抗 Ki67(浓度为 1:200),检测方法同 1.6。

## 1.9 统计分析

所获得数据采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,用 GraphPad Prism5 绘制统计图,计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。计量资料满足正态分布时,两组间比较采用独立样本  $t$  检验,三组及以上比较采用单因素方差分析,然后再采用 LSD 检验;若计量资料不满足正态检验,则用非参数检验进行分析。计数资料两组间比较采用  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CSF-cNs 的分离、纯化

应用流式细胞分析软件(Flowjo)分析流式细胞分选结果显示,单细胞悬液中 PKD2L1+细胞比例为(9.10 $\pm$ 0.60)%,分选后 PKD2L1+细胞比例为(94.5 $\pm$ 2.03)%(图 1)。台盼蓝染色发现单细胞悬液的存活率为(93.64 $\pm$ 2.35)%(表 1)。表明经流式

细胞分选仪筛选可得到纯度高、活性强的 CSF-cNs,可满足后续试验要求。

### 2.2 CSF-cNs 的神经干细胞特性鉴定

提取的 CSF-cNs 在体外悬浮培养时逐渐形成神经球。接种 1d 时,细胞呈现均匀分布,类圆形,折光性强。接种后 3d,细胞呈团块状聚集,部分细胞出现增殖现象,可见少量细胞碎片。接种 5d 时,可见部分悬浮细胞增殖形成神经球,折光性好,立体感强,少数细胞随着换液逐渐坏死。接种 7d 时,培养皿内见大量大小不等、形态规则、立体感强的神经球(图 2a)。选择培养 7d 的神经球进行传代。第 2 代时,增殖能力较原代略增强,多数细胞呈现增殖状态,成球时间较前缩短。神经球传至第 3 代时,单细胞增殖形成神经球的时间较前缩短,5d 左右可成球,形成的神经球折光性好,形状规则、立体感强,直径 120~150 $\mu$ m(图 2b)。

第 2 代 CSF-cNs 培养 5d 时形成的神经球进行免疫荧光检测,可见神经球高表达 CSF-cNs 标志物 PKD2L1,同时 PKD2L1 可与 NSCs 标记物

表 1 流式细胞术分选后的触液神经元存活率

Table 1 The survival rates of CSF-cNs after flow cytometric sorting

| 序号<br>Number   | 台盼蓝拒染细胞数<br>Number of Trypanblue<br>staining-resistant cells | 细胞总数<br>Total number<br>of cells | 存活率(%)<br>Cell survival<br>rate |
|----------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| A              | 52                                                           | 58                               | 89.66                           |
| B              | 48                                                           | 50                               | 96.00                           |
| C              | 48                                                           | 51                               | 94.12                           |
| D              | 50                                                           | 54                               | 92.59                           |
| E              | 46                                                           | 48                               | 95.83                           |
| $\bar{x}\pm s$ | —                                                            | —                                | 93.64 $\pm$ 2.35                |

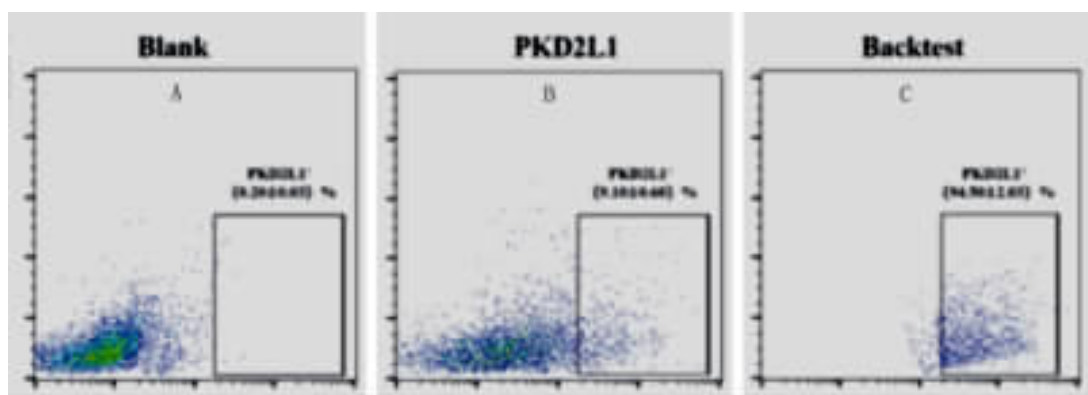


图 1 触液神经元流式细胞分选结果(A:空白对照;B:流式分选结果;C:分选后纯度鉴定)

**Figure 1** The result of fluorescence-activated cell sorter(FACS) of CSF-cNs(A, Blank control; B, Outcome of FACS; C, Purity testing after FACS)

Nestin、Sox2 共表达(图 3)。表明 CSF-cNs 形成的神经球具有 NSCs 潜能,与前期研究结果相似<sup>[5]</sup>。

### 2.3 CSF-cNs 的增殖能力鉴定

**2.3.1 细胞活性** 第 2 代 CSF-cNs 培养 0h、24h、48h、72h 及 96h 时后一个时间点与前一个时间点的 OD 值比较均有统计学差异 ( $P<0.05$ ),96h 与 120h 的 OD 值比较无统计学差异 ( $P=0.44$ ),表明

CSF-cNs 所形成的神经球传代后具有增殖能力(表 2)。

**2.3.2 增殖标志物** 第 2 代 CSF-cNs 形成的神经球高表达 CSF-cNs 特异标记物 PKD2L1, 并与细胞增殖相关标记物 Ki67 共表达,且与 DAPI 所标记的细胞核信号重合,表明 CSF-cNs 形成的第 2 代神经球具有较强的增殖活性(图 4)。

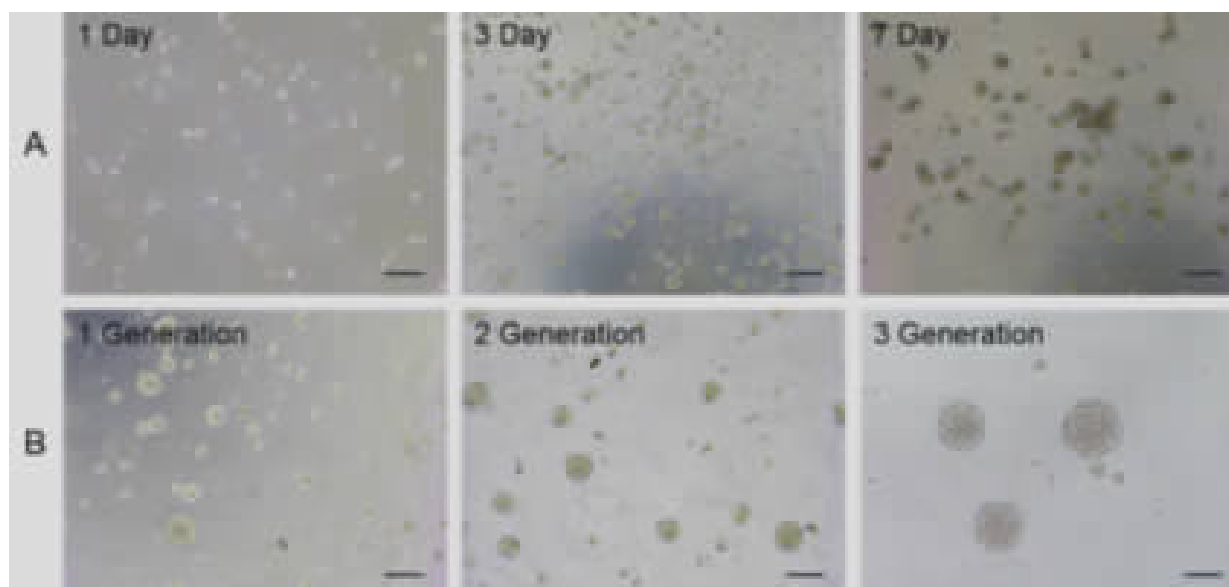


图 2 CSF-cNs 体外悬浮培养结果(标尺:100µm)(A,第 1 代 CSF-cNs 培养 1、3、7d 时 CSF-cNs 生长情况;B,第 1、2、3 代 CSF-cNs 培养 7d 时生长情况)

**Figure 2** CSF-cNs form neurospheres(Scale bars: 100µm) (A, The growth of 1st generation CSF-cNs at the 1d, 3d and 7d; B, The growth of CSF-cNs of the 1st, 2nd, 3rd generation at 7d)

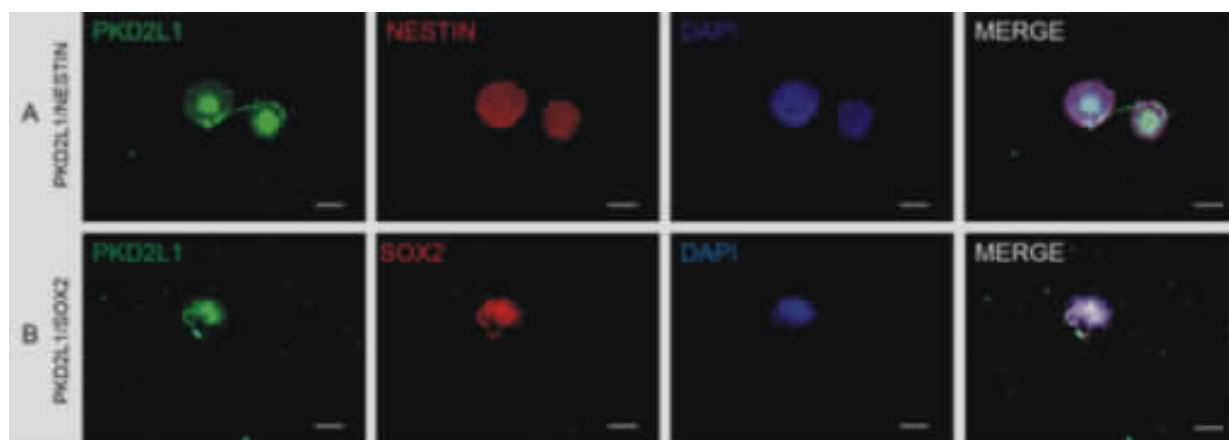


图 3 PKD2L1 阳性 CSF-cNs 表达神经干细胞标志物 Nestin 蛋白(A)与 Sox2 蛋白(B)(绿色荧光代表 PKD2L1 蛋白。A 图红色荧光代表 Nestin 蛋白,B 图红色荧光代表 Sox2 蛋白;蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核,MERGE 为前 3 张免疫荧光重合图像)(标尺:100µm)

**Figure 3** PKD2L1+CSF-cNs express neural stem cells markers Nestin(A) and Sox2(B) (Green fluorescence represented PKD2L1 protein. Red fluorescence in figure A represented Nestin protein, and red fluorescence in figure B represented Sox2 protein. The blue fluorescence was the nucleus stained by DAPI, and MERGE was the first three immunofluorescence coincidence images)(Scale bars: 100µm)

## 2.4 干预后各组 CSF-cNsNotch1 信号通路蛋白表达情况

各组细胞中 Notch1 信号通路蛋白表达情况见图 5 和表 3。PKD2L1 蛋白在各组细胞中无统计学差异 ( $P=0.27$ )。与对照组相比,DMSO 组中 Notch1、NICD、Hes1 蛋白表达量均无统计学差异 ( $P_{\text{Notch1}}=0.32, P_{\text{NICD}}=0.82, P_{\text{Hes1}}=0.40$ ), Jagged-1 组中 Notch1、NICD、Hes1 蛋白表达量均明显升高 ( $P$  值均  $<0.01$ ), DAPT 组中 Notch1、NICD、Hes1 蛋白表达量均明显降低 ( $P<0.01$ )。说明 Jagged-1 可激活

Notch1 信号通路,DAPT 可沉默 Notch1 信号通路,DMSO 对 Notch1 信号通路无明显效果。

## 2.5 干预后各组 CSF-cNs 增殖情况

**2.5.1 细胞活性** 各组 CSF-cNs 培养 0h、24h、48h、72h、96h 和 120h 时的 OD 值见表 4。培养 72h、96h、120h 时,Jagged-1 组细胞 OD 值与对照组同时时间点比较明显升高,差异具有统计学意义 ( $P_{72h}=0.03, P_{96h}=0.02, P_{120h}=0.01$ ),表明 Jagged-1 在加入细胞后 72h 发挥作用,可提升细胞增殖能力;DAPT 组细胞 OD 值与对照组同时时间点比较明显下降,差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ ),表明 Jagged-1 在加入细胞后 72h 发挥作用,可减弱细胞增殖能力。DMSO 组各时间点的细胞 OD 值与对照组同时时间点比较均无统计学差异 ( $P>0.05$ )。

**2.5.2 增殖标志物表达情况** 培养 5d 时,DMSO 组细胞 Ki67 蛋白 A.U. 值较对照组无明显差异 ( $P=0.94$ )。表明 DMSO 对 CSF-cNs 增殖能力不产生影响。Jagged-1 组细胞 Ki67 蛋白 A.U. 值较对照组明显升高,差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ )。表明在使用 Jagged-1 后 5d 时,CSF-cNs 增殖能力较不使用 Jagged-1 时增强。DAPT 组细胞 Ki67 蛋白

表 2 各时间点触液神经元 OD 值

Table 2 Optical density of CSF-cNs at each time point

| 时间点 (h)<br>Time point | OD 值<br>OD value       |
|-----------------------|------------------------|
| 0                     | 0.23±0.03              |
| 24                    | 0.37±0.03 <sup>①</sup> |
| 48                    | 0.54±0.02 <sup>①</sup> |
| 72                    | 0.68±0.04 <sup>①</sup> |
| 96                    | 0.76±0.04 <sup>①</sup> |
| 120                   | 0.77±0.03              |

注:①与上一时间点比较  $P<0.05$

Note: ①Compared with last time point,  $P<0.05$

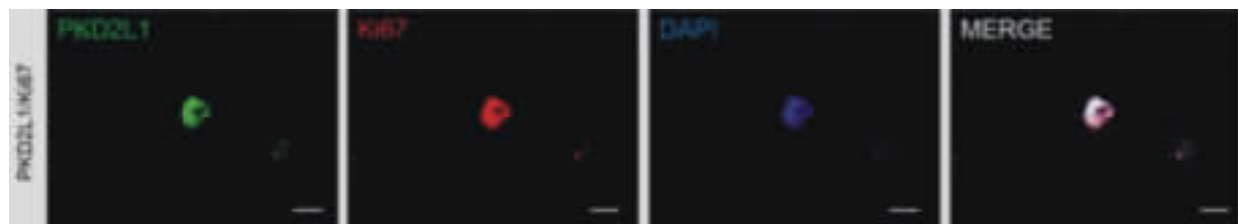


图 4 PKD2L1 阳性 CSF-cNs 表达细胞增殖标志物 Ki67 蛋白(绿色荧光代表 PKD2L1 蛋白,红色荧光代表 Ki67 蛋白,蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核,MERGE 为前 3 张免疫荧光重合图像)(比例尺:100μm)

Figure 4 PKD2L1+CSF-cNs express proliferation marker Ki67 protein (Green fluorescence represents PKD2L1 protein, red fluorescence represents Ki67 protein, blue fluorescence is the nucleus stained by DAPI, and MERGE is the first three immunofluorescence coincidence images) (Scale bars: 100μm)



图 5 各组细胞中 Notch1 信号通路蛋白的表达情况

Figure 5 The expression of Notch1 signal pathway in each group of cells

表 3 各组细胞 Notch1 信号通路蛋白相对表达量

Table 3 The relative expression of each protein in each group

|                              | PKD2L1    | Hes1                   | NICD                   | Notch1                 |
|------------------------------|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Jagged-1 组<br>Jagged-1 group | 0.97±0.04 | 1.29±0.06 <sup>①</sup> | 1.24±0.06 <sup>①</sup> | 1.3±0.07 <sup>①</sup>  |
| DMSO 组<br>DMSO group         | 0.98±0.04 | 0.98±0.06              | 1.01±0.05              | 1.03±0.05              |
| 对照组<br>Control group         | 1         | 1                      | 1                      | 1                      |
| DAPT 组<br>DAPT group         | 1.01±0.03 | 0.45±0.02 <sup>①</sup> | 0.62±0.07 <sup>①</sup> | 0.47±0.02 <sup>①</sup> |

注:①与对照组比较  $P<0.01$

Note: ①Compared with control group,  $P<0.01$

A.U.值较对照组明显下降,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。表明在使用 DAPT 后 5d 时,CSF-cNs 增殖能力较不使用 DAPT 时减弱(图 6、表 5)

**3 讨论**  
中枢神经系统是哺乳动物体内最复杂、最重要的系统之一,以往认为其在出生后便不可再生。

表 4 各时间点各组 CSF-cNs 的 OD 值  
Table 4 Optical density of each group CSF-cNs at each time point

|                           | 0h        | 24h       | 48        | 72h                    | 96h                    | 120h                   |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Jagged-1 组 Jagged-1 group | 0.21±0.03 | 0.36±0.02 | 0.52±0.04 | 0.72±0.02 <sup>①</sup> | 0.81±0.02 <sup>①</sup> | 0.81±0.01 <sup>①</sup> |
| DMSO组 DMSO group          | 0.21±0.04 | 0.34±0.01 | 0.50±0.03 | 0.68±0.02              | 0.74±0.03              | 0.75±0.04              |
| 对照组 Control group         | 0.21±0.03 | 0.34±0.01 | 0.51±0.05 | 0.67±0.01              | 0.74±0.02              | 0.76±0.01              |
| DAPT组 DAPT group          | 0.20±0.04 | 0.34±0.01 | 0.48±0.02 | 0.57±0.03 <sup>②</sup> | 0.63±0.04 <sup>②</sup> | 0.64±0.03 <sup>②</sup> |

注:与同时点对照组比较,① $P<0.05$ ;② $P<0.01$   
Note: Compared with control group at the same time, ① $P<0.05$ ; ② $P<0.01$

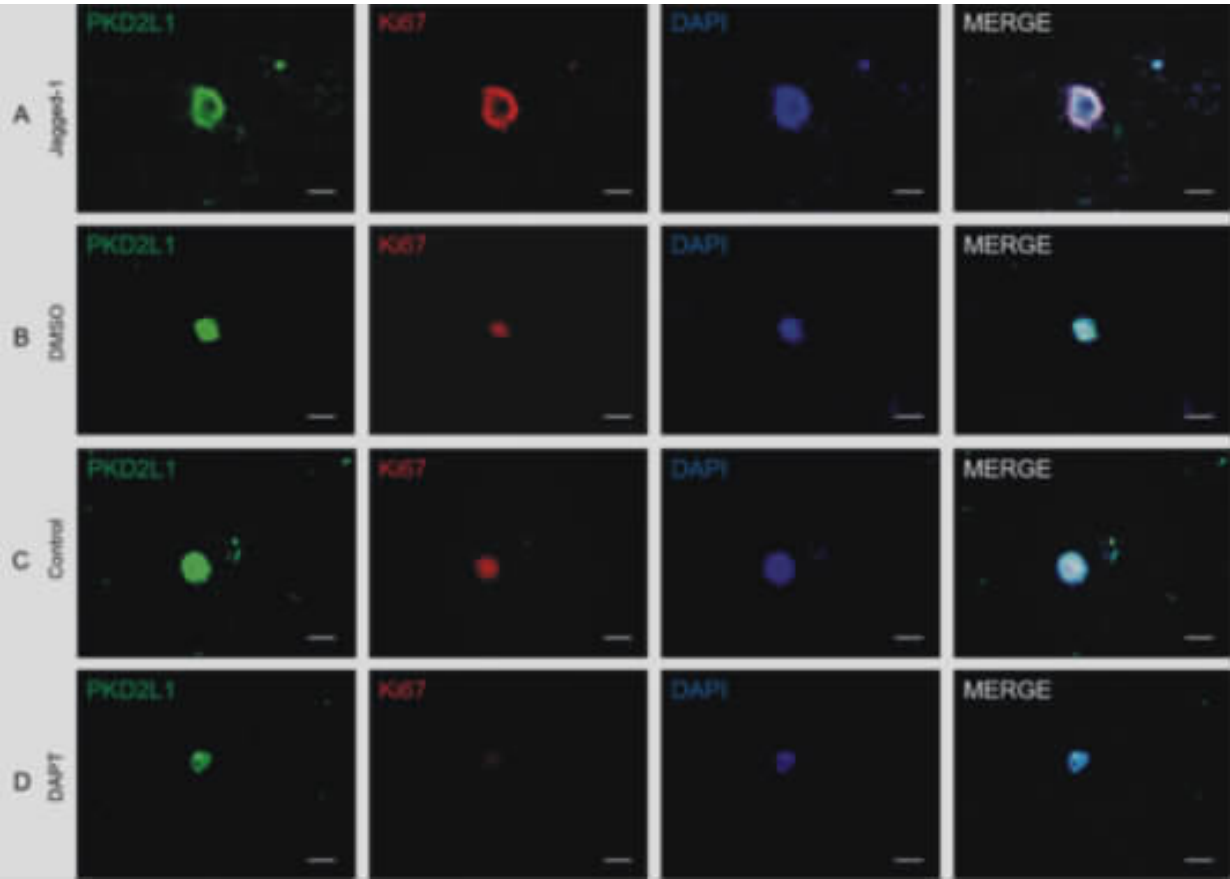


图 6 各组 PKD2L1 阳性 CSF-cNs 表达细胞增殖标志物 Ki67 蛋白的情况 (绿色荧光代表 PKD2L1 蛋白,红色荧光代表 Ki67 蛋白,蓝色荧光为 DAPI 染色的细胞核,MERGE 为前 3 张免疫荧光重合图像)(比例尺:100 $\mu$ m)。各组 CSF-cNs 表达 PKD2L1 蛋白无明显差异,Jagged-1 组(A)中 Ki67 蛋白表达较对照组(C)明显升高,DAPT 组(D)中 Ki67 蛋白表达较对照组(C)明显降低,DMSO 组(B)中 Ki67 蛋白表达与对照组(C)无明显差异。  
**Figure 6** Expression of Ki67 in each group of PKD2L1+CSF-cNs(Green fluorescence represented PKD2L1 protein. Red fluorescence represented Ki67 protein. Blue fluorescence was the nucleus stained by DAPI, and MERGE was the first three immunofluorescence coincidence imagesand)(Scale bars:100 $\mu$ m). There was no statistical difference in CSF-cNs expression among groups. The expression of Ki67 protein of Jagged-1 group(A) was significantly higher than that of control group(C), and the expression of Ki67 protein of DAPT group(D) was significantly lower than that of control group(C). The expression of Ki67 protein of DMSO group(B) was not significantly different from that of control group(C)

表 5 培养 5d 时 CSF-cNs 中 Ki67 蛋白 A.U.值

Table 5 Arbitrary Unit of cellular positive Ki67 protein in each group

|                              | A.U.值<br>A.U. value      |
|------------------------------|--------------------------|
| Jagged-1 组<br>Jagged-1 group | 101.98±7.08 <sup>①</sup> |
| DMSO组<br>DMSO group          | 43.46±2.55               |
| 对照组<br>Control group         | 41.64±2.28               |
| DAPT组<br>DAPT group          | 22.30±2.02 <sup>①</sup>  |

注:①与对照组比较  $P<0.01$ Note: ①Compared with control group,  $P<0.01$ 

1992年 Reynolds 和 Weiss 教授在成年哺乳动物前脑纹状体中发现了 NSCs<sup>[18]</sup>,为人类治疗 SCI 带来了新的希望,但何种细胞为 NSCs 一直没有定论。目前认为哺乳动物脊髓中的 NSCs 主要存在于神经干细胞巢中<sup>[19]</sup>,巢中的微环境为 NSCs 的生长发育提供了有利条件<sup>[20,21]</sup>。CSF-cNs 为神经干细胞巢的重要组成部分,发现于 1977 年<sup>[3]</sup>,但特异性标记物的缺乏阻碍了对其功能的研究<sup>[2,22]</sup>。2006 年,Huang 等<sup>[4]</sup>发现 PKD2L1 可以特异性标记 CSF-cNs,为 CSF-cNs 的深入研究打下了基础。

本研究根据以前的研究方法<sup>[16,17]</sup>,从 C57BL/6 新生大鼠延髓组织中分离出神经细胞,经木瓜酶消化、流式细胞分选仪分选后,得到纯度高、活性强的原代 CSF-cNs。将原代 CSF-cNs 悬浮培养,可形成大小适中、折光性强的神经球,将传代至第三代神经球进行免疫印迹检测,可检测到其表达 Nestin、Sox2 等 NSCs 标志物。神经球形成实验及免疫荧光检测结果均表明 CSF-cNs 具有 NSCs 潜能,可能为 NSCs 的种类之一。

Notch1 信号通路为 Notch 信号通路的一种,主要通过跨膜受体 Notch1 与相邻细胞表面的跨膜配体(Jagged 1,2 和 Delta-like 1,3,4)的物理结合而激活<sup>[23]</sup>,促进下游靶基因(Hes1、Hes5 等)的表达<sup>[13,24]</sup>。Jagged-1 是 Notch1 信号通路的主要配体之一,能增加 Notch1 信号通路配体数量,释放出大量 NICD,激活 Notch1 信号通路<sup>[25]</sup>。而 DAPT 为  $\gamma$ -内分泌酶的主要阻断剂,可以阻断  $\gamma$ -内分泌酶介导的酶切过程,使其无法促进 NICD 的释放,从而抑制 Notch1 信号通路<sup>[26]</sup>。本研究在 CSF-cNs 中加入 Jagged-1 及 DAPT,观察 Notch1 及下游蛋白 NICD、Hes1 的表达及 CSF-cNs 的增

殖能力,发现激活 Notch1 信号通路可增强 CSF-cNs 的增殖能力,抑制 Notch1 信号通路可降低 CSF-cNs 的增殖能力。

综上所述,本研究发现大鼠 CSF-cNs 在体外具有 NSCs 潜能,激活 Notch1 信号通路可增强 CSF-cNs 的增殖能力,抑制 Notch1 信号通路可降低 CSF-cNs 的增殖能力,提示调节 Notch1 信号通路可以影响大鼠 CSF-cNs 的增殖能力。这为未来应用 CSF-cNs 治疗 SCI 提供了理论依据。但是,虽然本实验应用了目前公认的方法激活或抑制 Notch1 信号通路,并验证此通路蛋白及下游蛋白的表达,以及 CSF-cNs 的增殖能力,但本研究采用的是体外细胞培养技术评估 CSF-cNs 的增殖能力,而体外培养使细胞脱离了原来生存的体内环境,实验结果可能不能完全代表细胞在体内的变化,需要进一步研究。

#### 4 参考文献

- GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. Lancet Neurol, 2019, 18(5): 459–480.
- Vigh-Teichmann I, Vigh B. The cerebrospinal fluid-contacting neuron: a peculiar cell type of the central nervous system. Immunocytochemical aspects[J]. Arch Histol Cytol, 1989, 52(1): 195–207.
- Vigh B, Vigh-Teichmann I, Aros B. Special dendritic and axonal endings formed by the cerebrospinal fluid contacting neurons of the spinal cord[J]. Cell Tissue Res, 1977, 183(4): 541–552.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, et al. The cells and logic for mammalian sour taste detection[J]. Nature, 2006, 442(7105): 934–938.
- He YQ, Shi XX, Chen L, et al. Cerebrospinal fluid-contacting neurons affect the expression of endogenous neural progenitor cells and the recovery of neural function after spinal cord injury[J]. Int J Neurosci, 2020, Online ahead of print.
- Orts-Del'Immagine A, Kastner A, Tillement V, et al. Morphology, distribution and phenotype of polycystin kidney disease 2-like 1-positive cerebrospinal fluid contacting neurons in the brainstem of adult mice [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e87748.
- Orts-Del'Immagine A, Trouslard J, Airault C, et al. Postnatal maturation of mouse medullo-spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons[J]. Neuroscience, 2017, 343: 39–54.
- Petracca YL, Sartoretti MM, Di Bella DJ, et al. The late and dual origin of cerebrospinal fluid-contacting neurons in the mouse spinal cord[J]. Development, 2016, 143(5): 880–891.

9. Djenoune L, Desban L, Gomez J, et al. The dual developmental origin of spinal cerebrospinal fluid-contacting neurons gives rise to distinct functional subtypes[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 719.
10. Zhang LC, Zeng YM, Ting J, et al. The distributions and signaling directions of the cerebrospinal fluid contacting neurons in the parenchyma of a rat brain[J]. *Brain Res*, 2003, 989(1): 1-8.
11. Ables JL, Breunig JJ, Eisch AJ, et al. Not(ch) just development: Notch signalling in the adult brain[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2011, 12(5): 269-283.
12. Wang L, Chopp M, Zhang RL, et al. The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal differentiation in adult neural progenitor cells after stroke [J]. *Neuroscience*, 2009, 158(4): 1356-1363.
13. Venkatesh K, Reddy L, Abbas S, et al. Notch signaling is essential for maturation, self-renewal, and tri-differentiation of in vitro derived human neural stem cells[J]. *Cell Reprogram*, 2017, 19(6): 372-383.
14. Basak O, Giachino C, Fiorini E, et al. Neurogenic subventricular zone stem/progenitor cells are Notch1-dependent in their active but not quiescent state[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(16): 5654-5666.
15. Engler A, Rolando C, Giachino C, et al. Notch2 signaling maintains NSC quiescence in the murine ventricular-subventricular zone[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(4): 992-1002.
16. Brewer GJ, Torricelli JR. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(6): 1490-1498.
17. Homayouni Moghadam F, Sadeghi-Zadeh M, Alizadeh-Shoorjistan B, et al. Isolation and culture of embryonic mouse neural stem cells[J]. *J Vis Exp*, 2018, 141: 1-6.
18. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707-1710.
19. Marichal N, Reali C, Trujillo-Cenóz O, et al. Spinal cord stem cells in their microenvironment: the ependyma as a stem cell niche[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1041: 55-79.
20. Becker CG, Becker T, Hugnot JP. The spinal ependymal zone as a source of endogenous repair cells across vertebrates[J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 170: 67-80.
21. Andreotti JP, Silva WN, Costa AC, et al. Neural stem cell niche heterogeneity[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2019, 95: 42-53.
22. Orts-Del'Immagine A, Wyart C. Cerebrospinal-fluid-contacting neurons[J]. *Curr Biol*, 2017, 27(22): R1198-R1200.
23. 何宇祺, 王洪超, 李青. 脊髓损伤后内源性神经干细胞激活机制的研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(3): 279-283.
24. Mao YZ, Jiang L. Effects of Notch signalling pathway on the relationship between vascular endothelial dysfunction and endothelial stromal transformation in atherosclerosis [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(4): 764-772.
25. Cheng YL, Choi Y, Sobey CG, et al. Emerging roles of the  $\gamma$ -secretase-notch axis in inflammation [J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 147: 80-90.
26. Yan Y, Kong L, Xia Y, et al. Osteopontin promotes endogenous neural stem cell proliferation and improved neurological function through Notch signaling pathway in mice acute mechanical brain injury [J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 67: 118-129.

(收稿日期:2020-07-16 末次修回日期:2020-11-19)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 卢庆霞)