

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202405017



# 丙戊酸促进小鼠神经干细胞分化 成神经元及其影响机制

宁文洁<sup>1</sup>, 刘使君<sup>1</sup>, 孙源培<sup>1</sup>, 赖靖尧<sup>2</sup>, 王立强<sup>1</sup>, 侯志勇<sup>1,3</sup>

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 神岐生命科技(福建)有限公司, 福建 泉州 362005;

3. 解放军 962 医院, 黑龙江 哈尔滨 150080)

**摘要:** 为了探究丙戊酸(VPA)促进小鼠神经干细胞(NSCs)分化成神经元的可能机制,从小鼠脑中分离神经干细胞并进行传代培养,再将其在不同类型分化培养基中重新接种,诱导细胞分化为神经元,用免疫荧光染色检测神经元特异性标志物的表达情况,并采用 qRT-PCR 分析研究 VPA 处理前、后 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中关键分子表达水平。结果表明:分离后传代培养的 NSCs 悬液内 Nestin 和 Pax6 阳性细胞比例居高,分化后细胞呈现出显著神经元形态,且神经元标志物  $\beta$ -微管蛋白(TUJ1)、双皮质素(DCX)和微管相关蛋白 2 (MAP2)在分化后表达水平显著提高;与正常组相比,VPA 处理组中 Wnt-3 $\alpha$ ,  $\beta$ -catenin 和 cyclin D1 的 mRNA 相对表达量上升, p21 的 mRNA 相对表达量降低;Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的抑制剂 FH535 能显著减弱 VPA 中 NSCs 分化成神经元的过程。

**关键词:** 神经干细胞; 神经元; 细胞周期蛋白; 丙戊酸; Wnt/ $\beta$ -catenin 通路

中图分类号: R 329.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-5013(2025)01-0079-08

## Valproic Acid Promotes Differentiation of Mouse Neural Stem Cells Into Neurons and Its Mechanism of Effect

NING Wenjie<sup>1</sup>, LIU Shijun<sup>1</sup>, SUN Yuanpei<sup>1</sup>,  
LAI Jingyao<sup>2</sup>, WANG Liqiang<sup>1</sup>, HOU Zhiyong<sup>1,3</sup>

(1. School of Biomedical Sciences, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. Shenqi Life Science and Technology (Fujian) Limited Company, Quanzhou 362005, China;

3. PLA 962 Hospital, Harbin 150080, China)

**Abstract:** To investigate the possible mechanisms by which valproic acid (VPA) promotes the differentiation of mouse neural stem cells (NSCs) into neurons, neural stem cell were isolated from mouse brain and passaged in culture, then re-inoculated in different types of differentiation medium to induce cell differentiation into neurons, and the expression of neuron-specific markers was detected by immunofluorescence staining, and the expression levels of key molecules in the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway were investigated before and after VPA treatment by qRT-PCR. The results showed that the proportion of Nestin and Pax6 positive cells within suspensions of NSCs cultured in passages after isolation was high, the differentiated cells showed significant

收稿日期: 2024-05-21

通信作者: 侯志勇(1972-),男,副主任药师,主要从事创新药物的研究。E-mail:mpp5358@163.com。

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFE0101700);福建省高校产学研合作重大项目(2019Y4007);华侨大学研究生科研创新基金资助项目(18013071019)

neuronal morphology, and the expression levels of neuronal markers  $\beta$ -Tubulin (TUJ1), Doublecortin (DCX) and recombinant microtubule associated protein 2 (MAP2) were significantly increased after differentiation. Compared with the normal group, the mRNA relative expression levels of *Wnt-3 $\alpha$* ,  *$\beta$ -catenin* and *cyclin D1* was increased, and the mRNA relative expression levels of *p21* protein was decreased in the VPA-treated group. FH535, an inhibitor of the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway, significantly attenuated the differentiation of NSCs into neurons in VPA.

**Keywords:** neural stem cells; neurons; cell cycle protein; valproic acid; Wnt/ $\beta$ -catenin pathway

神经干细胞(NSCs)是在胚胎、新生儿和成人大脑中产生神经元和神经胶质细胞的主要祖细胞<sup>[1]</sup>,是多潜能的前体细胞,能作为神经球在培养基中生长和自我更新很长一段时间,同时保持稳定以产生成熟的功能性脑细胞<sup>[2]</sup>,在神经系统疾病的治疗中发挥着独特的作用。随着对神经发育的了解和干细胞技术的进步,可以通过不同来源获得 NSCs,并有目的地将其分化为特定的神经谱系细胞,从而替代某些神经系统疾病中丢失的特定细胞,为治疗神经退行性疾病提供了新的方法<sup>[3]</sup>。NSCs 的分化受到多种因素的调节,包括生长和转录因子、表观遗传调节剂、微核糖核酸(microRNA)和细胞外基质成分的作用等<sup>[4]</sup>。除这些内在特征和外在信号的调节外,化学物质也可以调节 NSCs 的分化进程。

丙戊酸(VPA)是一种用于治疗神经疾病的药物,研究表明 VPA 对神经具有保护作用。这种作用的潜在机制是上调抗凋亡蛋白(Bcl-2)的表达,从而产生神经营养效应<sup>[5]</sup>。VPA 是一种细胞外信号调节激酶(ERK)通路激活剂,它可以通过激活 ERK 调节转录因子 AP-1 功能,也可以作为神经营养因子促进神经元分化和神经元存活。VPA 还能增加 ERK 通路调控的基因的表达,包括生长锥相关蛋白和 Bcl-2,促进神经突生长和细胞存活,增强去甲肾上腺素的摄取和释放<sup>[6]</sup>。Hsieh 等<sup>[7]</sup>的研究表明,在 VPA 上调的神经元特异性基因中存在一种神经源性的基本螺旋-环-螺旋转录因子(NeuroD),它能够诱导神经元,如诱导成年海马神经祖细胞的神经元分化,也能抑制神经胶质分化,如星形胶质细胞和少突胶质细胞。VPA 在神经元分化中发挥着重要作用,但是 VPA 对 NSCs 的影响尚不清楚。因此,本文从小鼠中分离 NSCs,经过不同培养基重新接种使其分化成神经元,探究 VPA 诱导 NSCs 分化的可能影响机制。

# 1 实验材料

## 1.1 动物和试剂

昆明种小鼠购自福州吴氏试验动物研究中心,试验动物使用许可证号:SCXK(闽)2016-0002。

Neurobasal<sup>TM</sup> Plus 培养基、B-27<sup>TM</sup> Plus 添加物、 $\gamma$ -分泌酶抑制剂(DAPT)(美国 Gibco 公司);优等胎牛血清(FBS)(美国 Hy-clone 公司);培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);PrimeScript<sup>TM</sup> RT Reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time) 试剂盒(日本 TAKARA 公司);iTaQ Unieversal SYBR Green 超混合液(美国 Bio-Rad 公司); $\beta$ -巯基还原剂、体积分数 4%的组织细胞固定液(北京索莱宝生物科技有限公司);双皮质素(DCX)抗体、 $\beta$ -微管蛋白(TUJ1)抗体(英国 Ab-cam 公司);抗荧光淬灭剂(上海碧云天生物技术有限公司);山羊抗小鼠二抗-Cy3(美国 Jackson 公司);丙戊酸(VPA)、牛血清白蛋白(BSA)、Triton X-100 聚乙二醇辛基苯基醚(美国 Sigma 公司);Nestin 单克隆抗体、Pax6 单克隆抗体、Mouse IgG1 Isotype Control(同型对照)、DyLight 488 偶联山羊抗小鼠 IgG 二抗(美国 Invitrogen 公司);引物(上海生工生物工程股份有限公司);NeuroCult NSC 增殖补充剂、NeuroCult NSC 基础培养基(加拿大 StemCell Technologies 公司);FGF2(bFGF)、表皮生长因子(EGF)(美国 Peprotech 公司);FH535 拮抗剂(美国 EMD Millipore 公司)。

## 1.2 实验设备

台式低温高速离心机(美国 Beckman 公司);流式细胞仪(美国 Beckman 公司);倒置荧光显微镜(德国莱卡公司);荧光定量 PCR 仪、PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);高速离心机(德国 Eppendorf 公司);涡旋振荡器(德国 IKA 公司);微量分光光度计(美国 Thermo 公司)。

2 实验方法

2.1 溶液配制

完全培养液:将 50 mL NeuroCult NSC 增殖补充剂添加到 450 mL NeuroCult NSC 基础培养基中,加入 20  $\mu$ L 500  $\mu$ g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>的 EGF 和 1 000  $\mu$ L 100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>的 FGF2,于 4  $^{\circ}$ C 下储存。

对照组为诱导分化第 0 天的细胞,其他各组别神经干细胞需在相应的培养基中诱导分化 10 d。正常(NOR)组细胞培养基由 Neurobasal<sup>TM</sup> Plus 培养基、体积分数 2% 的 B-27<sup>TM</sup> Plus 添加物和体积分数 0.1% 的 DAPT 组成;实验(EXP)组细胞培养基由 Neurobasal<sup>TM</sup> Plus 培养基、体积分数 2% 的 B-27<sup>TM</sup> Plus 添加物、体积分数 0.1% 的 DAPT 和 0.75 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> VPA<sup>[8]</sup> 组成;VPA+FH535(ANT)组细胞培养基由 Neurobasal<sup>TM</sup> Plus 培养基、体积分数 2% 的 B-27<sup>TM</sup> Plus 添加物、体积分数 0.1% 的 DAPT、0.75 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> VPA 和 FH535 拮抗剂构成。

2.2 神经干细胞的分离培养

取出生第 15 天的 小鼠脑组织,先用生理盐水冲洗至洗涤液澄清,再用体积分数 75% 的酒精洗涤,最后用生理盐水冲洗 3 次;将端脑快速解剖分离并转移至 50 mL 离心管中,用枪头吹至浑浊。加入完全培养液,2 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min,重复 2 次。向离心管中加入 1 mL 完全培养液,吹打至没有可见细胞团块;将细胞按照每 15 mL 1.0 $\times$ 10<sup>7</sup> 个的密度接种于 T75 瓶中,置于细胞培养箱中培养。

2.3 神经干细胞传代

神经干细胞培养 7 d 后可以观察到神经球,将其收集至离心管中,离心弃上清,加入 Accutase 酶,重悬细胞球后,将离心管放置于恒温震荡箱中孵育 20 min。吹打细胞液至无肉眼可见的团块,向离心管中加入生理盐水使消化终止,3 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 5 min,去上清,再加入完全培养液重悬,使沉淀分散为单细胞悬液。将细胞以每 15 mL 1.0 $\times$ 10<sup>6</sup> 个的密度接种于 T75 瓶中,放置于培养箱中培养。

2.4 定向分化

用 Laminin 包被 24 孔板,置于培养箱内过夜,在接种细胞前,用磷酸缓冲液(PBS)洗涤 24 孔板。将第 2 代神经干细胞的神经球消化为单细胞,再用神经元分化培养基重悬细胞,按每孔 500  $\mu$ L 4 $\times$ 10<sup>4</sup> 个细胞接种于 24 孔板,放置于 37  $^{\circ}$ C,体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每隔 3 d 换液 1 次,换液采取半量换液原则,观察细胞状态诱导 10 d。

2.5 流式细胞术

将细胞固定、透化,然后用 Nestin,Pax6 单克隆抗体、小鼠 IgG1 同种型对照分别与体积分数 5% 的 BSA 以体积比 1 : 100 稀释。将一抗在冰上孵育 1 h 后,用 DyLight 488 偶联的山羊抗小鼠 IgG 二抗在冰上以 1 : 500 的稀释度对细胞进行染色 1 h。每个样品采集了 1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞。

2.6 qRT-PCR

在培养 0 和 10 d 时,分别检测各组 *TUJ1*,*DCX* 和微管相关蛋白 2(*MAP2*)的 mRNA 相对表达量,检测各组 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中关键分子 *Wnt-3 $\alpha$* , *$\beta$ -catenin*,*cyclin D1*,*p21* 的 mRNA 相对表达量。对 RNA 样品进行提取,使用微量分光光度计测量 RNA 浓度。对 RNA 进行纯化及反转录,结果采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法进行相对定量。PCR 引物序列,如表 1 所示。表 1 中:*GAPDH* 为管家基因。

表 1 PCR 引物序列  
Tab.1 Primer sequences of PCR

基因名称	引物序列 (5'-3')	基因名称	引物序列 (5'-3')
<i>TUJ1</i>	F:CGCCATGTTTCAGACGCAAG R:CTCGGACACCAGGTCGTTCA	<i><math>\beta</math>-catenin</i>	F:GACCACAAGCAGAGTGCTGA R:ACTCGGGTCTGTCAGGTGAG
<i>DCX</i>	F:GAGTGGGGCTTTTCGAGTGAT R:TGGTGGAACCACAGCAACTT	<i>cyclin D1</i>	F:TGGAGCCCCCTGAAGAAGAG R:AAGTGC GTTGTGCGGTAGC
<i>MAP2</i>	F:AAGTGGTGACTTGGCTCAGG R:GGGAGGATGGAGGAAGGTCT	<i>p21</i>	F:CTGCTCCCTTCCTCAGAC R:TGAGGTAGGACCAGGAAACC
<i>Wnt-3<math>\alpha</math></i>	F:GCCGTCACATGCACCTCAA R:GCTCTGTGGGCACCTTGAAG	<i>GAPDH</i>	F:AGGTTGTCTCCTGCGACTTCA R:TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC

2.7 免疫荧光染色

诱导 10 d 后,去除孔板中培养液,再用体积分数 4% 的多聚甲醛(PFA)固定 10 min,吸出,洗涤。加入体积分数 0.3% 的 Triton X-100,室温固定 10 min,吸出,洗涤。每孔加体积分数 3% 的 BSA 室温封闭 1 h;加入体积分数 3% BSA 稀释后的 TUJ1 抗体(体积比为 1 : 300)和 DCX 抗体(体积比为 1 : 300),对照组加入等量体积分数 3% 的 BSA,4 ℃ 孵育过夜。吸去一抗,洗涤;再加入体积分数 3% BSA 稀释后的山羊抗小鼠二抗-Cy3(体积比为 1 : 500),避光孵育 1 h,吸出,洗涤;加入 5 滴抗荧光淬灭剂(含 DAPI),室温避光放置 5 min,荧光显微镜观察拍照。

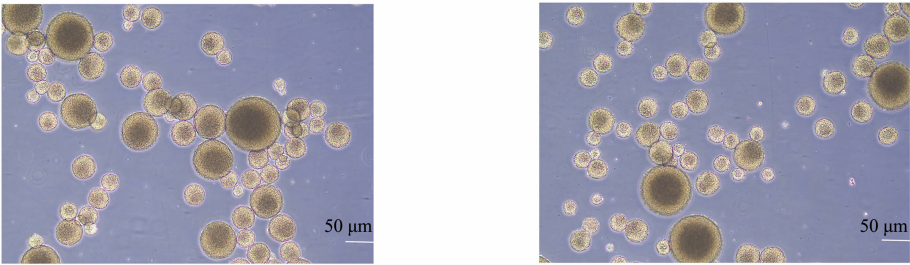
2.8 统计学分析

采用 Graphpad Prism 6 软件作图<sup>[9]</sup>,所有数据均用均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 SPSS 18.0 软件对原始数据进行正态性检验,并对服从正态分布的连续变量进行单因素方差分析;然后进行方差齐假设事后检验,对方差不齐的数据使用 Welch 校正的两独立样本  $t$  检验评价组间参数的显著性。检验水准  $\alpha$  设为 0.05。与对照(CON)组相比,上标“\*”“\*\*”“\*\*\*”分别表示  $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ ;与正常(NOR)组相比,上标“#”“##”“###”分别表示  $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ ;与实验(EXP)组相比,上标“\$”“\$\$”“\$\$\$”分别表示  $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ 。

3 实验结果与分析

3.1 神经干细胞分离培养及标志物检测

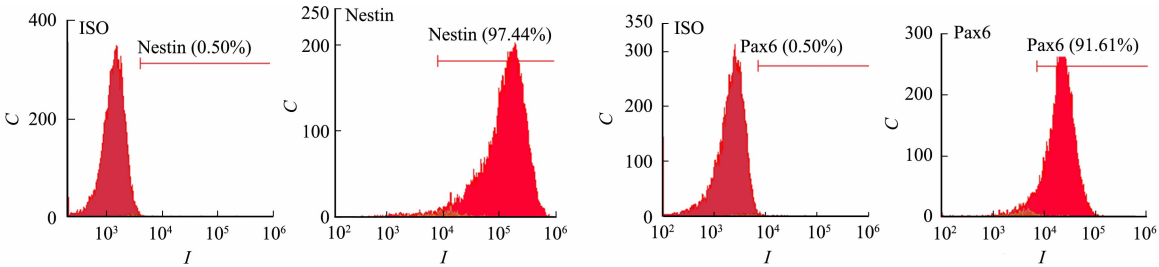
采用神经球技术从人神经组织中分离出神经干细胞,经体外培养并传代可以观察到细胞聚集生长,并形成球状(图 1)。



(a) 细胞第 1 次传代培养 7 d 后 (b) 细胞第 2 次传代培养 7 d 后  
图 1 体外培养的 NSCs 形态

Fig. 1 Morphology of NSCs cultured *in vitro*

许多标志物与 NSCs 相关,这些标志物包括 SOX2<sup>[10]</sup>,Nestin<sup>[11]</sup> 和 Pax6<sup>[12]</sup> 等。使用单细胞分析鉴定 NSCs 标志物,通过采用流式细胞术对神经干细胞胞内标志物 Nestin 和 Pax6 进行检测。Nestin, Pax6 在神经干细胞内的表达峰图,如图 2 所示。图 2 中: $C$  为细胞计数; $I$  为荧光强度。由此可知,传代培养后,细胞悬液内具有高比例的 Nestin 和 Pax6 阳性细胞。



(a) Nestin (b) Pax6  
图 2 Nestin, Pax6 在神经干细胞内的表达峰图

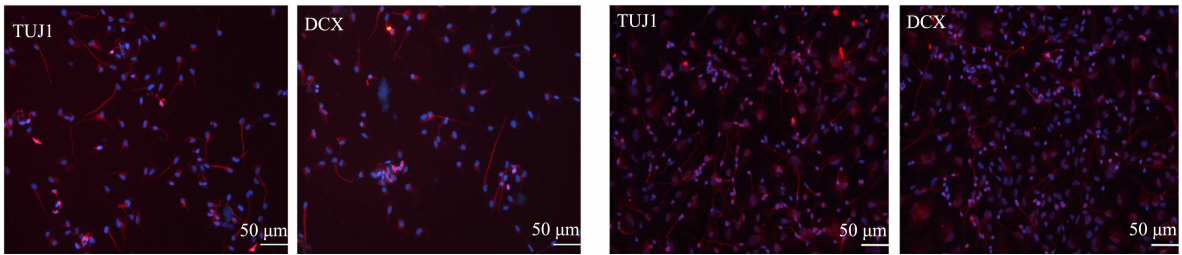
Fig. 2 Expression peak diagrams of Nestin, Pax6 in neural stem cells

3.2 诱导后神经元形态

通过种板使细胞呈贴壁生长,采用分化培养基对神经干细胞进行诱导,可观察到许多细胞表现出神

神经元形态<sup>[13]</sup>,具有小的圆形细胞体,延伸出长突起。

为了探究分化培养基能否将神经干细胞诱导为神经元,对诱导后的细胞进行免疫荧光染色处理,检测神经元特异性标志物 TUJ1,DCX。TUJ1,DCX 在体外分化细胞中的表达,如图 3 所示。图 3 中:红色为 TUJ1,DCX 免疫荧光染色;蓝色为 DAPI 染色。NOR 组和 EXP 组诱导培养后的细胞 TUJ1 和 DCX 抗体染色的阳性率对比,如图 4 所示。图 4 中: $\eta$  为免疫荧光阳性率。



(a) NOR 组

(b) EXP 组

图 3 免疫荧光检测神经干细胞的分化情况

Fig. 3 Immunofluorescence detection of differentiation of neural stem cells

由图 3,4 可知:NOR 组和 EXP 组的 NSCs 都成功分化成神经元;与 NOR 组相比,EXP 组培养的细胞,NSCs 分化的细胞表达神经元特异性标志物 TUJ1,DCX 更显著。结果表明,分化培养基和丙戊酸都促进 NSCs 向神经元的分化,EXP 组中 NSCs 分化的神经元数量远高于正常组,分化效果更佳,模拟了体内神经干细胞向神经元进化的过程。

### 3.3 诱导前、后神经元标志物基因表达量变化

为了进一步检测 TUJ1,DCX,MAP2 在神经干细胞分化过程中的表达情况,提取诱导 0 d 和 10 d 后细胞中的 RNA,通过 qRT-PCR 检测,得到神经元标志物基因 mRNA 相对表达量,如图 5 所示。

由图 5 可知:与 CON 组相比,NOR 组和 EXP 组中 TUJ1,DCX,MAP2 的 mRNA 在分化过程中表达水平都显著提高,标志物基因表达水平的差异具有统计学意义( $P < 0.001$ );与 NOR 组相比,EXP 组中 TUJ1,DCX 和 MAP2 的 mRNA 表达水平的差异具有统计学意义( $P < 0.001$ )。

### 3.4 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中关键分子在分化中的表达

VPA 能够促进 NSCs 向神经元的分化,为进一步探究 VPA 在 NSCs 分化过程中可能的影响机制,选取 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中关键分子 *Wnt-3 $\alpha$*  和  $\beta$ catenin 为评价指标,通过 RT-qPCR 检测 *Wnt-3 $\alpha$*  和  $\beta$ catenin 的 mRNA 相对表达量,结果如图 6(a),(b) 所示。由图 6(a)可知:与 CON 组相比,NOR 组和 EXP 组中 *Wnt-3 $\alpha$*  的 mRNA 相对表达量均高于对照组;与 NOR 组相比,EXP 组的 VPA 可以增加细胞中 *Wnt-3 $\alpha$*  的 mRNA 相对表达量;然而,在加入 FH535 后,与 EXP 组相比,ANT 组中 *Wnt-3 $\alpha$*  的 mRNA 相对表达量下降。由图 6(b)可知:与 CON 组相比,NOR 组和 EXP 组中  $\beta$ catenin 的 mRNA 相对表达量明显提高;与 NOR 组相比,EXP 组中  $\beta$ catenin 的 mRNA 表达提高更显著;加入 FH535 拮抗剂后,ANT 组中  $\beta$ catenin 的 mRNA 表达下降,但是表达水平仍然高于 CON 组。

此外,实验还探究了丙戊酸对分化细胞中细胞周期蛋白 cyclin D1 表达的影响,结果如图 6(c)所示。由图 6(c)可知:与 CON 组相比,NSCs 分化后的细胞中 *cyclin D1* 的 mRNA 相对表达量显著提升( $P < 0.001$ ),EXP 组中 *cyclin D1* 的 mRNA 相对表达量显著高于 NOR 组( $P < 0.001$ );加入 FH535 拮抗剂

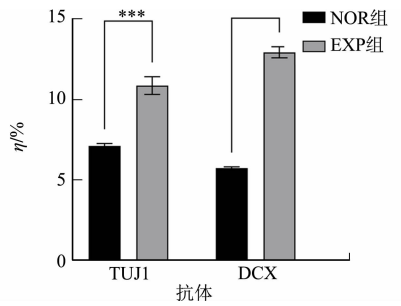


图 4 诱导培养后的细胞 TUJ1 和 DCX 抗体染色的阳性率

Fig. 4 Positive rates of TUJ1 and DCX antibody staining in cells after induction culture

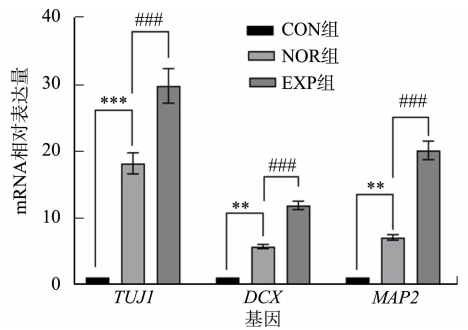


图 5 神经元标志物基因 mRNA 相对表达量  
Fig. 5 Relative mRNA expression of neuronal marker genes

后,ANT 组中 *cyclin D1* 的 mRNA 相对表达量下降( $P<0.001$ ),表达水平低于 EXP 组,但高于 CON 组。由图 6(d)可知:与 CON 组相比,NOR 组和 EXP 组中 *p21* 的 mRNA 相对表达量均显著下降,且与 NOR 组相比,EXP 组中 *p21* 的 mRNA 相对表达量更低,加入 FH535 拮抗剂后,ANT 组 *p21* 的 mRNA 相对表达量提高,但仍低于 CON 组。

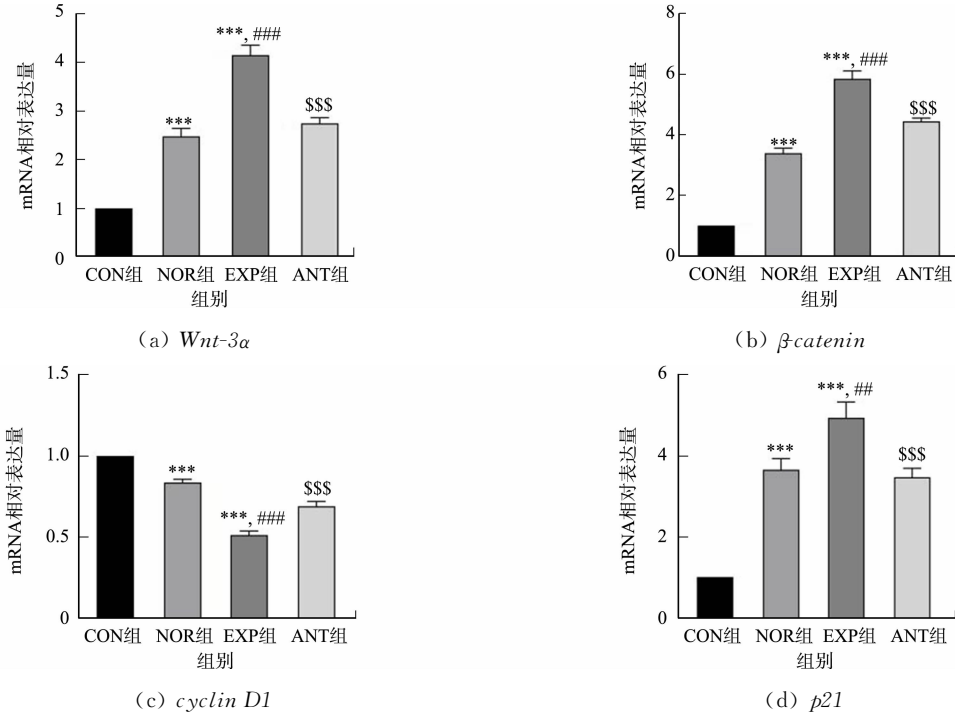


图 6 分化前、后 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路关键分子的 mRNA 相对表达量

Fig. 6 Relative mRNA expression of key molecules of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway before and after differentiation

4 结论

神经干细胞存在于胚胎发育期间和成人中枢神经系统 (CNS) 的某些区域<sup>[14]</sup>,它们能够自我更新,同时保留对神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞 3 个主要中枢神经系统谱系的分化潜力<sup>[15]</sup>。动物成人 NSCs 促进损伤或患病中枢神经系统的修复是一种很有前途的方法。从小鼠脑部分离神经干细胞,使用补充有生长因子的培养基分离和扩增 NSCs,流式细胞术结果显示,分离后传代培养的神经干细胞细胞表面标记物 Nestin,Pax6 表达显著,可得到高纯度的神经干细胞,再将神经干细胞通过分化培养基处理,诱导其向着神经元方向分化,模拟体内 NSCs 的分化进程。研究表明,无论是正常组还是实验组,NSCs 分化后细胞中 *TUJ1*,*DCX*,*MAP2* 的 mRNA 相对表达量均显著升高,且分化后细胞经免疫荧光染色呈现出显著神经元形态。

Wnt/ $\beta$ -catenin 通路调节多种发育过程,如细胞增殖、细胞分化和细胞迁移等<sup>[16]</sup>。在经典信号通路中,在 Wnt 配体存在的情况下,细胞表面的 Wnt 配体和受体结合后会诱散发散乱,导致复合物 (AXIN, GSK3 $\beta$ ,CK1,APC)向受体聚集<sup>[16]</sup>。随后,GSK3 $\beta$  的磷酸化和抑制确保了细胞膜  $\beta$ -catenin 浓度的升高。细胞质中未磷酸化的  $\beta$ -catenin 迁移到细胞核并聚集,与 T 细胞特异性因子(TCF)或淋巴细胞增强子结合因子(LEF)及共激活因子(如 Pygopus 和 Bcl-9)相互作用,触发 Wnt 靶基因(如 *c-Myc*,*CDKN1A* 和 *cyclin D1*)表达,导致 TCF/LEF 靶基因上调。具有高度多向性及多功能的超转录因子(TF) *c-Myc* 通过靶向多达 15% 的基因来控制多种细胞功能,对细胞增殖、分化、凋亡和新陈代谢具有广泛影响<sup>[17]</sup>。不同的细胞因子和激素可促进 *c-Myc* 蛋白水平的稳定,进而激活依赖于 *c-Myc* 的靶基因的核转录活化,例如,参与细胞周期调控的基因包括细胞周期蛋白 D1,D2,B1,细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4)和 CDK 抑制剂 p21,p27<sup>[17]</sup>。除此之外,显性活性形式的  $\beta$ -catenin 的表达促进径向胶质细胞

(RG)自我更新和抑制中间祖细胞(IP)产生<sup>[18]</sup>。IP 在中期神经发生期间产生大量的神经元,并且在晚期神经发生期间可能作为唯一的神经元生成祖细胞库<sup>[19]</sup>,所以 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路在调节 IP 行为中也起着必要的作用。Woodhead 等<sup>[20]</sup>指出, $\beta$ -catenin 的局灶性消融促进 RG 细胞周期退出和神经元分化。Kuwahara 等<sup>[21]</sup>研究表明,Wnt/ $\beta$ -catenin 通路通过 N-myc 和神经源性转录因子 Ngn1/2 促进神经元分化。总之,Wnt/ $\beta$ -catenin 通路在神经细胞分化中发挥重要作用,通过对比发现,正常组与添加 VPA 组都会导致神经元分化,分化结束伴随着神经元细胞数量的增加及 Wnt-3 $\alpha$  和  $\beta$ -catenin 的表达量上升,但是与 CON 组相比,添加 VPA 组中分化产生的神经元数更多,Wnt-3 $\alpha$  和  $\beta$ -catenin 表达量也更高,然而,再加入拮抗剂后,这种作用明显减弱,Wnt-3 $\alpha$  和  $\beta$ -catenin 的表达量明显降低,因此认为 VPA 介导的神经元分化是由于激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路导致的。

细胞周期调节剂细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)主要存在于多个 4 级复合物中,每个复合物都含有 CDK、细胞周期蛋白(cyclin)、增殖细胞核抗原和 p21 蛋白。通过 p21 的分子克隆和第 4 级细胞周期激酶复合物的体外重建研究表明,p21 的过表达可以抑制 cyclin 或 CDK 家族成员的活性,进而抑制细胞的增殖,p21 是细胞周期蛋白激酶的通用抑制剂<sup>[22]</sup>。在实验中,除了 Wnt-3 $\alpha$  和  $\beta$ -catenin 外,还伴随着 cyclin D1 和 p21 mRNA 相对表达量的变化,与对照组相比,分化后的细胞中 cyclin D1 的 mRNA 相对表达量上升;与正常组相比,添加 VPA 组 NSCs 分化后的细胞中 cyclin D1 的 mRNA 表达更为显著,但是 p21 的 mRNA 相对表达量下降;然而在加入拮抗剂后,呈现出相反的趋势。VPA 介导的神经元的分化可以通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路转录调控靶基因 c-Myc 和 cyclin D1,一方面,c-Myc 可以通过下调 p21 蛋白解除其过表达对细胞周期蛋白激酶的抑制作用,促进细胞分裂增殖;另一方面,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路也可以直接增强靶基因 cyclin D1 的 mRNA 相对表达量,最终促进 NSCs 细胞增殖和分化为神经元。

综上所述,VPA 介导 NSCs 分化为神经元的可能机制如下:VPA 先通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,促进 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中关键分子  $\beta$ -catenin, Wnt-3 $\alpha$  的 mRNA 表达水平,再通过调控 Wnt 靶基因 c-Myc 等,抑制 p21 蛋白的表达,促进细胞周期蛋白 cyclin D1 的表达,进而诱导 NSCs 的增殖分化。研究发现,经过 VPA 处理的培养基更容易诱导 NSCs 分化成神经元,实验探究了其可能的影响机制,为进一步探究 VPA 诱导后的神经元功能提供了可能,促进了神经元在再生医学到药物筛选等应用中的进一步研究。

## 参考文献:

- [1] LADRAN I, TRAN N, TOPOL A, *et al.* Neural stem and progenitor cells in health and disease[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews-Systems Biology and Medicine, 2013, 5(6): 701-715. DOI: 10. 1002/ wsbm. 1239.
- [2] FERRARI D, BINDA E, De FILIPPIS L, *et al.* Isolation of neural stem cells from neural tissues using the neurosphere technique[J]. Current Protocols in Stem Cell Biology, 2010(15): 2D. 6. 1-2D. 6. 18. DOI: 10. 1002/ 9780470151808. sc02d06s15.
- [3] NIE Luwei, YAO Dabao, CHEN Shiling, *et al.* Directional induction of neural stem cells, a new therapy for neurodegenerative diseases and ischemic stroke[J]. Cell Death Discovery, 2023, 9(1): 215. DOI: 10. 1038/ s41420-023-01532-9.
- [4] MARQUES B L, MACIEL G F, BRITO M J, *et al.* Regulatory mechanisms of stem cell differentiation: Biotechnological applications for neurogenesis[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2023, 144: 11-19. DOI: 10. 1016/ j. semcdb. 2022. 09. 014.
- [5] CORSON T W, WOO K K, LI P P, *et al.* Cell-type specific regulation of calreticulin and Bcl-2 expression by mood stabilizer drugs[J]. European Neuropsychopharmacology, 2004, 14(2): 143-150. DOI: 10. 1016/ S0924-977X(03) 00102-0.
- [6] YUAN Peixiong, HUANG Lidong, JIANG Yiming, *et al.* The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(34): 31674-31683. DOI: 10. 1074/ jbc. M104309200.
- [7] HSIEH J, NAKASHIMA K, KUWABARA T, *et al.* Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation

- of multipotent adult neural progenitor cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(47):16659-16664. DOI:10.1073/pnas.0407643101.
- [8] 王莉,伍亚民,刘媛,等.丙戊酸影响神经干细胞体外分化的量效和时效关系[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(12): 2263-2265. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2011.12.021.
- [9] ZHUANG Kai, HUANG Changquan, LENG Lige, *et al.* Neuron-specific menin deletion leads to synaptic dysfunction and cognitive impairment by modulating p35 expression[J]. *Cell Reports*, 2018, 24(3):701-712. DOI:10.1016/j.celrep.2018.06.055.
- [10] ZHANG Juan, JIAO Jianwei. Molecular biomarkers for embryonic and adult neural stem cell and neurogenesis[J]. *Biomed Research International*, 2015, 2015:727542. DOI:10.1155/2015/727542.
- [11] PARK D, XIANG A P, MAO F F, *et al.* Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells[J]. *Stem Cells*, 2010, 28(12):2162-2171. DOI:10.1002/stem.541.
- [12] NINKOVIC J, PINTO L, PETRICCA S, *et al.* The transcription factor Pax6 regulates survival of dopaminergic olfactory bulb neurons *via* crystallin  $\alpha$ A[J]. *Neuron*, 2010, 68(4):682-694. DOI:10.1016/j.neuron.2010.09.030.
- [13] YAN Yasheng, ARZUA T, LOGAN S, *et al.* Isolation and culture of human-induced pluripotent stem cell-derived cerebral organoid cells[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2454:483-494. DOI:10.1007/7651\_2020\_328.
- [14] GORDON J, AMINI S. General overview of neuronal cell culture[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2311:1-8. DOI:10.1007/978-1-0716-1437-2\_1.
- [15] LIU D D, HE J Q, SINHA R, *et al.* Purification and characterization of human neural stem and progenitor cells[J]. *Cell*, 2023, 186(6):1179-1194. DOI:10.1016/j.cell.2023.02.017.
- [16] STEINHART Z, ANGERS S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis[J]. *Development*, 2018, 145(11):dev146589. DOI:10.1242/dev.146589.
- [17] DANG C V. MYC on the path to cancer[J]. *Cell*, 2012, 149(1):22-35. DOI:10.1016/j.cell.2012.03.003.
- [18] WROBEL C N, MUTCH C A, SWAMINATHAN S, *et al.* Persistent expression of stabilized  $\beta$ -catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors[J]. *Developmental Biology*, 2007, 309(2):285-297. DOI:10.1016/j.ydbio.2007.07.013.
- [19] NOCTOR S C, MARTÍNEZ-CERDEÑO, KRIEGSTEIN A R. Contribution of intermediate progenitor cells to cortical histogenesis[J]. *Arch Neurol*, 2007, 64(5):639-642. DOI:10.1001/archneur.64.5.639.
- [20] WOODHEAD G J, MUTCH C A, OLSON E C, *et al.* Cell-autonomous  $\beta$ -catenin signaling regulates cortical precursor proliferation[J]. *Journal of Neuroscience*, 2006, 26(48):12620-12630. DOI:10.1523/JNEUROSCI.3180-06.2006.
- [21] KUWAHARA A, HIRABAYASHI Y, KNOEPFLER P S, *et al.* Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex[J]. *Development*, 2010, 137(7):1035-1044. DOI:10.1242/dev.046417.
- [22] MOUSSA R S, PARK K C, KOVACEVIC Z, *et al.* Ironing out the role of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 in cancer: Novel iron chelating agents to target p21 expression and activity[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 133:276-294. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.027.

(责任编辑:黄晓楠 英文审校:刘源岗)