

• 药理与临床 •

Notch 和 BMP 信号通路介导红景天苷促进小鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞定向分化研究

赵红斌¹, 甄英丽², 田 蓉¹, 张全伟¹, 甄 平¹

1. 兰州军区兰州总医院骨科研究所, 甘肃 兰州 730050

2. 兰州军区机关门诊部, 甘肃 兰州 730000

摘要: 目的 探讨 BMP 和 Notch 信号通路介导红景天苷诱导骨髓间充质干细胞 (MSCs) 向神经细胞定向分化的分子机制。方法 实验分为对照组、红景天苷诱导组和阻断组。利用细胞免疫荧光化学方法、Real-Time PCR 方法和 Western blotting 方法分别研究了红景天苷对 MSCs 的增殖、形态以及对 BMP 和 Notch 信号通路的影响。结果 红景天苷影响 MSCs 的增殖且促进其形成神经元样细胞; 细胞免疫荧光结果显示, 红景天苷可降低 Notch1 和 Jadge1 阳性表达率 ($P < 0.05$); 红景天苷诱导细胞 12~72 h 时, Notch1 和 Hes1 mRNA 表达丰度明显下调 ($P < 0.05$); 特异性阻断剂 DAPT 阻断 Notch 信号通路后, 神经元细胞标志分子 NSE、MAP-2 和 β -tubulin III mRNA 和 NSE、 β -tubulin III 蛋白的表达水平与阻断前比较显著上调 ($P < 0.05$)。12 h 时 Smad5 和 Smad8 mRNA 的表达水平显著上调 ($P < 0.01$), 且 12 和 24 h 时 Smad1/5/8 蛋白表达上调 ($P < 0.05$); Noggin 阻断 BMP 信号通路后, NSE、MAP-2 和 β -tubulin III mRNA 的表达丰度与诱导组比较明显下调 ($P < 0.05$); DAPT 和 Noggin 同时阻断 Notch 和 BMP 信号通路后, 与单独阻断 BMP 信号通路后比较, MAP-2 和 β -tubulin III mRNA 的表达上调, NSE 和 β -tubulin III 蛋白的表达水平上调 ($P < 0.05$)。结论 红景天苷通过抑制 Notch 信号通路、激活 BMP 信号通路诱导 MSCs 向神经细胞定向分化。

关键词: 红景天苷; 骨髓间充质干细胞; BMP 信号通路; Notch 信号通路; 神经细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2016)13 - 2294 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.13.015

Directional differentiation of mouse mesenchymal stem cells into neuronal cells induced by salidroside via Notch and BMP signal pathway

ZHAO Hong-bin¹, ZHEN Ying-li², TIAN Rong¹, ZHANG Quan-wei¹, ZHEN Ping¹

1. Institute of Orthopaedics, General Hospital of Lanzhou Military Command of the PLA, Lanzhou 730050, China

2. Outpatient Department of Lanzhou Military Command of the PLA, Lanzhou 730000, China

Abstract: Objective To study the molecule mechanism of salidroside inducing mesenchymal stem cells (MSCs) to directionally differentiate into neuronal cells via bone morphogenetic protein (BMP) and Notch signal pathways. **Methods** Experiments were divided into control, induced, and blocked groups. The technologies, such as immunofluorescence, real-time PCR, and Western blotting were used to analyze the effect of salidroside on cellular proliferation, morphosis, and BMP and Notch signal pathways. **Results** The immunofluorescence results showed that salidroside could affect cellular proliferation and induce MSCs to form the morphosis of neuronal cells. The positive rate of Notch1 and Jadge1 was significantly decrease to compare with the control ($P < 0.05$), real-time PCR results indicated that mRNA expression of Notch1 and Hes1 was obviously down-upregulated when treated with salidroside for 12—72 h ($P < 0.05$). However, Notch signal pathway was blocked with DAPT, a special inhibitor of Notch, the marker molecules of neuronal cells expression, such as neuron-specific enolase (NSE), microtubule associated protein 2 (MAP2), and β -tubulin III, were significantly increased when cells were treated with salisroside ($P < 0.05$). The mRNA levels of Smad5 and Smad8 were up-regulated when cells were

收稿日期: 2015-09-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目资助 (81073156)

作者简介: 赵红斌 (1967—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事干细胞定向分化基础及应用研究。

Tel: (0931)8994602 E-mail: zhao761032@163.com

treated with salidroside for 12 h, expression of Smad1/5/8 protein was increased at 12 and 24 h. When BMP signal pathway was blocked with Noggin, a special inhibitor of BMP, NSE, MAP2, and β -tubulin III mRNA expression was decreased to compare with the salidroside induced group ($P < 0.05$); When Notch and BMP signal pathways were simultaneously blocked with DAPT and Noggin, MAP2 and β -tubulin III mRNA expression was increased more obviously than that of the blocked with Noggin. Meanwhile the expression of NSE and β -tubulin III protein was also up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Salidroside promotes neuron-like differentiation of MSCs by negatively regulating the Notch pathway and activating BMP signal pathway, it plays a vital role for salidroside to inhibit Notch pathway on affecting MSCs differentiation.

Key words: salidroside; mesenchymal stem cells; BMP signal pathway; Notch signal pathways; neuronal cells

红景天苷 (salidroside) 是红景天属 *Rhodiola* L. 植物红景天 *Rhodiola Crenulatae Radix et Rhizoma* 的主要有效成分, 是一种强抗氧化剂, 红景天具有显著的抗缺氧功能, 对神经细胞具有明显的保护作用^[1-4]。前期研究表明, 红景天苷能诱导骨髓间充质干细胞 (marrow mesenchymal stem cells, MSCs) 向神经元细胞定向分化^[5-6], 但是其诱导分化作用的机制尚不清楚。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 和 Notch 信号通路在干细胞向神经元细胞定向分化过程中发挥重要作用。本实验从 BMP 和 Notch 信号通路角度探讨红景天苷诱导 MSCs 向神经元细胞定向分化的分子机制, 以期揭示红景天苷诱导 MSCs 向神经细胞定向分化的效应关系, 为进一步利用中药有效成分结合干细胞治疗神经损伤的修复和再生提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

小鼠骨髓间充质干细胞 D1 细胞株, 美国 ATCC 公司, 序列号 CRL-10915。

1.2 药品与试剂

红景天苷对照品 (质量分数 99.8%, 批号 N9HD-C53R), 中国食品药品检定研究院。D/F12 培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); Trizol 试剂 (Invitrogen 公司); 兔抗小鼠 β -tubulin、NSE、MAP2、 β -tubulin III、Smad1/5/8 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI, 美国 Sigma 公司)、 γ -分泌酶抑制剂 (Noggin, 美国 Sigma 公司)、DAPT (美国 Sigma 公司)。

1.3 仪器

电泳槽、电转仪和酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), 荧光定量 PCR 7300 system (Applied Biosystems 公司), BX51 荧光显微镜 (Olympus)。

2 方法

2.1 D1 细胞培养、分组及药物处理

D1 细胞加入含 10% 胎牛血清的 D/F12 完全培

养液, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每周更换 2 次培养液, 待细胞 80% 融合后, 2.5 g/L 胰酶消化传代培养。D1 细胞按照 1×10^5 个/cm² 接种于 96 孔培养板中, 实验分为对照组、诱导组、阻断组, 其中对照组为 D/F12 完全培养液; 诱导组 D/F12 完全培养液含 100 mg/L 红景天苷^[7]; 阻断组 D/F12 完全培养液含 10 μ mol/L DAPT 或 10 μ mol/L Noggin。阻断组分别或同时加入 DAPT 和 Noggin 作用细胞 30 min 后, 加入 100 mg/L 红景天苷。

2.2 MTT 法检测细胞增殖

D1 细胞以密度 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。实验分为对照组和诱导组, 药物处理同“2.1”项, 药物分别处理 12、24、48、72 h 后吸弃培养基, 加入 MTT (5 mg/L) 20 μ L 继续孵育 4 h, 吸弃上清, 加入 150 μ L DMSO 溶解紫色结晶。每组设 6 个复孔, 平行设不加细胞只加培养液的空白孔, 比色时以空白孔调零, 细胞增殖情况以 492 nm 处吸光度 (*A*) 值表示。

2.3 细胞形态观察

细胞以密度 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔培养板中, 实验分为 5 组, 对照组 (D/F12 完全培养液), 12、24、48、72 h 诱导组 (100 mg/L 红景天苷)^[8]。利用细胞荧光免疫组织化学方法观察细胞形态, 具体方法如下: 0.1% Triton X-100 室温作用 10 min; 3% 的 H₂O₂ 室温作用 20 min; 羊血清封闭作用 30 min 后, 加羊抗兔 β -tubulin 单克隆抗体 (1:1000), 湿盒中 4 °C 孵育过夜; 0.01 mol/L PBS 洗 3 次后加异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗兔多克隆抗体 37 °C 孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次; 滴加终质量浓度为 5 mg/L 的 DAPI, 室温避光染色 10 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 磷酸甘油缓冲液封片, 荧光显微镜观察并拍照。每组抽取 3 张爬片, 随机选择 5 个视野, 按照细胞树突 3 个以上且长度大于 5 μ m 以上为神经样细胞计数, 神经样细胞百分率 = 神经样细胞数/总细胞数。

2.4 对 MSCs 细胞 Notch1 和 Jadge1 表达的影响

D1 细胞以密度 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔培养板中, 实验分为 5 组, 对照组 (D/F12 完全培养液) 和 12、24、48、72 h 诱导组 (100 mg/L 红景天苷)。利用细胞荧光免疫组织化学方法检测 Notch1 和 Jadge1 的表达, 具体方法如下: 0.1% Triton X-100 室温作用 10 min; 3% 的 H_2O_2 室温作用 20 min; 羊血清封闭作用 30 min 后, 加羊抗兔 Notch1 和 Jadge1 单克隆抗体 (1:1 000), 湿盒中 4 °C 孵育过夜; 0.01 mol/L PBS 洗 3 次后加 FITC 标记的羊抗兔多克隆抗体 37 °C 孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次; 滴加终质量浓度为 5 mg/L 的 DAPI, 室温避光染色 10 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 磷酸甘油缓冲液封片, 荧光显微镜观察并拍照。取 3 张爬片, 高倍镜随机选择 5 个视野并计细胞总数和阳性细胞数, 计算细胞阳性率 (阳性率 = 阳性细胞数/细胞总数)。

2.5 对 Notch 和 BMP 信号通路的影响

D1 细胞以密度 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔培养板中, 实验分为 3 组, 对照组、诱导组和阻断组, 细胞处理方法同“2.1”项。37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 12~72 h, 提取 RNA 进行 Real Time-PCR 检测; 其中对照组为 D/F12 完全培养液; 诱导组 D/F12 完全培养液含 100 mg/L 红景天苷; 阻断组 D/F12 完全培养液含 10 μ mol/L DAPT 或 10 μ mol/L Noggin。阻断组分别或同时加入 DAPT 和 Noggin 作用细胞 30 min 后, 加入 100 mg/L 红景天苷作用细胞 24 h, 待 80% 的细胞融合后, 分别提取 RNA 和蛋白质进行相关实验。

2.5.1 Real Time-PCR 检测 按照 Trizol 试剂使用说明提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 纯度和浓度, 取 500 ng 总 RNA, PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒合成 cDNA, 反应体系 10 μ L, 反应条件: 37 °C、15 min; 85 °C、5 s; 采用荧光定量 PCR-7300 两步法扩增, 反应体系 20 μ L, PCR 反应条件: 95 °C、10 s 预变性; 95 °C、5 s; 60 °C、31 s 退火。相关引物序列见表 1。分别检测上述基因 mRNA 的表达水平; 基因的相对表达采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算^[9]。

2.5.2 Western blotting 检测 细胞蛋白提取方法如下: 细胞用冷 (4 °C) 0.01 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 2 min, 加入细胞裂解液 500 μ L 于冰上裂解 30 min, 反复吹打使其充分裂解后, 移入 1.5 mL 离心管, 12 000 r/min, 4 °C 离心 15 min, 收集上清, 利用二辛可酸法 (BCA) 测定蛋白浓度。每组取 20 μ g 蛋白, 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 运用电转移法将蛋白质转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,

表 1 Real time-PCR 反应引物序列

基因	引物序列 (5'→3')
NSE	F: TCTGAACGTCTGGCGAAGTACAA R: CAGAGTGA CTATGGCAGGTCAGG
MAP-2	F: CAGTTTGGCTGAAGGTAGCTGAA R: CACATCTGTGTGAGTGTGTGTGTGGA
β -tubulin III	F: GCGCCTTTGGACACCTATCA R: TTCCGCACGACATCTAGGACTG
Notch1	F: AGAAACACGCCAGACCTTGA R: CAAGTCCACACTGGTGTGTTACAGAA
Hes1	F: AAAGACGGCCTCTGAGCAC R: GGTGCTTCACAGTCATTTCCA
Smad1	F: TGCTGAGGATTGACTCGCTGTG R: GGAATGCTGTGAGTTCCCATTTG
Smad5	F: TTGACAATCCCAGGCAGAAA R: AGACCATGCCAGCATATCCA
Smad8	F: GAGAACATTGGATGGACGACTTCA R: GGACTCAAGTCCGAGGTCAA
GAPDH	F: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA R: TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

加兔抗小鼠单克隆抗体 NSE、MAP-2、 β -tubulin III、Smad1/5/8 (1:1 000) 一抗, 4 °C 孵育过夜, 洗膜后分别加 HRP 标记的羊抗小鼠多克隆抗体 (1:5 000), 室温孵育 2 h, 化学发光法 (ECL) 显影。应用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析各特异性条带积分 A 值。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件, 单因素方差分析进行数据统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验重复 3 次。

3 结果

3.1 对 MSCs 增殖和形态的影响

MTT 法以红景天苷分别诱导 D1 细胞 12、24、48、72 h 后测定 A 值, 红景天苷作用 24 h 时细胞的增殖明显高于 12 h, 与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$); 红景天苷作用 48 h 和 72 h 时细胞增殖与对照组比较显著降低 ($P < 0.05$), 结果见图 1。细胞免疫

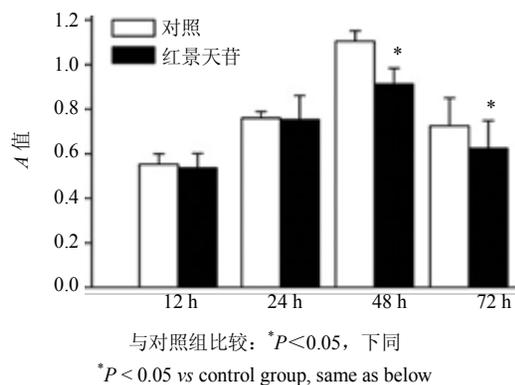


图 1 红景天苷对 MSCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effect of salidroside on proliferation of MSCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

荧光化学染色结果表明, 对照组细胞形态多呈多角形或菱形结构, 红景天苷诱导 24 h 时, 43.2% 的细胞胞体增大, 有长短不等的多极树突形成; 诱导 72 h 时, 68.4% 的细胞胞体明显增大, 多极树突数量显著增加, 结果见图 2。

3.2 通过抑制 Notch 信号通路促进 MSCs 向神经元细胞定向分化

荧光免疫细胞化学染色检测显示, Notch1 主要定位于细胞胞浆, 呈绿色, DAPI 标记细胞核呈蓝色。对

照组 Notch1 的阳性表达率为 72.3%, 红景天苷分别诱导 D1 细胞 12、24、48、72 h 后, Notch1 阳性表达率分别为 25.4%、38.6%、40.2%、42.1%, 与对照组比较, 红景天苷组 Notch1 的阳性表达率明显降低 ($P < 0.05$), 结果见图 3 和 4。对照组 Jadge1 的阳性表达率为 69.8%, 红景天苷分别诱导 D1 细胞 12、24、48、72 h 后, Jadge1 阳性表达率分别为 40.1%、43.3%、42.7%、40.6%, 与对照组比较, 红景天苷组 Jadge1 的阳性表达率明显降低 ($P < 0.05$), 结果见图 3 和 4。

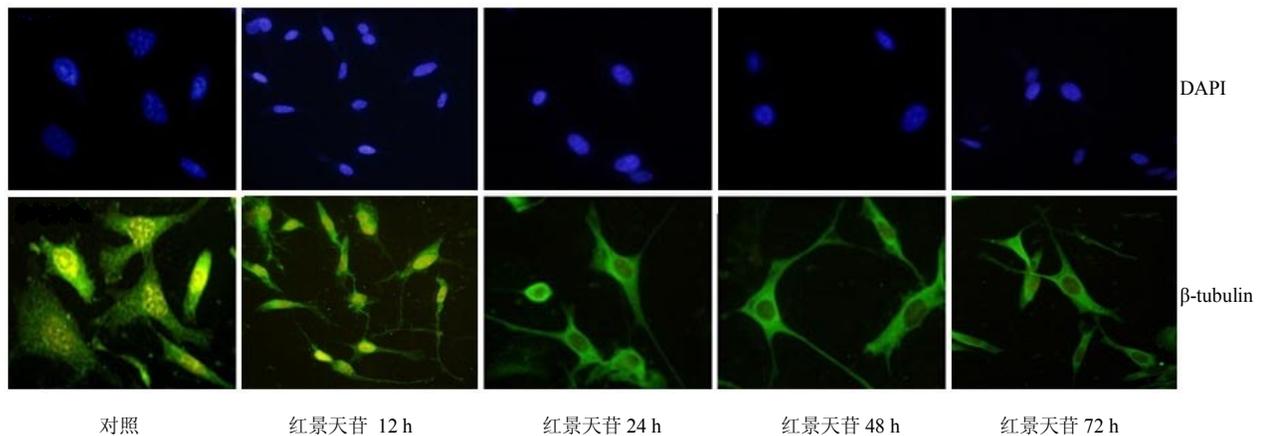


图 2 红景天苷对 MSCs 形态的影响 (免疫荧光化学)
Fig. 2 Effect of salidroside on morphology of MSCs (IF)

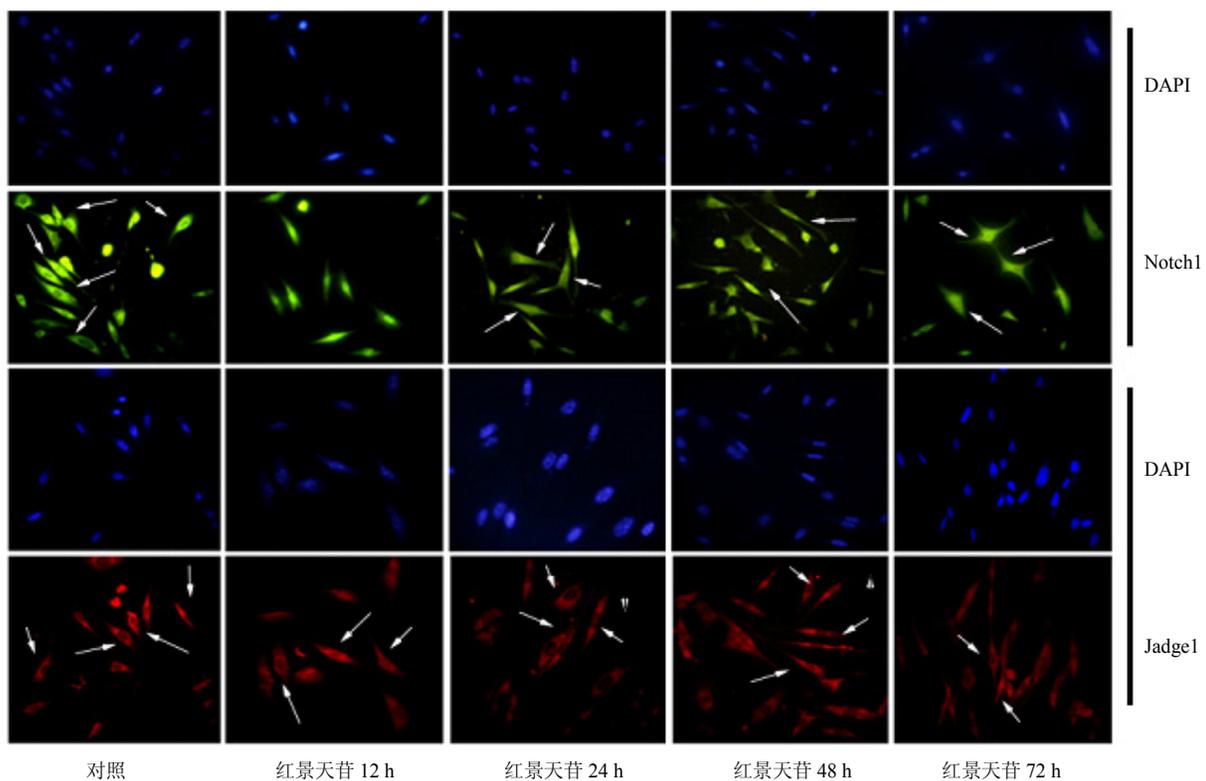


图 3 红景天苷对 MSCs 中 Notch1 和 Jadge1 蛋白表达的影响 (免疫荧光化学)
Fig. 3 Effect of salidroside on expression of Notch1 and Jadge1 protein in MSCs (IF)

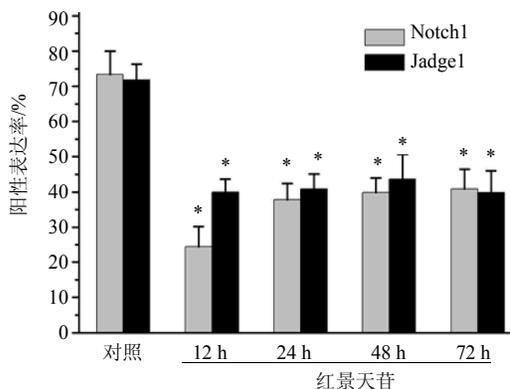
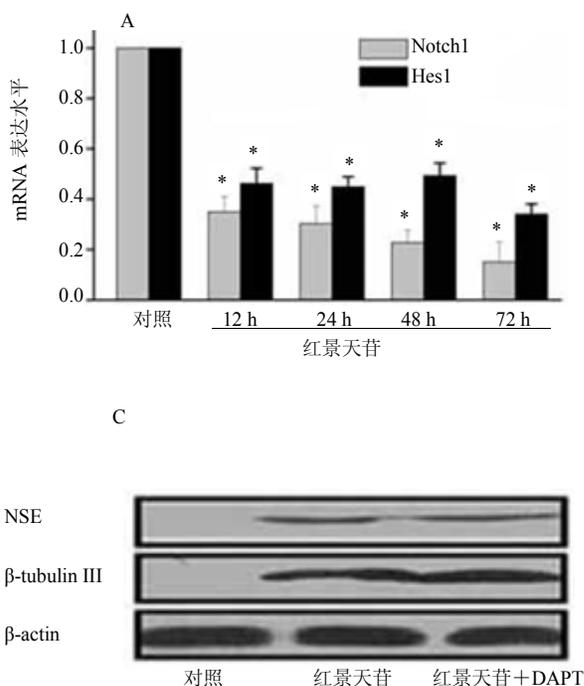


图 4 Notch1 和 Jadge1 的阳性表达率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Positive expression rates percentage of Notch1 and Jadge1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与红景天苷诱导组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs salidoside induced group

图 5 红景天苷对 Notch 信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of salidoside on Notch signal pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胞 12、48、72 h 时 Smad1 mRNA 的表达水平与对照组比较上调 ($P < 0.05$); 12 h 时 Smad5 和 Smad8 mRNA 的表达水平达到峰值, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$), 结果见图 6-A。

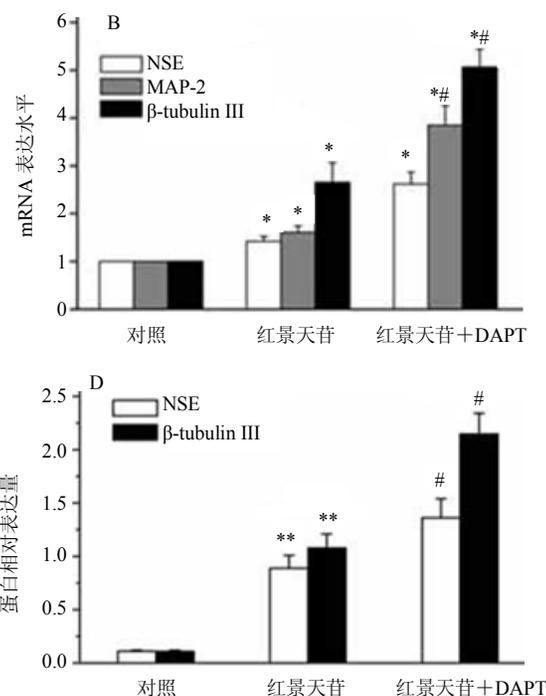
Western blotting 检测显示, 红景天苷诱导 D1 细胞 12~72 h 时, Smad1/5/8 蛋白在 12 h 和 24 h 时的表达水平与对照组比较明显上调 ($P < 0.05$), 与诱导 48 h 和 72 h 时比较也显著上调 ($P < 0.05$), 结果见图 6-B。

Real-Time PCR 结果表明, 红景天苷诱导 D1 细胞 12~72 h 后, Notch1 和 Hes1 mRNA 的表达水平与对照组比较明显下调 ($P < 0.05$), 结果见图 5-A; 利用特异性阻断剂 DAPT 阻断 Notch 信号通路后, NSE、MAP-2 和 β -tubulin III mRNA 的表达水平与阻断前比较显著上调 ($P < 0.05$), 结果见图 5-B。

Western blotting 检测显示, 利用特异性阻断剂 DAPT 阻断 Notch 信号通路后, NSE 和 β -tubulin III 蛋白的表达水平与阻断前比较显著上调 ($P < 0.05$), 结果见图 5-C 和图 5-D。

3.3 通过激活 BMP 信号通路促进 MSCs 向神经元细胞定向分化

Real-Time PCR 结果表明, 红景天苷诱导 D1 细



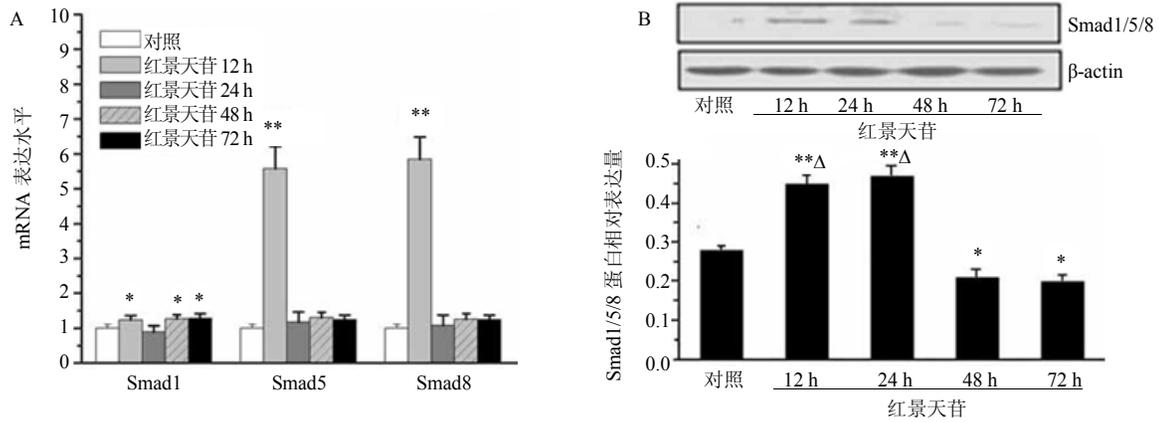
3.4 通过激活 BMP 信号通路抑制 Notch 信号通路促进 MSCs 向神经元细胞定向分化

Real-Time PCR 检测表明, Noggin 阻断 BMP 信号通路后 NSE、MAP-2 和 β -tubulin III mRNA 的表达水平与红景天苷诱导组比较显著下调 ($P < 0.05$ 、0.01); 同时阻断 BMP 和 Notch 信号通路后, NSE 和 β -tubulin III mRNA 的表达水平与红景天苷诱导组比较显著下调 ($P < 0.05$ 、0.01), 相反 MAP-2 mRNA 则上调; 与单独阻断 BMP 信号通路组比较 MAP-2

和 β -tubulin III mRNA 的表达水平显著上调 ($P < 0.05$), 结果见图 7-A。

Western blotting 检测显示, Noggin 阻断 BMP 信号通路后 NSE 和 β -tubulin III 蛋白的表达水平与红景天苷诱导组比较显著下调 ($P < 0.05$); 同时阻

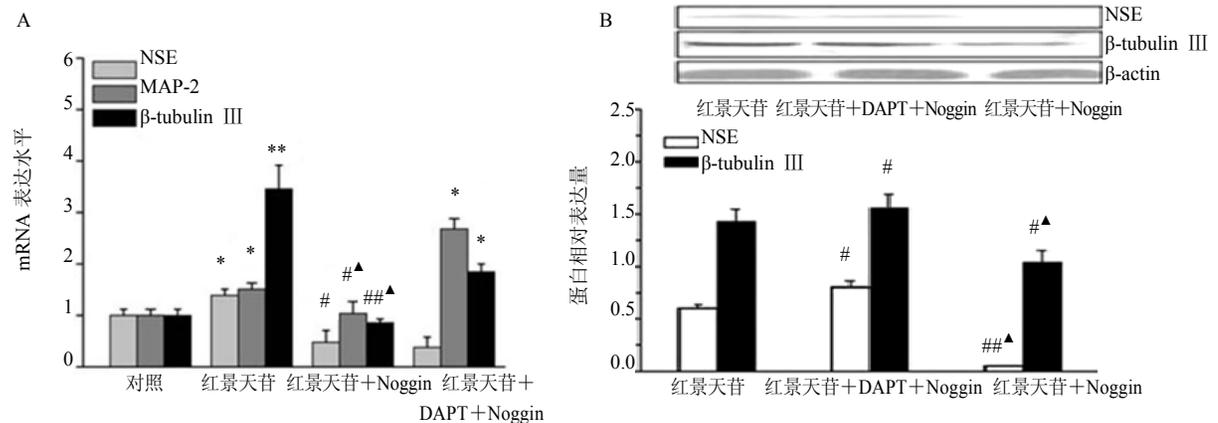
断 BMP 和 Notch 信号通路后, NSE 和 β -tubulin III 蛋白的表达水平与红景天苷诱导组比较显著上调 ($P < 0.01$), 与单独阻断 BMP 信号通路组比较 NSE 和 β -tubulin III 蛋白的表达水平显著上调 ($P < 0.05$), 结果见图 7-B。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与红景天苷 48 或 72 h 比较: $\Delta P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs salidroside induced 48 h or 72 h group

图 6 红景天苷对 D1 细胞 Smad1/5/8 mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of salidroside on Smad1/5/8 mRNA and protein expression in D1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与红景天苷诱导组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$; 与红景天苷+DAPT+Noggin 组比较: $\Delta P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs salidroside-induced group; $\Delta P < 0.05$ vs salidroside + DAPT + Noggin group

图 7 阻断 Notch 和 BMP 信号通路后红景天苷对 NSE、MAP-2、 β -tubulin III mRNA 和 NSE、 β -tubulin III 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of salidroside on expression of NSE, MAP2, β -tubulin III mRNA and NSE, β -tubulin III protein when blocking Notch signal and BMP pathways ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

红景天苷有抑制细胞 Ca^{2+} 超载、抗凋亡、抗自由基、营养神经细胞、促进神经干细胞向神经元方向分化的能力^[10], Notch 信号通路普遍存在于各种动物机体中, 对组织和器官的发生、特别是新陈代谢自我更新以及细胞分化等多种生命过程起重要的作用^[11]。Notch 信号通路调控干细胞的自我更新和多种分化潜

能。Notch 信号通路是一个没有胞内第二信使的简单的信号转导过程, γ -分泌酶作用于 Notch 信号通路, 通过信号级联机制传递到细胞内侧启动下游基因的转录^[12-13], 抑制 Notch 信号通路则促进 MSCs 向神经元轴突的方向延伸, 激活 Notch 信号通路则促进细胞的增殖, 并减少细胞的分化^[14]。基于 Notch 信号通路在 MSCs 分化中的作用, 本实验研究了红景天苷诱导

MSCs 向神经元细胞定向分化中对 Notch 信号通路的影响, 结果显示红景天苷能抑制 Notch 信号通路中关键信号分子 Notch1、Jadge1 和 Hes1 的表达; 利用 Notch 信号通路特异性阻断剂 DAPT 阻断该信号通路时, 能明显抑制神经元细胞标志分子 NSE、MAP-2 和 β -tubulin III 的表达, 该结果提示, 红景天苷通过抑制 Notch 信号通路促进 MSCs 向神经元细胞定向分化。

BMP 是一种具有多功能的转化生长因子, 在细胞的生命活动过程中发挥着重要的调节作用。BMP 配体与 BMP 受体特异性识别并结合可能激活下游基因 Smad^[14-15]。本实验结果显示, 红景天苷能明显上调 BMP 信号通路中关键调节蛋白 Smad5 和 Smad8 的表达水平, Smad5 和 Smad8 表达水平的上调主要发生在红景天苷诱导的早期; 利用 BMP 信号通路的特异性阻断剂 Noggin 阻断该信号通路后, 明显抑制了红景天苷促进 MSCs 神经元细胞的标志分子 NSE、MAP-2 和 β -tubulin III 的表达, 该结果提示红景天苷通过激活 BMP 信号通路促进 MSCs 向神经元细胞定向分化。研究还发现同时阻断 Notch 和 BMP 信号通路后, MAP-2 和 β -tubulin III 的表达水平比单独阻断 BMP 信号通路显著上调, 究其原因可能是由于红景天苷诱导 MSCs 向神经元细胞定向分化过程中, 红景天苷主要通过抑制 Notch 信号通路实现其诱导的生物学效应, 同时红景天苷能激活 BMP 信号通路影响 MSCs 向神经元细胞定向分化, 然而阻断 Notch 和 BMP 信号通路后神经元细胞标志分子 NSE、MAP-2 和 β -tubulin III 的表达并没有被完全抑制, 表明红景天苷的诱导效应是通过多途径影响 MSCs 的定向分化。

前期研究结果证实, 红景天苷诱导 MSCs 向神经元细胞定向分化过程中, Wnt/ β -catenin 和 ERK1/2 信号通路也参与此过程^[16-17], 这些研究结果进一步证明了红景天苷的诱导效应与多种信号途径有关。

参考文献

- [1] 冉建华, 孙善全, 汪克建, 等. 红景天苷对大鼠缺血性脑水肿的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1200-1204.
- [2] 张明发, 沈雅琴. 红景天苷抗痴呆药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(6): 675-681.
- [3] Qu Z Q, Zhou Y, Zeng Y S, *et al.* Protective effects of a rhodiola crenulata extract and salidroside on hippocampal neurogenesis against streptozotocin-induced neural injury in the rat [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29641.
- [4] Choe K I, Kwon J H, Park K H, *et al.* The antioxidant and anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the root of *Rhodiola sachalinensis* A. BOR. [J]. *Molecules*, 2012, 17(10): 11484-11494.
- [5] Chen Q G, Zeng Y S, Qu Z Q, *et al.* The effects of *Rhodiola rosea* extract on 5-HT level, cell proliferation and quantity of neurons at cerebral hippocampus of depressive rats [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(9): 830-838.
- [6] 张明, 赵红斌, 荔志云, 等. 红景天苷对大鼠 BMSCs 向胆碱能神经细胞分化的影响 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2012, 26(2): 158-165.
- [7] 陈亚男, 刘辉, 赵红斌, 等. 红景天苷诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞定向分化的机制研究 [J]. 药理学学报, 2013, 48(8): 1247-1252.
- [8] Zhao H B, Ma H, Ha X Q, *et al.* Salidroside induces rat mesenchymal stem cells to differentiate into dopaminergic neurons [J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(4): 462-471.
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] 和梅, 张瑶, 李莹, 等. BDNF 和红景天苷对体外神经干细胞向 GABA 能神经元分化的研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2009, 32(4): 80-82.
- [11] Mead T J, Yutzey K E. Notch pathway regulation of neural crest cell development *in vivo* [J]. *Dev Dyn*, 2012, 241(2): 376-389.
- [12] Wang S, Kan Q, Sun Y, *et al.* Caveolin-1 regulates neural differentiation of rat bone mesenchymal stem cells into neurons by modulating Notch signaling [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2013, 31(1): 30-35.
- [13] Greenberg D A, Jin K. Turning neurogenesis up a Notch [J]. *Nat Med*, 2006, 12(8): 884-885.
- [14] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, 284(5415): 770-776.
- [15] Sieber C, Kopf J, Hiepen C, *et al.* Recent advances in BMP receptor signaling [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2009, 20(5/6): 343-355.
- [16] Zhang J W, Li L H. BMP signaling and stem cell regulation [J]. *Dev Biol*, 2005, 284(1): 1-11.
- [17] 朱晓娟, 耿排力, 赵红斌, 等. 红景天苷通过 Wnt/ β -catenin 信号通路影响小鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞定向分化 [J]. 激光生物学报, 2012, 21(6): 510-516.