

# 亨廷顿相关蛋白 1 在丙戊酸钠诱导神经干细胞分化过程中的表达和作用

王珊珊 李雯 何辉 秦建兵 田美玲 赵荷艳 成翔 金国华\*

(南通大学医学院人体解剖学系, 江苏省神经再生重点实验室, 神经再生协同创新中心, 江苏 南通 226001)

**[摘要]** **目的** 探讨丙戊酸钠(VPA)诱导神经干细胞(NSCs)向神经元分化过程中亨廷顿相关蛋白 1 (HAP-1)的表达及其作用。**方法** 分离培养 SD 大鼠海马 NSCs,应用 Real-time PCR 和 Western blotting 检测 VPA 诱导 NSCs 向神经元分化过程中 0、1、3 和 5d 时 HAP-1 mRNA 和蛋白的表达变化; Real-time PCR 检测成年 SD 大鼠多组织及 NSCs、神经元和星形胶质细胞中 HAP-1 mRNA 的表达;应用小干扰 RNA 技术下调 NSCs 中 HAP-1 的表达后, Real-time PCR 和 Western blotting 分别检测神经元特异分子微管解聚蛋白 2(Stmn-2)、神经元分化因子 1(Neurod-1)、微管相关蛋白 2(Map-2)和突触蛋白 1(Syn-1)基因和神经元特异性标志物  $\beta$ -微管蛋白 III(Tuj-1)的表达水平,应用免疫荧光检测 NSCs 向 Tuj-1 阳性神经元分化的比例,并观察神经元发育情况。**结果** 与对照组相比,VPA 组 NSCs 向神经元分化过程中 HAP-1 mRNA 和蛋白在 VPA 处理后 1 d 和 3 d 表达明显上调;HAP-1 mRNA 在中枢神经系统的海马中呈优势表达,在神经元中表达较高,NSCs 中表达较低,星形胶质细胞中表达最低;干扰 HAP-1 表达后,VPA 诱导 NSCs 向神经元分化的比例减少,神经元发育变差。**结论** VPA 可能通过上调 HAP-1 的表达促进 NSCs 向神经元分化。

**[关键词]** 亨廷顿相关蛋白 1;丙戊酸钠;神经干细胞;神经元;分化;实时定量聚合酶链反应;大鼠

**[中图分类号]** R332.8 **[文献标志码]** A **[DOI]** 10.16098/j.issn.0529-1356.2021.02.004

## Expression and role of Huntingtin-associated protein 1 during valproate induced neural stem cells differentiation

WANG Shan-shan, LI Wen, HE Hui, QIN Jian-bing, TIAN Mei-ling, ZHAO He-yan, CHENG Xiang, JIN Guo-hua\*

(Department of Human Anatomy, Jiangsu Key Laboratory of Nerve Regeneration, Collaborative Innovation Center for Nerve Regeneration, Medical College of Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression and role of Huntingtin-associated protein-1 (HAP-1) in the process of valproate acid (VPA) inducing neural stem cells (NSCs) into neurons. **Methods** The hippocampus NSCs of SD rats were isolated and cultured, Real-time PCR and Western blotting were used to detect HAP-1 mRNA and protein expression at day 0, day 1, day 3 and day 5 during the induction of VPA on NSCs differentiation into neurons; Real-time PCR was used to detect the expression level of HAP-1 mRNA in multiple tissues of adult SD rats, as well as NSCs, neurons and astrocytes. After applying small interfering RNA technology to down-regulate the expression of HAP-1 mRNA in NSCs, Real-time PCR was used to detect the mRNA expression levels of neuron-specific molecules stathmin-2 (Stmn-2), neuronal differentiation-1 (Neurod-1), microtubule-associated protein-2 (Map-2) and synapsin-1 (Syn-1), and Western blotting was used to detect the protein expression levels of neuron-specific marker  $\beta$ -tubulin III (Tuj-1). Immunofluorescence was used to detect the proportion of NSCs differentiated into Tuj-1 positive neurons, and to observe the development of neurons. **Results** At day 1 and day 3 after VPA treatment, the expression of HAP-1 mRNA and protein in the VPA group was significantly up-regulated; HAP-1 mRNA was predominantly expressed in the hippocampus, and its expression was higher in neurons, followed by NSCs, and minimally in astrocytes. After down-regulating HAP-1 with small interference technology, the proportion of NSCs differentiated into Tuj-1 positive neurons reduced, and neuron development became worse. **Conclusion** VPA may promote the differentiation of NSCs into neurons by up-regulating HAP-1 expression.

**[Key words]** Huntingtin-associated protein-1; Valproate acid; Neural stem cell; Neuron; Differentiation; Real-time PCR; Rat

**[收稿日期]** 2020-09-08 **[修回日期]** 2020-10-23

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金青年基金(BK20170447)

**[作者简介]** 王珊珊(1994—),女(汉族),江苏省徐州市人,在读硕士研究生。

\* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

E-mail: jguohua@ntu.edu.cn Tel: (0513)85051718

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是神经系统中具有自我更新和多向分化潜能的细胞,可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。在成年哺乳动物的脑中,大多数 NSCs 处于静止状态或者休眠状态,很少分裂,当它们受到环境或病理因素刺激后可进入有丝分裂期,进行增殖并具有多向分化的潜能<sup>[1]</sup>。因此,促进内源性 NSCs 增殖或通过外源性手段补充 NSCs,使之分化成神经元或特异表型的神经元及所需的胶质细胞等,已成为修复中枢神经系统损伤和治疗神经系统退行性疾病的主要策略之一。丙戊酸钠(valproate acid, VPA)是最常用的抗癫痫药物之一,同时也是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,可上调组蛋白乙酰化水平,从而调控基因的表达<sup>[2]</sup>。有研究表明,VPA 具有神经保护和神经营养作用<sup>[3, 4]</sup>,不仅能促进 NSCs 向神经元分化以及促进神经元轴突的生长,还能抑制 NSCs 向星形胶质细胞分化<sup>[5]</sup>。本课题组前期研究也表明,VPA 可促进海马 NSCs 向神经元分化<sup>[6]</sup>,并通过基因芯片检测发现,NSCs 经 VPA 处理后亨廷顿相关蛋白 1 (Huntington-associated protein-1, HAP-1) mRNA 的表达明显上调。本文应用 Real-time PCR、Western blotting、免疫荧光等检测手段,观察 VPA 在诱导 NSCs 分化过程中 HAP-1 的表达变化,并通过基因沉默技术,探讨 HAP-1 在 VPA 诱导 NSCs 向神经元分化过程中的作用,从而为临床应用 NSCs 治疗中枢神经系统疾病提供新思路和新方法。

## 材料和方法

### 1. 实验动物

实验用孕 15 d SD 大鼠和 220~250 g 成年 SD 大鼠(雌雄不拘)均由南通大学实验动物中心提供[动物许可证号:SYXK(苏)2012-0031]。动物实验获南通大学实验动物伦理委员会批准,并按实验动物饲养管理和使用指南进行。实验中尽量减少动物使用数量,并减轻实验动物痛苦。

### 2. 胚胎 NSCs 的分离培养及 VPA 诱导分化

孕 15 d SD 大鼠,腹腔注射复合麻醉剂(chlorpent, 2 ml/kg 体重)。无菌条件下取出胚胎,置于基础培养液(无血清 DMEM)中,分离胚胎海马原基,机械解离成单细胞悬液,离心后弃上清液,用增殖培养液[1:1 DMEM/F12、2% B27、20  $\mu$ g/L 碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、20  $\mu$ g/L 表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)]悬细胞,以密度( $4\sim 5$ ) $\times 10^5$  细胞/T25 培养瓶种植。6~7 d 后将形成的神经球[生后 0 d (postnatal day 0, P0)代]消化传代,待 6~7 d 形成 P1 代神经球。随机取少量神经

球经巢蛋白(Nestin)免疫荧光检测,并证实其可向神经元和星形胶质细胞分化,被确证为 NSCs 后用于后续实验。取 P1 代神经球种植于 6 孔板,用分化培养液(1:1 DMEM/F12、2% B27、2% FBS)诱导分化,浓度为  $5\times 10^7$  细胞/L,贴壁过夜后换液。实验分为 VPA 组和对照组;VPA 组用含 1 mmol/L VPA (Sigma 公司)的分化培养液培养;对照组用不含 VPA 的分化培养液培养。分别在 0、1、3 和 5 d 时提取 RNA 和蛋白质,通过 Real-time PCR 和 Western blotting 检测 HAP-1 mRNA 和蛋白的动态表达变化,每组 3 孔重复,重复 3 次。

### 3. 神经干细胞、胚胎神经元和星形胶质细胞的培养

为检测神经元和星形胶质细胞中 HAP-1 mRNA 的表达水平,取孕 15 d SD 大鼠,腹腔注射复合麻醉剂(chlorpent, 2 ml/kg 体重),无菌条件下取出胚胎,置于基础培养液中,分离出胚胎大脑皮质,机械解离为单细胞悬液,离心后弃上清液。将培养的 P1 代神经球消化为单细胞悬液,贴壁培养 24 h 后收集细胞提取 RNA。为检测神经元和星形胶质细胞中 HAP-1 mRNA 的表达水平,神经元培养用神经元培养液(neurobasal、2 mmol/L 赖氨酸、2% B27),以密度  $3\times 10^6$  细胞/10 cm 培养皿种植后培养,6~7 d 后收集细胞提取 RNA;星形胶质细胞培养用星形胶质细胞培养液(1:1 DMEM/F12、10% FBS),以密度  $1.5\times 10^6$  细胞/T75 培养瓶种植后培养,3~4 d 传代 1 次,传至 P4 胶质细胞纯度达到近 100%时收集细胞,提取 RNA。

### 4. 小干扰 RNA 转染

为检测 HAP1 在 VPA 诱导 NSCs 向神经元分化中的作用,由 Invitrogen 公司设计并合成小干扰阴性对照(si-NC)和 3 条针对 HAP-1 的小干扰 RNA (si-HAP-1),分别为 si-HAP-1-1, si-HAP-1-2 和 si-HAP-1-3。引物序列如下:si-HAP-1-1:正向:5'-CCU GCAGGUUCUGUCACCCACUAGG-3',反向 5'-CAU AGUGGGUGACAGAACCUGCAGG-3';si-HAP-1-2:正向:5'-CAGUGUGCCUCUGGAUGCACUCCA-3',反向 5'-UGGAAGUGCAUCCAGAGGCACACUG-3v;si-HAP-1-3:正向:5'-GACGCACCAUGGACCCGCUACA UAU-3',反向 5'-AUAUGUAGCGGGUCCAUGGUGC GUC-3'。经预实验,si-HAP-1-1 的抑制效率最好,故实验均用 si-HAP-1-1 转染。转染试剂为 Lipofectamine 3000,具体转染过程如下:(1) P1 代 NSCs 被消化成单细胞悬液后分别以  $5\times 10^5$  或  $1\times 10^5$  种植到 6 孔或 24 孔板中,培养过夜;(2) 第 2 天更换新鲜分化液;(3) 预混 Lipofectamine 3000 和 Opti-MEM 摇匀,离心,室温静置 5 min;(4) 预混 siRNA 和 Opti-MEM,摇匀,离心,室温静置 5 min;

(5) 将 siRNA 预混液逐滴加入 Lipofectamine 3000 预混液中, 摇匀, 离心, 室温静置 5 min; (6) 将混合液逐滴加入相应的 6 孔或 24 孔板中, 继续培养 24 h 或 4 d 后提取细胞 RNA、蛋白质或者取得细胞爬片。实验设计了 4 个组: 小干扰阴性对照组 (si-NC 组), VPA 组, HAP-1 小干扰 RNA 组 (si-HAP-1 组), VPA+si-HAP-1 组。6 孔板中的细胞用 Real-time PCR 检测神经元特异性分子 mRNA 的表达, 用 Western blotting 检测神经元特异性标志物  $\beta$ -微管蛋白 III ( $\beta$ -tubulin III, Tuj-1) 蛋白的表达, 每组 3 孔, 重复 3 次; 24 孔板中的细胞用于免疫荧光检测 Tuj-1 阳性神经元情况, 每组 6 孔, 重复 3 次。

## 5. Real-time PCR 检测

取成年 SD 大鼠 3 只, 前述复合麻醉剂腹腔注射麻醉后开颅, 取端脑、小脑、脑干和海马组织, 另取大鼠心脏、肝脏和肌肉组织, 分别用 Trizol 在研磨器中研磨提取 RNA; T25 培养瓶、10 cm 培养皿及 T75 培养瓶中的 NSCs、神经元细胞和星形胶质细胞则用 Trizol 直接裂解提取总 RNA, 提取后用 Nanodrop 2000 检测样品的浓度和纯度。按照 HiScript QRT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 第 1 链 cDNA 合成试剂盒 (Vazyme Biotech 公司) 说明书, 将 1  $\mu$ g 总 RNA 反转录成 cDNA。按照 Fast Start Universal SYBR Green Master (Roche) 说明书, 在 StepOnePlus™ real-time PCR 仪 (Applied Biosystems 公司) 中进行 Real-time PCR, 反应结束后将给出的 Ct 值按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对表达量, 所得数据用 GraphPad Prism 6.0 统计学软件进行分析。实验所用引物 (Sangon 公司) 如下: HAP-1: 正向 5'-TCA CCAAGCTACAACAGCGT-3', 反向 5'-CACGAG GCCTGCTTCCATAA-3'; 微管解聚蛋白 2 (stathmin-2, Stmn-2): 正向 5'-CACTTGGAGACTGTGAGCTG GTT-3', 反向 5'-ATTGCCCTATGGGAATGAAA-3'; 神经元分化因子 1 (neuronal differentiation-1, Neurod-1): 正向 5'-CAGGGTTATGAGATCGTCA CTATTC-3', 反向 5'-CCTTCTTGCTGCCTCGT GTTCC-3'; 微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein-2, Map-2): 正向 5'-CTTGATTCTATTGCCC TTGGGTTTA-3', 反向 5'-CATCCATCGTTCCGC TAGTGTTG-3'; 突触蛋白 1 (synapsin-1, Syn-1): 正向 5'-CCTCATTCGTGCTGCCTGTGGTA-3', 反向 5'-CTGGCCCTTTGCTTGTATTTT-3'; GAPDH: 正向 5'-CCACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3', 反向 5'-GACGCCAGTAGACTCCACGACAT-3'。

## 6. Western blotting 检测

用蛋白提取试剂盒 (Pierce 公司) 提取细胞总蛋白, 测定浓度后进行凝胶电泳, Bio-Rad 半干转印系

统转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉将 PVDF 膜室温封闭 2 h, 一抗孵育过夜 (4  $^{\circ}$ C)。第 2 天二抗室温孵育 2 h, 通过增强化学发光试剂盒 (Bio-Rad 公司) 进行显像。用 Shine-tech Image System 扫描并量化每个条带的吸光度值。实验所用一抗: 鼠抗 HAP-1 单克隆抗体 (1:1000, Abcam 公司), 鼠抗 Tuj-1 单克隆抗体 (1:1000, Millipore 公司), 鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (1:1500, Abcam 公司); 二抗: HRP 缀合的山羊抗小鼠 IgG (1:5000, Pierce 公司)。

## 7. 免疫荧光检测

小干扰 RNA 转染后 4 d, 24 孔培养板中的细胞爬片用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2) 洗 3 遍, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 再用 PBS 清洗 3 遍, 用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 室温孵育 15 min, PBS 清洗 3 遍后用含 0.5% BSA 的 PBS 室温封闭 2 h, 吸去封闭液, 加入一抗, 4  $^{\circ}$ C 过夜。吸去一抗, PBS 洗 3 遍后二抗室温避光孵育 2 h。吸去二抗, PBS 洗 3 遍, 用 Hoechst 33342 (Pierce 公司) 将细胞在室温下避光染色 10 min, 吸去 Hoechst 33342, PBS 清洗后用甘油明胶封片。实验所用一抗: 鼠抗 Tuj-1 单克隆抗体 (1:1000, Millipore 公司); 二抗: Alexa Fluor 488 缀合的 (绿色) 山羊抗鼠 IgG (1:1000), 均购自 Abcam 公司。

## 8. 数据分析

数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 GraphPad Prism 6 统计学软件分析数据, 两组间比较采用双尾 Student's *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 为差异具有统计学意义。

# 结 果

## 1. VPA 处理后 HAP-1 表达水平上调

Real-time PCR 和 Western blotting 检测了 VPA 组和对照组中海马 NSCs 在 0、1、3 和 5 d 时 HAP-1 mRNA 和蛋白的表达水平, 结果如图 1A 和 1B 所示, 与对照组相比, VPA 组 HAP-1 的 mRNA 和蛋白表达水平在 1 d 和 3 d 时均呈现明显升高 ( $P<0.01$  或  $P<0.05$ ), 与芯片结果趋势一致。

## 2. HAP-1 mRNA 在大鼠多组织和神经组织细胞中的表达

为了推测 HAP-1 在 VPA 诱导 NSCs 向神经元分化过程中的可能作用, 我们通过 Real-time PCR 检测了 HAP-1 mRNA 在成年大鼠 3 个胚层来源组织端脑、小脑、脑干、海马、心脏、肝脏和肌肉中的表达, 结果显示, HAP-1 mRNA 在脑干和海马中的表达显著高于其他组织, 且在海马中表达最高 (图 2A)。通过 Real-time PCR 还检测了 HAP-1 mRNA 在 NSCs、神经元和星形胶质细胞中的表达, 结果如图



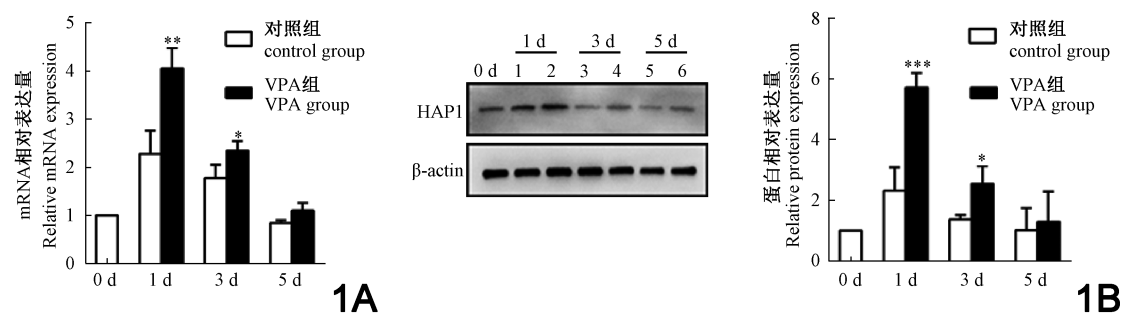


图1 海马 NSCs 经 VPA 处理后 HAP-1 mRNA 和蛋白表达水平上调

A. Real-time PCR 检测 HAP-1 mRNA 的表达, 在 1 d 和 3 d 时 VPA 组 HAP-1 mRNA 的表达明显高于对照组 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ); B. Western blotting 检测 HAP-1 蛋白的表达, 1、3 和 5 为对照组, 2、4 和 6 为 VPA 组; 在 1 d 和 3 d 时 VPA 组 HAP-1 蛋白的表达明显高于对照组 (\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )

Fig.1 VPA upregulated the mRNA and protein expression of HAP-1

A, The expression of HAP-1 mRNA at day 0, day 1, day 3 and day 5 was detected by Real-time PCR, the results indicated that the upregulation of HAP-1 mRNA in VPA group compared to the control group at day 1 and 3 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ); B, The expression of HAP-1 protein at day 0, day 1, day 3 and day 5 was detected by Western blotting (\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ); 1, 3 and 5 referred to the control group, 2, 4 and 6 referred to the VPA group, the results indicated that the upregulation of HAP-1 protein in the VPA group compared to the control group at day 1 and day 3

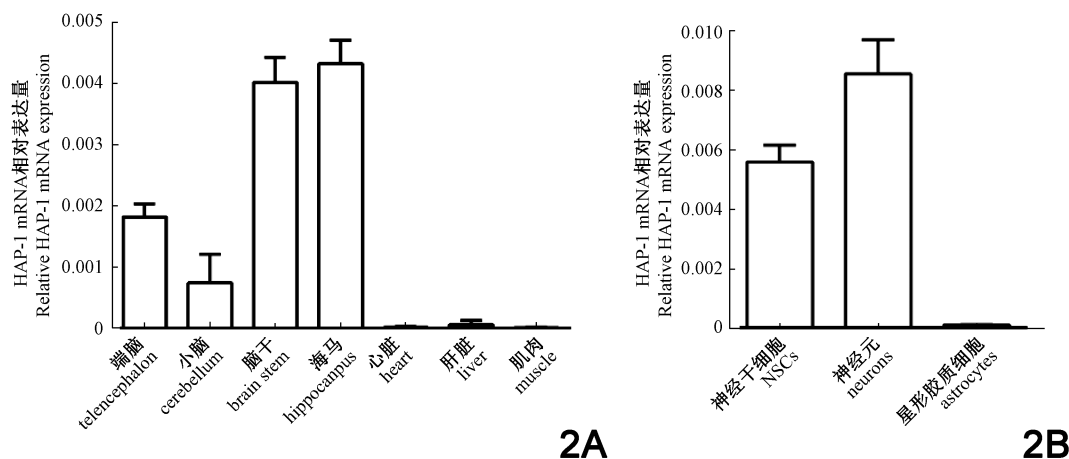


图2 HAP-1 mRNA 在大鼠多组织和神经组织细胞中的表达

A. Real-time PCR 检测 HAP-1 mRNA 在成年大鼠的端脑、小脑、脑干、海马、心脏、肝脏和肌肉组织中的表达;

B. Real-time PCR 检测 HAP-1 mRNA 在神经干细胞、神经元和星形胶质细胞中的表达

Fig.2 The mRNA expression of HAP-1 in various tissues and nervous tissue

A, The mRNA expression of HAP-1 in telencephalon, cerebellum, brain stem, hippocampus, heart, liver and muscle was detected by Real-time PCR; B, The mRNA expression of HAP-1 in neural stem cells, neurons and astrocytes was detected by Real-time PCR

2B 所示, HAP-1 mRNA 在神经元中表达最高, 在 NSCs 中次之, 在星形胶质细胞中表达最低。

### 3. HAP-1 小干扰 RNA 的转染及其干扰效率

为研究 HAP-1 在 VPA 诱导 NSCs 向神经元分化过程中的作用, 应用 RNA 干扰抑制 HAP-1 的表达。在将小干扰 RNA 转染 NSCs 后, 通过观察 BLOCK-ITTM 荧光确定转染效果, 在小干扰 RNA 浓度为 20 nmol/L 时几乎所有细胞都呈红色荧光, 说明小干扰 RNA 转染的效率接近 100%, 因此后续实验均使用浓度为 20 nmol/L 小干扰 RNA 进行转染。为检测小干扰 RNA 的干扰效率, 本实验通过 Real-time PCR 和 Western blotting 分别检测 HAP-1 mRNA

和蛋白的表达情况, 结果显示, HAP-1 的 mRNA 和蛋白表达均受到显著抑制 (图 3A 和 3B), 而 si-HAP-1-1 的干扰效率最好, 后续的实验均使用 si-HAP-1-1 转染 NSCs。

### 4. HAP-1 对 VPA 诱导 NSCs 向神经元分化的影响

Real-time PCR 的检测结果显示, VPA 促进 Stmn-2、Neurod-1、Map-2 和 Syn-1 的表达, 而干扰了 HAP1 的表达后则下调 Stmn-2、Neurod-1、Map-2 和 Syn-1 表达; 在干扰 HAP-1 表达的同时, 加入 VPA 可部分抵消由于 HAP-1 下调导致的神经元特异性分子的表达变化 (图 4A)。Western blotting 的检测结果显示, VPA 处理后神经元特异性标记物 Tuj-1

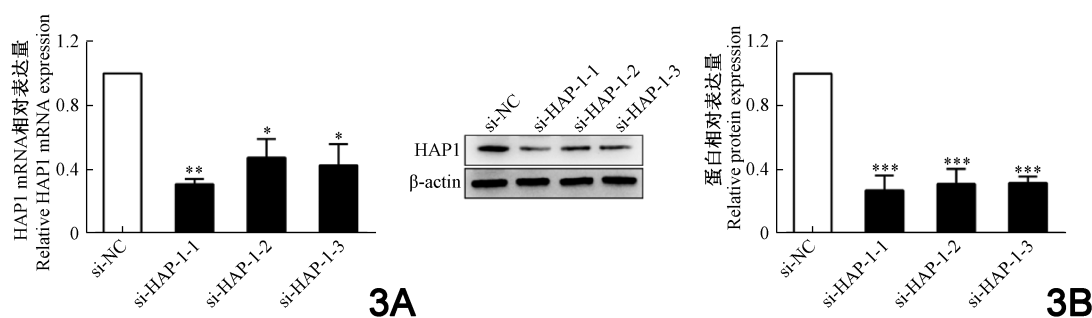


图3 HAP-1 小干扰 RNA 的转染及干扰效率检测

A. Real-time PCR 检测 HAP-1 mRNA 的表达量(与 si-NC 组比, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ); B. Western blotting 检测 HAP-1 蛋白表达量(与 si-NC 组比, \*\*\*  $P<0.001$ )

Fig.3 Transfection and interference efficiency detection of si-HAP-1

A, The mRNA expression of HAP-1 was detected by Real-time PCR after transfected with siRNA (compared with the si-NC group, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ); B, The protein expression of HAP-1 was detected by Western blotting after transfected with siRNA (compared with the si-NC group, \*\*\*  $P<0.001$ )

蛋白表达上调;而干扰 HAP-1 后 Tuj-1 蛋白表达下调;在干扰 HAP-1 的同时加入 VPA,可部分抵消干扰 HAP-1 的作用,Tuj-1 蛋白的表达水平达到对照组水平(图 4B,4C)。免疫荧光结果显示,VPA 组 Tuj-1 阳性神经元的比例增多,神经元突起较多较长较粗;干扰 HAP-1 后 Tuj-1 阳性神经元比例下降,突起较少较短较细;在 VPA 诱导时加入小干扰 HAP-1 后,Tuj-1 阳性神经元比例下降至对照组水平,突起较少较短较细(图 4D,4E),提示 VPA 可能通过上调 HAP-1 的表达促进 NSCs 向神经元分化。

## 讨 论

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、亨廷顿舞蹈病(Huntington disease, HD)、肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)和朊病毒疾病等<sup>[7]</sup>神经退行性疾病(neurodegenerative disease, ND)已成为全球严重的医学和社会问题<sup>[8]</sup>。鉴于 NSCs 的增殖和分化特性,NSCs 最有望成为治疗 AD、PD 等神经系统退行性疾病的备选细胞。

VPA 作为一种短链脂肪酸,多年来一直作为广泛使用的抗癫痫药物,并已有报道显示其具有明显的神经保护作用<sup>[9,10]</sup>。此外,VPA 也是一种组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)抑制剂,通过促进组蛋白乙酰化对染色质结构进行表观遗传修饰和调节基因表达<sup>[11]</sup>,以影响神经元分化。有研究表明,VPA 减少神经元前体细胞(neural progenitor cells, NPCs)增殖,促进其向神经元、抑制其向胶质细胞分化<sup>[12]</sup>。Duan 等<sup>[13]</sup>研究发现,VPA 提高小鼠成纤维细胞诱导为神经干细胞的重编程效率和神经元分化与 mTOR 信号通路激活有关。我们前期研究发现,在 NSCs 分化过程中,加入 VPA 处理 24 h

后,Map-2 和 Syn-1 等神经元标志分子明显上调<sup>[6]</sup>,提示 VPA 在促进 NSCs 向神经元分化过程中发挥作用,但具体的分子机制及靶标尚不清楚。因此,探索 VPA 促进 NSCs 向神经元分化的分子机制,可更好地调控 NSCs 分化,并可为临床治疗神经系统退行性疾病的药物筛选提供依据。

本课题组构建的大鼠海马 NSCs 差异表达基因芯片结果中,与对照组比较,VPA 处理组有 1132 个 mRNA 的表达呈现明显差异(差异倍数 $>2$ 且  $P<0.05$ ),其中上调的 mRNA 有 874 个,下调的有 258 个。GO(gene ontology)分析结果显示,上调的差异 mRNA 主要集中在神经元发育,突触传递和神经元活力等生物学功能方面。在上调的基因中,HAP-1 的差异倍数较大,为 2.203 倍。本研究通过 Real-time PCR 和 Western blotting 证实,在 VPA 处理 1 d 和 3 d 时,与对照组相比,HAP-1 mRNA 和蛋白水平均明显上调,进一步验证了基因芯片结果。HAP-1 是第 1 个被发现与亨廷顿蛋白(Huntington protein, Htt)相作用的蛋白质,在大脑中尤其在下丘脑中高表达<sup>[14]</sup>。HAP-1 突变后可引起细胞内外  $Ca^{2+}$  稳态失衡,从而导致 HD 的发生<sup>[15]</sup>。研究还表明,HAP-1 在其他神经系统退行性疾病中也能与相关蛋白结合而发挥作用。有文献表明,HAP-1 参与微管依赖性转运,在神经细胞发育和分化过程的物质运输中起着关键作用<sup>[16~18]</sup>。Huang 等<sup>[17]</sup>对来自 HAP-1 半抗原缺失和野生型小鼠大脑的紫杉醇沉淀微管进行了蛋白质组学分析,发现 HAP-1 能够通过微管上的断点簇区蛋白(breakpoint cluster region protein, Bcr)结合,继而进一步激活 Bcr 的下游效应子——细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK),促进神

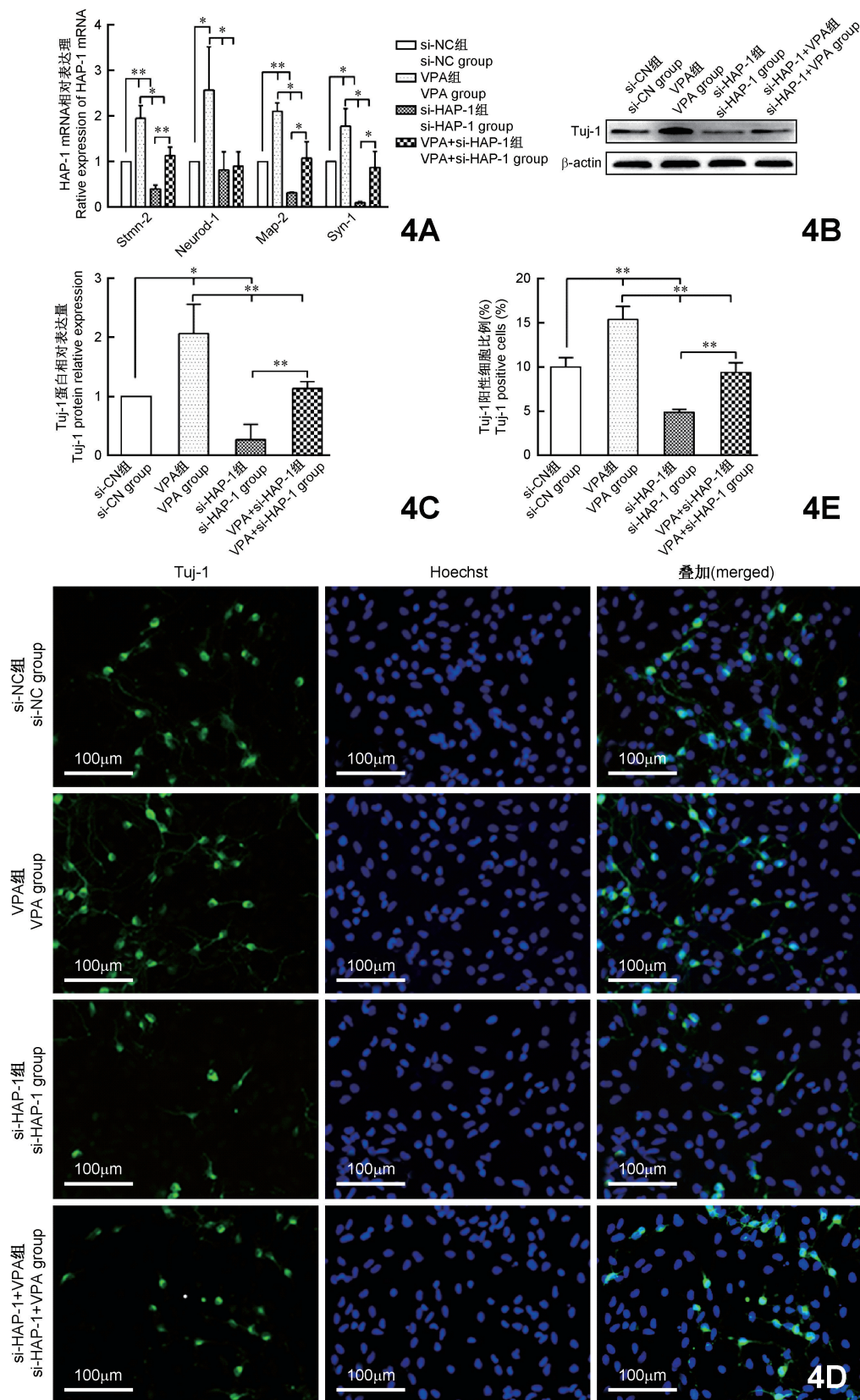


图4 HAP-1对VPA诱导NSCs向神经元分化的影响

A. Real-time PCR检测神经元特异分子Stmn-2、Neurod-1、Map-2和Syn-1的表达(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ); B、C. Western blotting检测神经元标记物Tuj-1蛋白的表达量(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ); D、E. 免疫荧光检测Tuj-1阳性神经元比例, Hoechst染核, 标示100 μm(\*\* $P < 0.01$ )

Fig.4 Effect of HAP-1 on the differentiation of NSCs into neurons induced by VPA

A, Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of Stmn-2, Neurod-1, Map-2 and Syn-1(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ); B, C, Western blotting analysis of Tuj-1 protein expression(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ); D, E, Tuj-1 positive neurons were detected by immunofluorescence assay, nuclei were stained by Hoechst, Bar=100 μm(\*\* $P < 0.01$ )



神经元发育和分化以及神经突起的生长。Lim 等<sup>[19]</sup>研究表明, HAP-1 是参与脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)/酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 信号转导的关键分子, BDNF/TrkB 复合物在神经元发育和神经系统功能的维持中起关键作用, HAP-1 基因敲除小鼠具有很多 BDNF 基因敲除小鼠的表型特征。基于上述报道, 我们推测 VPA 可能通过上调 HAP-1 的表达促进 NSCs 向神经元分化。

本研究检测了 HAP-1 在大鼠 3 个胚层来源的多组织中的表达, 发现其高表达于来自外胚层的神经系统, 特别在有神经发生区的海马结构中高表达。而与 NSCs 和星形胶质细胞相比, HAP-1 在神经元中表达更高, 我们认为, 高表达基因更有可能在神经生物学过程中起着至关重要的作用, 这进一步说明了 HAP-1 可能与神经元的分化有关。为了验证 HAP-1 在 VPA 诱导 NSCs 向神经元分化中的作用, 我们通过在 NSCs 中干扰 HAP-1 mRNA 表达的方法, 应用 Real-time PCR、Western blotting 和细胞免疫荧光等手段, 检测了神经元特异性分子 Stmn-2、Neurod-1、Map-2 和 Syn-1 基因以及神经元特异性标志物 Tuj-1 蛋白的表达, 并观察了分化为 Tuj-1 阳性神经元的比例和神经元的发育情况, 进一步证实了 NSCs 经 VPA 诱导后, 神经元的标志分子和标志物的表达明显上调, 向神经元分化比例明显增加, 神经元发育良好。如果在干扰 HAP-1 表达的同时加入 VPA 处理, 神经元特异性标志分子和标志物的表达、神经元的分化数量及发育情况可得到部分逆转, 这与 VPA 还可能通过其他信号途径促进 NSCs 向神经元的分化有关, 本课题组曾证实 VPA 促进 NSCs 向神经元分化的过程中肝配蛋白 A3 (ephrin A3, Efna-3) 表达上调<sup>[20]</sup>。本研究探讨了 VPA 诱导海马 NSCs 向神经元分化过程中 HAP-1 的表达变化及可能的作用机制, 其研究结果可为临床应用 NSCs 治疗神经系统退行性疾病的研究和药物筛选提供参考。

### 参 考 文 献

- [1] Otsuki L, Brand AH. Quiescent neural stem cells for brain repair and regeneration: lessons from model systems [J]. Trends Neurosci, 2020, 43(4):213-226.
- [2] Poolchanuan P, Unagul P, Thongnest S, et al. An anticonvulsive drug, valproic acid (valproate), has effects on the biosynthesis of fatty acids and polyketides in microorganisms [J]. Sci Rep, 2020, 10(1):9300.
- [3] Chen JY, Chu LW, Cheng KI, et al. Valproate reduces neuroinflammation and neuronal death in a rat chronic constriction injury model [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):16457.
- [4] Romoli M, Mazzocchi P, D'Alonzo R, et al. Valproic acid and epilepsy: from molecular mechanisms to clinical evidences [J]. Curr Neuropharmacol, 2019, 17(10):926-946.
- [5] Lu L, Zhou HX, Pan B, et al. c-Jun amino-terminal kinase is involved in valproic acid-mediated neuronal differentiation of mouse embryonic nscs and neurite outgrowth of nsc-derived neurons [J]. Neurochem Res, 2017, 42(4):1254-1266.
- [6] He H, Li W, Peng M, et al. MicroRNA expression profiles of neural stem cells following valproate inducement [J]. J Cell Biochem, 2018, 119(7):6204-6215.
- [7] Márquez F, Yassa MA. Neuroimaging biomarkers for alzheimer's disease [J]. Mol Neurodegener, 2019, 14(1):21.
- [8] Ankarcrona M, Winblad B, Monteiro C, et al. Current and future treatment of amyloid diseases [J]. J Intern Med, 2016, 280(2):177-202.
- [9] Gamirova R, Gorobets E, Akhutina T, et al. Changes in the functions of energetic block of brain in children and adolescents with idiopathic generalized epilepsy treated by valproic acid [J]. J Neurol Sci, 2019, 405:66-67.
- [10] Wang Y, Li ZP. Association of UGT2B7 and CaMK4 with response of valproic acid in Chinese children with epilepsy [J]. Therapie, 2020, 75(3):261-270.
- [11] Scholz B, Schulte JS, Hamer S, et al. HDAC (Histone deacetylase) inhibitor valproic acid attenuates atrial remodeling and delays the onset of atrial fibrillation in mice [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2019, 12(3):e7071.
- [12] Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, et al. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(47):16659-16664.
- [13] Duan QR, Li SY, Wen XR, et al. Valproic acid enhances reprogramming efficiency and neuronal differentiation on small molecules staged-induction neural stem cells: suggested role of mTOR signaling [J]. Front Neurosci, 2019, 13:867.
- [14] Wroblewski G, Islam MN, Yanai A, et al. Distribution of HAP1-immunoreactive cells in the retrosplenial-retrohippocampal area of adult rat brain and its application to a refined neuroanatomical understanding of the region [J]. Neuroscience, 2018, 394:109-126.
- [15] Xiang J, Yang S, Xin N, et al. DYRK1A regulates Hap1-Dcaf7/WDR68 binding with implication for delayed growth in Down syndrome [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(7):E1224-E1233.
- [16] Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, et al. Neuronal cell death [J]. Physiol Rev, 2018, 98(2):813-880.
- [17] Huang PT, Chen CH, Hsu IU, et al. Huntingtin-associated protein 1 interacts with breakpoint cluster region protein to regulate neuronal differentiation [J]. PLoS One, 2015, 10(2):e116372.
- [18] Lee JK, Kang SM, Wang X, et al. HAP1 loss confers L-asparaginase resistance in all by downregulating the calpain-1-Bid-caspase-3/12 pathway [J]. Blood, 2019, 133(20):2222-2232.
- [19] Lim Y, Wu LY, Chen S, et al. HAP1 is required for endocytosis and signalling of BDNF and its receptors in neurons [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(3):1815-1830.
- [20] Li W, He H, Peng M, et al. Expression of efna3 during valproate induced neural stem cells differentiation [J]. Acta Anatomica Sinica, 2018, 49(3):294-298. (in Chinese)  
李雯, 何辉, 彭敏, 等. 丙戊酸钠诱导神经干细胞分化过程中肝配蛋白 A3 的表达 [J]. 解剖学报, 2018, 49(3):294-298.

(编辑 张立克)