

网络出版时间: 2019-12-2 13:41 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20191126.1716.001.html>

◇基础医学研究◇

BMSC-CM 通过抑制 Notch1 信号通路 促进神经干细胞的有效分化

童 祎¹, 宋旒文¹, 申才良¹, 刘晓颖²

摘要 目的 探讨骨髓间充质干细胞条件培养液(BMSC-CM)对神经干细胞(NSCs)分化的影响及 Notch1 信号通路在其中的作用。方法 在不同分化条件下培养 NSCs,通过 Notch1 信号激活剂 Jagged 分析是否存在 Notch1 信号通路的作用。实验分为四组:对照组(NSCs)、Jagged 组(NSCs + 1 μ g/ml Jagged)、BMSC-CM 组(NSCs + BMSC-CM)、BMSC-CM + Jagged 组(NSCs + BMSC-CM + 1 μ g/ml Jagged)。用免疫荧光染色法鉴定各组 NSCs 的分化情况,Western blot 法检测 MAP-2、GFAP 及通路相关蛋白 Notch1、NICD、Hes1、Hes5 的表达量。结果 免疫荧光分析显示:与对照组相比,BMSC-CM 组神经元特异性微管相关蛋白-2(MAP-2)阳性细胞数明显增多,星形胶质细胞特异性胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性细胞数明显减少,在 Jagged 组中这种现象完全相反。关于 Notch1、NICD、Hes1、Hes5 蛋白的表达量,Jagged 组明显高于对照组,BMSC-CM 组明显低于对照组,BMSC-CM + Jagged 组明显低于 Jagged 组,BMSC-CM + Jagged 组明显高于 BMSC-CM 组。结论 BMSC-CM 通过抑制 Notch1 通路促进神经干细胞在体外的有效分化,增加 MAP-2 阳性细胞比例,减少 GFAP 阳性细胞比例。

关键词 神经干细胞;骨髓间充质干细胞条件培养基;Notch1 信号通路

中图分类号 R 329

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1835-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.001

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)是一种灾难性的、代价高昂的损伤,目前尚无有效的治疗方法^[1]。细胞移植可能是治疗 SCI 的一种方法,神经干细胞(neural stem cells,NSCs)具有自我更新和分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力^[2]。然而,当神经干细胞移植到受损的脊髓中

时,这些细胞倾向于分化为星形胶质细胞^[3]。根据最近的体外研究^[4-5]显示骨髓间充质干细胞条件培养液(bone mesenchymal stem cell-conditioned medium, BMSC-CM)可以调节 NSCs 的分化过程。然而,BMSC-CM 影响 NSCs 分化的分子机制尚待深入研究。Notch 信号通路在中枢神经系统的发育中起着重要的作用^[6],Notch1 被认为是调节神经系统发育的重要信号分子,增加神经干细胞中 Hes1、Hes5 的表达可以抑制神经干细胞向神经元类细胞分化^[7],促进神经干细胞向胶质细胞分化^[8-9]。现着重研究 Notch1-Hes1/5 信号通路与 BMSC-CM 影响 NSCs 分化方面是否有关联。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 生 24~48 h 龄 SD 大鼠 1 只和 80~100 g 成年雄性 SD 大鼠 1 只,购自安徽医科大学实验动物科学研究所。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司);DMEM 低糖培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);B-27(美国 Invitrogen 公司);表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(美国 Pepro Tech 公司);100 U/ml 青霉素/0.1 mg/L 链霉素(德国 PAN 公司);小鼠抗大鼠巢蛋白(Nestin)抗体(美国 Sigma 公司);小鼠抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、兔抗大鼠微管相关蛋白-2(microtubule associated protein-2, MAP-2)抗体(英国 Abcam 公司);CY3 标记的山羊抗兔 IgG、AlexaFluor-488 标记的山羊抗小鼠 IgG(武汉伊莱瑞特生物有限公司);Triton X-100(北京中杉金桥生物技术有限公司);DAPI 染色液、免疫荧光一抗稀释液、免疫荧光二抗稀释液(上海碧云天公司);左旋氏多聚赖氨酸(美国 Sigma 公司);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);Jagged-Fc 融合蛋白(美国 R&D System 公司);ECL 蛋

2019-07-31 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1508085MH152)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院脊柱外科,合肥 230022

² 安徽医科大学生物科学学院生物学系,合肥 230032

作者简介:童 祎,男,硕士研究生;

申才良,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: shencailiang1616@163.com

白显影液试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒(美国 Pierce 公司)。

1.2 方法

1.2.1 NSCs 的分离、培养和鉴定 取新生 24 ~ 48 h 龄 SD 大鼠,脱臼法处死,在 75% 酒精中浸泡 5 min,断头,取出大脑,分离脑膜剥除血管后剪碎脑组织至 1 mm³ 大小,加入 0.25% 胰蛋白酶消化 10 min,轻柔吹打混匀,经 200 目筛网过滤成单细胞悬液,然后以 1 000 r/min 离心 5 min,弃除上清液,重悬沉淀,再以 1 000 r/min 离心 5 min 并弃除上清液,然后以 3×10^5 个/ml 的密度将细胞接种于无血清的培养基上(DMEM/F12 + 2% B27 + 20 ng/ml bFGF + 20 ng/ml EGF)并添加 100 U/ml 青霉素/0.1 mg/L 链霉素,置于 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中培养,每隔 3 d 加入新鲜的培养基,1 周后神经球直径达到约 100 μ m,进行传代。得到第 2 代神经球,接种于经 0.1 mg/ml 多聚赖氨酸包被的盖玻片,行免疫细胞化学荧光检测神经干细胞特异性蛋白(Nestin),证实所培养的细胞为大鼠神经干细胞。

1.2.2 分离、培养 BMSCs 并制备 BMSC 条件培养液 参考本课题组前期的实验方法^[4],取成年雄性 SD 大鼠 1 只(体质量 80 ~ 100 g),从大鼠股骨和胫骨骨髓中分离培养 BMSCs,将细胞以 10^6 个/ml 的密度接种于含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育。48 h 后更换培养基,以后每 3 d 更换 1 次,丢弃未贴壁细胞。当贴壁细胞在新鲜培养基中培养至细胞融合率达到 90% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,重新悬浮后,以 1 : 2 的比例传代。得到第 3 代生长良好的 BMSCs,当贴壁率达 90% 时使用倒置显微镜观察其形态鉴定,见图 1。将原培养液换成不含胎牛血清的 DMEM/F12 再培养 24 h,倒出培养液,最后用直径 0.22 μ m 的孔滤器过滤获得所需条件培养基。

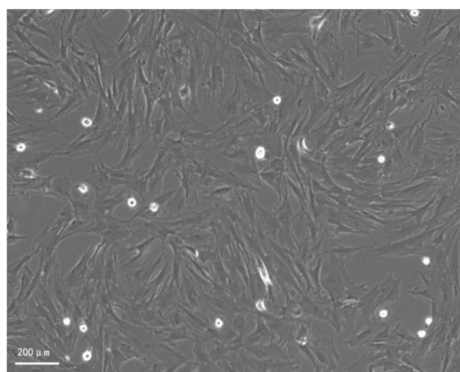


图1 第3代骨髓间充质干细胞的成纤维细胞形态 ×200

1.2.3 NSCs 的分组及分化培养 将生长良好的第 2 代 NSCs 接种在有 0.1 mg/ml 多聚赖氨酸包被处理盖玻片的 6 孔板中培养,每孔细胞数约 2×10^4 个,先用 DMEM/F12 + B27 培养基培养 12 h,然后根据实验设计将 NSCs 分为四组,分别为:①对照组(NSCs)、Jagged 组(NSCs + 1 μ g/ml Jagged)、BMSC-CM 组(NSCs + BMSC-CM)、BMSC-CM + Jagged 组(NSCs + BMSC-CM + 1 μ g/ml Jagged)。置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每 3 d 换液 1 次。1 周后对分组培养的细胞行免疫荧光染色实验。

1.2.4 NSCs 的免疫荧光染色 实验应用免疫荧光染色技术检测检测细胞的神经元和神经胶质细胞的特异性标志物 MAP-2 及 GFAP。取出样本,用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次,每次 5 min,常温下用 4% 多聚甲醛固定 15 ~ 20 min,吸去多余残液,再用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。含 0.1% Triton X-100 的 PBS 孵育 20 min 后,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。加入正常山羊血清工作液,置于 37 °C 恒温培养箱中孵育 1 h,然后加入 1 : 500 稀释的 MAP-2 一抗,1 : 1 000 稀释的 GFAP 一抗,在 4 °C 冰箱内孵育过夜。第 2 天,取出标本,常温下放置 1 h 后 PBS 洗 3 次,每次 5 min。分别加入 1 : 200 稀释的特异性二抗 CY3 及 Alexa Flour-488,在 37 °C 恒温培养箱中孵育 1 h。取出标本,PBS 洗 3 次,每次 5 min。最后,室温下用 DAPI 孵育 10 min 对细胞核染色。将载玻片用 PBS 漂洗 3 次,封片,荧光显微镜观察、拍照。

1.2.5 Western blot 分析 分别提取各组 NSCs 分化后细胞总蛋白,用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定各组蛋白含量,根据蛋白浓度选择上样量,依此行 SDS-PAGE 凝胶电泳,PVDF 转膜,非特异性封闭。加入一抗,所用抗体及稀释度:抗 MAP-2(1 : 200 稀释)、抗 GFAP(1 : 500 稀释)、 β -actin(1 : 1 000 稀释)、抗 Notch1(1 : 200 稀释)、抗 Notch 胞内结构域(notch intracellular domain,NICD)(1 : 1 000 稀释)、抗 hes1(hairy and enhancer of split1)(1 : 200 稀释)、抗 Hes5(hairy and enhancer of split5)(1 : 200 稀释)。于 4 °C 冰箱孵育过夜,第 2 天用 TBST 洗膜 4 次,再加入相应的二抗,室温孵育 1 h,用 TBST 洗膜 4 次,用 ECL 化学发光显影并行胶片定影处理,用 Super Signal West Femto 最大灵敏度底物检测系统(美国 Pierce 公司)来观察免疫反应带,用 Epson V200 和 Quantity One 对实验结果进行统计分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较均采用独

立样本 t 检验 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCs 鉴定 体外分离的细胞原代培养至 7 d 左右,可见培养瓶中细胞形成球形集落,对取贴壁后的 NSCs 细胞球行神经干细胞特异性蛋白 Nestin 荧

光染色检测,结果示贴壁细胞中大多细胞呈 Nestin 阳性表达,见图 2。

2.2 BMSC-CM 对 NSCs 分化的影响 第 2 代 NSCs 球接种后,培养 7 d,细胞免疫荧光检测显示四组 NSCs 分化为 MAP-2 表达阳性的神经元和 GFAP 表达阳性的星形胶质细胞,见图 3。与对照组相比,

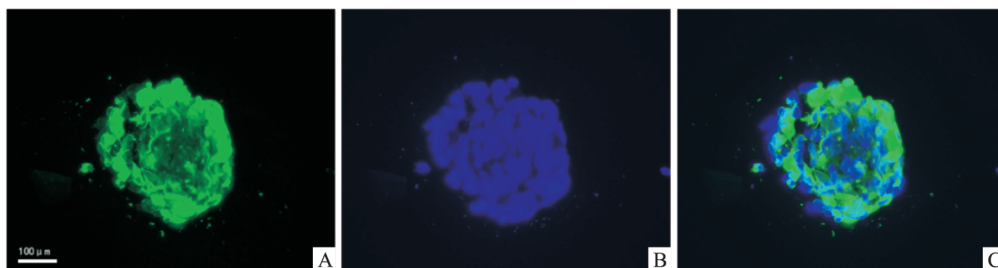


图 2 神经干细胞的免疫荧光鉴定 $\times 400$

A: Nestin 蛋白表达水平; B: DAPI 蛋白表达水平; C: 融合图像显示神经球中有大量 Nestin 蛋白表达

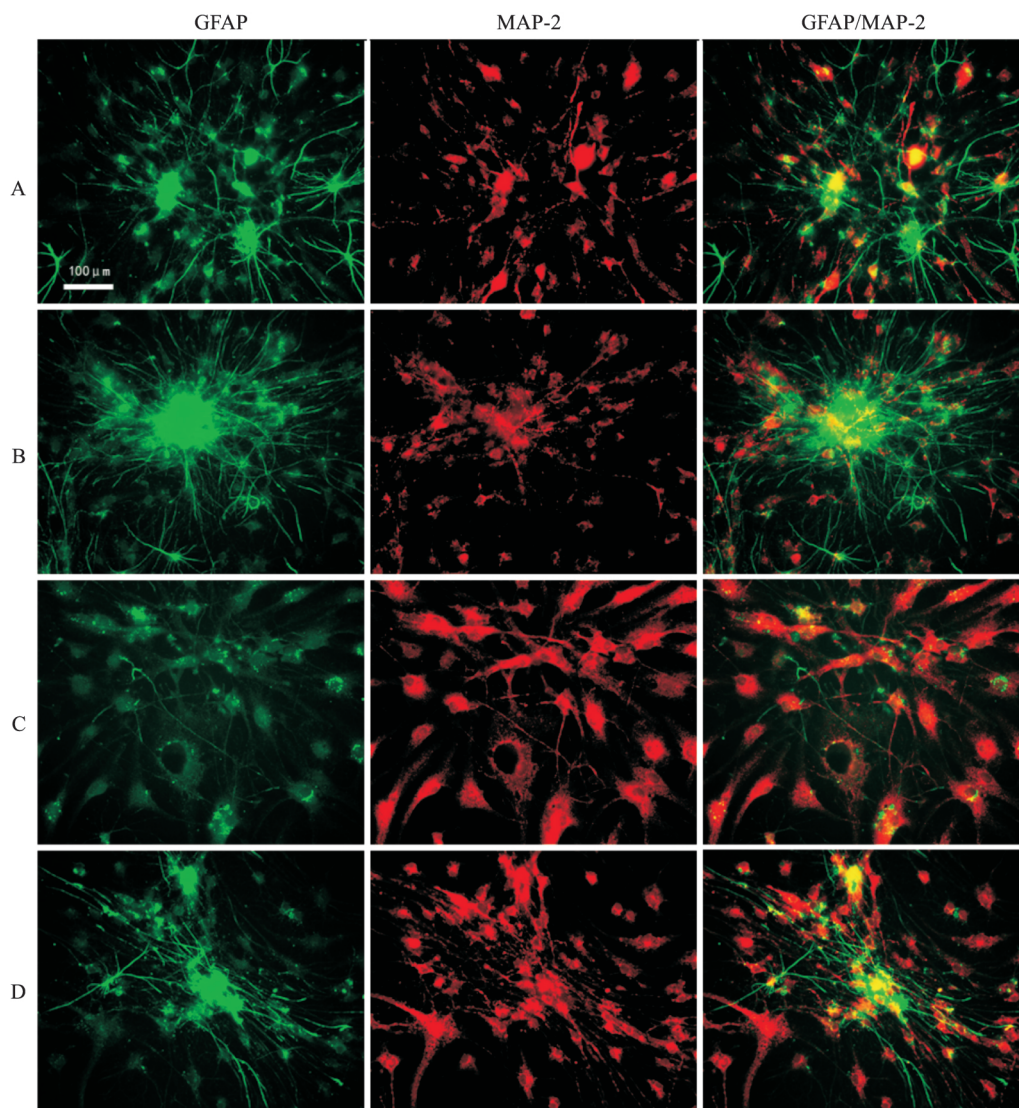


图 3 NSCs 在不同分化培养基中 MAP-2 及 GFAP 阳性细胞的表达 $\times 400$

A: 对照组; B: Jagged 组; C: BMSC-CM 组; D: BMSC-CM + Jagged 组

BMSC-CM 组的 MAP-2 阳性细胞显著增加,GFAP 阳性细胞显著减少。与对照组相比,Jagged 组 MAP-2 阳性细胞明显减少,GFAP 阳性细胞明显增加。而 BMSC-CM + Jagged 组较 Jagged 组 MAP-2 阳性细胞显著增加,GFAP 阳性细胞显著减少。BMSC-CM + Jagged 组较 BMSC-CM 组 MAP-2 阳性细胞显著减少,GFAP 阳性细胞显著增加,见图 4、表 1。Western blot 分析显示 BMSC-CM 组与对照组相比,MAP-2 蛋白表达水平显著增加,GFAP 蛋白表达水平显著减少。与对照组相比,Jagged 组 MAP-2 蛋白表达水平明显减少,GFAP 蛋白表达水平明显增加。而 BMSC-CM + Jagged 组较 Jagged 组 MAP-2 蛋白表达水平明显增加,GFAP 蛋白表达水平明显减少。BMSC-CM + Jagged 组较 BMSC-CM 组 MAP-2 蛋白表达水平显著减少,GFAP 蛋白表达水平显著增加,见图 5、6 和表 2。BMSC-CM 促进 NSCs 的有效分化。

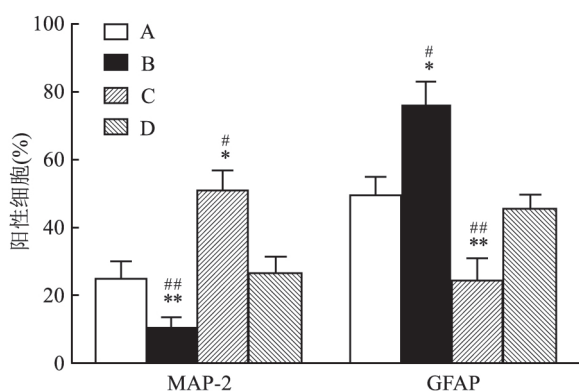


图 4 NSCs 在不同分化培养基中分化后 MAP-2 阳性细胞率及 GFAP 阳性细胞率

A: 对照组; B: Jagged 组; C: BMSC-CM 组; D: BMSC-CM + Jagged 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 BMSC-CM + Jagged 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 1 NSCs 在不同分化培养基中 MAP-2 阳性细胞率及 GFAP 阳性细胞率比较

阳性细胞率对比	MAP-2		GFAP	
	t 值	P 值	t 值	P 值
对照组与 Jagged 组	2.507	<0.05	6.872	<0.01
对照组与 BMSC-CM 组	9.325	<0.01	5.841	<0.01
Jagged 组与 BMSC-CM + Jagged 组	2.964	<0.05	10.408	<0.01
BMSC-CM 组与 BMSC-CM + Jagged 组	8.013	<0.01	7.148	<0.01

2.3 在 BMSC-CM 与 NSCs 共培养时 Notch1 信号通路被抑制 为研究 Notch1 信号通路在 BMSC-CM 与 NSCs 共培养中的作用,采用 Western blot 方法检测四组样本的 Notch1 通路相关蛋白的表达。见图 6。结果显示:BMSC-CM 组与对照组相比,Notch1、NICD、Hes1、Hes5 蛋白表达水明显显著减少;Jagged 组

与对照组相比,Notch1、NICD、Hes1、Hes5 的蛋白表达水平明显增加;BMSC-CM + Jagged 组较 Jagged 组 Notch1、NICD、Hes1、Hes5 的蛋白表达水平明显减少;BMSC-CM + Jagged 组较 BMSC-CM 组 Notch1、NICD、Hes1、Hes5 的蛋白表达水平明显增加。见图 7、8 和表 3。

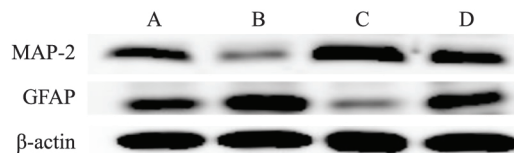


图 5 NSCs 在不同分化培养基中分化后的 MAP-2 及 GFAP 蛋白条带

A: 对照组; B: Jagged 组; C: BMSC-CM 组; D: BMSC-CM + Jagged 组

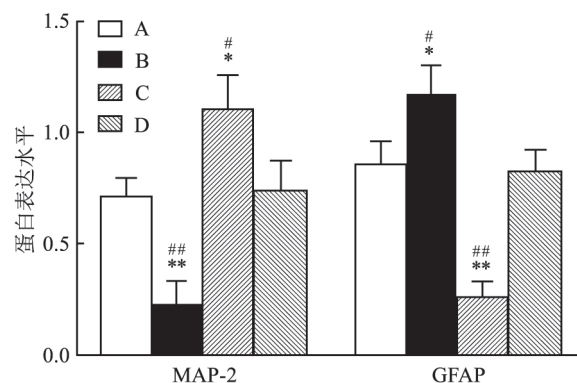


图 6 NSCs 在不同分化培养基中分化后 MAP-2 及 GFAP 蛋白表达水平

A: 对照组; B: Jagged 组; C: BMSC-CM 组; D: BMSC-CM + Jagged 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 BMSC-CM + Jagged 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 2 NSCs 在不同分化培养基中分化后 MAP-2 及 GFAP 蛋白表达水平的比较

蛋白表达水平对比	MAP-2		GFAP	
	t 值	P 值	t 值	P 值
对照组与 Jagged 组	10.496	<0.01	7.324	<0.05
对照组与 BMSC-CM 组	6.377	<0.05	13.625	<0.01
Jagged 组与 BMSC-CM + Jagged 组	10.821	<0.01	6.32	<0.05
BMSC-CM 组与 BMSC-CM + Jagged 组	6.153	<0.05	14.312	<0.01

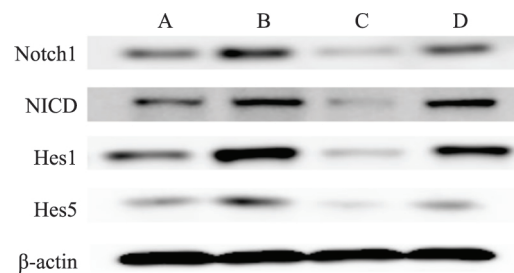


图 7 NSCs 在不同分化培养基中分化后 Notch1 通路相关蛋白条带

A: 对照组; B: Jagged 组; C: BMSC-CM 组; D: BMSC-CM + Jagged 组

表3 NSCs在不同分化培养基中分化 Notch1 通路相关蛋白表达水平的比较

蛋白表达水平对比	Notch1		NICD		Hes1		Hes5	
	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值	t 值	P 值
对照组与 Jagged 组	4.635	<0.05	6.025	<0.05	8.592	<0.05	4.593	<0.05
对照组与 BMSC-CM 组	12.521	<0.01	10.614	<0.01	18.717	<0.01	10.102	<0.01
Jagged 组与 BMSC-CM + Jagged 组	4.407	<0.05	5.143	<0.05	9.066	<0.05	4.802	<0.05
BMSC-CM 组与 BMSC-CM + Jagged 组	13.140	<0.01	11.498	<0.01	19.569	<0.01	10.925	<0.01

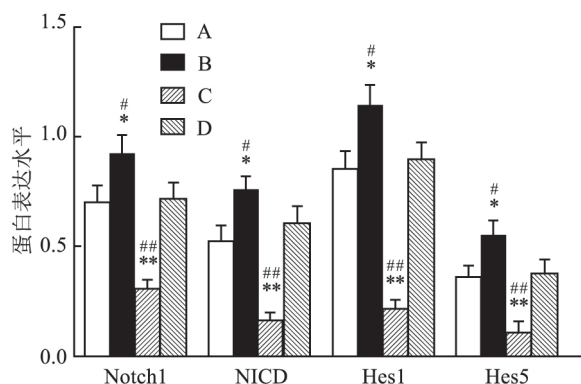


图8 NSCs在不同分化培养基中分化后 Notch1 通路相关蛋白表达水平

A: 对照组; B: Jagged 组; C: BMSC-CM 组; D: BMSC-CM + Jagged 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 BMSC-CM + Jagged 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

本研究探讨了 BMSC-CM 对 NSCs 分化的调控及可能机制。与对照组相比,用 BMSC-CM 培养 NSCs 7 d 后,通过细胞免疫荧光和 Western blot 分析显示 MAP-2 蛋白表达水平比例增加,GFAP 蛋白表达水平比例减少。这些结果表明,BMSC-CM 对 NSCs 的分化有影响,显著增加神经元的比例,减少星形胶质细胞的比例。将 BMSCs 移植到受损的中枢神经系统中,可促进神经功能的恢复。以往的研究^[10]表明,BMSCs 在损伤后移植到小鼠脊髓内,导致空洞体积明显缩小,小鼠的运动和感觉恢复得到了改善。BMSCs 与 NSCs 在体外共培养时,可以提供指导 NSCs 分化和促进轴突发育的指导性信号^[11],且 BMSC-CM 在体外对神经元分化具有与 BMSC 相同的作用^[12]。Notch 信号通路可以调控 NSC 的自我更新、神经发生和胶质发生,激活 Notch 信号通路可以促进神经胶质发生,抑制 NSC 的神经发生^[13]。本研究以 BMSC-CM 组及 BMSC-CM + Jagged 组作为实验组,通过 BMSC-CM 抑制被 Jagged 激活的 Notch1 通路,证明了 BMSC-CM 影响 NSCs 分化的潜在机制。Jagged 是 Notch1 通路主要配体之

一,Jagged 蛋白能增加 Notch1 通路配体数量,直接激活 Notch1 通路。Notch 信号通路主要通过跨膜受体(Notch1、Notch2、Notch3、Notch4)与相邻细胞表面的跨膜配体(Jagged 1 2 和 Delta-like 1 3 4)的物理结合激活。经肿瘤坏死因子 α -转化酶作用,然后激活 γ -分泌酶(γ -Secretase)^[14],促进 NICD 的释放,NICD 转移至胞核内与转录抑制因子 RBP-J 结合,诱导下游靶基因(Hes1、Hes5 等)的表达。为进一步研究其作用机制,通过应用 Notch1 信号通路的特异性激活剂(Jagged 融合蛋白)激活 Notch1 信号通路,通过免疫荧光和 Western blot 分析观察上调 Notch1 信号通路对 NSCs 分化的影响。结果显示,加入 Jagged 时 Notch1 信号后被激活,Notch1、NICD、Hes1、Hes5 表达量明显上调,NSCs 向神经元分化减少,NSCs 向星形胶质细胞分化增多。BMSC-CM 组的 Notch1、NICD、Hes1、Hes5 表达量明显降低,Notch1 通路被抑制,从而调控了 NSCs 分化。BMSC-CM + Jagged 组 Notch1、NICD、Hes1 和 Hes5 的表达较 Jagged 组明显降低。这些结果表明,BMSC-CM 可能是通过抑制 Notch1 信号通路调节 NSCs 的分化。此外,Notch1 信号通路可能不是调节 NSCs 分化的唯一途径,在 BMSCs 调控 NSCs 分化的过程中有多种信号通路参与,不同信号通路之间存在交叉作用。BMSC-CM 可通过抑制 BMP-4-smad1/5/8 信号通路来调节 NSCs 的分化,增加神经元的生成^[5],减少星形胶质细胞的生成。因此联合调控 BMP4-SMAD1/5/8 信号通路和 Notch 信号通路对 NSCs 的有效分化可能存在协同作用。目前 BMSCs 调控 NSCs 分化的机制尚没有完全清楚,Notch1、Jagged1、Hes1 和 Hes5 可能是参与该调控的作用靶点,这为 BMSC-CM 诱导 NSCs 分化提供了新的理论支持。

参考文献

- [1] Gregoire C A, Goldenstein B L, Floriddia E M, et al. Endogenous neural stem cell responses to stroke and spinal cord injury [J]. Glia, 2015, 63(8): 1469-82.
- [2] Reynolds B A, Weiss S J S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system

- [J]. *Science* ,1992 ,255(5052) : 1707 – 10.
- [3] Cao Q L , Zhang Y P , Howard R M , et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage[J]. *Exp Neurol* ,2001 ,167(1) : 48 – 58.
- [4] Fang H , Song P , Shen Y , et al. Bone mesenchymal stem cell-conditioned medium decreases the generation of astrocytes during the process of neural stem cells differentiation[J]. *J Spinal Cord Med* 2018 ,41(1) : 10 – 6.
- [5] Fang H , Song P , Shen C , et al. Bone mesenchymal stem cell-conditioned medium induces the upregulation of Smad6 , which inhibits the BMP-4/Smad1/5/8 signaling pathway[J]. *Neurol Res* , 2016 ,38(11) : 965 – 72.
- [6] Louvi A , Artavanis-Tsakonas S. Notch signalling in vertebrate neural development[J]. *Nat Rev Neurosci* , 2006 ,7(2) : 93 – 102.
- [7] Bai G , Sheng N , Xie Z , et al. Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1[J]. *Dev Cell* 2007 ,13(2) :283 – 97.
- [8] Furukawa T , Mukherjee S , Bao Z Z , et al. Rax , Hes1 , and notch1 promote the formation of Müller glia by postnatal retinal progenitor cells[J]. *Neuron* 2000 ,26(2) :383 – 94.
- [9] Imayoshi I , Ohtsuka T , Kageyama R. Roles of Hes genes in development of cerebral cortex and choroid plexus[J]. *Int J Dev Neurosci* 2006 ,24(24) : 516.
- [10] Neirinckx V , Agirman G , Coste C , et al. Adult bone marrow mesenchymal and neural crest stem cells are chemoattractive and accelerate motor recovery in a mouse model of spinal cord injury[J]. *Stem Cell Res Ther* ,2015 ,6 : 211.
- [11] Croft A P , Przyborski S A. Mesenchymal stem cells expressing neural antigens instruct a neurogenic cell fate on neural stem cells[J]. *Exp Neurol* ,2009 ,216(2) : 329 – 41.
- [12] Cantinieaux D , Quertainmont R , Blacher S , et al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation [J]. *PLoS One* ,2013 ,8(8) : e69515.
- [13] Irvin D K , Zurcher S D , Nguyen T , et al. Expression patterns of Notch1 , Notch2 , and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch - DSL signaling system during brain development[J]. *J Comp Neurol* 2001 ,436(2) : 167 – 81.
- [14] Wang L , Chopp M , Zhang R L , et al. The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal differentiation in adult neural progenitor cells after stroke [J]. *Neuron* ,2009 ,158(4) : 1356 – 63.

BMSC-CM promotes the effective differentiation of neural stem cells by inhibiting Notch1 signaling pathway

Tong Yi Song Peiwen Shen Cailiang et al

(Dept of Spine Surgery ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects of bone mesenchymal stem cell-conditioned medium (BMSC-CM) on differentiation of neural stem cells (NSCs) and the role of Notch1 signaling pathway. **Methods** The experiment was divided into four groups: control group (NSCs) 、Jagged treatment group (NSCs + 1 $\mu\text{g/ml}$ Jagged) 、BMSC-CM group (NSCs + BMSC-CM) 、BMSC-CM combined with Jagged group (NSCs + BMSC-CM + 1 $\mu\text{g/ml}$ Jagged). The differentiation of NSCs in each group was identified by immunofluorescence staining. Western blot was used to detect the expression of MAP-2 , GFAP and pathway related proteins Notch1 ,NICD ,Hes1 ,Hes5. **Results** Immunofluorescence analysis and Western blot showed that in BMSC-CM group the expression of MAP-2 was increased , while the expression of GFAP was decreased , compared to control group. In Jagged group , this phenomenon was opposite. As for the expressions of Notch1 , NICD ,Hes1 and Hes5 ,Jagged group was significantly higher than control group , BMSC-CM group was significantly lower than control group , BMSC-CM + Jagged group was below Jagged group , BMSC-CM + Jagged group was above the BMSC-CM group. **Conclusion** BMSC-CM promotes the differentiation of neural stem cells *in vitro* by inhibiting Notch1 pathway , increases the proportion of MAP-2 positive cells , and reduces the proportion of GFAP positive cells.

Key words NSCs; bone mesenchymal stem cell – conditioned medium; Notch1 signaling pathway