

网络出版时间: 2018-5-23 14:12 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.005.html>

BMSC-CM 通过抑制 Notch1 信号通路减轻 H_2O_2 诱导的神经干细胞凋亡

牛 杨¹, 申才良¹, 宋旆文¹, 刘晓颖²

摘要 目的 探讨骨髓间充质干细胞条件培养基(BMSC-CM)对氧化应激损伤的神经干细胞(NSCs)的保护作用,以及 Notch1 信号通路在其中所发挥的作用。方法 通过使用过氧化氢(H_2O_2)来模拟氧化应激环境,采用流式细胞仪检测 NSCs 的凋亡率。Western blot 法检测 Notch1 蛋白、Hes1 蛋白、含半胱氨酸的天冬氨酸水解酶 3 蛋白(Caspase-3)、Caspase-9、Bcl-2 相关蛋白(Bax)蛋白和 B 细胞淋巴瘤蛋白 2(Bcl-2)的表达量。结果 结果表明,BMSC-CM 可以降低 H_2O_2 引起的氧化应激环境的损害。BMSC-CM 可以抑制 Notch1 信号通路,提高神经干细胞的存活率。结论 BMSC-CM 可以通过抑制 Notch1 信号通路来中和氧化应激损伤对 NSCs 细胞凋亡的影响。

关键词 骨髓间充质干细胞条件培养基; 神经干细胞; 凋亡; 氧化应激; Notch 信号通路

中图分类号 R 329

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)06-0845-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.005

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)可导致严重的神经系统疾病,给个人家庭和社会造成巨大负担。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一类细胞,不仅可以自我复制,而且具有分化成多种神经细胞的潜力^[1]。研究^[2]表明,NSCs 可以分化为有助于损伤后脊髓组织修复的神经元。这一发现表明脊髓损伤后的功能恢复是可能的。然而,由于脊髓损伤后的氧化应激环境,移植入体内的 NSCs 很难存活^[3]。因此,减少氧化应激损伤成为 NSCs 治疗 SCI 的关键一环。

目前许多研究已经证明骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)对 SCI 的治疗作用。有学者发现 BMSCs 旁分泌液具有有效的

免疫调节和抗氧化应激特性^[4-5]。然而,其主要机制尚不清楚。有研究^[6]指出 Notch 信号通路在控制细胞增殖和凋亡中发挥关键作用。因此在该研究中,将着重研究骨髓间充质干细胞条件培养基(bone mesenchymal stem cell conditional medium, BMSC-CM)对体外 H_2O_2 诱导的 NSCs 的保护作用,以及 Notch1 信号通路(Notch1 signaling pathway, Notch1)在 NSCs 的氧化应激反应中的作用以及 BMSC-CM 的保护机制是否与 Notch1 相关联。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂 SD 大鼠获自安徽医科大学实验动物科学研究所;表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)购自美国 PeproTech 公司;DMEM 和 DMEM / F12 购自美国 Gibco BRL 公司;B27 购自美国 Invitrogen 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 HyClone 公司;GFAP 和 MAP-2 抗体、左旋多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司;细胞巢蛋白抗体(Nestin)、DAPT 购自美国 Santa Cruz 公司;膜联蛋白 V-FITC / PI 凋亡检测试剂盒购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.2 神经干细胞的培养 取 24~48 h 的 SD 小鼠,酒精消毒后脱臼处死,取出完整脑组织。使用解剖显微镜小心地剔除脑膜。将组织切成小块,加入胰酶消化液,而后放入恒温箱中 7 min,随后取出切碎的组织在巴斯德吸管中研磨。研磨后的组织通过滤网过滤,然后以 1 000 r/min 离心 5 min,去除上清液,重悬沉淀,再次以 1 000 r/min 离心 5 min,而后将沉淀的组织重新悬浮于增殖培养基(含有 2% B27 补充剂,20 ng/ml EGF 和 10 ng/ml bFGF 的 DMEM / F12 培养基)中。然后,将细胞以 10^5 个细胞/ml 的方式接种在烧瓶中,然后将细胞放在恒温箱中进行孵育。每 4 d 更换一次培养基。细胞培养 7 d 后,其增殖并形成悬浮的神经球,其直径约为 100 μ m。然后,吹散神经球,对神经干细胞进行传代培养。按照

2018-02-05 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 安徽医科大学生命科学院生物学系,合肥 230032

作者简介: 牛 杨,男,硕士研究生;

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

相同的程序培养第2代神经球。当细胞增殖并形成达到直径约为100 μm 的悬浮神经球时,将细胞用于实验。将第2代神经球移植到用聚-L-赖氨酸上油的盖玻片上。然后通过免疫细胞化学鉴定 NSCs。在神经球中发现巢蛋白阳性的许多细胞(图1A)。

1.3 培养细胞的分化免疫荧光染色实验 应用免疫细胞化学技术检测细胞的 MAP-2 表达。将传代培养7 d 后的神经干细胞吹散,而后接种在被多聚甲醛浸润过得玻片上,而后加入培养液,每3 d 更换一次培养液,7 d 后向培养物中加入4%多聚甲醛,使培养物在室温下静置15~20 min。然后,将培养物用 PBS 洗涤3次,每次5 min。细胞用含有10%正常山羊血清的0.3% Triton-X100 处理以在室温下封闭非特异性抗原30 min。然后,将培养物与抗 MAP-2 在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下过夜。第2天,将培养物用 PBS 洗涤3次,每次5 min。将特异性二抗加入到培养物中,并将培养物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育40~60 min。然后将细胞用 PBS 洗涤3次,每次5 min,并使用 DAPI 在室温下染色细胞核5~10 min。最后,将载玻片用 PBS 漂洗3次,并用荧光显微镜成像。使用相同的方法染色 GFAP(图1)。

1.4 制备 BMSCs 及其条件培养基 使用戊巴比妥钠用于处死大鼠。然后,从胫骨和股骨收集骨髓基质干细胞。将收集的组织悬浮液以1 000 r/min 离心5 min 以溶解红细胞。然后,使用 Krebs 缓冲液和0.83% NH_4Cl 的混合物在4 $^{\circ}\text{C}$ 下将沉积的细胞重新悬浮10 min。然后将组织洗涤2次,并以1 000 r/min 将培养物离心5 min。接下来,将沉淀的细胞重新悬浮在含有20% FBS 的 DMEM 中。将细胞以 10^6 个细胞/ml 接种在玻璃烧瓶中。使用细胞培养箱孵育 BMSCs(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)。48 h 后更换培养基,每4 d 更换一次。当细胞贴壁达到至少80%以上时,使用胰酶对间充质干细胞进行消化重悬,重复上述离心步骤,最后再以 10^5 个细胞/ml 将它们重新接种在玻璃烧瓶中。当细胞传至第3代时,贴壁率达90%时,使用倒置显微镜观察其形态。流式细胞仪鉴定 BMSCs^[4]。而后将培养基从玻璃烧瓶中取出,玻璃烧瓶用 Krebs 缓冲液洗涤3次。最后,用不含 FBS 的 DMEM 培养液培养 BMSCs 24 h,而后倒出培养液,并使用直径0.22 μm 的孔滤器获得所得条件培养基。

1.5 细胞分组和处理 将 NSCs 分为4组后进行编号,分别接种于24孔板中,每孔约1 ml,第一组为对照组,加入等量 PBS,第二组为 H_2O_2 处理组(50、

100、200 $\mu\text{mol/L}$),测定不同浓度 H_2O_2 对 NSCs 的影响,第三组为 H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理组 + DAPT 组(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$),测定不同浓度 DAPT 对损伤后 NSCs 的影响,第四组为 H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理组 + BMSC-CM 组(50、100、200 $\mu\text{mol/L}$),测定不同浓度 BMSC-CM 对损伤后 NSCs 的影响。各组均在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 温箱中培养2 h,而后通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6 细胞凋亡分析 通过 FITC-Annexin V / PI 染色试剂盒检测神经干细胞的凋亡。在 H_2O_2 处理2 h 后,通过离心(1 000 r/min、5 min) 收获细胞。然后,用冰冷的 PBS 洗涤细胞2次。然后将细胞与 FITC(5 μl) 和 PI(5 μl) 染色试剂盒在室温下避光环境中孵育15 min。然后使用流式细胞仪分析细胞。数据由 FACStation 数据管理系统和 Cell Quest 软件(美国, Becton Dickinson, San Jose 公司) 分析。

1.7 Western blot 分析 通过在2 000 r/min 离心5 min(室温) 收集细胞。然后将样品裂解。将样品缓冲液加入样品中(样品: 样品缓冲液 = 体积比为4:1)。然后,将样品重新悬浮并煮沸(5 min, 95~100 $^{\circ}\text{C}$)。接下来,在室温下以1 200 r/min 离心样品2 min。收集所得上清液进行 Western blot 分析。然后将上清液转移到聚偏二氟乙烯(PVDF) 上。随后用5%的无脂牛奶在室温下封闭膜2 h。然后将膜与结合的抗 Notch1(1:200),抗 Hes1(Hairy and enhancer of split 1, Hes1)(1:200),抗 B 细胞淋巴瘤蛋白2(B cell lymphoma 2, Bcl-2)(1:200),抗 Bcl-2 相关蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)(1:200),抗含半胱氨酸的天冬氨酸水解酶3蛋白(Cysteiny aspartate specific proteinase 3, Caspase-3)(1:200),抗含半胱氨酸的天冬氨酸水解酶9蛋白(Cysteiny aspartate specific proteinase 9, Caspase-9)(1:200) 和抗 β -肌动蛋白(1:1 000) 过夜。第2天,用 TBST 洗涤膜4次。然后将膜在二次抗体(1:4 000 稀释) 中在室温下温育2 h。之后,用 TBST 洗涤膜4次,共10 min。最后,使用 SuperSignal 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。使用 Epson V200 和 Quantity One 分析结果。

1.8 统计学处理 所有实验一式两份进行,重复至少3次。采用 SPSS 17.0 软件进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据用单因素方差分析(ANOVA) 进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 NSCs 鉴定 体外分离的神经干细胞培养 7 d 后,可见细胞聚集成球生长,选取贴壁后的神经球细胞行神经干细胞特异性蛋白 Nestin 荧光染色检测,结果见图 1A,见 Nestin 阳性表达。MAP-2 为神经元细胞特异性蛋白,GFAP 为神经胶质细胞特异性蛋白,对贴壁分化培养 7 d 后的神经干细胞进行免疫荧光染色,鉴定神经元及神经胶质细胞,结果见图 1B、1C,MAP-2 及 GFAP 均阳性表达,进一步证明体外分离细胞为神经干细胞。

2.2 H_2O_2 对 NSCs 细胞凋亡的影响 用不同浓度的 H_2O_2 (50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 分别处理 NSCs 2 h。通过流式细胞仪测定凋亡率。结果显示凋亡率随着 H_2O_2 浓度的增加而增加(图 2)。选用 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组,检测蛋白质的表达。Western blot 结果显示,与对照组相比,Notch1 ($t = 13.508, P < 0.01$),Hes1 ($t = 15.150, P < 0.01$),Caspase-3 ($t = 23.800, P < 0.01$),Caspase-9 ($t = 19.682, P < 0.01$) 和 Bax ($t = 14.002, P < 0.01$) 蛋白的表达明显升高,

而 Bcl-2 ($t = 33.389, P < 0.01$) 的表达则明显低于对照组(图 3)。

2.3 DAPT 可保护神经干细胞免受 H_2O_2 诱导的细胞凋亡 为了研究 Notch1 信号通路在 H_2O_2 诱导的氧化应激中的作用,将不同浓度的 DAPT (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 加入到用 H_2O_2 处理的 NSCs (2 h、100 $\mu\text{mol/L}$) 中。通过流式细胞术测量细胞活力。随着 DAPT 浓度的增加,细胞存活率显著增加。实验数据分析结果见图 4。通过 Western blot 检测 H_2O_2 + DAPT (10 $\mu\text{mol/L}$) 组蛋白的表达。结果表明与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组比较,Notch1 ($t = 9.470, P < 0.01$),Hes1 ($t = 8.728, P < 0.01$),Caspase-3 ($t = 10.035, P < 0.01$),Bax ($t = 8.386, P < 0.01$) 和 Caspase-9 ($t = 15.062, P < 0.01$) 蛋白明显降低;而 Bcl-2 ($t = 3.375, P < 0.05$) 的表达显著增加(图 5)。

2.4 BMSC-CM 保护神经干细胞免受 H_2O_2 诱导的细胞凋亡 为了研究 BMSC-CM 在 H_2O_2 诱导的 NSCs 氧化应激中的保护作用,将不同浓度的 BMSC-CM 加入到 H_2O_2 处理过的神经干细胞中 (100 $\mu\text{mol/L}$, 2 h)。通过流式细胞术测量细胞凋亡率。

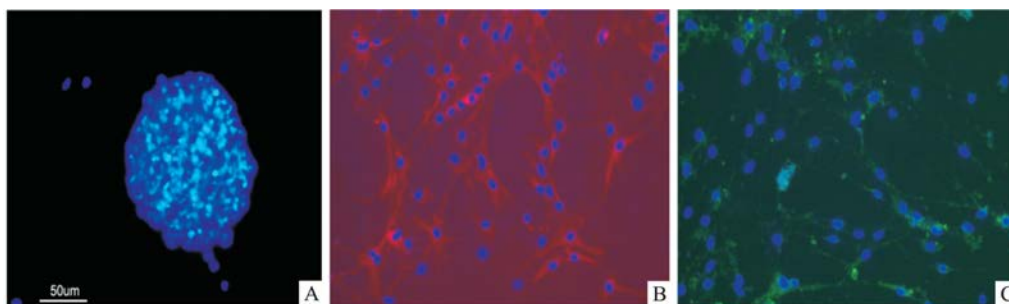


图 1 神经干细胞免疫荧光染色结果 $\times 400$
A: 神经球; B: MAP-2; C: GFAP

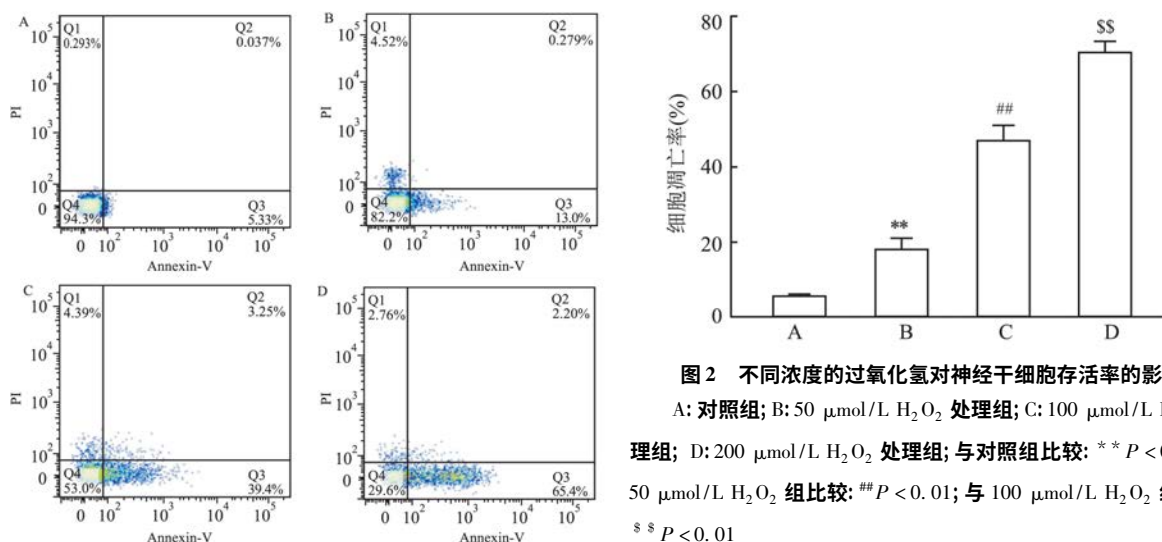


图 2 不同浓度的过氧化氢对神经干细胞存活率的影响

A: 对照组; B: 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组; C: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组; D: 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 50 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组比较: ## $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组比较: §§ $P < 0.01$

当 BMSC-CM 的浓度增加时,细胞存活率显著增加。实验数据分析结果见图 6。另外,Western blot 检测 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ BMSC-CM 组蛋白的

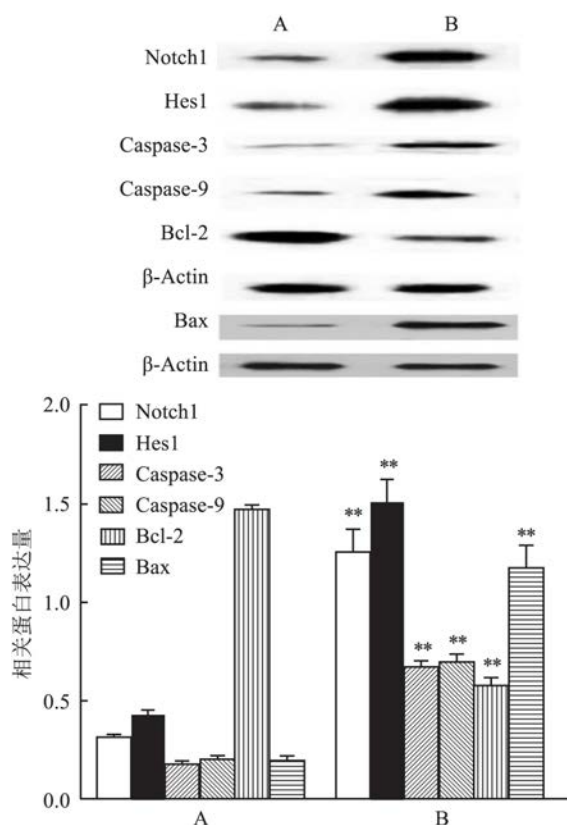


图3 加入 H_2O_2 后 NSCs 相关蛋白表达量比较

A: 对照组; B: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

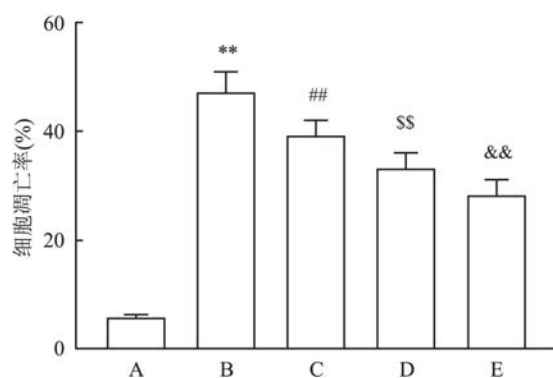


图4 向 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 中加入不同浓度的 Notch 通道阻滞剂(DAPT) 后对神经干细胞存活率的影响

A: 对照组; B: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组; C: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT 处理组; D: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 10 $\mu\text{mol/L}$ DAPT 处理组; E: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 20 $\mu\text{mol/L}$ DAPT 处理组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组比较: ## $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 5 $\mu\text{mol/L}$ DAPT 组比较: §§ $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 10 $\mu\text{mol/L}$ DAPT 组比较: §§ $P < 0.01$

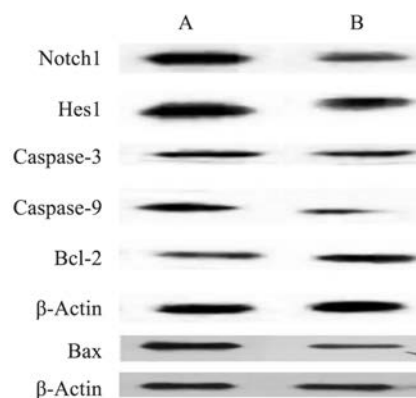


图5 加入 DAPT 后受损 NSCs 相关蛋白表达量比较

A: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组; B: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 10 $\mu\text{mol/L}$ DAPT 处理组; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

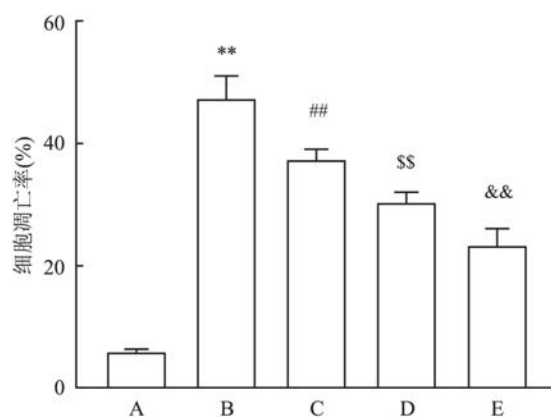


图6 向 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 中加入不同浓度的 BMSC-CM 后对神经干细胞存活率的影响

A: 对照组; B: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组; C: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 50 $\mu\text{mol/L}$ BMSC-CM 处理组; D: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ BMSC-CM 处理组; E: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 200 $\mu\text{mol/L}$ BMSC-CM 处理组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 组比较: ## $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 50 $\mu\text{mol/L}$ BMSC-CM 组比较: §§ $P < 0.01$; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ BMSC-CM 组比较: §§ $P < 0.01$

表达。与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组比较, Notch1 ($t = 9.920, P < 0.01$), Hes1 ($t = 10.250, P < 0.01$), Caspase-3 ($t = 10.996, P < 0.01$), Bax ($t = 10.136, P < 0.01$) 和 Caspase-9 ($t = 10.824, P < 0.01$) 明显降低, 而 Bcl-2 ($t = 4.353, P < 0.05$) 的表达则显著增加 (图 7)。

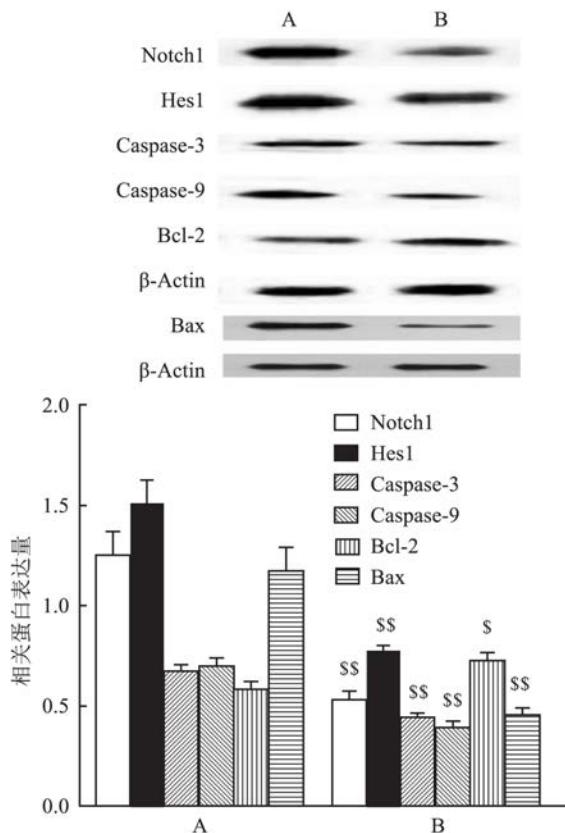


图 7 加入 BMSC-CM 后受损 NSCs 相关蛋白表达量比较

A: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组; B: 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 + 100 $\mu\text{mol/L}$ BMSC-CM 处理组; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

本研究结果表明 BMSC-CM 可以减少用 H_2O_2 处理的 NSCs 的凋亡。此外, 当把 BMSC-CM 加入到 H_2O_2 诱导的神经干细胞时, Notch1 和 Hes1 的表达降低。这些结果表明, BMSC-CM 可能是通过抑制 Notch1 信号通路减弱氧化应激损伤从而产生对 NSCs 的保护作用。

脊髓损伤后的氧化应激环境是影响干细胞移植治疗的关键因素。最近的一项研究^[8]表明, H_2O_2 可模拟氧化应激环境, 诱导细胞功能障碍和细胞凋亡。在本研究中, 在 H_2O_2 的帮助下, 模拟了 NSCs 培养

过程中的氧化应激环境。结果表明, 当向神经干细胞中加入 H_2O_2 后, 细胞凋亡率随之增加。这与 Wang et al^[8] 的研究是相一致的。

Boopathy et al^[9] 之前已经研究发现, 当细胞暴露于 H_2O_2 时, Notch1 信号通路可以被激活。当 Notch1 信号通路被激活时, 细胞膜上的 Notch1 受体与其相邻的配体 (Delta 和 Jagged) 组合。随后, 肿瘤坏死因子 α 转换酶 (TACE- α) 和早老素 1 (2) (PS1 / 2) 参与酶过程, 切除大部分 Notch1 受体的细胞外结构域, 然后释放 Notch1 细胞内结构域 (NICD) 进入细胞质。在 NICD 进入细胞质后, 其进一步转移到细胞核中, 其结合 DNA 结合蛋白 CBF / RBP-JK 以形成转录激活物并激活其相关的下游基因。在哺乳动物中, Notch 的主要下游靶基因是 HES (分裂的毛发/增强子) 和 ESR 基因家族中的基因, 如 Hes-1 和 Hes-5^[10]。在本文中, 通过 Western blot 蛋白检测结果显示, 当加入 H_2O_2 后 Notch1 和 Hes1 的表达会增加, 这与之前研究^[11-12] 结果相一致。为了进一步研究 Notch1 信号通路对 H_2O_2 诱导的 NSCs 细胞凋亡的影响, 使用 DAPT 用于特异性阻断 Notch1 信号通路。结果显示当 DAPT 加入后细胞存活率显著提高, 而且细胞的凋亡率与 DAPT 的浓度呈负相关性。

近几年研究^[13] 显示 BMSC-CM 具有神经保护作用, 因此 BMSC-CM 被认为是神经损伤疾病中的潜在治疗剂。然而, 神经干细胞中 BMSC-CM 的具体机制尚未公开。本研究设计了一个实验组, 通过向 H_2O_2 诱导后的神经干细胞加入 BMSC-CM 来验证条件培养基的保护作用。结果显示加入 BMSC-CM 处理后的实验组, 细胞存活率明显增强。为了进一步研究 BMSC-CM 与 Notch1 信号通路的关系, 采用 Western blot 法检测 Notch1 和 Hes1 的表达。结果表明加入 BMSC-CM 实验组, Notch1 和 Hes1 表达量显著降低。结合以上的实验结果表明, Notch1 信号通路是调节神经干细胞凋亡的重要通路, 且条件培养基可以通过抑制 Notch1 信号通路提高神经干细胞的存活率。

研究^[14] 证明, Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 家族在调节细胞凋亡中起关键作用, 是细胞存活途径的重要成员, 当 Caspase-3 被激活后, 可以激活更多的下游凋亡因子, 如 Caspase-6 和 Caspase-9, 这将进一步增强对细胞的凋亡作用。Bcl-2 可以抑制多种细胞毒性因子提高细胞存活率。Bcl-2 的过度表达可以减少氧自由基的产生和脂质过氧化物的形成。因此目前有学者认为 Bcl-2 的表达强弱可以作为细胞对细

胞毒素的抵抗力的观察指标^[3],表明 Bcl-2 是凋亡过程执行步骤的重要组成部分。在本研究中,BMSC-CM 和 DAPT 可以抑制 Caspase-3、Caspase-9、Bax 的表达,并增强 Bcl-2 的表达。这些结果表明 Notch1 途径可能与 Bax、Bcl-2 和 Caspase 家族相关,BMSC-CM 通过参与调节神经干细胞中 Bcl-2 表达和 Caspase 家族来减弱细胞凋亡。

参考文献

- [1] Bergstr M T. Neural stem cells: brain building blocks and beyond [J]. *Ups J Med Sci*,2012,117(2):132-42.
- [2] Badner A, Siddiqui A M, Fehlings M G. Spinal cord injuries: how could cell therapy help [J]. *Expert Opin Biol Ther*,2017,17(5):529-41.
- [3] Sohn H M, Hwang J Y, Ryu J H, et al. Simvastatin protects ischemic spinal cord injury from cell death and cytotoxicity through decreasing oxidative stress: *in vitro* primary cultured rat spinal cord model under oxygen and glucose deprivation-reoxygenation conditions [J]. *J Orthop Surg Res*, 2017, 12(1):36.
- [4] Roshanzamir F. Quercetin attenuates cell apoptosis of oxidant-stressed SK-N-MC cells while suppressing up-regulation of the defensive element, HIF-1 α [J]. *Neuroscience*, 2014, 277:780-93.
- [5] Chen S D, Yin J H, Hwang C S, et al. Anti-apoptotic and anti-oxidative mechanisms of minocycline against sphingomyelinase/ceramide neurotoxicity: implication in Alzheimer's disease and cerebral ischemia [J]. *Free Radic Res*,2012,46(8):940-50.
- [6] Shi Y, Hu Y, Lv C. Effects of reactive oxygen species on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Ann Transplant*, 2016, 21:695-700.
- [7] 李海太, 申才良, 宋旒文, 等. BMP-4 对大鼠骨髓间充质干细胞与神经干细胞共培养转归影响的实验研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(2):205-9.
- [8] Wang S, Zhang T, Yang Z, et al. Heme oxygenase-1 protects spinal cord neurons from hydrogen peroxide-induced apoptosis via suppression of Cdc42/MLK3/MKK7/JNK3 signaling [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(3):449-62.
- [9] Boopathy A V, Pendergrass K D, Che P L, et al. Oxidative stress-induced Notch1 signaling promotes cardiogenic gene expression in mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*,2013,4(2):43.
- [10] Deskin B, Lasky J, Zhuang Y. Requirement of HDAC6 for activation of Notch1 by TGF- β 1 [J]. *Sci Rep*,2016,6:31086.
- [11] Tang G, Liu Y, Zhang Z, et al. Mesenchymal stem cells maintain blood-brain barrier integrity by inhibiting aquaporin-4 upregulation after cerebral ischemia [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(12):3150-62.
- [12] Kamarehei M. Modulation of notch signaling pathway to prevent H₂O₂/menadione-induced SK-N-MC cells death by EUK134 [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(7):1037-45.
- [13] Cui C, Cui Y, Gao J, et al. Intraparenchymal treatment with bone marrow mesenchymal stem cell-conditioned medium exerts neuroprotection following intracerebral hemorrhage [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4):2374-82.
- [14] Hsieh M J, Lin C W, Chen M K, et al. Inhibition of cathepsin S confers sensitivity to methyl protodioscin in oral cancer cells via activation of p38 MAPK/JNK signaling pathways [J]. *Sci Rep*, 2017, 7:45039.
- [15] Ding Y, Tian Y, Zeng Z, et al. YC13 promotes neuronal cell death by inducing apoptotic pathways in rats [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:2183658.

BMSC-CM reduces the effects of oxidative stress damage on neural stem cells by inhibiting Notch1 signaling pathway

Niu Yang, Shen Cailiang, Song Peiwen, et al

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

Abstract Objective To investigate the protective effect of bone marrow mesenchymal stem cell conditioned medium (BMSC-CM) on oxidative stress-injured neural stem cells (NSCs) and the role of Notch1 signaling pathway. **Methods** The oxidative stress environment was simulated by hydrogen peroxide (H₂O₂), and the apoptosis rate of NSCs was detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression of Notch1, Hes1, Caspase-3, Caspase-9, Bax and Bcl-2. **Results** BMSC-CM could significantly attenuate oxidative stress environment. BMSC-CM could inhibit Notch1 signaling pathway and improve the survival rate of neural stem cells. **Conclusion** These results indicate that BMSC-CM could neutralize the effect of oxidative stress injury on NSCs by inhibiting Notch1 signaling pathway.

Key words BMSC-CM; NSCs; apoptosis; oxidative stress; Notch signaling pathway