



# 构建芯片技术探讨人参皂苷 R<sub>g1</sub> 促进人神经干细胞分化的机制

赵香琴<sup>1</sup>, 李英博<sup>1</sup>, 姜英虹<sup>1</sup>, 陈笛<sup>1</sup>, 姜蓉<sup>2</sup>, 王莎莉<sup>1\*</sup>

(1. 重庆医科大学 神经科学研究中心 重庆市神经生物重点实验室, 重庆 400016;  
2. 重庆医科大学 干细胞与组织工程研究室, 重庆 400016)

**[摘要]** 目的:采用基因芯片技术筛选出人参皂苷 R<sub>g1</sub> 促进 NSCs 分化的主要分子靶点。方法:通过基因芯片技术,观察 R<sub>g1</sub> 诱导人神经干细胞(neural stem cells, NSCs)向神经元分化 7 d 时靶基因表达,通过数据演算筛选出 R<sub>g1</sub> 促进 NSCs 分化的最主要的靶基因和信号转导途径,然后采用 Western blot 和免疫组化的方法对其中的 ERK 信号分子进行验证。结果:在 R<sub>g1</sub> 诱导 NSCs 分化第 7 天时,获得差异基因 675 个,其中显著上调的基因 255 个,显著下调的基因 420 个;MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)通路中的 ERK1/2(细胞外信号调节蛋白激酶)信号分子与 NSCs 分化直接相关。经 Western blot 和免疫组化证实,在 R<sub>g1</sub> 诱导 NSCs 分化中,ERK1/2 蛋白明显上调,磷酸化水平也明显增强,此作用能够被 PD98059(ERK1/2 阻断剂)所阻断,同时 PD98059 也可以明显阻断 NSCs 的分化。结论:ERK1/2 是人参皂苷 R<sub>g1</sub> 促进 NSCs 分化的重要分子靶点。基因芯片筛选出的差异表达基因可能为研究 R<sub>g1</sub> 促进 NSCs 分化的分子机制提供线索。

**[关键词]** 人参皂苷 R<sub>g1</sub>;人神经干细胞;分化;基因芯片

人参是我国名贵中药,具有“补气生血”的功效,对机体神经、免疫、心血管等多个系统有显著的保护和治疗作用<sup>[1-3]</sup>。作者前期的实验也证实人参皂苷 R<sub>g1</sub> 能明显促进人神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的分化,同时对蛛网膜下腔出血和帕金森模型鼠有显著的神经保护作用<sup>[4-5]</sup>。中药作用的最大特点就是多系统、多环节同时作用于机体,显然这种调控作用必然是通过多个分子靶点和信号途径实现的。要从众多基因中筛选出药物作用的分子靶点,基因芯片技术无疑是最佳选择之一。然而,利用基因芯片技术来研究人参皂苷 R<sub>g1</sub> 促进 NSCs 分化的机制未见报道。

本实验通过基因芯片检测技术,观察 R<sub>g1</sub> 诱导人 NSCs 分化过程中靶基因的表达,通过图形比对、Pathway 分析、数据演算最终筛选出 R<sub>g1</sub> 促进 NSCs 分化的最主要的目的基因和信号转导途径,再采用 Western blot 和免疫组化的方法对筛选出的靶基因进行验证,以揭示 R<sub>g1</sub> 诱导人 NSCs 分化的分子机制。

## 1 材料和方法

**1.1 药品与试剂** 人参皂苷 R<sub>g1</sub> (中国药品生物制品检定所);ERK1/2 抗体,p-ERK1/2 抗体,Nestin 抗体(rabbit anti human-Nestin) (Santa Cruz 公司);PD98059(ERK1/2 阻断剂,美国 Sigma 公司);DMEM/F12 培养基、神经干细胞培养添加剂 B27、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF) (美国 Chemicon 公司);生物素标记二抗、通用型免疫组化 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司);Western blot 试验试剂盒(上海碧云天公司);SBC-Phalanx 人类全基因组表达谱芯片(上海生物芯片有限公司)。

**1.2 芯片所需细胞的总 RNA 抽提(Trizol 法)** 将第 3 代 NSCs(本实验室常规培养<sup>[6]</sup>,其取材操作经重庆医科大学伦理委员会批准),接种培养瓶中,撤除生长刺激因子 EGF 和 bFGF。试验分为对照组(神经干细胞常规培养)和 R<sub>g1</sub> 组(20 mg · L<sup>-1</sup>):R<sub>g1</sub> 诱导分化后神经细胞。细胞培养 7 d 后,采用 Trizol 法提取出所需细胞的总 RNA。然后测定 A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub>,用 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 来判定 RNA 纯度。并用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

**1.3 荧光探针的制备(采取反转 cDNA 第 1 链标记)**

**[稿件编号]** 20111024005

**[基金项目]** 重庆市自然科学基金项目(cstc2011jjA10031)

**[通信作者]** \* 王莎莉,教授,博士生导师, Tel: (023) 68486815, E-mail: ypsnali@gmail.com



在 PCR 管中配制总 RNA 变性反应体系。70 °C 预变性 5 min。变性反应结束后在 PCR 管中配制 cDNA 第 1 链合成反应体系,体系内含 Cy3/Cy5 荧光标记。

**1.4 芯片杂交** 取出经定量的 Cy3 和 Cy5 标记的探针,混合于 PCR 管内,放置于真空干燥仪中避光抽干,最后用双蒸水充分溶解。将溶解的探针置于 PCR 仪中 94 °C 变性。反应结束后,加入杂交缓冲液和甲酰胺。吸取杂交液滴加在芯片的一端,并缓慢盖上盖玻片。将上述杂交芯片水平放入加有 PBS 的杂交盒,置 42 °C 杂交箱中避光杂交 16 ~ 18 h。

**1.5 芯片洗涤及图像的获取** 16 ~ 18 h 杂交结束后,用镊子取出片子,浸入经过 55 °C 预热的洗液中洗涤 3 次。最后将芯片取出放入芯片盒,避光保存于干燥器中。用 Agilent 扫描仪扫描获取图像。

**1.6 数据分析** 将图像导入图像分析软件,经过自动和人工定位与排列,确定杂交点的范围,提取得到基因表达的荧光信号强度值,最后通过标准化,计算得到 ratio 值(2 种荧光 cy3 与 cy5 的比值)。一般认为 ratio 值在 0.5 ~ 2.0 的基因不存在显著的表达差异,而在该范围之外的基因则被认为表达出现显著改变。然后使用 genespring 和 cluster 分析软件进行聚类分析,用 Pathway 进行基因信号通路分析。Pathway 分析对试验结果有重要的提示作用,通过差异基因的 Pathway 分析,可以找到富集差异基因的 Pathway 条目,寻找不同样品的差异基因和某些细胞通路的改变有关。

**1.7 Western blot 分析** 按常规进行蛋白样品制备(样品分组同基因芯片),并进行蛋白含量的测定。取出样品,采用 SDS-PAGE 电泳(电压 60 V,4 ~ 5 h)。电泳至溴酚蓝刚跑出即终止电泳,进行转膜(90 V,1.5 h)。然后将膜用 ERK1/2 抗体(1:1 000)和 p-ERK1/2 抗体(1:1 000)4 °C 孵育过夜。TBST 漂洗后,膜与二抗室温下孵育 1 ~ 2 h, TBST 充分洗膜 3 次后,进行 ECL 化学发光反应。用凝胶图象处理系统将胶片进行扫描,并分析目标带的吸光度值。

**1.8 免疫组化检测** 采用 ERK 信号通路特异性阻断剂 PD98059,先与细胞孵育 1 h,然后加入 20 mg · L<sup>-1</sup> 的 Rg<sub>1</sub>。7 d 后,免疫细胞化学检测分化细胞的神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE),神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP),半乳糖脑苷脂(galactocerebroside, Gal-c)的表达。采用 Nikon 显微摄影系统,在 400 倍数下,每个盖玻片上随机选 5 个视野,计数每个视野

的阳性细胞数和细胞总数,最后计算出阳性细胞所占的比例。以分析 ERK 信号通路特异性阻断剂 PD98059 应用后对 NSCs 分化为神经元样细胞,星形胶质细胞和少突胶质细胞的影响。

**1.9 统计学处理** 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组之间两两比较用方差分析(*q* 检验)。

## 2 结果

**2.1 各组细胞的总 RNA** 从细胞中提取的总 RNA,经紫外分光光度计测定  $A_{260}$ ,  $A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{280}$  均大于 1.9,表明纯度高。用 1.0% 的甲醛变性凝胶电泳,可见清楚的 28S, 18S, 5S 3 条条带,表明 RNA 完整性好,无降解现象,符合总 RNA 要求,见图 1。

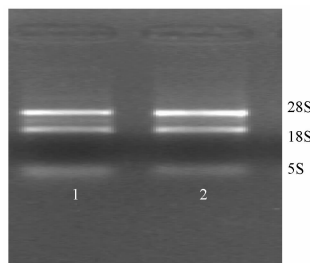


图 1 RNA 电泳样品

Fig. 1 RNA electrophoresis sample

**2.2 基因芯片杂交图像** 在激光共聚焦扫描的图像上,对于某一点的信号,如果 cy3 信号较强,该点显绿色,表示基因上调;若 cy5 信号较强,该点显红色,表示基因下调;如果强度相似,即显黄色,见图 2。基因芯片杂交信号强度散点图见图 3。每个点的横坐标表示对照组基因的信号值,纵坐标表示 Rg<sub>1</sub> 基因的信号值。每 1 个点代表 1 个基因,图中 1 对线依次表示  $y = mx$ ,  $y = 1/mx$ , 分别表示差异是 2 倍。图 3 代表了 2 组之间荧光信号比值的离散程度,越靠近 X 轴或 Y 轴表明该基因差异表达越显著。

**2.3 基因芯片图像分析** 对上述数据进行标准化处理、分析, Rg<sub>1</sub> 诱导 NSCs 分化前后差异基因共有 675 个,其中上调的基因有 255 个(ratio > 2),下调的基因有 420 个(ratio < 0.5)。基因的种类主要有:细胞生物合成相关基因、细胞代谢相关基因、转录正向调控相关基因、中枢神经系统发育相关基因、细胞分化调节相关基因、离子通道活性相关基因等。分别占差异基因总数的 21.6%, 11.7%, 6.4%, 5.1%, 3.4%, 1.5%。



255个,显著下调的基因420个。通过聚类分析,统计出这些差异基因主要有与细胞生物合成、细胞代谢、转录正向调控、中枢神经系统发育、细胞分化、离子通道活性等功能相关的基因。它们分别占差异基因总数的21.6%,11.7%,6.4%,5.1%,3.4%,1.5%,其余的基因主要与遗传信息传递、免疫应答等功能相关。这些结果提示,Rg<sub>1</sub>促进NSCs分化的机制并非单一途径,体现了中药作用的多靶向性,同时也为探讨Rg<sub>1</sub>促进NSCs分化的分子机制提供了新的思路。

为确定与调控NSCs分化直接相关的差异靶基因所激活的信号途径,作者又进行了差异基因同Pathway的超几何分布关系的计算,并对其进行通路定位。通过Pathway数据演算发现,ERK(细胞外信号调节蛋白激酶)-MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)通路在Rg<sub>1</sub>诱导NSCs分化中扮演重要角色,而cAMP(环磷酸腺苷)-PKA(蛋白激酶A)和PI3K(磷脂酰肌醇-3激酶)-AKT信号传导通路在Rg<sub>1</sub>促增殖过程中发挥重要作用。

Pathway的变化可以由参与这条Pathway途径的蛋白的表达量或者蛋白的活性改变引起,它们在一定程度上反映了蛋白质之间的相互作用。但是通过芯片技术所获得的是编码这些通路上蛋白质的mRNA表达量的变化,从mRNA到蛋白表达还要经过microRNA调控,翻译调控,翻译后修饰(如糖基化,磷酸化),蛋白运输等一系列的调控过程,mRNA表达量和蛋白表达量之间往往不具有线性关系,因此mRNA的改变不一定意味着蛋白表达量的改变。同时,细胞还可以在维持蛋白量不变的情况下,通过蛋白磷酸化程度的改变(调节蛋白的活性)来调节通路的功能<sup>[9-10]</sup>。因此芯片数据Pathway分析的结果需要有后期蛋白质功能实验的支持。为此又采用Western blot、免疫组化方法特别对Pathway分析有明显上调的ERK1/2蛋白进行了验证,以验证ERK1/2蛋白是否是Rg<sub>1</sub>调控NSCs分化的分子靶点,也可以排除芯片技术中可能出现的假阳性结果。实验证实,在Rg<sub>1</sub>诱导神经干细胞分化7d时,ERK1/2总蛋白的表达与NSCs分化时间正相关;在

加入Rg<sub>1</sub>10min时,ERK1/2蛋白磷酸化被激活,30min达到高峰,60min消失,同时ERK1/2蛋白以及蛋白的磷酸化都明显强于对照组( $P < 0.05$ );当用PD98059特意性阻断ERK1/2时,ERK1/2蛋白和蛋白的磷酸化以及NSCs分化为神经元样细胞和胶质细胞都显著降低( $P < 0.05$ ),得出了Pathway分析的同样结果。综上所述,ERK1/2是人参皂苷Rg<sub>1</sub>促进NSCs分化的重要分子靶点。基因芯片筛选出的差异表达基因可以为研究Rg<sub>1</sub>促进NSCs分化的分子机制提供新的线索。

#### [参考文献]

- [1] 王明波. 人参皂苷Rg<sub>1</sub>对神经保护作用机制的研究进展[J]. 中国保健营养: 临床医学学刊, 2008, 17(5): 69.
- [2] 张建平, 司银楚, 朱培纯. 人参皂苷Rg<sub>1</sub>诱导大鼠海马神经干细胞分化的实验研究[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 3: 335.
- [3] 崔荣太, 蒲传强, 刘洁晓, 等. 人参皂苷Rg<sub>1</sub>对大鼠局灶性脑缺血后侧脑室下区神经干细胞增殖分化的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2007, 9(10): 707.
- [4] Li Yingbo, Tang Jiping, Nikan H, et al. Ginsenoside Rb<sub>1</sub> reduces neurologic damage, is anti-apoptotic, and down-regulates p53 and BAX in subarachnoid hemorrhage[J]. Curr Neurovasc Res, 2010, 7(2): 85.
- [5] Li Yingbo, Wang Shali. Total saponins of *Panax ginseng* effects on proliferation and differentiation of human embryonic neural stem cells and in a Parkinson's disease mouse model[J]. Neural Regener Res, 2009, 4(3): 186.
- [6] 冯敏, 胡晶, 王莎莉. 3~18周胎龄人胚胎神经干细胞的分离、培养及鉴定[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(4): 366.
- [7] Sharova L V, Sharov A A, Nedorezov T, et al. Database for mRNA half-life of 19977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells[J]. DNA Res, 2009, 16(1): 45.
- [8] Chen H, Qian K, Tang Z P, et al. Bioinformatics and microarray analysis of microRNA expression profiles of murine embryonic stem cells, neural stem cells induced from ESCs and isolated from E8.5 mouse neural tube[J]. Neural Res, 2010, 32(6): 603.
- [9] Ouyang Z, Zhou Q, Wong W H. ChIP-Seq of transcription factors predicts absolute and differential gene expression in embryonic stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci MS A, 2009, 106(51): 21521.
- [10] Elliott A M, Elliott K A, Kammesheidt A. High resolution array-CGH characterization of human stem cells using a stem cell focused microarray[J]. Mol Biotechnol, 2010, 46(3): 234.



## Study on mechanism of ginsenoside Rg<sub>1</sub>-induced human neural stem cells differentiation by genechip

ZHAO Xiangqin<sup>1</sup>, LI Yingbo<sup>1</sup>, JIANG Yinghong<sup>1</sup>, CHEN Di<sup>1</sup>, JIANG Rong<sup>2</sup>, WANG Shali<sup>1\*</sup>

(1. *Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;*

2. *Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China*)

[**Abstract**] **Objective:** The molecular targets of ginsenoside Rg<sub>1</sub>-induced neural stem cells (NSCs) differentiation were screened by genechip. **Method:** 7<sup>th</sup> day following ginsenoside Rg<sub>1</sub> induced human neural stem cells to neurons the gene expression was observed by genechip. The purpose gene and signal transduction pathways were selected by the data calculations, and then confirmed by western blot and immunohistochemical method. **Result:** 7<sup>th</sup> day following Rg<sub>1</sub>-induced NSCs differentiation, there were about 675 different genes, 255 genes of which were up-regulated and 420 genes down-regulated obviously. Meanwhile the ERK1/2 (extracellular signal-regulated protein kinase) in MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway was related with the NSCs differentiation. The Western blot and immunohistochemistry detection confirmed that ERK 1/2 protein and its phosphorylation were significantly increased, which can be blocked by PD98059 (ERK1 / 2 inhibitor). In addition, differentiation rate of NSCs was also decreased obviously in ginsenoside Rg<sub>1</sub>-induced differentiated NSCs when ERK blocker PD98059 was used. **Conclusion:** ERK1/2 is an important molecular target in ginsenoside Rg<sub>1</sub>-induced NSC differentiation. The selected differentially expressed genes by genechip may provide new clues to study of ginsenoside Rg<sub>1</sub>-induced NSCs differentiation.

[**Key words**] ginsenosides; human neural stem cells; differentiation; genechip

doi:10.4268/cjcm20120421

[责任编辑 张宁宁]