文章编号:1000-5404(2008)19-1787-04

论著

EDS对新生SD大鼠海马神经干细胞增殖分化的作用

储卫华[1],詹梦熊[1],朱 刚[1],陈 志[1],刘 智[1],唐卫华[1],胡 荣[1],麻彤辉[2],冯 华[1] ([1]第三军医大学西南医院神经外科,全军神经系统疾病微创诊治中心,重庆 400038;[2]东北师范大学生命科学学院,长春 130024)

摘 要:目的 观察在不同剂量蜕皮甾酮(ecdysterone,EDS)作用下,体外培养的神经干细胞(neural stem cells,NSCs)增殖、分化情况。**方法** 原代培养新生SD大鼠海马NSCs,经EDS处理后,传代细胞克隆形成率、四甲基偶氮唑盐比色法观察神经干细胞增殖能力的变化,免疫荧光细胞染色技术、流式细胞术检测神经干细胞分化情况。**结果** 与对照组相比,中低剂量组(50、100、200 mg/L),对大鼠海马NSCs增殖能力无显著影响,而高剂量的EDS(400 mg/L及800 mg/L)干预组则明显抑制了NSCs的增殖。在分化条件下,EDS200 mg/L干预组显著提高NSCs向神经元分化的比例,其余各组无统计学差异。**结论** EDS能够调节体外培养的大鼠海马NSCs的增殖和分化水平,在合适的剂量下明显提高了神经元的分化比例。

关键词: 蜕皮甾酮;神经干细胞;增殖;分化
中图法分类号: R285.5;R329.21;R329.25 **文献标识码:** A

Effects of ecdysterone on proliferation and differentiation of rat neural stem cells *in vitro*

CHU Wei-hua[1], ZHAN Meng-xiong[1], ZHU Gang[1], CHEN Zhi[1], LIU Zhi[1], TANG Wei-hua[1], HU Rong[1], MA Tong-hui[2], FENG Hua[1] ([1]Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Institute of Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of ecdysterone (EDS) on proliferation and differentiation of rat hippocampal neural stem cells (NSCs) *in vitro*. **Methods** NSCs of SD rat hippocampus were isolated and cultured in serum-free medium containing bFGF and EGF, then different doses of EDS were used to treat the NSCs. Clone counting and MTT assays were performed for the proliferation of NSCs; Immunofluorescence and flow cytometry were carried out for the cell differentiation. **Results** High doses of EDS (400 and 800 mg/L) treatment markedly inhibited the proliferation of rat hippocampal NSCs, while the low doses of EDS (50, 100 and 200 ng/L) exhibited no effects on the NSCs proliferation. Treatment of NSCs with 200 mg/L EDS markedly increased the neurogenesis of NSCs in differential medium, while NSCs of other doses did not. **Conclusion** EDS regulates the proliferation and differentiation of NSCs *in vitro*, whereas only 200 mg/L EDS can increase the neurogenesis of rat hippocampal NSCs.

Key words: ecdysterone; neural stem cells; proliferation; differentiation

蜕皮甾酮(ecdysterone,EDS)是活血化瘀中药牛膝的有效单体成分,在动植物界均有分布。研究表明,EDS生物学功能广泛,具有促进蛋白核酸的合成、调节免疫应答、影响神经递质代谢等多种作用。最近的研究表明,作为内源性甾体激素,EDS在昆虫类生物大脑神经发育中起重要的调控作用,在不同的分泌浓度下,它能诱导昆虫类神经干细胞的增殖、分化甚至凋亡[1,2]。但EDS对哺乳动物神经干细胞(neural stem cells,NSCs)的增殖与分化是否也有调控作用目前鲜见报道。因此,我们以新生SD大鼠为研究对象,进行了离体实验,观察在不同剂量EDS作用下海马NSCs增殖分化情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 出生48 h之内SD乳大鼠5只,由第三军医大学实验动物中心提供,所有动物实验过程和操作均按科技部

基金项目:国家自然科学基金(30770508);全军"十一五"计划中药新药研发项目(2006181002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30770508) and the Chinese Traditional Medicine Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (2006181002)

作者简介:储卫华,男,安徽省池州市人,博士研究生,医师,主要从事神经创伤救治与修复方面的研究。电话:(023)68765260, E-mail:weihua9871@163.com
通信作者:冯华,E-mail:fenghua8888@yahoo.com

收稿日期:2008-01-31;修回日期:2008-04-24

《关于善待实验动物的指导性意见》有关规定执行。

1.1.2 试剂 细胞培养基 DMEM/F12、B27 添加剂(Gibico),胎牛血清(杭州四季青),碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)为 Sigma 产品。一抗:小鼠抗巢蛋白单单克隆抗体(Nestin,北京中杉),兔抗 Tuj1 单克隆抗体(碧云天),小鼠抗胶质纤维酸性蛋白多克隆抗体(glial fibrillary acidic protein,GFAP,北京中杉)。异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)、Cy3 荧光标记二抗均为碧云天公司产品。甲基噻唑基四唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT,Sigma),EDS(中国科学院昆明植物研究所)。

1.2 方法

1.2.1 NSCs 分离、培养与鉴定 将出生不足 48 h 的 SD 乳大鼠用 75% 酒精消毒,脱颈椎处死后,无菌条件下打开颅腔,解剖显微镜下剥离脑膜分离出海马,D-Hanks 液中剪切成 0.5 mm^3 的细小组织块,置 10 ml 离心管吹打,200 目铜网过滤;离心后,细胞沉淀重悬于含 2% B27、20 ng/ml bFGF、20 ng/ml EGF、DMEM/F12 无血清培养基中,台盼蓝染色后行活细胞计数,于每培养瓶(75 cm^2)按 1×10^6 个细胞密度接种。原代克隆球形成后进行机械分离,制作单细胞悬液,按 5×10^5 个细胞密度进行传代培养。此后每 3 天半量换液 1 次,7 ~ 8 d 机械分离克隆传代 1 次。将传代培养的 NSCs 克隆球置于预先涂有多聚赖氨酸的玻片上,4 h 后行 Nestin 免疫荧光染色鉴定。

1.2.2 EDS 干预对 NSCs 增殖能力的影响

1.2.2.1 克隆形成率检测 取传代培养的神经干细胞克隆,吹打至单细胞悬液,稀释成 100 个细胞/ml, 接种至 24 孔板,每孔 1 ml。分组:EDS 用 0.1 mol/L PBS 配制成 50、100、200、400、800 mg/L 共 5 个剂量组,等量 PBS 及正常对照各 1 组,总数 7 组,每组设 3 个复孔。7 d 后倒置显微镜下观察计数克隆数。

1.2.2.2 MTT 法观测 NSCs 增殖能力 传代培养的神经干细胞克隆吹打至单细胞悬液后,按 5×10^4 个细胞接种至 96 孔板。分组同上,MTT 法同文献描述[3],酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度值[D(490)],绘制各组生长曲线。

1.2.3 EDS 干预对 NSCs 分化能力影响 取传代培养的神经干细胞克隆,用分化培养液(配制为 DMEM/F12 + 10% 的胎牛血清)接种于铺有多聚赖氨酸盖玻片的 12 孔培养板或 75 cm^2 培养瓶,培养 10 d 后进行免疫荧光和流式细胞仪观测。

1.2.3.1 免疫荧光激光共聚焦显微镜观测 常规方法对分化后的细胞进行免疫荧光染色,兔抗 Tuj1(1∶200)标记神经元,小鼠抗 GFAP(1∶100)标记星形胶质细胞。封片后进行激光共聚焦显微镜扫描。

1.2.3.2 流式细胞术观测 每组收集 5×10^4 个细胞,4% 的多聚甲醛固定后,加入兔抗 Tuj1(1∶150)常温下孵育 1 h,PBS 洗净后加入羊抗兔 FITC(1∶100)二抗,孵育 45 min,PBS 洗涤后上机检测。对照组用 PBS 代替一抗,余同。

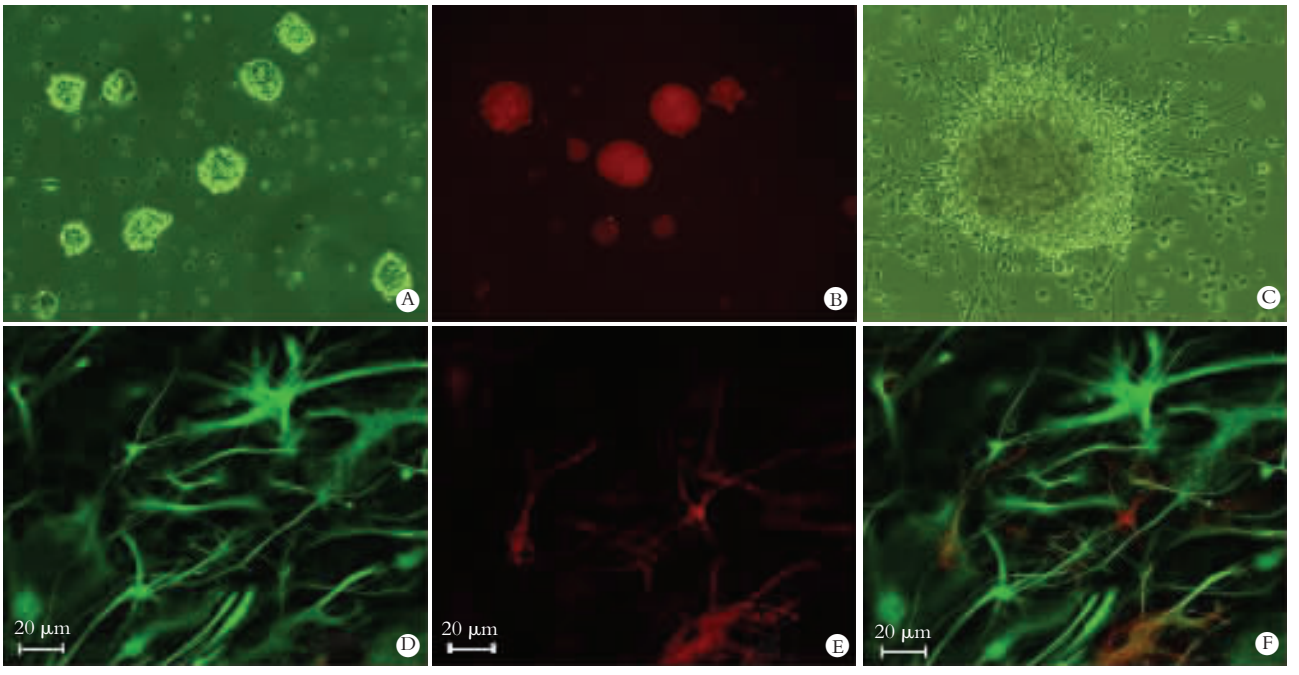
1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 软件包及 Excel 7.0 分析,两组间均数比较行 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠海马神经干细胞培养与鉴定

本组原代取材之后,培养 24 h 可见克隆开始形成,3 ~ 4 d 克隆形态已较为丰满、规则,7 ~ 8 d 克隆球已需要传代,Nestin 免疫荧光检测呈强阳性。分化条件下培养 10 d 后,绝大部分细胞呈 Tuj1 阳性或 GFAP 阳性(图 1)。

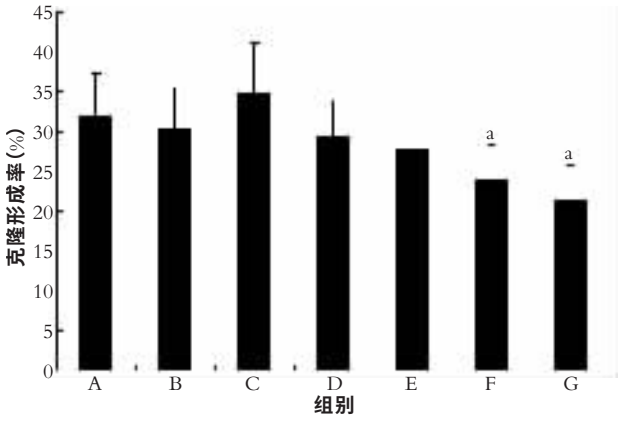


A:原代克隆球 (相差显微镜 ×100);B:Nestin 免疫荧光染色 (×100);C:NSCs 分化状态 (相差显微镜 ×400);D ~ F:免疫荧光染色 NSCs 分化后 GFAP(绿色,D)、Tuj1(红色,E)染色,F 为二者融合

图 1 NSCs 培养与鉴定

2.2　EDS 干预对 NSCs 增殖能力的影响

2.2.1　EDS 干预对 NSCs 克隆形成率影响　　给予不同剂量 EDS 干预后进行传代培养,结果显示 400 mg/L EDS 组和 800 mg/L EDS 组显著抑制了传代 NSCs 克隆形成率,具有统计学意义($P<0.05$)(图 2)。



A:正常组;B:PBS;C:EDS 50 mg;D:EDS 100 mg;E:EDS 200 mg;F:EDS 400 mg;G:EDS 800 mg　a:$P<0.05$,与正常组比较

图 2　不同剂量 EDS 干预对 NSCs 克隆形成率影响

2.2.2　EDS 干预对 NSCs 增殖曲线的影响　　经不同剂量 EDS 干预后,MTT 法检测显示中低剂量组(50 mg/L,100 mg/L,200 mg/L)对 NSCs 增殖曲线影响不显著,而较高剂量组(400 mg/L 和 800 mg/L)则较明显的抑制了 NSCs 增殖(图 3)。

2.3　EDS 干预对 NSCs 分化能力的影响

2.3.1　激光共聚焦显微镜观察　　各组在分化条件下培养 10 d 后,进行免疫荧光染色,激光共聚焦显微镜下观察。每组计数 5 个视野下 Tuj1 阳性(标记神经元)、GFAP 阳性(标记星形胶质细胞)细胞数,并计算其占总细胞数的比例。结果提示 EDS 干预后除 50 mg/L 组外,其余各组 Tuj1 阳性细胞比例均较对照组有所提高,其中 200 mg/L 与对照组差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1,图 4。

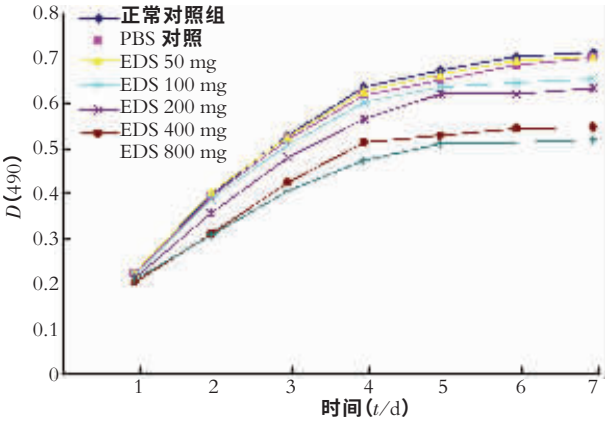
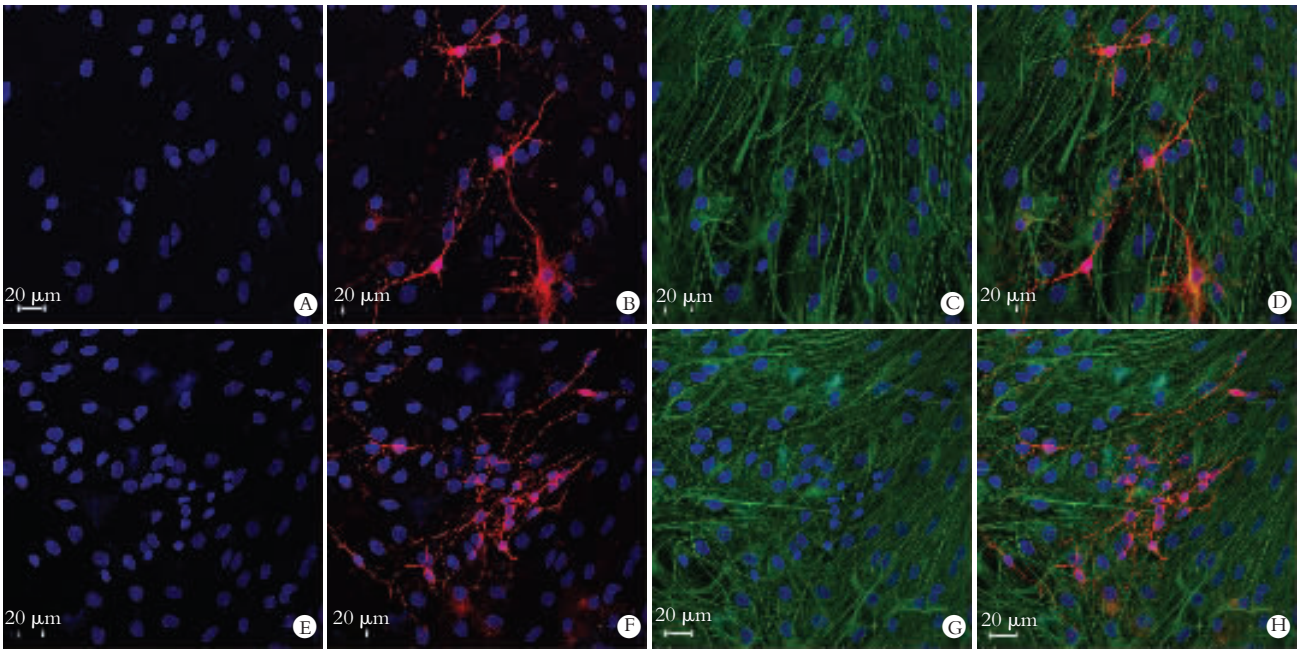


图 3　EDS 干预对 NSCs 增殖曲线影响

表 1　EDS 干预后各组 NSCs 分化为 Tuj1$^+$、GFAP$^+$ 细胞的比例(%)

组别	Tuj1$^+$(%)	GFAP$^+$(%)
正常对照	12.4±3.3	85.3±7.8
PBS 对照	13.5±4.6	84.5±7.4
EDS 干预		
50 mg/L	11.9±3.4	87.9±8.1
100 mg/L	15.1±5.1	82.3±9.2
200 mg/L	22.6±4.7[a]	75.3±8.4
400 mg/L	16.3±5.5	82.4±6.9
800 mg/L	13.8±3.4	85.5±8.7

a:$P<0.05$,与正常对照组比较



A~D:正常对照组;E~H:200 mg/L EDS 处理组。蓝色:DAPI 染色,红色:Tuj1$^+$,绿色:GFAP$^+$

图 4　正常及 200 mg/L EDS 处理后 NSCs 向 Tuj1$^+$ 细胞分化情况　(免疫荧光)

2.3.2 流式细胞术检测 为进一步明确200 mg/L EDS干预对NSCs分化能力的影响,我们重复进行了3次流式细胞术检测Tuj1$^+$细胞分化比例,结果为24.6%、18.5%、21.9%,均值为21.7%,而正常对照组则为10.4%、9.5%、11.9%,均值为10.6%,二者有统计学差异($P<0.05$)。显示200 mg/L EDS干预显著提高了Tuj1$^+$细胞的分化,与激光共聚焦显微镜观察结果符合。

3 讨论

作为传统中药牛膝、漏芦等的单体成分,EDS已被证实能在哺乳动物有关病理生理过程中发挥效应。如EDS能促进血管内皮细胞的增殖,对多种因素如缺血缺氧、内毒素、肿瘤坏死因子等造成的内皮细胞损伤具有保护作用[4];整体动物给药后,蜕皮甾酮对外伤或缺血引起的脑损伤也有一定的保护作用,能促进大鼠海马学习记忆障碍的改善[5,6]。

在昆虫类动物体内EDS是分布广泛的类固醇类激素,参与调节了许多重要的生命活动,如其最为突出的生理功能是能刺激昆虫真皮细胞的分裂,产生新的表皮,导致昆虫变态[7]。研究还指出EDS对昆虫大脑神经发育也起着非常重要的调控作用。随着局部微环境中EDS浓度的改变,昆虫神经前体细胞增殖分化以及凋亡水平也会发生变化。如Malun等[1]研究发现,无论在体内还是在体外,超过一定阈值浓度的EDS均显著抑制了蜜蜂大脑蘑菇状体神经前体细胞的有丝分裂,提示其参与调控了蘑菇状体内的神经发生;Champlin等[2]研究指出EDS通过NO信号途径参与了天蛾大脑的神经发生,低浓度时,EDS刺激NO的产生,后者抑制了天蛾视皮层神经前体细胞的增殖,浓度较高时EDS则能抑制NO的生成从而促进神经前体细胞的增殖。但EDS对哺乳动物的神经发生是否也有调节作用鲜见报道。

最近研究表明,在哺乳动物海马齿状回颗粒细胞下层(subgranular zone,SGZ)中,自出生到成年一直存有神经干细胞的聚集发生区,其分化的神经元迁移定位于颗粒细胞层中,与海马功能关系密切。在诸如脑缺血、脑外伤等神经损伤中,海马内源性神经发生都有增强,参与了受伤机体的自然恢复过程,而促进内源性神经发生已成为神经损伤修复研究的重要方向[8,9]。

在我们的实验中,高剂量的EDS(400 mg/L及800 mg/L)干预组明显抑制了体外培养的大鼠海马神经干细胞克隆形成率,依据MTT法所测结果绘制的生长曲线图也显示高剂量组抑制了NSCs的增殖;中低剂量EDS处理组对NSCs增殖没有产生显著影响,50 mg/L处理组甚至还促进其增殖,提示需要对更低剂量EDS的干预效应进行观察;在分化条件下加入EDS干预后,NSCs向神经元分化比例有所提高,特别是EDS200 mg/L干预组,与正常对照组相比有显著性的差异。

我们的实验结果初步证实了EDS能够影响体外培养大鼠海马NSCs的增殖和分化水平,在合适的剂量下明显提高了神经元的分化比例,提示EDS对哺乳动物的神经发生也可能有一定的调节作用。已有研究者成功分离培养人胚神经干细胞建立了人胚神经干细胞株[10],EDS在整体动物水平上对神经干细胞增殖分化是否有影响以及这种影响是否与其神经保护作用相关值得进行深入研究。

参考文献:

[1] Malun D, Moseleit A D, Grunewald B. 20-Hydroxyecdysone inhibits the mitotic activity of neuronal precursors in the developing mushroom bodies of the honeybee, Apis mellifera[J]. J Neurobiol, 2003, 57(1): 1-14.

[2] Champlin D T, Truman J W. Ecdysteroid coordinates optic lobe neurogenesis via a nitric oxide signaling pathway[J]. Development, 2000, 127(16):3543-3551.

[3] Hayon T, Dvilansky A, Shpilberg O, *et al*. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2003,44(11):1957-1962.

[4] 陈 志,朱 刚,唐卫华,等. 蜕皮甾酮对实验性蛛网膜下腔出血后血管内皮细胞损害的作用研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(5): 540-543.

[5] 吴 旭,姚 一,卓 豫. 蜕皮甾酮对急性脑损伤的保护作用及机制探讨[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(7): 454-457.

[6] 杨正钦,吴芹,陆远富,等. 蜕皮甾酮改善$A\beta_{25-35}$大鼠学习记忆功能障碍与ChAT相对高表达有关[J]. 遵义医学院学报, 2006, 29(2): 106-110.

[7] Mirth C K, Riddiford L M. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects[J]. Bioessays, 2007, 29(4): 344-355.

[8] Murray K, Lledo PM. Adult neural stem cells: fate and function[J]. Pathol Biol (Paris), 2006, 54(5): 266-269.

[9] Zhao C, Deng W, Gage F H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis[J]. Cell, 2008, 132(4): 645-660.

[10] 阳运康,鲁晓波,张忠杰,等. 人胚神经干细胞的培养与基因修饰后体内的表达[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(3): 270-272.

(编辑 吴培红)