论著

文章编号:1000-5404(2010)11-1188-04

大鼠孕期染邻苯二甲酸二丁酯对子代神经干细胞增殖分化的影响

罗芬兰,蔡文琴,张吉强 (400038 重庆,第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所)

[摘要] **目的** 探讨大鼠孕期染环境雌激素邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate,DBP)对子代神经干细胞增殖和分化的影响。**方法** 40只SD孕鼠随机分为3个不同DBP剂量[25、75、225 mg/(kg·d)]的实验组和对照组,各组孕鼠自E0起分别给予不同剂量DBP或玉米油溶剂灌胃直至生产。取新生大鼠进行神经干细胞培养,检测计数细胞克隆形成率、克隆球直径大小;分离的神经干细胞进行分化培养,以Neu-N和GFAP免疫荧光检测DBP干预后的神经干细胞分化为神经元与星形胶质细胞的比例差别与形态变化。**结果** 大鼠孕期染DBP致子代神经干细胞增殖能力降低。与对照组相比,中、高剂量染毒组新生鼠神经干细胞克隆率明显低于对照组[实验对照组克隆率为(40.53±4.65)%;药物处理组克隆率分别为(30.96±3.80)%、(15.35±5.29)%、(6.58±1.43)%,$P<0.01$]。高剂量处理组克隆球的直径也明显小于对照组。DBP高剂量组神经干细胞分化为星形胶质细胞比例显著增加[高剂量组为(36.8±3.5)%,而对照组为(30.8±2.4)%,$P<0.01$]。分化后的神经元和神经胶质细胞形态随着染毒浓度增大,形态变化明显。星形胶质细胞的细胞突起逐渐变短,变粗,以高剂量染毒后为明显。**结论** 大鼠孕期染DBP会影响子代神经干细胞的增殖与分化,从而影响神经系统的发育。

[关键词] 环境雌激素;邻苯二甲酸二丁酯;神经干细胞;神经干细胞增殖与分化

[中图法分类号] R715.3; R322.8; X503.1 **[文献标志码]** A

Effect of maternal exposure to dibutyl phthalate on proliferation and differentiation of neural stem cells from neonatal offspring rats

Luo Fenlan, Cai Wenqin, Zhang Jiqiang (Department of Neurobiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of maternal exposure to dibutyl phthalate (DBP), an environmental estrogen on the proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) in the neural tube of neonatal rats. **Methods** A total of 40 male and 40 female SD rates at age of 4 to 5 months, were matched, and the morning when vaginal plugs were found was designated as E0. Then the 40 pregnant rats were randomly divided into 4 groups, 3 DBP exposure groups (25, 75, and 225 mg/kg) and control group. DBP at corresponding doses were dissolved in corn oil, and administrated by intragastrically injection once per day from E0 till delivery, while those of control group were given corn oil. Brain tissue of newborn rats was collected for primary culture of NSCs. Then the cell colony formation was counted to detect the NSCs proliferation. Then 10% fetal bovine serum (FBS) was added into the culture medium to induce the NSCS to differentiate. Neu-N and GFAP immunofluorescence stainings were used to detect neurons and astrocytes, and their morphological changes were observed. **Results** The proliferation of NSCs was decreased significantly after DBP administration. Compared with the control group [(40.53±4.65)%], the colony formation rate of middle- and high-dose DBP exposure groups was significantly reduced and in a dose-dependent manner [(30.96±3.80)%, (15.35±5.29)%, (6.58±1.43)%, $P<0.01$]. The diameter of the formed colony in high-dose DBP exposure group was significantly smaller than in control group. DBP induced more NSCs to differentiate to astrocytes in high-dose group [(36.8±3.5)%] than in control group [(30.8±2.4)%, $P<0.01$] Morphological changes were more obvious in the differentiated neurons and astrocytes with the increasing dose of DBP. DBP also caused obvious gradually shortened and thickened processes, especially in the high dose group. **Conclusion** The results suggest that DBP exert obvious effect on the proliferation and differentiations of NSCs, and thus affects the development of neural system.

[Key words] environmental estrogens; dibutyl phthalate; neural stem cells; proliferation ; differentiation

Corresponding author:Cai Wenqin,Tel:86-23-68752233 ,E-mail:cwqtmmu@yahoo.com

[通信作者] 蔡文琴,电话:(023)68752233,E-mail:cwqtmmu@yahoo.com

环境雌激素(environmental estrogens,EES),又称为环境内分泌扰物(environmental endocrine disrupting chemicals, EEDS)。它们进入生物体内,干扰生物体自身激素的合成、分泌、转运、结合、活性反应、代谢、降解或产生类似生物体自身激素,对生物有机体维护正常的动态平衡、繁殖、生长及行为产生不利影响[1]。它们积蓄在生物体内后阻碍神经系统的传输、毒害生殖腺、影响肝脏、肾脏内的酶系统和降低机体的免疫机能等,多种途径造成生物体内的激素失调、生殖器官畸形甚至癌变[1]。随着人们对 EES 研究的深入,越来越多的疾病被证实与 EES 相关。陈济安等[2]报道,长江水中的主要 EES 是邻苯二甲酸酯二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)。而 DBP 本身作为一种增塑剂在医疗用品、化妆品中大量使用,已被美国和欧盟列入优先控制的污染物名单[3]。目前认为,DBP 的生殖发育毒性的一个重要的机制是其内分泌干扰作用。由于神经、内分泌是密切联系又互相影响的 2 个系统,围生期中内分泌系统受到干扰很可能对神经系统的发育产生影响[4]。文献[5]报道 EES 会影响大鼠下丘脑神经元及神经胶质细胞的发育。例如,双酚 A 会阻碍神经元的发育,而三硝基苯酚则对神经元与神经胶质细胞的发育都有抑制。为此我们探究了大鼠孕期染 DBP 对其子一代神经干细胞增殖与分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:选择 80 只 4 ~ 5 月龄健康清洁级 SD 大白鼠,体质量(250 ± 32.5) g,雌雄各 40 只,由第三军医大学实验动物中心提供。试剂:细胞培养基 DMEM/F12、B27(美国 Gibco),bFGF、EGF(美国 Pepro Tech),多聚赖氨酸、小鼠抗 neun 单克隆抗体、小鼠抗巢蛋白(Nestin)单克隆抗体(美国 Chemicon),兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体、FITC 标记二抗、CY3 标记的二抗(北京中衫),邻苯二甲酸二丁酯、玉米油(美国 Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 孕鼠的染毒与分组 SD 大鼠,人工昼夜各 12 h,室温(25 ± 1)℃,相对湿度(50 ± 5)%,自由饮食饮水,雌雄 1∶1 合笼。发现阴栓且阴道涂片发现精子的雌鼠定为妊娠第 1 天(E0),交配成功的孕鼠分为 3 个不同 DBP 剂量的实验组和 1 个对照组共 4 组,每组 10 只,合笼饲养(每笼 3 ~ 4 只)直到待产。自妊娠 E0 起,3 个实验组分别给予 DBP 25、75、225 mg/(kg · d)(玉米油为溶剂),对照组则给予等体积玉米油灌胃,直到生产后。

1.2.2 神经干细胞的培养 全程操作无菌。取各组新生 2 h 内乳大鼠脑组织,剥离大脑皮层的血管和脑膜,于平皿中分离出室管膜下区(subventricle zone,SVZ),置于盛有 DMEM/F12(含 20 μl/L B27、10 μg/L bFGF、10 μg/L EGF)的离心管内,用钝化后的吸管反复吹打,通过 200 目尼龙筛网过滤后,除去粘连的组织纤维,制成单细胞悬液。离心管静置 3 ~ 5 min 后,取上清液,以 $4 \times 10^5 \sim 6 \times 10^5$/ml 的密度种入细胞培养瓶中(6 ml/瓶)。在 5% CO_2、37 ℃ 和饱和湿度条件下,悬浮培养。根据细胞生长情况,2 ~ 3 d 全换液 1 次,每 6 ~ 7 天离心收集神经球,吸管反复吹打分离传代培养。

1.2.3 神经干细胞的鉴定与克隆形成率的检测 神经干细胞呈球样生长。将部分培养的细胞球接种于已用多聚赖氨酸包被过的 10 mm × 10 mm 盖玻片上培养过夜后固定。用 Nestin 免疫组化染色进行神经干细胞的鉴定。

各组培养的神经干细胞取适量,用吸管反复吹打后制成单细胞悬液,用培养液稀释后,接种于 35 mm 培养皿中培养,培养液中不加血清。将培养皿置于带网格的透明胶片上,每天观察,于显微镜下计数克隆数,计算克隆形成率。

克隆形成率(%) = (单位面积克隆数/单位面积接种细胞数) × 100%。

1.2.4 神经干细胞的分化悬液 取传 3 代后的神经干细胞球,用吸管反复吹打成单细胞以后,以 5×10^4/片细胞密度接种于经多聚赖氨酸包被的 10 mm × 10 mm 玻璃盖玻片上,加入含 10% 胎牛血清的培养基,进行分化培养。7 d 后,取出盖玻片,将各组细胞用 4% 多聚甲醛固定 30 min,经 PBS 漂洗 3 次,再用含 5% 正常山羊血清的 PBS 在室温条件下封闭 30 min。然后分别用抗 Neu-N 抗体(1∶200 稀释)、抗 GFAP 抗体(1∶100 稀释)于室温下反应 1 h;经 PBS 再次漂洗 3 次后,用相应的荧光标记二抗于室温孵育 45 min。PBS 漂洗 3 次后,用 DAPI 染核 20 min,最后在荧光显微镜下观察、拍照。

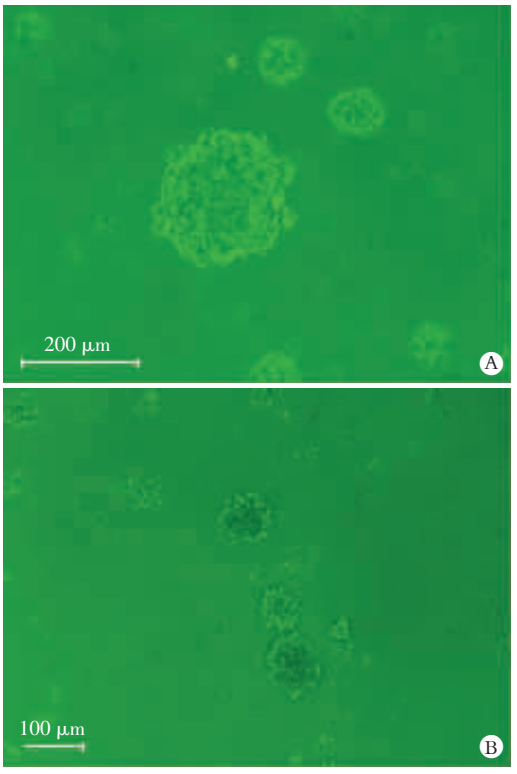
1.2.5 细胞计数和统计学分析 用生物图像处理系统摄取图片后,计总细胞数、Neu-N 阳性细胞数(×200)和 GFAP 阳性细胞数(×200),测量克隆球直径。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件处理。多组样本比较进行方差齐性检验,采用单因素方差分析处理数据。多个样本均数两两比较选用 q 检验。

2 结果

2.1 DBP 对仔鼠神经干细胞克隆形成的影响

取自对照组新生鼠大脑皮层 SVZ 区的原代细胞在含 B27 与 bFGF、EGF 的 DMEM/F12 培养液中,24 h 后细胞部分死亡,2 ~ 3 d 后开始增殖,呈集落样悬浮生长。经多次传代后部分细胞生长特性同原代细胞(图 1A)。低剂量组神经干细胞成球时间和克隆球生长状态与实验对照组无明显差异,克隆球直径无明显区别。中剂量组与高剂量组神经干细胞成球时间相对实验对照组较长,克隆球生长状态较慢,克隆球直径差异不大。高剂量组克隆球活性明显降低,多数中心呈发黑状态,克隆球折光性减弱且生长速度比正常对照组明显减慢,克隆球直径差异显著(图 1B)。各组细胞传 3 代后,取部分细胞贴壁培养过夜,用 Nestin 作为神经干细胞的标志物,通过免疫细胞化学染色鉴定细胞,结果显示:Nestin 阳性细胞率为(89.87 ± 11.87)%,占总细胞数 85% 以上。各组之间克隆球 Nestin 阳性率差异不明显。Nestin 阳性细胞胞体呈圆形,细胞核较大,细胞形态规则,少量细胞有突起。这一结果证明研究所用细胞大部分为神经干细胞(图 2)。

孕鼠经不同浓度DBP处理后，子一代乳鼠进行神经干细胞培养，结果显示：低剂量DBP处理组与正常组相比，克隆形成率虽下降，但无统计学差异（$P>0.05$）。中剂量处理组和高剂量处理组与实验对照组相比，神经干细胞的克隆率明显低于实验对照组[对照组克隆率为(40.53±4.65)%，高、中、低3个剂量的DBP处理组克隆率分别为(30.96±3.80)%、(15.35±5.29)%、(6.58±1.43)%，$P<0.01$]。



A：实验对照组；B：高剂量组

图1　原代细胞培养6 d DBP对NSCS克隆球形成的影响　（光镜　×200）

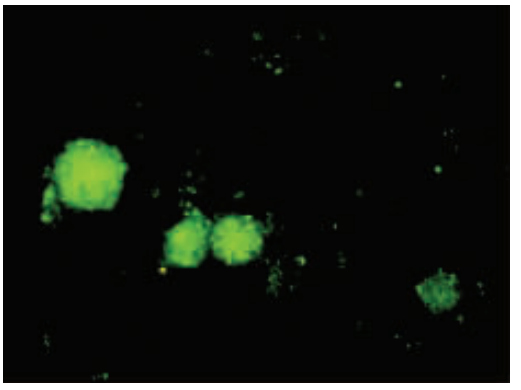


图2　NSCS克隆球Nestin免疫荧光染色结果　（×100）

2.2　DBP对子代神经干细胞分化的影响

DBP处理孕鼠，子一代乳鼠神经干细胞分化受到明显影响。分化后的星形胶质细胞形态随着毒物剂量增大，形态变化明显。星形胶质细胞的细胞突起逐渐变短，变粗，以高剂量染毒后为明显（图3）。神经干细胞分化为神经元与神经胶质细胞的比例除高剂量组与对照组之间有统计学差异（$P<0.01$）以外，各组之间无统计学差异（$P>0.05$）。见表1。

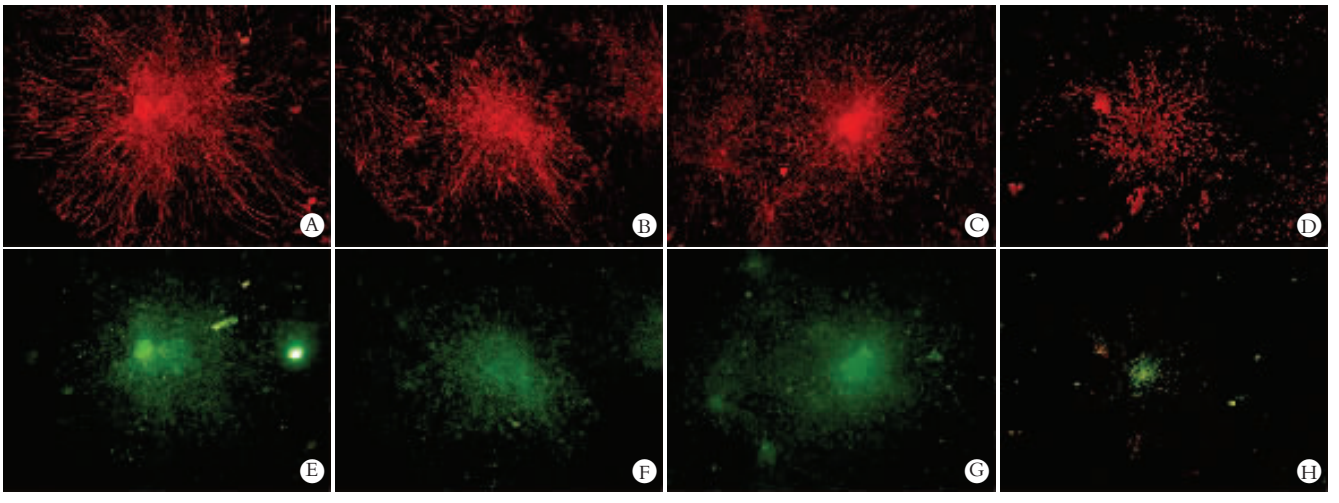
表1　DBP对神经干细胞分化的影响（%，$\bar{x}\pm s$）

组别	神经元	星形胶质细胞
对照组	46.9±4.7	30.8±2.4
DBP低剂量组	46.3±2.9	30.6±3.1
DBP中剂量组	44.5±3.6	31.2±2.1
DBP高剂量组	38.9±2.8[a]	36.8±3.5[a]

a：$P<0.01$，与对照组比较

3　讨论

ESS具有难降解、高亲脂性、残留期长等特性，可通过生物富集和食物链的放大作用引起体内聚集，进



A、E：对照组；B、F：DBP低剂量处理组；C、G：DBP中剂量处理组；D、H：DBP高剂量处理组。红色荧光为GFAP标记星形胶质细胞免疫荧光染色，绿色荧光为Nen-N标记神经元免疫荧光染色

图3　不同剂量DBP对子代神经干细胞分化的影响　（×200）

而通过 2 个途径影响神经系统:一是直接作用于神经内分泌器官(如甲状腺)影响激素的释放及其在靶器官的效应,再通过负反馈作用影响中枢神经系统;二是直接作用于神经组织影响神经内分泌功能紊乱,引起行为和精神等的改变[6]。邻苯二甲酸酯类(phthalic acid esters, PAEs)是 EES 中不可忽视的一类,其中的增塑剂 DBP 是我国水域环境主要污染物之一[2]。

神经干细胞的分裂分化在神经系统的发育中起主要作用。本实验从不同浓度 DBP 染毒孕鼠及实验对照组孕鼠新生乳大鼠大脑 SVZ 区提取脑组织进行神经干细胞培养,来探究 DBP 对神经干细胞增殖与分化的影响。结果显示,母体染毒浓度越高,子一代神经干细胞的增殖越受到抑制。这是由于环境雌激素的特性决定的。环境雌激素有较高的脂溶性,易于通过血脑屏障和胎盘屏障,沉积于脑组织,对中枢神经系统产生直接的毒性效应。妊娠期和哺乳期的暴露,对子一代神经系统的发育影响尤为明显。本实验还表明,母体染毒剂量越大,子一代神经干细胞贴壁分化能力越差,分化后神经元与神经胶质细胞的突起变粗、变短。高剂量组[225 mg/(kg · d)]DBP 对神经干细胞分化成胶质细胞与神经元的比例与对照组相比差异显著,神经胶质细胞比例增大,神经元比例缩小。Shikimi 等[7]于 2004 年报道,三硝基苯酚(NP)对蒲肯野细胞的形态不会产生明显影响,但对下丘脑细胞的分化有促进作用。此外,双酚 A 对突触的发育有抑制效应。研究表明将离体培养的海马细胞暴露于双酚 A,其突触的形成和神经元发育的速度会显著减慢[8]。这一结果,与本实验结果相似。另有实验表明,给围生期大鼠口服双酚 A,其子一代的脑组织均有不同程度的异常改变,主要表现为当毒物剂量达到一定的时候,实验组新生大鼠海马 CA3 区锥体细胞和大脑皮层神经元细胞核开始固缩变性[9]。李元峰等[10]用不同 DBP 剂量[25、75、225 mg/(kg · d)]对各组孕鼠于孕第 6 天至产后 28 d 灌胃给药,发现 DBP 孕期和哺乳期暴露会降低子代雄性大鼠的学习记忆能力,促进 simohilin 基因的表达,两者之间可能存在一定的联系。

目前虽然已经肯定 EES 确实影响实验动物神经系统的发育,但有关其对人类神经系统是否存在影响还有不小的争议,主要是因为缺乏足够的人群流行病学资料,而大部分研究结果均来自理论推论或比较理想的动物实验。已有可靠调查显示,人类在出生以前就通过母体的食物链受到 EES 的长期影响[11]。但是由于 EES 神经毒性研究的复杂性、不确定性和日常生产生活中 EES 接触的广泛性,使得 EES 研究成为当今一个科学研究的新热点[12-16]。因此,提高人们对 EES 危害性的认识,重视环境保护和科学防护具有十分重要的意义。

参考文献:

[1] 李剑, 徐飞, 李少旦, 等. 环境雌激素研究进展[J]. 现代预防医学, 2006, 33(8): 1355-1359.
[2] 陈济安, 邱志群, 舒为群,等. 我国水环境中邻苯二甲酸酯污染现状及其生物降解研究进展[J]. 癌变·畸变·突变,2007,19(3): 212-214.
[3] 石莹, 张宏伟. 环境内分泌干扰物的研究进展[J]. 国外医学: 卫生学分册, 2006, 33(6):342-347.
[4] 阎冬良, 马纪伟. 环境雌激素与社会[J]. 实用预防医学, 2009, 16(3): 980-982.
[5] Fowler C D, Liu Y, Wang Z X. Estrogen and adult neurogenesis in the amygdala and hypothalamus[J]. Brain Res Rev, 2008,57(2): 342-351.
[6] McGarvey C, Cates P A, Brooks A, *et al*. Phytoestrogens and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity and pituitary luteinizing hormone release in the rat[J]. Endocrinology, 2001, 142(3): 1202-1208.
[7] Shikimi H, Sakamoto H, Mezaki Y, *et al*. Dendritic growth in response to environmental estrogens in the developing Purkinje cell in rats [J]. Neurosci Lett, 2004, 364(2): 114-118.
[8] Yokosuka M, Ohtani-Kaneko R, Yamashita K, *et al*. Estrogen and environmental estrogenic chemicals exert developmental effects on rat hypothalamic neurons and glias[J]. Toxicol *In Vitro*, 2008, 22(1): 1-9.
[9] 龙冬梅, 张浩, 程薇波, 等. 围生期双酚 A 暴露对雄鼠子一代生长和脑发育形态的影响[J]. 环境与职业医学,2006, 23(2): 118-121.
[10] 李元锋, 庄梅株, 李涛, 等. 邻苯二甲酸二丁酯对雄性子代大鼠学习记忆及海马 Spinophilin 表达的影响[J]. 癌变. 畸变. 突变, 2008, 20(5): 380-384.
[11] Gursoy E, Cardounel A, Kalimi M. The environmental estrogenic compound bisphenol A exerts estrogenic effects on mouse hippocampal (HT-22) cells: neuroprotection against glutamate and amyloid beta protein toxicity[J]. Neurochem Int, 2001, 38(2): 181-186.
[12] Panzica G C, Viglietti-Panzica C, Ottinger M A. Introduction: neurobiological impact of environmental estrogens[J]. Brain Res Bull, 2005,65(3): 187-191.
[13] 朱毅,舒为群,田怀军,等. 辛基酚体外类雌激素效应观察[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(8): 673-675.
[14] 彭俊华,糜漫天,朱俊东,等. 辛基酚和三羟基异黄酮对二甲基苯蒽诱发大鼠乳腺肿瘤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23): 2317-2320.
[15] 陈蕾,徐晓虹,田栋. 环境雌激素双酚 A 对脑和行为发育的影响[J]. 中国科学(C 辑:生命科学), 2009, 39(12): 1111-1119.
[16] 罗芬兰,蔡文琴. 环境雌激素的神经毒性[J]. 神经解剖学杂志, 2009,25(4):474-476.

(**收稿**:2010-03-11;**修回**:2010-03-27)
(编辑 王小宴)