DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.005

论著

文章编号:1000-5404(2004)17-1524-03

神经干细胞增殖分化相关蛋白在左旋单钠谷氨酸大鼠中的变化

高 唱,王景周 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 观察神经干细胞(neural stem cell, NSC)增殖分化相关蛋白在左旋单钠谷氨酸(monosodiumglutamate, MSG)大鼠NSC增殖分化中的作用。方法 提取前脑组织蛋白、利用Western blot方法检测NSC增殖分化相关蛋白变化。结果 与正常对照组比较,造模后30、60 d、MSG大鼠NSC增殖分化相关蛋白Notch1、hes5、Mash1、NeuroD表达水平显著降低,尤以Notch1和hes5更显著($P<0.01$);与实验组比较,左归丸可明显增加Notch1、hes5、Mash1、NeuroD表达水平($P<0.01$)。结论 MSG显著抑制NSC增殖分化相关蛋白表达水平,左归丸能部份拮抗MSG对NSC增殖分化相关蛋白表达的抑制。Notch和bHLH家族可能与左归丸促进NSC增殖分化作用有关。

关键词:左归丸;左旋单钠谷氨酸;神经干细胞;Notch;bHLH
中图法分类号:R322.8;R329.28;R977.4 文献标识码:A

Changes of differentiation- and proliferation-related proteins in neural stem cells in rats treated with L-monosodium glutamate

GAO Chang, WANG Jing-zhou (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of differentiation- and proliferation-related proteins in neural stem cells (NSCs) in rats treated with L-monosodium glutamate (MSG). Methods Tissue proteins were extracted from the rat forebrain. Western blotting was used to investigate the changes of differentiation- and proliferation-related proteins in NSCs in rats treated with MSG. Results Compared with those in rats of the normal control group, the related proteins (Notch1, hes5, Mash1, and NeuroD) in NSCs were significantly decreased in MSG rats at 30 and 60 d, especially for Notch1 and hes5 ($P<0.01$). Compared with those in the model group, the levels of Notch1, hes5, Mash1, and NeuroD were significantly increased in MSG rats after treatment with the *Zuogui* pills at 30 and 60 d ($P<0.01$). Conclusion MSG could effectively decrease the levels of Notch1, hes5, Mash1, and NeuroD which are related with the differentiation and proliferation of NSCs. *Zuogui* pills could partly reverse the inhibition of MSG. Notch family and bHLH transcription factor are probably involved in the NSC proliferation and differentiation induced by *Zuogui* pills.

Key words: *Zuogui* pill; L-monosodium glutamate; neural stem cell; Notch; bHLH

中医基础理论认为肾主髓,脑为髓海。左归丸具有滋补肾阴功效。我们先前的实验表明用左旋单钠谷氨酸(monosodiumglutamate, MSG)模拟肾阴虚证模型存在神经干细胞(neural stem cell, NSC)增殖分化和神经细胞凋亡异常,左归丸可显著增加MSG大鼠NSC增殖分化能力,减少左旋单钠谷氨酸大鼠神经细胞凋亡。但左旋单钠谷氨酸和左归丸是如何影响NSC增殖分化,有何信号通路参与,目前尚不清楚。由于Notch和bHLH家族广泛参与了NSC的增殖分化,本实验从NSC增殖分化相关蛋白入手探讨左归丸和MSG对NSC增殖分化作用的信号机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

Notch1IC小鼠源性单抗(Chemicon公司),hes5兔源性多抗(Cemines公司),NeuroD山羊源性多抗(Santa Cruz公司),Mash1小鼠源性单抗(PharMingen公司),RIPA(申能博彩公司),Super-Signal化学发光试剂盒(Pierce公司),BCA-100蛋白质定量测定试剂盒(上海申能博彩公司),二抗等。

1.2 方法

1.2.1 左归丸(ZGW)的制备 参照文献[1]方法制备。熟地、淮山药、枸杞子、山茱萸、菟丝子、牛膝、鹿角胶、龟板胶依次按8、4、4、4、4、3、4、4比例称量。10倍体积饮用水煎1 h,滤取上

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271652)
Supported by the National Nature Science Foundation of China (30271652)
作者简介:高 唱(1965-),男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事脑血管病方面的研究,发表论文46篇。电话:(023)68757363
收稿日期:2003-10-16;修回日期:2004-06-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

清液, 如此重复 3 次。合并 3 次所得药汁, 微火浓缩成 100%(35 g/35 ml)浓度, 冷却后置磁力搅拌器上边搅拌边加入无水乙醇, 至乙醇浓度为 75%, 继续搅拌过夜。2 000× g 离心 20 min, 上清液经 100 ℃电恒温水浴锅蒸发尽酒精, 用蒸馏水调节药物浓度至 100%, 100 kPa 灭菌 15 min, 4 ℃保存备用。

1.2.2　动物分组及方法　　雄性新生 SD 大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)出生后的第 2、4、6、8、10 d 皮下注射 MSG, 每次 4 mg/g, 对照组注射等体积生理盐水。28 d 后离乳, 分笼饲养, 光照时间为 12 h (8:00~20:00), 温度(22±1) ℃。至第 8 周时, 将大鼠分成 3 组, 即正常对照组(6 只)、实验组(12 只)以及左归丸组(12 只)。实验组和左归丸组又分为 30 d 和 60 d 小组, 每小组各 6 只。左归丸组以 5 g/kg 浓度的左归丸灌胃, 对照组与实验组以等体积的生理盐水灌胃, 连续灌胃 30 d 和 60 d。分别观察造模后 30 d 和 60 d 各组 NSC 增殖分化相关蛋白变化。

1.2.3　Western Blot 检测 NSC 增殖分化相关蛋白变化　　快速断颈处死动物、取新鲜前脑 0.3 g。加入 RIPA 裂解液, 冰浴下匀浆, 将匀浆液入 Eppendorf 5415D 低温离心机中 26 000× g 4 ℃离心 30 min。取上清, 用 BCA-100 蛋白质定量测定试剂盒在分光光度计上进行蛋白质定量测定。用 BIO-RAD 公司 Mini-Protean 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、室温下封闭, 用一抗稀释液把 NC 膜和一抗(Notch1IC, hes5, Mash1, NeuroD)于 4 ℃共同轻摇孵育过夜。次日, 用 1× TBST 洗 NC 膜 3 次(每次 15 ml, 10 min), 然后将 NC 膜与溶解在封闭液中的 HRP-标记的二抗或 HRP-标记的抗生物素抗体室温下共同孵育 1 h。洗膜后用 SuperSignal 化学发光试剂盒在 X 线片上曝光。X 线片经计算机图像分析系统分析结果。

1.3　统计学处理

计量资料数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 作单因素方差分析和 t 检验。利用 SPSS10.0 统计软件分析。

2　结果

2.1　Notch1IC 变化

造模后 30 d 和 60 d, 实验组 Notch1IC 水平均较正常对照组极显著的降低($P<0.01$)。左归丸灌胃后 30 d 和 60 d, Notch1IC 水平均较实验组有明显增高($P<0.01$), 见表 1。

表 1　各组 NSC 增殖分化相关蛋白的变化(%)

Tab 1　Changes of the related protein of NSC differentiation and proliferation in each group (%)

	Time	Notch1IC	hes5	Mash1	NeuroD
Control		1.0±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00	1.0±0.00
Model group	30 d	0.13±0.06 *	0.94±0.12 *	0.89±0.11 *	0.82±0.13 *
	60 d	0.03±0.04 *	0.22±0.09 *	0.14±0.05 *	0.92±0.08
Zuogui Pill group	30 d	0.85±0.14 #	0.71±0.11 #	0.77±0.13	0.98±0.12
	60 d	0.93±0.10 #	0.81±0.10 #	0.88±0.10	1.06±0.10

*: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.01$, *vs* model group

2.2　hes5 变化

如表 1 所示, 实验组 hes5 水平分别较正常对照组降低($P<0.01$)。给予左归丸后, hes5 水平较实验组有明显增加($P<0.01$), 但与正常对照组比较仍显著降低($P<0.01$)。

2.3　Mash1 的变化

实验组 Mash1 水平分别较正常对照组降低($P<0.01$)。给予左归丸后, Mash1 水平较实验组有极显著增高($P<0.01$), 见表 1。

2.4　NeuroD 变化

实验组 NeuroD 表达水平分别较正常对照组降低($P<0.01$)。给予左归丸后, NeuroD 变化水平较实验组有极明显增高($P<0.01$), 见表 1。

3　讨论

NSC 增殖分化调控是当今关于 NSC 研究的核心焦点问题。研究表明, 在干细胞发育过程中, Notch 信号通路对于决定胚胎发生、造血及 NSC 分化的命运起着至关重要的作用。当 Notch 被激活时, 干细胞进行增殖; 当 Notch 活性被抑制时, 干细胞进入分化程序, 发育为功能细胞[2]。Notch1 IC (Notch1 胞内结构域)表达, 可使胎龄为 9.5 d 小鼠大脑细胞分化为辐射状胶质细胞。后者既有胶质细胞特征、又是其它神经细胞的前体细胞(包括神经元)。Notch1IC 或其下游基因 hes1 可促进视网膜 Muller 胶质细胞的分化, 敲除 hes5 可减少 Muller 胶质细胞的分化数量, 异位表达 hes5 可增加 Muller 胶质细胞的分化数。我们的实验初步表明 MSG 能显著抑制 NSC 增殖分化相关蛋白表达水平, 特别是与 NSC 增殖相关的 Notch1IC 和 hes5 表达。左归丸能部份拮抗 MSG 对 NSC 增殖分化相关蛋白表达的抑制。Notch 和 bHLH 家族可能参与左归丸和 MSG 对 NSC 增殖分化的病生机制。

前神经元碱性环-螺旋-环基因(proneural basic helix-loop-helix genes, bHLH)是发育过程中转录网络的重要组成部分, 广泛参与神经和肌肉发生、细胞增殖分化、细胞谱系的决定、性别决定等基本生理过程。bHLH 蛋白之间的相互作用可促进或抑制干细胞的分化[2]。Notch 信号通过上调 bHLH 蛋白 hes1 和 hes5 阻止向神经元亚型的分化从而促进干细胞的增殖。bHLH 基因在神经上皮细胞发育为神经元中起着关键作用。它们可促使细胞脱逸细胞周期、使细胞游离出皮层并激活下游特定的神经元分化的遗传基因表达。在小鼠用基因敲除 MASH1、MATH1、ngn1、ngn2 或 neuroD 的方法显示特定神经元亚型的缺失。非洲蟾、斑马鱼或小鸡胚胎异位表达 neuroD、ngn2 或其它神经元 bHLH 蛋白可促使非神经细胞分化为神经元, 小鼠 P19 细胞瞬时表达 neuroD、MASH1、ngn1 或其它神经元 bHLH 蛋白, 在无维甲酸条件下可促使 P19 细胞向不同神经细胞分化, 并且可诱导细胞周期的脱离、使细胞周

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

期依赖激酶抑制物 P27KIP1 增高。Mash1 和 Ngn2 的缺失、皮层就不能正常发育。端脑前体细胞多表达 Ngn1/2, Mash1, Pax6 和 Gsh2[3]。在胚胎端脑 Mash1 和 Ngns 主要促进向神经细胞分化；体外离体实验表明 NeuroD、Mash1 和 Ngns 能促使 P19 细胞和胚胎皮层前体细胞向神经元分化。在视网膜的在体实验过度表达 Mash1 和 Ngns 可促使向神经细胞分化[4~7]。

本实验表明左旋单钠谷氨酸可显著抑制 NSC 增殖分化相关蛋白的表达，特别对与 NSC 增殖有关的 Notch1IC 和 hes5 更明显。但 MSG 也对 NSC 分化相关蛋白 Mash1 和 NeuroD 也有一定的抑制作用，提示 MSG 不仅明显抑制 NSC 增殖、也在一定程度上影响 NSC 的分化。我们的另一实验表明皮质酮模拟肾阳虚证主要影响 NSC 的分化功能[8]。这些实验结果初步提示中医肾阴虚证可能与 NSC 的增殖能力减退有关，而肾阳虚证可能与 NSC 分化功能减退有关。本实验表明 MSG 模拟肾阴虚证在一定程度上涉及 NSC 增殖和分化异常，可能与中医理论的阴中寓阳、阴阳互根的理论相吻合。本实验结果还显示左归丸促进 NSC 增殖分化可能与增加 Notch 和 bHLH 家族中增殖分化因子表达有关。但左归丸中是何种有效成份影响 Notch 和 bHLH 家族蛋白的表达，是一种或几种有效成份单独或协同作用的结果？目前尚不清楚。这些问题须进一步深入研究。

参考文献：

[1] 蔡定芳，刘彦芳，陈晓红，等. 左归丸对单钠谷氨酸大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的影响[J]. 中国中医基础医学杂志，1999，5(2)：24－27.
[2] 高 唱，王景周，吴伟康. 神经干细胞增殖分化基因调控的进展[J]. 国外医学脑血管疾病分册，2003，11(2)：117－120.
[3] Schuurmans C, Guillemot F. Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon[J]. Curr Opin Neurobiol, 2002, 12(1): 26－34.
[4] Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, *et al*. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms[J]. Cell, 2001, 104(3): 365－376.
[5] Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, *et al*. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(10): 5868－5873.
[6] Ohtsuka T, Sakamoto M, Guillemot F, *et al*. Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain[J]. J Biol Chem, 2001, 276(32): 30467－30474.
[7] Kim M H, Gunnersen J, Augustine C, *et al*. Region-specific expression of the helix-loop-helix gene BETA3 in developing and adult brains[J]. Mech Dev, 2002, 114(1-2): 125－128.
[8] 高 唱，王景周，吴伟康. 皮质酮大鼠神经干细胞增殖分化的变化[J]. 第三军医大学学报，2004，26(17)：1521-1523.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)17-1526-01

男性乳腺癌 2 例

Male breast carcinoma: a report of 2 cases

孟 刚，柳凤轩，章 榕 （第三军医大学西南医院病理科，重庆 400038）

例 1，患者，男，69 岁，发现右乳包块 1 年。患者 1990 年发现右乳包块，质硬、界清、移动，无压痛，包块逐渐增大，入院前 1 月增大至 3 cm×4 cm，双侧腋窝及锁骨下淋巴结未扪及。家族史、个人史无异常。入院查胸片、血常规、肝肾功无异常，于 1991 年 3 月行右乳单纯切除术。病理检查：巨检：切除右乳腺组织 12 cm×8 cm×2 cm，乳头下有灰白色组织，大小 2.5 cm×2 cm×1.5 cm。镜检：癌细胞排列成小片状、巢状或梁索状，偶见少量腺管状，癌细胞呈多角形或椭圆形，核圆形、核膜清楚、核分裂像可见，癌组织间纤维组织分隔，部分纤维组织呈透明变性，癌细胞呈浸润性生长，浸润周围脂肪组织。病理诊断：右乳腺浸润性导管癌。

例 2，患者，男，62 岁，发现左乳包块 2 年，左乳包块切除后复发，再次切除后（未作病理检查）复发 1 年。查体：左乳乳头稍突起，乳头下扪及一包块，约 1.5 cm×1.5 cm，未见皮肤破溃，无桔皮样外观，左腋下扪及数枚肿大淋巴结。右乳未见异常。家族史、个人史无异常。入院查胸片、血常规、肝肾功、腹部 B 超无异常。于 2003 年 2 月 21 日行左乳改良根治术。病理检查：巨检：切除乳腺组织 7 cm×3 cm×2.5 cm，其中见有大小 1.5 cm×1.5 cm 灰白色质硬区域。腋窝下组织一块，大小为 6.5 cm×5 cm×2 cm，其中找见淋巴结 17 枚，米粒至花生大小。镜检：癌细胞呈矮柱状形，卵圆形或不规则形，胞浆丰富，红染，胞界不清，核圆形、卵圆形，深染，异形性明显，核分裂像易见，癌细胞排列呈不规则管状，部分呈实心团块状，间质纤维中有少量淋巴细胞浸润。腋下淋巴结 17 枚中见 11 枚有癌转移。免疫组化染

（下转 1532 页）

作者简介：孟 刚（1975－），男，四川省南充市人，医师，主要从事肿瘤方面的研究。电话：(023)68765462

收稿日期：2004-01-18；修回日期：2004-04-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net