

[文章编号] 1000-2200(2009)08-0662-04

· 基础医学 ·

己烯雌酚对胎鼠海马神经干细胞增殖与分化的影响

汪洪杰, 赵正梅, 刘东梅

[摘要] 目的:探讨己烯雌酚对胎鼠海马神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的促增殖、分化作用及其机制。**方法:**取孕 16 天 SD 胎鼠海马 NSCs 培养, 分别设空白对照组, 己烯雌酚 1×10^{-7} mol/L 组、 1×10^{-8} mol/L 组、 1×10^{-9} mol/L 组, 以及脑源性神经营养因子(BDNF) 5×10^{-2} mg/L 组; 免疫荧光化学方法检测 Nestin、神经元特异烯醇化酶及神经胶质酸性蛋白的表达, RT-PCR 检测 BDNF mRNA 的含量。**结果:**不同剂量己烯雌酚处理各组神经球面积、积分光密度值、平均突起长度与平均突起数均增加, 其中 10^{-8} mol/L 组海马 NSC 增殖与分化最明显, BDNF mRNA 表达量亦最高($P < 0.01$)。**结论:**己烯雌酚对海马 NSCs 的增殖分化具有促进作用, 且可能与上调 BDNF 的表达有关。

[关键词] 海马; 神经干细胞; 己烯雌酚; 神经营养因子; 增殖; 分化

[中国图书资料分类法分类号] R 322.81 **[文献标识码]** A

Influence of diethylstilbestrol on proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells

WANG Hong-jie, ZHAO Zheng-mei, LIU Dong-mei

(Anhui Medicine College, Hefei Anhui 230601, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of the effect of diethylstilbestrol on the proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells(NSCs) in fetal rats. **Methods:** Hippocampal neural stem cells from the embryo (gestational day 16) of fetal rats were prepared and divided into five groups: control, diethylstilbestrol 1×10^{-7} mol/L, diethylstilbestrol 1×10^{-8} mol/L, diethylstilbestrol 1×10^{-9} mol/L and BDNF 5×10^{-2} mg/L. The expressions of Nestin, neurone specific enolase(NSE) and glial fibrillary acidic protein(GFAP) were determined by immunohistochemistry, and the level of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) mRNA was detected by RT-PCR. **Results:** Different doses of diethylstilbestrol could increase the area of neural spheres, quantity of NSE, and GFAP-positive cells. At a concentration of 10^{-8} mol/L, diethylstilbestrol facilitated the proliferation and differentiation of hippocampal NSCs of fetal rats the most, and the level of BDNA mRNA was the highest ($P < 0.01$). **Conclusions:** Diethylstilbestrol enhances the proliferation of hippocampal NSCs in fetal rats, which is probably related to the up-regulation of the BDNF mRNAs' expression.

[Key words] hippocampal; neural stem cell; diethylstilbestrol; neurotrophic factor; proliferation; differentiation

中风是危害人类健康的三大疾病之一, 以缺血性中风最为常见, 其受损区域中海马区受损最为严重^[1]。由于成熟神经元无再生能力, 因此, 中风患者损伤的神经功能不能完全得到恢复。随着对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的深入研究, 人们期

望通过刺激内源性 NSCs 增殖分化及迁移来彻底治愈中风所致的残疾^[2,3]。雌激素是人体一种内在的固醇类激素, 近年来其神经保护作用引起了广泛关注。雌激素不仅通过经典的核受体途径, 还可以通过抗细胞凋亡、抗氧化应激等方式抵抗缺血缺氧及其他诱发因素所致的神经损伤, 常全忠和 Amantea 等^[4,5]研究表明, 雌激素亦能促进 NSCs 增殖分化, 但其具体机制尚不清楚。本研究采用胎鼠海马 NSCs 体外培养的方法, 观察合成雌激素——己烯雌酚对 NSCs 增殖分化的影响, 并探讨其可能的

[收稿日期] 2009-04-20

[基金项目] 安徽省高等学校省级自然科学基金资助项目 (KJ2008B070)

[作者单位] 安徽医学高等专科学校, 安徽 合肥 230601

[作者简介] 汪洪杰(1959-), 女, 副教授。

- [7] Suzuki A, Ito T, Kawano H, *et al.* Survivin initiates p21 complex formation as a result of interaction with CDK4 to resist Fas-mediated cell death [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (10): 1346 - 1353.
- [8] Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, *et al.* Expression of surviving in astrocytic tumors [J]. *Cancer*, 2003, 97 (4): 1077 - 1083.
- [9] Haghpanah V, Shooshtarizadeh P, Heshmat R, *et al.* Immunohistochemical analysis of survivin expression in thyroid follicular adenoma and carcinoma [J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2006, 14 (4): 422 - 425.
- [10] Shariat SF, Lotan Y, Saboorian H, *et al.* Survivin expression is

associated with features of biologically aggressive prostate carcinoma [J]. *Cancer*, 2004, 100 (4): 751 - 757.

- [11] 牛 坚, 陆 艺, 钱海鑫. survivin 在原发性胆囊癌中的表达及其临床意义 [J]. *苏州大学学报·医学版*, 2006, 26 (2): 277 - 279.
- [12] Endoh T, Tsuji N, Asanuma K, *et al.* Survivin enhances telomerase activity via up-regulation of specificity protein 1 and c-myc-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription [J]. *Exp Cell Res*, 2005, 305 (2): 300 - 311.
- [13] 梅柱中, 郑晓飞, 董 燕, 等. 抑制端粒酶催化亚基的表达促进 survivin 蛋白的降解 [J]. *癌症*, 2005, 24 (5): 525 - 530.

作用机制,为缺血性中风的激素治疗提供实验参考依据。

1 材料与方 法

1.1 动物 16 天 SD 胎鼠,种鼠由安徽医科大学实验动物中心提供(皖医实动准第 01 号),自合笼次晨发现白色蜡状阴栓并经涂片证实后记作 0.5 天。

1.2 药品及试剂 高糖 DMEM/F12、N₂ 添加剂(GIBCO),特级胎牛血清(FBS, Hyclon),己烯雌酚片(上海信谊康捷药业有限公司),神经元特异性烯醇酶(neurone specific enolase, NSE)单抗、神经胶质酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)多抗(北京博奥森有限公司),nestin 多抗(Santa Cruz),兔抗鼠 FITC 荧光二抗、鼠抗兔 CY3 荧光二抗(博士德),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、BDNF(Sigma),TRIzol RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒(Invitrogen)。引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列为:5'-CGT GAT CGA GGA GCT GTT GG-3',5'-CTG CTT CAG TTG GCC TTT CG-3'; β -actin:5'-TGC TCG ACA ACG GCT CCG GCA TGT-3',5'-CCA GCC AGG TCC AGA CGC AGG AT-3'。

1.3 仪器 超净工作台(苏州净化设备厂),CO₂ 培养箱(WTCBinder,德国),倒置显微镜及成像系统(Nikon),GIS-2020 凝胶图像处理系统(上海天能)。

1.4 胎鼠海马 NSCs 培养、传代、分化方法 24 孔培养板,采用细胞爬片法。用 DMEM/F12(1% N₂) 无血清培养基悬浮培养,种植密度为 1×10^9 /L,隔天半量换液,每天按终浓度 1×10^{-2} mg/L 添加 bFGF,余同中脑神经元培养^[6]。5 天后行传代培养。同时进行诱导分化实验,1 周后分化的细胞爬满整个盖玻片后即行免疫荧光化学实验。

1.5 分组 设空白对照组,己烯雌酚 1×10^{-7} mol/L 组、 1×10^{-8} mol/L 组、 1×10^{-9} mol/L 组,以及 BDNF 5×10^{-2} mg/L 组,每组 6 个复孔。

1.6 免疫荧光实验 (1)4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 5 min \times 3 次。(2)0.4% TritonX-100 透膜 10 min,封闭 15 min。(3)分别滴加一抗 nestin(1:400)、NSE(1:75)、GFAP(1:200),4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 3 次。(4)滴加 CY3 或 FITC 偶联的二抗,避光孵育 1 h, PBS 洗 3 次,蒸馏水洗 10 min,甘油封片,荧光显微镜下拍照。

1.7 RT-PCR 测定 BDNF mRNA 换 6 孔培养板。RNA 提取与 mRNA 逆转录实验按试剂盒说明书进行。BDNF PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35

个循环;72 $^{\circ}$ C 补充延伸 10 min。线性扩增。 β -actin PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min,70 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 33 个循环;70 $^{\circ}$ C 补充延伸 10 min。循环次数均位于线性扩增范围。PCR 产物经电泳,凝胶图像处理系统分析电泳带光密度值。以 β -actin 电泳带光密度值为参照, BDNF 电泳带的相对光密度值反映 BDNF mRNA 的表达水平。

1.8 图像分析 用 Image-Pro Plus 专业图像分析软件进行分析,每组 6 张玻片,每张玻片在同一放大倍数($\times 200$),同一光强度下随机观察 4 个视野,测量阳性细胞的积分光密度值(IOD)、平均突起数、突起平均长度及神经球面积。

1.9 统计学方法 采用单因素方差分析和 q' 检验。

2 结果

2.1 形态学检测 原代培养 24 h 即有神经球出现,3 天后神经球周边整齐有光晕,晶莹透亮活力好(见图 1)。随着传代次数增加,细胞活力减小。己烯雌酚 1×10^{-8} mol/L、BDNF 组 NSCs 可传五代,细胞活力分别为 0.65 和 0.52,其他各组只能传三代。加入血清 24 h 神经球贴壁,48 h 有细胞爬出(见图 1B),1 周后细胞长满培养孔,突起相互连接成网状。己烯雌酚 1×10^{-8} mol/L、BDNF 组 NSCs 分化充分,大多铺满培养孔(见图 2B、2D),己烯雌酚 1×10^{-7} mg/L 组较稀疏,空白对照组、己烯雌酚 1×10^{-9} mol/L 组则少有铺满培养孔的现象(见图 2A、2C)。

2.2 己烯雌酚对 NSCs Nestin、NSE、GFAP 的影响

免疫荧光结果显示,神经球呈 nestin 阳性染色,贴壁 12 h 有突起伸出,24 h 有细胞爬出(见图 2C、2D)。结果显示,己烯雌酚 1×10^{-8} mol/L、BDNF 组神经球最大,与空白对照组差异有统计学意义($P < 0.01$);己烯雌酚 1×10^{-8} mol/L、BDNF 组 NSE 及 GFAP 阳性细胞的 IOD 值、突起数及长度与空白对照组差异均有统计学意义($P < 0.01$)(见表 1)。由染色图片知己烯雌酚 1×10^{-8} mol/L、BDNF 组神经元和神经胶质细胞分化最为充分(见图 3C、3D、3G、3H),其他三组则稀疏,数量少(见图 3A、3B、3E、3F)。由此说明己烯雌酚促进 NSCs 增殖分化,并在浓度为 1×10^{-8} mol/L 时效果最显著,与 BDNF 5×10^{-2} mg/L 的效力相当。

2.3 己烯雌酚对 BDNF mRNA 表达的影响 己烯雌酚 1×10^{-8} mol/L 组 BDNF mRNA 表达量最高,明显高于空白对照组($P < 0.01$)(见表 2)。

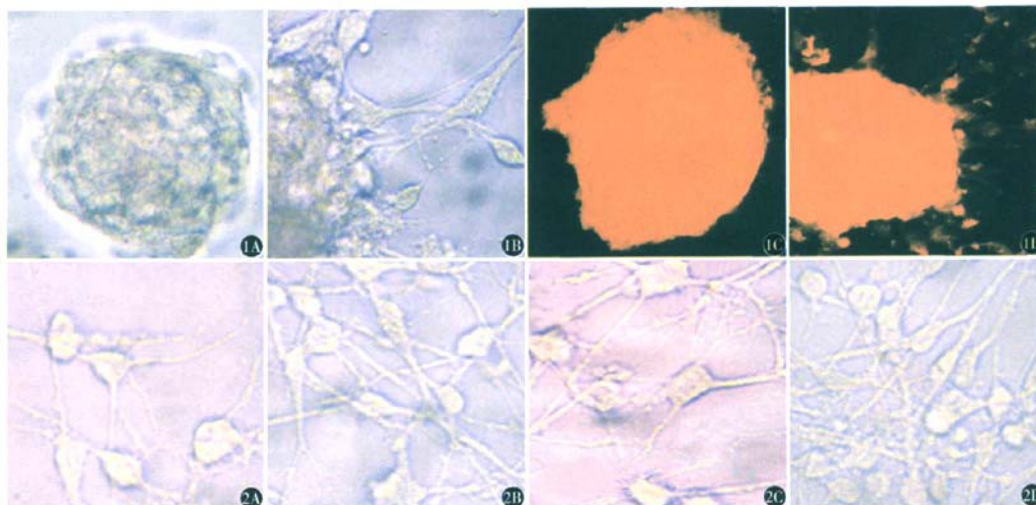


图1 原代培养3天的神经球(A),贴壁培养48h的神经球(B);贴壁12h(C)及贴壁24h(D)后呈 nestin 阳性表达的神经球(CY3 染色 ×20) 图2 诱导分化1周后空白对照组(C)、己烯雌酚 1×10^{-9} mol/L 组(C)、己烯雌酚 1×10^{-8} mol/L 组和 BDNF 对照组(D)细胞生长状况 (CY3 染色 ×20)

表1 各组神经球面积及 NSE、GFAP 阳性细胞所测指标值比较 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

| 分组 | 神经球面积 ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$) | NSE | | | GFAP | | |
|----------------------|--|----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | IOD | 平均突起长度(μm) | 突起平均数 | IOD | 平均突起长度(μm) | 突起平均数 |
| 空白对照组 | 1.16 ± 0.13 | 1.16 ± 0.13 | 7.7 ± 0.6 | 0.52 ± 0.05 | 2.76 ± 1.10 | 8.4 ± 0.1 | 0.68 ± 0.05 |
| 己烯雌酚 (mol/L) | | | | | | | |
| 1×10^{-7} 组 | 7.75 ± 0.32 ^{▲▲} | 7.25 ± 0.56 ^{▲▲} | 9.8 ± 0.7 ^{▲▲} | 0.61 ± 0.03 ^{▲▲} | 4.98 ± 0.81 ^{▲▲} | 12.8 ± 0.9 ^{▲▲} | 0.92 ± 0.06 ^{▲▲} |
| 1×10^{-8} 组 | 20.47 ± 3.41 ^{▲▲} | 22.56 ± 2.41 ^{▲▲} | 12.4 ± 0.5 ^{▲▲} | 0.71 ± 0.04 ^{▲▲} | 11.04 ± 0.78 ^{▲▲} | 20.5 ± 1.0 ^{▲▲} | 1.25 ± 0.16 ^{▲▲} |
| 1×10^{-9} 组 | 2.24 ± 0.21 | 2.24 ± 0.21 | 7.9 ± 0.7 | 0.59 ± 0.02 ^{▲▲} | 1.39 ± 0.21 | 8.7 ± 1.1 | 0.72 ± 0.09 |
| BDNF 组 | 21.53 ± 1.28 ^{▲▲} | 21.53 ± 1.28 ^{▲▲} | 12.6 ± 0.3 ^{▲▲} | 0.72 ± 0.02 ^{▲▲} | 21.80 ± 1.93 ^{▲▲} | 21.8 ± 1.2 ^{▲▲} | 1.31 ± 0.18 ^{▲▲} |
| F | 214.45 | 414.39 | 99.23 | 36.98 | 335.36 | 273.51 | 35.62 |
| P | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |
| MS _{组内} | 2.295 | 1.564 | 0.336 | 0.001 | 1.249 | 0.894 | 0.014 |

q' 检验:与空白对照组比较 ▲P < 0.05, ▲▲P < 0.01

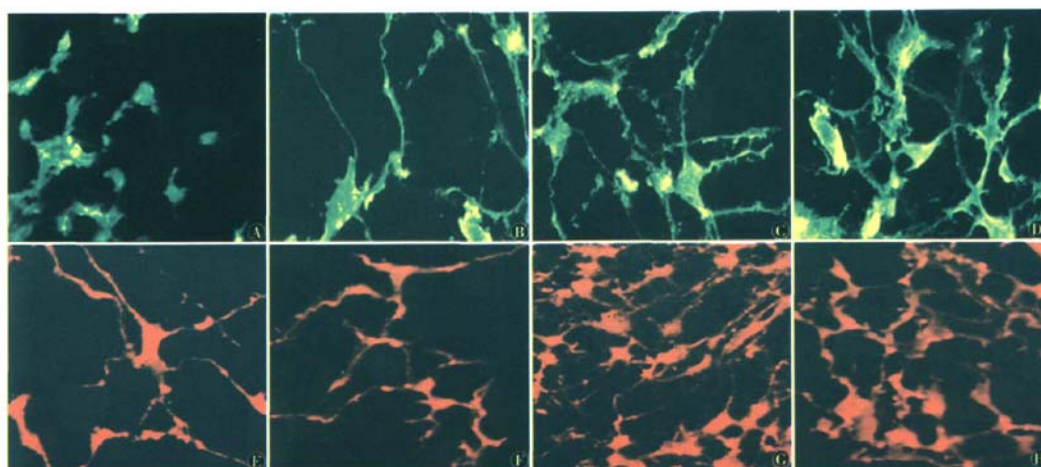


图3 空白对照组(A)及己烯雌酚 1×10^{-9} mol/L 组(B)、己烯雌酚 1×10^{-8} mol/L 组和 BDNF 对照组(D)呈 NSE 阳性表达的神经元(FTIC 染色 ×20);空白对照组(E)及己烯雌酚 1×10^{-9} mol/L 组(F)、己烯雌酚 1×10^{-8} mol/L 组和 BDNF 对照组(H)呈 GFAP 阳性表达的星形胶质细胞(CY3 染色 ×20)

表 2 各组 BDNF mRNA/ β -actin mRNA 比值比较($n_i=6; \bar{x} \pm s$)

| 分组 | BDNF Mma/ β -actin mRNA | F | P | MS _{组内} |
|-------------------------------|----------------------------------|--------|-------|------------------|
| 空白对照组 | 0.56 \pm 0.05 | | | |
| 己烯雌酚 (mol/L) | | | | |
| 1 \times 10 ⁻⁷ 组 | 0.78 \pm 0.03 ^{▲▲} | 217.18 | <0.01 | 0.001 |
| 1 \times 10 ⁻⁸ 组 | 0.97 \pm 0.01 ^{▲▲} | | | |
| 1 \times 10 ⁻⁹ 组 | 0.60 \pm 0.02 [▲] | | | |

q'检验:与空白对照组比较[▲]P<0.05, ^{▲▲}P<0.01

3 讨论

随着老龄化社会的来临,缺血性中风引起的危害越来越引起人们的重视。当脑局部缺血后谷氨酸载体受损,谷氨酸大量聚积,引起兴奋性毒性作用,尤其是海马的 CA1 区受损最为严重^[1]。在人缺血梗死半影区已经发现新生的神经元和成熟的神经元共存的现象^[2],而且在成年啮齿动物的室下区、海马齿状回等区域都存在 NSCs 池,当闭塞大脑中动脉后,这些区域的 NSCs 会向梗死区及半影区迁移^[3],并分化出具有活性的新的神经元。因此,越来越多的学者更倾向于刺激内源性 NSCs 增殖分化以期达到治疗中风的目的。目前,对于缺血性中风的的治疗,激素替代疗法仍存在很大争议,主要是在治疗窗及剂量上存在分歧^[7]。Brown 等^[8]用体内实验的方法,证明了一定剂量的雌激素替代疗法,对大鼠缺血性脑卒中中具有显著的疗效,但其具体机制并未阐明。研究表明^[9],脑部的缺血性损伤能刺激海马内源性 NSCs 增殖迁移,而 BDNF 则起关键性作用。用 BDNF 刺激中动脉闭塞模型鼠海马区的 NSCs,能明显改善中风症状^[10]。Lee 等^[11]发现 BDNF 还能促进海马区的神经发生。因此,无论在海马神经发育过程中,还是缺血性脑卒中后海马 NSCs 增殖分化中,BDNF 都起了关键性的作用。但是雌激素对缺血性脑卒中的治疗作用是否与 BDNF 有关,则少有报道。尽管激素可以调节神经细胞的增殖,但对其定位并无影响,如雌激素并不影响室下区^[12],由此说明雌激素对各脑区的作用并不均衡。

Nestin 是 NSCs 特异性标志物,悬浮神经球 nestin 染色阳性即为 NSCs。在相差显微镜下神经球周边有光晕,平整光滑,并不断长大,从形态学上佐证了其 NSCs 的特质。NSE 主要表达于成熟神经元胞质,在突起中也有所表达,且阳性神经元体积较小,核质比较大。GFAP 是星形胶质细胞的特异性标志,在胞质和突起中均表达。本研究以体外培养的海马 NSCs 为模型,在海马神经发育及海马 NSCs 增殖分化中起关键作用的调节因子——BDNF 为对

照,详细观察了己烯雌酚对海马 NSCs 增殖分化的影响,通过形态学观察和免疫组化的方法检测 NSE、GFAP,对 NSCs 的分化程度进行客观的衡量与比较;通过 RT-PCR 的方法,检测各组 BDNF mRNA 的表达量,以探讨己烯雌酚可能的作用机制。实验结果表明,己烯雌酚能够促进海马 NSCs 增殖分化,其在促进海马 NSCs 增殖和分化过程中,表现出恒定的浓度依赖,即浓度为 1 \times 10⁻⁸ mol/L 时效果最显著。己烯雌酚对海马 NSCs 增殖分化的促进效力与 BDNF 的作用相当(两者差异无统计学意义);己烯雌酚可能是上调了 BDNF 的表达,从而促进 NSCs 增殖分化。

综上所述,己烯雌酚对海马 NSCs 的增殖分化具有促进作用,不仅促其向神经元分化,还促其向星形胶质细胞分化,并具有恒定的浓度依赖,其作用机制可能与上调 BDNF mRNA 的表达有关,具体机制还待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Huang Y, McNamara JO. Ischemic stroke: "acidotoxicity" is a perpetrator[J]. Cell, 2004, 118(6): 665-666.
- [2] Jin K, Wang X, Xie L, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(35): 13198-13202.
- [3] Zhang RL, LeTourneau Y, Gregg SR, et al. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone[J]. J Neurosci, 2007, 27(12): 3157-3162.
- [4] 常全忠, 张淑玲. 雌激素对 NMDA 诱导离体大鼠海马神经元凋亡的作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(4): 456-460.
- [5] Amantea D, Russo R, Bagetta G, et al. From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens[J]. Pharmacol Res, 2005, 52(2): 119-132.
- [6] 赵正梅, 陈晓蓉. 己烯雌酚对体外培养中脑神经元的保护作用[J]. 神经解剖学杂志, 2007, 23(1): 69-72.
- [7] Bramlett HM. Sex differences and the effect of hormonal therapy on ischemic brain injury[J]. Pathophys, 2005, 12(1): 17-27.
- [8] Brown CM, Dela Cruz CD, Yang E, et al. Inducible nitric oxide synthase and estradiol exhibit complementary neuroprotective roles after ischemic brain injury[J]. Exp Neurol, 2008, 210(2): 782-787.
- [9] Lichtenwalner RJ, Parent JM. Adult neurogenesis and the ischemic forebrain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(1): 1-20.
- [10] Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats[J]. Stroke, 2009, 40(4): 1490-1495.
- [11] Lee J, Duan W, Mattson MP. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice[J]. J Neurochem, 2002, 82(6): 1367-1375.
- [12] Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders[J]. Nature, 2006, 441(7097): 1094-1096.