

6-羟基多巴对 C17.2 神经干细胞毒性及 NURR1 基因对其保护作用

李庆军, 刘 军, 肖颂华, 阎 俊, 黎祥喷, 邢诒刚
(中山大学附属第二医院神经内科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】初步鉴定 C17.2 神经干细胞的特性并研究不同浓度 6-羟基多巴对 C17.2 神经干细胞毒性及 NURR1 基因对 C17.2 神经干细胞的保护作用。【方法】免疫组化检测神经干细胞特异性抗原 nestin, X-gal 染色检测 LacZ 基因的表达, 流式细胞仪检测剂量为 0.02、0.04、0.06 g/L 6-羟基多巴在添加含有 NURR1 基因的重组复制缺陷性病毒前后诱发神经干细胞的坏死和凋亡。【结果】C17.2 神经干细胞 nestin 抗原染色阳性, 绝大部分细胞呈 X-gal 染色阳性, 0.02 g/L 时 6-羟基多巴以诱导神经干细胞凋亡为主, 随着剂量增加, 细胞坏死增多, 0.06 g/L 时则以神经干细胞的坏死为主, NURR1 基因过表达能明显减少神经干细胞的坏死和凋亡。【结论】C17.2 神经干细胞具有明显的特性, 6-羟基多巴诱发的 C17.2 神经干细胞凋亡或坏死与其剂量有关, NURR1 基因对神经干细胞有保护作用。

关键词: 帕金森病; 神经干细胞; 6-羟基多巴

中图分类号: R742.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)-02-0141-05

Toxicity of 6-hydroxydopamine to C17.2 Nerve Stem Cells and the Protective Effect of NURR1 Gene

LI Qing-jun, LIU Jun, XIAO Song-hua, YAN Jun, LI Xian-pen, XIN Yi-gang
(Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To identify the characteristics of C17.2 neural stem cells (NSC) and to investigate the toxicity of 6-hydroxydopamine and the protective effect of NURR1 gene.【Method】Specific nestin expression in nerve stem cell was detected by immunohistochemistry. Expression of LacZ was detected by X-gal staining. Necrosis and apoptosis of neural stem cells induced by 6-hydroxy-dopamine at dose of 0.02、0.04、0.06 g/L respectively, with or without the protection of recombinant replicon-deficient virus with NURR1 gene, were detected by flow cytometry.【Results】C17.2 NSC expressed nestin antigen and mostly were stained by X-gal. 0.02 g/L 6-hydroxydopamine mainly induced apoptosis of NSC and 0.06g/L dose mostly induced necrosis. The apoptosis and necrosis of C17.2 NSC were decreased by adding NURR1 gene.【Conclusion】Necrosis or apoptosis of NSC induced by 6-hydroxydopamine is closely related to its dose. Overexpression of NURR1 shows protective effect on C17.2 cells.

Key words: Parkinson's disease; neural stem cell; 6-hydroxydopamine

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(2): 141-145]

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种严重危害中老年健康的中枢神经系统

system, CNS)退行性疾病。我国初步估计该病患病率为 57/10 万人以上, 随着社会老龄化进展, 发病

收稿日期: 2003-06-05

基金项目: 国家教育部博士点基金资助项目(D002003003)

作者简介: 李庆军(1974-), 男, 河南安阳人, 博士研究生, 邢诒刚, 导师, 项目负责人, E-mail: xingyigang@hotmail.com

率有升高趋势。PD 主要病理改变是因黑质多巴胺神经元变性缺失所致的中枢神经系统变性疾病,其发病机制未明,多认为是遗传、环境、毒物等多因素共同作用的结果。神经干细胞具有多向分化潜能,在适当的条件下能分化为多巴胺能神经元,因此移植或激活体内已存在的神经干细胞,补充体内缺失的多巴胺能神经元,恢复多巴胺能神经元的神经支配,是治疗 PD 的最佳选择,相关的动物实验也正在尝试^[1]。但是神经干细胞对神经毒素如 6-羟基多巴是否有一定的拮抗能力,在神经毒素存在下神经干细胞能否正常增殖、分裂和分化,目前尚未见文献报道。Nurr1 又称之为 NOT/TINUR/RNR-1/HZF-3/RNR-1,为即早基因产物,属于类固醇类激素、类维生素 A、甲状腺激素核受体超家族。Nurr1 蛋白几乎完全集中表达在中枢神经系统内,在胚胎早期多巴胺能神经元前体细胞即有表达,早于酪氨酸羟化酶(TH)的表达,与神经干细胞向多巴胺能神经元分化及多巴胺能神经元生存和发展关系密切^[2],但对保护细胞拮抗神经毒素的作用尚未明确。因此,本课题组引进国际上所公认 C17.2 神经干细胞系,采用流式细胞仪检测 6-羟基多巴能否诱导 C17.2 神经干细胞坏死或凋亡,明确在神经干细胞内过表达的 NURR1 基因除能调控神经干细胞分化外,是否对神经毒素有拮抗作用,维持神经干细胞的正常增殖活性。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂

6-羟基多巴、X-gal 等均为美国 Sigma 公司产品,DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清均购自 Gibco 公司, nestin 一抗由博士德公司进口分装。实验中所用其它试剂均为分析纯级试剂。含有 NURR1 基因的重组复制缺陷性腺病毒由本课题组构建(文章已另行投稿)。

1.2 C17.2 神经干细胞传代中 Nestin 和 LacZ 的表达

将 C17.2 神经干细胞(美国哈佛医学院 Snyder 教授所赠)接种于含体积分数为 10% 胎牛血清和 5% 马血清的 DMEM/F12 培养基中。当细胞贴壁生长约铺满瓶底面积的 90% 时用胰酶-EDTA 消化,1:10 左右传代。

将 C17.2 神经干细胞接种在盖玻片上,待细胞

长满后用 40 g/L 多聚甲醛固定,细胞免疫组织化学检测神经干细胞所特有中间纤维骨架蛋白-神经巢蛋白(nestin)和 X-gal 染色显示 C17.2 神经干细胞的 LacZ 标记基因。滴加 nestin 一抗(1:100 倍稀释)4℃ 过夜,依次滴加二抗和生物素标记的链霉亲和素,二氨基联苯胺(DAB)显色,阴性对照为正常血清代替一抗。细胞爬片、固定、反复冲洗干净后,滴加 X-gal 溶液,37℃ 过夜即可。

1.3 6-羟基多巴诱导的 C17.2 神经干细胞坏死和凋亡及 Nurr1 的保护作用

将 C17.2 神经干细胞接种在 25 cm² 培养瓶中,待细胞处于平台期后分为空白对照组 I 组和试验组 II、III、IV 组,每组 10 只,其中有 5 只加有含有 NURR1 基因的重组复制缺陷性腺病毒 0.5 mL,其 MOI(multiplicity of infection)值为 20,更换培养液,每瓶为 4 mL,空白对照组加入生理盐水,试验组加入 6-羟基多巴,浓度分别为 0.02 g/L、0.04 g/L、0.06 g/L,共同孵育 6 h 后收集全部培养细胞,流式细胞仪检测细胞坏死和凋亡所占细胞总数的比例。

早期凋亡细胞因细胞膜的磷脂对称性改变时使暴露细胞膜外磷脂酰丝氨酸可特异结合异硫氰酸荧光素(FITC)标记的膜连蛋白(annexin V),但因细胞膜仍保持完整性,与染色质结合的荧光染料 P1 不能进入细胞内,使凋亡仅染色为绿色,即 annexin V 单阳性;坏死细胞的磷脂酰丝氨酸也暴露在外与 annexin V 结合呈阳性,又因细胞膜的破坏,P1 得以进入细胞内使染色质着色为红色,即 annexin V/P1 双阳性;损伤细胞仅为 P1 阳性,正常细胞为 annexin V/P1 双阴性。流式细胞仪每次检测细胞坏死或凋亡共计数 10×10^3 细胞左右,然后计算出凋亡和坏死细胞各占细胞总数的比例。

1.4 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计学处理,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析检验统计各组数值间的差异。

2 结果

2.1 C17.2 神经干细胞传代中 Nestin 和 LacZ 的表达

C17.2 神经干细胞接种后很快贴壁,进入分裂期后,细胞增殖很快,3~5 d 细胞即能长满培养瓶

的 90%。细胞形态不规则,呈圆形、三角形或多角形,细胞边界不清,部分细胞有长的突起,并与临近的细胞相互接触,交织成网状(图 1)。经传代后细胞的生长和形态没有太多的变化。传代细胞进行 nestin 免疫组化染色,结果 95% 细胞呈 nestin 抗原阳性,连续传 7 代后仍有 90% 的细胞呈 nestin 阳性(图 2), X-gal 染色示 90% 以上的 C17.2 神经干细胞染成深蓝色(图 3),细胞形态和边界清晰,表明 C17.2 神经干细胞内 LacZ 基因比较稳定。LacZ 基因随着细胞传代次数越加,丢失的可能性增加,细胞着色的比例会下降,当 X-gal 着色细胞少于细胞总数的 75% 时就要及时更换新的冻存细胞,因此应建立自己的 C17.2 神经干细胞库。

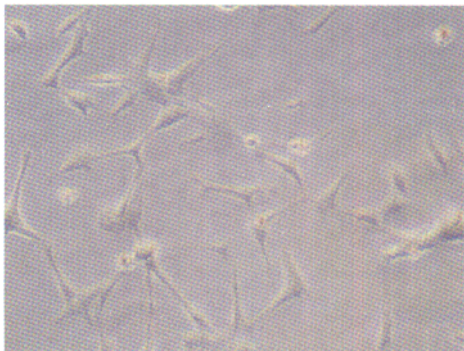


图 1 NSC 普通光镜观察

Fig. 1 NSC observation with microscope, ×400

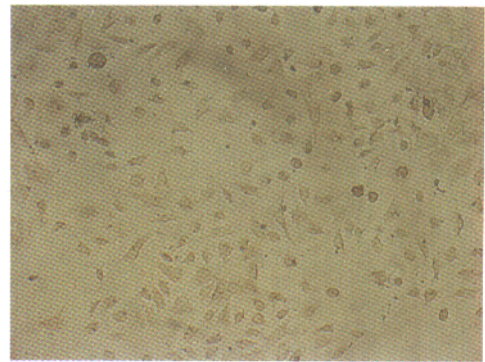


图 2 NSC 的 nestin 染色

Fig. 2 Nestin staining of NSC, ×200

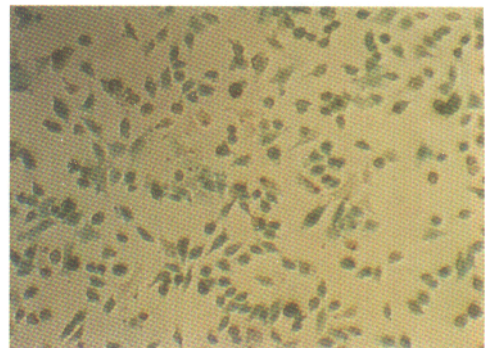


图 3 NSC 的 X-gal 染色

Fig. 3 X-gal staining of NSC, ×200

2.2 6-羟基多巴诱导的 C17.2 神经干细胞坏死和凋亡及 Nurr1 的保护作用

不同浓度 6-羟基多巴对 C17.2 神经干细胞影

响不同,随着 6-羟基多巴浓度增加,细胞凋亡和坏死明显增加,但当 6-羟基多巴为 0.06 g/L 时,细胞凋亡明显减少,坏死细胞明显增加。加入含有 NURR1 基因的重组复制缺陷性腺病毒后,6-羟基多巴诱发的神经干细胞的凋亡和坏死明显降低(表 1)。

表 1 不同浓度 6-羟基多巴诱导 C17.2 神经干细胞坏死和凋亡的比例

Table 1 Ratio of apoptosis and necrosis of C17.2 nerve stem cell induced by 6-OHDA

Group	n	Without NURR1 gene		With NURR1 gene	
		Apoptosis (%)	Necrosis (%)	Apoptosis (%)	Necrosis (%)
I	5	1.21 ± 0.23 ¹⁾	6.56 ± 0.49 ⁴⁾	1.15 ± 0.11 ¹⁾	6.22 ± 0.51 ⁴⁾
II	5	2.90 ± 0.33 ²⁾	7.40 ± 0.68 ⁵⁾	1.92 ± 0.21 ^{2),7)}	7.11 ± 0.24 ^{5),7)}
III	5	4.20 ± 0.45 ³⁾	9.18 ± 0.29 ⁶⁾	3.03 ± 0.12 ^{3),7)}	7.88 ± 0.46 ^{6),7)}
IV	5	1.08 ± 0.23	10.31 ± 0.78	1.27 ± 0.19	8.87 ± 0.38 ⁷⁾
F		109	36	137	38

1) Compared with IV, P > 0.05; 2) Compared with I, IV, P < 0.05; 3) Compared with II, P < 0.05; 4) Compared with II, III, IV, P < 0.05; 5) Compared with III, P < 0.05; 6) Compared with IV, P < 0.05; 7) Compared with the same dosage group (apoptosis or necrosis), P < 0.05

3 讨 论

C17.2 神经干细胞系是目前研究神经干细胞

特性较好的细胞系,被国际上许多著名试验室所采用^[3-5]。C17.2 神经干细胞系是由哈佛医学院的 Snyder 教授,采用带有 LacZ 基因的逆转录病毒将 v-myc 基因整合到小鼠小脑祖细胞内永生化的细胞

系,从此细胞系内克隆的细胞可分化为与体内中枢神经系统内移植部位相似的神经元和神经胶质细胞,并能与相邻的细胞建立有效的突触联系^[6]。C17.2 神经干细胞采用了 LacZ 基因标记,在 X-gal 存在下,细胞染成蓝色,或采用原位杂交方法就可非常容易检测到该细胞的存在,因此无论在体外研究神经干细胞的特性或进行体内神经干细胞移植治疗,都可良好显示神经干细胞在体内外的分化和移行^[7,8]。C17.2 神经干细胞内的 LacZ 比较稳定,不易丢失。我们在引进该细胞系进行连续传代 7 代后,被 X-gal 染色的细胞数仍占细胞总数的 90% 以上,完全可以用于细胞移植后的标记和示踪。由于国内尚没有一个公认的神神经干细胞株,C17.2 神经干细胞株的引进有助于我们采用标准的方法对神经干细胞的功能和分化进行深入的研究。我们正在采用自己构建的含有 NURR1、TH、芳香族氨基酸脱羧酶(Aromatic Amino acid Decarboxylase, AADC)等基因重组复制缺陷性腺病毒,并结合细胞因子对其修饰诱导,使其定向分化,治疗 PD 等中枢神经系统退行性疾病^[9]。

在生理状态下,6-羟基多巴的自身氧化处于一个动态平衡系统中,包括金属离子的转化、过氧化物、过氧化氢(H_2O_2)、自由基生成和清除等^[10]。6-羟基多巴引起的氧化应激使细胞膜的脂质过氧化,使磷脂酰肌醇和磷脂酰胆碱含量降低,减弱了细胞膜的流动性,氧化应激还破坏细胞膜的完整性,影响细胞膜转运功能^[11]。6-羟基多巴引起的氧化应激减弱了细胞内的 Ca^{2+} 向细胞外的转运,同时促进内质网和线粒体释放 Ca^{2+} ,诱发细胞内钙超载,促进了细胞的凋亡^[12]。6-羟基多巴还可直接抑制线粒体呼吸链复合酶 I,使线粒体腺苷三磷酸(ATP)生成受阻,细胞内 ATP 逐渐耗竭,导致细胞变性死亡^[13]。本实验研究发现 6-羟基多巴在以体内生理浓度 0.02 g/L 时主要诱导 C17.2 神经干细胞的凋亡,随着剂量的增加,细胞凋亡明显上升,但大剂量的 6-羟基多巴则以促进 C17.2 神经干细胞坏死为主,细胞的凋亡率明显下降,表明在生理状态下,6-羟基多巴对 C17.2 神经干细胞的毒性以诱发细胞凋亡为主。

Nurr1 蛋白几乎完全集中表达在中枢神经系统内,在胚胎早期多巴胺能神经元前体细胞即有表达,与神经干细胞向多巴胺能神经元分化及多巴胺能神经元生存和发展关系密切。NURR1^{-/-} 基因小鼠活动能力低下,生后 24 h 内即告死亡^[14,15]。

NURR1^{-/-} 鼠临床表现虽无明显异常,但 TH 活性已有下降,且随着年龄的增长其下降的速度加快,多巴胺合成明显减少,中脑多巴胺能神经元变性、凋亡数目增高,多巴胺能神经元对 MPTP 神经毒性的抵抗力明显减低^[16]。关于 NURR1 的研究主要集中在动物模型上,体外过表达 NURR1 基因对神经干细胞的保护作用由于 NURR1 基因较大,构建带有标记质粒比较困难,因而研究较少。因此本课题组在构建含 NURR1 基因重组复制缺陷性腺病毒后,首先研究过表达 NURR1 基因对神经毒素 6-羟基多巴的拮抗作用。本实验发现在过表达的 NURR1 情况下,C17.2 神经干细胞对不同浓度 6-羟基多巴诱发的细胞凋亡和坏死均明显减少,表明神经 NURR1 对神经干细胞有显著的保护作用。

因此,本研究提示在进行神经干细胞移植治疗 PD 时,除要注意诱导细胞神经干细胞定向分化为多巴胺能神经元外,也要注意体内神经毒素对神经干细胞的毒性。在 NURR1 过表达的情况下,神经干细胞对神经毒素有一定的拮抗作用。但 NURR1 过表达并不能完全拮抗 6-羟基多巴的毒性作用,提示在进行神经干细胞移植治疗中枢神经系统疾病时,注意减少体内细胞毒素诱发的神经干细胞的凋亡和坏死,以提高体内神经干细胞移植后细胞的成活率,增加神经干细胞移植的治疗效果。

参考文献:

- [1] 刘丹述,谢瑶,黄冰,等. 小鼠胚胎干细胞植入大鼠脑内存活和增殖[J]. 中山医科大学学报,2002,23(5):328-30.
- [2] Simon H H, Bhatt L, Gherbassi D, *et al.* Midbrain dopaminergic neurons: determination of their developmental fate by transcription factors[J]. *Ann N Y Acad Sci* 2003,991:36-47.
- [3] Yang M, Stull N D, Berk M A, *et al.* Neural stem cells spontaneously express dopaminergic traits after transplantation into the intact or 6-hydroxydopamine-lesioned rat[J]. *Exp Neurol*,2002,177(1):50-60.
- [4] Riess P, Zhang C, Saatman K E, *et al.* Transplanted neural stem cells survive, differentiate, and improve neurological motor function after experimental traumatic brain injury[J]. *Neurosurgery*,2002,51(4):1043-52.
- [5] Cheng A, Chan S L, Milhavel O, *et al.* p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells[J]. *J Biol Chem*,2001,276(46):43320-7.

- [6] Snyder E Y, Deitcher D L, Walsh C, *et al.* Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum[J]. *Cell*, 1992, 68(1): 33-51.
- [7] Lacorazza H D, Flax J D, Snyder E Y, *et al.* Expression of human β -hexosaminidase α -subunit gene (the gene defect of Tay-Sachs disease) in mouse brains upon engraftment of transduced progenitor cells[J]. *Nature*, 1996, 2(4): 424-9.
- [8] Whittemore S R, Snyder E Y. Physiologic relevance and functional potential of CNS-derived cell lines[J]. *Molec Neurobiol*, 1996, 12(1): 13-38.
- [9] 刘军, 邢诒刚, 梁秀龄, 等. 人芳香族氨基酸脱羧酶基因的克隆及测序[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(6): 436-8.
- [10] Galindo M F, Jordan J, Gonzalez-Garcia C, *et al.* Chromaffin cell death induced by 6-hydroxydopamine is independent of mitochondrial swelling and caspase activation[J]. *J Neurochem*, 2003, 84(5): 1066-73.
- [11] Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, *et al.* Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *J Neurochem*, 2000, 74(4): 1605-12.
- [12] Kumar R, Agarwal A K, Seth P K. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine[J]. *J Neurochem*, 1995, 64(4): 1703-7.
- [13] Glinka Y, Tipton K F, Youdim M B. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine[J]. *J Neurochem*, 1996, 66(5): 2004-10.
- [14] Wallen A, Zetterstrom R H, Solomin L. Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in NURR1 mutant mice[J]. *Exp Cell Res*, 1999, 253(2): 737-46.
- [15] Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau J D, Le W D, *et al.* Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(7): 4013-8.

(编辑 刘清海)

(上接 140 页 from page 140)

作的诊断及分型(表型分型)并不确切。相对其他 SCA 亚型, SCA12 并无具诊断意义的特征性表现, 只有进行基因分析才能得出正确的 SCA 亚型诊断。

参考文献:

- [1] 梁秀龄. 神经病学·神经系统遗传性疾病 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2001. 79-108, 337-44.
- [2] 李洵桦, 梁秀龄, 刘焯霖. 957 例神经系统遗传病临床分析[J]. *中华医学遗传学杂志*, 1994, 11(6): 372-4.
- [3] Holmes S E, Hearn E O, McInnis M G, *et al.* Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PPP2R2B is associated with SCA12[J]. *Nat Genet*, 1999, 23(4): 391-2.
- [4] Harding A E. Clinical features and classification of inherited ataxias[J]. *Adv Neurol*, 1993, 61(1): 1-14.
- [5] 黄智恒, 徐评议, 梁秀龄. 广东汉族人遗传性脊髓小脑性共济失调基因突变的研究[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2002, 28(4): 248-51.
- [6] Margolis R L. The spinocerebellar ataxias: order emerges from chaos[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2002, 2(5): 447-56.
- [7] Holmes S E, Hearn E O, Ross C A, *et al.* SCA12: an unusual mutation leads to an unusual spinocerebellar ataxia[J]. *Brain Res Bull*, 2001, 56(3-4): 397-403.
- [8] Worth P F, Wood N W. Spinocerebellar ataxia type 12 is rare in the United Kingdom[J]. *Neurology*, 2001, 56(2): 419-20.
- [9] Fujigasaki H, Verma I C, Camuzat A, *et al.* SCA12 is a rare locus for autosomal cerebellar ataxia: a study of an Indian family[J]. *Ann Neurol*, 2001, 49(1): 117-21.
- [10] Cholfin J A, Sobrido M J, Perlman S, *et al.* The SCA12 mutation as a rare cause of spinocerebellar ataxia [J]. *Arch Neurol*, 2001, 58(11): 1833-5.

(编辑 刘清海)