

褪黑激素对新生大鼠神经干细胞向神经元样细胞分化的影响

胡黎平, 谢富康, 李海标

(中山大学中山医学院组胚教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】探讨褪黑激素对外培养新生大鼠神经干细胞分化的影响。【方法】从新生 SD 大鼠室管膜下区分离依赖碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮细胞生长因子(EGF)生存的神经干细胞进行培养, 原代及子代细胞鉴定后用于实验。实验细胞均在无生长因子而含 10 mL/L 胎牛血清条件下培养, 经褪黑激素或 Luzindole 作用 1 周后做免疫组织化学染色, 比较 Map2 阳性细胞出现率。【结果】① 依赖 bFGF 和 EGF 生长的神经干细胞体外呈集落样生长, 表达抗原蛋白巢蛋白(Nestin), 无生长因子培养基中可分化形成胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)、S100 蛋白、微管相关蛋白(Map2)阳性细胞。② 褪黑激素能够提高 Map2 阳性细胞生成率(23.45%, 21.82%) ($P < 0.01$)。③ 褪黑激素膜受体竞争性阻断剂 Luzindole 可阻断高浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)褪黑激素促神经干细胞分化作用, 但不能抑制低浓度褪黑激素(10 nmol/L)的作用。【结论】褪黑激素能促进神经干细胞向神经元样细胞分化, 不同浓度褪黑激素可能存在不同的作用机制。

关键词: 褪黑激素; 干细胞/神经; 细胞分化

中图分类号: Q831 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)03-0180-03

Effects of Melatonin on Differentiation of Rat Neural Stem Cell into Neuron-like Cells HU Li-ping, XIE Fu-kang, LI Hai-biao. (Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effect of melatonin on differentiation of rat neural stem cells *in vitro*.【Methods】Neural stem cells, which depended on bFGF and EGF for surviving, were isolated from subventricular zone of neonate rat, cultured *in vitro* and used for experiment after identification by immunohistochemistry. All cells were cultured in medium containing 10 mL/L fetal calf serum without growth factors, processed for immunohistochemistry staining one week after treatment with melatonin or luzindole, and the formation rate of Map2-positive cells among the experimental groups was compared.【Results】① Neural stem cells generated neural spheres *in vitro* and expressed Nestin protein, and differentiated into GFAP-, S100-, Map2-positive cells without growth factors. ② Melatonin increased the formation rate of Map2-positive cells (23.45%, 21.82%) ($P < 0.01$). ③ Luzindole, a competitive inhibitor of the binding of melatonin to the transmembrane receptors, blocked the effect of high concentration(100 $\mu\text{mol/L}$) of melatonin on the differentiation of neural stem cells into neuron-like cells, but could not inhibit the action of melatonin in low concentration(10 nmol/L).【Conclusion】The results indicate that melatonin can accelerate differentiation of neural stem cells into neuron-like cells, but there exists different effects between the low and high concentrations, which may refer to the different mechanisms of action on neural stem cells.

Key words: melatonin; stem cells/neural; cell differentiation

褪黑激素(melatonin)是一种神经内分泌激素, 分布于体内多种器官中, 并随着年龄的递增而减少, 具有广泛的生理作用^[1]。许多研究表明褪黑激素可抑制神经肿瘤细胞的增殖, 促进多种细胞的分化, 而且有助于幼稚细胞的分化成熟^[2]。褪黑激素在神经系统发育过程中作用及其机制, 尤其对神经前体细胞的作用尚不清楚。本研究探讨褪黑激素对鼠神经干细胞体外分化的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 神经干细胞分离培养及鉴定

取生后 2 d 的 SD 大鼠, 引颈处死后在无菌条件下取出大脑, 沿视交叉前 2 mm 处做冠状切面, 切下 3~5 mm 左右厚度脑组织片, 0.01 mol/L 的 PBS 液(pH 7.2)清洗。在解剖显微镜下, 沿侧脑室壁分离出室管膜下区神经组织, 剪成碎块(< 2

收稿日期: 2001-12-26

基金项目: 国家重点基础研究发展规划基金资助项目(973)(G1999054301); 国家自然科学基金资助项目(39970237); CMB-SUMS Scholar Program(98-677)

作者简介: 胡黎平(1963-), 男, 江西南昌人, 博士生, 讲师; 谢富康, 教授, 项目负责人; 李海标, 教授, 导师。

mm),加入消化液(含0.7 g/L 犬尿硒酸,0.2 g/L 透明质酸,和1.33 g/L 胰酶)置37 °C 30 min。加入等量1 g/L 卵黏蛋白(Sigma),用巴斯德管机械吹打10次,经200目金属网过滤后,离心5 min(400 g),去上清。DMEM/F12培养液洗1次,再加入含20 μg/L bFGF、20 μg/L EGF(Peprotech Ltd)和20 mL/L B27(Gibco)的DMEM/F12培养液,继续机械吹打成细胞悬液,调整细胞密度 $< 10^8/L$ 进行培养。2~3 d换1次培养液,6~7 d传代1次。分别取原代与子代细胞做巢蛋白(nestin)免疫组化染色。

1.2 细胞分化实验

取第2代细胞接种于预先放置涂布多聚鸟氨酸与层黏蛋白(laminin)的盖玻片的培养板中(细胞密度 $< 2\ 000/cm^2$),基础培养基中不含生长因子,加入10 mL/L 胎牛血清。实验分组:A组:100 μmol/L 褪黑激素(由美国 Dr. Dun-Xian Tan 惠赠);B组:10 nmol/L 褪黑激素;C组:0.2 μmol/L Luzindole(Sigma);D组:0.2 μmol/L Luzindole + 100 μmol/L 褪黑激素;E组:0.2 μmol/L Luzindole + 10 nmol/L 褪黑激素;对照组。各组细胞培养1周后做免疫组织化学染色。

1.3 免疫组织化学染色

用免疫组织化学染色(Ultrasensitive™ S-P kit,迈新公司)分别检测各组细胞中出现的胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)、微管相关蛋白-2(microtubule-associated protein, Map2)、S100 阳性细胞(抗体购自迈新公司, Sigma)。Map2 是神经元表达的特异性抗原,可作为神经元的标记蛋白。用荧光染料 DAPI(Sigma)复染细胞核。每个标本在低倍镜或高倍镜下观察,随机取15个非重复视野,计数 Map2 阳性细胞数和 DAPI 阳性细胞数,计算两者比率(%)。

1.4 统计学方法

数据统计分析采用 χ^2 检验方法。

2 结果

2.1 神经干细胞体外生长

取自室管膜下区的分离原代细胞在无血清含 bFGF 与 EGF 培养液培养条件下,24 d 后大部分死亡,少部分细胞生存,于2~3 d 后开始增殖呈悬浮集落样生长,细胞境界不清楚,6~9 d 形成较大集落(图1)。经多次传代后部分细胞仍然呈集落样

生长,生长特性同原代细胞。

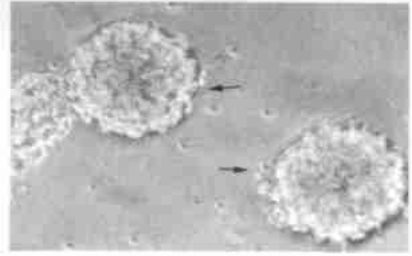


图1 体外培养依赖 bFGF 和 EGF 生长的神经干细胞集落
Fig.1 Neurosphere of neural stem cells cultured in medium containing bFGF and EGF (in vitro cultured for 7 d × 200)

2.2 神经干细胞 Nestin 抗原表达及分化

取自室管膜下区的神经干细胞原代集落与子代集落细胞贴壁2 h 后做 Nestin 免疫组化染色,集落细胞呈 Nestin 抗原阳性(图2)。在撤去生长因子,并加入10 mL/L 胎牛血清条件下,集落贴壁2 h 后细胞后开始向外迁移分化,形成多突起细胞,而且相连成网(图3)。继续培养1周后,分别进行免疫组织化学染色,分化的细胞 Map2、GFAP 和 S100 抗原阳性,表明分离出的神经干细胞具有多向分化能力(图4)。

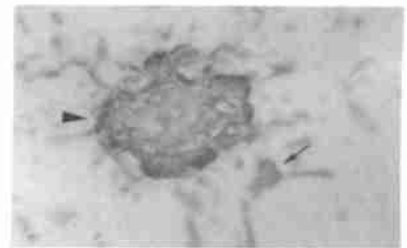


图2 Nestin 免疫组化染色阳性的神经干细胞
Fig.2 Nestin positive neurosphere(▲) and cells(↑) stained by immunohistochemistry (2 h after attachment in vitro, × 200)

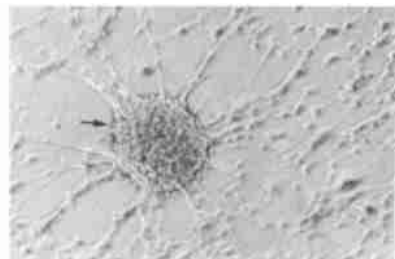


图3 分化状态的神经干细胞集落
Fig.3 Differentiation of neural stem cells (after withdrawing bFGF and EGF, × 100)

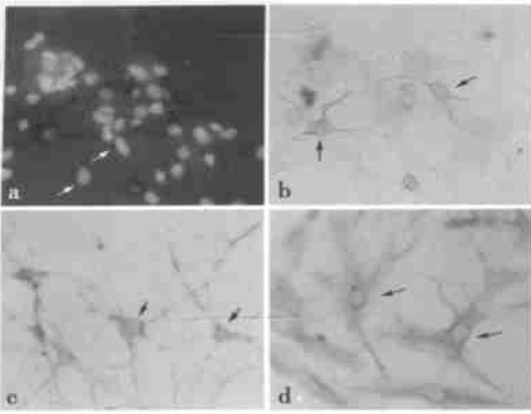


图4 神经干细胞分化形成的免疫组化染色阳性细胞
Fig.4 Positive cells of immunohistochemistry staining differentiated from neural stem cells (7 d after attachment *in vitro*, $\times 300$)

A: nucleus stained with DAPI used for counting the number of cells in one field; B: Map2-positive cells; C: GFAP-positive cells; D: S100-positive cells

2.3 褪黑激素对神经干细胞分化的影响

褪黑激素可加速神经干细胞的分化,在不同浓度褪黑激素作用下,神经干细胞分化为 Map2 阳性细胞率(%)均升高,与对照组相比有显著差异(A组:21.82; B组:23.45;对照组:7.48; $P < 0.01$),但低浓度(10 nmol/L)与高浓度(100 μ mol/L)之间的作用差异无显著性(A组:21.82; B组:23.45; $P > 0.05$)。Luzindole 为细胞膜褪黑激素特异性受体阻断剂,可竞争阻断褪黑激素与膜受体的结合。加入 Luzindole 后可以阻断高浓度褪黑激素对神经干细胞的促分化作用,阻断后的 Map2 阳性细胞出现率较未阻断组低(A组:21.82, E组:13.31, $P < 0.05$),但并不阻断低浓度褪黑激素作用(D组:28.89, $P > 0.05$)。高浓度褪黑激素组, Map2 阳性细胞突起较长(图5)。

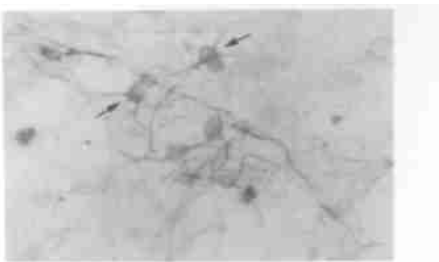


图5 Mel⁻⁵组的 Map2 阳性细胞,细胞突起较长
Fig.5 Map2-positive cells with long fibre from Mel⁻⁵ group (7 d after attachment *in vitro*, $\times 200$)

3 讨论

神经元的分化受许多细胞外信号分子的影响,这些分子通过细胞膜受体介导级联反应或核受体介导作用影响早期中枢神经系统的发育。这些因素当中主要有激素、维甲酸等^[3,4]。褪黑激素主要是由松果体分泌的一种神经内分泌激素,参与多种生理病理过程。近年来,褪黑激素在神经发育过程中的作用逐渐引起人们的注意。有报道,褪黑激素可抑制 P12 细胞增殖并促使其向神经元分化^[5],而且褪黑激素可促进外源性褪黑激素膜受体基因转染的卵巢基质细胞表达神经元特异性蛋白,并且具有神经元样表型^[6]。我们选用鼠神经干细胞作为研究对象,发现褪黑激素同样促进神经干细胞向神经元样细胞分化。但不同浓度条件下,褪黑激素对神经干细胞分化的作用结果有些不同,低浓度(10 nmol/L)的褪黑激素促使神经干细胞向神经元样细胞分化,而高浓度(100 μ mol/L)褪黑激素不仅促进神经干细胞向 Map2 阳性细胞分化,而且有助于 Map2 阳性细胞突起的生长,表明高低浓度褪黑激素均可促进神经元的分化,但可能对分化神经元突起的生长速度影响不同。

褪黑激素受体在中枢神经系统广泛分布^[7]。目前已知褪黑激素受体有二种,一种是细胞膜跨膜受体,存在三种亚型: Mt1、Mt2、Mt3,均为 Gi 蛋白偶联受体,不同组织部位受体亚型分布不同;另一种位于核,含有维甲酸核受体同源片段,具有二种亚型: RZR α 和 RZR β ,能够特异结合激活反应元件: RGGTCA (R=A or G),该反应元件在某些与细胞分化有关的活性因子基因中存在,例如: CRBP-1 (cellular retinoic acid-binding-1), P21, BSP (bone sialoprotein)等^[2,7]。我们的研究发现,褪黑激素膜受体特异性阻断剂 Luzindole 可阻断高浓度褪黑激素对神经干细胞的促分化作用,但不能阻断低浓度褪黑激素的作用,我们推测高浓度条件下,褪黑激素主要激活细胞膜受体,通过跨膜信号的转导,进而引发系列级联反应,导致神经干细胞向神经元样细胞分化。而在低浓度条件下,褪黑激素浓度不足以激活细胞膜受体,同时由于褪黑激素是一种脂溶性激素,可以直接穿透细胞膜进入细胞内激活褪黑激素核受体,通过激活转录因子基因表达触发神经干细胞向神经元方向分化的启动。有文献报道,低

(下转第 203 页 to page 203)

- aureus, *Serratia marcescens*, and *Streptococcus faecalis* in the establishment of infection in mice [J]. *Infect Immun*, 1983, 39(1): 193.
- [4] Yao Y M, Tian H M, Sheng Z Y, *et al*. Inhibitory effects of low-dose polymyxin B on hemorrhage-induced endotoxin/ bacterial translocation and cytokine formation in rats [J]. *J Trauma*, 1995, 38(6): 924.
- [5] Andrew M, Calvin B. Reversal of postburn immunosuppression with low-dose polymyxin B [J]. *J Trauma*, 1986, 26(11): 995.
- [6] Neely A, Law E, Holder I. Increased susceptibility to lethal *Candida* infections in burned mice preinfected with *Pseudomonas aeruginosa* or pretreated with proteolytic enzymes [J]. *Infect Immun*, 1986, 52(1): 200.
- [7] Kagawa G, Abe S, Yamaguchi H. Mortality of *Candida albicans* infected mice is facilitated by superinfection of *Escherichia coli* or administration of its lipopolysaccharide [J]. *J Infect Dis*, 1995, 171(6): 1539.
- [8] Regel M, Nerlich M, Dwenger J, *et al*. Phagocytic function of polymorphonuclear leukocytes and the RES in endotoxemia [J]. *J Surg Res*, 1987, 42(1): 74.
- [9] Kaija T, Lisa L, Ira M, *et al*. Endotoxin-induced selective dysfunction of rabbit polymorphonuclear leukocytes in response to endogenous chemotactic factors [J]. *Infect Immun*, 1985, 50(2): 527.
- [10] 吴朝晖, 张扣兴, 唐英春. 抗菌药物诱导大肠杆菌内毒素释放的研究 [J]. *中山医科大学学报*, 1999, 20(3): 194.

(编辑 黄小延)

(上接第182页 from page 182)

浓度褪黑激素可以抑制 P12 细胞的增殖, 而高浓度褪黑激素无抑制细胞的作用而是有助于细胞存活; 低浓度褪黑激素并不能抑制 forskolin 诱导的细胞内 cAMP 的升高, 这一现象提示低浓度褪黑激素不是通过细胞膜 G_i 蛋白偶联受体的作用, 而是直接作用于核受体, 抑制 P12 细胞的增殖^[9]。我们的实验结果得出相似的结论, Luzindole 阻断褪黑激素细胞膜受体后, 不能抑制低浓度褪黑激素对神经干细胞的促分化作用。细胞核内褪黑激素受体被激活后, 通过一系列复杂细胞内信号途径可诱导神经干细胞向神经细胞分化^[3, 8]。还有实验证实, 细胞膜褪黑激素受体的激活在干细胞向神经样细胞分化方面起重要作用, 该受体是在高浓度下被激活的^[2, 10]。本实验也证实, 细胞膜褪黑激素受体被阻断后, 高浓度褪黑激素促神经干细胞分化作用减弱, 说明是通过细胞膜受体而起作用的。

我们的实验证明褪黑激素作为体内重要的神经内分泌激素, 参与促进神经干细胞向神经元方向的分化成熟, 可能涉及细胞内复杂的信号系统的调控机制, 有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Reiter R J, Gverro J M, Garcia J J, *et al*. Reactive oxygen in intermediates: molecular, damage, and aging [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 854: 410.

- [2] Roth J A, Kim B G, Lin W L, *et al*. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(31): 22041.
- [3] Takahashi J, Palmer T D, Gage F H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures [J]. *J Neurobiol*, 1999, 38(1): 65.
- [4] 项 鹏, 夏文杰, 王连荣, 等. 丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞 [J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(5): 321.
- [5] Cos S, Verduga R, Fernandez Viadero C, *et al*. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture [J]. *Neurosci Lett*, 1996, 216(2): 113.
- [6] Witt-Enderby P A, MacKenzie R S, Carroll E A, *et al*. Melatonin induction of filamentous structures in non-neuronal cells that is dependent on expression of human mt1 melatonin receptor [J]. *Cell Motil Cytoskel*, 2000, 46(1): 28.
- [7] 赵 瑛, 邵福源, 何淑芬, 等. 人胚胎下丘脑褪黑激素受体鉴定及其生物学特征 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 1999, 15(3): 149.
- [8] Carlberg C. Gene regulation by melatonin [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 917: 387.
- [9] Roth J A, Rabin, Agnello K. Melatonin suppression of PC 12 cell growth and death [J]. *Brain Res*, 1997, 768(1-2): 63.
- [10] Bordt S L, Mekeon R M, Li P K. N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neurensin in response to melatonin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1499(3): 257.

(编辑 张恩健)