

·基础研究·

甲泼尼龙抑制神经干细胞并诱导其凋亡的研究*

吴永超¹ 郑启新¹ 杜靖远¹ 吴 斌¹

摘要 目的:研究甲泼尼龙对体外培养的神经干细胞的直接作用,为有效的结合这两种治疗方法提供依据和指导。方法:体外培养神经干细胞,加入 MP 培养 12h、24h 和 48h 后,用细胞活性检测试剂 CCK-8,检测其对神经干细胞活性的影响,用 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡,用 Annexin V/PI 双染色法检测神经干细胞凋亡比率。结果:甲泼尼龙对体外培养的活性有抑制作用,而且可以诱导体外培养的神经干细胞的发生凋亡。结论:甲泼尼龙不利于神经干细胞的生长,不宜在进行甲泼尼龙冲击疗法的同时进行神经干细胞移植。

关键词 甲泼尼龙;神经干细胞;凋亡

中图分类号:R49,R741,R459.1 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-09-0776-03

Methylprednisolone introduce inhibition and apoptosis to neural stem cells in vitro/WU Yongchao, ZHENG Qixin, DU Jingyuan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21(9):776—778

Abstract Objective: To study the direct effect of methylprednisolone to neural stem cells in vitro, and provide direction for the combined usage of these two therapy methods. **Method:** Neural stem cells were obtained and cultured in vitro. Methylprednisolone (250ng/ml) was added to the culture media for 12h, 24h and 48h. The activity of NSC was tested with CCK-8 (cell counting kit). NSCs were dyed with Hoechst 33258 and Annexin V-FITC/PI apoptosis kit. The apoptosis rates were tested with flow cytometry. **Result:** Methylprednisolone inhibited the activity of neural stem cells in vitro, and also promoted apoptosis of neural stem cells. **Conclusion:** Methylprednisolone provides a adverse environment for neural stem cells, so combined usage of methylprednisolone and neural stem cells should be avoided.

Author's address Dept. of Orthopaedics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022

Key words methylprednisolone; neural stem cell; apoptosis

甲泼尼龙(methylprednisolone, MP)是一种糖皮质激素,它是治疗急性脊髓损伤的常用药物,急性脊髓损伤的早期进行大剂量的 MP 冲击疗法是目前唯一被大规模临床实验证实有一定效果的临床治疗方法^[1-2],可以减轻受损脊髓的炎症反应,减轻继发损伤,保护受损脊髓,提高脊髓损伤后运动和感觉功能恢复。神经干细胞(neural stem cell, NSC)是神经系统来源的干细胞,可以分化成为神经元和神经胶质细胞,目前被广泛用于神经损伤和疾病的研究和治疗,可以提高脊髓损伤后运动和感觉功能恢复。有研究者在动物模型中联合全身注射 MP 和局部 NSC 移植治疗脊髓损伤取得了一定的结果。但是 MP 对 NSC 的直接作用目前国内外尚无研究报道,本文拟进行体外实验研究 MP 对培养的 NSC 的影响。

1 材料与方法

1.1 神经干细胞取材、培养和鉴定

使用新生 1d SD 大鼠(华中科技大学同济医学院动物实验中心提供),脱颈处死,浸泡于 75%酒精中消毒 5min,无菌生理盐水冲洗。分层剪开皮肤和

椎板,剪取脊髓,置于无菌 Hanks 液体中,去除脊膜和血管。转移脊髓到 PBS 液中,用尖锐小眼科剪剪碎脊髓,用抛光巴氏管吹打分散细胞,经 200 目尼龙筛网过滤,400g 离心 5min。用神经干细胞培养液(DMEM/F12, 2% B27, 20ng/ml bFGF, 20ng/ml EGF)分散,调整细胞浓度为 1×10^4 /ml,接种培养瓶,放入 5%CO₂、饱和湿度、37℃培养箱中培养。每 3d 离心更换培养液,神经球生长到 100μm 大小时,用抛光巴氏管吹打分散成单个细胞,传代。

取盖玻片,浸泡于无菌多聚赖氨酸(0.1mg/ml)后晾干,放入 6 孔板中。将神经球接种在盖玻片上,2h 后取出盖玻片, PBS 漂洗, 4%多聚甲醛固定。用羊抗大鼠 nestin 抗体进行 NSC 免疫标记,兔抗羊 FITC 二抗显色,荧光显微镜观察。

1.2 甲泼尼龙对神经干细胞的影响

由于 MP 冲击疗法最常用的治疗时间是持续

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30500511)

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科,武汉,430022

作者简介:吴永超,男,博士

收稿日期:2006-04-10

24h,也有意见认为治疗开始时间稍晚的患者 MP 冲击疗法持续 48h 效果更好^[1-2],结合临床本实验选取了 12h,24h 和 48h 三个观测时间点。参考相关文献^[3]本实验 MP 浓度设为 250ng/ml。

1.2.1 MP 对 NSC 的生物活性的影响:将 NSC 吹打分散后加入 96 孔板中,每孔含 NSC 1×10^5 个,同时加入 MP,使其终浓度为 250ng/ml,对照组不含 MP,每组 6 孔。放入 5%CO₂、饱和湿度、37℃培养箱分别培养 12h,24h 和 48h。加入细胞活性检测试剂 CCK-8 (cell counting kit, Dojindo, Japan),体积为培养液的 1/10,避光放入 37℃培养箱中培养 4h。取出用酶标仪读数 OD 值,激发光波长为 450nm。

1.2.2 甲泼尼龙诱导神经干细胞凋亡的检测:将神经球分散为单个 NSC 培养,加入 MP,使其终浓度为 250ng/ml,对照组不含 MP,放入 5%CO₂、饱和湿度、37℃培养箱中培养 24h,进行凋亡形态观测和凋亡率检测。

MP 诱导 NSC 凋亡形态观测:离心收集 NSC 于 1.5ml 离心管内,加入 0.5ml 多聚甲醛固定液,缓缓悬起细胞,固定 10min。离心去固定液,用 PBS 洗 2 遍,每次 3min。将细胞悬液滴加至载玻片上,稍晾干,均匀滴上 0.5ml Hoechst 33258 染色液(浓度为 5μg/ml),染色 5min。用吸水纸从边缘吸去液体,稍晾干。用 PBS 洗 2 遍,每次 3min。盖上一洁净的盖玻片,用荧光显微镜在紫外光下观测细胞核。

MP 诱导 NSC 凋亡率检测:离心去除培养液,用 PBS 调整细胞浓度为 5×10^5 /ml。用 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡,即加入 Annexin V-FITC (Bender MedSystems, Austria)标记 10min, PBS 漂洗 1 次,然后加入碘化丙啶(propidium iodide, PI),终浓度 1μg/ml,用流式细胞仪检测 NSC 的凋亡细胞比率。Annexin V-FITC 标记凋亡细胞和坏死细胞的磷脂酰丝氨酸,PI 标记坏死细胞的 DNA。

1.3 统计学分析

用 SPSS 11.0 对上述 OD 值和凋亡率分别进行 *t* 检验和卡方检验。

2 结果

2.1 神经干细胞培养和鉴定

新生大鼠脑皮质细胞分离培养后,细胞逐渐聚集生长,3d 时可以见数个细胞的小神经球,悬浮生长,7d 神经球约 100μm,分瓶传代后 6—7d 即可再次传代。神经球 2h 可黏附于涂覆多聚赖氨酸的玻片上,Nestin 染色阳性(图 1—2,见前置彩色插页 7)。

2.2 甲泼尼龙对神经干细胞生物活性的影响

加入 MP 培养 12h、24h 和 48h 后,CCK-8 检测其 OD 值为 0.882 ± 0.079 , 0.771 ± 0.093 和 0.651 ± 0.062 ,不加 MP 的对照组的 OD 值为 0.916 ± 0.105 。经过 *t* 检验表明对照组分别与 24h 组和 48h 组比较差异有显著性意义($P < 0.05$),对照组和 12h 组比较差异无显著性意义,24h 组和 48h 组比较差异有显著性意义。表明 MP 对 NSC 有抑制作用,而且随时间延长,其抑制作用增加。

2.3 甲泼尼龙诱导神经干细胞凋亡的检测

加入 MP 培养 24h 后,Hoechst 染色见发生凋亡的细胞染色质固缩,细胞核呈致密浓染(图 3,见前置彩色插页 7)。

MP 组细胞凋亡率为 6.43%,而对照组的凋亡率为 2.14%,见图 4。加入 MP 后,NSC 的坏死率也从 0.16%增加到 0.37%。对照组的凋亡率为 2.14%,MP 组细胞凋亡率为 6.43%。

图 4 双变量流式细胞仪的散点图

Data.002 示对照组,Data.003 示 MP 组。左下象限(LL)为(Annexin V-FITC-/PI-),显示活细胞;右上象限(UR)为(Annexin V-FITC+/PI+),显示坏死细胞;右下象限(LR)为(Annexin V-FITC+/PI-),显示凋亡细胞。

3 讨论

急性脊髓损伤的早期(<8h)进行大剂量的甲泼尼龙冲击疗法(30mg/kg,15min 静脉快速注射,暂停 45min,后 23h 静脉维持滴注 5.4mg/kg/h)是目前唯一被大规模临床实验证实有一定效果的临床治疗方法^[1-2],虽然现在有人对其疗效提出不同意见^[4],但是目前还是被广泛采纳。MP 通过激活糖皮质激素受体和抑制脂质过氧化减轻炎症反应,抑制前列腺素的生成改善微循环,保护 Na-K-ATP 酶,抑制钙离子介导的神经元丝的水解,从而减轻脊髓继发损伤,促进神经功能恢复。

神经干细胞具有自我增殖更新的能力,而且能够分化为神经元和胶质细胞,实验证明脊髓损伤后移植神经干细胞能够促进其功能恢复^[5-7]。有研究表明在脊髓损伤后,脊髓的中央管周围的细胞在损伤后的特殊环境的激发下能产生神经干细胞,称为内源性神经干细胞,在脊髓损伤的修复中可能发挥一定的作用^[7]。

基于上述情况,有人考虑联合使用 MP 和神经干细胞移植治疗脊髓损伤,希望能够起到协同作用,共同促进脊髓损伤的恢复。有文献报道,在动物整体水平联合使用 MP 和神经干细胞移植能够一定程度上促进损伤脊髓功能的恢复^[8]。由于动物整体水平影响因素较多,不利于问题的精确分析和判断,所以需要在细胞水平进行 MP 对神经干细胞直接作用的研究。但是到目前为止,还没有相关的报道。

本实验表明,MP 对体外培养的神经干细胞的活性有抑制作用。分析这种抑制作用可能的原因有:①MP 对神经干细胞代谢的直接抑制作用。由于糖皮质激素对神经元和胶质细胞的葡萄糖的摄取和利用有抑制作用,神经组织代谢对葡萄糖有很大的依赖性,所以 MP 可以直接抑制其代谢^[9]。②MP 抑制神经干细胞的增殖。文献报道^[10-13],糖皮质激素能减少恒河猴的齿状回的神经发生;使有丝分裂前、后的神经前体细胞存活减少;使细胞停滞在 G1 期,增强 p53 的转录活性,诱导凋亡基因 bax 转录,抑制神经细胞的增殖;下调血清反应元件 (serum response element, SRE) 介导的基因表达,诱导 p21 的表达,阻滞细胞周期的进展。抑制有丝分裂所需的细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 活性,损害 ERK-E1K 功能。本实验还表明,MP 对 NSC 的抑制作用随时间延长其抑制作用增强,所以,MP 冲击疗法持续较长时对 NSC 有损害作用。

本实验表明,MP 可以诱导体外培养的神经干细胞的发生凋亡。加入 MP 后神经干细胞凋亡率为 6.43%,较对照组明显升高(凋亡率为 2.14%,其发生可能是与细胞传代分散神经球时吹打损伤有关)。目前国内外文献尚没有关于 MP 诱导 NSC 凋亡及其机制的报道。我们根据糖皮质激素对神经前体细胞和神经元作用的相关报道分析可能有多方面的机制^[14-15]。糖皮质激素可以诱导纹状体和海马回神经元的凋亡,使脑组织中 c-fos 增加,c-fos 蛋白与 c-jun 蛋白组成异源二聚体 Fos-Jun,称为 AP-1。AP-1 是一个重要的转录因子,结合于 DNA 上,可诱导细胞凋亡,可以上调 p21,抑制 Cdk,从而抑制海马中的神经前体细胞增殖,诱导细胞凋亡,抑制神经突起生成,可以增强 p53 的转录活性,诱导凋亡基因 bax 转录。MP 可以抑制有丝分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 磷酸化诱导神经元的凋亡。糖皮质激素通过抑制神经元对葡萄糖的利用对其产生毒性作用。对于其确切机制我们将进行进一步的实验来探讨。

4 结论

由于大剂量 MP 可能对 NSC 有抑制其活性和诱导凋亡的作用,所以不宜在进行 MP 冲击疗法的同时进行 NSC 移植治疗,将 NSC 移植延期进行可能会取得更好的效果。另外,由于损伤反应诱导的内源性神经干细胞可能会受到 MP 的损害,影响受损脊髓的功能恢复,提示我们需要研制更好的治疗脊髓损伤的药物,能在减轻脊髓继发性损伤的同时,不影响甚至促进神经干细胞的功能发挥。

参考文献

- [1] Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the second national acute spinal cord injury study [J]. *N Engl J Med*, 1990, 322(20):1405—1411.
- [2] Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, et al. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the third national acute spinal cord injury randomized controlled trial. National acute spinal cord injury study [J]. *JAMA*, 1997, 277(20):1597—604.
- [3] Defer GL, Barre J, Ledudal P, et al. Methylprednisolone infusion during acute exacerbation of MS: plasma and CSF concentrations [J]. *Eur Neurol*, 1995, 35(3):143—148.
- [4] Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standard of care [J]. *J Neurosurg*, 2000, 93(1 Suppl):1—7.
- [5] Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(39):14069—14074.
- [6] Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(7):862—871.
- [7] Kulbatski I, Mothe AJ, Nomura H, et al. Endogenous and exogenous CNS derived stem/progenitor cell approaches for neuro-trauma [J]. *Curr Drug Targets*, 2005, 6(1):111—126.
- [8] 李立新, 徐启武, 吴幼章, 等. 甲基强的松龙和神经干细胞移植联合治疗大鼠脊髓损伤 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2002, 1(3):258—261.
- [9] Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM. Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia [J]. *Neuroendocrinology*, 1990, 52(1):57—64.
- [10] Coe CL, Kramer M, Czeh B, et al. Prenatal stress diminishes neurogenesis in the dentate gyrus of juvenile rhesus monkeys [J]. *Biol Psychiatry*, 2003, 54(10):1025—1034.
- [11] Kim JB, Ju JY, Kim JH, et al. Dexamethasone inhibits proliferation of adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro [J]. *Brain Res*, 2004, 1027(1—2):1—10.
- [12] Crochemore C, Michaelidis TM, Fischer D, et al. Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation [J]. *FASEB J*, 2002, 16(8):761—770.
- [13] Wong EY, Herbert J. The corticoid environment: a determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(10):2491—2498.
- [14] Haynes LE, Lendon CL, Barber DJ, et al. 17 Beta-oestradiol attenuates dexamethasone-induced lethal and sublethal neuronal damage in the striatum and hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2003, 120(3):799—806.
- [15] Yu IT, Lee SH, Lee YS, et al. Differential effects of corticosterone and dexamethasone on hippocampal neurogenesis in vitro [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(2):484—490.