

## 多氯联苯对胎鼠神经干细胞 Nnat 基因表达的影响

黄云燕, 康颖, 曾昭智, 陈燕  
(广东药学院临床医学院, 广州 510006)

**[摘要]** **目的** 探讨环境污染物多氯联苯 Aroclor 1254 对神经发育损伤的作用机制. **方法** 不同剂量的 Aroclor 1254 (A1254) 作用于胎鼠的神经干细胞 (NSC) 72 h, 通过实时定量 RT-PCR 检测 Neuronatin (Nnat) mRNA 的表达, Western blot 检测 Nnat 蛋白质含量和流式细胞技术检测细胞凋亡情况. **结果** (1) 免疫荧光显示所培养细胞表达 Nestin, 且能进一步被诱导分化; (2) 随着 A1254 剂量增加, Nnat mRNA 和蛋白质表达水平下降, NSC 细胞凋亡增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). **结论** 多氯联苯可能通过下调 Nnat 基因表达, 神经细胞凋亡增加, 导致胎儿的神经发育损伤.

**[关键词]** 多氯联苯; 神经干细胞; Nnat 基因; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R329.2\*8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 04 - 0025 - 05

## Effect of Polychlorinated Biphenyls on Expression of Neuronatin in Neural Stem Cells of Embryonic Mice

HUANG Yun - yan, KANG Ying, ZENG Zhao - zhi, CHEN Yan

(College of Clinical Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong 510006, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the mechanism of Polychlorinated Biphenyls Aroclor 1254 in neural injury during nervous system development. **Methods** Neural stem cells were treated for 72 h with different doses of Polychlorinated Biphenyls Aroclor 1254. The mRNA expressions of Neuronatin were measured by real time RT-PCR. The protein expressions of Neuronatin were measured by the Western blot. Cell apoptosis were detected by flow cytometry. **Results** (1) The expression of Nestin was detected on the cells by immunocytofluorescence. (2) The mRNA and protein expression of Nnat in NSC were decreased, the NSC apoptosis was increased, and they displayed dose-dependence with A1254. **Conclusion** Polychlorinated Biphenyls can cause nervous injury, its mechanism maybe related to the down-regulation of the expression of Nnat and the promotion of the apoptosis.

**[Key words]** Polychlorinated biphenyls; Neural stem cell; Neuronatin gene; Apoptosis

多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 是一种全球性环境污染物, 对生物体可产生严重的毒害作用, 尤其是对发育过程中的胎儿更为敏感, 可导致运动失调、脑损伤、发育迟缓、智商降低等神经毒性. PCBs 的神经毒性机制尚不清楚, 可能通过调节基因表达而产生毒副作用. Neuronatin (Nnat) 是一种与脑细胞的发育和分化密切相关的基因, 在胎儿期和幼年期脑发育最旺盛时高表达, 而成人后表达量逐渐下调<sup>[1]</sup>, 其错误表达将导致大脑发育障碍的发生. PCBs 是否通过下调 Nnat 基因

的表达, 而影响胎儿神经系统的发育, 本研究通过多氯联苯 Aroclor 1254 (A1254) 作用于胎鼠神经干细胞 (Neural stem cells, NSCs) 而探讨其作用机制.

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物和主要试剂

SD 孕鼠来自广州中医药大学动物实验中心, DMEM/F12、B27、EGF、bFGF 购自 Gibco 公司,

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30972497)

**[作者简介]** 黄云燕 (1972~), 女, 云南昆明市人, 医学博士, 讲师, 主要从事儿科临床工作.

胎牛血清购自杭州四季青公司, Nestin、Nnat 和  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自 Abcam 公司, A1254 购自 Sigma 公司, AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒购自 Axygen 公司, 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成, Annexin V-FITC/kit 细胞凋亡检测试剂盒购自 Caltag Laboratories 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 胎鼠 NSC 的分离、培养** 孕 12~14 d SD 大鼠, 颈椎脱臼处死。无菌条件下打开腹腔, 取出胎鼠解剖脑组织, 剪碎吹打制成单细胞悬液。加入含 B27 5 mL/L, EGF 20  $\mu$ g/L, bFGF 20  $\mu$ g/L, 青霉素和链霉素 100 U/mL 的 DMEM/F12 无血清培养基中。将原代细胞  $2 \times 10^5$  个细胞/mL 接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 置于 37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养, 每 5~7 d 传代 1 次。

**1.2.2 胎鼠 NSC 的鉴定** 将单细胞悬液种植于培养皿中, 置入多聚赖氨酸包被的玻璃片, 分别用无血清培养基 (DMEM/F12/B27/bFGF/EGF) 和含血清培养基 (DMEM/F12+5%胎牛血清) 培养, 观察其生长分化情况, 分别于 12 h、2 d、7 d、14 d 进行 Nestin 免疫荧光染色检测。

玻片取出后 PBS 洗 3 次; 4%多聚甲醛固定 20~30 min, PBS 洗 3 次; 0.2% Triton X-100 透化 5 min, PBS 洗 3 次; 5% BSA 室温封闭 30 min, 加 Nestin 单克隆抗体放在湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 再洗 3 次; 加 FITC-兔抗鼠 IgG 二抗室温 30 min (注意避光), PBS 洗 3 次; 95%甘油封片, 然后放在荧光显微镜下观察。

**1.2.3 A1254 对 NSC 的处理** A1254 溶解于 DMSO 中, 将 NSC 细胞随机分成正常空白对照组、溶剂对照组 (培养基中 DMSO 浓度为 0.1%) 和 3 组实验组 (培养基中 A1254 终浓度分别为 0.10 ng/mL、1.00 ng/mL、10.00 ng/mL)。处理 72 h 后离心处理细胞备用。

**1.2.4 实时定量 RT-PCR** AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒提取总 RNA, 用随机六聚体反转录合成 cDNA, 扩增 Nnat 基因。Nnat 上游引物 5'TCC GGA ATT CAT GCT CCA CGA GTC CTA CTG 3', 下游引物 5'ACG CGT CGA CAA ACT CTG AGT CTG GAC AAC 3', 扩增产物为 260 bp; 内参照 G3PDH 上游引物 5'TGC CAC TCA GAA GAC TGT GG 3', 下游引物 5'CAA CGG ATA CAT TGG GGG TA 3', PCR 产物为 182 bp。反应体系为 25  $\mu$ L, 反应条件 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s、58  $^{\circ}$ C 退火 30 s、72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 次循环后 72  $^{\circ}$ C 5 min 延长。

**1.2.5 Western blot** 收集细胞用 PBS 洗 3 次, 加

SDS 蛋白裂解液放置在冰上裂解 30 min。转移至 EP 管中, 12 000 g  $\times$  15 min 4 $^{\circ}$ C, 提取各组总蛋白, Bradford 的方法测定蛋白的含量。取 50  $\mu$ g 样品, 进行 SDS-PAGE 电泳分离; 半干式电转到醋酸纤维素膜上, 用含 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h; 加入 Nnat 和  $\beta$ -actin 抗体, 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜; TBS 洗膜后与辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗室温孵育 1h。洗膜后以化学发光法检测蛋白表达量。曝光底片应用凝胶成像系统进行扫描, 用 Fluorchem 1.02 软件对条带的灰度进行半定量分析, 结果用目的蛋白的光密度与内参照的光密度的相对值来比较。

**1.2.6 细胞凋亡** 用 PBS 洗涤 2 次细胞后, 用稀释的结合缓冲液重悬为  $(2 \sim 5) \times 10^5$ /mL, 195  $\mu$ L 细胞悬液加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 混匀, 室温避光孵育 10 min, PBS 洗涤 1 次, 再用 190  $\mu$ L 结合缓冲液重悬, 加入 10  $\mu$ L PI, 流式细胞仪检测。

## 1.3 统计学处理

计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 统计软件进行方差齐性检验、方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胎鼠 NSC 的培养、鉴定

原代细胞呈圆形球状, 悬浮生长, 2~3 d 后可见大小不等的细胞团, 较大者由数十个细胞组成。细胞形态规则, 边界清楚, 折光性强 (图 1 A)。7 d 后可见由数百个细胞组成的细胞团, 呈桑椹状。经添加 5%胎牛血清诱导 24 h 后, 即可见到细胞团贴壁, 各种不同形态的细胞从细胞团中长出, 2~3 d 后可见大部分细胞贴壁生长, 突起不断增粗和伸长, 1 周后分化成大量形态不一的、分散成片的多突起星状细胞和神经元样细胞, 突起互相交织成网状, 表现出明显的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的形态特征 (图 1 B)。2 周后部分神经细胞开始衰退、死亡。

经含血清培养基培养 12 h、2 d、7 d、14 d 行 Nestin 免疫荧光染色, 12 h 和 2 d 时可见较多 Nestin 阳性细胞, 在荧光显微镜下呈现黄绿色荧光 (图 1 C), 在 7 d 时尚可见部分 Nestin 阳性细胞, 2 周时几乎未找到 Nestin 阳性细胞。

A1254 对 NSC Nnat mRNA 表达的影响 (图 2)。Nnat mRNA 的表达, 0.10 ng/mL 组与对照组和溶剂对照组比较有所下降, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 1.00 ng/mL 组和 10.00 ng/mL 组均较空

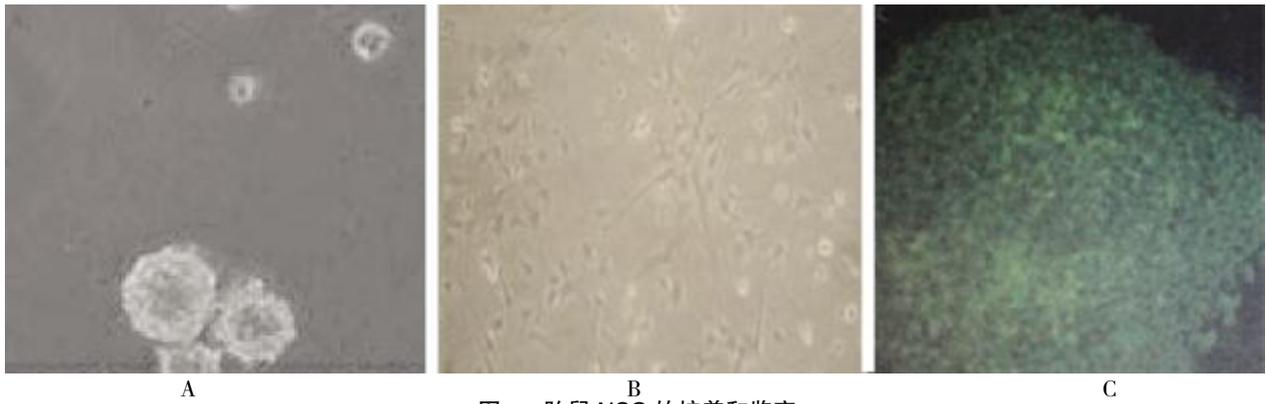


图 1 胎鼠 NSC 的培养和鉴定

Fig. 1 Morphology and identification of neural stem cells

A: 原代培养的 NSC (×200); B: 分化的 NSC (×200); C: Nestin 阳性的 NSC (×100)

白对照组和溶剂对照组下降, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。提示随着 A1254 浓度升高, Nnat 基因表达下降 (表 1)。

A1254 对 NSC Nnat 蛋白表达的影响 (图 3)。Nnat 蛋白质的表达, 0.10 ng/mL 组与对照组和溶剂对照组比较有下降, 但无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 而 1.00 ng/mL 组和 10.00 ng/mL 组均较空白对照组和溶剂对照组下降, 差异有统计学意义

( $P < 0.05$ )。提示随着 A1254 浓度升高, Nnat 基因表达下降 (表 1)。

2.2 A1254 对 NSC 细胞凋亡的影响

A1254 染毒实验中, 1.00 ng/mL 组和 10.00 ng/mL 组中, NSC 细胞凋亡增加, 与对照组和溶剂对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示随着 A1254 剂量的增加, NSC 凋亡逐渐增多 (表 1)。

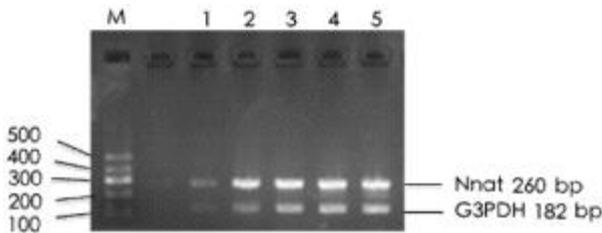


图 2 不同浓度 A1254 对 NSC Nnat mRNA 表达的影响

Fig. 2 Influence of different concentrations of A1254 on expression of Nnat mRNA in NSC

M:DNA Marker; 1:空白对照组; 2:溶剂对照组; 3:0.1 ng/mL; 4:1.00 ng/mL; 5:10.00 ng/mL.

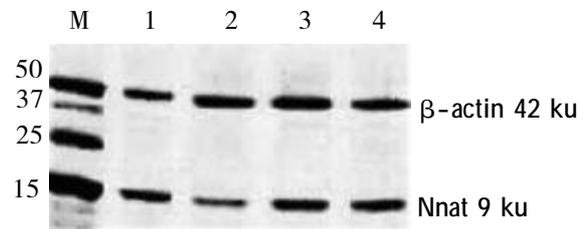


图 3 不同浓度 A1254 对 NSC Nnat 表达的影响

Fig. 3 Influence of different concentrations of A1254 on expression of Nnat protein in NSC

M:Marker; 1:空白对照组; 2:0.1 ng/mL; 3:1.00 ng/mL; 4:10.00 ng/mL.

表 1 A1254 作用于 NSC 后 Nnat 基因的 mRNA 和蛋白质表达水平 [n = 6, ( $\bar{x} \pm s$ )]

Tab. 1 The expression of Nnat gene at mRNA and protein level and apoptosis in the neural stem cell with different doses of A1254 [n = 6, ( $\bar{x} \pm s$ )]

项 目	空白对照组	溶剂对照组	0.10 ng/mL	1.00 ng/mL	10.00 ng/mL
mRNA 水平	1.0 ± 0.7	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.6	0.7 ± 0.2*	0.5 ± 0.2*
蛋白水平	3.5 ± 0.8	3.8 ± 1.3	4.3 ± 1.2	2.2 ± 0.4*	1.9 ± 0.5*
细胞凋亡 (%)	20.5 ± 5.3	22.5 ± 3.8	28.7 ± 8.7	30.2 ± 5.8*	37.3 ± 7.5*

与空白对照组、溶剂对照组比较, \* $P < 0.05$ .

### 3 讨论

巢蛋白 Nestin 是胚胎中枢神经系统祖细胞的主要中间纤维蛋白, 在大脑发育过程中高表达, 在大脑发育成熟后表达量急剧下降, 常常作为神经干细胞的特征性标志物. 本实验中, 神经干细胞培养液中所培养的原代细胞 Nestin 表达阳性, 免疫荧光染色后在荧光显微镜下呈黄绿色荧光. 随着添加 5% 胎牛血清诱导分化后表达量下降, 甚至不表达. 表现为含血清培养基培养 7 d 的 Nestin 阳性细胞将少, 培养 14 d 的 Nestin 阳性细胞消失. 添加血清 24 h 后逐渐分化, 出现神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的形态特征, 该细胞具有多向分化的潜能. 以上结果说明所培养的原代细胞为神经干细胞.

目前环境污染已成为一个全球性问题, 其中 PCBs 是首批被《斯德哥尔摩公约》列入全球控制的 12 种持久性有机污染物之一, 如今地球生物圈的任何地方包括地球两极和珠穆朗玛峰都有 PCBs 的踪迹. 我们日常的生活环境中, 已经不可能完全隔绝 PCBs 污染的毒副作用. 由于儿童处于组织器官生长发育的旺盛期, 尤其是胎儿期, 因此对环境毒物的毒性特别敏感, 对成人无害的暴露剂量常常导致儿童严重的发育障碍<sup>[1]</sup>. PCBs 可导致儿童体格、神经系统、内分泌系统、生殖系统等发育延迟. PCBs 具有高脂溶性, 可通过胎盘和乳汁进入胎儿或婴儿体内. 脑组织由于富含脂类而成为 PCBs 攻击的靶器官, 研究表明极低浓度的 PCBs (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重) 就能阻碍大脑发育的蛋白质合成. PCBs 的神经毒性机制可能包括: 活性氧的产生<sup>[2]</sup>、突触长时间增强效应的减低<sup>[3]</sup>、细胞内信号传递<sup>[4]</sup>和乙酰胆碱酯酶活性的改变<sup>[5]</sup>等. PCBs 也可通过改变印记基因的表达状态, 而抑制胎儿的生长发育<sup>[6]</sup>. Nnat 基因作为一种高度保守的印记基因, 与胎儿神经细胞的发育密切相关, 可能作为大脑发育过程中离子通道的调节因子, 并与神经系统的成熟或维持<sup>[7]</sup>, 以及空间位置和时间相关<sup>[8]</sup>. A1254 是一种氯含量为 54% 的常见 PCBs 混合物, 分子量为 328.4. 本研究发现, A1254 可下调 Nnat mRNA 和蛋白质的表达, 且随着作用剂量的增加, 下调更加明显, 同时出现 NSC 细胞凋亡的增加, 推测 PCBs 可能通过改变 Nnat 基因的表达, 从而导致了胎儿神经发育的损伤.

PCBs 在全球原来被广泛用于电力设备、液压

设备和热交换器等, 具有难降解性、生物毒性、生物蓄积性和远距离迁移性的特点, 在环境中存量、隐匿、易扩散. 大剂量 PCBs 急性中毒事件发生率远没有小剂量、隐形、慢性 PCBs 中毒常见, 对胎儿的损害也更加难于预防和干预. 目前儿童出现行为偏差、学习障碍的发病率增加, 除其他因素, 是否与环境恶化的恶化相关, 尤其是妊娠期妇女其体内这类化合物的负荷增加是否有关, 出生前 PCBs 暴露在一定程度上可影响婴儿的运动功能发育和学习能力受损. 1979 年台湾发生了 PCBs 污染米糠油的问题, PCBs 暴露母亲所生育的 6 月~2.5 岁儿童, 其 Bayley 婴儿发育量表显示婴儿精神运动指数 (MDI) 和心理运动指数 (PDI) 都低于对照组儿童<sup>[9]</sup>; 6~7 岁儿童韦氏儿童智力量表比对照组低 5 分<sup>[10]</sup>. 行为异常和学习障碍的孩子常常没有明显的神经系统器质性异常, 也缺乏相应的临床生化和影像学改变, 其基因表达的异常, 尤其是胎儿期表达的改变可能是导致了其神经行为偏差的原因之一. 除了防止环境污染、避免接触以外, 我们是否可以已发生 PCBs 暴露的母亲, 逆转其基因表达的改变, 例如上调 Nnat 基因的表达, 防止胎儿神经发育损伤的发生.

由于 Nnat 基因的表达主要受甲基化的调节, 而环境污染物可通过引起表观遗传修饰异常而产生毒副作用<sup>[11]</sup>, 因此, 笔者下一阶段将计划研究 A1254 对基因甲基化的影响, 以及 Nnat 基因有无相应的改变.

### [参考文献]

- [1] EVANSH K, WYLIE A A, MURPHY S K, et al. The neuronatin gene resides in a micro-imprinted domain on human chromosome 20q11.2 [J]. *Genomics*, 2001, 77(1-2):99-104.
- [2] GRANDJEAN P, LANDRIGAN P J. Development neurotoxicity of industrial chemicals [J]. *Lancet*, 2006, 368(9553):2167-2178.
- [3] MARIUSSEN E, MYHRE O, REISTAD T, et al. The polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: the involvement of the N-methyl-D-spartate and reactive oxygen species [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 179(3):137-144.
- [4] NIEMI W D, AUDI J, BUSH B, et al. PCBs reduce long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus [J]. *Exp Neurol*, 1998, 151(1):26-34.
- [5] YANG J H, DERR-YELLIN E C, KODAVANTI P R. Al-

- terations in brain protein kinase C isoforms following developmental exposure to a polychlorinated biphenyl mixture [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 111(1-2): 123 - 135
- [6] PROVOST T L, JUAREZ D E K U L M, ZENDER C, et al. Dose and age-dependent alterations in choline acetyltransferase (CHAT) activity, learning and memory, and thyroid hormones in 15- and 30-day old rats exposed to 1.25 or 12.5 PPM polychlorinated biphenyl (PCB) beginning at conception [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1999, 23(5):915 - 928.
- [7] WU Q, OHSAKO S, ISHIMURA R, et al. Exposure of mouse preimplantation embryos to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes H19 and Igf2 [J]. *Biol Reprod*, 2004, 70(6): 1790 - 1797.
- [8] WIJNHOLDS J, CHOWDHURY K, WEHR R, et al. Segment specific expression of the neuronatin gene during early hindbrain development [J]. *Dev Biol*, 1995, 171(1):73 - 84
- [9] ZHENG S, CHOU A H, JIMENEZ A L, et al. The fetal and neonatal brain protein neuroantigen protects PC12 cells against certain types of toxic insult [J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 136(2):101 - 110.
- [10] YU M L, HSU C C, GLADEN B C, et al. In utero PCB/PCDF exposure: relation of developmental delay to dysmorphology and dose [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1991, 13(2):195 - 202.
- [11] CHEN Y C, GUO Y L, HSU C C, et al. Cognitive development of Yu-Cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-degraded PCBs [J]. *JAMA*, 1992, 268(22):3213 - 3218.

(2014-03-07 收稿)

(上接第24页)

- COPD Risk Locus 19q13.2 [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(2): e88051.
- [4] VESTBO J. COPD: Definition and Phenotypes [J]. *Clin Chest Med*, 2014, 35(1):1 - 6.
- [5] 文富强, 申永春. 祛痰治疗在慢性阻塞性肺疾病中临床应用 [J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2010, 3(4): 236 - 238.
- [6] 李彩霞, 田应选. 不同祛痰疗法对慢性阻塞性肺疾病患者的疗效观察 [J]. *白求恩军医学院学报*, 2009, 7(5):299 - 300.
- [7] 马培奇. 慢性阻塞性肺病治疗新药罗氟司特 [J]. *上海医药*, 2011, 32(4):201 - 202.
- [8] 王瑞倩, 卞涛. 选择性磷酸二酯酶抑制剂罗氟司特在慢性阻塞性肺疾病抗炎作用的研究进展 [J]. *中华哮喘杂志(电子版)*, 2012, 6(6): 441 - 446.
- [9] MATA M, SARRIA B, BUENESTADO A, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition decreases MUC5AC expression induced by epidermal growth factor in human airway epithelial cells [J]. *Thorax*, 2005, 60(2):144 - 152.
- [10] VIJAYAN V K. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Indian J Med Res*, 2013, 137(2):251 - 269.
- [11] DI Y P, ZHAO J, HARPER R. Cigarette smoke induces MUC5AC protein expression through the activation of Sp1 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(33):27948 - 27958.
- [12] 杨君义. 选择性磷酸二酯酶4抑制药——罗氟司特 [J]. *医药导报*, 2012, 31(9):1185 - 1188.
- [13] 张哲, 卫小红. 罗氟司特治疗慢性阻塞性肺疾病患者的安全性和耐受性 Meta 分析 [J]. *临床合理用药杂志*, 2010, 3(4):8 - 11.

(2014-02-03 收稿)