

胰岛素样生长因子-I 在神经前体细胞中抗凋亡的作用*

唐梅¹, 王琪², 李赫冬², 杨凡^{1△}

1. 四川大学华西第二医院 儿科(成都 610041); 2. 四川大学华西第二医院 发育与干细胞研究所(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor I, IGF-I)对神经前体细胞抗凋亡的影响。
方法 以大鼠神经前体细胞(即 Ge6 细胞)为研究对象,体外培养 Ge6 细胞,在培养基中加入含 IGF-I 10 ng/mL 为实验组,不加 IGF-I 为对照组,分别继续培养 2 d、4 d、6 d,定量实时逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测 IGF-I 对 Ge6 细胞 caspase-3 mRNA 表达的影响。采用细胞免疫荧光染色观察各组细胞 caspase-3 蛋白的阳性表达率。
结果 qRT-PCR 结果显示,实验组 Ge6 细胞 caspase-3 mRNA 的表达较对照组低,实验组培养 4 d(2.007 ± 0.297)和 6 d(1.194 ± 0.244)与对照组培养 4 d(5.530 ± 1.027)和 6 d(5.371 ± 0.513)的差异有统计学意义(P 均 <0.05)。细胞荧光染色表明培养 2 d、4 d、6 d 实验组 Ge6 细胞 caspase-3 蛋白的阳性表达率较对照组减少,实验组培养 4 d ($3.5\% \pm 0.2\%$)和 6 d ($5.1\% \pm 0.1\%$)与对照组培养 4 d ($7.0\% \pm 0.5\%$)和 6 d ($7.4\% \pm 0.4\%$) caspase-3 蛋白的阳性表达率的差异有统计学意义(P 均 <0.05)。
结论 IGF-I 对神经前体细胞具有抗凋亡作用。

【关键词】 神经前体细胞 胰岛素样生长因子-I 凋亡 Caspase-3

Study on the Anti-apoptosis Effect of Insulin-like Growth Factor I on the Regulation of Neural Precursor Cells Survival
TANG Mei¹, WANG Qi², LI He-dong², YANG Fan^{1△}. 1. Department of Pediatrics, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Stem Cell Institute, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: 506742295@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) on the anti-apoptosis of neural precursor cells. **Methods** Rat neural precursor cells (Ge6) were used as experiment object. 10 ng/mL IGF-I were applied to cultured Ge6 differentiated 2 d, 4 d, 6 d and the untreated cells as control. Quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) was used to detect the effect of the IGF-I on caspase-3 mRNA in the Ge6 of different groups and Immunofluorescent staining were applied to observe the positive rate of caspase-3. **Results** qRT-PCR demonstrated that caspase-3 mRNA level of experimental group decreased compared to that of the control group, the differences between experimental group cultured for 4 d (2.007 ± 0.297), 6 d (1.194 ± 0.244) and the control group cultured for 4 d (5.530 ± 1.027), 6 d (5.371 ± 0.513) were statistically significant ($P < 0.05$). Immunofluorescent staining indicated that the caspase-3 positive rate of experimental group cultured for 2 d, 4 d and 6 d were reduced compared to that of the control group, the differences between experimental group cultured for 4 d ($3.5\% \pm 0.2\%$), 6 d ($5.1\% \pm 0.1\%$) and the control group cultured for 4 d ($7.0\% \pm 0.5\%$), 6 d ($7.4\% \pm 0.4\%$) were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** IGF-I plays an anti-apoptosis role on neural precursor cells.

【Key words】 Neural precursor cells Insulin-like growth factor I Apoptosis Caspase-3

胰岛素样生长因子系统(insulin-like growth factors, IGFs)由具有特定功能的配体、受体和结合蛋白组成,在胚胎分化和个体生长发育中有着重要作用^[1]。IGF-I 主要由肝细胞合成和分泌,通过自分泌、旁分泌和内分泌 3 种形式发挥作用^[2]。近年来的研究发现,存在 IGFs 系统功能障碍的个体,除了体格生长受限,多有神经系统损伤^[3-5],原因尚不十分清楚。而细胞凋亡是机体生长发育、细胞分化

和病理状态中细胞自主性死亡的过程,Caspase 蛋白酶家族是细胞凋亡的研究热点,Caspase 被认为是细胞凋亡的中心环节和执行者,分析 caspase-3 的活性或其表达能早期检测细胞凋亡的发生^[6]。为此,本研究通过观察 IGF-I 对具有分化潜能的大鼠神经前体细胞系 Ge6 细胞 caspase-3 活化的影响,探讨 IGF-I 对 Ge6 细胞凋亡的影响以及在神经发育中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

Ge6 细胞(本身自带绿色荧光,Ge6 GFP)由四

* 国家自然科学基金(No. 81170579)资助

△ 通讯作者, E-mail: 506742295@qq.com

川大学华西第二医院发育干细胞研究所李赫冬实验室提供。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, Preprotech 公司, 英国); 肝素(Heparin, Sigma, 美国); B27、葡萄糖和双抗的 DMEM/F12 培养基(invitrogen 公司, 美国); IGF- I (Pepro Tech 公司, 美国); Cleaved caspase-3 antibody (Cell Signaling 公司, 美国); 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, Sigma, 美国); 反转录试剂盒(PrimeScript[®] RT, TaKaRa 公司, 日本); 绿色荧光定量 PCR 试剂盒(iQ[™] SYBR[®] Green Supermix, BIO-RAD, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 快速复苏 Ge6 细胞, 在含 bFGF、Heparin、B27、葡萄糖和双抗的 DMEM/F12 培养基中, 将细胞以神经球状态悬浮培养, 传代细胞密度为 1×10^6 /培养皿(100 mm), 培养于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱内, 每 3 d 传代 1 次, 第 2 d 每培养皿加 1 mL 稀释 10 倍的 bFGF。

1.2.2 分组 取传代一次后的细胞进行分化实验, 多聚赖氨酸包被盖玻片放入 24 孔板, 将生长良好的 Ge6 细胞稀释至 3 000/μL, 取 10 μL 含细胞的培养基接种于盖玻片上, 置于 37 °C 的细胞培养箱中 3 h 左右, 待绝大部分细胞贴于盖玻片上后, 加 500 μL 的细胞生长培养基。过夜后分别换上 500 μL 含 IGF- I 10 ng/mL(实验组)和不含 IGF- I(对照组)的分化培养基。继续培养 2 d、4 d 和 6 d 收爬片。

1.2.3 细胞 caspase-3 mRNA 表达检测 采用定量实时逆转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测。依照 caspase-3 序列, 设计引物, 上游引物: 5'-ATC CACGAGCAGAGTCAAAG-3'; 下游引物: 5'-CCT GGTCAACTGTCACAAAAC-3'。以 GAPDH 为内参照, 上游引物 5'-GCAAGTTCAACGGCAC AG-3'; 下游引物: 5'-GCCAGTAGACTCCACGA CAT-3'; 引物合成于上海捷瑞生物工程有限公司。RNA 抽提采用 TRIzol 试剂, 依照说明书操作提取 Ge6 细胞总 RNA。用反转录试剂盒照说明书进行反转录, 反转录反应采用 10 μL 体系, RNA 总量为 500 ng。qRT-PCR 反应采用 10 μL 体系, 本次实验模板量反转录的 cDNA 稀释 50 倍后取 4.4 μL, 上、下游引物各 0.3 μL, iQ[™] SYBR[®] Green Supermix 5 μL。循环条件: 变性 95 °C 10 s, 退火 55 °C 30 s, 延伸 72 °C 30 s, 35 个循环。重复实验 3 次, 实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 caspase-3 mRNA 相对表达量。

1.2.4 Ge6 细胞 caspase 蛋白阳性表达率的检测

采用免疫荧光染色检测。Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用, 其中 Caspase-3 为关键的执行分子, 它在凋亡信号传导的许多途径中发挥功能。本研究使用一抗 Cleaved caspase-3 Antibody 染色, 可观察凋亡细胞水平的变化。分别于培养 2 d、4 d、6 d 的培养基中取出盖玻片, PBS 冲洗 3 次, 加一抗 caspase-3 (1 : 1 000) 室温 1 h 后, PBS 洗 3 次, 加山羊抗兔二抗 Cy5 (1 : 200)、DAPI (1 : 500) 室温 1 h 后 PBS 洗 3 次, 封片。在荧光显微镜下观察、照相。每张爬片选取 3 个视野($\times 40$)计数 caspase-3 染色阳性(红色)细胞。把不同通道获得的图片进行合并, 先合并 DAPI(蓝色)与 GFP(绿色)的图片, 计数视野中的 Ge6 细胞总量, 然后再计数 caspase-3 阳性(红色)的细胞, 根据公式: caspase-3 阳性率(%) = caspase-3 阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 得到 caspase-3 染色阳性细胞百分率($n \geq 3$)。

1.3 统计学方法

计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞 caspase-3 mRNA 的表达

qRT-PCR 检测结果显示, 实验组细胞继续培养 2 d, caspase3 mRNA 的表达与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 继续培养至 4 d、6 d, 与对照组比较差异有统计学意义(P 均 < 0.05 , 附表)。

附表 IGF- I 对各组 Ge6 细胞 caspase-3 mRNA 和蛋白阳性表达率的影响

Table IGF- I influences caspase-3 mRNA and the positive expression rate of protein of Ge6 cells

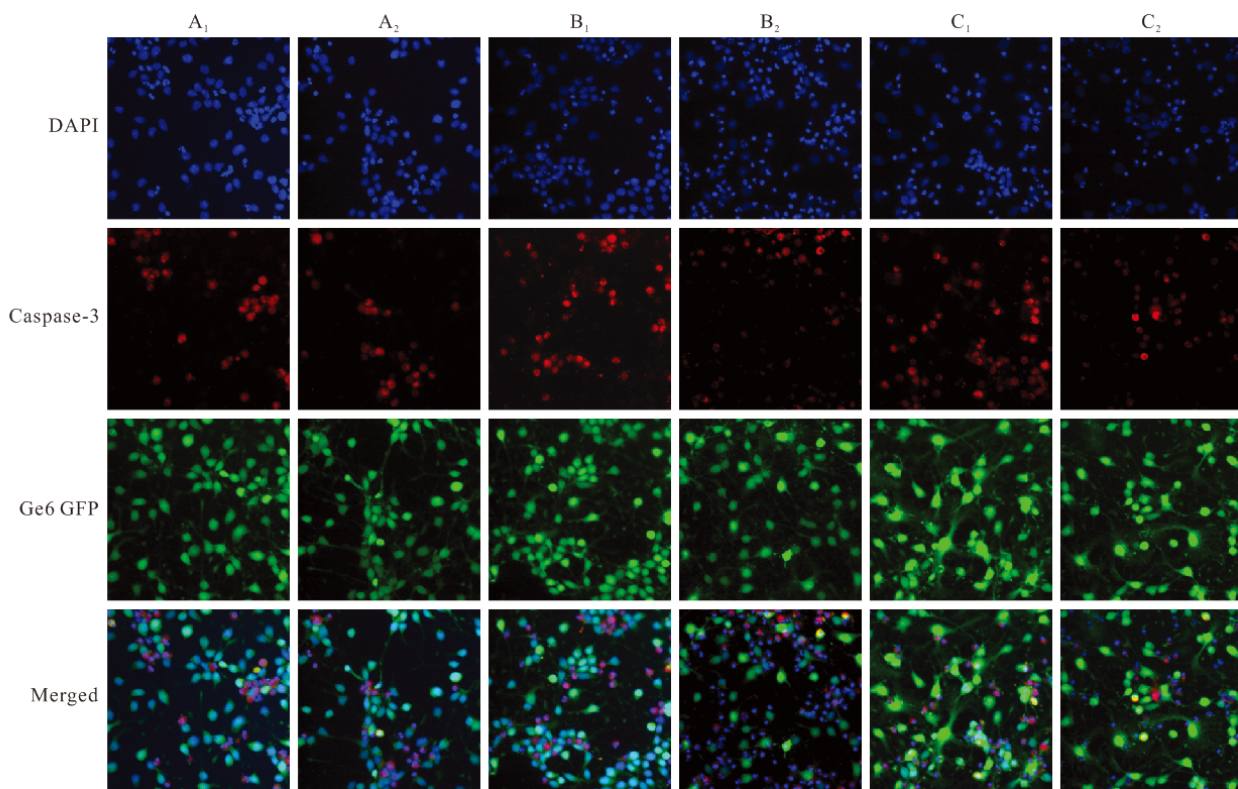
Group		Caspase-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $n=3$)	Positive expression rate of caspase-3 protein (% , $n \geq 3$)
Control	2 d	1.099 ± 0.090	4.4 ± 0.7
	4 d	5.530 ± 1.027	7.0 ± 0.5
	6 d	5.371 ± 0.513	7.4 ± 0.4
Experimental (IGF- I 10 ng/mL)	2 d	1.000 ± 0.109	4.1 ± 0.6
	4 d	2.007 ± 0.297 *	3.5 ± 0.2 *
	6 d	1.194 ± 0.244 *	5.1 ± 0.1 *

* $P < 0.05$, vs. control group at the same time point

2.2 各组细胞 caspase-3 蛋白阳性表达率的比较

细胞免疫荧光染色(附图)结果显示, 实验组 Ge6 细胞继续培养 2 d, caspase-3 蛋白阳性表达细胞比对照组有所减少, 但减少不明显($P > 0.05$); 继续培养 4 d 和 6 d 组, caspase-3 蛋白阳性表达细胞

较对照组明显减少,且差异有统计学意义(P 均 < 0.05),见附表。



附图 Ge6 细胞培养 2 d (A)、4 d (B)、6 d (C) 的免疫荧光染色。×40

Fig Immunofluorescent staining of Ge6 cells cultured for 2 (A), 4 (B), 6 (C) days. ×40

Blue: DAPI positive cells were total cells number; Red: Caspase-3 positive cells were apoptotic cells; A₁, B₁, C₁: Control groups on 2, 4, 6 d; A₂, B₂, C₂: Experimental groups on 2, 4, 6 d

3 讨论

IGF- I 是一种与机体组织分化、增殖和成熟有关的重要生长因子。已有研究证实,IGF- I 是一种重要的调节神经生长的生物活性物质,在调控神经生长方面十分重要,它不仅是大脑发育所必需,而且能够减轻脑缺血/再灌注等多种病理因素对中枢神经系统(central nervous system, CNS)造成的损伤,有助于神经细胞受损后功能恢复,对神经细胞增殖、分化起着重要的作用。我们体外培养大鼠神经前体细胞 Ge6,实验组加入含 IGF- I 10 ng/mL 的培养基,与不加 IGF- I 的对照组同时进行培养,培养时间分别选取 2 d、4 d、6 d,qRT-PCR 和免疫荧光染色结果在培养 4 d、6 d 的 Ge6 中细胞 caspase-3 mRNA 和 caspase-3 蛋白阳性表达率差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明 IGF- I 对神经前体细胞具有抗凋亡作用。但是培养 2 d 的细胞 IGF- I 抑制细胞凋亡的作用并不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$),推测在培养早期细胞本处于一个增殖旺盛

期,凋亡本不明显,而在培养多天后,其增殖率开始降低,IGF- I 才开始发挥抗凋亡作用。Joseph 等^[7]利用基因突变使不同大鼠表达 IGF- I 及胰岛素样生长因子- I 受体(insuline-like growth factor- I receptor,IGF- I R),发现 IGF- I 的高表达可以促进大脑的过度增长,而 IGF- I 或 IGF- I R 的低表达将导致大脑发育的迟缓。将小鼠的成神经细胞作体外培养,在有 IGF- I 培养液中的神经细胞数量是没有 IGF- I 培养液的 8~40 倍^[8],我们的结果与其有相似趋势。

在脑缺血缺氧损伤后,缺血半暗带迟发性神经死亡的主要形式是凋亡,IGF- I 对缺血损伤后的凋亡有明显的抑制作用。脑缺血后,IGF- I 能通过多种途径调节离子通道活性,抑制一氧化氮毒性、兴奋性氨基酸毒性和多种促炎因子表达,发挥神经细胞保护作用,通过外源性给予 IGF- I 能缩小梗死范围,改善神经功能^[9]。目前,对 IGF- I 在脑缺血缺氧中作用的实验较为系统,本实验结果和以往实验均表明 IGF- I 对神经前体细胞具有抗凋亡作用,那

么 IGF- I 在神经细胞缺血缺氧后细胞增殖过程中应该也具有抗凋亡作用,但需进一步深入研究。另一方面,许多神经系统的病理学损伤,痴呆、癫痫或神经退行性(如帕金森病、阿尔茨海默病)等疾病,只能通过药物来防止病情的恶化,而没有根治的疗法,将神经前体细胞植入体内是否会给这些疾病的治疗带来希望,目前正在研究中。神经前体细胞不仅能够自我更新和分化为不同的神经细胞,而且能够迁移并整合到中枢神经系统的损伤部位,因此利用神经前体细胞替代性治疗来修复脑和脊髓的损伤是今后神经系统疾病治疗的一个发展方向。此外,在细胞培养过程中可观察到细胞凋亡,那在移植入体内时细胞的凋亡是否会降低治疗效果? 如果降低细胞死亡率是否有助于提高治疗效果? 我们推测当脑和脊髓损伤后外源性给予 IGF- I,在治疗后期 IGF- I 应该会抑制脑和脊髓损伤所致的细胞凋亡,所以提出设想:在将神经前体细胞植入体内治疗疾病的过程中给予一定量的 IGF- I,可抑制细胞凋亡,从而提高治疗效率。如何把理论用于临床,尚需要大量的实验,我们的体外实验结果仅可以为临床研究提供参考。

综上所述,IGF- I 是一种重要的调节神经生长的物质,将 IGF- I 用于神经系统疾病早期辅助治疗具有重要的临床意义和价值。目前对其研究越来越多,积极开展基础研究,可为实现临床-基础-临床的转化奠定科学基础,我们也正在进行 IGF- I 的抗凋亡机制的深入研究,希望有助于进一步为临床研究打下良好的基础。

参 考 文 献

1 Shoba L, An MR, Frank SJ, *et al.* Developmental regulation of

- insulin-like growth factor- I and growth hormone receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, 1999; 25; 152(1-2): 125-136.
- 2 Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, *et al.* The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev*, 2005; 26(7): 916-943.
- 3 Walenkamp MJ, Van der Kamp HJ, Pereira AM, *et al.* A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91(8): 3062-3070.
- 4 Raile K, Klammt J, Schneider A, *et al.* Clinical and functional characteristics of the human Arg59Ter insulin-like growth factor I receptor(IGF I R) mutation: implications for a gene dosage effect of the human IGF I R. *Clin Endocrinol Metab*, 2006; 91(6): 2264-2271.
- 5 Inagaki K, Tulpakov A, Rubtsov P, *et al.* A family insulin-like growth factor- I receptor mutant leads to short stature; clinical and biochemical characterization. *Clin Endocrinol Metab*, 2007; 92(4): 1542-1548.
- 6 Villa P, Kaufmann SH, Eamshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci*, 1997; 22(10): 388-393.
- 7 Joseph D'Ercole A, Ye P. Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology*, 2008; 149(12): 5958-5962.
- 8 Arsenijerac Y, Weiss S. Insulin-like growth factor- I is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors; distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*, 1998; 18(6): 2118-2128.
- 9 Wang JM, Hayashi T, Zhang WR, *et al.* Reduction of ischemic damage by application of insulin-like growth factor- I in rat brain after transient ischemia. *Acta Med Okayama*, 2001; 55(1): 25-30.

(2013 - 06 - 05 收稿, 2013 - 09 - 20 修回)

编辑 沈 进