

论著·实验研究

17 β -雌二醇抑制高氧所致少突前体细胞凋亡

王华 母得志

(四川大学华西第二医院儿科/新生儿出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨高氧及配对免疫球蛋白样受体 B (PirB) 对大鼠体外少突前体细胞 (OPCs) 的影响, 以及 17 β -雌二醇 (E2) 的保护作用。**方法** 用逆转录定量酶联反应 (RT-qPCR) 检测 OPCs 的 PirB mRNA 和蛋白表达, 用 siRNA 沉默 OPCs 的 PirB, 高氧刺激后再用 E2 处理, 通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 比色法和流式细胞术测定 OPCs 细胞存活率和凋亡率。**结果** 高氧导致 OPCs 凋亡增加和活性降低, E2 能够明显下调 PirB 的表达, E2 处理或沉默 PirB 能够明显减少高氧所致的 OPCs 凋亡、增加细胞存活率。**结论** 高氧导致 OPCs 的凋亡, 而 E2 能够保护高氧所致的 OPCs 凋亡。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(7): 650-655]

[关键词] 高氧; 17 β -雌二醇; 凋亡; 配对免疫球蛋白样受体 B; 少突前体细胞; 大鼠

17 β -estradiol suppresses hyperoxia-induced apoptosis of oligodendrocyte precursor cells through paired-immunoglobulin-like receptor B

WANG Hua, MU De-Zhi. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Mu D-Z, Email: mudz@scu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the effect of hyperoxia and paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) on rat oligodendrocyte precursor cells (OPCs) *in vivo* and the neuroprotective effects of 17 β -estradiol (E2) on these cells. **Methods** Rat OPCs were treated with different concentrations of E2 and the cells were harvested for RT-qPCR analysis at different time points. PirB was silenced with small interfering siRNA. The effects of E2 treatment and silencing of PirB on OPCs viability and apoptosis under hyperoxic stimulation were detected using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and flow cytometry analysis. **Results** Hyperoxia induced apoptosis in OPCs and decreased their viability. E2 treatment markedly down-regulated the expression of PirB. E2 treatment or PirB silencing markedly decreased hyperoxia-induced apoptosis and increased cell viability in OPCs. **Conclusions** E2 can protect OPCs from hyperoxia-induced apoptosis. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(7): 650-655]

Key words: Hyperoxia; 17 β -estradiol; Apoptosis; Paired immunoglobulin-like receptor B; Oligodendrocyte precursor cell

随着新生儿重症监护技术的进步, 尤其是新生儿复苏、呼吸支持的发展, 极低出生体重儿 (出生体重 <1500 g) 和超早早产儿 (出生胎龄 <28 周) 的存活率得以提高; 然而, 他们的神经系统预后并未明显改善^[1]。大脑的主要发育阶段是胎儿期 23~32 周, 这一阶段也正是少突细胞发育的关键时期^[2]。有报导表明, 约 40% 的超早早产儿可能有神经系统缺陷, 影响运动及感知功能。不仅缺氧

可能引起早产儿脑损伤, 高氧也可导致脑损伤。一些报道表明高氧是导致神经细胞发育阶段凋亡的重要原因^[3]。已经有证据表明, 支气管肺发育不良或视网膜病的早产儿有较高的神经系统损伤风险^[4]。

配对免疫球蛋白样受体 B (paired immunoglobulin like receptor B, PirB) 是髓鞘抑制因子的另一个功能性受体。已有动物实验表明, 抑制 PirB 可以促

[收稿日期] 2016-02-07; [接受日期] 2016-05-23

[基金项目] 国家自然科学基金 (81401239, 81330016)。

[作者简介] 王华, 女, 博士, 副教授。

[通信作者] 母得志, 男, 教授。

进损伤脊髓的再生^[5]。我们最近的动物实验也证明缺氧脑损伤中 PirB 的表达增加,并且 PirB 的增加可能会抑制神经再生^[6]。

母孕期 17-β 雌二醇 (E2) 水平几乎增加了 100 倍,导致胎儿体内的雌激素水平也增加。E2 是神经保护剂,一些缺氧缺血和毒性实验模型已经证实了 E2 的神经保护作用。E2 在神经系统发育和功能上,尤其是在脑室周围前体细胞分化过程中发挥着重要的作用,在发育的不同阶段影响细胞凋亡^[7-10]。但出生后 24 h 内,新生儿体内的 E2 水平迅速下降,早产儿的下降则出现得更早,这可能使 E2 的神经保护作用不足^[11-12]。

凋亡是高氧所致脑损伤的重要机制^[12],脑室周围白质软化 (periventricular leukomalacia, PVL) 是早产儿脑损伤的主要形式,而少突前体细胞 (oligodendrocyte precursor cells, OPCs) 是 PVL 的主要靶细胞。Riddle 等^[13]在胎羊脑损伤模型的研究发现,白质损伤的严重程度与 OPCs 数目密切相关。但高氧是否导致 OPCs 凋亡,高氧时 OPCs 的 PirB 表达情况,以及 E2 与 OPCs 凋亡之间的相互关系尚未阐明。

1 材料与方法

1.1 动物

20 只 2 d 龄 SD 大鼠,购自四川大学实验动物中心。动物的喂养、保存及手术均遵守国际动物保护法和四川大学伦理委员会规定,符合动物伦理学标准。

1.2 少突前体细胞的原代培养

参考 Chen 等^[14]的方法分离原代 OPCs。SD 大鼠在乙醚 (Sigma-Aldrich, USA) 深度麻醉下断头处死,剪开颅骨、剥除脑膜、分离出皮质,冰预冷的 Hank's (Gibco, USA) 缓冲液漂洗两次,37℃、0.01% 胰蛋白酶 (碧云天,中国南通) 和 DNase (碧云天,中国南通) 孵化 15 min,将组织磨碎、40 μm 无菌过滤器过滤细胞,将细胞置于含有 DMEM 和 20% FBS (Gibco, USA) 的多 D 赖氨酸包被的 T75 培养瓶中培养。第 10 天见胶质细胞长出,其表面覆盖一层 OPCs。将培养瓶置于摇床,200 转/min 振荡 1 h,分离出死亡细胞和小神经胶质细胞;换液,200 转/min 振荡过夜,分离

OPCs。收集 OPCs 并将其植于不含血浆的 DMEM 中培养 (多 D 赖氨酸包被培养皿),同时加入 E2 及生长因子 (PDGF-AA 和 bFGF)。诱导分化后移除生长因子,加入神经营养因子 (CNTF)。

1.3 药物处理

在 OPCs 培养基中加入 E2 (终浓度为 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} mol/L),0 h、8 h、16 h、24 h、48 h 后收集细胞,使用逆转录定量酶联反应 (RT-qPCR) 检测 PirB mRNA 表达。E2 以 PirB mRNA 水平最低时作为最佳浓度。

1.4 PirB 小分子干扰 RNA (siRNA) 和转染

PirB siRNA (5'-GTGTTTCAGTTGTTCCCTTGA CATGA-3') 和阴性对照 siRNA 购于上海吉马生物有限公司 (上海,中国)。根据说明书,用脂质体 2000 (Invitrogen, USA) 融合 50% 细胞并转染 100 nmol/L siRNA。

1.5 实验分组

实验分为 8 组: (1) 常氧加阴性 siRNA 组: 细胞在常氧情况下转染阴性对照 siRNA,培养 24 h,然后继续常氧下培养 24 h; (2) 高氧加阴性 siRNA 组: 细胞首先在常氧下转染阴性 siRNA,培养 24 h,继而在高氧下培养 24 h; (3) 常氧加 PirB siRNA 组: 常氧下 PirB siRNA 转染细胞并培养 24 h,然后常氧下继续培养 24 h; (4) 高氧加 PirB siRNA 组: 常氧下 PirB siRNA 转染细胞并培养 24 h,然后高氧下培养 24 h; (5) 常氧加 E2 组: 细胞中加入 E2,常氧培养 48 h; (6) 高氧加 E2 组: 细胞在常氧下加入 E2,培养 24 h,然后高氧下继续培养 24 h; (7) 常氧加生理盐水组: 细胞在常氧下加入与 E2 等体积的生理盐水,培养 48 h; (8) 高氧加生理盐水组: 细胞在常氧情况下加入与 E2 等体积的生理盐水,培养 24 h 后改为高氧培养 24 h。每组均 5 个复孔。

高氧培养是指细胞在 37℃, 80% O₂, 5% CO₂ 和 15% N₂ 中孵化; 常氧培养即细胞在 37℃, <21% O₂ 和 5% CO₂ 中孵化。E2 组的 E2 终浓度为 10^{-7} mol/L。

1.6 RT-qPCR 检测 PirB mRNA 水平

每组取 6×10^5 个细胞,离心, PBS 洗两次,冰 Trizol (Invitrogen, USA) 裂解细胞,提取 RNA,使用 PrimeScript RT 逆转录试剂盒 (Takara 生物公司,中国大连) 将 RNA 逆转录为 cDNA。

使用 Mx3000P 实时 PCR 系统 (Stratagene, USA) 和 SYBR Premix Ex TaqII PCR 试剂盒 (Takara Bio, Inc.) 将相同量的 cDNA 作为 RT-qPCR 的模板检测 PirB mRNA 表达。基因表达的褶皱感应使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

1.7 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT) 法分析 OPCs 活性

各组 OPCs 细胞孵化 48 h 后, 每个孔内加入 20 μ L (5 mg/mL) MTT, 继续孵化 4 h, 继而 200 μ L DMSO 加入每孔, 4 h 后读取器 (multiscan MK3, USA) 读取 570 nm 波长的 OD 值, 并计算细胞存活率。

1.8 流式细胞仪分析 OPCs 的凋亡

OPCs 种于 6 孔板 (10^6 / 孔), 冰 PBS 洗两次, 缓冲液 (南京凯基公司) 重新调整细胞浓度至 10^4 / 孔, 加入 10 μ L 荧光标记的膜联蛋白-V 和 10 μ L 3 mmol/L 的碘化丙啶 (PI), 15 min 室温孵化, 暗室内洗涤后行流式细胞仪 (BD Accuri™ C6, USA) 分析。

1.9 Western blot 检测 PirB 蛋白表达

在 RIPA 分析缓冲液中对细胞进行溶解, 并且加入酶抑制剂处理 5 s, 12000 转/min、4℃ 离心 20 min, 取上清 -80℃ 保存待用。溶菌产物蛋白

(50~60 μ g 总蛋白) 在 10% SDS-PAGE (碧云天, 中国南通) 上进行电泳分离, 转膜 (Pall, USA), 用 5% 脱脂干奶粉在 TBS-T 中 37℃ 封闭膜 1 h, 再加入兔抗 PirB 多克隆抗体 (1:1000) 4℃ 孵化过夜。TBS-T 洗膜 3 次, 用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1:20000) (博士得生物公司, 中国武汉) 37℃ 孵化 1 h, TBS-T 洗膜 3 次。使用信号底物 (Thermo Fisher Scientific, USA) 观察蛋白条带, 用 Pro-Plus 6.0 软件对膜照相后的胶片进行扫描和密度定量分析。蛋白表达结果用目标蛋白/参考蛋白比值表示。

1.10 统计学分析

使用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差表示, 各组间的比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 17 β -雌二醇对少突前体细胞的抑制作用

E2 浓度为 10^{-7} mol/L、孵化 24 h 的 PirB mRNA 表达最低, 见图 1。因此, 以 10^{-7} mol/L 作为 E2 的最佳浓度, 24 h 作为最佳处理时间。

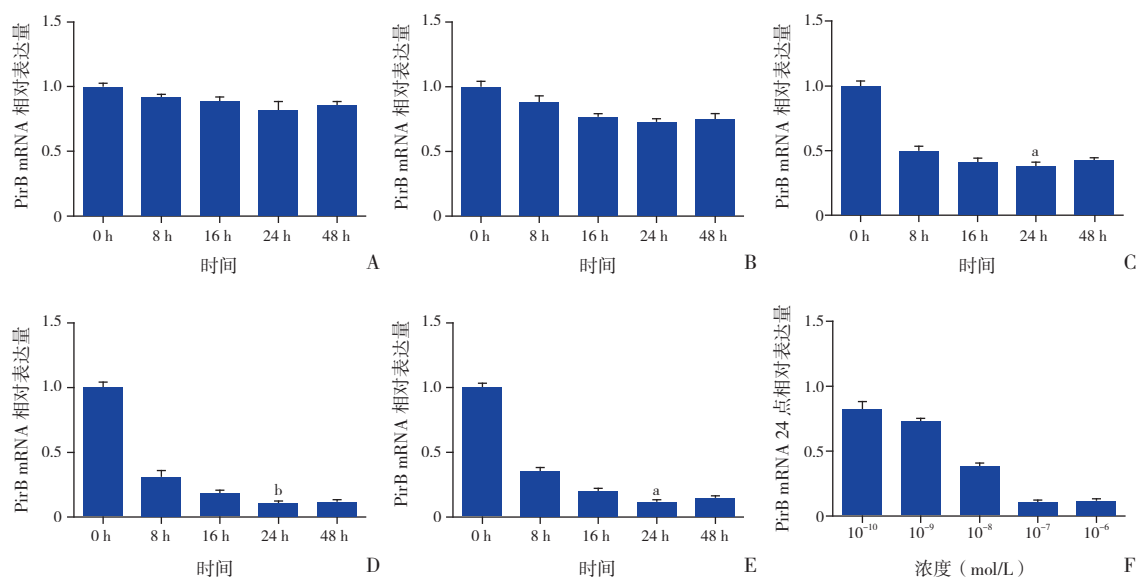


图1 少突前体细胞在雌二醇 (E2) 不同浓度、不同时间作用下的配对免疫球蛋白 (PirB mRNA) 相对表达 ($n=5$) A~E: 不同浓度 E2 (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/L) 处理后的 PirB mRNA 表达。a 示与 0 h、8 h、16 h、48 h 比, $P < 0.05$; b 示与 0 h、8 h、16 h、48 h 比, $P < 0.01$ 。F: 不同浓度 E2 作用 24 h 后的 PirB mRNA 相对表达量。a 示与 10^{-10} , 10^{-9} mol/L 比, $P < 0.05$; b 示与 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-6} mol/L 比, $P < 0.01$ 。

2.2 RT-PCR 和 Western blot 检测 PirB siRNA 转染后的 PirB 表达

PirB siRNA 组的 PirB mRNA 明显低于阴性对

照组 ($P<0.05$), 见图 2A; PirB 蛋白表达量 (165 ± 5) 明显低于阴性对照组 (661 ± 13), 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见图 2B、C。

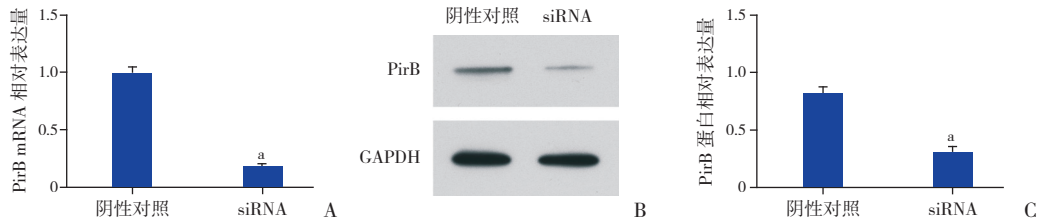


图 2 RT-PCR 和 Western blot 检测 PirB siRNA 转染后的 PirB 表达 ($n=5$) A: PirB mRNA 相对表达量。

B、C: PirB 蛋白表达。a 示与阴性对照相比, $P<0.05$ 。

2.3 各组少突前体细胞活性比较

高氧阴性组的细胞存活率低于常氧阴性组 ($P<0.05$), 高氧 E2 组细胞存活率高于高氧生理盐水组 ($P<0.05$); 高氧 PirB siRNA 组的细胞存活率高于高氧阴性 siRNA 组 ($P<0.05$)。见图 3。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率

高氧阴性 siRNA 组的总凋亡率比常氧阴性 siRNA 组增加 ($P<0.05$), 高氧 PirB siRNA 组的总凋亡率低于高氧阴性 siRNA 组 ($P<0.05$); 高氧加 E2 组的总凋亡率低于高氧加生理盐水组 ($P<0.05$)。见图 4~5。

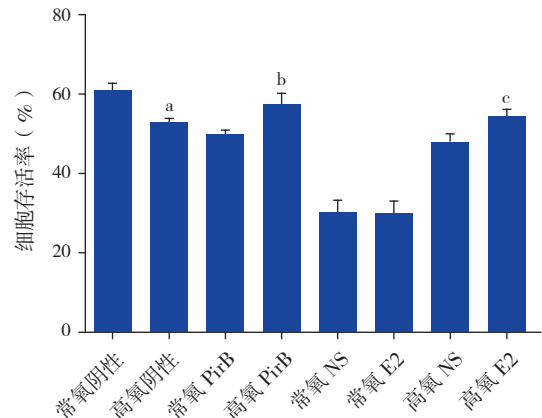


图 3 各组少突前体细胞存活率 ($n=5$) a 示与常氧阴性组比, $P<0.05$; b 示与高氧阴性组比, $P<0.05$; c 示与高氧生理盐水组比, $P<0.05$ 。

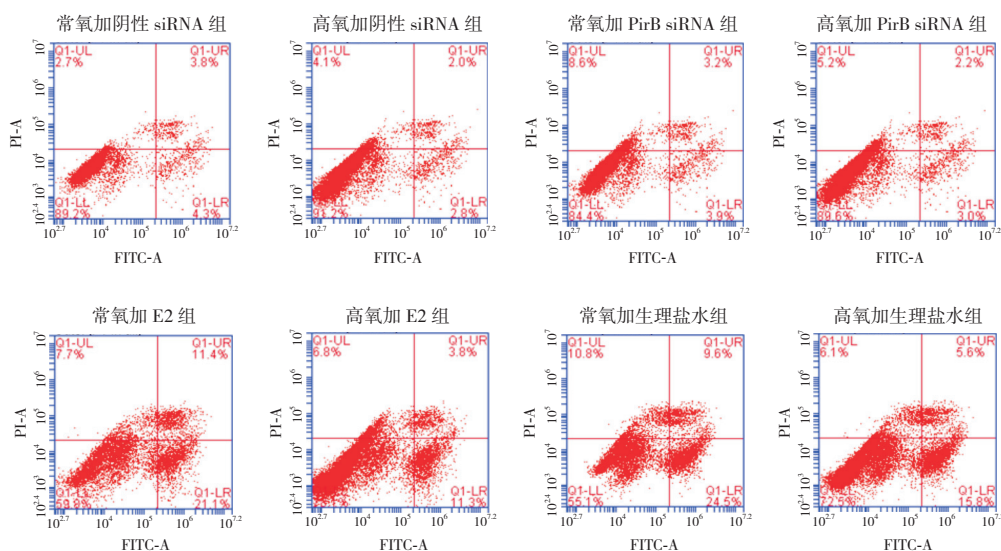


图 4 流式细胞术检测各组少突前体细胞凋亡 存活细胞: 阴性染色, 左下区; 早期凋亡细胞: 膜联蛋白-V 阳性和碘化丙啶阴性, 右下区间; 细胞凋亡晚期阶段: 膜联蛋白-V 和碘化丙啶阳性, 右上区间。

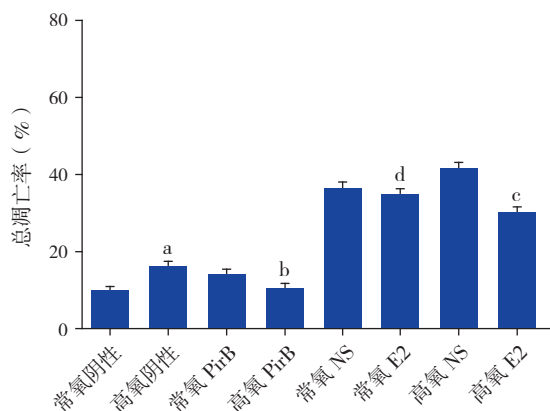


图5 各组少突前体细胞凋亡率比较 a示与常氧阴性组比, $P<0.05$; b示与高氧阴性组比, $P<0.05$; c示与高氧NS组比, $P<0.05$; d示与常氧NS组比, $P<0.05$ 。

3 讨论

随着新生儿重症监护技术的提高,早产儿存活率逐渐增高,但是极低出生体重儿和超早产儿在学龄期发生神经发育损伤仍然较为普遍^[15]。目前对于早产儿如此高的神经发育损伤(neurodevelopmental impairment, NDI)发生率原因尚不十分清楚,但是早产儿在NICU常常高浓度吸氧,这对于肺和视网膜的损伤已经十分明确了^[16-18],而肺发育损伤(支气管肺发育不良, bronchopulmonary dysplasia, BPD)或视网膜发育异常(早产儿视网膜病, retinopathy of prematurity, ROP)的早产儿发生NDI的危险率也常常增高^[17]。近期有文献报道新生鼠高氧暴露后在成年阶段有NDI表现^[19-20]。而且临床随访同时发现很多早期高浓度吸氧的极低出生体重儿远期均有运动或行为方面的异常^[21]。

研究表明高氧是导致发育期脑组织神经细胞广泛凋亡的重要原因。实验显示,高氧导致7d龄Wistar大鼠和C57/BL6小鼠脑组织不同区域死亡退化细胞增加,这些区域包括尾状核、前额II和IV层、顶部、前扣带回皮层、脑室周围白质^[22]。

围生期脑损伤的神经病理学变化十分复杂,根据患儿不同胎龄和不同发育阶段,会涉及到不同部位脑灰质或白质结构的病理变化^[23],脑室周围白质软化是早产儿脑损伤的主要表现形式,在脑发育的高峰期神经细胞最容易受到损伤,而人类的这一高峰期从孕中期一直延续到生后第三年,

PVL损伤在人类发生的高峰期是胎龄23~32周,这一期间恰好是少突前体细胞逐渐分化成熟的阶段^[24]。因此我们拟通过实验证明高氧是否会导致OPCs的凋亡以及可能的机制。本课题组前期已证实PirB这种表达于髓鞘细胞上的受体有抑制神经再生的作用^[6],另外一些研究表明神经活性激素包括E2,能够保护神经元免于多种危险因素的伤害^[18]。因此本研究力图探讨高氧、PirB和E2治疗与OPCs凋亡之间的关系。

本研究首先证明了高氧增加OPCs凋亡,减少其存活率,这与Miller等^[22]、Sosa等^[23]的实验一致。第二,PirB的表达增加了OPCs的凋亡,这也同样与本课题组之前的实验结果一致^[6],表明PirB蛋白在损伤新生鼠脑组织中明显增加;第三,E2能够帮助保护高氧所致的细胞损伤。已有实验证实E2似乎特别能够保护皮层和海马神经元的缺氧损伤^[10],而本研究结果进一步表明E2同时能够对高氧产生的神经细胞损伤加以保护,而且沉默PirB能够保护高氧所致的OPCs细胞损伤。

从试验结果我们推测在高氧应激损伤脑白质后,PirB水平增加可促进OPCs凋亡,根据E2能够保护高氧所致的细胞损伤,假设E2治疗可能是通过沉默PirB基因致PirB表达下调,进而减少高氧所致的OPCs凋亡,但是由于试验中没有涉及到E2治疗与PirB基因沉默之间的关系研究,因此E2治疗减少高氧所致OPCs凋亡与PirB表达之间是否有这样的关系,尚需我们进一步探讨。

【参 考 文 献】

- [1] Pitcher JB, Schneider LA, Burns NR, et al. Reduced corticomotor excitability and motor skills development in children born preterm[J]. J Physiol, 2012, 590(Pt 22): 5827-5844.
- [2] Londhe VA, Sundar IK, Lopez B, et al. Hyperoxia impairs alveolar formation and induces senescence through decreased histone deacetylase activity and up-regulation of p21 in neonatal mouse lung [J]. Pediatr Res, 2011, 69(5 Pt 1): 371-377.
- [3] Siffringer M, Bendix I, Börner C, et al. Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis [J]. Cell Death Dis, 2012, 3(1): e250.
- [4] Teberg AJ, Pena I, Finello K, et al. Prediction of neurodevelopmental outcome in infants with and without bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Med Sci, 1991, 301(6): 369-374.
- [5] Huebner EA, Kim BG, Dufly PJ, et al. A multi-domain

- fragment of nogo-a protein is a potent inhibitor of cortical axon regeneration via nogo receptor-1[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 18026-18036.
- [6] Wang H, Xiong Y, Mu D. PirB restricts neuronal regeneration in developing rat brain following hypoxia-ischemia [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(2): 339-344.
- [7] Karki P, Smith K, Johnson J, et al. Astrocyte-derived growth factors and estrogen neuroprotection: role of transforming growth factor- α in estrogen-induced upregulation of glutamate transporters in astrocytes [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 389(0): 58-64.
- [8] Wang S, Wei H, Cai M, et al. Genistein attenuates brain damage induced by transient cerebral ischemia through up-regulation of ERK activity in ovariectomized mice[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(4): 457-465.
- [9] Merchenthaler I, Dellovade TL, Shughrue PJ. Neuroprotection by estrogen in animal models of global and focal ischemia [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1007(1): 89-100.
- [10] Wang L, Andersson S, Warner M, et al. Estrogen receptor (ER) beta knockout mice reveal a role for ER β in migration of cortical neurons in the developing brain[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(2): 703-708.
- [11] Ishihara Y, Fujitani N, Kawami T, et al. Suppressive effects of 17 β -estradiol on tributyltin-induced neuronal injury via Akt activation and subsequent attenuation of oxidative stress[J]. *Life Sci*, 2014, 99(1-2): 24-30.
- [12] Siffringer M, Bendix I, Börner C, et al. Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3(1): e250.
- [13] Riddle A, Luo NL, Manese M, et al. Spatial heterogeneity in oligodendrocyte lineage maturation and not cerebral blood flow predicts fetal ovine periventricular white matter injury[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(11): 3045-3055.
- [14] Chen Y, Balasubramaniyan V, Peng J, et al. Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(5): 1044-1051.
- [15] Vohr BR, Stephens BE, Higgins RD, et al. Are outcomes of extremely preterm infants improving? Impact of bayley assessment on outcomes[J]. *J Pediatr*, 2012, 161(2): 222-228.e3.
- [16] Auten RL, Mason SN, Auten KM, et al. Hyperoxia impairs postnatal alveolar epithelial development via NADPH oxidase in newborn mice[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(1): L134-L142.
- [17] Dorfman A, Dembinska O, Chemtob S, et al. Early manifestations of postnatal hyperoxia on the retinal structure and function of the neonatal rat[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(1): 458-466.
- [18] Londhe VA, Sundar IK, Lopez B, et al. Hyperoxia impairs alveolar formation and induces senescence through decreased histone deacetylase activity and up-regulation of p21 in neonatal mouse lung[J]. *Pediatr Res*, 2011, 69(5 Pt 1): 371-377.
- [19] Ramani M, van Groen T, Kadish I, et al. Neurodevelopmental impairment following neonatal hyperoxia in the mouse[J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 50: 69-75.
- [20] Vottier G, Pham H, Pansioot J, et al. Deleterious effect of hyperoxia at birth on white matter damage in the newborn rat[J]. *Dev Neurosci*, 2011, 33(3-4): 261-269.
- [21] Prins SA, von Lindern JS, van Dijk, et al. Motor development of premature infants Born between 32 and 34 weeks[J]. *Int J Pediatr*, 2010; 2010. pii: 462048.
- [22] Miller SL, Yawno T, Alers NO, et al. Antenatal antioxidant treatment with melatonin to decrease newborn neurodevelopmental deficits and brain injury caused by fetal growth restriction[J]. *J Pineal Res*, 2014, 56(3): 283-294.
- [23] Sosa MA, De Gasperi R, Paulino AJ, et al. Blast overpressure induces shear-related injuries in the brain of rats exposed to a mild traumatic brain injury[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2013 1(1): 51.
- [24] Osterholt HC, Dannevig I, Wyckoff MH, et al. Antioxidant protects against increases in low molecular weight hyaluronan and inflammation in asphyxiated newborn pigs resuscitated with 100% oxygen[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38839.

(本文编辑: 俞燕)