

全氟辛烷磺酸对大鼠神经干细胞增殖和迁移的影响

林 函*, 高雅静*, 徐 敏, 梅虹霞, 李晓珩, 连庆泉
(温州医科大学附属第二医院麻醉科, 浙江 温州 325027)

摘要: 目的 探讨全氟辛烷磺酸(PFOS)对大鼠神经干细胞增殖和迁移的影响及其机制。方法 分离怀孕 15 d(E15)SD 大鼠大脑皮质,神经上皮干细胞蛋白染色鉴定培养的神经干细胞。PFOS 10, 50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理大鼠神经干细胞 24 h 后, Edu 免疫荧光染色检测神经干细胞的增殖; 荧光定量聚合酶链反应法(qPCR)检测样本中 Stat3, Sox2 和 Notch1 mRNA 表达; Western 蛋白质印迹法检测 Stat3 及 p-Stat3 蛋白表达; 采用 Transwell 小室检测神经干细胞的迁移能力。结果 经鉴定分离培养的原代细胞为神经干细胞。Edu 免疫荧光染色结果显示, 与正常对照组相比, 经 PFOS 处理的神经干细胞的 Edu 阳性率明显下降($P<0.05$), 说明 PFOS 抑制神经干细胞的增殖; qPCR 检测结果显示, PFOS 处理组神经干细胞中 Stat3 mRNA 表达显著降低($P<0.05$); Western 蛋白质印迹实验结果表明, PFOS 组 p-Stat3 蛋白的表达降低($P<0.05$), 但总 Stat3 蛋白表达无变化; Transwell 小室检测结果显示, PFOS 具有抑制神经干细胞迁移的能力($P<0.05$)。结论 PFOS 可导致神经干细胞增殖和迁移能力降低, 可能与抑制 Stat3 的转录和翻译后的磷酸化过程有关。

关键词: 全氟辛烷磺酸; 神经干细胞; 增殖; 迁移; Stat3

中图分类号: R971 文献标志码: A 文章编号: 1000-3002(2014)01-0018-06

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2014.01.003

全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是人工合成的氟表面活性剂, 由于其磺酰基或羧基端的无极性, 而胎儿/新生儿的血脑屏障发育不成熟, 导致 PFOS 可以进入发育中的大脑^[1-2]。新生大鼠给予高剂量的 PFOS 引起神经系统发育延迟甚至死亡^[3-4]。细胞实验发现, PFOS 明显减少小胶质细胞(小鼠 N9 细胞株)的活性、破坏线粒体膜完整性、影响凋亡调节基因的表达^[5]。研究表明, PFOS 对神经干细胞自然分化的过程的影响主要表现为抑制神经干细胞向神经元方向分化, 并且 PFOS 的这种作用是通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR γ) 调节的^[6]。

Stat3 蛋白是一种潜在的细胞质转录因子, 在将信息从膜传递到核中起着主要的作用, 受细胞因子, 生长因子及干扰素类的激活^[7], 它不仅在胚胎

干细胞更新以及多能干细胞表型维持当中起着关键性的决定作用^[8-9], 而且还对细胞生长发育过程具有调节作用, 包括细胞增殖、分化以及细胞凋亡^[10-11]。Jak/Stat 信号通路被激活后, 前体祖细胞的增殖能力增强, 并且 Wnt 通路还可以通过对 Jak/Stat 信号通路进行调节从而决定祖细胞的增殖能力^[12], 另外 LIF/gp130 复合物也可以激活 Jak/Stat 信号通路引起细胞的生长加速^[13]。有研究表明, 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 通过激活 Stat3 信号通路后, 可以促进骨髓间充质干细胞的迁移和存活的能力^[11], Stat3 还参与了调节白细胞、上皮细胞及角化细胞的迁移过程^[13]。Rajan 等^[14]的研究发现, 孕晚期(E14.5)的神经干细胞中的 Stat3 活动的增强将导致其向胶质细胞分化, 然而, 还有数据证实抑制 Stat3 将直接诱导其向神经元方向分化, 从而抑制星形胶质细胞的形成^[15]。

基于 PFOS 对胎儿及新生儿的敏感性, 本研究选择孕 15 d(E15)的胎大鼠大脑皮质神经干细胞, 探讨 PFOS 对大脑神经干细胞增殖和迁移的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

DMEM/F12 和 B27 supplement, 美国 Gibco

基金项目: 浙江省医药卫生平台重点资助计划(2012ZDA037); 浙江省卫生厅中医药优秀青年人才基金计划(2010ZQ011); 浙江省科技厅钱江人才计划(2012R10073)

作者简介: 林 函, 男, 博士, 主要从事麻醉药的神经毒理学研究; 高雅静, 女, 硕士研究生, 主要从事麻醉药的神经毒理学研究。

通讯作者: 连庆泉, E-mail: lianqingquanmz@163.com

* 共同第一作者。

公司;碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF),美国 Cali-Bio 公司;大鼠 Stat3 抗体、P-Stat3 抗体及大鼠神经上皮干细胞蛋白抗体,美国 Abcam 公司;Trizol 和 EDU 试剂盒,美国 Invitrogen 公司;荧光定量 PCR 仪和 SsoFast EvaGreen Supermix,美国 Bio-Rad 公司;逆转录试剂盒,美国 Promega 公司;Western 蛋白质印迹法鼠抗兔二抗,碧云天公司;Transwell 板,美国 Corning 公司。CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司;解剖显微镜,日本 Olympus;荧光显微镜,日本 Nikon 公司。

1.2 细胞制备及鉴定

雌雄 SD 大鼠,体质量 250 ~ 350 g,温州医科大学实验动物中心提供,动物许可证编号:SCXK(浙)2010-0044。将雌雄 SD 大鼠放在定制的铁笼里进行交配,室温为 21.5 ~ 22.5℃,自然照明,12 h 昼夜交替饲养,以查获阴栓日为孕第 0 天,记为 E0。分离 E15 大鼠的皮质神经干细胞,在含有神经营养因子(2% B27, bFGF 20 μg · L⁻¹ 以及 EGF 20 μg · L⁻¹)的 DMED/F12 的培养基中进行培养,放在含 5% CO₂、充分湿化的 37℃ 的细胞培养箱中繁育培养。培养 3 ~ 4 d 进行细胞传代,稳定传至第 3 代时,再将原代和培养到第 3 代(P3)的神经干细胞接种到 6 孔板中的盖玻片上,加入少量培养基在培养箱内继续培养,4 h 后取出培养板,进行神经上皮干细胞蛋白免疫细胞化学染色鉴定,荧光显微镜拍照。

1.3 细胞分组处理

PFOS 在人类中的半衰期一般为 4 ~ 6 年^[16],PFOS 生产工厂的工人血清中 PFOS 的一般水平为 0.5 ~ 2 mg · L⁻¹,报道最高者达到 13 mg · L⁻¹(26 μmol · L⁻¹)^[1]。由于本研究设计作用的时间短暂(24 h),故选择高于人血清水平的 PFOS(10, 50 和 100 μmol · L⁻¹),文献报道也有选择此浓度 PFOS 进行体外神经毒性研究^[17]。

取鉴定的细胞,调节细胞密度至 2 × 10⁶ L⁻¹,接种至 6 孔板,随机分为 5 组:正常对照组、终浓度为 0.1% DMSO 组、PFOS 终浓度为 10, 50 和 100 μmol · L⁻¹ 组。

1.4 Edu 荧光染色检测细胞增殖

取 1.3 分组的细胞,放入培养箱繁育 12 h 后进行 24 h 药物处理(细胞继续培养 20 h 后,加入终浓度为 10 μmol · L⁻¹ 的 Edu,继续培养 4 h)。按照说明书进行 Edu 与细胞核(Hoechst33342)的染色后,荧光显微镜下拍照,每组按照上下左右中间的位置随机选取 5 个视野,分别计数 Edu 阳性细胞平均数及总细胞数(细胞核的总数),最后用 Edu 细胞的

阳性率表示神经干细胞的增殖。

1.5 qPCR 检测神经干细胞的 mRNA 水平的改变

取 1.3 分组的细胞,繁育 12 h 进行药物干预 24 h 后,按 Trizol 试剂说明书提取各组神经干细胞的总 RNA,并对总 RNA 的浓度与吸光度值进行测定,将 RNA 逆转录为 cDNA,采用标准曲线法将产物 cDNA 进行 qPCR。其引物序列如下,β 肌动蛋白:上游引物(F) CCCATCTATGAGGGTTACGC;下游引物(R) TTTAATGTACGCACGATTTC; Stat3: (F) TACCAGCAAAATCAGGTTGCT; (R) ACATCCCCAGAGTCCTTATCAA; Sox2: (F) TACCTCTTCTCCCACTCCAG; (R) AATCTCTCCCCTTCTCCAGTTC; Notch1: (F) ACATCCCAGAGTCCTTATCAA; (R) GAAAAGCCACCGAGATAGTCAG。采用相对稀释标准曲线法测定目的基因 Stat3, Sox2 和 Notch1 mRNA 的相对表达水平。

1.6 Western 蛋白质印迹法检测神经干细胞蛋白表达

取 1.3 分组的细胞,繁育 12 h 进行药物干预 24 h 后,收集细胞进行离心沉淀,加入适量的裂解液和磷酸酶抑制剂。置于冰上静止 30 min,收集在 EP 管内超声(100 ~ 200 w)5 s,3 次。用冷冻离心机以 12 000 × g 的速度离心 10 min,收取上清液,用 BCA 工作试剂盒测定蛋白浓度,每条泳道蛋白上样量 20 μg,电泳、转膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入兔抗大鼠 β 肌动蛋白和 p-Stat3 一抗,分别按 1:2000 和 1:1000 的滴度稀释,4℃ 过夜。TBST 洗膜,加入稀释比例为 1:5000 的鼠抗兔二抗,室温繁育 2 h, TBST 充分洗膜,通过曝光后显示条带。将 p-Stat3 条带用一抗二抗去除液洗涤 20 min 后,加入兔抗大鼠 Stat3 一抗,按 1:1000 的滴度稀释,4℃ 过夜。TBST 洗膜,加入稀释比例为 1:5000 的二抗,室温繁育 2 h, TBST 充分洗膜,通过曝光后显示条带。用 Quantity One 4.62 软件分析目标蛋白条带和内参蛋白条带的积分吸光度(integrated absorbance, IA),以两者 IA 的比值表示目标蛋白的相对表达水平。

1.7 Transwell 检测神经干细胞的迁移能力

收集 1.3 项处理的细胞,用含有 0.1% BSA 的培养基重悬细胞,按照 5 × 10⁸ 的密度接种 100 μL 到 Transwell 板的上室中,下室中加入 600 μL 含有 10% 胎牛血清(FBS)的培养基,放入培养箱中继续培养 24 h^[18]。培养好后取出 Transwell 板,将上室培养基吸净,再将小室放入甲醇中室温固定 15 ~ 20 min, PBS 清洗 1 次后结晶紫染色 15 ~ 20 min, PBS 清洗直至不再有颜色。用棉签擦拭上室中的

细胞,显微镜下观察下室细胞,记数,每组按照上下左右中的位置随机选取 5 个视野,取 5 个视野细胞总数的均数进行统计分析,以迁移至下室细胞个数的均数表示细胞的迁移能力。

1.8 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS19.0 软件进行统计分析,各组间差异用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经干细胞的鉴定

图 1 结果显示,刚接种的细胞折光性好,呈球形,培养 3~4 d 逐渐增殖为多细胞组成的神经球(图 1A),培养至第 3 代的神经球经过巢蛋白(nestin)免疫荧光染色特异性标记后呈现绿色的荧光(图 1B),DAPI 标记神经干细胞的细胞核,免疫荧光呈现蓝色(图 1C)。免疫荧光的结果显示,巢蛋白特异性标记的神经干细胞在 DAPI 标记神经干细胞的细胞核中阳性率 $>95\%$,证明培养至第 3 代的细胞仍为纯度很高的神经干细胞。

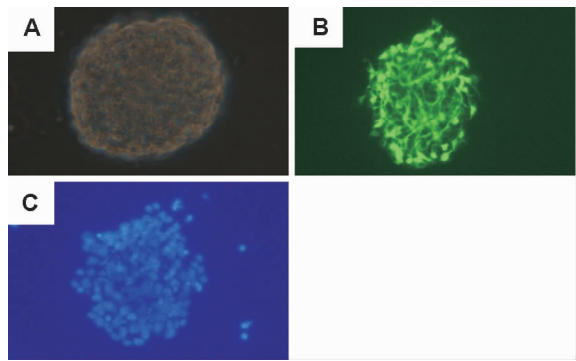


Fig.1 Identification of neural stem cells by nestin immunofluorescence staining. The neural stem cells of the third generation with nestin immunofluorescence staining were clustered into neural spheres(A). The cells of the neural spheres were nearly nestin positive (B). The cell nuclei were stained with DAPI(C).

2.2 全氟辛烷磺酸对神经干细胞增殖的影响

如表 1 和图 2 所示,与正常对照组相比,PFOS $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组神经干细胞 Edu 阳性率统计学无明显差异,说明此浓度对神经干细胞的增殖无抑制作用,PFOS 50 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组神经干细胞 Edu 阳性率显著下降,说明 PFOS 对神经干细胞的增殖有明显抑制作用($P < 0.01$)。

Tab.1 Effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on proliferation of neural stem cells

Group	Proliferative rate/%
Normal control	46.9 ± 2.0
0.1%DMSO	47.5 ± 3.5
PFOS 10	46.3 ± 3.8
50	$36.9 \pm 2.6^*$
100	$31.7 \pm 2.6^{**}$

The cells were treated with PFOS 10, 50 and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group.

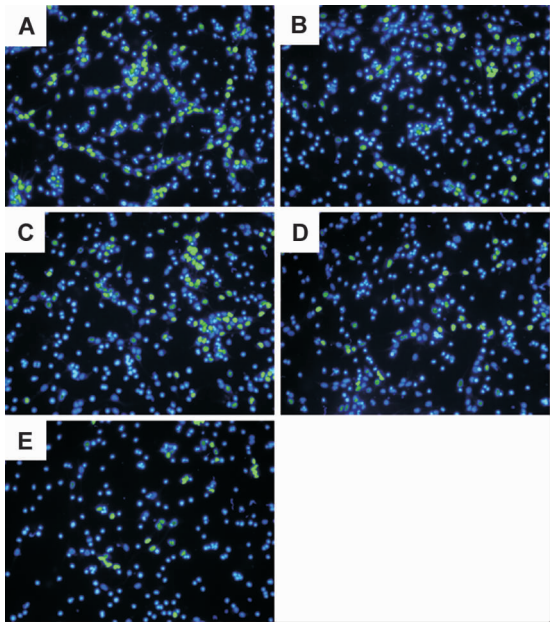


Fig.2 Effect of PFOS on proliferation of neural stem cells by Edu immunofluorescence staining (green) and DAPI immunofluorescence staining ($\times 200$). See Tab.1 for the cell treatment. A: normal control group; B: 0.1%DMSO group; C-E: PFOS 10, 50 and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group, respectively.

2.3 全氟辛烷磺酸对神经干细胞基因表达的影响

表 2 结果显示,与正常对照组相比,经 PFOS 处理后的神经干细胞 Stat3 基因的表达显著下降($P < 0.05$),Sox2 和 Notch1 基因的表达无明显差异。

Tab.2 Effect of PFOS on mRNA expression of Stat3, Sox2 and Notch1 by qPCR

Group	Stat3 mRNA	Sox2 mRNA	Notch1 mRNA
Normal control	1.56 ± 0.15	1.14 ± 0.26	0.76 ± 0.18
0.1%DMSO	1.96 ± 0.89	0.96 ± 0.79	0.91 ± 0.28
PFOS 10	$1.08 \pm 0.42^*$	1.07 ± 0.53	0.74 ± 0.22
50	$0.94 \pm 0.25^*$	0.84 ± 0.41	0.67 ± 0.21
100	$0.96 \pm 0.13^*$	0.81 ± 0.31	0.89 ± 0.41

See Tab. 1 for the cell treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, compared with normal control group.

2.4 全氟辛烷磺酸对神经干细胞 p-Stat3 和 Stat3 蛋白表达的影响

Western 蛋白质印迹检测结果显示(表 3 和图 3),与对正常对照组相比,PFOS 处理组 p-Stat3 蛋白相对表达均显著降低,且差异具有显著意义($P < 0.05$),但 Stat3 蛋白表达无改变。

Tab.3 Effect of PFOS on p-Stat3 and Stat3 protein expression

Group	Protein expression($IA_{\text{Target protein}} : IA_{\beta\text{-Actin}}$)	
	p-Stat3	Stat3
Normal control	1.26 ± 0.26	1.09 ± 0.18
0.1%DMSO	1.28 ± 0.35	1.09 ± 0.15
PFOS 10	0.92 ± 0.04 *	0.97 ± 0.06
50	0.80 ± 0.20 *	0.94 ± 0.19
100	0.76 ± 0.16 *	1.01 ± 0.14

See Tab. 1 for the cell treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, compared with normal control group.

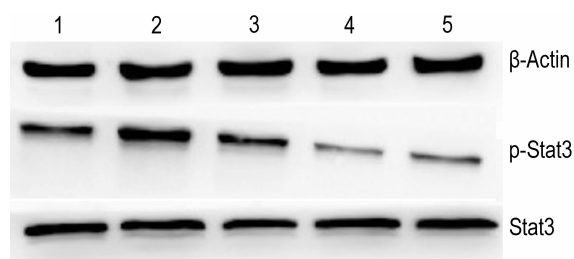


Fig.3 Effect of PFOS on p-Stat3 and Stat3 expressions by Western blotting. See Tab. 1 for the cell treatment. Lane 1: normal control; lane 2: 0.1% DMSO; lane 3 – 5: PFOS 10, 50 and 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group for 24 h, respectively.

2.5 全氟辛烷磺酸对神经干细胞迁移的影响

Transwell 结果显示(表 4 和图 4),与正常对照组相比,PFOS 处理组的神经干细胞迁移数量均显著降低($P < 0.01$),并随着 PFOS 浓度增加,迁移率有逐渐降低的趋势。

Tab.4 Effect of PFOS on migration of neural stem cells

Group	Number of cells with migration
Normal control	416 ± 8
0.1%DMSO	405 ± 15
PFOS 10	348 ± 10 **
50	296 ± 25 **
100	244 ± 23 **

See Tab. 1 for the cell treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ** $P < 0.01$, compared with normal control group.

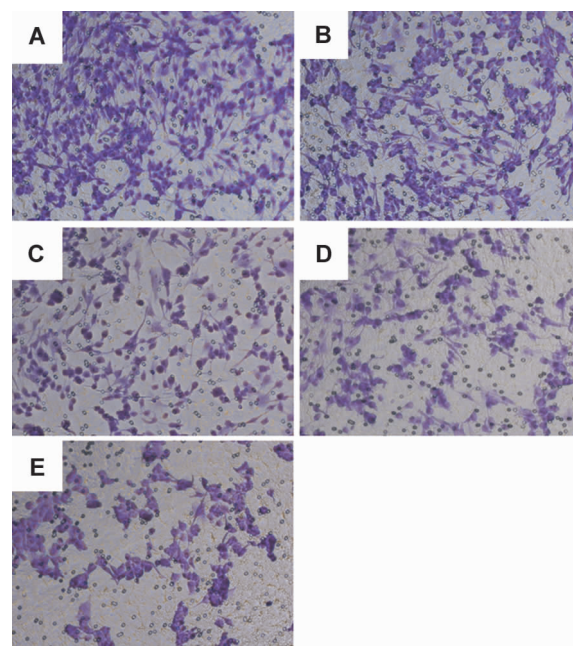


Fig.4 Effect of PFOS on migration of neural stem cells by Transwell (20 × 10). See Tab. 1 for the cell treatment. A: normal control B: 0.1% DMSO; C – E: PFOS 10, 50 and 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group, respectively.

3 讨论

本研究结果发现,PFOS 处理使 Stat3 mRNA 水平有所下降,p-Stat3 蛋白表达下降,但总 Stat3 的蛋白表达无改变;Transwell 检测的结果显示,神经干细胞的迁移被抑制。Stat3 mRNA 水平下降,但总 Stat3 蛋白水平不变的原因尚待进一步研究。总 Stat3 的蛋白表达水平不变,p-Stat3 蛋白下降,说明 PFOS 改变了翻译后磷酸化过程,PFOS 对神经干细胞增殖和迁移的抑制作用可能是通过分别抑制 Stat3 的转录过程和 Stat3 翻译后的磷酸化过程,从而改变 Stat3 基因在神经干细胞发育过程中的作用。有研究发现,PPAR γ 受体对神经干细胞的增殖过程有影响^[19],并且 Cimini 等^[20]提出了 PPAR γ 受体还对神经干细胞的迁移过程也具有某些影响作用,但是其具体机制仍还不清楚。通常情况下,PPAR γ 受体可以分为 Stat3, Wnt 及 NFkB 等信号通路,PPAR γ 受体可以通过 Stat3 通路和 Wnt 通路对 stat3 产生影响。PFOS 对神经干细胞的 Stat3 影响是否通过 PPAR γ 受体介导,需要进一步研究,但从本研究结果看,至少 PFOS 所致的 Stat3 翻译后磷酸化的改变不可能由 PPAR γ 受体介导。Sox 基因家族是由众多具有 HMG box 保守序列的基因构成的超基因家族,其编码的蛋白质具有结合 DNA 的能力,在维持神经干细胞的未分化状态的过程中

起着非常关键的作用^[21]。事实上, Sox 蛋白与 DNA 序列结合发挥作用主要取决于与其他转录因子的协同结合,也可以通过靶控基因和亚基起作用,而且 Sox2 蛋白表达与细胞环境有关,在不同细胞环境下, Sox2 表现的作用将会有所不同。而本研究发现 PFOS 对神经干细胞 Sox2 mRNA 表达无影响,可能 PFOS 并没有作用于 Sox2 的调控基因或调控因子。Notch 信号通路是受体和配体双分子间的相互作用,这个通路会对细胞发育的多种结果产生影响,其中包括细胞的增殖、分化、凋亡、迁移以及血管的再生等过程^[22]。在某些情况下, Notch 活化将促进神经干细胞自我再生^[23]。而在另一些环境下,将会促使神经干细胞向星形胶质细胞方向分化^[24-25]。本研究发现, Notch mRNA 表达水平没有发生改变。因此, PFOS 可能并不影响神经干细胞 Notch 基因与蛋白的表达。本研究尚存在一些不足,未观察 PFOS 对神经干细胞分化的影响,仅进行 PFOS 急性短时间暴露研究, PFOS 影响神经干细胞迁移作用的具体机制有待进一步验证。

本研究发现, PFOS 对神经干细胞的增殖和迁移均产生影响,其机制可能为分别抑制 Stat3 的转录过程和 Stat3 翻译后的磷酸化过程。

参考文献:

- [1] Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings [J]. *Toxicol Sci*, 2007, **99**(2):366-394.
- [2] Lau C, Thibodeaux JR, Hanson RG, Narotsky MG, Rogers JM, Lindstrom AB, *et al*. Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse[J]. *Toxicol Sci*, 2006, **90**(2):510-518.
- [3] Luebker DJ, Case MT, York RG, Moore JA, Hansen KJ, Butenhoff JL. Two-generation reproduction and cross-foster studies of perfluorooctanesulfonate (PFOS) in rats[J]. *Toxicology*, 2005, **215**(1-2):126-148.
- [4] Luebker DJ, York RG, Hansen KJ, Moore JA, Butenhoff JL. Neonatal mortality from *in utero* exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters [J]. *Toxicology*, 2005, **215**(1-2):149-169.
- [5] Zhang L, Li YY, Zeng HC, Li M, Wan YJ, Schluesener HJ, *et al*. Perfluorooctane sulfonate induces apoptosis in N9 microglial cell line[J]. *Int J Toxicol*, 2011, **30**(2):207-215.
- [6] Wan Ibrahim WN, Tofighi R, Onishchenko N, Rebellato P, Bose R, Uhlén P, *et al*. Perfluorooctane sulfonate induces neuronal and oligodendrocytic differentiation in neural stem cells and alters the expression of PPAR γ *in vitro* and *in vivo*[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, **269**(1):51-60.
- [7] Ihle JN. STATs: signal transducers and activators of transcription[J]. *Cell*, 1996, **84**(3):331-334.
- [8] Burdon T, Chambers I, Stracey C, Niwa H, Smith A. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells[J]. *Cells Tissues Organs*, 1999, **165**(3-4):131-143.
- [9] Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3 [J]. *Genes Dev*, 1998, **12**(13):2048-2060.
- [10] Ihle JN. The Stat family in cytokine signaling[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, **13**(2):211-217.
- [11] Rattigan Y, Hsu JM, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu [J]. *Exp Cell Res*, 2010, **316**(20):3417-3424.
- [12] Lin J, Wang X, Dorsky RI. Progenitor expansion in apc mutants is mediated by Jak/Stat signaling [J]. *BMC Dev Biol*, 2011, **11**:73.
- [13] Hirano T, Ishihara K, Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors [J]. *Oncogene*, 2000, **19**(21):2548-2556.
- [14] Rajan P, McKay RD. Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS [J]. *J Neurosci*, 1998, **18**(10):3620-3629.
- [15] Gu F, Hata R, Ma YJ, Tanaka J, Mitsuda N, Kumon Y, *et al*. Suppression of Stat3 promotes neurogenesis in cultured neural stem cells[J]. *J Neurosci Res*, 2005, **81**(2):163-171.
- [16] Trudel D, Horowitz L, Wormuth M, Scheringer M, Cousins IT, Hungerbühler K. Estimating consumer exposure to PFOS and PFOA [J]. *Risk Anal*, 2008, **28**(2):251-269.
- [17] Slotkin TA, MacKillop EA, Melnick RL, Thayer KA, Seidler FJ. Developmental neurotoxicity of perfluorinated chemicals modeled *in vitro*[J]. *Environ Health Perspect*, 2008, **116**(6):716-722.
- [18] Kang SK, Cha SH, Jeon HG. Curcumin-induced histone hypoacetylation enhances caspase-3-dependent glioma cell death and neurogenesis of neural progenitor cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2006,

- 15(2):165-174.
- [19] Wada K, Nakajima A, Katayama K, Kudo C, Shibuya A, Kubota N, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma – mediated regulation of neural stem cell proliferation and differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281**(18):12673-12681.
- [20] Cimini A, Cerù MP. Emerging roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the regulation of neural stem cells proliferation and differentiation[J]. *Stem Cell Rev*, 2008, **4**(4):293-303.
- [21] Shi Y, Sun G, Zhao C, Stewart R. Neural stem cell self-renewal [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, **65**(1):43-53.
- [22] Falk R, Falk A, Dyson MR, Melidoni AN, Parthiban K, Young JL, *et al.* Generation of anti-Notch antibodies and their application in blocking Notch signalling in neural stem cells[J]. *Methods*, 2012, **58**(1):69-78.
- [23] Mizutani K, Yoon K, Dang L, Tokunaga A, Galiano N. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. *Nature*, 2007, **449**(7160):351-355.
- [24] Grandbarbe L, Bouissac J, Rand M, Hrabé de Angelis M, Artavanis-Tsakonas S, Mohier E. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process[J]. *Development*, 2003, **130**(7):1391-1402.
- [25] Scheer N, Groth A, Hans S, Campos-Ortega JA. An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina [J]. *Development*, 2001, **128**(7):1099-1107.

Effect of perfluorooctane sulfonate on proliferation and migration of neural stem cells of rats

LIN Han*, GAO Ya-jing*, XU Min, MEI Hong-xia, LI Xiao-heng, LIAN Qing-quan
(Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on proliferation and migration of neural stem cells in rats, and explore the mechanism. **METHODS** Neural stem cells derived from the forebrain of rat E15 embryos were cultured *in vitro*. They were identified by neuroepithelial stem cell protein staining and treated with PFOS 10, 50 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h. Cell proliferation was analyzed by Edu staining. The mRNA expression level of Stat3, Sox2 and Notch1 of the samples was detected by qPCR. The protein expression level of phosphorylated and total Stat3 was measured by Western blotting. Cell migration ability of neural stem cells was tested by Transwell. **RESULTS** The primary neural stem cells were identified as neural stem cells. Compared with the control group, the positive rate of Edu staining of neural stem cells treated with PFOS was decreased, suggesting that PFOS was able to inhibit the proliferation of neural stem cells. The mRNA expression level of Stat3 related to appreciation and migration of neural stem cells was significantly reduced ($P < 0.05$). Western blotting analysis revealed that PFOS inhibited the protein expression level of phosphorylated Stat3 ($P < 0.05$) rather than that of total Stat3 ($P > 0.05$). In addition, PFOS also could inhibit the migration ability of neural stem cells. **CONCLUSION** PFOS can inhibit the proliferation and migration ability of neural stem cells *in vitro*, possibly by affecting the transcription and phosphorylation of the post-translation process of the Stat3 gene.

Key words: perfluorooctane sulfonate; neural stem cells; proliferation; migration; Stat3

Foundation item: The project supported by Program of Zhejiang Provincial Medical and Health Platform (2012ZDA037); Youth Talents Funding Program of Zhejiang Provincial Health Bureau of Traditional Chinese Medicine (2010ZQ011); and Qianjiang Talents Program of Zhejiang Provincial Science and Technology Bureau (2012R10073)

Corresponding author: LIAN Qin-quan, E-mail: lianqingquanmz@163.com

* Co-first authors.

(收稿日期: 2013-10-12 接受日期: 2014-01-31)
(本文编辑: 乔虹)