

罗格列酮对海马神经元树突发育的影响*

刘桂兰¹⁾ 鲍晓明²⁾ 陆周一¹⁾ 徐淑君^{1)**} 王钦文¹⁾

(¹⁾ 宁波大学医学院, 宁波 315211; ²⁾ 宁波市第二医院, 宁波 315010)

摘要 罗格列酮(rosiglitazone, Rosig.)是噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZDs)过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)的激动剂, 近年来, 临床研究发现其具有神经保护作用, 但对其作用机制目前仍没有完全研究清楚. 利用活细胞成像的方法, 观察罗格列酮对大鼠海马神经元树突丝和树突树发育的影响及其机制. 结果显示, 罗格列酮浓度依赖的增高神经元树突丝密度, 对树突丝长度、运动速度并没有影响. 此外, 罗格列酮也不影响树突树的总分支、总长度以及各级分支的数目和长度. PPAR γ 特异性拮抗剂 GW9662 完全阻断了罗格列酮介导的树突丝密度增高. 结果表明罗格列酮可能通过 PPAR γ 途径影响神经元的早期发育, 这可能是罗格列酮发挥神经保护作用的潜在机制.

关键词 神经元, 树突丝, 树突树, 发育, 罗格列酮, PPAR γ , GW9622

学科分类号 R338

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00527

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)是一类由配体激活的核受体, 其主要生物学功能表现为改善胰岛素抵抗, 调节糖、脂、能量代谢和抑制炎症基因表达^[1]. 罗格列酮(rosiglitazone, Rosig.)属于 PPAR γ 的噻唑烷二酮类(thiazolidinediones, TZDs)激动剂, 目前在临床上主要作为胰岛素增敏药, 被广泛用于治疗 2 型糖尿病^[2]. 2 型糖尿病患者常伴随学习、记忆衰退等认知功能障碍的发生^[3-5], 而在近年来的临床用药发现, 对 2 型糖尿病病人给予罗格列酮治疗除能改善其糖尿病的症状外, 还能改善其认知功能的缺损^[6-7], 而目前对罗格列酮的神经保护作用机制并不完全清楚.

海马是大脑边缘系统中与学习、记忆和认知功能相关的重要脑区^[8], 损伤海马神经元树突树复杂性、突触的形成, 都可能对学习记忆造成影响^[9]. 神经元发育过程中树突丝、树突分支的生长与神经元突触和树突树复杂性的形成密切相关^[10]. 在探索罗格列酮发挥神经保护作用的机制研究中, 对其在神经元早期发育中的作用研究甚少. 本研究运用活细胞成像技术, 观察罗格列酮对体外培养第 7 天

(7 days *in vitro*, DIV7)的大鼠海马神经元树突丝长度、密度、运动以及树突树的分支和长度的影响及其机制, 有助于了解罗格列酮在神经元树突发育过程中的作用, 为进一步研究罗格列酮改善神经系统中认知功能损伤的潜在作用机制提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料

胰酶 (trypsin)、DMEM、FBS、F-12、B27、Neurobasal、谷氨酰胺 (glutamine)、脂质体 2000 (Lipofectamine 2000)、OPTI-MEM、阿糖胞苷(cytosine

* 国家自然科学基金(30900430, 30970932), 教育部留学回国人员科研启动基金([2010]1561 号), 宁波市自然科学基金(2011A610065, 2009A610128), 浙江省教育厅创新团队项目(T200907), 宁波市创新团队项目(2009B21002), 宁波大学学科项目(XKL11D2114), 宁波大学研究生科研创新基金(G11JA029), 大学生科技创新计划(2010R405042)和宁波大学王宽诚幸福基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0574-87609594, E-mail: xushujun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2011-11-15, 接受日期: 2012-03-05

arabinofuranoside)、多聚赖氨酸(poly-D-lysine)购自 Invitrogen 公司; 罗格列酮(rosiglitazone)购自 Cayman 公司; GFP-actin、F-GFP 质粒由浙江大学医学院神经生物学研究室惠赠。

1.2 神经元原代培养

取第 1 天出生的 Wistar 大鼠海马回, 剥离脑膜并将组织剪碎, 在 0.25% 胰酶中消化 13 min, 用含 FBS 的 DMEM 培养基终止消化。加入适量含 10% F-12 和 10% FBS 的 DMEM 培养基轻轻吹打组织, 使其成密度为 $7 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液, 在每个 35 mm 培养皿中接种 2 ml (培养皿中放置已用多聚赖氨酸包被的 6 片小玻片), 于 37°C CO_2 孵箱中培养。培养 24 h 后, 用含 1% 谷氨酸和 2% B27 的神经基础培养基全量换液。之后每隔 3 天, 用 Neurobasal 培养基进行半量换液。在体外培养第 5 天(5 days *in vitro*, DIV5)加入终浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 的阿糖胞苷以抑制胶质细胞生长。

1.3 神经元转染

神经元转染参照文献[11, 12]。在 DIV5, 将 OPTI-MEM 与 Lipofectamine 2000 以 250 μl : 4 μl 的比例混匀, 室温静置 5 min 后加入每 250 μl 含 1 μg GFP-actin 和 1 μg F-GFP 质粒的 OPTI-MEM, 室温避光静置 20 min。收集神经元的原培养液并用不含 Glutamate 和 B27 的 Neurobasal 培养基清洗 2 遍, 往每皿培养细胞中加入 1.5 ml 不含谷氨酸和 B27 的 Neurobasal 及 0.5 ml 孵育好的脂质体和质粒, 37°C 培养 3 h 后换回原神经元液培养。该转染方法对神经元的转染效率约为 5%, 可清楚地独立显示单个神经元的形态学细节。

1.4 药物处理

在 DIV 6, 对神经元分别给予 5、10 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 的罗格列酮处理, 孵育时间为 24 h。在用 PPAR γ 受体特异性拮抗剂的实验中, $5 \mu\text{mol/L}$ GW9662 与 $20 \mu\text{mol/L}$ 罗格列酮对神经元共同孵育 24 h。

1.5 图像获取和分析

1.5.1 神经元成像。在药物对神经元处理 24 h 后(DIV7), 将装载有培养神经元的小玻片置于含细胞外液(148.00 mmol/L NaCl, 3.00 mmol/L KCl, 3.00 mmol/L CaCl_2 , 10.00 mmol/L HEPES 和 8.00 mmol/L 葡萄糖, pH 7.3)的记录槽中, 在激光共聚焦显微镜下选择 488 nm 波长激发光和 60 $\times$ 油镜对表达绿色荧光蛋白的神经元进行 Timelapse 序

列扫描成像, 参数为: Interval, 30 s; Number, 11; Total time, 5 min; Resolution, 512×512 。成像过程确保将一个神经元拍摄到一个视野中, 若单次成像无法拍全神经元形态, 则采取多次变换位移成像以将神经元形态拍摄完全。

1.5.2 树突丝分析。所有树突丝用 Image J 软件进行长度测量, 树突丝尖端与树突干之间的距离定义为该树突丝的长度, 所有树突丝长度的平均值为该神经元树突丝长度的最终值; 记录神经元所有树突上的树突丝数目及相应树突干总长度, 以每 100 μm 树突干上的树突丝数量表示该神经元树突丝的密度。在树突丝运动分析中, 先用 Image J 软件对每个神经元的 11 帧照片进行水平位移校准, 然后用 Image-Pro Plus 5.1 软件对每根树突丝尖端在 11 帧照片中的位置进行描绘, 软件测量工具测量每根树突丝在每两张照片中(30 s)的运动速度, 树突丝尖端在 11 帧照片中(5 min)的平均运动速度定义为该树突丝的运动速度。

1.5.3 树突树分析。分析时参照 Havton 等^[13]的命名方式。直接从胞体伸出的树突干为一级分支, 从一级分支延伸出的为二级分支, 以此类推。所有树突分支用 Image J 软件测量其长度, 最终计算神经元树突树中各级树突分支的平均长度和个数以及所有分支的总长度和总分支个数。

1.6 数据统计

结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较时采用双尾学生 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 时认为两样本间差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 罗格列酮对原代培养海马神经元树突丝密度的影响

对 DIV7 各实验组树突丝密度结果显示, 罗格列酮浓度依赖的增高神经元树突丝密度(图 1): 对照组、5、10 和 $20 \mu\text{mol/L}$ 罗格列酮处理组神经元树突丝密度分别为 $(26.45 \pm 1.47)/100 \mu\text{m}$ ($n=21$)、 $(27.66 \pm 1.84)/100 \mu\text{m}$ ($n=20$)、 $(34.27 \pm 2.12)/100 \mu\text{m}$ ($n=21$) 和 $(37.75 \pm 2.09)/100 \mu\text{m}$ ($n=21$), 其中 10、 $20 \mu\text{mol/L}$ 罗格列酮处理组树突丝密度显著高于对照组($P < 0.05$), 而 $5 \mu\text{mol/L}$ 罗格列酮处理组树突丝密度和对照组相比没有显著性差异($P > 0.05$)。

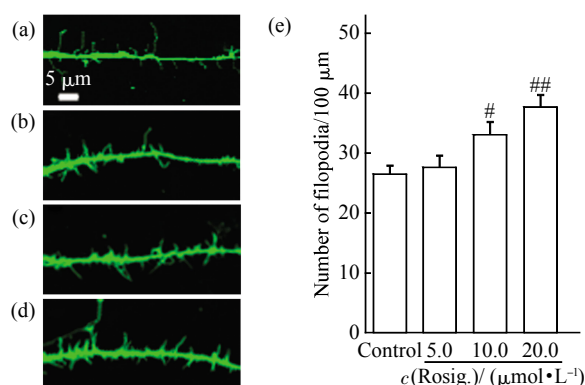


Fig. 1 Rosiglitazone increases the filopodia density in hippocampal neurons at DIV7 in a dose-dependent manner

Filopodial morphology was revealed by co-transfected F-GFP with GFP-actin. Primary cultured hippocampal neurons were incubated with rosiglitazone (Rosig.) for 24 h. (a~d) Representative image of dendrites from neurons treated with vehicle (a), 5 μmol/L Rosig. (b), 10 μmol/L Rosig. (c), 20 μmol/L Rosig. (d). (e) Quantitative comparison of the density of dendritic filopodia. [#] $P < 0.05$ vs vehicle-treated group, ^{##} $P < 0.01$ vs vehicle-treated group (two-tailed t -test).

2.2 罗格列酮对原代培养海马神经元树突丝长度和运动性的影响

对各实验组神经元树突丝长度和运动速度分析发现, 对照组, 5、10 和 20 μmol/L 罗格列酮处理组神经元树突丝长度分别为 $(2.68 \pm 0.17) \mu\text{m}$ ($n=21$)、 $(2.44 \pm 0.18) \mu\text{m}$ ($n=20$)、 $(2.72 \pm 0.22) \mu\text{m}$ ($n=21$) 和 $(2.24 \pm 0.15) \mu\text{m}$ ($n=21$), 罗格列酮各浓度处理组树突丝长度和对照组相比没有显著性差异(图 2a, $P > 0.05$). 对照组, 5、10 和 20 μmol/L 罗格列酮处理组神经元树突丝运动速度分别为 $(0.84 \pm 0.04) \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=21$)、 $(0.85 \pm 0.04) \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=20$)、 $(0.82 \pm 0.04) \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=21$) 和 $(0.89 \pm 0.04) \mu\text{m}/\text{min}$ ($n=21$), 罗格列酮各浓度处理组树突丝运动速度和对照组相比无显著性差异(图 2b, $P > 0.05$).

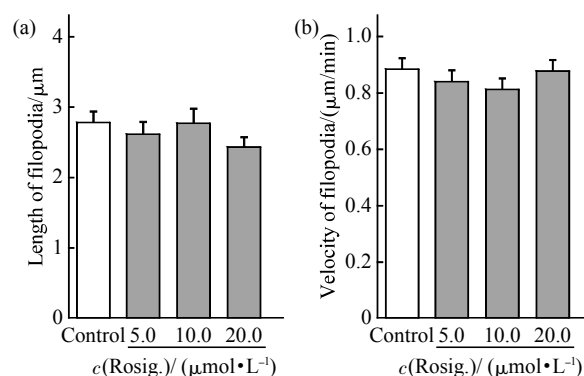


Fig. 2 Rosiglitazone does not alter the filopodia length and filopodia motility at DIV7

Primary hippocampal neurons were incubated with rosiglitazone (Rosig.) for 24 h. (a) Quantitative comparison of the length of dendritic filopodia. No significant difference was found among these groups. (b) Quantitative comparison of the motility of dendritic filopodia. No change was found after rosiglitazone treatment.

2.3 罗格列酮对原代培养海马神经元树突树发育的影响

我们进一步研究罗格列酮对神经元树突树发育的影响, 对照组, 5、10 和 20 μmol/L 罗格列酮处理组神经元树突树分支总长度分别为 $(429.10 \pm 25.17) \mu\text{m}$ ($n=37$)、 $(441.88 \pm 31.52) \mu\text{m}$ ($n=30$)、 $(434.64 \pm 23.95) \mu\text{m}$ ($n=33$) 和 $(439.56 \pm 31.13) \mu\text{m}$ ($n=32$). 罗格列酮各浓度处理组树突树分支总长度和对照组比较无显著性差异(图 3a~d, e; $P > 0.05$). 对照组, 5、10 和 20 μmol/L 罗格列酮处理组神经元树突树分支总个数分别为 (14.68 ± 0.91) ($n=37$)、 (13.93 ± 0.98) ($n=30$)、 (14.48 ± 0.93) ($n=33$) 和 (16.16 ± 1.30) ($n=32$). 罗格列酮各浓度处理组树突树分支总数目和对照组比较无显著性差异(图 3a~d, f; $P > 0.05$). 进一步对树突树各级分支的平均长度和平均个数进行分析发现, 罗格列酮处理后神经元树突树各级分支的平均长度和平均个数也均没有发生显著性变化(图 3g, h).

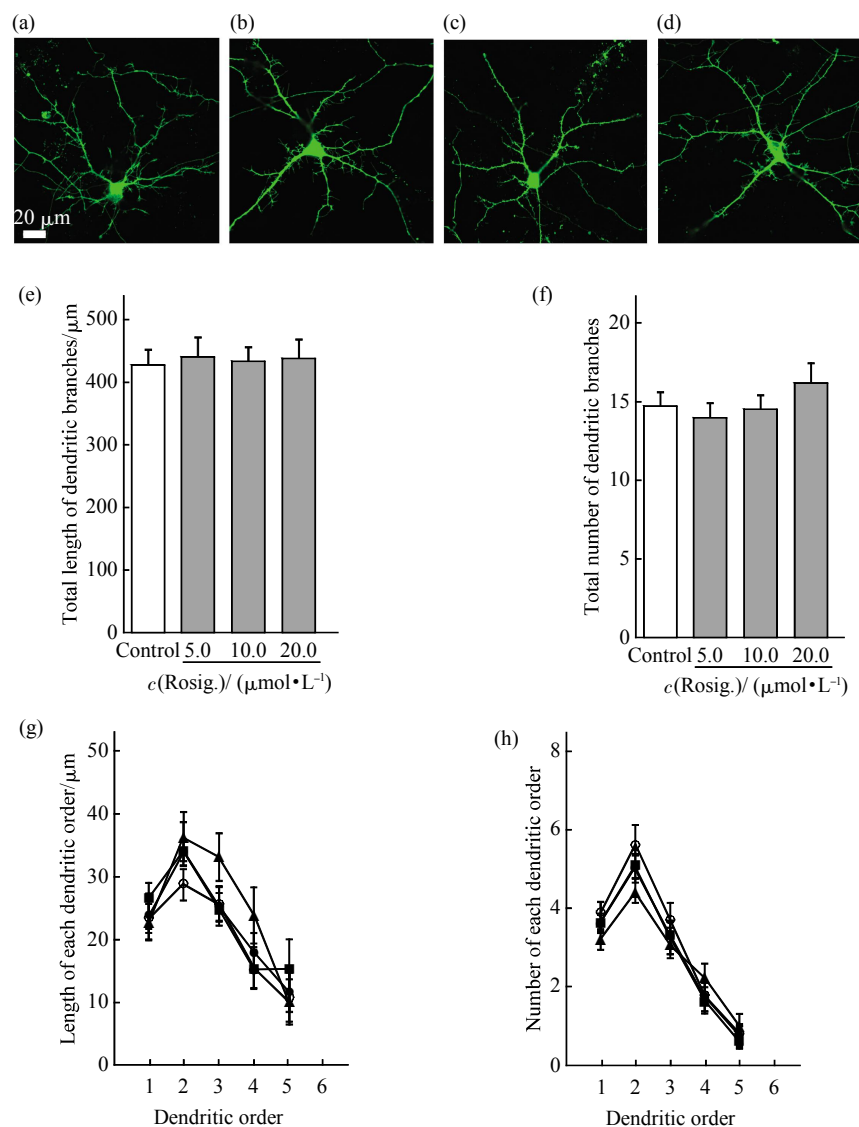


Fig. 3 Rosiglitazone does not alter the length and the number of dendritic branches

Primary hippocampal neurons were incubated with rosiglitazone (Rosig.) for 24 h. (a~d) Representative image of neurons treated with vehicle (a), 5 μmol/L Rosig. (b), 10 μmol/L Rosig. (c), 20 μmol/L Rosig. (d). (e) Quantitative comparison of the total dendritic length of neurons. No significant difference was found among these groups. (f) Quantitative comparison of the total number of dendritic branches. No change was found after rosiglitazone treatment. (g) Quantitative comparison of the average segment length for each dendritic order. Rosiglitazone treatment did not alter the length of each dendritic order either. (h) Quantitative comparison of the average number of each dendritic order. No significant difference was found among these groups. ●—●: Control; ▲—▲: 5 μmol/L Rosig.; ■—■: 10 μmol/L Rosig.; ○—○: 20 μmol/L Rosig..

2.4 GW9662 拮抗罗格列酮引起海马神经元树突丝密度的增加

为了研究罗格列酮是否为通过 PPAR γ 受体依赖途径产生促进神经元树突丝密度生长的作用, 我们将 5 μmol/L PPAR γ 特异性拮抗剂 GW9662 与 20 μmol/L 罗格列酮共同对神经元孵育 24 h, 分析 GW9662 对罗格列酮引起的树突丝密度增高的影响。

对照组, 20 μmol/L 罗格列酮处理组和 20 μmol/L 罗格列酮+5 μmol/L GW9662 处理组树突丝密度分别为 $(27.83 \pm 1.71)/100 \mu\text{m}$ ($n=16$), $(38.58 \pm 2.35)/100 \mu\text{m}$ ($n=16$) 和 $(27.86 \pm 1.75)/100 \mu\text{m}$ ($n=16$), 5 μmol/L GW9662 处理显著性地降低罗格列酮介导的树突丝密度增加(图 4, $P < 0.05$)。

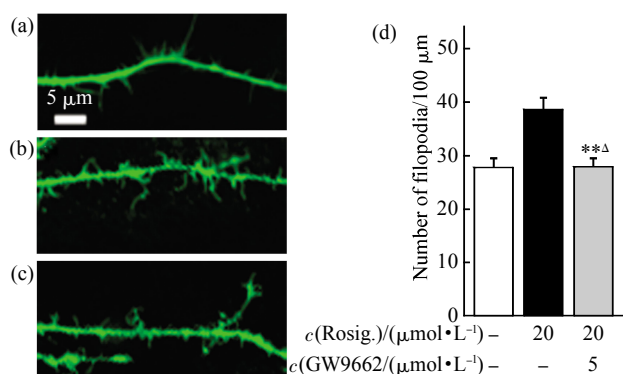


Fig. 4 GW9662 attenuates the increased effect of rosiglitazone on dendritic filopodia density at DIV7

Primary hippocampal neurons were incubated with 20 μmol/L rosiglitazone (Rosig.) in the presence or absence of 5 μmol/L GW9662 (PPAR γ antagonist) for 24 h. (a ~ c) Representative image of dendrites from neurons treated with vehicle (a), 20 μmol/L Rosig. (b), and 20 μmol/L Rosig. + 5 μmol/L GW9662 (c). (d) Quantitative comparison of the filopodia density among vehicle-treated group, Rosig. treated group, Rosig. and GW9662 co-incubated group. $**P < 0.01$ vs rosiglitazone-treated group, $^{\Delta}P > 0.05$ vs vehicle-treated group. (two-tailed *t*-test).

3 讨 论

树突是神经元间建立兴奋性突触联系、进行神经传递的重要场所。研究发现,大鼠的神经元在其出生后约一周即进入树突发育的关键阶段,该阶段早期树突的显著性特征之一表现在树突干上呈现众多细长结构的突起,即树突丝,这些树突丝主要以活跃的伸缩运动不断与周围环境中的轴突接触,启动早期的突触发育过程^[14]。树突丝被证实是成熟突触后部位结构-树突棘的前体,早期突触发育过程中树突丝的数目与成熟突触的形成数量具有重要的联系^[15]。本研究实验结果显示,罗格列酮以浓度依赖方式促进神经元树突丝密度的增长,这有可能是其进一步增加树突棘密度的原因^[16]。另外,树突丝的细长结构和运动性被认为是树突丝在启动突触发生过程中与周围环境进行接触的重要特征和必不可少的因素^[15, 17]。我们的研究结果显示,罗格列酮对DIV7神经元树突丝的长度和运动均没有影响,提示罗格列酮在神经元早期发育中促进树突丝密度增长的过程不影响树突丝长度和运动的正常特性。

发育早期神经元树突的另外显著性特征表现在

树突分支迅速生长,形成较为复杂的树突树网状结构。有研究表明,在神经元的树突发育过程中,树突丝参与树突树分支的形成^[10]。我们的研究结果显示,罗格列酮在促进神经元树突丝密度增长的同时并不影响神经元树突树分支的总长度和总个数。进一步的发现,罗格列酮对神经元各级分支的平均长度和平均个数也不产生影响。树突树的分支复杂度对决定神经元能否发挥正常细胞功能具有重要作用:树突分支的过度生长或总长度减短均可能影响神经元间的信号传递,最终影响不同脑区间的联系而导致精神发育迟缓或行为异常^[18]。本研究中,罗格列酮对海马神经元树突早期发育中树突树分支复杂度没有造成影响,提示所使用的罗格列酮浓度对神经元的发育没有产生潜在的神经毒性效应,将不影响神经元的正常发育。

罗格列酮是 PPAR γ 受体的 TZDs 类激动剂,人们普遍认为其主要通过激活 PPAR γ 途径发挥各样生物学功能,但近年也有研究者发现其通过 PPAR γ -非依赖途径发挥药理作用^[19]。为此,研究罗格列酮是否通过 PPAR γ 依赖途径促进神经元树突丝密度增长,对了解 PPAR γ 在罗格列酮发挥该生物学功能中的作用具有重要意义。我们的研究结果发现,PPAR γ 的特异性拮抗剂 GW9662 完全阻断了罗格列酮介导的树突丝密度增高,表明 PPAR γ 是罗格列酮促进神经元树突丝密度增长的作用靶点。

本研究结果发现,罗格列酮通过 PPAR γ 途径浓度依赖增加大鼠海马神经元树突丝的密度,提示罗格列酮可能通过激活 PPAR γ 途径促进树突丝的生长而影响早期的突触形成,从而发挥改善神经认知功能缺陷的功能,罗格列酮改善认知功能缺陷也可能与其可改善胰岛素抵抗的大鼠海马 Alzheimer 病样 tau 蛋白磷酸化水平有关^[20]。罗格列酮被证明能够通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)到达脑区^[21-22],但目前对其通过 BBB 的机制及具体渗透能力并不完全清楚。也因为体内 BBB 的存在以及罗格列酮在动物和人体中发挥药物效应的物种间差异,我们以大鼠为研究对象对罗格列酮进行的体外基础研究与该药物的临床研究会存在一定的差距,所以我们还是不能把本实验的研究结果直接推至该药物的临床效应,而该药物在中枢神经系统中的临床使用需要更深入的探讨,但本研究结果将对其用于临床治疗提供机制方面的指导。

目前,罗格列酮由于其心脏血管方面的不良

反应而在临床上被勒令谨慎用于治疗 2 型糖尿病, 但本研究结果除能证明罗格列酮具有促进树突丝生长的功能外, 还可表明 PPAR γ 可作为促进神经元早期发育的作用途径, 为了解 PPAR γ 其他激动剂可能存在的潜在生物学功能以及证明 PPAR γ 可能作为神经性疾病的潜在药物治疗靶点提供指导。另外, 也对了解以罗格列酮为改造对象的新型开发药物在神经发育方面的潜在作用提供依据, 同时本研究试验的罗格列酮浓度也为研究罗格列酮的其他神经保护作用提供体外浓度效应参考。

参 考 文 献

- [1] Landreth G, Jiang Q, Mandrekas S, *et al.* PPARgamma agonists as therapeutics for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 2008, **5**(3): 481-489
- [2] Berthet S, Olivier P, Montastruc J L, *et al.* Drug safety of rosiglitazone and pioglitazone in France: a study using the french pharmacovigilance database. *BMC Clin Pharmacol*, 2011, **11**(1): 5
- [3] Rizzo M R, Marfella R, Barbieri M, *et al.* Relationships between daily acute glucose fluctuations and cognitive performance among aged type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 2010, **33**(10): 2169-2174
- [4] Bruce D G, Davis W A, Casey G P, *et al.* Predictors of cognitive impairment and dementia in older people with diabetes. *Diabetologia*, 2008, **51**(2): 241-248
- [5] Fontbonne A, Berr C, Ducimetie're P, *et al.* Changes in cognitive abilities over a 4-year period are unfavourably affected in elderly diabetic subjects: results of the epidemiology of vascular aging study. *Diabetes Care*, 2001, **24**(2): 366-370
- [6] Abbatecola A M, Lattanzio F, Molinari A M, *et al.* Rosiglitazone and cognitive stability in older individuals with type 2 diabetes and mild cognitive impairment. *Diabetes Care*, 2010, **33**(8): 1706-1711
- [7] Ryan C M, Freed M I, Rood J A, *et al.* Improving metabolic control leads to better working memory in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2006, **29**(2): 345-351
- [8] Choi J H, Won M H. Microglia in the normally aged hippocampus. *Lab Anim Res*, 2011, **27**(3): 181-187
- [9] Ivy A S, Rex C S, Chen Y, *et al.* Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors. *J Neurosci*, 2010, **30**(39): 13005-13015
- [10] Portera-Cailliau C, Pan D T, Yuste R. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci*, 2003, **23**(18): 7129-7142
- [11] Ning W, Xu S J, Chiang H, *et al.* Effects of GSM 1800 MHz on dendritic development of cultured hippocampal neurons. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, **28**(12): 1873-1880
- [12] Xu S, Zhou S, Xia D, *et al.* Defects of synaptic vesicle turnover at excitatory and inhibitory synapses in Niemann-Pick C1-deficient neurons. *Neuroscience*, 2010, **3**(167): 608-620
- [13] Havton L A, Ohara P T. Quantitative analyses of intracellularly characterized and labeled thalamocortical projection neurons in the ventrobasal complex of primates. *J Comp Neurol*, 1993, **336**(1): 135-150
- [14] Ziv N E, Smith S J. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 1996, **17**(1): 91-102
- [15] Jontes J D, Smith S J. Filopodia, spines, and the generation of synaptic diversity. *Neuron*, 2000, **27**(1): 11-14
- [16] Brodbeck J, Balestra M E, Saunders A M, *et al.* Rosiglitazone increases dendritic spine density and rescues spine loss caused by apolipoprotein E4 in primary cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(4): 1343-1346
- [17] Arstikaitis P, Gauthier-Campbell C, Huang K, *et al.* Proteins that promote filopodia stability, but not number, lead to more axonal-dendritic contacts. *PLoS One*, 2011, **6**(3): e16998
- [18] Kaufmann W E, Moser H W. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex*, 2000, **10**(10): 981-991
- [19] Feinstein D L, Spagnolo A, Akar C, *et al.* Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key?. *Biochem Pharmacol*, 2005, **70**(2): 177-188
- [20] 胡蜀红, 杨 雁, 张建华, 等. 罗格列酮改善胰岛素抵抗大鼠海马 Alzheimer 病样 tau 蛋白磷酸化水平. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(5): 533-537
- [21] Hu S H, Yang Y, Zhang J H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(5): 533-537
- [22] Strum J C, Shehee R, Virley D, *et al.* Rosiglitazone induces mitochondrial biogenesis in mouse brain. *J Alzheimers Dis*, 2007, **11**(1): 45-51
- [23] 张凌红, 段雅乐, 李于博, 等. 罗格列酮在大鼠体内药理学及组织分布研究 (英文). *华东师范大学学报 (自然科学版)*, 2011, **4**: 104-114
- [24] Zhang L H, Duan Y L, Li Y B, *et al.* *J East China Normal University (Natural Science)*, 2011, **4**: 104-114

The Effect of Rosiglitazone on The Dendritic Development of Hippocampal Neurons*

LIU Gui-Lan¹⁾, BAO Xiao-Ming²⁾, LU Zhou-Yi¹⁾, XU Shu-Jun^{1)**}, WANG Qin-Wen¹⁾

(¹⁾ Medical School, Ningbo University, Ningbo 315211, China; ²⁾ The Second Hospital of Ningbo, Ningbo 315010, China)

Abstract Rosiglitazone, a PPAR γ thiazolidinediones (TZDs) agonist, has been proposed to have neuroprotective effects in the central nervous system (CNS). However, the mechanisms underlying the beneficial effects of rosiglitazone are unclear. In the present study, primary cultured hippocampal neurons of 1-day-old wistar rats were transfected with farnesylated enhanced green fluorescent protein (F-GFP) and GFP-actin on day 5 *in vitro* (DIV5) to display the morphological details of the dendrites and dendritic protrusions. Different doses of rosiglitazone (5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$) or 20 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone with the presence of 5 $\mu\text{mol/L}$ GW9662, an antagonist of PPAR γ , were applied to neurons for 24 h at DIV6. Live-cell imaging technology was used to investigate the effects of rosiglitazone on the development of dendritic filopodia and dendritic tree in hippocampal neurons at DIV7. Our results have shown that rosiglitazone increased the density of dendritic filopodia in a dose-dependent manner. The filopodia density of cultured neurons in 10 $\mu\text{mol/L}$ (34.27 ± 2.12)/100 μm , $n = 21$) and 20 $\mu\text{mol/L}$ (37.75 ± 2.09)/100 μm , $n = 21$) rosiglitazone treated group was significantly increased compared with those of control group (26.45 ± 1.47)/100 μm , $n = 21$), but the filopodia density of cultured neurons in 5 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone treated group (27.66 ± 1.84)/100 μm , $n = 20$) was not significantly altered compared with those of control group. Rosiglitazone treatment of 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ concentrations has no effect on the length and motility of dendritic filopodia. In addition, neither the length nor the number of dendritic branches was altered by treatment of 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone. 5 $\mu\text{mol/L}$ GW9662 attenuated the increased filopodia density induced by 20 $\mu\text{mol/L}$ rosiglitazone. These results suggest that rosiglitazone may affect the initial stage of hippocampal neuron development through the PPAR γ pathway. This may be a possible mechanism of the neuroprotective effects of rosiglitazone.

Key words hippocampal neuron, filopodia, dendritic tree, development, rosiglitazone, PPAR γ , GW9622

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00527

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30900430, 30970932), The Project-sponsored by SRF for ROCS, SEM ([2010]1561), Ningbo Natural Science Foundation (2011A610065, 2009A610128), Innovative Research Team of Educational Commission of Zhejiang Province (T200907), Innovative Research Team of Ningbo (2009B21002), Disciplinarity Project of Ningbo University (XKL11D2114), Scientific Research Foundation of Graduate School of Ningbo University (G11JA029), Undergraduate Scientific and Technological Innovation Project (2010R405042) and The K.C.Wong Magna Fund in Ningbo University.

**Corresponding author.

Tel: 86-574-87609594, E-mail: xushujun@nbu.edu.cn

Received: November 15, 2011 Accepted: March 5, 2012