文章编号:1000-5404(2005)10-0945-03

论著

Id2在成年大鼠喙侧神经干细胞迁移流通道的表达

陈兴书[1],姚忠祥[1],刘建军[1],陈建芳[1],杨 辉[2],蔡文琴[1] (第三军医大学:[1]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038,[2]新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 明确Id2在成年大鼠脑内室管膜前下区(SVZa)、喙侧迁移流(RMS)、嗅脑(OB)3个不同区域内的表达模式。**方法** 用RT-PCR和免疫荧光染色的方法观察成年大鼠SVZa、RMS、OB 3个区域Id2的表达情况。**结果** 成年大鼠脑内SVZa、RMS、OB 3个区域Id2均有不同程度的表达,且在这3个部位中Id2在OB区表达最弱,在SVZa表达较强,在RMS表达最强。**结论** 确立Id2在成年大鼠SVZa、RMS、OB 3个区域的表达模式,提示Id2可能对成年SVZa神经干细胞的增殖和定向分化起到一定的调节作用。

关键词: 神经干细胞;Id2;喙侧迁移流
中图法分类号: R322.81; R329.21; R394.2 **文献标识码:** A

Expression of inhibitor of DNA binding-2 in the pathway of rostral migratory stream of adult rat brain

CHEN Xing-shu[1], YAO Zhong-xiang[1], LIU Jian-jun[1], CHEN Jian-fang[1], YANG Hui[2], CAI Wen-qin[1] ([1]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, [2]Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the expression of inhibitor of DNA bingding-2 (Id2) in SVZa, RMS and OB area in adult rat brain. **Methods** To examine the expression of Id2 by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunofluorescence. **Results** Expression of Id2 was different in SVZa, RMS and OB in adult rat brain. Expression of Id2 showed the peak at the area of RMS, less in SVZa, the least in OB. **Conclusion** The different expression of Id2 in SVZa, RMS and OB area in adult rat brain indicates that Id2 may play an important role in the orienting differentiation and proliferation of neural stem cells (NSCs) derived from SVZa in adult rat brain.

Key words: neural stem cells; inhibitor of DNA binding-2; rostral migratory stream

近年来,位于侧脑室附近的室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)和海马被公认为成年哺乳动物神经系统中神经干细胞最为集中的部位[1,2]。研究表明,出生后嗅脑(olfactory bulb, OB)神经元终身更新来源于SVZa神经干细胞,此区神经干细胞产生后,沿喙侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)朝嗅脑方向迁移,在嗅脑的中央区再分别向周边的颗粒细胞层和球周细胞层迁移,分化形成颗粒细胞和球周细胞[3,4]。

Id(inhibitor of DNA binding)为碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)转录抑制因子,含有HLH结构域,但它与bHLH蛋白不同,缺乏结合DNA的碱性区域。最初的研究表明,Id蛋白一般在处于分裂期的肌肉前体细胞中合成,可调控细胞的分化发育,对细胞分化起抑制作用,在细胞分化的过程中该基因表达下降[5]。Id2为Id蛋白家族成员之一,在控制细胞分化和增殖过程中有重要作用,但Id2对SVZa神经干细胞增殖和分化有何作用及调控机制还不清楚。SVZa神经干细胞在向嗅球迁移的过程中受多种因素调控,如含bHLH结构域蛋白Mash1、细胞因子BMPs、Pax6等,但其具体的调控机制还不清楚,Id2是否在其调控中发挥作用还有待于进一步研究。因此本研究以成年大鼠为研究对象,应用免疫组化和RT-PCR技术,观察成年大鼠脑内SVZa、RMS、OB 3个不同区域的Id2的表达模式,初步探讨Id2对成年大鼠SVZa神经干细胞的增殖分化的可能作用,为进一步了解SVZa神经干细胞分化调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

实验动物采用Wistar成年大鼠24只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量(180±20)g。Id2抗体为Santa公司产品;FICT荧光二抗购自Jackson Immunoresearch公司。

基金项目: 国家自然科学基金资助重点项目(30130110),国家自然科学青年项目(30300463)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30130110) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars (30300463)
作者简介: 陈兴书(1980-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事细胞发育与分化调控方面的研究。电话:(023)68752231
通讯作者: 姚忠祥,电话:(023)68752231,E-mail: yaozhx@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2004-09-13;**修回日期:** 2004-12-15

1.2 RT-PCR

分别取成年大鼠 SVZa、RMS、OB 3 个不同区域的组织，采用 Tripure 试剂盒(Boehringer Mannherin 公司，德国)提取总 RNA。一步法 RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。反应体系总体积为 50 μl，DEPC 水 29 μl，AMV/Tfl 5×反应缓冲液 10 μl，dNTPs 1 μl，25 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl，β-actin 或 Id2 上下游引物各 2 μl，充分混匀，加入 AMV 逆转录酶 1 μl，Tfl DNA 聚合酶 1 μl，混匀后加入 2 μl (含 1.0 μg)RNA 模板。进行逆转录 PCR 扩增。Id2、β-actin PCR 引物由上海博亚生物技术公司合成，Id2 引物序列为：上游 5′-AGCCTTCAGTCCGGTGAGGTCC-3′；下游 5′-TCAGACGCCTGCAAGGACAGG-3′。β-actin 引物序列为：上游 5′-GAGGGAAATCGTGCGTGAC-3′；下游 5′-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-3′。反应条件为：48 ℃ 45 min，94 ℃始变性 2 min，94 ℃ 30 s，60 ℃ 1 min，68 ℃ 2 min，40 个循环，68 ℃终延伸 7 min；取 5 μl Id2 PCR 产物和 2 μl β-actin 产物在 2%琼脂糖凝胶中电泳，Bio-Rad 凝胶成像仪中照相记录并用 Quantity one 分析结果，Id2 及 β-actin 条带分别以面积×灰度表示，分析结果时以各组 Id2/β-actin(%)进行统计分析。

1.3 免疫荧光

1.3.1 冰冻切片的制备 成年大鼠以 3%戊巴比妥钠，按 1 ml/kg 麻醉。以 2.5% Zamboni's 液行左心室灌注，然后小心剥取鼠脑，注意保护好嗅球。鼠脑取出后，以 4%多聚甲醛，4 ℃后固定 24 h，30%蔗糖 4 ℃脱水。OCT 包埋，10 μm 连续冰冻切片。

1.3.2 免疫荧光染色及照相 以 0.05%多聚赖氨酸包被载玻片，将冰冻切片贴于载玻片上，0.01 mol/L PBS 漂洗干净，0.01 mol/L pH 6.0 柠檬酸三钠抗原微波修复，0.4% BSA/Tritonx-100 37 ℃孵育 30 min，入一抗 37 ℃孵育 2 h，转入 4 ℃冰箱过夜，FITC 荧光标记二抗 37 ℃孵育 4 h，0.01 mol/L PBS 漂洗干净，75%甘油封片。切片以 Olympus 荧光显微镜观察，数码照相机照相。各组均设阴性对照，阴性对照切片以 PBS 替代一抗，其余步骤相同。免疫荧光结果采用 Image-pro-plus 软件分析，每张切片随机选择 5 个具有代表性的视野，自动选取相同面积下的阳性区域并计算平均光密度值。

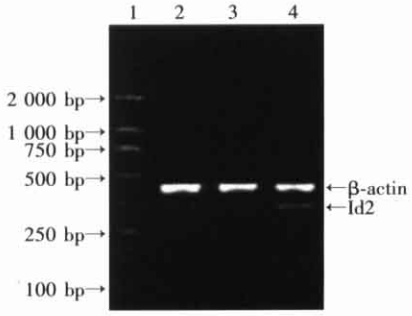
1.4 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 进软件行 t 检验。

2 结果

2.1 Id2 mRNA 在 SVZa-RMS-OB 通道中的表达

Id2 扩增片断长 350 bp，β-actin 为 445 bp。SVZa、RMS 和 OB 这 3 个区域细胞内都不同程度的表达 Id2 mRNA(图 1)。为减少实验误差，以 β-actin 为参照，用 SVZa、RMS 和 OB 区 Id2 mRNA 光密度值/β-actin 光密度值(%)来表示 Id2 mRNA 水平，结果经统计学分析进行两两比较有显著性差别($P < 0.01$)。结果表明，Id2 mRNA 在 RMS 区的表达最强，在 SVZa 表达较强，在 OB 区表达最弱。



1：DL2000 DNA marker；2：SVZa；3：OB；4：RMS

图 1 成年大鼠脑内各区域 Id2 mRNA 的表达

Fig 1 Expression of Id2 mRNA in different areas of adult rat brain

2.2 Id2 蛋白表达的免疫荧光分析

免疫荧光染色结果显示，Id2 蛋白主要在细胞核内表达，少数细胞的胞浆内也有表达。在 SVZa 区可见 Id2 表达阳性细胞数量较多但面积小；在 RMS 区，阳性细胞多面积较大，阳性细胞排列紧密；而在 OB 区阳性细胞面积较大但数量稀少。经统计学分析进行两两比较有显著性差别($P < 0.01$)。结果表明，Id2 在 RMS 区的表达最强；在 SVZa 表达较强；在 OB 区表达最弱。在 OB 颗粒细胞层细胞突起内有较强表达，而且嗅球腹侧边缘在部分胶质细胞样细胞中表达，见图 2。



A，B，C：Id2 positive cells in OB，RMS，SVZa

图 2 免疫荧光显示 SVZa、RMS、OB 3 个区域 Id2 阳性细胞 (Immunofluorescence × 100)

Fig 2 Positive Id2 cells in SVZa，RMS，OB areas (Immunoflunofluorescence × 100)

3　讨论

目前，位于侧脑室附近的室管膜下区是公认的成年哺乳动物神经系统中神经干细胞最为集中的部位之一，与其它部位的神经干细胞相比，SVZa 的神经干细胞还具有以下特点[6,7]：①迁移途径明确，形成 SVZa-RMS-OB 迁移流。②迁移过程中始终保持增殖状态和神经元前体细胞的特征而不进一步分化。③到达迁移终点后，才分化为成熟神经元。

Id2 基因的表达具有如下特征[8]：由于 Id 蛋白的核定位受 E 蛋白介导的分子伴侣机制的调节，在分化早期有从核内迁移到胞质的现象。E47 能诱导 Id2 的核内表达，Id2 分化早期从核内迁移到胞质很可能是由于 E47 和 B 型 bHLH 结合后 E47 下调，E47 下调从而使得 Id2 从核内迁移到胞质。

Wang 等[9]研究证明 Id2 对少突胶质细胞的发育有重要作用，抑制少突胶质细胞的分化，在分化的过程中该基因表达下降。神经干细胞从室管膜区产生后聚集于 SVZa 区，可能经过初步的分化然后向嗅球方向迁移。本实验中，RT-PCR 显示成年大鼠 SVZa、RMS 和 OB 3 个区域均有 Id2 mRNA 的表达，其表达水平与免疫荧光技术结果相一致，即 Id2 在嗅球的表达最弱，在 SVZa 区的表达较强，而在 RMS 主干部分的表达水平最强。Id2 在 RMS 的高表达可能起抑制细胞进一步分化的作用。SVZa 区的神经元前体细胞迁移到嗅球后才分化为成熟神经元，此时 Id2 的低水平表达可能与细胞发生分化密切相关。

我们还观察到 Id2 在 SVZa 区、RMS 区主要局限于细胞核内表达，在 OB 区细胞部分在胞质内表达。Id2 在核内和核外可能通过不同的途径起作用[10]。当在促细胞分裂剂存在的情况下，pRb 磷酸化释放与其结合的 E2F 使细胞进入细胞周期而增殖，当 Id2 被磷酸化进入胞核内与 E47 和未被磷酸化的 pRb 结合后从而抑制细胞分化。而当促细胞分裂剂不存在的情况下，pRb 又和 E2F 结合阻止细胞增殖；分化必需的 OligoD 和核内游离的 E47 和 pRb 结合从而使得 Id2 促进细胞分化。

我们在实验中观察到 bHLH 家族的 Mash1 在 OB 区表达增强(另文阐述)，这可能是由于和 E47 结合后使 E47 下调，从而使得 Id2 从核内迁移到胞质。我们还观察到 OB 区腹侧边缘有胶质细胞样细胞表达，其细胞特性和意义还需进一步证明。另有文献报道，Id2 受 BMP2 诱导后，Id2 对神经细胞分化的负向调控作用可能是通过抑制 Mash1 对神经干细胞的增殖、分化的影响来实现的[11,12]。Id2 在 SVZa-RMS-OB 通道不同区域表达高低与 SVZa 神经干细胞增殖、迁移、分化密切关联，Id2 究竟通过何种途径调控 SVZa 神经干细胞增殖、分化，SVZa 神经干细胞在通过 RMS 迁移到 OB 的过程中 Id2 和其它调控基因的关系如何还需更深入的研究。

参考文献：

[1] Pencea V, Bingaman K D, Freedman L J, *et al*. Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain[J]. Exp Neurol, 2001, 172(1): 1 - 16.

[2] Vescovi A, Gritti A, Cossu G, *et al*. Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential[J]. Cells Tissues Organs, 2002, 171(1): 64 - 76.

[3] Corotto F S, Henegar J A, Maruniak J A, *et al*. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain[J]. Neurosci Lett, 1993, 149(2): 111 - 114.

[4] Law A K, Pencea V, Buck C R, *et al*. Neurogenesis and neuronal migration in the neonatal rat forebrain anterior subventricular zone do not require GFAP-positive astrocytes[J]. Dev Biol, 1999, 216(2): 622 - 634.

[5] Norton J D. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis[J]. J Cell Sci, 2000, 113 (Pt 22): 3897 - 3905.

[6] Bedard A, Levesque M, Bernier P J, *et al*. The rostral migratory stream in adult squirrel monkeys: contribution of new neurons to the olfactory tubercle and involvement of the antiapoptotic protein Bcl-2[J]. Eur J Neurosci, 2002, 16(10): 1917 - 1924.

[7] Yang H, Mujtaba T, Venkatraman G, *et al*. Region-specific differentiation of neural tube-derived neuronal restricted progenitor cells after heterotopic transplantation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(24): 13366 - 13371.

[8] Deed R W, Armitage S, Norton J D. Nuclear localization and regulation of Id protein through an E protein-mediated chaperone mechanism[J]. J Biol Chem, 1996, 271(39): 23603 - 23606.

[9] Wang S, Sdrulla A, Johnson J E, *et al*. A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development[J]. Neuron, 2001, 29(3): 603 - 614.

[10] Lasorella A, Iavarone A, Israel M A. Id2 specifically alters regulation of the cell cycle by tumor suppressor proteins[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(6): 2570 - 2578.

[11] Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, *et al*. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(10): 5868 - 5873.

[12] Clement J H, Marr N, Meissner A, *et al*. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) induces sequential changes of Id gene expression in the breast cancer cell line MCF-7[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, 126(5): 271 - 279.

(编辑　龙　亮)