文章编号:1000-5404(2005)24-2403-03

论著

细胞因子信号抑制因子-2在成年大鼠喙侧神经干细胞迁移流通道的表达

陈建芳[1],姚忠祥[1],陈兴书[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 400038,[2]新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 明确SOCS2在成年大鼠脑内喙侧神经干细胞迁移流内的表达模式。**方法** 用RT-PCR和原位杂交组织化学技术观察SOCS2在成年大鼠喙侧神经干细胞迁移流的SVZa、RMS、OB 3个区域的表达情况。**结果** 成年大鼠脑内SVZa、RMS、OB 3个区域SOCS2均有不同程度的表达,且在这3个部位中SOCS2在OB区表达最强,在SVZa表达次之,RMS表达较弱。**结论** SOCS2在成年大鼠SVZa、RMS、OB 3个区域均有表达但强度不同,提示SOCS2可能对成年SVZa神经干细胞的发育、迁移和定向分化起到一定的调节作用。

关键词: 神经干细胞;SOCS2;喙侧迁移流
中图法分类号: R322.81;R329.2;R394.2 **文献标识码:** A

Expression of suppressors of cytokine signaling-2 in the pathway of rostral migratory stream of neural stem cells in adult rat brain

CHEN Jian-fang[1], YAO Zhong-xiang[1], CHEN Xing-shu[1], YANG Hui[2], CAI Wen-qin[1] ([1]Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Chongqing 400038, [2]Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the expression of suppressors of cytokine signaling-2 (SOCS2) in the pathway of rostral migratory stream of neural stem cells in adult rat brain. **Methods** To examine the expression of SOCS2 in SVZa, RMS and OB area by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* hybridization technique. **Results** Expression of SOCS2 was different in SVZa, RMS and OB in adult rat brain. Expression of SOCS2 showed the peak at the area of OB, less in SVZa, the least in RMS. **Conclusion** The different expression of SOCS2 in SVZa, RMS and OB areas in adult rat brain indicates that SOCS2 may play an important role in the development, migration and orienting differentiation of neural stem cells derived from SVZa in adult rat brain.

Key words: neural stem cells; suppressors of cytokine signaling-2; rostral migratory stream

近年来随着对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)研究的不断深入,人们发现NSCs是一类具有多重分化潜能和自我更新能力的高度未分化细胞,广泛存在于哺乳动物的中枢神经系统,其中侧脑室附近的室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)被认为是哺乳动物神经系统中NSCs最为集中的部位之一[1,2]。研究表明SVZa的NSCs产生后,逐渐向嗅球(olfactory bulb, OB)迁移,是嗅球神经元更新的重要来源。NSCs在从SVZa迁移到OB的过程中形成一条高度局限的迁移通道——喙侧迁移流(rostral migratory stream, RMS),位于迁移流中的NSCs保持增殖状态和神经元特征而不进一步分化[3]。

细胞因子信号抑制因子-2(suppressors of cytokine signaling-2, SOCS2)是近年来发现的一种可被多种细胞因子诱导产生,对细胞因子信号通路具有负反馈调节作用的蛋白分子,参与多种细胞因子、生长因子和激素的信号调节[4]。最新研究表明SOCS2是神经元发育分化的重要调控因子,并且能促进NSCs向神经元而非胶质细胞方向分化[5,6],但SVZa的NSCs在迁移途中保持不分化状态是否有SOCS2参与作用,SOCS2是如何调控SVZa NSCs发育分化的?本研究应用RT-PCR技术和原位杂交技术,观察成年大鼠脑内喙侧NSCs迁移流通道的SVZa、RMS、OB 3个不同区域SOCS2的表达模式,初步探讨SOCS2对成年大鼠SVZa NSCs发育、迁移、分化的调控作用,为进一步研究SVZa NSCs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10只(第三军医大学实验

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(30130110),国家自然科学基金资助面上项目(30572364)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30130110) and the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30572364)
作者简介:陈建芳(1979-),女,广东省博罗县人,硕士研究生,主要从事神经干细胞发育与分化调控方面的研究。电话:(023)68752229
通讯作者:姚忠祥,电话:(023)68752231,E-mail: yaozhx@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-08-25;修回日期:2005-10-15

动物中心提供),雌雄不拘,体质量(180 ± 20)g。Tripure 试剂购自 Roch 公司;逆转录试剂盒、PCR 试剂购自 TaKaRa 公司;PCR marker 购自北京鼎国公司。SOCS2 原位杂交检测试剂盒由武汉博士德公司提供。

1.2 RT-PCR

分别取成年大鼠 SVZa、RMS、OB 3 个不同区域的组织,按 Tripure 试剂说明书快速提取总 RNA,使用紫外分光光度计定量。取 2 μg RNA 用逆转录试剂盒 42 ℃保温 1 h 制备 20 μl 体系的 cDNA。取 2 μl cDNA 模板进行 PCR 扩增。SOCS2、内参 β-actin 引物应用 Primer Premier 5.0 设计并交由北京赛百盛基因技术公司合成,引物序列分别为:SOCS2:上游 5′- AACCTGCGGATTGAGTACCAAGACG-3′;下游 5′-GTTAATGCTGAGTCGGCAGAAGTG- 3′,扩增产物长度为 237 bp;β-actin:上游 5′-GAGGGAAATCGTGCGTGAC-3′;下游 5′-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-3′,扩增产物长度为 450 bp。PCR 反应条件为:先 94 ℃变性 3 min,然后 94 ℃ 30 s,63 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环,最后 72 ℃终延伸 10 min;取 SOCS2 PCR 产物和 β-actin 产物各 5 μl 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 分析软件进行结果分析,SOCS2 及 β-actin 条带分别以"面积 × 灰度"表示,分析结果时以各组 SOCS2/β-actin 进行统计分析。

1.3 原位杂交组织化学

1.3.1 探针的合成 根据 GenBank 中大鼠 SOCS2 基因全序列,应用 Primer Premier 5.0 设计并经 BLAST 比对,由武汉博士德生物试剂公司合成 3 个高特异的寡核苷酸探针引物:引物 1:5′-TGGTACTGGGGAAGTATGACTGTTAATGAAGCCAA-3′;引物 2:5′-CATCTGATTGACTACTACGTTCAGATGTGCAAGGA-3′;引物 3:5′-CAGCACTTCTGCCGACTCAGCATTAACAAGTGTAC-3′。

1.3.2 冰冻切片的制备 成年大鼠以 3% 戊巴比妥钠,按 1 ml/kg 麻醉后以 2.5% Zambonis 液行左心室灌注,剥取鼠脑以 4% 多聚甲醛后固定 24 h,脱水后矢状面 10 μm 连续冰冻切片。所有器械、器皿、溶液均经去 RNA 酶处理。

1.3.3 原位杂交(*in situ* hybridization, ISH) 参照蔡文琴主编的《现代实用细胞与分子生物学实验技术》和原位杂交检测试剂盒说明书进行实验。设实验对照如下:阴性对照:①将切片用 RNA 酶预处理后杂交;②以不含探针的杂交缓冲液取代含探针的杂交液;阳性对照以地高辛标记的 NOS 探针代替 SOCS2 探针进行杂交。阳性结果为蓝紫色反应物。切片以 Olympus显微镜观察,数码照相机摄像。采用 LEICA 图形分析系统,每张切片随机选择 10 个具有代表性的视野,自动选取阳性区域并计算平均光密度值。

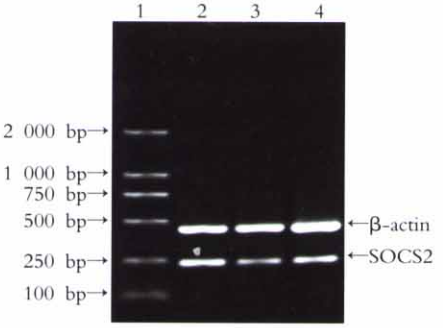
1.4 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用医学统计软件 SPSS 10.0 进行方差分析。

2 结果

2.1 SOCS2 mRNA 在 SVZa-RMS-OB 通道中的表达

SOCS2 扩增片断为 237 bp,β-actin 为 445 bp。SVZa、RMS 和 OB 3 个区域组织均不同程度表达 SOCS2 mRNA(图 1)。SOCS2 mRNA 表达水平用各组 SOCS2/β-actin 来表示。结果经统计学分析表明 3 个区域的 SOCS2 mRNA 表达水平有显著性差异($P < 0.05$),OB 区表达最强(0.73 ± 0.03),SVZa 表达次之(0.55 ± 0.02),RMS 区表达较弱(0.40 ± 0.02)。



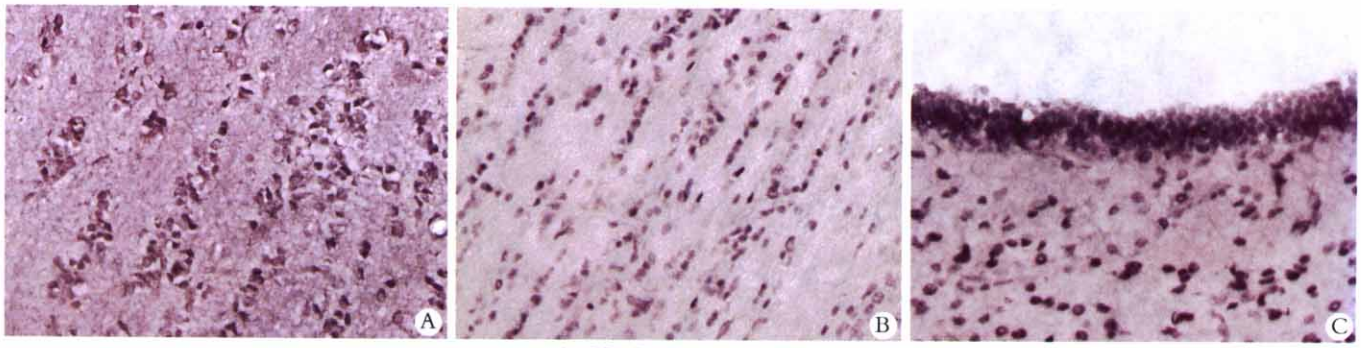
1: DL2000 DNA marker; 2: OB; 3: RMS; 4: SVZa

图 1 RT-PCR 显示成年大鼠脑内各区域 SOCS2 mRNA 的表达

Fig 1 Expression of SOCS2 mRNA in different areas of adult rat brain by RT-PCR

2.2 原位杂交组织化学

原位杂交组织化学结果显示,在喙侧迁移流通道的 3 个区域均可见 SOCS2 mRNA 阳性细胞。SOCS2 mRNA 在 OB 区有广泛表达,阳性信号有强有弱。特别是在颗粒细胞层、僧帽细胞层有强阳性信号,阳性细胞胞体较大,呈梭形或椭圆形,染色较深,胞质及胞核内均可见染成蓝紫色的阳性反应产物,胞核较大,部分胞核大而透亮。在 SVZa 区可见 SOCS2 mRNA 阳性细胞较 OB 区稀疏,细胞体积稍小。在 RMS 区,阳性细胞较局限,细胞呈长梭形,排列较紧密,首尾相接,在 SVZa 和 OB 间形成一条细胞链(图 2)。



A: OB; B: RMS; C: SVZa

图 2 原位杂交显示 OB、RMS、SVZa 3 个区域 SOCS2 mRNA 阳性细胞 (ISH × 400)

Fig 2 Positive SOCS2 mRNA cell in OB, RMS, SVZa areas by *in situ* hybridization (ISH × 400)

3　讨论

随着对 NSCs 研究的不断深入，近年来 NSCs 迁移分化的调控机制以及调控 NSCs 分化的内外环境因素成为研究的热点。有学者[5]研究发现在中枢神经系统内 SOCS2 主要在神经元中表达，并认为 SOCS2 可能是神经元分化的内在调控因子。我们在实验中观察到 SOCS2 mRNA 在 SVZa-RMS-OB 通道内的表达广泛尤其是在嗅球可见强阳性信号，SVZa 区也可见许多强阳性细胞，强阳性细胞胞体多较大，呈梭形或椭圆形，细胞核较大，且部分细胞核较大而透明，因此我们推测 SOCS2 作为一种细胞因子信号抑制因子，可能主要在神经元中表达，但不能排除亦存在于胶质细胞、神经元前体细胞等细胞中（我们进行的体外实验结果亦与之吻合，待发表）。体内外的研究表明过度表达 SOCS2 的 NSCs 集落更多的向神经元方向分化，而缺乏 SOCS2 则导致分化为神经元的数目减少而分化为胶质细胞的数目增加[7]。NSCs 分化为神经元还是胶质细胞取决于内外环境的相互作用[6,8]，多种调节 NSCs 分化的内在因素已经得到证实，包括 bHLH 基因如 NeuroD、Neurogenin 等，而外环境因素则包括多种 FGF 和 BMP 家族、PDGF 以及各种细胞因子如 LIF、CNTF 等，内外环境因素的相互作用可以调节神经生长基因的表达从而加强对 NSCs 分化命运的调节。有研究认为[9] SOCS2 的促 NSCs 向神经元分化的作用是通过抑制 GH 信号实现的，GH 信号是调节神经分化的重要因子，主要通过 JAK/STAT 信号转导途径发挥抑制神经元分化的效应，SOCS2 含有一个 SH2 结构域能和细胞因子受体结合从而阻断生长因子及细胞因子的下游信号途径如 JAK/STAT 信号通路，从而促进 NSCs 向神经元方向分化。

NSCs 存在于成年哺乳动物的室管膜区，NSCs 自室管膜周围产生后，一部分呈向大脑皮质投射形成皮质神经元，而位于 SVZa 区的 NSCs 则终生不停地以首尾相连接的链式模式朝嗅球迁移，成为嗅球神经元更新的重要来源，这部分 NSCs 的迁移形成了喙侧迁移流[10]。SVZa 的 NSCs 不仅迁移途径明确，形成明显的 SVZa-RMS-OB 迁移流通道，而且在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，在到达迁移终点后才分化成熟。本实验中，RT-PCR 显示成年大鼠 SVZa、RMS 和 OB 3 个区域均有 SOCS2 mRNA 的表达，其表达水平与原位杂交结果相一致，即 SOCS2 mRNA 在 OB 区表达最强，SVZa 区次之，RMS 区较弱。这种现象与 NSCs 从侧脑室周围产生、向嗅球迁移并逐步分化的过程是相吻合的。室管膜周围新生 NSCs 是原始细胞，具有多分化潜能，在 SVZa 区 NSCs 首先分化为神经元前体细胞，然后再向嗅球方向迁移，即室管膜周围新生的 NSCs 在 SVZa 区发生初步的定向分化，表现为此区域内 SOCS2 的较强表达，此次分化使 SVZa 的 NSCs 初步具备了神经元的特征，成为神经元前体细胞。SVZa 区的神经元前体细胞在向嗅球迁移时，始终保持增殖状态和神经元前体细胞特征而不进一步分化，SOCS2 在 RMS 区中的低表达有利于神经元前体细胞在向嗅球迁移过程中保持一种稳定状态。SVZa 区的神经元前体细胞迁移到嗅球后，进一步分化为成熟的神经元，体现在 SOCS2 的表达水平上，在嗅球为最强。SOCS2 在大鼠喙侧 NSCs 迁移流有表达且其表达具有特异性，在含有较多成熟神经元的区域如 OB 中表达强而在含有较多处于各个分化阶段的 NSCs 和神经元前体细胞的区域如 SVZa、RMS 中表达相对较弱，SOCS2 在 SVZa-RMS-OB 迁移流通道的表达强弱变化揭示了 SOCS2 与 SVZa NSCs 的发育、迁移和分化密切相关，可能参与了 SVZa 区 NSCs 的发育、迁移和分化调节。

综上所述，本研究初步探讨了 SOCS2 在成年大鼠喙侧 NSCs 迁移流的表达模式，为进一步研究 SOCS2 对神经元分化的调控机制以及对 SVZa 区 NSCs 的发育、迁移和分化调节作用奠定基础。

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] Galli R, Gritti A, Bonfanti L, *et al*. Neural stem cells : an overview [J]. Circ Res, 2003, 92 (6): 598 - 608.

[3] 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.

[4] Metcalf D, Greenhalgh C J, Viney E, *et al*. Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2[J]. Nature, 2000, 405(6790): 1069 - 1073.

[5] Wang L, Zhang Z, Zhang R, *et al*. Erythropoietin up-regulates SOCS2 in neuronal progenitor cells derived from SVZ of adult rat[J]. Neuroreport, 2004, 15(8): 1225 - 1229.

[6] Turnley A M, Faux C H, Rietze R L, *et al*. Suppressor of cytokine signaling 2 regulates neuronal differentiation by inhibiting growth hormone signaling[J]. Nat Neurosci, 2002, 5(11): 1155 - 1162.

[7] Ransome M I, Turnley A M. Analysis of neuronal subpopulations in mice over-expressing suppressor of cytokine signaling-2[J]. Neuroscience, 2005, 132(3): 673 - 687.

[8] Solecki D J, Liu X L, Tomoda T, *et al*. Activated notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation[J]. Neuron, 2001, 31(4): 557 - 568.

[9] Turnley A M. Role of SOCS2 in growth hormone actions[J]. Trends Endocrinol Metab, 2005, 16(2): 53 - 58.

[10] Menezes J R, Marins M, Alves J A, *et al*. Cell migration in the postnatal subventricular zone [J]. Braz J Med Biol Res, 2002, 35(12): 1411 - 1421.

（编辑　薛国文）