论著

文章编号:1000-5404(2006)16-1656-03

BMP-2在成年大鼠脑内SVZa-RMS-OB通路中的表达

刘建军[1],姚忠祥[1],陈兴书[1],蔡文琴[1],杨 辉[2] (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BMP-2在成年大鼠脑内,SVZa、RMS、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BMP-2的表达情况。**结果** RT-PCR检测在成年大鼠脑内SVZa、RMS、OB 3个区域BMP-2的mRNA均有不同程度的表达,其中OB区表达最高;免疫组化显示BMP-2蛋白在OB区表达也最高,但在SVZa区表达次之,RMS区表达最低。**结论** 确立BMP-2在成年大鼠SVZa、RMS、OB 3个区域的表达模式,提示BMP-2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: 骨形成蛋白2;嘴侧迁移流;表达

中图法分类号: R322.81;R329-33;R329.26 **文献标识码:** A

Expression of morphogenetic protein-2 in SVZa-RMS-OB way in adult rat brain

LIU Jian-jun[1], YAO Zhong-xiang[1], CHEN Xing-shu[1], CAI Wen-qin[1], YANG Hui[2] ([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 pattern of BMP2 in anterior subventricular zone (SVZa), rostral migratory stream (RMS), olfactory bulb (OB) area in adult rat brain. **Methods** The expression of BMP2 was examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunofluorescence. **Results** BMP-2 mRNA was expressed in all the SVZa, RMS and OB areas in adult rat brain, highest at OB area. The expression of BMP-2 proteins was higher at OB and SVZa than at RMS in adult rat brain. **Conclusion** The expression pattern of BMP2 in SVZa, RMS and OB in adult rat brain indicates that BMP2 may play an important role in orientation differentiation and migration of neural stem cell derived from SVZa in adult rat brain.

Key words: BMP-2; rostral migratory stream; expression

近年的研究认为室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)是成年神经干细胞(neural stem-cells, NSCs)比较集中的部位,此处NSCs是嗅脑球(olfactory bulb, OB)中间神经元终身更新的来源。SVZa NSCs产生后,将沿着一条高度局限的迁移通道-嘴侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)向OB迁移,达到迁移终点后分化为多巴胺能和GABA能神经元[1]。而对SVZa神经干细胞的增殖、迁移和分化的机制问题,目前的研究认为它们不仅受控于自身遗传因素,而且要受到多种细胞因子的影响,这些因子单独或协同作用参与其调控[2]。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是60年代中期发现的一类细胞因子,属于转化生长因子-β(TGF-β)超家族成员[3]。BMP-2是BMPs成员之一,不但对骨和软骨的发生具有促进作用,而且发现它参与了多种生命过程,如:调节细胞的生长、分化和凋亡等[4]。最新的研究表明BMP-2在神经系统的发生和神经干细胞的增殖、分化过程中均具有重要的调控作用,而其具体的调控机制至今少见报道。本实验以成年大鼠为研究对象,用免疫组化和RT-PCR,观察成年大鼠脑内SVZa、RMS、OB 3个不同区域的BMP-2的表达模式,试图初步探讨BMP-2对成年大鼠SVZa神经干细胞的增殖、迁移和分化的可能作用。

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(2月龄,体质量200 g,雌雄

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(30300463),国家自然科学基金资助重点项目(30130110)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30130110) and the Program for Young Scholars of the National Natural Science Foundation of China (30300463)

作者简介: 刘建军(1975-),男,湖南省武冈市人,博士,主要从事神经干细胞分化调控方面的研究。电话:(023)68752231, E-mail: sydljj@yahoo.com.cn

通讯作者: 姚忠祥,E-mail: yaozhx@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2005-09-07;**修回日期:** 2005-11-07

不拘），由第三军医大学实验动物中心提供。BMP-2 抗体为 Santa 公司产品；FICT 荧光二抗购自 Jackson Immunoresearch 公司，BMP-2 PCR 引物由申友公司合成。

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。取 3.0 μg RNA，加入 Oligo(dT)$_{15}$ 1.5 μg 加水至 15 μl 混匀，70 ℃保温 10 min，降至 20 ℃保温 10 min，然后加入 5 × AMV 反应缓冲液 8 μl，dNTPs 3 μl，RNA 酶抑制剂 1 μl(40 U)，AMV 3 μl，DEPC 水 10 μl 进行反转录，反转录体系的总体积为 40 μl，条件为 42 ℃ 60 min，取 2 μl 产物用 β-actin（大小为 308 bp）鉴定，PCR 反应条件为：94 ℃始变性 10 min，94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，30 个循环，72 ℃终延伸 10 min；取 2 μl逆转录产物进行 BMP-2 的 PCR 反应，条件为：94 ℃始变性 10 min，94 ℃ 30 s，45 ℃ 30 s，72 ℃ 45 s，30 个循环，72 ℃终延伸 10 min；取 10 μl PCR 产物（大小为 380 bp）于 2% 琼脂糖电泳。

BMP-2 引物设计如下：上游 5′-TCAATTTAAGTTCTGTCCCTACTG-3′；下游 5′-TCTTACCTGAGACCAGCTGTGTTCAT-3′。

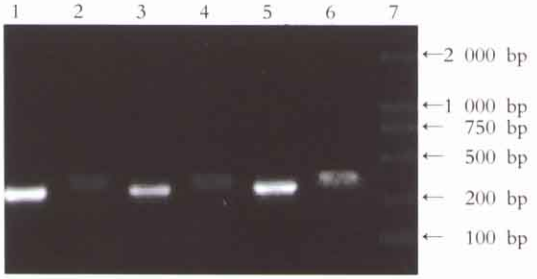
1.3　免疫组化

分别取成年大鼠全脑，zamboni's 液固定，30 % 蔗糖脱水，冰冻切片厚度 20 μm，微波修复，一抗 37 ℃孵育 2 h，4 ℃过夜，荧光二抗 37 ℃孵育 1 h，室温 3 h，甘油封片，荧光显微镜观察照相。

2　结果

2.1　BMP-2 mRNA 的表达

运用 RT-PCR 技术，对成年大鼠 SVZa，RMS 和 OB 3 个不同区域的 BMP-2 mRNA 进了检测，结果显示：这 3 个区域 BMP-2 mRNA 都有不同程度的表达。参考 β-actin 的表达量，我们得出初步的结果：BMP-2 的 mRNA 在 SVZa、RMS 两个区域表达稍低，在 OB 区表达量较高（图 1）。

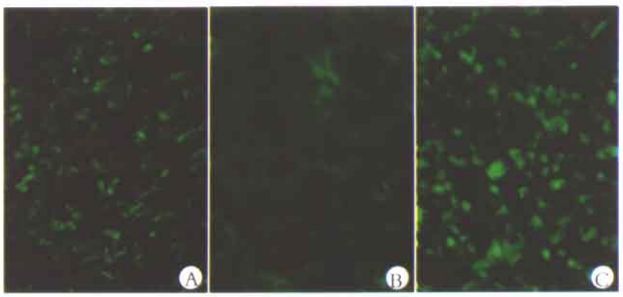


1、3、5：β-actin；2、4、6：分别为 SVZa、RMS、OB 3 个区域的 BMP-2 mRNA；7：DL2000 标准

图 1　成年大鼠脑内喙测迁移流各区域 BMP-2 mRNA 表达

2.2　BMP-2 蛋白的表达

运用免疫荧光染色技术，对成年大鼠 3 个不同区域的 BMP-2 表达进行检测，结果如图 2 所示：在 SVZa 区可见 BMP-2 阳性细胞，但在 RMS 区，阳性细胞就非常微少，而在 OB 区 BMP-2 阳性细胞较多，而且集中在嗅球边缘内侧（图 2）。根据测点计数法进行图像分析，数据显示 BMP-2 在 OB 区呈高水平表达（ +++ ），在 SVZa 区呈较高水平表达（ ++ ），而在 OB 区呈低水平表达（ + ）。



A：SVZa；B：RMS；C：OB

图 2　成年大鼠喙测迁移流各区域 BMP-2 蛋白的表达

（荧光显微镜 × 100）

3　讨论

在成年哺乳动物神经系统中，室管膜前下区（anterior subventricular zone，SVZa）是目前公认的神经干细胞最为集中的部位之一，与其他部位的神经干细胞相比，此处神经干细胞具有两个重要特征：在迁移过程中保持增殖状态和神经元前体细胞特性。在迁移终点进一步分化为多巴胺能和 GABA 能神经元。Luskin 研究认为：来源于 SVZa 的神经干细胞产生后，即沿着一条高度局限的迁移通道——嘴侧迁移流（rostral migratory stream，RMS）朝嗅脑迁移，在迁移终点退出细胞周期，分化成颗粒细胞和球周细胞，是出生后嗅脑（olfactory bulb，OB）中间神经元终身更新的主要来源[1,5]。而 SVZa 神经干细胞又是如何从最原始祖细胞逐步分化为多巴胺能和 GABA 能神经元？又是如何从 SVZa 区迁移至嗅球呢？目前也有相关的报道，如 pax6，wnt1，mash1 等，他们可能在 SVZa 神经干细胞的迁移和分化起着重要的调控作用[6]。

骨形成蛋白质（bone morphogenetic proteins，BMPs）是一种转化生长因子 β-（TGF-β）超家族成员，研究认为 BMPs 不但在诱导软骨和骨的形成过程中起着重要的作用，而且还参与了多种细胞和分子过程，如中胚层诱导、神经胚形成、细胞的凋亡、神经元分化等[4]。而最新的研究表明在神经系统发育的自始至终都有 BMPs 的表达，特别是在早期的神经脊细胞转移前后，神经管的形成及演变中，以及某些前体细胞向特定方向的成熟，细胞的凋亡等过程中，发挥重要作用[7,8]。Yang 等[9,10]在研究 BMPs 对 SVZa 神经干细胞分化影响的过程中发现 BMP-2 及其受体可能通过改变细胞周期因子 $P19^{INK4d}$ 的表达，在 Mash-1 和 Pax-6 的协同作用下使其分化为 TH 阳性的神经元。

本研究中，我们以 BMPs 家族中重要成员——BMP-2 为目标，观察 BMP-2 在成年大鼠 SVZa 神经干细胞迁移流通路上的表达规律，初步推测 BMP-2 可能在 SVZa 神经干细胞迁移和分化中的可能作用。结果显示：成年大鼠 SVZa、RMS 和 OB 3 个区域均有 BMP-2 mRNA 的表达，而免疫组化结果是 BMP-2 在嗅球的表达最高，在 SVZa 区的表达次之，而在 RMS 主干部分的表达水平则最低。BMP-2 的这种表达规律与 NSCs 从室管膜前下区产生、向嗅球迁移并逐步分化的过程密切相关，神经干细胞刚从室管膜周围产生的时候是多潜能的原始细胞，在 SVZa 区，首先进行一次初步的分化，成为神经元前体细胞，此时 BMP-2 较高水平的表达，有利于 SVZa 神经干细胞维持较高的分化和增值活性，同时使 SVZa 的 NSCs 初步具备了神经元的特征；而 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，此时 BMP-2 的低表达也许有利于神经元前体细胞在向嗅球迁移过程中保持一种稳态。当 SVZa 区的神经元前体细胞迁移到嗅球后，将最终分化为成熟的多巴胺能和谷氨酰胺能神经元，体现在嗅球 BMP-2 为高水平表达。因此我们推测 BMP-2 可能有利于 SVZa 神经干细胞的增殖和分化，而对其迁移可能影响不大。

BMP-2 功能的实现，依赖于其信号途径中两类受体：BR Ⅰ和 BR Ⅱ，BR Ⅰ又分为 BR ⅠA 和 BR ⅠB 两种亚类，它们均属于丝氨酸/苏氨酸激酶受体，表达于细胞表面，与相应的配体结合后，介导或调节各种细胞的生物学效应[11-13]。就本实验的研究结果看来，BMP-2 影响 SVZa 神经干细胞的增殖和分化，但其具体机制还需进一步的实验研究。

参考文献：

[1] COSKUN V, LUSKIN M B. Intrinsic and extrinsic regulation of the proliferation and differentiation of cells in the rodent rostral migratory stream [J]. Neurosci Res, 2002, 69(6): 795-802.

[2] WORDINGER R J, AGARWAL R, TALATI M, *et al*. Expression of bone morphogenetic proteins (BMP), BMP receptors, and BMP associated proteins in human trabecular meshwork and optic nerve head cells and tissues [J]. Mol Vis, 2002, 8: 241-250.

[3] WESTON A D, ROSEN V, CHANDRARATNA R A, *et al*. Regulation of skeletal progenitor differentiation by the BMP and retinoid signaling pathways [J]. J Cell Biol, 2000, 148 (4): 679-690.

[4] REDDI A H. Bone and cartilage differentiation [J]. Curr Opin Genet Dev, 1994, 4 (5): 737-744.

[5] MUJTABA J, MAYER-PROSCHEL M, RAO M S. A common neural progenitor for the CNS and PNS [J]. Dev Biol, 1998, 200(1): 1-15.

[6] 邱克军，蔡文琴，姚忠祥，等. Pax-6 在大鼠发育脑喙侧神经干细胞迁移流中的表达[J]. 解剖学报, 2004, 35 (3): 262-267.

[7] HOGAN B L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development [J]. Genes Dev, 1996, 10(13): 1580-1594.

[8] PERETTO P, CUMMINGS D, MODENA C, *et al*. BMP mRNA and protein expression in the developing mouse olfactory system [J]. J Comp Neurol, 2002, 451(3): 267-278.

[9] YANG H. The migration and differentiation of neuron restricted precursors following transplantation into the CNS [J]. Soc Neurosci Abst, 1999, 25(3): 215.

[10] COSKUN V, VENKATRAMAN G., NOYES C P, *et al*. Bone morphogenetic proteins regulate the proliferation SVZa progenitor cells by modulating the expression of $p19^{INK4d}$ [J]. Soc Neurosci Abst, 2000, 26: 1092.

[11] VENKATRAMAN G, COSKUN V, WU Y, *et al*. SVZa progenitor cells retain commitment to the neuronal lineage in response to enhanced BMP signaling [J]. Soc Neurosci Abst, 2000, 26: 1092.

[12] IWASAKI S, TSURUOKA N, HATTORI A, *et al*. Distribution and characterization of specific cellular binding proteins for bone morphogenetic protein-2 [J]. J Biol Chem, 1995, 270(10): 5476-5482.

[13] ZHANG D, MEHLER M F, SONG Q, *et al*. Development of bone morphogenetic protein receptors in the nervous system and possible roles in regulating trkC expression [J]. J Neurosci, 1998, 18(9): 3314-3326.

（编辑 陈聪连）

欢迎订阅 2007 年《中国组织工程研究与临床康复》（原《中国临床康复》）杂志

2007 年《中国组织工程研究与临床康复》杂志将工作的重点放在以下 5 个领域：种子细胞研究、组织构建研究、生物材料研究、临床应用研究、康复工程研究，并以每周一刊的时效向您传播。

本刊稿件特色：报道上述研究领域的热点、焦点、难点问题及其创新技术、创新方法，探讨其新机制和新思路，内容突出前瞻性、创新性、科学性、实用性。惟能确实反映出该领域研究的最高水平，力求每一篇文章都清楚阐述与他人、他篇的不同之处。

本刊出版周期：一般稿件修回后 6 个月出版，"绿色特快通道"承诺修回稿件 3 个月内出版。

本社订阅：辽宁省沈阳市 1200 邮政信箱 邮编：110004 国内订阅邮发代号：8-584

电 话：(024)23389106；(024)23384352 咨询电邮：szb100@zglckf.com

投稿电邮：kf23385083@sina.com；kf22838105@sina.com 传 真：(024)23381085

更多信息详见 www.zglckf.com