论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1080-04

Id2在SVZa神经干细胞向神经元分化中的作用

张治元,杨 辉,刘仕勇,何家全,邱克军,宋业纯 (第三军医大学新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 研究DNA结合抑制物2(inhibitor of DNA binding 2, Id2)在室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)神经干细胞向神经元分化中的作用。**方法** 体外分离培养P0昆明小鼠SVZa神经干细胞,正义Id2、反义Id2真核表达质粒转染SVZa神经干细胞,采用流式细胞仪检测在Id2作用下SVZa神经干细胞分化为神经元的比例。采用Western blot检测不同浓度的骨形成蛋白2(bone morphogenentic protein 2, BMP2)诱导下Id2蛋白的表达变化。**结果** 正义Id2真核表达质粒转染组,SVZa神经干细胞分化为神经元的比例小于空白对照组,反义Id2真核表达质粒转染组,SVZa神经干细胞分化为神经元的比例明显高于空白对照组;随着BMP2浓度的增加,Id2的表达增加。**结论** Id2抑制体外培养的P0 SVZa神经干细胞向神经元方向分化,BMP2可以促进SVZa神经干细胞Id2的表达,它们共同参与调控SVZa神经干细胞向神经元分化的过程。

关键词:Id2; SVZa ; 神经干细胞; BMP2; 分化

中图法分类号:R322.85; R329.2;R394.3 **文献标识码**:A

Role of Id2 in neuronal differentiation of SVZa neural stem cells

ZHANG Zhi-yuan, YANG Hui, LIU Shi-yong, HE Jia-quan, QIU Ke-jun, SONG Ye-chun (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Id2 in the neuronal differentiation of SVZa neural stem cells. Methods The neural stem cells derived from SVZa of postnatal day 0 (P0) Kunming mouse were separated and cultured *in vitro*. The rate of neuron in the differentiated cells of SVZa NSCs induced by sense Id2 or anntisense Id2 plasmids was detected by flow cytometry. The expression of Id2 in SVZa NSCs induced with different concentrations of BMP2 was detected by Western blotting. Results The rate of neuron of sense Id2 group was lower than that of blank group, while the rate of neuron in antisense Id2 group was higher than that of blank group. The expression of Id2 was enhanced by BMP2 in SVZa neural stem cells. Conclusion Id2 retards the neuronal differentiation of SVZa NSCs. The expression of Id2 is enhanced by BMP2. They are coordinately implicated in regulating the differentiation of SVZa NSCs to neurons.

Key words: Id2; SVZa; neural stem cells; BMP2; differentiation

室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)是目前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,与其他部位的神经干细胞相比,SVZa的神经干细胞具有以下特点:①自产生起即具备发育为神经元的特征;②迁移过程中保持增殖状态和神经元特征而不进一步分化;③到达迁移终点后,才进一步分化为多巴胺能和γ-氨基丁酸能神经元(gamma-aminobutyric acid, GABA),因此这个部位成为神经干细胞研究的热点[1-3]。但到目前为止,SVZa神经干细胞特异性向神经元分化的分子机制尚未阐明。Id蛋白是一种公认的抑制神经分化,促进细胞增殖的转录调控因子。Id的作用在神经发育中表现的尤为明显,Id蛋白可以抑制未成熟细胞的进一步分化,抑制其退出细胞周期。在神经发育的过程中,Id广泛表达,决定神经元开始分化的时间。Id2是Ids家族的重要成员,参与神经发育的调控[4-7]。诱导神经干细胞向神经元分化具有重要科研以及临床应用价值。本实验以SVZa神经干细胞为细胞模型,研究Id2在SVZa神经干细胞向神经元分化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

新生0 d昆明小鼠(P0)由第三军医大学实验动物中心提供。培养基及细胞因子:DMEM/F12和B27由美国Gibco公司提供,胎牛血清由美国Hyclone公司提供,β-actin小鼠多克隆抗体、bFGF细胞因子、微管相关蛋白2(microtubule associated proteins 2, MAP2)兔多克隆抗体、Cy3荧光标记的羊抗兔二抗由

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(30130110)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30130110)

作者简介:张治元(1975-),男,山西省定襄县人,博士研究生,医师,主要从事神经发育、神经再生方面的研究。电话:13108958161
通讯作者:杨 辉,电话:(023)68755610, E-mail:Huiyang64@yahoo.com

收稿日期:2005-11-22;修回日期:2006-03-16

美国 Sigma 公司提供，骨形成蛋白 2（bone morphogenetic protin 2，BMP2）细胞因子由德国 Roche 公司提供，Id2 兔多克隆抗体、FITC 荧光标记二抗、Cy3 标记的 GFAP 抗体由美国 Santacruz 公司提供。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、BCA 总蛋白定量试剂盒、Super Signal West Pico 化学发光检测底物试剂盒由美国 Pierce 公司提供。小鼠神经干细胞 Nucleofector 转染试剂盒由德国 amaxa 公司提供。质粒来源：正义 Id2-pCDNA3.1 和反义 Id2-pCDNA3.1 真核表达质粒由 Wayne A. Phillips Ph. D（Australia）惠赠。

1.2　方法

1.2.1　SVZa 神经干细胞的分离培养　　新生小鼠经碘酒、乙醇消毒后固定于烛台，去除头皮、头骨和硬膜，小心剥离出整个鼠脑。在解剖显微镜下操作，以嗅球为中心矢状位纵切，得一含嗅球的纵行片（约 1 mm 厚度），在显微镜下找到 SVZa（紧邻侧脑室前角，颜色稍发白）并取材。吸管吹打机械分离制作单细胞悬液，台盼蓝染色后细胞计数，于每培养瓶中（75 ml 培养瓶）加入 1×10^6 个细胞，培养液采用 DMEM/F12（1∶1）加 B27（1∶50）的无血清培养基，同时加用 bFGF（20 ng/ml）。待原代克隆形成后再次机械分离克隆制作单细胞悬液，每培养瓶中加入 1×10^6 个细胞。此后每 5～7 天机械分离克隆传代 1 次，方法同前，纯化培养 3 代以后应用于下述的干细胞实验。采用 0、5、10 ng/ml 不同浓度的 BMP2 加入上述培养基中，诱导培养 3 d 后，收集 SVZa 神经干细胞，提取细胞总蛋白。

1.2.2　目的基因质粒转染 SVZa 神经干细胞　　收集传代 3 代以上的 SVZa 神经干细胞，按 Nucleofector 试剂说明书转染正义 Id2-pCDNA3.1、反义 Id2-pCDNA3.1、pCDNA3.1 及 pEGFP－C1 真核表达质粒，10% 胎牛血清贴壁培养 3 d 后行流式细胞仪检测 MAP2 阳性细胞的比例。每组 3 个样本，重复 3 次实验。

1.2.3　流式细胞仪检测 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例　　具体方法见文献[8]。

阳性率＝阳性细胞/（阳性细胞＋阴性细胞）－对照组中的非特异结合率。

1.2.4　免疫荧光法检测 SVZa 分化产物中 MAP2 和 GFAP 表达阳性的细胞　　将各种不同处理条件下的 SVZa 神经干细胞种植于预先置有多聚赖氨酸处理的盖玻片的 6 孔培养板，培养 3 d，待其完全分化后，行 MAP2 一抗（1∶1 000）Cy3 荧光标记的二抗（1∶1 000）及 Cy3 标记的 GFAP 抗体（1∶3 000）免疫荧光检测，方法参照文献[8]。各组均设阴性对照，阴性对照不加一抗，其余步骤相同。未设阳性对照。

1.2.5　SDS-PAGE（SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳）和蛋白免疫印迹（Western blot）检测在不同浓度 BMP2 作用下 Id2 蛋白表达变化情况　　RIPA 法裂解细胞及总蛋白提取，采用 BCA 法检测总蛋白浓度；SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳：灌制 10% 分离胶配制，室温聚合 30～40 min。灌制 5% 浓缩胶，室温聚合 30 min。将样品及蛋白标准与 5×SDS 凝胶加样缓冲液以 4∶1 的比例混合，95 ℃煮沸 5 min，用微量注射器每孔加入煮沸好的样品 30 μg 和预染的蛋白相对分子质量标准品。以恒压 130 V，电泳 1.5 h。电泳结束进行半干电转移。以恒流 0.8 A/cm^2，转移 2 h，转移后的 PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉封闭液中室温封闭 2 h，将膜与一抗共同孵育 4 ℃冰箱中过夜，一抗用封闭液稀释（Id2：1∶500，β-actin：1∶3 000），孵育完毕用 PBST 缓冲液充分洗膜 6 次，每次 5 min。将膜与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温下摇荡孵育 2 h，抗体稀释度为 1∶2 000，PBST 缓冲液充分洗膜 6 次，每次 5 min。采用美国 Pierce 公司 Super Signal West Pico 化学发光检测底物试剂盒检测，Bio-Rad 扫描胶片，采用 Quantity One 软件对目的条带进行光密度分析。以 β-actin 作为对照，实验组条带密度与对照组的比值作为各组实验数据，每组实验重复 3 次。

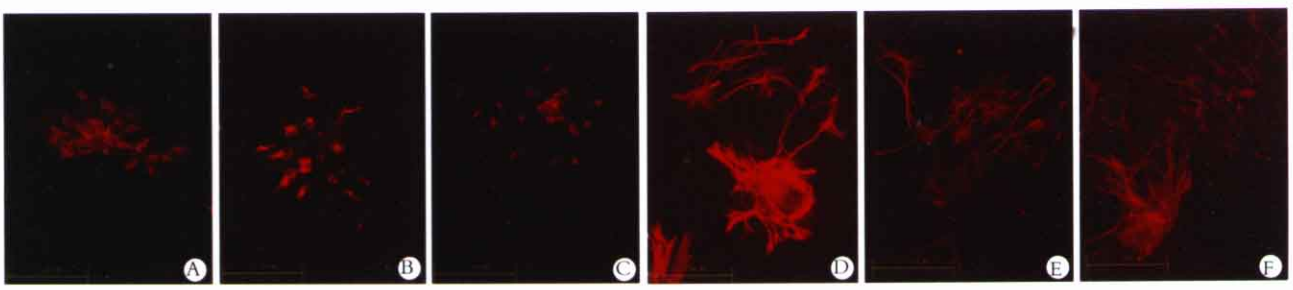
1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　免疫荧光检测结果

如图 1 可见，与空载体组（图 1B）SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例为 33.25% 的比较，反义 Id2-pCDNA3.1 组（图 1A）SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例达到 43.64%，明显高于空载体组，正义 Id2-pCDNA3.1 组（图 1C）SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例为 25.65%，明显低于空载体组；与空载体组（图 1E）SVZa 神经干细胞分化为星形胶质细胞的比例为 53.63% 比较，反义 Id2-pCDNA3.1 组（图 1D）SVZa 神经干细胞分化为星形胶质细胞的比例为 45.36%，低于空载体组（$P<0.05$），正义 Id2-pCDNA3.1 组（图 1F）SVZa 神经干细胞分化为星形胶质细胞神经元的比例为 65.33%（$P<0.05$），高于空载体组。

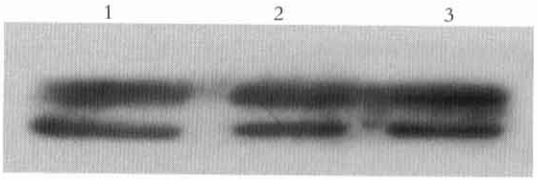


A：反义 Id2 - pCDNA3.1 组 SVZa 神经干细胞分化产物 MAP2；B：对照组 SVZa 神经干细胞分化产物 MAP2；C：正义 Id2 - pCDNA3.1 组 SVZa 神经干细胞分化产物 MAP2；D：反义 Id2 - pCDNA3.1 组 SVZa 神经干细胞分化产物 GFAP；E：对照组 SVZa 神经干细胞分化产物；F：正义 Id2 - pCDNA3.1 组 SVZa 神经干细胞分化产物 GFAP

图 1　SVZa 神经干细胞分化产物免疫荧光检测结果　（Cy3 免疫荧光染色 ×200）

2.2 Western blot 检测在不同浓度的 BMP2 作用下 Id2 蛋白表达变化结果

如图 2 可见，5 ng/ml BMP2 作用组 Id2 蛋白表达量高于 0 ng/ml BMP2 作用组，10 ng/ml BMP2 作用组 Id2 蛋白表达量高于 0 ng/ml BMP2 作用组，10 ng/ml BMP2 作用组 Id2 蛋白表达量高于 5 ng/ml BMP2 作用组，即随着 BMP2 作用浓度的增加，SVZa 神经干细胞中 Id2 蛋白表达量也在增加，BMP2 促进 SVZa 神经干细胞中 Id2 表达。



1：0 ng/ml 组；2：5 ng/ml 组；3：10 ng/ml 组

图 2 Western blot 检测在不同浓度 BMP2 作用下 Id2 蛋白表达结果

2.3 流式细胞仪检测结果

空载体组 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例为 36.82%，反义 Id2 - pCDNA3.1 组 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例达到 48.86%，明显高于空载体组的 36.82%（$P<0.05$），差异显著；正义 Id2 - pCDNA3.1 组 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例下降为 24.15%，明显低于空载体组的 36.82%（$P<0.05$），差异显著。

3 讨论

Id 家族由 4 种 Id 蛋白组成，包括 Id1、Id2、Id3、Id4，被公认为是细胞增殖、细胞分化、细胞死亡、细胞最终结果等重要的活动的重要调控因子[4-7]。在神经发育中，Id 沿神经管的腹侧－背侧轴以特有的形式分布表达：在神经发育的早期阶段，Id2 表达于神经盘的顶部，随着发育的进行，Id2 表达于尚为发育成熟的神经元部位。Id 表达贯穿于整个神经发育阶段[9]。Id2 mRNA 主要表达于小鼠胚胎发育中脑室管膜增殖中的细胞。Id2 mRNA 也高表达于僧帽细胞层、室管膜层/室管膜下层和海马。在 P1 到 P14，Id2 mRNA 高表达于大脑皮层，然而在成年大鼠大脑皮层 Id2 mRNA 的表达下降非常明显。在发育的不同时间和空间上，包括在细胞特异性上，Id2 在神经前体细胞增殖和细胞多样性方面发挥重要的作用[10]。Id2 是 Ids 家族的重要成员，参与神经发育的调控。Id2 在神经干细胞增殖和分化中均发挥重要的作用。本实验以体外分离培养的 P0 昆明小鼠 SVZa 神经干细胞为细胞模型，对 Id2 在 SVZa 神经干细胞向神经元分化过程中的作用进行了研究[11]。

Id 蛋白是一种公认的抑制细胞分化，促进细胞增殖的转录调控因子，在神经发育中表现的尤其明显。Id 蛋白可以抑制神经前体细胞的进一步分化，抑制其退出细胞周期。通过拮抗转录调控因子（basic helix loop helix transcripition factor，bHLH）和 Rb（retinoblastoma tumor suppressor）家族蛋白从而达到它的作用[1-3]。

本实验在相同实验条件采用 Nucleofector 核转染仪将正义 Id2 -pCDNA3.1、反义 Id2-pCDNA3.1、pCDNA3.1 及 pEGFP-C1 真核表达质粒转染 SVZa 神经干细胞，以转染 pCDNA3.1 真核表达质粒组作为对照组。通过流式细胞仪检测 pEGFP-C1 真核表达质粒转染组，发现可以获得较高的转染率，平均 25% ~30%，因此可以反映 Id2 在 SVZa 神经干细胞增殖和分化中的作用。从免疫荧光 MAP2 阳性检测结果分析，反义 Id2-pCDNA3.1 组分化为神经元的比例高于正常对照组，而正义 Id2-pCDNA3.1 组分化为神经元的比例低于正常对照组；而 GFAP 免疫荧光检测结果提示：反义 Id2-pCDNA3.1 组分化为星形胶质细胞的比例低于正常对照组，而正义 Id2-pCDNA3.1 组分化为星形胶质细胞的比例高于正常对照组。从免疫荧光检测结果分析，Id2 抑制 SVZa 神经干细胞向神经元方向分化，促进其向星形胶质细胞方向分化。为了进一步证实免疫荧光的检测结果，我们采用流式细胞仪检测 SVZa 神经干细胞在相同条件下分化为神经元的比例，检测结果同样提示：Id2 抑制 SVZa 神经干细胞向神经元方向分化。

骨形成蛋白家族（bone morphogenetic proteins，BMPs）是参与神经发育的重要细胞因子，而且随着浓度的不同、作用时间的不同和细胞类型的不同，它们的生物学作用也不同[8,12]。我们的前期研究结果表明：不同浓度的 BMP2 对于 SVZa 神经干细胞的增殖分化有不同的影响，在 10% 胎牛血清诱导培养下，10 ng/ml 浓度的 BMP2 可显著提高 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例[8]，可促进 Mash1 的表达；在 bFGF + DMEM/F12 无血清培养条件下，5 ng/ml 的 BMP2 可明显促进 SVZa 神经干细胞增殖。根据我们前期研究结果，我们采用 0、5、10 ng/ml 不同浓度 BMP2 诱导在 bFGF + DMEM/F12 无血清培养条件下的 SVZa 神经干细胞，诱导 3 d 后，收集细胞，提取总蛋白，采用 Western blot 检测在不同浓度 BMP2 诱导下 Id2 的表达变化

情况。结果表明：随着 BMP2 浓度的增加，SVZa 神经干细胞中 Id2 的蛋白表达量明显增加。

BMP2 对细胞诱导以后，使得被诱导的细胞处于敏感状态，使得许多与细胞增殖、分化密切的相关基因易于激活。Hollnagel 等[13]研究证实 Id2 是 BMPs 的直接靶基因。BMP2 可通过诱导 Id2 的表达变化，参与细胞增殖、细胞分化和细胞亚型的决定[13,14]。Id 家族蛋白的主要功能是抑制与 DNA 的结合和抑制细胞的分化，主要通过与它的天然靶基因相互作用，包括 bHLH 及其他的一些转录调控因子。bHLH 蛋白可以诱导神经前体细胞向神经元方向分化，包括 Neurogenins，NeuroD，Mash1 等[4,6,15]。Id2 蛋白通过和高度保守的 HLH domain 结合而抑制其他的 bHLH 转录调控因子结合，从而达到抑制其他转录调控因子的作用。因此，Id2 在 SVZa 神经干细胞增殖分化中的作用机制可能如下：在 bFGF + DMEM/F12 无血清培养条件下，BMP2 可诱导 Id2 蛋白表达增加，通过拮抗成神经元基因 Mash1 的作用从而达到增加 SVZa 神经前体细胞数目的作用；在 10% 胎牛血清诱导条件下，转染正义 Id2-pCDNA3.1 组 SVZa 神经干细胞内 Id2 表达增加，而转染反义 Id2-pCDNA3.1 组 Id2 的表达受到抑制，通过拮抗成神经元基因 Mash1 的作用从而抑制 SVZa 神经干细胞向神经元方向分化，在血清中其他信号分子的综合作用下诱导 SVZa 神经干细胞向星形胶质细胞方向分化[6,16]。

Id2 不仅在增殖的神经球细胞团中表达，而且表达于有丝分裂后的正在分化的神经元和胶质细胞中。这可能提示我们：Id2 参与决定特定的细胞亚型的过程。进一步研究表明：Id2 可能在调控细胞周期以及肿瘤的发生中发挥重要作用[17]。Id2 与 BMPs 及其他信号分子之间存在复杂的相互作用，有待进一步深入研究。相信对 Id2 的深入研究，必将促进我们对神经发育和肿瘤发生机制的进一步理解。

参考文献：

[1] LUSKIN M B, ZIGOVA T, SOTERES B J, *et al*. Neuronal progenitor cells derived from the anterior subventricular zone of the neonatal rat forebrain continue to proliferate *in vitro* and express a neuronal phenotype[J]. Mol Cell Neurosci, 1997, 8(5): 351 - 366.

[2] BROCK S C, BONSALL J, LUSKIN M B. The neuronal progenitor cells of the forebrain subventricular zone: intrinsic properties *in vitro* and following transplantation[J]. Methods, 1998, 16(3): 268 - 281.

[3] LUSKIN M B. Neuroblasts of the postnatal mammalian forebrain: their phenotype and fate[J]. J Neurobiol, 1998, 36(2): 221 - 233.

[4] NORTON J D, DEED R W, CRAGGS G, *et al*. Id helix - loop - helix proteins in cell growth and differentiation[J]. Trends Cell Biol, 1998, 8 (2): 58 - 65.

[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] BENEZRA R, DAVIS R L, LOCKSHON D, *et al*. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins [J]. Cell, 1990, 61 (1): 49 - 59.

[7] ROCKMAN S P, CURRIE S A, CIAVARELLA M, *et al*. Id2 Is a Target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma[J]. J Biol Chem, 2001, 276(48): 45113 - 45119.

[8] 张治元，杨　辉，刘仕勇，等. BMP2 在 SVZa 神经干细胞向神经元分化中的作用[J]. 第三军医大学学报，2003，25(20)：1788 - 1791.

[9] JEN Y, MANOVA K, BENEZRA R. Each member of the Id gene family exhibits a unique expression pattern in mouse gastrulation and neurogenesis[J]. Dev Dyn, 1997, 208(1): 92 - 106.

[10] TZENG S F, DE-VELLIS J. Id1, Id2, and Id3 gene expression in neural cells during development[J]. Glia, 1998, 24(4): 372 - 381.

[11] 张清勇，杨　波，赵新利，等. 胚胎大鼠神经干细胞的培养及鉴定[J]. 郑州大学学报：医学版，2003，38(1)：5 - 7.

[12] LASORELLA A, UO T, IAVARONE A. Id proteins at the cross-road of development and cancer[J]. Oncogene, 2001, 20 (58): 8326 - 8333.

[13] HOLLNAGEL A, OEHLMANN V, HEYMER J, *et al*. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells[J]. J Biol Chem, 1999, 274(28): 19838 - 19845.

[14] KOWANETZ M, VALCOURT U, BERGSTROM R, *et al*. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(10): 4241 - 4254.

[15] 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.

[16] ROSS S E, GREENBERG M E, STILES C D. Basic helix-loop-helix factors in cortical development [J]. Neuron, 2003, 39(1): 13 - 25.

[17] LASORELLA A, BOLDRINI R, DOMINICI C, *et al*. Id2 is critical for cellular proliferation and is the oncogenic effector of N-myc in human neuroblastoma[J]. Cancer Res, 2002, 62 (1): 301 - 306.

（编辑　龙　亮）