文章编号:1000-5404(2007)10-0863-03

论著

Mash1在室管膜前下区神经干细胞向GABA能神经元分化中的作用

陈锦华[1],张治元[1],尹昌林[2],杨 辉[1] (第三军医大学:[1]新桥医院神经外科,重庆 400037,[2]西南医院急诊科,重庆 400038)

提 要:目的 研究Mash1在室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)神经干细胞向γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)能神经元分化中的作用。**方法** 体外分离培养新生0 d昆明小鼠的SVZa神经干细胞,构建Mash1与绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)正义、反义融合蛋白表达质粒,转染SVZa神经干细胞,GFP活体荧光标记SVZa神经干细胞,采用流式细胞仪检测在Mash1作用下SVZa神经干细胞分化为神经元的比例和分化为GABA能神经元的比例。**结果** pEGFP-Mash1$^-$质粒、pEGFP-Mash1$^+$质粒双酶切鉴定构建成功,核转染结果表明:GFP融合蛋白表达阳性;pEGFP-Mash1$^+$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($P<0.05$);pEGFP-Mash1$^-$组SVZa神经干细胞分化为神经元的比例明显低于空白对照组;pEGFP-Mash1$^+$组SVZa神经干细胞分化为GABA能神经元的比例明显高于空白对照组($P<0.05$);pEGFP-Mash1$^-$组SVZa神经干细胞分化为GABA能神经元的比例明显低于空白对照组($P<0.05$)。**结论** pEGFP-Mash1$^-$质粒、pEGFP-Mash1$^+$质粒构建成功;Mash1可以促进SVZa神经干细胞向神经元方向分化,而且主要表现为促进SVZa神经干细胞向GABA能神经元分化。

关键词:Mash1;室管膜前下区;神经干细胞;分化
中图法分类号:R322.81;R329.21;R329.25 **文献标识码**:A

Role of Mash1 in differentiation of SVZa neural stem cells to GABA neurons

CHEN Jin-hua[1], ZHANG Zhi-yuan[1], YIN Chang-lin[2], YANG Hui[1] ([1]Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Department of Emergency, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstracts: **Objective** To investigate the role of Mash1 in differentiation of anterior subventricular zone (SVZa) neural stem cells to gamma-aminobutyric acid (GABA) neurons. **Methods** The neural stem cells derived from SVZa of postnatal Kunming mouse aged 0 day (P0) were separated and cultured *in vitro*. The rate of GABA neurons in the differentiated cells of neural stem cells of SVZa induced by different plasmids of Mash1 was detected by cell counting and flow cytometry (FCM). **Results** Double digestions verified the successful construction of Mash1-GFP$^+$ and Mash1-GFP$^-$. The rate of GABA neuron in the group of sense Mash1 was higher than that of blank control group while the rate of GABA neuron in the group of antisense Mash1 was lower than that of blank control group. **Conclusion** pEGFP-Mash1$^-$ and pEGFP-Mash1$^+$ plasmids have been successfully constructed. Mash1 can promote the GABA neuronal differentiation of the neural stem cells of SVZa.

Key words: Mash1; anterior subventricular zone; neural stem cells; differentiation

室管膜下区(anterior subventricular zone, SVZa)是目前公认的成年个体神经干细胞最为集中的地方,室管膜前下区神经干细胞将分化为神经元的祖细胞,并沿着一条高度局限化的迁移通道——嘴侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)以链式模式朝嗅球迁移,在嗅球的中央区分别朝周边的颗粒细胞层和球周细胞层迁移,并分化为颗粒细胞和球周细胞。γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)能神经元在脑有广泛的分布,发挥重要的生理作用,在癫痫等疾病的发生中有重要的病理意义,因此研究GABA能神经元的分化调控机制具有重要意义[1]。Mash1已经成为人们研究最多的bHLH家族成员之一,发现其广泛表达于在发育中的中枢和外周神经系统,在神经元分化过程中起重要作用,并参与决定神经元亚型。但关于Mash1在SVZa神经干细胞向GABA能分化中的作用

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30130110)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30130110)
作者简介:陈锦华(1974-),男,江苏省南通市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事神经发育、脑血管疾病方面的研究。电话:13527478687
通讯作者:杨 辉,电话:(023)68755610, E-mail:Huiyang64@yahoo.com
收稿日期:2006-08-28;修回日期:2006-09-18

机制缺乏阐述。本实验通过构建 Mash1 和增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)的正义和反义融合蛋白表达质粒,以绿色荧光蛋白(GFP)作为报告基因,标记神经干细胞,研究 Mash1 在 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明种新生小鼠(P0d)18 只,体质量约 1.5 g,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(Gibco)、bFGF(Sigma)、胎牛血清(Hyclone)。神经元特异性烯醇化酶(Neuron-specific enolase,NSE)抗体、GAD67 抗体由 Santa Cruz 公司提供,FITC 荧光二抗(Sigma)。质粒来源:PSV2-CMV Mash1 plasmid 由日本 Ryoichiro Kageyama 教授惠赠,pEGFP 载体购自 Clontech 公司。小鼠神经干细胞 Nucleofector 法基因转染专用试剂盒购自 Amaxa 公司(深圳精美公司代理)。

1.2 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。

1.3 质粒重构

反义 Mash1 表达质粒(pEGFP-Mash1$^-$)构建:经 *Kpn* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,将 1.0 kb 的 Mash1 目的片段连接到 pEGFP-C1 载体;正义 Mash1 表达质粒(pEGFP-Mash1$^+$)构建:经 *Bam*H Ⅰ和 *Sac* Ⅰ双酶切,将 1.0 kb 的 Mash1 目的片段连接到 pEGFP-C2 载体上;pEGFP-Noggin 构建:经 *Eco*R Ⅰ和 *Apa* Ⅰ双酶切,经双酶切证实连接成功。

1.4 pEGFP-Mash1$^-$、pEGFP-Mash1$^+$ 对 SVZa 神经干细胞分化的作用

收集传代 3 代以上的 SVZa 神经干细胞,按 Nucleofector 试剂说明书转染 pEGFP-C1、pEGFP-Mash1$^-$、pEGFP-Mash1$^+$ 质粒,10% 胎牛血清贴壁培养 3 d 后行流式细胞仪检测 NSE 阳性细胞的比例计算神经干细胞分化为神经元的比例,并通过检测 GAD67 阳性细胞的比例计算神经干细胞分化为 GABA 能神经元的比例。

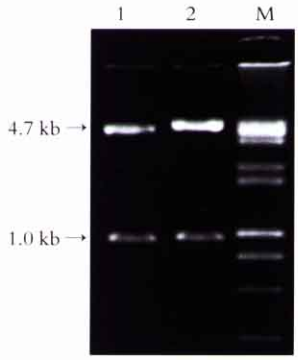
1.5 统计学处理

数据以 $x\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 pEGFP-Mash$^-$ 质粒、pEGFP-Mash1$^+$ 质粒双酶切鉴定结果

双酶切鉴定结果显示:pEGFP-Mash$^-$ 质粒、pEGFP-Mash1$^+$ 质粒构建成功,双酶切所得片段为 1 kb 和 4.7 kb 大小的片段,符合 Mash1 目的片段的大小和空载体片段的大小(图 1)。

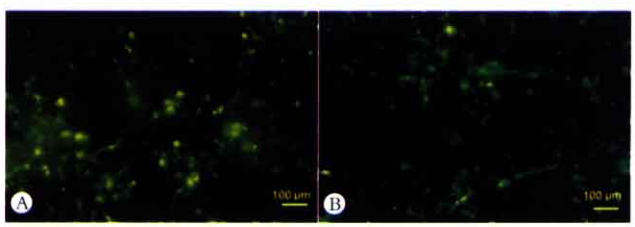


1:pEGFP-Mash1$^-$ 质粒;2:pEGFP-Mash1$^+$ 质粒;M:标准

图 1 Mash1-GFP$^+$ and Mash1-GFP$^-$ 质粒的双酶切鉴定

2.2 pEGFP-Mash1$^-$ 质粒、pEGFP-Mash1$^+$ 质粒表达情况检测结果

在荧光显微下可见 pEGFP-Mash1$^-$ 质粒组、pEGFP-Mash1$^+$ 质粒组有大量的亮绿色的 GFP 阳性细胞,说明 pEGFP-Mash1$^-$ 质粒和 pEGFP-Mash1$^+$ 质粒表达 Mash1 与 GFP 的融合蛋白(图 2)。



A:pEGFP-Mash1$^+$ 质粒;B:pEGFP-Mash1$^-$ 质粒

图 2 SVZa 神经干细胞高表达 GFP (荧光显微镜,标尺为 100 μm)

2.3 pEGFP-Mash1$^-$、pEGFP-Mash1$^+$ 对 SVZa 神经干细胞分化的作用

流式细胞仪检测结果提示:pEGFP-Mash1$^+$ 组 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例[(40.71±1.92)%]明显高于对照组[(32.84±1.82)%]($P<0.05$);pEGFP-Mash1$^-$ 组 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例[(25.89±1.62)%]明显低于对照组[(32.84±1.82)%]($P<0.05$)。pEGFP-Mash1$^+$ 组 SVZa 神经干细胞分化为 GABA 能神经元的比例[(25.65±0.75)%]明显高于对照组[(18.46±0.52)%]($P<0.05$);pEGFP-Mash1$^-$ 组 SVZa 神经干细胞分化为 GABA 能神经元的比例[(12.27±0.48)%]明显低于对照组[(18.46±0.52)%]($P<0.05$)。

3　讨论

GABA 是神经系统主要的抑制性神经递质，幼年时期兴奋性神经递质占主导地位，随着年龄的增长，兴奋性和抑制性神经递质逐渐达到平衡。GABA 神经递质产生和释放的异常是引起癫痫的重要原因[1,2]。GABA 能神经元是产生和释放 GABA 的主要细胞，在中枢神经系统中发挥重要的作用。因为 SVZa 神经干细胞是嗅球球周细胞层 GABA 能神经元分化产生的重要来源，而且具有不同于其他神经干细胞的特点，所以我们选择 SVZa 神经干细胞作为研究 GABA 能神经元产生的细胞模型。由于出生当天是小鼠 SVZa 神经干细胞增殖、迁移、分化最旺盛的时期，而且 SVZa 区体积最大，因此本实验选择 P0 小鼠作为实验研究对象。

在中枢神经系统中，Mash1 表达于端脑腹侧、后脑、中脑背侧、脊髓神经管背侧，尤以端脑腹侧和间脑腹侧的某些区域以及嗅球上皮的表达更为明显。Mash1 突变鼠前脑神经元祖细胞严重缺失，基底节和大脑皮层的神经元减少，特别是 SVZ 神经元祖细胞和嗅球嗅觉神经元的广泛缺失，嘴侧迁移流的形态也表现异常。另外有研究报道：Mash1 在神经祖细胞中低表达，短暂性的增强表达可启动神经干细胞向神经元的分化[3-5]。目前的研究多见于外周神经系统、嗅球、端脑等部位神经元的分化形成，关于 Mash1 在 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化中的作用机制缺乏阐述。

研究表明：在体内神经干细胞向神经元分化受周围微环境许多信号分子共同调控。我们采用体外培养的 SVZa 神经干细胞作为细胞模型。在 bFGF 条件培养基培养下，神经干细胞增殖更加活跃，可以抑制其退出细胞周期，而且 bFGF 依赖性神经干细胞分化为神经元的比例更高[6]。在相关研究的基础上，我们采用 bFGF 的无血清条件培养基培养 SVZa 神经干细胞，从 SVZa 分离的细胞群经过 3 代以上的纯化培养，神经干细胞的比例已大幅增加，比例相对较为稳定，研究 Mash1 在 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化中的作用。

为了研究 Mash1 在 SVZa 神经干细胞分化中的作用，本实验通过构建 Mash1 和 GFP 正义、反义融合蛋白表达质粒，转染 SVZa 神经干细胞，以 GFP 作为活体标记，活体动态研究 Mash1 在 SVZa 神经干细胞分化中的作用。经双酶切鉴定，符合目的片段大小；Mash1 正义及反义质粒转染后 GFP 融合蛋白表达阳性，说明 Mash1 正义及反义融合蛋白表达质粒构建成功，可用于研究 Mash1 在 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化中的作用。采用核转染技术，将 Mash1 正义和反义表达质粒转染 SVZa 神经干细胞，诱导分化 3 d，待 SVZa 神经干细胞完全分化后，采用流式细胞仪检测 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例，结果表明。pEGFP-Mash1 + 组 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例明显高于 pEGFP-C1 组（$P < 0.05$），而 pEGFP-Mash1-组 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例明显低于 pEGFP-C1 组（$P < 0.05$），分析其可能原因为：转录调控因子 Mash1 表达增强，启动了 SVZa 神经干细胞向神经元分化，而 Mash1-GFP$^-$ 质粒封闭了 Mash1 的生成与表达，抑制了 SVZa 神经干细胞向神经元分化；也即 Mash1 促进 SVZa 神经干细胞向神经元分化。

研究表明：Mash1 启动神经干细胞向神经元方向分化，也参与神经元亚型的形成，多见于外周神经元亚型的决定[7]。我们的流式细胞仪检测结果显示：Mash1 不仅促进 SVZa 神经干细胞向神经元的分化，而且有明显的诱导 GABA 能神经元生成的作用，提示：Mash1 参与决定 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元亚型的决定。

但是 Mash1 启动神经干细胞向神经元分化的基因表达程序仍然未知。Hes 抑制 Mash1 的表达；Mash1、Wnts 和 FGFs 家族都参与调控糖原合成激酶 3（glycogen synthase kinase3，GSK3）的活性，这提示几种信号分子之间存在相互作用，可能通过 GSK3 介导的磷酸化把内源性和外源性信号通路结合起来，目前还少见报道。关于 Mash1 在 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化的具体机制仍有待进一步研究。

参考文献：

[1] Hachiya Y, Takashima S. Development of GABAergic neurons and their transporter in human temporal cortex[J]. Pediatr Neurol, 2001, 25(5): 390 - 396.

[2] Sperk G, Furtinger S, Schwarzer C, *et al*. GABA and its receptors in epilepsy[J]. Adv Exp Med Biol, 2004, 548: 92 - 103.

[3] Murray R C, Navi D, Fesenko J, *et al*. Widespread defects in the primary olfactory pathway caused by loss of Mash1 function[J]. J Neurosci, 2003, 23(5): 1769 - 1780.

[4] Ross S E, Greenberg M E, Stiles C D. Basic helix-loop-helix factors in cortical development[J]. Neuron, 2003, 39(1): 13 - 25.

[5] Letinic K, Zoncu R, Rakic P. Origin of GABAergic neurons in the human neocortex[J]. Nature, 2002, 417(6889): 645 - 649.

[6] Israsena N, Hu M, Fu W, *et al*. The presence of FGF2 signaling determines whether beta-catenin exerts effects on proliferation or neuronal differentiation of neural stem cells[J]. Dev Biol, 2004, 268(1): 220 - 231.

[7] Chenn A, Walsh C A. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors[J]. Science, 2002, 297(5580): 365 - 369.

（编辑　薛国文）