文章编号:1000-5404(2007)08-0699-03

论著

BMP2在SVZa神经干细胞向GABA能神经元分化中的调控作用

陈锦华,杨 辉,尹昌林,张治元,刘仕勇,何家全,高方友 (第三军医大学新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要: 目的 研究BMP2在SVZa神经干细胞向γ-氨基丁酸(GABA)能神经元分化中的调控作用。**方法** 体外分离培养P0昆明小鼠室管膜下区(SVZa)神经干细胞,纯化传代培养3代后,使用不同浓度BMP2诱导SVZa神经干细胞,采用流式细胞仪检测不同浓度BMP2作用下SVZa神经干细胞分化为GABA能神经元的比例;另外利用活体荧光GFP标记GAD67特异性启动子,动态地研究BMP2在SVZa神经干细胞向GABA能神经元分化中的作用。在此基础之上,采用RT-PCR检测不同浓度BMP2作用下Mash1的表达。**结果** 不同浓度BMP2作用组分化为GABA能神经元的比例均高于空白对照组,10 ng/ml浓度的BMP2组比例最高;10 ng/ml浓度BMP2组,GAD67-GFP标记阳性细胞数目明显高于对照组;10 ng/ml浓度BMP2组Mash1表达高于其他组。**结论** BMP2促进SVZa神经干细胞向GABA能神经元的分化;10 ng/ml浓度的BMP2显著促进Mash1的表达。

关键词: 神经干细胞;SVZa;BMP2;GABA能神经元;GFP
中图法分类号: R329.21;R338.1;R341 **文献标识码**: A

Role of BMP2 in differentiation of neural stem cells from anterior subventricular zone into GABAergic neurons

CHEN Jin-hua, YANG Hui, YIN Chang-lin, ZHANG Zhi-yuan, LIU Shi-yong, HE Jia-quan, GAO Fang-you (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Millitary Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the role of BMP2 in the differentiation of SVZa neural stem cells (NSCs) into GABAergic neurons. **Methods** The neural stem cells derived from anterior subventricular zone (SVZa) of Kunming mouse (postnatal day 0, P0) were separated and cultured *in vitro*. The rate of GABAergic neurons in the differentiated cells of SVZa NSCs induced by BMP2 (1, 5, 10, 20, 100 ng/ml) were detected by flow cytometry (FCM). The role of BMP2 in the differentiation of SVZa NSCs into GABAergic neurons was studied by the GAD67 promoter labeled with GFP. The expression of Mash1 in the SVZa NSCs induced by BMP2 of different concentration was detected by RT-PCR. **Results** FCM and the GAD67 promoter labeled with GFP confirmed that the rates of GABAergic neurons induced by BMP2 were higher than that of blank group. The expression of Mash1 was enhanced by BMP2 in SVZa NSCs, especially by 10 ng/ml BMP2. **Conclusion** BMP2 promotes the differentiation of SVZa NSCs into GABAergic neurons.

Key words: neural stem cells; SVZa; BMP2; GABAergic neuron; GFP

室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)位于SVZ的前部,此区神经干细胞产生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(olfactory bulb, OB)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,其中大约30%的球周细胞属于γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)能神经元。GABA能神经元在脑部有广泛的分布,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。

骨形成蛋白家族(bone morphogenetic proteins, BMPs)在细胞增殖、分化中发挥重要作用,是影响神经发育的重要细胞因子。目前已有研究表明BMPs参与了神经系统的发生、吻尾轴和腹背轴的分化及细胞凋

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,发表论文10余篇。电话:(023)68774610, E-mail: vasography@gmail.com.cn
通讯作者:杨 辉,电话:(023)68755610, E-mail: Huiyang64@yahoo.com.cn
收稿日期:2006-08-23;**修回日期**:2006-10-12

亡等发育过程。BMPs 可以诱导神经干细胞向神经元分化，也可促使其向星形胶质细胞分化，即使在同一部位、同一发育阶段，不同的学者亦得出不同的结论，甚至是相互矛盾的。Lim 等[1]报道 BMPs 及其受体表达于成年大鼠 SVZa。由于出生前后是小鼠 SVZa 神经干细胞增殖、迁移、分化最旺盛的时期，因此研究 BMPs 在新生小鼠 SVZa 中的作用更有意义，所以本实验选择 P0 小鼠作为实验对象，研究 BMP2 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

健康昆明种新生小鼠(P0)18 只，雌雄不拘，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)、BMP2(Roche)、胎牛血清(Hyclone)。GAD67 抗体由 Santa Cruz 公司提供，FITC 荧光二抗(Sigma)。质粒来源：GAD67-GFP 质粒(GAD67 启动子和 GFP 构建)由美国 Aric Agmon 教授惠赠。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)，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 BMP2 对 SVZa 神经干细胞分化的调控

取传代 3 代以上的 SVZa 神经干细胞种植入 6 孔培养板，分别加入 1、5、10、20、100 ng/ml 的 BMP2 细胞因子(以 0 ng/ml 为对照组)，10% 胎牛血清贴壁培养 3 d 后用 0.25% 胰酶消化，D-Hanks 液漂洗，1 500 r/min离心 5 min，重复 3 次后行 GAD67 免疫荧光染色，将标本混匀后采集样本，用流式细胞仪(FACstar PLUS 型，Becton Dickison 公司，美国)检测，每组取 3 个样本，每样本计数 30 000 个细胞，并计算其阳性率。

1.4 BMP2 影响 SVZa 神经干细胞分化的活体荧光标记

取前述的 SVZa 神经干细胞，培养 3 代后采用 Nucleofector 法转染 GAD67-GFP 质粒，10% 胎牛血清贴壁培养，以不加入 BMP2 为对照组，加入 10 ng/ml BMP2，动态观察，并于 8、24、48、72、96、120 h 各取 6 个样本部分细胞行荧光分光光度计定量检测，并根据标准曲线计算出 GFP 的表达浓度(激发光波长 488 nm，发射光波长 510 nm)。

1.5 RT-PCR 检测不同浓度 BMP2 对 Mash1 表达的影响

细胞总 RNA 按照 Roche 公司产品说明采用 Tripure 提取，采用 RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA)。采用 1.5% 琼脂糖电泳检测 cDNA 的产量，采用 Gel. Doc 扫描分析仪扫描凝胶图谱，采用 Total Lab 分析软件对条带进行密度扫描分析。β-actin 作为实验内参对照。参考文献[2]，采用 Primer Premier5.0 软件设计引物，由上海 Genecore 公司合成，各基因引物序列如下：Mash1 引物(168 bp)：5′-GAAGATGAGCAAGGTGGAGACG-3′，5′-CGGAGAACCCGCCATAGAGT-3′；β-actin 引物(455 bp)：5′-CCCTGTATGCCTCTGGTC-3′，5′-GTCTTTACGGATGTCAACG-3′。

1.6 统计学处理

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

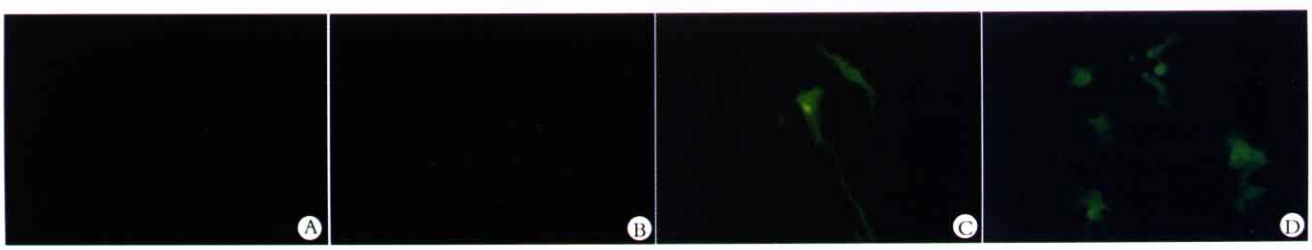
2 结果

2.1 BMP2 对 SVZa 神经干细胞分化的调控

加入 0、1、5、10、20、100 g/ml 浓度的 BMP2，3 d 时行流式细胞仪检测 SVZa 神经干细胞分化结果中 GAD67 阳性细胞比例，结果显示 GAD67 阳性细胞比例在 1～10 ng/ml 时逐渐增加，而 10～100 ng/ml 呈下降趋势，10 ng/ml 浓度组 GAD67 阳性细胞比例最高。

2.2 BMP2 在 SVZa 神经干细胞分化为 GABA 能神经元中的作用

SVZa 神经干细胞转染 GAD67-GFP 质粒，以 10% 胎牛血清诱导分化，贴壁分化 8 h 后未见到阳性细胞，24～48 h 开始有个别阳性细胞出现，数目较少，呈散在分布，可见到明显的细胞突起，48～72 h 逐渐增加(图 1)，到约 96 h 达到高峰。加入 10 ng/ml BMP2 后，GFP 阳性细胞明显增加，出现时间提前。荧光分光光度计检测结果见表 1。



A：贴壁分化 0 h；B：贴壁分化 8 h；C：贴壁分化 48 h；D：贴壁分化 72 h

图 1 荧光显微镜下动态观察不同时间点 GAD67-GFP 阳性细胞的表达情况 (×200)

表 1　BMP2 影响 SVZa 神经干细胞分化过程中的 GAD67 启动子活性（$n=3, \bar{x} \pm s$）

组别	0 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
0 ng/ml BMP2	66.83 ± 9.12	73.24 ± 8.01	106.85 ± 11.52	136.29 ± 9.31	167.65 ± 4.02	181.33 ± 6.35	116.84 ± 5.82
10 ng/ml BMP2	65.18 ± 10.02	72.25 ± 11.14	98.54 ± 7.23	184.16 ± 7.92[a]	226.29 ± 5.25[a]	198.45 ± 7.63	186.89 ± 9.12[a]

a：$P<0.05$，与 0 ng/ml BMP2 比较

2.3　RT-PCR 检测不同浓度 BMP2 对 Mash1 表达的影响　10 ng/ml BMP2 组 SVZa 神经干细胞中 Mash1 表达最高，与对照组（0 ng/ml BMP2 组）比较有显著性差异（$P<0.05$）。

3　讨论

Xin 等[3]研究发现 P0-7 的 SVZa 星形胶质细胞极少甚至没有，而神经元祖细胞极其丰富。那么，存在什么机制使得 SVZa 成为这样一个特殊的富含神经元祖细胞的区域呢？SVZa 神经干细胞又是通过什么机制成为神经元祖细胞的呢？

为了研究这个问题，本实验采用 DMEM/F12 + B27 + bFGF 无血清培养基建立了 bFGF 依赖性 SVZa 神经干细胞[4]，与其他条件培养液培养的神经干细胞相比，更具有向神经元方向分化的趋势。在 BMP2 诱导 SVZa 神经干细胞分化的实验中观察到：加于 6 孔培养板中的神经干细胞，2 ~ 4 h 即开始贴壁并分化；到第 3 天时 SVZa 神经干细胞已基本分化完全，神经干细胞克隆团分化为菊花状细胞团；SVZa 神经干细胞分化 3 d 的产物行流式细胞仪检测。实验结果表明：BMP2 可以促进 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化，以 10 ng/ml 浓度的 BMP2 作用最为显著。

实验采用 GFP 活体标记技术[5]，借助于 GFP 间接地显示目的基因，从而研究目的基因对组织、细胞的生理作用。由于基因 DNA 转录的启动需要调控蛋白与启动子的特异性结合，因而启动子的活性能够反映目的基因的表达状况，利用这个原理，采用 GFP 标记特定 GAD67 启动子，作为 GABA 能神经元的特异性标志物，动态地显示 SVZa 神经干细胞分化为 GABA 能神经元，研究在 BMP2 作用下，GABA 能神经元的分化情况。启动子标记实验结果显示：10 ng/ml BMP2 作用组与 0 ng/ml BMP2 作用组比较，GAD67-GFP 阳性细胞数目显著增加，出现时间也明显提前。这在体外动态地显示 BMP2 促进 SVZa 神经干细胞向神经元方向分化，而且最终分化为 GABA 能神经元。结合流式细胞仪检测结果，我们推测：BMP2 促进 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元方向分化。

BMP2 可促进神经干细胞分化为神经元。Sailer 等[6]发现：1 ~ 10 ng/ml 浓度的 BMP2 可促进孕 16 d 大鼠胎脑大脑背侧皮质来源的神经前体细胞向神经元分化。在孕 16 d 大鼠大脑皮层发育中，BMP2 呈浓度依赖性分离细胞，1 ~ 10 ng/ml 浓度促进神经元和星型胶质细胞分化。BMP2 可快速促进体外分离培养的新皮层神经前体细胞向神经元的分化，可以引发室管膜层神经前体细胞向神经元分化。

那么 BMP2 促进 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化的分子机制如何呢？国外研究报道[7]：Mash1 突变鼠前脑神经元祖细胞严重缺失，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。那么在 BMP2 诱导 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化的过程中是否有 Mash1 的参与呢？不同浓度的 BMP2 诱导 SVZa 神经干细胞后，采用 RT-PCR 检测各组 Mash1 表达变化情况，结果显示：10 ng/ml BMP2 作用组 Mash1 表达最高，高于 BMP2 其他浓度作用组，提示10 ng/ml BMP2 可以明显促进 Mash1 的表达。而10 ng/ml BMP2 作用组，SVZa 神经干细胞分化为 GABA 能神经元的比例最高，由此我们推测：10 ng/ml 浓度的 BMP2 增强 SVZa 神经干细胞 Mash1 的表达，启动 SVZa 神经干细胞向神经元分化，即诱导 SVZa 神经干细胞分化为神经元祖细胞，而且参与 GABA 能神经元亚型的决定，这也许是 BMP2 促进 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化的部分原因。

参考文献：

[1] Lim D A, Tramontin A D, Trevejo J M, *et al*. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis[J]. Neuron, 2000, 28(3): 713 - 726.

[2] 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.

[3] Xin H, Li Y, Chen X, *et al*. Bone marrow stromal cells induce BMP2/4 production in oxygen-glucose-deprived astrocytes, which promotes an astrocytic phenotype in adult subventricular progenitor cells [J]. J Neurosci Res, 2006, 83(8): 1485 - 1493.

[4] 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.

[5] Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, *et al*. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse[J]. J Comp Neurol, 2003, 467(1): 60 - 79.

[6] Sailer M H, Hazel T G, Panchision D M, *et al*. BMP2 and FGF2 cooperate to induce neural-crest-like fates from fetal and adult CNS stem cells[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 24): 5849 - 5860.

[7] 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.

（编辑　栾　嘉）