论著

文章编号:1000-5404(2009)05-0394-04

# Id2在三碘甲状腺氨酸调节大鼠室管膜前下区神经干细胞分化中的作用

罗 雪,陈兴书,蔡其燕,钟善传,姚忠祥 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

**摘 要:目的** 探讨三碘甲状腺氨酸(triiodothyronine,$T_3$)对大鼠室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)神经干细胞(neural stem cells, NSCs)分化为少突胶质细胞的影响及转录因子Id2的表达变化。**方法** 离体培养新生大鼠SVZa来源的NSCs,应用免疫细胞化学技术观察加入$T_3$后对NSCs分化细胞种类、比例的影响,以及不同分化时间Id2表达的变化情况。**结果** 在正常自然培养的未分化NSCs中Id2表达较强,分化2h和12h时表达较弱,随后逐渐增强。加入$T_3$后,细胞分化加速,Id2表达较对照组高($P<0.05$),但此时少突胶质细胞数量增多,而星形胶质细胞数量减少。**结论** $T_3$可能通过增加Id2的表达从而促进体外培养的SVZa NSCs向少突胶质细胞分化,而抑制其向星形胶质细胞分化。

**关键词:** 神经干细胞;三碘甲状腺氨酸;Id2;分化

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

# Id2 expression in triiodothyronine mediated differentiation of rat neural stem cells derived from anterior subventricular zone

LUO Xue, CHEN Xing-shu, CAI Qi-yan, ZHONG Shan-chuan, YAO Zhong-xiang (Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of triiodothyronine ($T_3$) on the differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes and the changes of transcriptional factor, inhibitor of DNA binding-2 (Id2). **Methods** Neural stem cells from subventricular zone of new born Wistar rats were cultured *in vitro*, and the cell types and ratio of differentiated cells were observed after $T_3$ treatment as well as the changes of Id2 expression at different stages. **Results** The expressions of Id2 were strong in normal undifferentiated neural stem cells, and decreased at 2 h and 12 h after differentiation, then increased gradually again. $T_3$ accelerated the differentiation of neural stem cells, and the expression levels of Id2 were higher than those of the normal group. At the same time, the quantity of oligodendrocytes was increased while the quantity of astrocytes was decreased. **Conclusion** $T_3$ stimulates oligodendrocyte formation and inhibits astrocyte formation from neural stem cells, possibly through increasing Id2 expressions.

**Key words:** neural stem cells; thyroxine; (inhibitor of DNA binding-2; differentiation

甲状腺素(thyroxine)是哺乳动物脑发育中重要的调节因子[1,2],其主要成份为三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine,$T_3$),它对少突胶质细胞分化及髓鞘形成有重要作用。研究表明,$T_3$在转录水平对少突胶质细胞的髓鞘结构蛋白基因进行调节,从而调节中枢神经系统髓鞘形成[3]。

$T_3$可促进神经干细胞(neural stem cells, NSCs)向少突胶质细胞分化[4],但$T_3$仅在少突胶质细胞分化的几个有限的时间段调节髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)表达,提示$T_3$调节NSCs向少突胶质细胞分化可能还存在其他的靶基因。转录因子Id2(inhibitor of DNA binding-2)为螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix,HLH)转录因子的家族成员之一,缺乏结合DNA的碱性区域[5]。Id2可调控少突胶质细胞的分化、发育,有促进细胞增殖和抑制细胞分化的双重作用,在细胞分化的过程中该基因表达下降[6,7]。但$T_3$对NSCs分化的调节作用是否与Id2的表达有关还不清楚。因此,本研究以新生大鼠离体培养室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa) NSCs为研究对象,应用

基金项目:国家自然科学基金(30572364);重庆市自然科学基金(2007BB5008) Supported by the National Natural Science Foundation of China(30572364) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5008)

作者简介:罗 雪,女,重庆市人,助理实验师,主要从事神经干细胞发育分化方面的研究。电话:(023)68752229

通信作者:姚忠祥,电话:(023)68775266,E-mail: yaozhx@yahoo.com

收稿日期:2008-06-18;修回日期:2008-07-08

免疫细胞化学技术,观察加入 $T_3$ 后不同分化时间内细胞的分化类型、比例及 Id2 表达的变化,初步探讨加入 $T_3$ 对 NSCs 分化的影响及分化过程中 Id2 的表达情况,为进一步了解 $T_3$ 调控 NSCs 向少突胶质细胞分化的机制奠定基础。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验动物

新生 Wistar 大鼠 3 只,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供。

### 1.2　试剂和抗体

培养基:DMEM/F12 和 B27(Gibco)。生长因子:bFGF(Sigma 公司)。细胞黏附剂:多聚左旋赖氨酸(相对分子质量 3 000 ~7 000,Sigma 公司)。一抗:Id2 和 CC-1 (成熟少突胶质细胞标志物,Santa cruz 公司), GFAP(星形胶质细胞标志物,Sigma 公司), NF200(神经元标志物,中山公司)。荧光抗体:细胞核显示剂 DAPI(Sigma 公司),二抗 FITC 和 TRITC (中山公司)。

### 1.3　方法

1.3.1　SVZa NSCs 的分离与培养　　取新生大鼠,1% 戊巴比妥钠麻醉,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(厚约 1 mm ),找到 SVZa(紧邻侧脑室前外,颜色稍发白)并取材。用无菌手术刀片切碎,加入细胞培养液,用吸管轻轻吹打至大部分为单细胞悬液为止,200 目筛网过滤,台盼蓝染色后细胞计数。于 75 ml 培养瓶中加入 $2 \times 10^5$ 个细胞,加入 DMEM/F12 (1∶1)培养液,在每 6 ml 培养液中加入 B27 120 μl、20 ng/μl bFGF 6 μl,于 37℃、5% $CO_2$ 的孵箱内原代培养。待神经球(直径约 200 μm)形成后机械分离制作单细胞悬液,每培养瓶中加入 $1 \times 10^5$ 个细胞。此后每 3 ~5 天传代 1 次,培养条件同原代培养。

1.3.2　$T_3$ 诱导 SVZa NSCs 分化　　收集传代 2 ~3 次的 SVZa NSCs,换液后除留取几瓶正常培养和加入 $T_3$ 培养的细胞外,其余转入放有涂了 0.01% 多聚赖氨酸的盖玻片的培养皿内,同时撤除 bFGF,按以下分组进行诱导分化: ①正常对照组(自然分化);②加入 $T_3$(根据文献[3]选择最佳浓度为 $3 \times 10^{-8}$ mol/L),于 37℃、5% $CO_2$ 的孵箱内进行贴壁分化。各组诱导 0、2、12、24、48、72、96 h、7 d 后收集细胞。

1.3.3　免疫细胞化学染色　　收集同一时间不同分化组的细胞,用 Zamboni's 固定液固定细胞 2 h 以上,进行免疫荧光染色。分别以抗 Id2、GFAP、NF200 和 CC-1 等为一抗,羊抗兔 FITC、TRITC 为荧光二抗,对体外培养细胞行免疫荧光单、双标染色。盖玻片经 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min ×3 次,滴加封闭液(含 1% BSA、0.4% Triton X-100)室温孵育 30 min,滴加 Id2 一抗,37 ℃ 2 h 后入 4 ℃冰箱过夜。滴加羊抗兔 FITC 或 TRITC 荧光二抗,室温孵育 2 h。0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min ×3 次,加封闭液,室温孵育 30 min。滴加 GFAP、NF200 或 CC-1 等一抗,4 ℃ 24 h。漂洗 5 min ×3 次,滴加羊抗兔 FITC 或 TRITC 荧光二抗(与前一个二抗相异即可),37 ℃ 2 h。漂洗 5 min ×3 次,DAPI 染色细胞计数,以 75% 甘油/PBS 液封片。在 Olympus 荧光显微镜下观察,数码照相机摄像,双标照片 Photoshop 7.0 软件合成。各实验组均按本室常规设置阴性对照,阴性对照组包括不加一抗或加 IgG 蛋白[8],其余步骤相同。计数方法: 在 40 倍物镜下,于 1 张玻片的 4 个象限各选取 1 个视野,计算每个视野阳性细胞率,取平均值。阳性细胞率(%) = GFAP、NF200 或 CC-1 阳性细胞数 ÷ DAPI 阳性细胞数。用 Image Pro Plus 图像分析软件分析 Id2 染色结果。

### 1.4　统计学分析

染色强度以平均光密度(*OD*)值计算,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用医学统计软件 SPSS10.0 进行 $t$ 检验。

## 2　结果

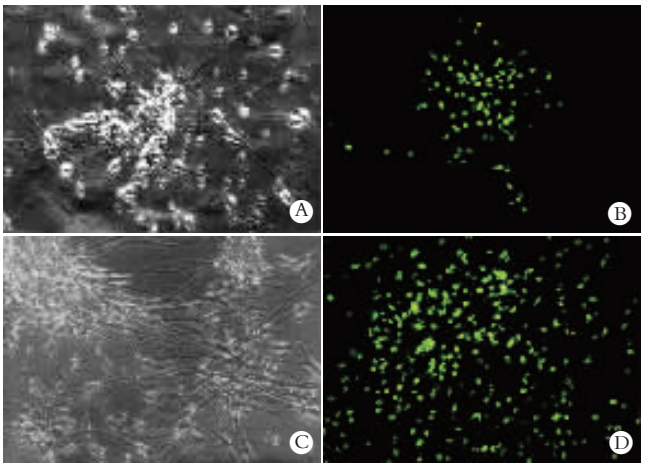
### 2.1　形态学观察

NSCs 在含 bFGF 和 B27 的无血清 DMEM/F12 培养基中培养,72 h 形成直径约 200 μm 的神经球,呈圆球状悬浮生长。加入 $T_3$ 分化 2 h 后,多数神经球贴壁,并长出很短的突起;而正常对照组自然分化的神经球只有半数左右贴壁。正常对照组自然分化 6、12、24、72 h(图 1A)后,各组细胞的突起逐渐生长、延长,加入 $T_3$ 后分化细胞的突起生长明显增快,与正常对照组相比均有统计学差异($P < 0.01$,图 1C,表 1)。分化 96h 后,$T_3$ 组以及正常对照组均可见分化细胞的突起相互交错生长,形成网络结构,难于准确测量其长度,但 $T_3$ 组沿干细胞球伸出的链状结构上有细胞交错生长,形似串珠,分化细胞的整体呈蜘蛛网状,突起增粗增长。

**表 1　正常对照组和 $T_3$ 组不同时相点 NSCs 分化细胞突起长度比较**(μm, $n = 120$, $\bar{x} \pm s$)

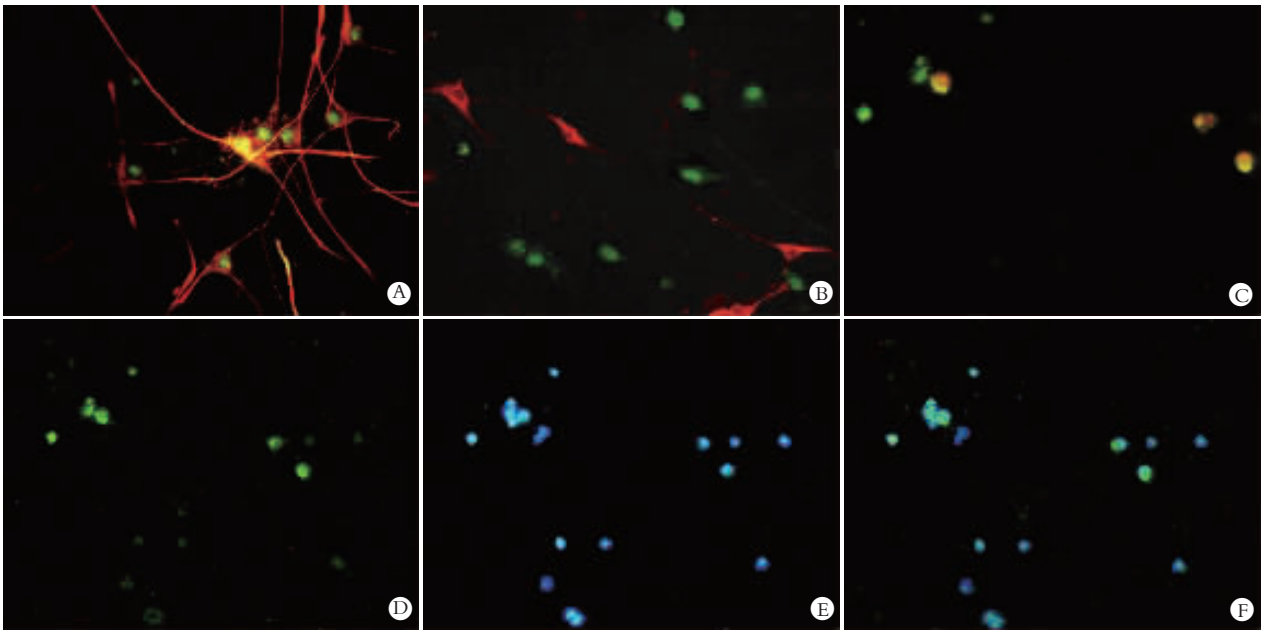
| 组别 | 分化时间 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 6 h | 12 h | 24 h | 72 h |
| 正常对照组 | 18.26 ±2.77 | 37.39 ±2.83 | 76.91 ±6.64 | 136.22 ±5.27 |
| $T_3$ 组 | 24.40 ±3.22[a] | 58.29 ±7.17[a] | 151.10 ±5.76[a] | 302.48 ±7.75[a] |

a:$P < 0.01$,与正常对照组比较




A:正常对照组自然分化 72 h 相差显微镜观察离体培养的 SVZa NSCs 形态; B:免疫荧光标记 Id2 在 SVZa NSCs 正常对照组自然分化 72 h 的表达情况;C:$T_3$ 组诱导 72 h 相差显微镜观察离体培养的 SVZa NSCs 形态;D:免疫荧光标记 Id2 在 $T_3$ 组的 SVZa NSCs 分化 72 h 的表达情况

**图 1　正常对照组和 $T_3$ 组对 SVZa NSCs 形态分化及 Id2 表达的影响**　(×200)




A:Id2(绿色)与 GFAP(红色)双标;B:Id2(绿色)与 NF200(红色)双标;C:Id2(红色)与 CC-1(绿色)双标;D:CC-1 阳性表达细胞;E:DAPI 染色细胞核;F:D 和 E 的重叠图像

**图 2 离体培养的 SVZa NSCs 中 Id2 与 GFAP、NF200、CC-1 的荧光双标及 DAPI 与 CC-1 双标** (×200)

**表 2 正常对照组和 $T_3$ 组不同时相点 Id2 阳性细胞平均光密度(*OD*)值表达变化($\bar{x} \pm s$)**

| 组别 | 未分化 | 分化时间 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 2 h | 12 h | 24 h | 72 h | 96 h | 7 d |
| 正常对照组 | 78.52±2.31 | 49.84±1.36 | 53.77±1.76 | 55.73±1.22 | 61.59±1.57 | 70.50±1.86 | 79.45±1.98 |
| $T_3$组 | 79.54±2.35 | 55.65±1.69[a] | 66.59±1.87[a] | 69.85±1.94[a] | 72.14±2.17[a] | 78.82±2.38[a] | 94.01±2.94[a] |

a:$P<0.05$,与正常对照组比较

### 2.2 $T_3$ 促进 SVZa NSCs 向少突胶质细胞分化

正常对照组 SVZa NSCs 分化为各型细胞的比例:$GFAP^+$ 星形胶质细胞约为 64%(图 2A),$NF200^+$ 神经元约为 15%(图 2B),$CC\text{-}1^+$ 少突胶质细胞所占比例约为 20%(图 2C)。加入 $T_3$ 后,SVZa NSCs 分化为各型细胞的比例:$NF200^+$ 神经元约为 18%,$GFAP^+$ 星形胶质细胞约为 40%,$CC\text{-}1^+$ 少突胶质细胞所占比例约为 40%(图 2D-F)。

### 2.3 Id2 在 SVZa NSCs 分化中的表达及 $T_3$ 对 Id2 表达的影响

在未分化的 NSCs 中,Id2 表达非常强烈,阳性反应呈球形,细胞形态不清。在分化的细胞中,正常对照组(图 1B)和 $T_3$ 组(图 1D)的 Id2 主要表达在细胞核中。经过图像分析进一步显示:在正常对照组的 SVZa NSCs 中,Id2 表达较强,在细胞自然贴壁分化 2 h 和 12 h,Id2 表达明显减弱,此后,随着细胞逐渐分化,Id2 的表达逐渐增强($P<0.05$)。加入 $T_3$ 后,在每个时间点上,Id2 表达都不同程度地较正常对照组增强($P<0.05$,表 2)。在离体培养 SVZa NSCs 分化细胞中,Id2 与 GFAP(图 2A)、CC-1(图 2C)都有共表达,而与 NF200(图 2B)基本无共表达。加入 $T_3$ 后,随着 $CC\text{-}1^+$ 少突胶质细胞所占比例增加,Id2 与 CC-1 共存数也增加,随着 $GFAP^+$ 星形胶质细胞所占比例减少,Id2 与 $GFAP^+$ 细胞共存数也减少。

## 3 讨论

SVZa 被公认为成年哺乳动物神经系统中 NSCs 最为集中的部位之一,具有自我分裂、自我复制、自我更新及自我维持能力,并具有多种分化潜能的特殊细胞群,能在体外分化为神经系统的各类细胞。NSCs 的分化是一个非常复杂的过程,是多因素与环境共同作用的结果[9]。Barres 等[10]认为,前体细胞增殖分化受"生物钟"机制调控,这个机制至少由 2 个组件组成:①计时组件,用于计量时间和计数细胞分裂次数;②效应组件,用于阻止细胞分裂。用有丝分裂因子(bFGF 等)作用而无疏水性信号($T_3$ 等)时,细胞维持干细胞状态。反之,则进入分化[11]。既无分裂原又无疏水性信号作用时,细胞也停止分裂。外源性信号还包括细胞因子类、神经递质类、神经活性肽类、黏附分子等单独或协调作用于 NSCs 的增殖分化,除外源性信号外,内源性信号可同样作用于此生物钟。

Id2 具有促进细胞增殖和抑制分化的双重作用,在细胞分化的过程中表达下降[12]。前期的研究证实,Id2 对少突胶质细胞的早期分化和髓鞘形成可能发挥

重要作用[8]。在本研究中,Id2 在 NSCs 有较强表达,细胞分化早期表达减弱,随后又逐渐增强,提示早期 Id2 的强表达可能具有促进 NSCs 增殖的作用,随后的弱表达可能和 NSCs 分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞后,由于 Id2 在 $NF200^+$ 神经元中不表达有关,分化 7 d 时表达略增强可能由于此时胶质细胞大量增殖,而 Id2 与大量 $GFAP^+$ 星形胶质细胞和 $CC\text{-}1^+$ 少突胶质细胞有共表达所致。加入 $T_3$ 后,$NF200^+$ 神经元数量变化不大;$GFAP^+$ 星形胶质细胞数量明显减少,而 $CC\text{-}1^+$ 少突胶质细胞数量明显增加($P < 0.05$),进一步提示 $T_3$ 促进 NSCs 向少突胶质细胞分化。加入 $T_3$ 后,Id2 表达较对照组高,可能主要是由于 Id2 与 $CC\text{-}1^+$ 少突胶质细胞共表达。不论是否有 $T_3$ 存在,Id2 的表达都是先降低,再升高,可能与 $T_3$ 促进 NSCs 向胶质细胞特别是少突胶质细胞分化而减少向神经元分化有关。

我们还观察到在分化的细胞中,正常对照组自然分化和加入 $T_3$ 组,Id2 主要表达在细胞核中,可能和 Id2 作为转录因子的功能状况有关。Id 蛋白的核定位受 E 蛋白介导的分子伴侣机制的调节[13,14]。E2A 蛋白缺乏,Id 在细胞质中表达。共转染核定位信号的 E47,诱导 Id 在核内表达。Id2 从核内迁移到胞质很可能是由于 E47 和 B bHLH 结合后 E47 下调,E47 下调从而使得 Id2 从核内迁移到细胞质。Id2 在核内和核外可能通过不同的途径起作用。当成熟促进因子存在的情况下,pRb 磷酸化释放与其结合的 E2F 使细胞进入细胞周期而增殖,当 Id2 被磷酸化进入胞核内与 E47 和未被磷酸化的 pRb 结合后从而抑制细胞分化。而当成熟促进因子不存在的情况下,pRb 又和 E2F 结合阻止细胞增殖;分化必须的 OligoD 和核内游离的 E47 和 pRb 结合从而使得 Id2 促进细胞分化。在静止期细胞,Id2 基因低表达,但有成熟促进因子刺激下,Id2 基因很快被诱导。

我们在培养的细胞体系内加入了促进干细胞增殖的 bFGF,而分化时则撤除了 bFGF。当有增殖信号 bFGF 时,Id2 与 pRb 结合或者与 E47 结合抑制细胞分化,促进细胞增殖,因此在培养的 NSCs 中,Id2 表达强;当撤出 bFGF 且加入 $T_3$ 后,Id2 不与 pRb 和 E47 结合,而 pRb 和 OligoD、E47 和 OligoD、pRb 和 E2F 结合后促进细胞分化。这可能是 $T_3$ 促进 NSCs 向少突胶质细胞分化过程中 Id2 表达变化的重要原因。尽管 Id2 在 $T_3$ 促进 NSCs 向少突胶质细胞分化过程中表达变化明显,但 $T_3$ 调节 Id2 表达变化的机制仍然不清楚,还需进一步的研究。

## 参考文献:


[1] Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function [J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007, 3(3): 249 – 259.

[2] Fernandez M, Pirondi S, Manservigi M, *et al*. Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat[J]. Eur J Neurosci, 2004,20(8):2059 – 2070.

[3] Farsetti A, Mitsuhashi T, Desvergne B, *et al*. Molecular basis of thyroid hormone regulation of myelin basic protein gene expression in rodent brain[J]. J Biol Chem,1991,266(34): 23226 – 23232.

[4] 刘奔,李兰英,刘春蓉,等. $T_3$ 对人神经干细胞分化为少突胶质细胞的影响[J]. 解剖学报,2003,34(2):213 – 216.

[5] Chaudhary J, Schmidt M, Sadler-Riggleman I. Negative acting HLH proteins Id 1, Id 2, Id 3, and Id 4 are expressed in prostate epithelial cells[J]. Prostate,2005,64(3):253 – 264.

[6] Mikami S, Hirose Y, Yoshida K, *et al*. Predominant expression of OLIG2 over ID2 in oligodendroglial tumors[J]. Virchows Arch, 2007, 450(5):575 – 584.

[7] Wang S, Sdrulla A, Johnson J E, *et al*. A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development[J]. Neuron, 2001,29(3):603 – 614.

[8] Chen X S, Zhou D S, Yao Z X. The inhibitor of DNA binding 2 is mainly expressed in oligodendrocyte lineage cells in adult rat brain[J]. Neurosci Lett,2007,428(2 – 3):93 – 98.

[9] Chen K, Hughes S M, Connor B. Neural progenitor cells derived from the adult rat subventricular zone: characterization and transplantation [J]. Cell Transplant,2007,16(8):799 – 810.

[10] Barres B A, Lazar M A, Raff M C. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development[J]. Development,1994,120(5):1097 – 1108.

[11] Benvenuti S, Luciani P, Cellai I, *et al*. Thyroid hormones promote cell differentiation and up-regulate the expression of the seladin-1 gene in in vitro models of human neuronal precursors[J]. J Endocrinol, 2008,197(2):437 – 446.

[12] Samanta J, Kessler J A. Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation[J]. Development,2004,131(17):4131 – 4142.

[13] Deed R W, Armitage S, Norton J D. Nuclear localization and regulation of Id protein through an E protein-mediated chaperone mechanism [J]. J Biol Chem,1996,271(39):23603 – 23606.

[14] Kurooka H, Yokota Y. Nucleo-cytoplasmic shuttling of Id2, a negative regulator of basic helix-loop-helix transcription factors[J]. J Biol Chem,2005,280(6):4313 – 4320.


(编辑　张　维)