论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0480-04

# BMP-2对室管膜前下区神经干细胞向多巴胺能神经元分化及对DLX5表达的影响

刘胜华,周 政,杨 辉,刘 俊,阴金波,辛志成 (第三军医大学新桥医院神经外科,重庆 400037)

**摘 要:目的** 探讨骨形成蛋白2(bone morphogenetic protein-2,BMP-2)对室管膜前下区(anterior subventricular zone,SVZa)神经干细胞(neural stem cells,NSCs)向多巴胺能神经元分化及对DLX5表达的影响。**方法** 体外培养SVZa NSCs,分为对照组、BMP-2组、BMP-2+Noggin组和Noggin组,通过免疫荧光染色和流式细胞术,观察其分化为酪氨酸羟化酶阳性($TH^+$)神经元的情况;用RT-PCR检测DLX5 mRNA表达水平。**结果** BMP-2组SVZa NSCs向$TH^+$神经元分化的比例和DLX5 mRNA表达水平均显著高于对照组($P<0.05$),且这种效应能被其拮抗剂Noggin特异性抑制。**结论** BMP-2可能通过上调DLX5表达水平从而促进SVZa NSCs向多巴胺能神经元分化。

**关键词:** 神经干细胞;室管膜前下区;多巴胺能神经元;DLX5;BMP-2

**中图法分类号:** R322.8;R329.2;R394.2 **文献标识码:** A

# Effects of BMP-2 on dopaminergic neuronal differentiation of neural stem cells from SVZa and on DLX5 expression

LIU Sheng-hua, ZHOU Zheng, YANG Hui, LIU Jun, YIN Jin-bo, XIN Zhi-cheng (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Millitary Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on dopaminergic neuronal differentiation of neural stem cells (NSCs) of anterior subventricular zone (SVZa) and expression of DLX5. **Methods** The neural stem cells from SVZa were separated and cultured *in vitro*, then divided into control group, BMP-2 group, BMP-2 + Noggin group, Noggin group. $TH^+$ neuronal differentiation of neural stem cells from SVZa was identified by immunofluorescence staining and flow cytometry. RT-PCR was employed to assay the expression of DLX5 mRNA. **Results** Both the percentage of $TH^+$ neurons and expression of DLX5 mRNA in BMP-2 group were much higher than those in control group ($P<0.05$). And those effects could be specifically blocked by BMP-2 antagonist Noggin. **Conclusion** BMP-2 may promote dopaminergic neuronal differentiation of neural stem cells of SVZa through upregulating DLX5.

**Key words:** neural stem cells; anterior subventricular zone; dopaminergic neuron; DLX5; bone morphogenetic protein-2

神经干细胞(neural stem cells,NSCs)移植治疗某些中枢神经系统疾病具有广阔的应用前景,但NSCs定向分化为多巴胺能神经元的调控机制尚未完全阐明,极大地限制了这一技术的应用。室管膜前下区(anterior subventricular zone, SVZa)是目前已知的NSCs富集区,此区NSCs产生后经嘴侧迁移流(rostral migratory stream)迁移到嗅球,最后在嗅球全部分化为嗅球中间神经元(包括多巴胺能神经元)。在调节SVZa NSCs向嗅球中间神经元迁移分化过程的诸多环境信号中,DLX5基因起着重要的作用[1-3]。主要存在于胞核表达的DLX5基因属转录因子类基因,通过诱导其下游基因如TH基因转录,使之表达嗅球中间神经元如$TH^+$中间神经元的表型特征,最终定向分化为嗅球中间神经元如多巴胺能神经元。

骨形成蛋白家族(bone morphogenetic proteins, BMPs)对神经干细胞的作用极为复杂,它既可促进其向神经元分化,也可以促进其向星形胶质细胞分化,这主要取决于神经细胞发育的阶段、取材部位及细胞所表达的特定转录因子[4,5]。本研究利用BMP-2及其拮抗剂Noggin诱导体外培养的SVZa NSCs分化,观察其分化为$TH^+$神经元情况,RT-PCR检测DLX5 mRNA表

基金项目:全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MB236)
Supported by the General Program of the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Sci & Tech Research of PLA (06MB236)
作者简介:刘胜华,男,四川省泸州市人,硕士研究生,主要从事神经发育、脑血管疾病方面的研究。E-mail: lg65036@126.com
通信作者:周 政,电话:(023)68774010,E-mail: bigbrain126@yahoo.com.cn
收稿日期:2008-07-14;修回日期:2008-08-17

达水平,观察其诱导 SVZa NSCs 向 $TH^+$ 神经元分化情况以及其与 DLX5 mRNA 表达水平的关系,希望为 SVZa NSCs 的定向分化机制提供一些实验资料。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验动物

SPF 级孕 15 d Wistar 大鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

### 1.2　主要实验试剂和抗体

DMEM/F12(1∶1)合成培养基(美国 HyClone 公司),标准胎牛血清(Gibco 公司),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF,美国 Peprotech 公司),B27 添加剂(Gibco 公司),BMP-2(美国 Peprotech 公司),重组人 Noggin(美国 Peprotech 公司),RT-PCR 试剂盒(Toyobo 公司),兔抗鼠-TH(武汉博士德生物工程有限公司),FITC 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉公司)。

### 1.3　实验方法

1.3.1　SVZa NSCs 的分离培养　　参照文献[6]方法。取清洁级孕 15 d Wistar 大鼠,1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉。备皮及消毒,取出胎鼠,D-Hanks 液漂洗。75% 乙醇浸透 5 s 消毒,固定于冰台,暴露胎鼠脑组织,解剖显微镜下辨认 SVZa,以手术显微剪和显微镊取材,在解剖显微镜下小心剥离胎鼠脑膜及血管组织,浸于 D-Hanks 液中,反复漂洗,然后将脑组织转移到 DMEM/F12(含终浓度为 20 μl/ml 的 B27 添加剂和 20 ng/ml 的 bFGF)无血清培养基中,吸管轻轻吹打机械分离,使大部分细胞分散为单细胞后,台盼蓝染色后在计数板上进行活细胞计数,于每瓶 (50 ml 培养瓶) 中加入 $4\times10^5$ 个活细胞,每瓶中加入上述无血清培养液 4 ~ 5 ml,于 37 ℃、5% $CO_2$、95% 湿度孵箱内进行原代培养。此后观察细胞生长情况,每 5 ~ 7 天传代 1 次。传代 3 代以后备用。

1.3.2　SVZa NSCs 的鉴定　　待细胞增殖形成悬浮球状克隆团后,免疫荧光染色法检测悬浮细胞球的 Nestin 表达。再用 10% 标准胎牛血清诱导分化后,检测 NSE、GFAP、Olig2 的表达,验证其多向分化潜能。

1.3.3　SVZa NSCs 诱导分化　　取体外培养传代 3 代后的 NSCs,离心收集,吸管轻轻吹打机械分离,使大部分细胞分散为单细胞,台盼蓝染色后在计数板上进行活细胞计数,按每瓶 $4\times10^5$ 个细胞接种于 1% 多聚赖氨酸包被的 50 ml 培养瓶或每孔 $1\times10^4$ 个细胞密度种植于含 1% 多聚赖氨酸包被的盖玻片 12 孔培养皿中,分为对照组、BMP-2 组、BMP-2 + Noggin 组和 Noggin 组,每组 6 瓶(对照组 9 瓶,其中 3 瓶作为将来流式细胞仪检测的空白对照)或 3 孔,分别加入分化培养液 DMEM/F12 + B27,DMEM/F12 + B27 + 10 ng/ml BMP-2,DMEM/F12 + B27 + 10 ng/ml BMP-2 + 100 ng/ml Noggin,DMEM/F12 + B27 + 100 ng/ml Noggin,每瓶 5 ml 或每孔 1.5 ml,分别置于 37 ℃、5% $CO_2$、95% 湿度孵箱内继续培养,待其分化 3 d 后进行免疫荧光染色和流式细胞计数。另一部分细胞按同样密度和培养液种植于 25 ml 培养瓶中,同样分为 4 组,每组 6 瓶,待其培养 72 h 后提取各组细胞总 RNA。

1.3.4　免疫荧光 $TH^+$ 神经元细胞染色　　取各组分化 3 d 的长有 $TH^+$ 神经细胞的盖玻片的 12 孔培养板,去掉培养液上清,0.01 mol/L PBS(pH 7.4)液漂洗,3 min × 2 次;10% 中性甲醛固定 15 min,0.01 mol/L PBS 液漂洗,5 min × 3 次;0.1% Triton X-100 的 PBS 漂洗 10 min;5% BSA 封闭 15 min,倾掉多余液体;加一抗 (兔抗鼠-TH,1∶100),4 ℃过夜;0.01 mol/L PBS 液漂洗,5 min × 3 次;加荧光二抗(山羊抗兔 FITC,1∶50),37 ℃孵育 60 min;0.01 mol/L PBS 液漂洗,5 min × 3 次;50% 甘油封片,荧光显微镜观察 $TH^+$ 神经元分化情况。

1.3.5　流式细胞仪技术检测 $TH^+$ 神经元分化情况　　取各组分化 3 d 的长有 $TH^+$ 神经细胞的 50 ml 细胞培养瓶,弃培养液上清,0.01 mol/L PBS 液洗涤贴壁细胞,用 0.25% 胰酶消化贴壁细胞,吸管吹打,机械分离细胞,含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 终止胰酶消化和封闭非特异性抗原,置于 5 ml 的 EP 管中 1 500 r/min,室温 5 min,收集细胞,弃上清;0.01 mol/L PBS 漂洗细胞,1 500 r/min,5 min × 3 次,弃上清;4% 多聚甲醛固定,室温,30 min;0.01 mol/L PBS 漂洗,5 min × 3 次;用含 0.1% Triton X-100 和 0.1% BSA 的 0.01 mol/L PBS 液在 37 ℃孵育 15 min,3 000 r/min,离心 5 min,收集细胞,弃上清;加入一抗(兔抗鼠-TH,1∶100),置于 4 ℃冰箱反应过夜;0.01 mol/L 的 PBS 液(含 0.1% Triton X-100)漂洗细胞,3 000 r/min,5 min × 3 次;加入二抗(山羊抗兔 FITC,1∶50),37 ℃孵育 2 ~ 3 h,0.01 mol/L PBS 液漂洗细胞, 3 000 r/min,5 min × 3 次,弃上清;1 ml 0.01 mol/L PBS 液重悬细胞;取少量细胞悬液涂片,在荧光显微镜下观察染色情况;染色成功后,用流式细胞仪检测阳性细胞数,每组 6 个样本,得到阳性细胞在总细胞中的所占比例。阳性率 = 阳性细胞/(阳性细胞 + 阴性细胞) - 空白对照组中的非特异结合率

1.3.6　RT-PCR 检测 DLX5 mRNA 表达变化　　收集各组处理 72 h 后的细胞,1 000 r/min,室温 5 min,吸除培养液上清,0.01 mol/L PBS 漂洗 1 遍,把细胞转入 1.5 ml Eppendorf 管中,提取该组 NSCs 的总 RNA,进行 RT-PCR 反应。使用大鼠 DLX5 (rDLX5)引物(上海生工生物工程技术公司合成):上游序列为 5′-TTATGCGGACTACGGCTACG-3′,下游序列为 5′-GGCAGGT-GGGAATTGATTGA-3′,退火温度为 53 ℃,543 bp,DLX5 cDNA 扩增条件为 94 ℃、5 min 循环 1 次;94 ℃、45 s,53 ℃、40 s,72 ℃、45 s,循环 35 次;72 ℃、7 min;同时以 GAPDH 为内参照进行质控和标化,GAPDH 引物(上海生工生物工程技术公司合成)的上游序列为:5′-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3′,下游序列为: 5′-TGACCT TGCCCACAGCCT TG-3′,退火温度为 58 ℃,产物大小为 443 bp , GAPDH cDNA 扩增条件为 94 ℃、5 min 循环 1 次;94 ℃、45 s,58 ℃、40 s,72 ℃、45 s,循环 28 次;72 ℃、7 min。反应条件:总体积 25 μl,5 × 反应缓冲液,dNTP 10 mmol/L,cDNA 模板 1 μg。20 μl 扩增产物在含溴乙锭为0.5 μg/ml 的 1.6% 琼脂糖凝胶上用 PCR 仪(Bio-Rad 公司)电泳分离,在凝胶成像分析仪(Bio-Rad 公司)上用 Quantity One 软件检测 DLX5 cDNA、GAPDH cDNA PCR 产物的 Volume(INT $mm^2$)值,DLX5 mRNA 表达的半定量值计算公式为:DLX5(INT $mm^2$)/GAPDH(INT $mm^2$)。

### 1.4　统计学方法

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素

方差分析。

## 2 结果

### 2.1 SVZa NSCs 的培养及鉴定

在无血清培养基中可见细胞呈球状克隆团样增殖，NSCs 特异性抗体 Nestin 荧光染色呈强阳性（图 1）。采用 10% 标准胎牛血清诱导分化后，免疫荧光检测 NSE、GFAP、Olig2 表达阳性，说明所培养细胞不但能自我更新，而且具有多向分化潜能，属于神经干细胞。

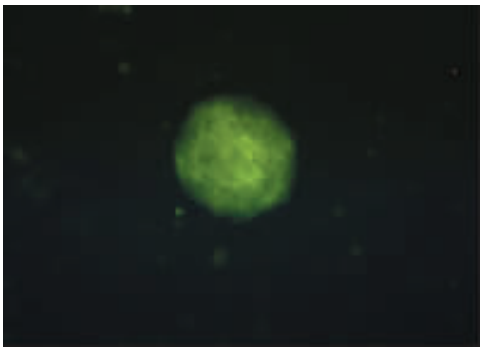


**图 1 免疫荧光染色镜下观察神经干细胞团** （×200）

### 2.2 SVZa NSCs 诱导分化后免疫荧光检测结果

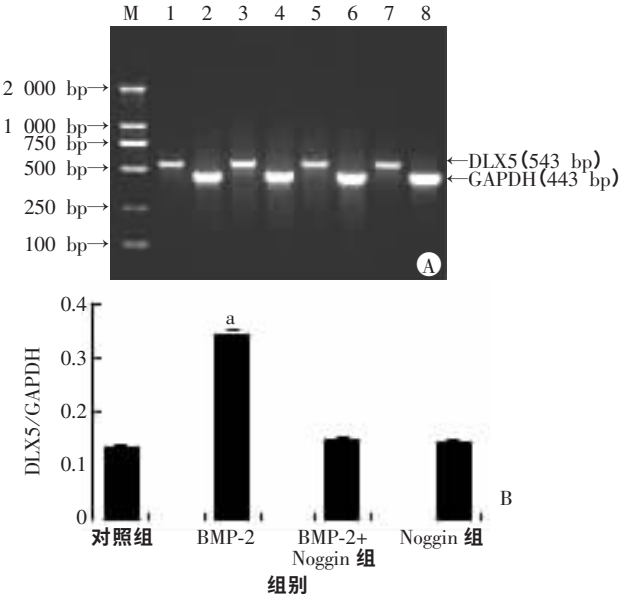
分化 3 d 后免疫荧光染色，镜下可见在 BMP-2 组有较多 $TH^+$ 细胞，其胞体呈圆形或卵圆形，发出较长突起，有双极细胞，也有多极细胞，少数为单极卵圆形，细胞突起相互连接呈网状，而对照组、BMP-2 + Noggin 组和 Noggin 组的 $TH^+$ 细胞明显较少（图 2）。

### 2.3 流式细胞检测结果

SVZa NSCs 分化为 $TH^+$ 神经元的比例为：对照组（3.01 ± 0.24）%，BMP-2 组（15.01 ± 0.47）%，BMP-2 + Noggin 组（3.13 ± 0.33）%，Noggin 组（3.04 ± 0.22）%。BMP-2 组 $TH^+$ 神经元分化比例与对照组、BMP-2 + Noggin 组和 Noggin 组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）；对照组、BMP-2 + Noggin 组和 Noggin 组神经元分化比例组间两两比较，差异无显著性（$P>0.05$）。

### 2.4 RT-PCR 检测结果

将 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，并对电泳图谱上的条带进行图像分析，计算各处理组 DLX5 mRNA 半定量值（$n=6$）。BMP-2 组 DLX5 mRNA 表达量明显高于对照组、BMP-2 + Noggin 组和 Noggin 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；对照组、BMP-2 + Noggin 组和 Noggin 组 DLX5 mRNA 表达量组间两两比较，差异无显著性（$P>0.05$，图 3）。

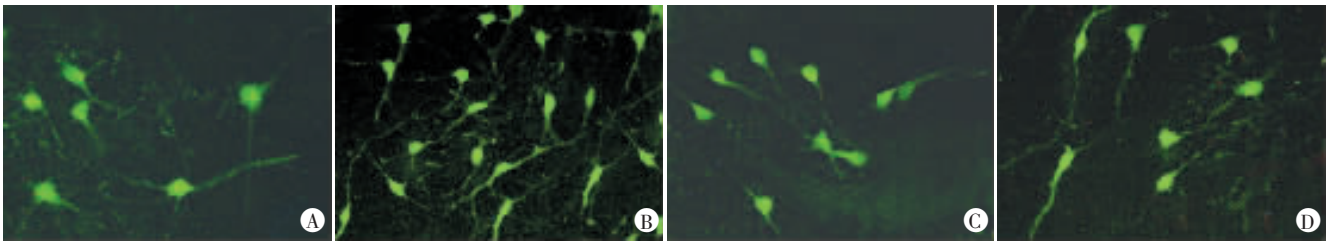



A：RT-PCR 检测结果　M：DNA 标准；1、3、5、7：分别为对照组、BMP-2 组、BMP-2 + Noggin 组、Noggin 组的 DLX5 cDNA；2、4、6、8：各组 GAPDH；B：DLX5 在不同处理组分化细胞中的表达　a：$P<0.05$，与其他组比较

**图 3 各组 DLX5 RT-PCR 检测结果及灰度值比较**

## 3 讨论

DLX5 基因主要编码与果蝇 distal-less 相关的同源盒转录因子，在中枢神经前脑发育过程中起着重要作用[7]。既往通过基因敲除鼠研究表明 DLX5 基因在 SVZa NSCs 向嗅球多巴胺能中间神经元分化过程中起着重要的作用[1-3]。但具体涉及 DLX5 在 SVZa NSCs 向多巴胺能神经元分化的分子调控机制尚少见相关报道。本实验中，我们首先观察了 BMP-2 及其拮抗剂 Noggin 诱导体外 SVZa NSCs 向 $TH^+$ 神经元的分化作用，结果表明：在诱导 3 d 后的 BMP-2 组，$TH^+$ 神经元分化比例明显高于对照组，而对照组、BMP-2 + Noggin 组和 Noggin 组 $TH^+$ 神经元分化比例无明显差异。这表明 BMP-2 对 $TH^+$ 神经元分化有明显的促进作用，而且这种作用能够被其拮抗剂 Noggin 所特异性地抑制。在 RT-PCR 实验中，BMP-2 组 DLX5 mRNA 表达水平也明显高于对照组，并且这种对 DLX5 mRNA 表达的诱导作用也被其拮抗剂 Noggin 所特异性地抑制。结




A：对照组；B：BMP-2 组；C：BMP-2 + Noggin 组；D：Noggin 组

**图 2 荧光显微镜下各组 $TH^+$ 免疫反应阳性细胞表达情况** （×400）

合既往研究发现 BMP-2 在 SVZa NSCs 向嗅球迁移分化的各部位均存在表达[8],故可以推测在 SVZa NSCs 向嗅球中间神经元如 $TH^+$ 神经元迁移分化过程中,BMP-2 可能通过上调 DLX5 的表达而促进 SVZa NSCs 向 $TH^+$ 神经元分化,即 BMP-2 通过与细胞膜上的特异性受体(BMPS)结合,将信号传导到胞内,促进细胞膜内 smads 家族成员的磷酸化,而后者形成功能复合物进入核内,进而调控主要在胞核表达的下游目标基因 DLX5 的转录,DLX5 基因再诱导 TH 基因转录,最终定向分化为多巴胺能神经元。

目前有关 BMP-2 在中枢神经系统发育中的作用报道各异,发现其对不同发育阶段和不同部位神经干细胞的作用并不相同。在原肠胚形成前及形成期间,BMP-2 信号抑制外胚层神经分化[9];在神经脊干细胞分化中,BMP-2 信号与神经胶质细胞的形成密切相关[10];在来源于体外培养的胚胎干细胞的早期神经前体细胞,BMP-2 抑制神经分化和促进周围神经元如胆碱能神经元等分化,而在高密度细胞培养和来源于体外培养的胚胎干细胞的晚期神经前体细胞,发现 BMP-2 促进星形胶质细胞产生[11];对体外培养 4 d 的胎鼠端脑神经上皮细胞,BMP-2 促进其向星形胶质细胞分化[12];对胚胎 12.5 d 前脑的皮层神经上皮细胞,BMP-2 促进神经元分化,促进星形胶质分化[13],而在室管膜区的神经祖细胞和脊髓神经前体细胞,BMP-2 促进其向神经元分化[14,15];在新生鼠 SVZa NSCs, BMP-2 促进其向 GABA 能神经元分化[16],而在 16 d 胎鼠 SVZa NSCs,BMP-2 明显促进其向神经元分化[17],并且明显促进其向 $TH^+$ 神经元分化[18]。本实验选用胚胎 15 d 室管膜前下区并经传代 3 代后的神经干细胞进行研究,发现 BMP-2 对 $TH^+$ 神经元的分化有明显促进,而选择 10 ng/ml 浓度是因为既往报道发现此浓度是 BMP-2 促进 SVZa NSCs 向 $TH^+$ 神经元分化的最佳作用浓度[18]。同时为了间接证明 BMP-2 在 SVZa NSCs 向 $TH^+$ 神经元分化过程中的作用及其与对 DLX5 mRNA 表达的关系,我们用对 BMP-2 具有最强的拮抗作用的拮抗剂 Noggin(100 ng/ml)[19] 拮抗 BMP-2(10 ng/ml)作用。近年来对离体胚胎干细胞的研究证实,Noggin 基因单独作用不能实现神经诱导和神经分化,其功能是通过拮抗 BMP-2/BMP-4 的作用实现的。BMP-2 可能与其拮抗剂 Noggin 组成一个平衡系统共同调节 SVZa NSCs 的分化[20]。

**参考文献:**


[1] Perera M, Merlo G R, Verardo S, *et al*. Defective neuronogenesis in the absence of Dlx5[J]. Mol Cell Neruosci, 2004, 25(1): 153 - 161.

[2] Levi G, Puche A C, Mantero S, *et al*. The Dlx5 homeodomain gene is essential for olfactory development and connectivity in the mouse[J]. Mol Cell Neruosci, 2003, 22(4): 530 - 543.

[3] Long J E, Garel S, Depew M J, *et al*. DLX5 regulates development of peripheral and central components of the olfactory system[J]. J Neurosci, 2003, 23(2): 568 - 578.

[4] Shah N M, Groves A K, Anderson D J. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members[J]. Cell, 1996, 85(3): 331 - 343.

[5] Mehler M F, Mabie P C, Zhu G, *et al*. Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage fate[J]. Dev Neurosci, 2000, 22(1 - 2): 74 - 85.

[6] 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.

[7] Panganiban G, Rubenstein J L. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes[J]. Development, 2002, 129(19): 4371-4386.

[8] 刘建军, 姚忠祥, 陈兴书, 等. BMP-2 在成年大鼠脑内 SVZa-RMS-OB 通路中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1656 - 1658.

[9] Di-Gregorio A. , Sancho M, Stuckey D W, *et al*. BMP signalling inhibits premature neural differentiation in the mouse embryo[J]. Development, 2007, 134(18): 3359 - 3369.

[10] Doss M X, Chen S, Winkler J, *et al*. Transcriptomic and phenotypic analysis of murine embryonic stem cell derived BMP2 + lineage cells: an insight into mesodermal patterning[J]. Genome Biol, 2007, 8(9): R184.

[11] Gossrau G, Thiele J, Konang R, *et al*. Bone morphogenetic protein-mediated modulation of lineage diversification during neural differentiation of embryonic stem cells[J]. Stem Cells, 2007, 25(4): 939 - 949.

[12] Fukuda S, Abematsu M, Mori H, *et al*. Potentiation of astrogliogenesis by STAT3-mediated activation of bone morphogenetic protein-Smad signaling in neural stem cells[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(13): 4931 - 4937.

[13] Li H, Grumet M. BMP and LIF signaling coordinately regulate lineage restriction of radial glia in the developing forebrain[J]. Glia, 2007, 55(1): 24 - 35.

[14] Li W, Cogswell C A, LoTurco J J. Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP [J]. J Neurosci, 1998, 18(21): 8851 - 8862.

[15] Kalyani A J, Piper D, Mujtaba T, *et al*. Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture[J]. J Neurosci, 1998, 18(19): 7856 - 7868.

[16] 陈锦华, 杨　辉, 尹昌林, 等. BMP2 在 SVZa 神经干细胞向 GABA 能神经元分化中的调控作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(8): 699 - 701.

[17] 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.

[18] 辛志成, 周　政, 刘　俊, 等. BMP2 在 SVZa 神经干细胞向 $TH^+$ 神经元分化中的作用[J]. 四川医学, 2007, 28(11): 1197 - 1199.

[19] Mabie P C, Mehler M F, Kessler J A. Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype[J]. J Neurosci, 1999, 19 (16): 7077- 7088.

[20] 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.


(编辑　邓强庭)