DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.003
第25卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 20
1784 2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)20-1784-04

SVZ神经干细胞分化过程中的Bmp4启动子活性分析

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

提 要:目的 室管膜下层(Subventricular zone,SVZ)神经干细胞分化过程中的Bmp4启动子活性分析及其与神经元分化的关系。方法 在构建Bmp4启动子——红色荧光蛋白报告载体基础上转染SVZ神经干细胞,动态地观察报告基因在SVZ神经干细胞分化过程中的表达,并进行显微计数和神经元标志物流式细胞仪检测。结果 SVZ神经干细胞贴壁分化过程中具有较高的Bmp4启动子活性,48 h阳性率达到8.6%,且明显高于皮层神经干细胞。SVZ神经干细胞的Bmp4启动子活性与神经元分化高度正相关($r=0.805$, $P<0.05$),皮层神经元分化与Bmp4启动子活性相关不明显。结论 采用启动子活体荧光标记,能够较好地反映正常情况下内在蛋白的表达情况;Bmp4启动子活性与SVZ神经干细胞向神经元的分化高度相关,显示Bmp4在SVZ神经干细胞分化过程中的独特作用。

关键词:室管膜下层;神经干细胞;骨形成蛋白;红色荧光蛋白
中图法分类号:R322.85;R329.2;R394.3 文献标识码:A

Activity of Bmp4 promotor in differentiation of SVZ neural stem cells

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

Abstract: Objective To analyze the activity of Bmp4 (Bone morphogenetic protein) promotor in differentiation of subventricular zone (SVZ) neural stem cells and its relation to neuron differentiation. Methods SVZ neural stem cells were transfected using reporter vector conjugating Bmp4 promotor and red fluorescence protein. Expression of red fluorescence protein was traced continuously in the living cells and the positive cell number was counted microscopically. Neuron-specific enolase (NSE) positive cells were also detected by flow cytometry. Results Higher activity of Bmp4 promotor in differentiation of SVZ neural stem cells was detected, as compared with that of the cortex neural stem cells. The maximal positive ratio reached 8.6% in SVZ. Significant relation between Bmp4 promotor activity and neuron differentiation was found in SVZ neural stem cells ($r=0.805$, $P<0.05$), but not in cortex. Conclusion Fluorescence labeling of the living cells using Bmp4 promotor conjugating red fluorescence protein is a good way to reflect the integrated protein expression. Bmp4 promotor activity is closely related to neuron differentiation, suggesting that Bmp4 plays an important role in differentiation of SVZ neural stem cells.

Key words: subventricular zone; neural stem cells; bone morphogenetic proteins; red fluorescence protein

神经干细胞不仅存在于发育中的哺乳动物神经系统,而且还存在于成年哺乳类动物神经系统[1],其中,位于侧脑室附近的室管膜下层(Subventricular zone,SVZ)是目前公认的成年个体神经干细胞最为集中的地方,因此,SVZ神经干细胞成为研究神经发育的理想模型之一。骨形成蛋白家族(Bone morphogenetic proteins,Bmps)是影响神经发育的重要基因组之一,在神经系统发育的不同时期、不同部位,Bmps均起着相当重要的作用。已有较多研究报道Bmp2和Bmp4调控神经干细胞向胶质细胞分化,但在SVZ却缺乏相关报道。本研究在构建Bmp4启动子——红色荧光蛋白报告载体基础上转染SVZ神经干细胞,动态地观察报告基因在SVZ神经干细胞分化过程中的表达及其与神经元分化的关系,以期明确Bmp4对SVZ神经干细胞分化的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30130110)
Supported by a grant from National Natural Science Foundation of China(30130110)
作者简介:刘仕勇(1973-),男,四川省长宁县人,博士研究生,主治医师,主要从事神经干细胞方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68774610
通信作者:杨 辉,电话:(023)68755610;E-mail:yanghxqh@cta.cq.cn
收稿日期:2003-05-15;修回日期:2003-09-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料和方法

1.1　实验动物

健康昆明种新生小鼠(P0 d), 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

DMEM/F12 和 B27(Gibco)、bFGF(Sigma)、胎牛血清(杭州四季青生物材料研究所)。FITC 荧光二抗(中山公司), 抗 NSE (Neuron-specific enolase, NSE) IgG 由 Promega 公司提供。FuGene6 (非脂质体配方)来源于 Roche 公司。

1.3　质粒来源

pDsRed2-1(无启动子)购自 Clontech 公司, Bmp4 启动子质粒由 Ebara 教授(Shinshu University School of Medicine, Japan)惠赠。

1.4　实验方法

1.4.1　SVZ 神经干细胞的分离培养　　参照 Luskin 的方法, 稍作改进。新生小鼠经碘酊、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 SVZ(紧邻侧脑室前外, 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 2×10^5 个细胞, 培养液采用 DMEM/F12(1∶1)加 B27 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 1×10^5 个细胞。此后每 5~7 天机械分离克隆传代 1 次, 方法同前。

同时取皮层组织, 按上述方法培养皮层神经干细胞。

1.4.2　pDsRed-Bmp4 pro 质粒构建　　经 *Kpn*1 和 *Xba*1 双酶切, 将 1 745 bp 的 Bmp4 启动子连接到 pCDNA3.1 载体(由于受酶切位点的限制, 构建经 pCDNA3.1 过渡), 再经 *Hind* Ⅲ和 *Apa*1 双酶切, 将启动子连接到红色荧光蛋白载体上, 双酶切证实连接成功。

1.4.3　转染 SVZ 神经干细胞　　按试剂说明书进行, 取 6 μl FuGene 6 稀释于 100 μl 无血清培养基(无抗生素), 加入 3 μg 质粒 DNA, 室温下静置 20 min。收集细胞, 种植于 6 孔培养板(1×10^5 个细胞/孔), 将上述的 FuGene 6-DNA 复合物加入培养板, 混匀后置孵箱培养。24 h 后加入 10%有血清培养基使神经干细胞贴壁分化。

1.4.4　荧光显微镜动态观察　　于贴壁 4、12、24、36、48、60、72、96 h 后荧光显微镜下动态观察, 并进行显微细胞计数: 计算 10 个视野(100 倍, 随机抽取)的平均阳性细胞数, 乘以 200(6 孔培养板的视野数), 即为总阳性细胞数。

1.4.5　流式细胞仪检测　　分别于贴壁 4、12、24、36、48、60、72、96 h 后用 0.25% 胰酶消化培养孔内细胞, D-Hank 液漂洗 1 500 r/min, 离心 5 min, 重复 3 次后行 NSE 免疫荧光染色标记(按蔡文琴的方法进行), 混匀后采集样本, 用 FACstar 流式细胞仪检测, 每组取 3 个样本, 每样本计数 10 000 个细胞, 并计算其阳性率(应减去阴性免疫对照中的非特异性结合率)。

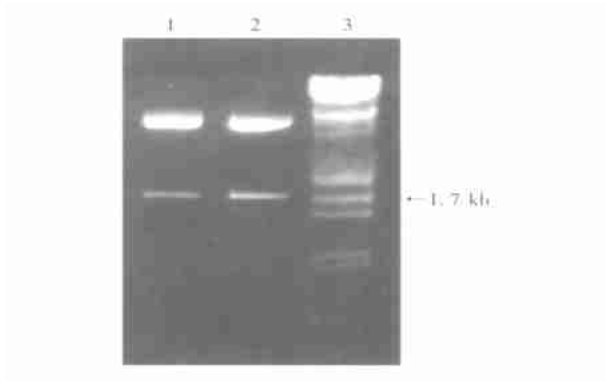
1.5　统计学处理

采用 SPSS 软件包分析, 作直线相关分析和 χ^2 检验。

2　结果

2.1　pDsRed-Bmp4 pro 质粒酶切鉴定

连接后的质粒采用 *Hind* Ⅲ和 *Apa*1 双酶切, 电泳鉴定片段长度为 1.7 kb, 见图 1。



1, 2: pDsRed-Bmp4 pro+ *Apa* Ⅰ + *Hind* Ⅲ;
3: λDNA/*Eco* RⅠ + *Hind* Ⅲ Marker

图 1　pDsRed-Bmp4 pro 质粒双酶切电泳图谱

Fig 1　Restrictive digestion of pDsRed-Bmp4 pro

2.2　荧光显微镜动态观察结果

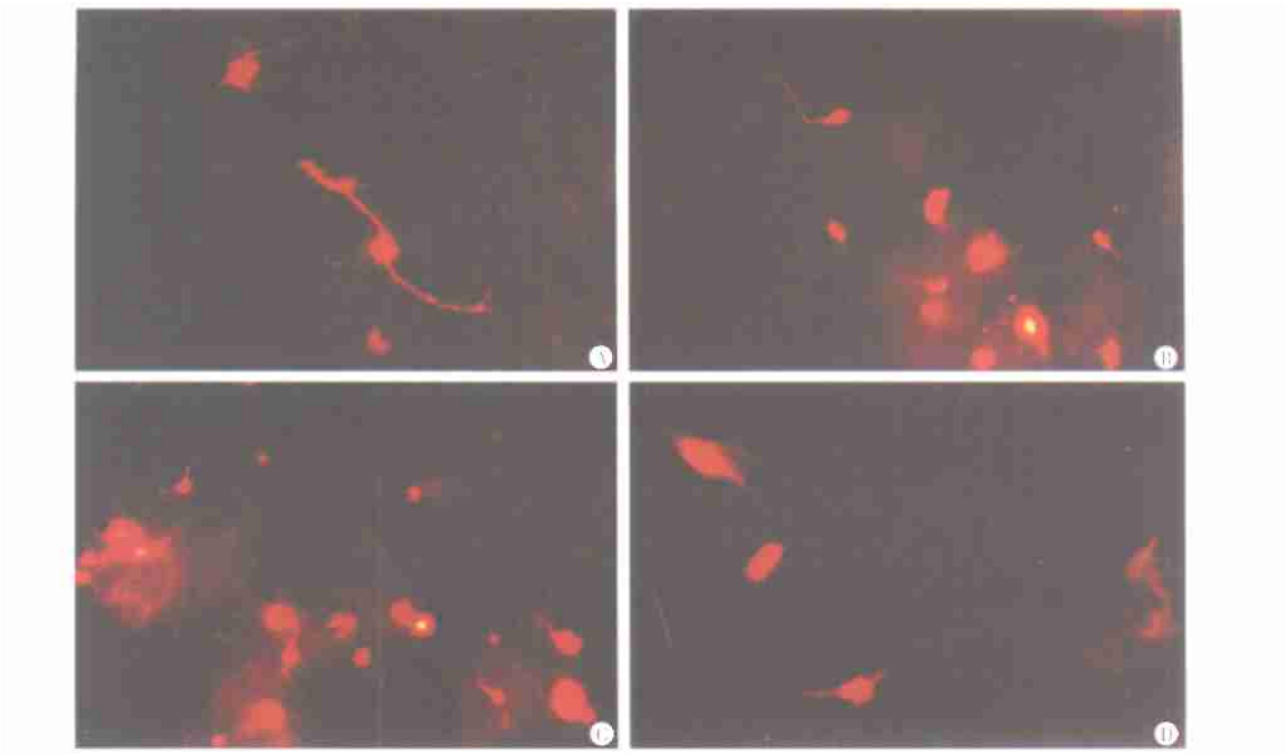
SVZ 神经干细胞和皮层神经干细胞转染 pDsRed-Bmp4 pro 质粒, 贴壁 4 h 后未见到阳性细胞, 贴壁分化 12 h 后见到极少量红色荧光细胞, 荧光强度较亮, 可清楚地看到细胞突起。24~48 h 后 SVZ 神经干细胞培养孔中阳性细胞明显增多, 荧光蛋白表达高峰期在 48 h, 48 h 后迅速减弱, 5 d 后基本消失, 红色荧光蛋白主要表达于神经元样细胞中, 可见到其粗长突起, 见图 2; 少量表达于胶质细胞; 荧光较弱。在皮层对照组中, 荧光相对于 SVZ 较弱, 24~48 h 后阳性细胞有所增加, 主要表达于胶质细胞, 神经元样细胞增加不明显, 72 h 后达到高峰, 随后下降。

显微细胞计数结果显示证实了上述趋势, 在 SVZ 神经干细胞分化过程中, 贴壁分化 12 h 后每培养孔仅有 800 阳性细胞, 阳性率为 0.8%, 24 h 后激增为 4 800 个阳性细胞, 48 h 后达到 8 600, 阳性率为 8.6%。皮层组中, 贴壁 24 h 后阳性细胞数为 1 600, 到高峰值也仅为 2 200, 阳性率 2.2%。具体结果见表 1。

2.3　流式细胞仪检测结果

分别于贴壁后 4、12、24、36、48、60、72、96 h 行 NSE 免疫荧光染色标记, 流式细胞仪检测结果表明, SVZ 神经干细胞分化为神经元的比例随着时间的增加而增加, 在 24~48 h 时增加明显, 48 h 后增加速度明显减慢, 神经元的增加数与 Bmp4 启动子活性明显正相关, 相关系数为 0.805($P<0.05$), 而皮层神经干细胞分化为神经元的数目明显低于 SVZ 神经干细胞, 24~72 h 时神经元数目逐渐增加, 此后至 96 h 无明显变化, 神经元的增加数与 Bmp4 启动子活性相关不明显。具体结果见表 1 和图 3、4。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



A：12 h after attachment；B：24 h after attachment；C：48 h after attachment；D：96 h after attachment

图 2 SVZ 神经干细胞分化后的神经元表达红色荧光蛋白 （× 400）

Fig 2 Expression of red fluorescence protein by neurons after differentiation of SVZ neural stem cell （× 400）

表 1 Bmp4启动子活性与神经元分化的相关性

Tab 1 Relation between Bmp4 promotor activity and neuron differentiation

Time of examination (h)	SVZ neural stem cell		Cortex neural stem cell	
	Micrometry	Flow cytometry ($\bar{x}\pm s$, %)	Micrometry	Flow cytometry ($\bar{x}\pm s$, %)
4	0	14.5±1.7	0	12.3±2.1▲
12	800	15.4±1.8	1 000	12.8±2.4▲
24	4 800	20.6±2.6	1 600▲	17.6±2.7▲
36	7 600	29.1±2.9	2 000▲	23.3±2.7▲
48	8 600	39.3±3.7	2 200▲	28.6±3.3▲
60	6 400	44.9±3.2	1 800▲	30.8±2.8▲
72	4 200	47.9±4.1	1 000▲	31.4±3.0▲
96	1 600	48.7±3.0	600▲	30.9±3.5▲

▲：$P<0.05$ *vs* SVZ neural stem cell

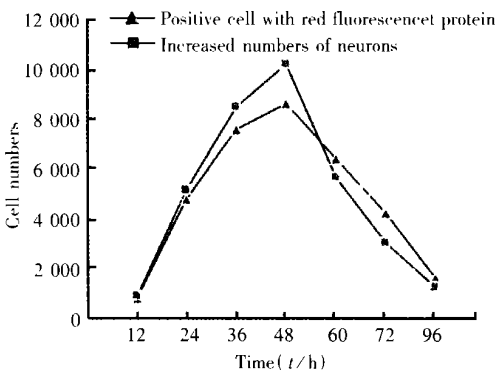


图 3 Bmp4启动子活性与神经元分化的相关性（SVZ 神经干细胞）$r=0.805$ $P<0.05$

Fig 3 Relation between Bmp4 promotor activities and increased number of neurons (SVZ neural stem cells) $r=0.805$ $P<0.05$

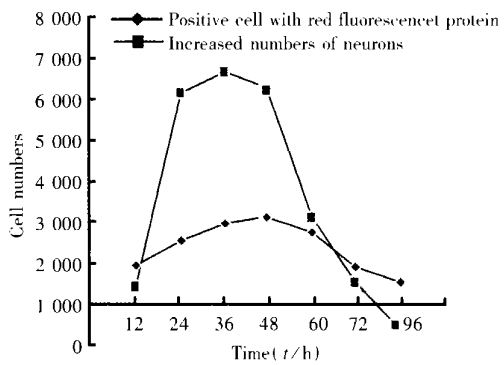


图 4 Bmp4启动子活性与神经元分化的相关性（皮层神经干细胞）$r=0.202$ $P>0.05$

Fig 4 Relation between Bmp4 promotor activities and increased number of neurons (Cortex neural stem cells) $r=0.202$, $P>0.05$

3 讨论

近年来活体荧光标记技术被广泛地应用于神经科学研究，在绿色荧光蛋白（Green fluorescence protein，GFP）基础上，又相继发展了红色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白和黄色荧光蛋白，这些蛋白的表达对组织和细胞无明显毒性作用，这使人们能在活体动态地观察细胞的各种生理活动[2,3]。目前普遍使用的融合蛋白技术，即将目的基因序列和荧光蛋白序列相连，使其表达为

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

融合蛋白, 借助于荧光蛋白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[2,3]。但采用融合蛋白等技术研究基因功能时, 将可能带入外来目的基因, 这与细胞的正常生理状态存在差异, 过多的外来基因可能干扰细胞的生理活动, 因而不能很好地反映活细胞正常的生理活动, 并可能导致研究结果的偏差[3]。由于基因 DNA 转录的启动需要蛋白与其启动子的特异性结合, 因而启动子的活性能够反映基因蛋白的表达状况, 利用这个原理, 本研究将 Bmp4 的启动子与本身无启动子的红色荧光蛋白连接, 用 Bmp4 的启动子来启动荧光蛋白的表达, 间接地反映 Bmp4 蛋白在神经干细胞的表达情况, 获得了较为满意的结果, 出现了较多红色荧光蛋白阳性细胞, 不仅实现了活体荧光标记, 而且能较好地反映正常情况下内在蛋白的表达情况。

以 Bmp4 代表的骨形成蛋白家族是影响神经发育的重要基因组之一, 从神经板的诱导到神经系统发育成熟的不同时期、不同脑区, Bmps 均起着相当重要的作用[4,5]。本实验结果表明, 从 SVZ 和皮层分离的神经干细胞均有较高的 Bmp4 启动子活性, 荧光蛋白阳性率分别达到 8.6%和 2.2%, 如果再参照质粒转染效率(我们采用 GFP 作为阳性对照, 转染效率约为 26%, 结果未显示), 即在转染成功的 SVZ 神经干细胞中有近 1/3 的细胞表达荧光蛋白, 有接近 9%的皮层神经干细胞表达荧光蛋白, 这显示在 SVZ 和皮层均有较高的 Bmp4 表达。SVZ 神经干细胞 Bmp4 启动子的活性明显高于皮层, 表明 Bmp4 在 SVZ 神经干细胞发育过程中起着更为重要的作用。由于 SVZ 在出生后乃至成年依旧存在大量神经干细胞, 因此本实验从新生小鼠 SVZ 分离的干细胞的纯度要高于皮层, 也可能是 SVZ 神经干细胞分化过程中 Bmp4 启动子活性更高的原因之一。

目前 Bmp4 诱导神经干细胞分化的报道来看, 大多倾向于使干细胞向星形胶质细胞分化, 但在某些区域如神经嵴却是例外, Bmp4 促使干细胞向交感神经元分化[6~9]。本实验结果表明, 在 SVZ 神经干细胞, Bmp4 启动子活性与干细胞向神经元分化高度相关, 相关系数达到 0.805($P<0.05$), 而在皮层却不明显, 这显示 Bmp4 在 SVZ 神经干细胞分化为神经元过程中的独特作用。Bmp4 影响 SVZ 神经干细胞向神经元分化的原因尚不清楚, 存在以下两种可能, 一为 Bmp4 直接促进神经干细胞向神经元分化, 另一可能为 Bmp4 促使干细胞退出细胞分裂周期, 由于从 SVZ 分离的细胞中含有较多已定向神经元的祖细胞, 因而退出细胞分裂周期可以增加成熟神经元的分化比例[3]。根据 Mckay 的观点, Bmp 可以调节干细胞增殖和分化之间的平衡, Bmp 与 1A 受体结合产生增殖作用, 1A 受体激活的同时启动 1B 受体的表达, 当 1B 受体超过 1A 受体时, 促使神经前体细胞退出细胞周期分化为成熟神经细胞, 而本实验结果亦似乎支持这种观点, 在 SVZ 神经干细胞表达高浓度的 Bmp4, 较早启动 1B 受体的激活, 使之退出细胞周期分化为神经元[3]。

参考文献:

[1] 周德山, 蔡文琴. 干细胞基础与应用研究的一些进展[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(1): 1—3.

[2] Horn C, Schmid B G, Pogoda F S, *et al*. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis[J]. Insect Biochem Mol Biol, 2002, 32(10): 1221—1235.

[3] Spergel D J, Kruth U, Shimshek D R, *et al*. Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical, and physiological studies[J]. Prog Neurobiol, 2001, 63(6): 673—686.

[4] Panchision D M, McKay R D. The control of neural stem cells by morphogenic signals[J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12(4): 478—487.

[5] Faure S, de Santa Barbara P, Roberts D J, *et al*. Endogenous patterns of BMP signaling during early chick development[J]. Dev Biol, 2002, 244(1): 44—65.

[6] Gomes W A, Mehler M F, Kessler J A. Transgenic overexpression of Bmp4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment[J]. Dev Biol, 2003, 255(1): 164—177.

[7] Bronner F M. Molecular analysis of neural crest formation[J]. J Physiol Paris, 2002, 96(1-2): 3—8.

[8] Ohnemus S, Kanzler B, Jerome M L A, *et al*. Aortic arch and pharyngeal phenotype in the absence of BMP-dependent neural crest in the mouse[J]. Mech Dev, 2002, 119(2): 127—135.

[9] Coskun V, Venkatraman G, Yang H, *et al*. Retroviral manipulation of the expression of bone morphogenetic protein receptor Ia by SVZa progenitor cells leads to changes in their p19(INK4d) expression but not in their neuronal commitment[J]. Int J Dev Neurosci, 2001, 19(2): 219—227.

(编辑　王　红)

离心机转速的写法及相对离心力的正确表示

有的作者将离心机转速用 rpm 表示, 这已是非法定单位写法了。正确的写法是: 当低速离心时用 r/min 表示; 当高速或超速离心时用相对离心力"×g"表示, g 是斜体, 前面是乘号。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net