DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.005
第25卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 20
1788 2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)20-1788-04

BMP2在SVZa神经干细胞向神经元分化中的作用

张治元,杨 辉,刘仕勇,何家全,王 彬,张可成 (第三军医大学附属新桥医院神经外科,重庆 400037)

提 要:目的 研究BMP2在室管膜前下区(SVZa)神经干细胞向神经元分化中的作用,提高SVZa神经干细胞分化为神经元的比例。方法 体外分离培养SVZa神经干细胞,以不同浓度的BMP2诱导SVZa神经干细胞,采用免疫荧光和流式细胞仪技术,检测SVZa神经干细胞分化为神经元的比例。结果 BMP2浓度为1~10 ng/ml时SVZa神经干细胞分化为神经元的比例均高于0 ng/ml,10 ng/ml时达到最高峰,20~100 ng/ml时SVZa神经干细胞分化为神经元的比例亦高于0 ng/ml,但呈下降趋势。结论 BMP2可以促进SVZa神经干细胞向神经元分化,可以明显提高分化为神经元的比例。

关键词:神经干细胞;BMP2;SVZa;分化;神经元
中图法分类号:R322.85;R329.2;R394.3 文献标识码:A

Roles of BMP2 in the differentiation of the neural stem cells of SVZa

ZHANG Zhi-yuan, YANG Hui, LIU Shi-yong, HE Jia-quan, WANG Bin, ZHANG Ke-cheng (Department of Neurosurgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of BMP2 in the differentiation of the neural stem cells of Anterior subventricular zone (SVZa) and to improve the rate of neuronal differentiation of neural stem cells. Methods The neural stem cells of SVZa were separated and cultured *in vitro*. The neural stem cells of SVZa were induced by different concentrations of BMP2. The neuronal rate of differentiation of the neural stem cells of SVZa was detected by immunofluorescence and flow cytometry (FCM). Results BMP2 could promote neuronal differentiation of neural stem cells of SVZa at the concentrations of 1~10 ng/ml. The rate of neuronal differentiation peaked when the concentration of BMP2 was 10 ng/ml. BMP2 at the concentrations of 20~100 ng/ml could significantly promote the neuronal differentiation too, but the neuronal differentiation rate decreased. Conclusion BMP2 can promote the neuronal differentiation of the neural stem cells of SVZa and the rate of neuronal differentiation of neural stem cells of SVZa significantly as well.

Key words: neural stem cells; BMP2; SVZa; differentiation; neuron

室管膜前下区(Anterior subventricular zone, SVZa)是目前公认的成年哺乳动物神经系统中神经干细胞最为集中的部位,因此这个部位成为神经干细胞研究的重点。但是关于SVZa神经干细胞如何特异性向神经元方向分化的分子机制,目前尚未阐明。骨形成蛋白2(Bone morphogenetic protein 2, BMP2)以及它的受体、配体、生理拮抗剂noggin在中枢神经系统的特异表达,表明BMP2在调控中枢神经系统发育中发挥重要作用[1]。关于BMP2在SVZa神经干细胞向神经元分化中的作用,目前尚未见确切的研究报道。本实验通过体外培养SVZa神经干细胞,采用不同浓度的BMP2诱导SVZa神经干细胞,研究BMP2在SVZa神经干细胞向神经元分化中的作用,探讨SVZa神经干细胞的分化机制,为今后神经干细胞定向诱导分化和临床中枢神经移植奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

优等胎牛血清(Hyclone公司,美国),BMP2蛋白(Roche公司,德国),B27、合成培养基DMEM/F12(Gibco,美国),bFGF、NSE抗体、TritoonX-100、左旋多聚赖氨酸、胰蛋白酶(Sigma,美国),FITC抗体、Cy3免疫荧光染色试剂盒(博士德公司),荧光显微镜(OLYMPUS,日本),流式细胞仪(FACstar PLUS型)(Becton Dickison公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 SVZa神经干细胞的分离培养 参照文献[2]方法,取胚胎16 d Wistar大鼠(第三军医大学实验动物中心提供),1%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射麻醉,备皮、消毒,取出胎鼠,D-

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:张治元(1975-),男,山西省定襄县人,硕士研究生,助教,主要从事神经干细胞的分化调控方面的研究。电话:(023)65203369
通信作者:杨 辉,电话:(023)68755610;E-mail:yanghxqh@cta.cq.cn
收稿日期:2003-07-03;修回日期:2003-09-18

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

Hank 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, 在解剖显微镜下剥离脑膜和血管组织, 浸于 D-Hank 液中, 反复漂洗, 然后将脑组织转移到 DMEM/F12(1∶1)+B27+bFGF(20 ng/ml)的无血清培养基, 吸管吹打机械分离制作单细胞悬液, 台盼蓝染色后在多马计数台上进行活细胞计数, 于每培养瓶中(75 ml 培养瓶)加入 5×10^5 个活细胞, 每瓶中加入上述无血清培养液 5~7 ml 进行原代培养。

1.2.2　SVZa 神经干细胞的传代培养　待原代克隆形成后再次使用吸管吹打机械分离克隆, 相差显微镜下观察显示为单细胞悬液, 计数后每培养瓶中加入 5×10^5 个活细胞。此后每 6~9 天机械分离克隆传代 1 次, 仍采用无血清培养基。

1.2.3　SVZa 神经干细胞的鉴定　免疫荧光染色, 检测 Nestin 的表达, 10%胎牛血清诱导其分化后, 检测 NSE、GFAP、CNP 的表达, 验证其多分化潜能。

1.2.4　不同浓度 BMP2 诱导 SVZa 神经干细胞向神经元分化　取第 3 代纯化的 SVZa 神经干细胞, 离心收集神经干细胞, 吸管机械吹打分离, 制备单细胞悬液, 记数板镜下计数, 6 孔培养板每 3 孔为一个标本, 共计 100 万个细胞, 培养液为新鲜的含 10%胎牛血清 DMEM/F12 培养液, 设 0、1、5、10、20、100 ng/ml 的 BMP2 浓度梯度, 每孔 2 ml 培养液。每个浓度设 3 组, 0 浓度共设 6 组, 其中 3 组作为将来流式细胞仪检测的空白对照, 培养 3 d, NSE 免疫荧光染色, 流式细胞仪检测分化为神经元的百分率。将第 3 代同样数目的 SVZa 神经干细胞接种于预先用 1%多聚赖氨酸处理的盖玻片上, 设同样的 BMP2 浓度梯度, 加含 10%胎牛血清的新鲜 DMEM/F12 培养液, 于 6 孔培养板中培养 3 d 后, 行 NSE 的 Cy3 免疫荧光染色。

1.2.5　流式细胞仪检测 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例　弃培养液上清, D-Hank 液洗涤贴壁细胞; 以 0.25%胰酶消化贴壁细胞, 吸管吹打, 机械分离细胞, 同种血清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, 5 min, 室温收集细胞, 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; 加入含 0.1%TritonX-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 nse(1∶100), 置于 4 ℃冰箱反应 12 h; 0.01 mol/L 的 PBS 液(含 0.1%TritonX-100)漂洗细胞, 3 000 r/min, 5 min×3 次; 加入 FITC 荧光二抗(1∶50), 37 ℃孵育 2~3 h; 0.01 mol/L 的 PBS 液漂细胞, 3 000 r/min, 5 min×3 次, 弃上清; 600~700 μl 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 FACstar 流式细胞仪检测阳性细胞数, 每组 3 个样本, 每个标本检测 10 000 个细胞, 得到阳性细胞在总细胞中的所占比例。阳性率计算: 阳性率= 阳性细胞/(阳性细胞+阴性细胞)-对照组中的非特异结合率。

1.3　统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 软件包处理, 采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　SVZa 神经干细胞的鉴定

在光镜下可见细胞呈典型的球状克隆团样生长; 神经干细胞特异性抗体 nestin 染色强阳性, 见图 1; 采用 10%胎牛血清诱导后, 免疫荧光检测分化产物, NES(神经元特异抗体, 见图 2)、GFAP(星形胶质细胞特异抗体, 见图 3)、CNP(少突胶质细胞特异抗体, 见图 4)免疫荧光染色阳性, 提示: 培养细胞具有分化为神经系统全部细胞的多向分化潜能; 符合神经干细胞的标准。

2.2　BMP2 诱导前后 SVZa 神经干细胞分化为神经元的情况

从 NSE 抗体 Cy3 免疫荧光染色检测结果, 可以发现 BMP2 诱导前后神经元的比例明显增加, 其中尤其是在 10 ng/ml BMP2 浓度作用组, 可见神经元明显增多, 见图 5、6。

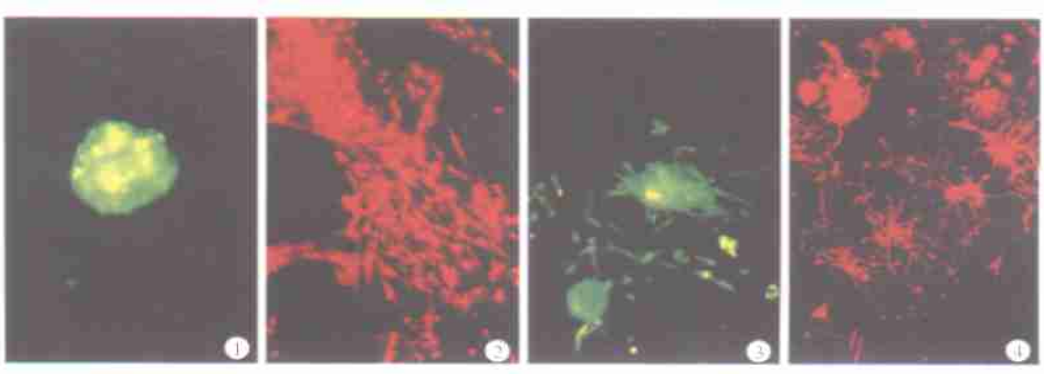


图 1　克隆细胞呈 **Nestin** 阳性　(FITC×200)

Fig 1　Nestin positive cells of clone　(FITC×200)

图 2　分化细胞呈 **NSE** 阳性　(Cy3×200)

Fig 2　NSE positive cells of differentiated neural stem cells of SVZa　(**Cy**3×200)

图 3　分化的 **SVZa** 神经干细胞呈 **GFAP** 阳性　(FITC×200)

Fig 3　GFAP positive cells of differentiated neural stem cells of SVZa　(FITC×200)

图 4　分化的 **SVZa** 神经干细胞呈 **CNP** 阳性　(Cy3×200)

Fig 4　CNP positive cells of differentiated neural stem cells of SVZa　(Cy3×200)

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

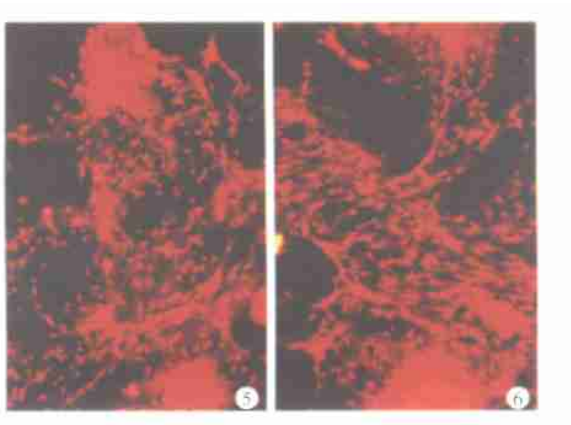


图 5 0 ng/ml BMP2 组分化细胞 NSE Cy3 免疫荧光染色 (Cy3× 200)

Fig 5 0 ng/ml BMP 2 group NSE positive cell of differentiated neural stem cells of SVZa (Cy3× 200)

图 6 10 ng/ml BMP2 组分化细胞 NSE Cy3 免疫荧光染色 (Cy3× 200)

Fig 6 10 ng/ml BMP 2 group NSE positive cell of differentiated neural stem cells of SVZa (Cy3× 200)

2.3 不同浓度的 BMP2 在 SVZa 神经干细胞分化为神经元中的作用

流式细胞仪检测结果如下: SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例为 0 ng/ml 组(36.07±0.75), 1 ng/ml 浓度组(38.34±0.56), 5 ng/ml 浓度组(39.09±0.36), 10 ng/ml 组(53.84±0.25), 20 ng/ml 组(49.16±0.36), 100 ng/ml 组(46.48±0.25)。BMP2 浓度为 1~10 ng/ml 时 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例高于 0 ng/ml, 10 ng/ml 时达到最高峰, 20~100 ng/ml 时 SVZa 神经干细胞分化为神经元的比例亦高于 0 ng/ml, 但比例开始下降。单因素方差分析, $P<0.05$; 组间两两比较, $P<0.05$。

3 讨论

与其他部位神经干细胞相比, SVZa 神经干细胞具有以下特点: ①自产生起即具备发育为神经元的特征; ②迁移过程中保持增殖状态和神经元特征而不进一步分化; ③到达迁移终点后, 才进一步分化为多巴胺能和 GABA 能神经元[3,4]。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前体细胞的区域呢? SVZa 神经干细胞又是通过什么机制成为神经元前体细胞的呢? 生理条件下, SVZa 神经干细胞在分化过程中受局部微环境的复杂调控。BMP2 是其局部微环境中非常重要的一种细胞因子。我们采用 BMP2 体外诱导 SVZa 神经干细胞, 研究体外培养条件下, BMP2 在 SVZa 神经干细胞分化中的作用。参照国外相关研究[5~9], 我们设立了 0、1、5、10、20、100 ng/ml 的 6 个浓度, 从 SVZa 神经干细胞分化产物 NSE 免疫荧光检测结果表明: 分化产物中神经元比例明显增高, 即 BMP2 促进胚胎 16 d SVZa 神经干细胞向神经元分化。流式细胞仪检测结果表明: 1~10 ng/ml 的 BMP2 可以促进神经干细胞向神经元方向分化, 10 ng/ml 浓度 BMP2 明显促进神经干细胞向神经元方向分化, 20~100 ng/ml 浓度 BMP2 亦可以促进神经干细胞向神经元方向分化, 但比例开始下降, 同样表明: BMP2 可以促进胚胎 16 d SVZa 神经干细胞向神经元分化, 但不是剂量依赖性的, 而是有一个最佳的作用浓度。BMP2 的配体和受体亚单位在胚胎 16 d 大鼠的皮层有丰富的表达, 在室管膜和室管膜下区表达尤为明显, 而且 BMP2 的表达与其受体的表达区域相一致[4], 结合我们的实验结果, 提示 BMP2 在体内、体外均可以促进胚胎 16 d 大鼠 SVZa 区神经干细胞向神经元方向分化。

那么在不同的发育期、不同的部位, BMP2 是否具有同样的作用呢? 有研究报道: 在 1~10 ng/ml 浓度的 BMP2 作用下, 导致胚胎 13 d 大鼠大脑皮质前体细胞大量凋亡; 在胚胎 16 大鼠大脑皮层发育中, BMP2 显示浓度依赖性分离细胞作用, 1~10 ng/ml 时促进神经元和星型胶质细胞分化, 100 ng/ml 时促进细胞凋亡。在围产期, BMP2 进一步促进星形胶质细胞分化, 在全部阶段, 少突神经胶质系的分化受到 BMP2 的抑制[6,7]。另有报道: BMP2 集中表达于室管膜区的表面, 可以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, 可以引发脑室膜区的神经前体细胞向神经方向的分化[8]。Nakashima 等[9] 发现: BMP2 短暂诱导培养后, 端脑来源的神经干细胞分化产物中, 神经元数目减少, 星形胶质细胞数目增加。结合本实验结果, 可以得出: 1~10 ng/ml 左右中等浓度范围的 BMP2 促进发育中期(大鼠胚胎 16 d 前后一个时间段)的中枢神经系统包括(SVZa)神经前体细胞向神经元方向分化, 而在发育早期促进神经干细胞凋亡, 在发育晚期和出生后, BMP2 促进神经前体细胞向星形胶质细胞方向分化。

关于 BMP2 诱导神经干细胞分化的分子机制, 尚未完全阐明。BMP2 受体为跨膜丝氨酸-苏氨酸激酶受体, 受体Ⅰ和受体Ⅱ已经在哺乳动物鉴定, 细胞内信号通过 Smad 蛋白来转导, Smad 为 BMP 受体激活。Bmp 受体和 Smad4 形成异侧复合物, 转运入核内, 激活各种基因转录。Smad6 和 Smad7 为抑制性 Smads 成员, 可能充当自分泌开关信号。Smads 可以对 BMP2 信号起促进作用, 也可以起抑制作用。BMP2 可以与两种受体单独结合, 也可以与两种受体同时结合, 产生不同的作用。不同浓度的 BMP2 可以作用于不同的 Smads 分子, 引起 BMPR-Ⅱ和 BMPR-Ⅰ受体表达的改变, 引起细胞核内不同的转录反应, 在不同发育阶段和不同发育部位产生不同的作用[10], 这也许是众多实验研究结果差异的一个原因。

在发育过程中, 神经干细胞或者神经前体细胞最

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

终分化结果由细胞的内在基因和周围的信号分子所共同决定。notch、noggin、shh 和 wnt 等信号分子也参与调节 BMP2 对神经干细胞的诱导分化作用。神经元的分化需要 bHLH 转录因子家族的参与，包括 MASH1、neurogenins、NeuroD 等成神经元基因的表达，同时也需要否定性 HLH 转录因子的负调控[11]。关于 BMP2 在 SVZa 神经干细胞分化中的分子机制有待进一步深入研究。我们相信 SVZa 神经干细胞定向诱导分化机制的阐明，对中枢神经系统发育研究和临床中枢神经移植应用将产生积极和深远的影响。

参考文献：

[1] Yung S Y, Gokhan S, Jurcsak J, *et al*. Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog－responsive ventral forebrain progenitor species[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(25): 16273－16278.

[2] 刘仕勇，张可成，杨 辉，等. 神经干细胞的分离培养及其鉴定[J]. 第三军医大学学报，2000，22(1)：26－28.

[3] 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.

[4] Brock S C, Bonsall J, Luskin M B. The neuronal progenitor cells of the forebrain subventricular zone: intrinsic properties *in vitro* and following transplantation[J]. Methods, 1998, 16(3): 268－281.

[5] Zhang D, Mehler M F, Song Q, *et al*. Development of bone morphogenetic protein receptors in the nervous system and possible roles in regulating trkC expression[J]. J Neurosci, 1998, 18(9): 3314－3326.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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): 8853－8862.

[9] Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, *et al*. BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(10): 5868－5873.

[10] Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2000, 11(1-2): 15－22.

[11] Bartlett P F, Brooker G J, Faux C H, *et al*. Regulation of neural stem cell differentiation in the forebrain[J]. Immunol Cell Biol, 1998, 76(5): 414－418.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2003)20-1791-01

个案与短篇

腹膜活检在腹水病因诊断中的意义

The significance of biopsy of peritoneum in diagnosis of ascites

樊丽琳，陈东凤 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所消化内科，重庆 400042）

腹水的常见病因有肝硬化、结核性腹膜炎、恶性肿瘤腹膜转移或种植、腹膜恶性肿瘤等，一般通过病史、常规辅助检查以及腹水脱落细胞检查等能明确病因，但临床上仍有不少病例通过以上检查不能明确诊断，以至于影响治疗。我科开展腹膜活检术以来共对 34 例不明原因的腹水患者进行了腹膜活检，其中 30 例明确了病因，确诊率达到 88.24%，为治疗提供了明确的依据，现将结果报告如下。

1 资料与方法

34 例均为住院患者，其中男性 23 例，女性 11 例，年龄 16～78 岁，平均(43±5)岁。均以腹水为主要表现并经详细询问病史、体格检查、实验室检查、腹部影像学检查(B 超、CT、X 线)、腹水常规及脱落细胞检查均未能明确诊断者。

腹膜活检方法：采用 Abram 胸膜活检套针，一般以左下腹脐与髂前上棘连线中、外 1/3 处为穿刺点，如为包裹性腹水或分隔，可于术前 B 超定穿刺点，常规消毒铺巾，局麻后用针芯插入针套中于穿刺点逐层刺入腹腔，待有明显落空感，取出针芯，见腹水流出，立即插入活检针，使活检针前端凹槽面贴紧腹膜，然后使活检针渐与腹壁平行，此过程中，一直要保持紧贴腹壁，将活检针后退，钩住腹膜组织，此时有明显的阻滞感，随即拔出活检针，在凹槽处取出组织，浸泡于 10%福尔马林液中固定，按此法，在以进入腹腔的活检针长度为半径的范围内，在不同的方向钩取腹膜组织 3～5 块，固定后送检。活检术后常规碘酒烧灼穿刺点，无菌纱布按压并覆盖。如大量腹水的病人予明胶海绵贴于穿刺点防腹水外漏。

2 结果

34 例患者经腹膜活检病理学检查，其中腹膜转移癌 18 例，结核性腹膜炎 9 例，腹膜间皮瘤 2 例，嗜酸细胞肉芽肿 1 例，其

（下转 1794 页）

作者简介：樊丽琳(1977－)，女，四川省简阳县人，硕士研究生，医师，主要从事脂肪肝的发病机制及治疗方面的研究。电话：(023)68757342

收稿日期：2003-04-29；修回日期：2003-10-05

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