

BMP4 对神经干细胞分化的影响及分子机制的研究

夏翔 宋旆文 牛杨 杨超 申才良

摘要 目的 观察骨形态发生蛋白(BMP)对神经干细胞(NSCs)分化的影响及探讨其可能的分子机制。方法 实验分为3组: Control组, BMP4组, BMP4 + Noggin组; 通过体外培养神经干细胞, 将BMP4添加剂以及其受体拮抗剂Noggin添加到NSCs分化培养基中, 对培养的NSCs分化情况通过免疫化学染色鉴定, 同时用Western blot检测GFAP表达以及BMP信号通路pSmad1/5/8蛋白及Id2蛋白的表达。结果 与Control组相比, BMP4组中GFAP表达明显上升, 同时BMP信号通路激活pSmad1/5/8及其目的基因Id2的表达明显上升, BMP4 + Noggin组与BMP4组相比, GFAP及pSmad1/5/8和Id2的表达明显减少。结论 BMP4通过激活Smad1/5/8信号促进星形胶质细胞的分化, 这一现象的可能机制是通过上调Id2基因的表达实现的。

关键词 神经干细胞; 骨形态发生蛋白; 分化; 星形胶质细胞
中图分类号 R 332; R 341

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)11-1706-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.11.011

严重的脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)会造成不同形式的瘫痪, 目前来说仍然无十分有效的治疗, 这带来了巨大的个人和社会经济损失^[1]。近年来随着干细胞研究的兴起, 为治疗SCI以及类似神经系统疾病带来了新希望。但是研究^[2]显示, 损伤后无论是内源性的神经干细胞增生, 还是移植的外源性神经干细胞, 均不能有效的分化为神经元或者少突胶质细胞等神经功能细胞, 而是较多的分化为星形胶质细胞。然而星形胶质细胞在损伤局部主要形成胶质瘢痕, 阻碍了轴突的再生, 抑制了神经功能的恢复^[3]。研究^[4-6]显示骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP) (BMP2/4/7)蛋白在损伤局部高表达, 同时高表达的BMP会促进星形胶质细胞的分化, 抑制神经元的分化。本实验通过体外培养神经干细胞(neural stem cells, NSCs), 添加外源性BMP4蛋白以及其受体拮抗剂Noggin蛋白, 观察其

对NSCs分化的影响以及探索其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 DMEM/F12细胞培养液和胎牛血清(FBS)以及B-27细胞因子(美国Gibco公司); 细胞表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和碱性细胞成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)(美国PeproTech公司); 兔抗小鼠胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)抗体、兔抗小鼠-Id2抗体(美国Abcam公司); pSmad1/5/8抗体(美国Cell Signaling公司); 包被用左旋氏多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine)(美国Sigma公司); ECL蛋白显影液试剂盒、BCA蛋白定量检测试剂盒(美国Pierce公司); Transwell培养板(美国Corning公司); Dapi、免疫荧光一抗稀释液、免疫荧光二抗稀释液、青/链霉素溶液、即用型胰蛋白酶细胞消化液、抗荧光淬灭封片液(上海碧云天公司); BMP-4蛋白(美国Peprotech公司)。18 mm细胞爬片(江苏世泰公司), 超净工作台(香港力康公司 HFsafe-1200LC Healforce) 细胞培养箱(美国希尔顿公司), 手术解剖显微镜(奥林巴斯SZ51, 日本), 荧光显微镜(尼康80i, 日本)。SPF级SD新生乳鼠购自安徽省实验动物中心。

1.2 NSCs的培养 取1只24 h内新生SD乳鼠, 用70%酒精消毒后断头, 依次剪开皮肤、颅骨, 迅速取出脑组织置于冰上含有预冷PBS液的培养皿中。弃去小脑部分, 在解剖显微镜的帮助下, 彻底去除每个皮层的脑膜以及血管, 将清理好的脑组织用眼科剪剪成约1 mm³小碎块, 加入1.5 ml胰酶, 将组织和胰酶混悬液置于细胞培养箱中消化7 min, 用2 ml含有10% FBS的DMEM/F12终止消化, 用微量移液枪轻轻吹打使细胞尽可能分散, 200目滤网滤过去除未消化组织, 将细胞悬液移入15 ml离心管, 然后1 000 r/min离心5 min, 再次加入适量PBS吹打悬浮细胞, 然后1 000 r/min离心5 min, 尽量去除上清液, 将其沉淀重新悬浮于5 ml的NSC增殖培养基中(DMEM/F12培养基, 加入2% B27补充剂、20 ng/ml EGF和20 ng/ml FGF以及1%青/链霉素溶

2018-04-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472088)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院脊柱外科, 合肥 230022

作者简介: 夏翔, 男, 硕士研究生;

申才良, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shencailiang1616@163.com

液)。将细胞以 1×10^5 /ml 的密度接种于 T25 细胞培养瓶中。然后将细胞放在 37°C 、5% CO_2 温箱中培养,每 3 d 更换 1 次培养液,直至第 7 天,当 NSCs 增殖形成悬浮球,进行传代。

1.3 NSCs 体外分化实验 将预先灭菌的细胞爬片置于 6 孔细胞培养板中,用 1% 多聚赖氨酸包被 60 min,吸去多余的多聚赖氨酸,蒸馏水洗 2 遍每次 5 min,将包被好的细胞爬片,连同 6 孔细胞培养板放在 37°C 细胞培养箱中晾干,选取生长状况良好的 2 代或者 3 代细胞进行下一步的实验,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,用不含 EDTA 的胰酶将细胞消化 1 min,用 2 ml 含 10% FBS 的 DMEM/F12 终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,吹散细胞,将细胞用增殖培养液培养 24 h,待细胞完全贴壁,吸去培养液,重新加入分化培养基中培养,分为 3 组: BMP4 组(分化培养基为 DMEM/F12 基础培养液,添加 20 ng/ml BMP4 蛋白以及 1% 青/链霉素溶液)、BMP4 + Noggin 组(分化培养基为 DMEM/F12 基础培养液,添加 20 ng/ml BMP4 蛋白以及 200 ng/ml Noggin 蛋白以及 1% 青/链霉素溶液)、Control 组(分化培养基为 DMEM/F12 基础培养液以及 1% 青/链霉素溶液),待到分化第 7 天进行下一步实验。

1.4 NSCs 分化的鉴定 取爬片 7 d 后分化状态良好的细胞,吸出培养基,沿培养板侧壁轻轻加入适量 PBS 清洗 2 次,每次 5 min(为了防止细胞被吹离爬片以后每步加液均按此步骤进行),用经预热的 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min,用预先配好的 0.3% Triton X-400,洗 1 次,5 min, TBS 清洗 1 次,5 min, PBS 清洗 2 次,每次 5 min, 5% BSA 在 37°C 温箱孵育封闭 1 h,尽量吸去多余的 BSA,孵育 1 抗,兔抗鼠 GFAP 1 : 1 000, 4°C 湿盒内孵育过夜,第 2 天取出在室温下放置 40 min, TBS 洗 1 次,5 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。加二抗: 山羊抗兔 IgG-Cy3(1 : 100); 室温下,避光孵育 1 h,以后操作都在避光下进行, TBS 洗 1 次, PBS 洗 2 次,每次 5 min,用 Dapi 染核 10 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。用吸水纸吸光玻片周围水使玻片干燥,加抗荧光淬灭剂封片, 4°C 避光保存,荧光显微镜(日本尼康 80i) 拍照。

1.5 Western blot 检测 将 NSCs 接种在经 0.1% 多聚赖氨酸包被的玻片上,其中 BMP 组加入 20 ng/ml BMP4, BMP4 + Noggin 组加入 20 ng/ml BMP4 和 200 ng/ml Noggin, Control 组加入等量的 PBS, 贴壁

培养 7 d。提取各组细胞分化后的总蛋白,用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定各组蛋白含量,确定电泳上样量为 20 μg , 蛋白行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 转膜,非特异性封闭。加入一抗 pSmad1/5/8、Id2 兔多抗,所使用抗体稀释浓度为 GAPDH(鼠单抗, 1 : 1 000)、GFAP(兔多抗, 1 : 1 000)、pSmad1/5/8(兔多抗, 1 : 500)、Id2(兔多抗, 1 : 1 000)。 4°C 冰箱内孵育过夜,加入对应的二抗; 4°C 孵育 1 h,用 ECL 发光剂时间为 5 min,通过进行曝光、显影、定影一系列操作后使用数码分析成像软件对实验结果进行统计分析,用目的蛋白的灰度值表示相对表达的目的蛋白水平。

1.6 细胞计数 荧光显微镜用于检查免疫染色的细胞。为了确定表达 GFAP 的细胞数量,由未参与该项试验,并且熟悉统计学方法的人员,随机选择每个玻片的 20 个视野进行细胞计数。结果表示为 GFAP 阳性细胞(星形胶质细胞)数量相对于 DAPI 阳性细胞总数的百分比。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组数据之间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),差异有统计学意义时组内两两比较用 SNK- q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMP4 对 NSCs 分化的影响 用 GFAP 进行特异性荧光免疫染色,鉴定不同分组星形胶质细胞的分化,红色为 GFAP 特异性标记星形胶质细胞(图 1A)。细胞计数检测 GFAP 阳性细胞的表达,与 Control 组(阳性率 $64.9\% \pm 2.04\%$) 相比, BMP4 组(阳性率 $94.6\% \pm 1.49\%$) 的 GFAP 表达显著增加。与 BMP4 组相比, BMP4 + Noggin 组(阳性率 $31.6\% \pm 1.21\%$) 中表达 GFAP 的细胞的阳性率显著降低 ($F = 381.1, P < 0.01$) (图 1B)。同时用 Western blot 检测 GFAP 蛋白的表达,发现与 Control 组相比, BMP4 组的蛋白表达明显升高;与 BMP4 组相比, BMP4 + Noggin 组的蛋白表达明显减少 ($F = 126.2, P < 0.01$), 见图 2。

2.2 BMP4 对 pSmad1/5/8 蛋白表达的影响 用蛋白质免疫印迹技术检测分化 7 d 的 Control 组、BMP4 组和 BMP4 + Noggin 组中 pSmad1/5/8 蛋白的表达。发现 BMP4 组中 pSmad1/5/8 的表达显著高于对照组和 BMP + Noggin 组 ($F = 2 149, P < 0.01$), 见图 3。

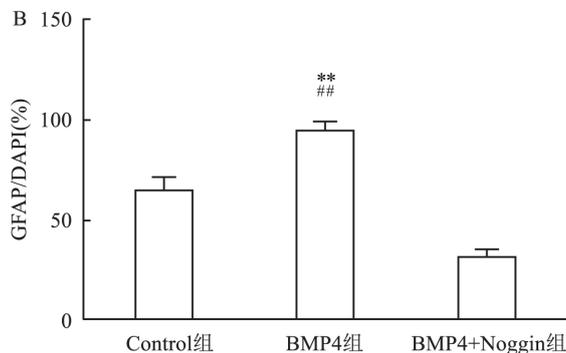
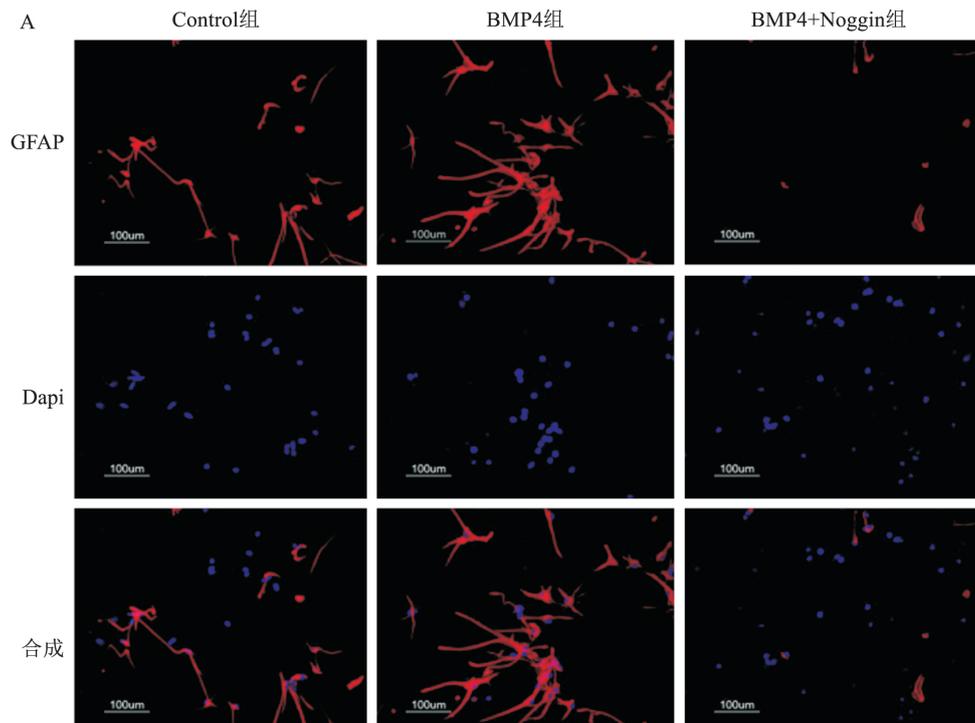


图1 不同分化条件下 NSCs

免疫荧光 GFAP 阳性表达

A: 星形胶质细胞的免疫荧光染色鉴定 ×200; 红色: GFAP 标记星形胶质细胞; 蓝色: Dapi 标记细胞核; 合成: 将细胞与细胞核进行融合; B: NSCs 分化为星形胶质细胞的阳性率表达比较; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 BMP4 + Noggin 组比较: ## $P < 0.01$

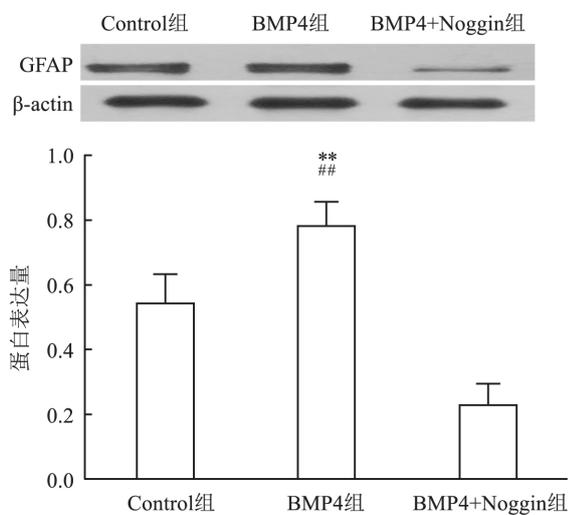


图2 NSCs 分化后 GFAP 蛋白表达量的比较

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 BMP4 + Noggin 组比较: ## $P <$

0.01

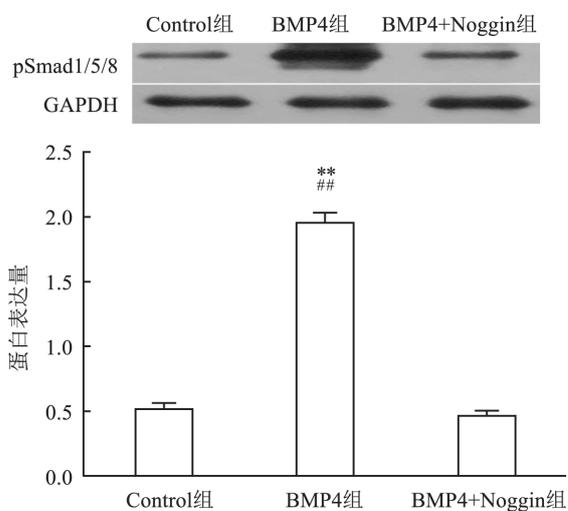


图3 NSCs 分化后 pSmad1/5/8 蛋白表达量的比较

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 BMP4 + Noggin 组比较: ## $P <$

0.01

2.3 BMP4 对 Id2 蛋白表达的影响 通过 Western blot 检测不同分组中 Id2 蛋白的表达水平。BMP4 组 Id2 蛋白的表达显著高于 Control 组和 BMP4 + Noggin 组 ($F = 978.9$, $P < 0.01$) ,见图 4。

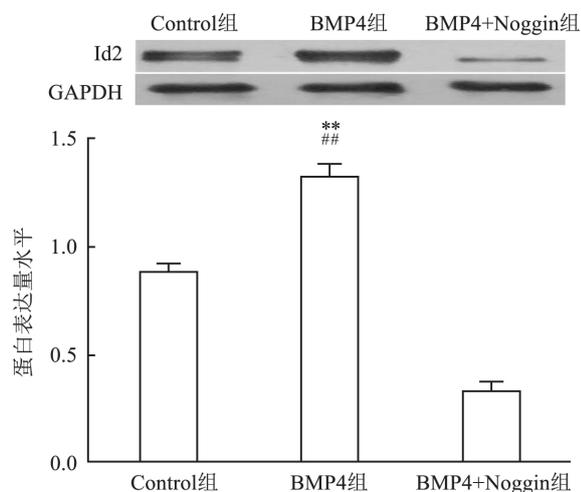


图 4 NSCs 分化后 Id2 蛋白表达量的比较

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 BMP4 + Noggin 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

本实验检测了 BMP 信号通路中 pSmad1/5/8 及其下游 Id2 蛋白的表达,同时用星形胶质特异性抗体、GFAP 进行免疫荧光染色,检测星形胶质细胞的表达。证实了 BMP4 在 NSCs 分化过程中通过上调 Id2 的表达,促进了星形胶质细胞的分化。

BMP 是信号传导配体转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族的成员。其通过信号转导进入细胞核进行转录调控, BMP 在神经发生和星形胶质发生过程中起着动态的作用^[4]。BMP4 作为 BMPs 家族中重要的一员,在体内外的实验中被证实可以抑制 NSCs 向神经功能细胞分化,抑制了神经功能的恢复^[3],研究^[6]显示, BMP 的应用可以减少 NSCs 向少突胶质细胞的分化,并促进其向星形胶质细胞的分化。这与本研究结果 BMP4 增加 NSCs 分化中星形胶质细胞的表达是一致的。然而 BMP 是通过何种途径增加星形胶质细胞的分化,其具体机制并不十分清楚,因此探索其可能的分子机制十分必要,这也是本实验重点。

骨形态发生蛋白通过 BMP 信号通路和信号通路下游受体 (Smad1/5/8) 发挥生物学作用,其中受体的磷酸化发挥着不可或缺的作用,当 BMP 信号通

路激活,其使下游受体 Smad1/5/8 磷酸化,同时磷酸化的 Smad1/5/8 (pSmad1/5/8) 可以进入细胞核内调控目的基因的转录。本研究通过免疫荧光染色检测星形胶质的细胞表达,以及 Western blot 检测 GFAP 蛋白和 pSmad1/5/8 蛋白的表达,结果表明 BMP4 的应用可以促进 NSCs 分化为星形胶质细胞,同时 pSmad1/5/8 蛋白表达增加,加入 BMP 受体拮抗剂 Noggin 后,随着 pSmad1/5/8 的表达减少, GFAP 表达显著降低。此结果与其他研究的结果一致,因此认为 BMP4 可以通过 BMP-Smad1/5/8 信号通路促进了星形胶质细胞的分化^[7],初步探索了其可能的分子机制。

Id 家族是细胞命运的重要调节因子,包括增殖、分化和凋亡, Id 蛋白的高表达可以抑制神经元的分化,促进星形胶质细胞的分化^[8]。Id2 是 Id 家族中最重要的成员之一,在调节细胞增殖和维持细胞多样性和分化方面起着至关重要的作用^[9]。研究^[10]表明,在 SCI 早期, Id 蛋白的表达显著增加,这与损伤后 BMP 表达的增加是相一致的,同时 Id 蛋白的高表达促进了损伤部位星形胶质细胞的分化。有研究^[11]表明 BMP2 可以上调下游基因 Id2 的表达,促进少突胶质前体细胞向星形胶质细胞的分化,同时抑制了这些细胞分化为少突胶质细胞。因此推测 BMP 使体外培养的 NSCs 星形胶质细胞分化增多,是由 Id 蛋白表达增加介导的。为了探索 Id 蛋白在 NSCs 分化过程中的作用,本研究通过 Western blot 检测不同组中 Id2 蛋白的表达。发现随着 BMP 信号通路的激活, Id2 蛋白表达增加。然而使用 Noggin 抑制 BMP 信号通路时, Id2 的表达显著减少。因此 BMP4 可以通过 BMP-Smad1/5/8 信号通路调节 Id2 基因的表达,这相关研究^[12]结果是一致的。本实验证实 BMP4 能够通过 BMP-Smad1/5/8 信号通路上调 Id2 的表达,促进 NSCs 分化为星形胶质细胞,同时确定了 Id 基因在 NSCs 分化中的作用。

综上所述,本实验通过 NSCs 体外分化证实了 BMPs 可以激活 BMP-Smad1/5/8 信号通路上调 Id2 的表达,从而促进星形胶质细胞的分化,确定了其可能的分子机制。本实验的结果为如何调控 SCI 后星形胶质细胞的分化进而调控胶质瘢痕大小提供了新的思路。本研究的局限性是没有进行动物实验来进一步证实本实验的结论,这将是下一个研究重点。

参考文献

- [1] Singh A ,Tetreault L ,Kalsi - Ryan S et al. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury [J]. *Clin Epidemiol* , 2014 6: 309 - 31.
- [2] Fan C , Li X , Xiao Z , et al. A modified collagen scaffold facilitates endogenous neurogenesis for acute spinal cord injury repair [J]. *Acta Biomater* 2017 51: 304 - 16.
- [3] Lukovic D , Stojkovic M , Moreno - Manzano V , et al. Concise review: Reactive astrocytes and stem cells in spinal cord injury: Good guys or bad guys [J]. *Stem Cells* 2015 33(4) : 1036 - 41.
- [4] Bond A M , Bhalala O G , Kessler J A. The dynamic role of bone-morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation [J]. *Dev Neurobiol* 2012 72(7) : 1068 - 84.
- [5] Park Y M , Lee W T , Bokara K K. The multifaceted effects of agmatine on functional recovery after spinal cord injury through modulations of BMP-2/4/7 expressions in neurons and glial cells [J]. *PLoS One* 2013 8(1) : e53911.
- [6] Sandner B , Rivera F J , Caioni M , et al. Bone morphogenetic proteins prevent bone marrow stromal cell-mediated oligodendroglial differentiation of transplanted adult neural progenitor cells in the injured spinal cord [J]. *Stem Cell Res* 2013 11(2) : 758 - 71.
- [7] Sun Y , Hu J , Zhou L , et al. Interplay between FGF2 and BMP controls the self-renewal , dormancy and differentiation of rat neural stem cells [J]. *Cell Sci* 2011 124(Pt 11) : 1867 - 77.
- [8] Tzeng S F. Inhibitors of DNA binding in neural cell proliferation and differentiation [J]. *Neurochem Res* 2003 28(1) : 45 - 52.
- [9] Havrda M C , Harris B T , Mantani A , et al. Id2 is required for specification of dopaminergic neurons during adult olfactory neurogenesis [J]. *Neurosci* 2008 28(52) : 14074 - 86.
- [10] Tzeng S F , Bresnahan J C , Beattie M S et al. Upregulation of the HLH Id gene family in neural progenitors and glial cells of the rat spinal cord following contusion injury [J]. *Neurosci Res* , 2001 66(6) : 1161 - 72.
- [11] Du Y , Yip H. Effects of bone morphogenetic protein 2 on Id expression and neuroblastoma cell differentiation [J]. *Differentiation* , 2010 79(2) : 84 - 92.
- [12] Ying Q L , Nichols J , Chambers I , et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 [J]. *Cell* 2003 115(3) : 281 - 92.

Effect of BMP4 on differentiation of neural stem cells and its molecular mechanism

Xia Xiang Song Peiwen , Niu Yang , et al

(Dept of Spinal Surgery , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the effect of bone morphogenetic protein(BMP) on the differentiation of neural stem cells (NSCs) and to explore its possible molecular mechanism. **Methods** The neural stem cells were culture *in vitro* and the experiment were divided into 3 groups: Control Group , BMP4 Group , BMP4 + Noggin Group. BMP4 and its receptor antagonist Noggin were added into NSCs differentiation medium. The differentiation of cultured NSCs was identified by immunochemical staining. Western blot was used to detect the expression of GFAP and BMP signaling pathway pSmad1/5/8 and Id2 protein expression. **Results** Compared with the control group , the expression of GFAP in BMP4 group was significantly increased , and the expression of pSmad1/5/8 and its target gene Id2 was significantly increased . In BMP + Noggin group , the expression of GFAP and pSmad1/5/8 and Id2 expression was significantly reduced compared with the BMP group. **Conclusion** BMP4 promotes the differentiation of astrocytes by activating Smad1/5/8 signaling. The possible mechanism of this phenomenon is through the up-regulation of Id2 expression.

Key words neural stem cells; bone morphogenetic protein; differentiation; astrocytes