

诱导胚胎干细胞向神经细胞分化方法的研究与探讨

顾文佳 庞希宁*

(中国医科大学卫生部细胞生物学重点实验室发育生物学教研室, 沈阳 110001)

摘要: 胚胎干细胞(ES细胞)是一种能够在体外进行不断自我更新,并具有多种分化潜能的细胞。胚胎干细胞向神经细胞诱导分化的研究进展迅速,相关实验技术和理论也不断发展。总结了近年来各国研究者诱导小鼠和人胚胎干细胞向神经细胞分化的方法,分析了一些方法的原理并初步探讨其相关的分子机制,并提出一些可行性新方法。胚胎干细胞向神经细胞诱导分化因其体外的可操作性、来源的广泛性及质量可控性将有可能成为临床上治疗神经系统疾病的有效方法。

关键词: 胚胎干细胞; 诱导分化; 神经细胞

中图分类号: Q813.1;Q21;R329.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)02-145-04

哺乳动物的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES细胞)研究近年来已取得了较大进展,人类胚胎干细胞(hES细胞)的研究起步较晚,但在无数哺乳动物尤其是鼠类ES细胞的培养和诱导分化的方法上已获得很多成功经验。

胚胎干细胞理论上可以分化为体内任何一种细胞,体外大量繁殖可为细胞移植提供足够的来源,因此利用ES细胞进行细胞移植的研究近年来已成为研究热点,体外定向诱导干细胞分化为特异性细胞或其前体,再植入受者体内,可达到修复损伤、治疗疾病的目的。神经系统一直被认为再生能力有限,尤其是成体神经元不再分裂,这大大影响了神经系统疾病患者的康复,因此体外诱导ES细胞产生神经细胞,以治疗神经系统疾病的研究更加有意义。本文着重对各国学者体外诱导ES细胞产生神经细胞的实验方法做一总结,并初步探讨了其中的分子机制。方法大致分为两大类:基因外诱导(epigenetic manipulation)和基因修饰(genetic methods)。

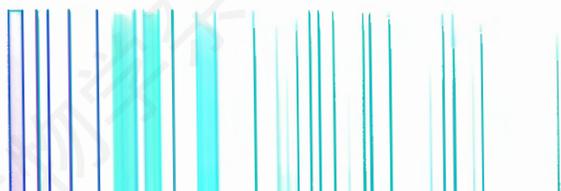
1 基因外诱导

在基因外即细胞水平对ES细胞进行诱导分化,包括使用特异性诱导剂、序贯诱导法,还有目前尚有争议的特殊诱导方法。各种方式各有优势,其诱

最常用于诱导神经细胞分化的物质是维甲酸(retinoic acid, RA),它已被证实是一类促神经生长因子,不仅对多潜能干细胞有神经诱导作用,对分化末期的神经前体细胞也有促进增殖、成熟的作用。它的优点在于只要向已开始分化的ES细胞培养液中添加一定剂量的RA^[1, 2, 3],甚至在未分化的ES细胞中直接添加RA^[4],就可以获得大比例的神经细胞,它所需时间短、成本低,是使用广泛的神经诱导方式。

由Bain等人^[1]于1995年创立的“八日诱导程序”,即“4-/4+法”是最经典的RA诱导法。他们将未分化的鼠ES细胞(mES)吹散,在悬液中培养4天形成拟胚体(embryoid body, EB),再向培养液中添加0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的全反式维甲酸(ATRA),培养4天,观察到有38%的神经元样细胞。因hES细胞与mES细胞生长周期、体积不同,对诱导剂的剂量反应也不同,Schuldiner等人^[2]研究表明,较高浓度RA(1 $\mu\text{mol/L}$),及较长的作用时间(21天)能更有效的诱导hES细胞产生神经元样细胞。亦有报道hES细胞与高浓度RA(10 $\mu\text{mol/L}$)作用4天,产生了(87 \pm 9)%的A2B5或PS-NCAM阳性细胞^[3]。

RA诱导神经分化的机制是通过结合于RA受体RAR、RXR,后者与目的基因的DNA结合域(RA反应元件, RARE)结合,激活神经相关基因并抑制



激活 follistatin, 抑制了 BMP, 从而促进神经分化的^[7]; 用 BMP-4 处理 P19 细胞, 阻断了 RA 诱导的神经发育, 并检测到上皮细胞标志物^[8]。

1.2 序贯诱导法

序贯诱导法是模仿体内胚胎细胞生长、分化环境, 按 ES 细胞生长阶段逐步改变培养液成分、血清浓度, 添加生长因子、神经营养因子等, 诱导 ES 细胞定向神经分化。该方法操作简单、细胞毒性小, 而且产生的神经元纯度较高。

1.2.1 经典“五步法” Lee 等^[9]使用“五步法”诱导 mES 向神经细胞诱导分化: 第一步扩增未分化的胚胎干细胞; 第二步去除促有丝分裂素或分化抑制剂, ES 细胞开始分化, 不贴壁悬浮生长, 逐渐形成类似体内发育的胚体(EBs); 第三步去除生长因子, 选择巢蛋白(nestin)阳性细胞(即神经前体细胞); 第四步使用神经细胞培养液, 添加生长激素、神经营养因子, 扩增神经前体细胞; 第五步利用促神经元存活因子(SPF)诱导并维持神经元成熟。共耗时 31 天左右, 得到 72% 神经元样细胞。Zhang 等人将该方法用于人类胚胎干细胞, 细胞在无饲养层、无血清、含有碱性成纤维细胞生长因子(FGF-2)的神经细胞培养液(含多种神经营养因子)中生长 8~10 天, 观察到有神经管样的玫瑰花形结构(rosette)产生, 免疫荧光法证实其中 72%~84% 的细胞为神经上皮细胞, 有(96 ± 0.6)% 的细胞表达 nestin, 这些神经前体细胞可自我增殖, 去除 FGF-2 可进一步分化产生神经元(多为谷氨酸能神经元)、胶质细胞和少突胶质细胞^[10]。

生长激素如 FGF-2(bFGF)、表皮生长因子(EGF)^[11]; 神经营养因子如胰岛素、转铁蛋白、硒盐、纤连蛋白、孕激素等均为神经发育必需的元素, 可促神经分化^[12, 13]。EB 中含有多个胚层的细胞, 加入这些生长激素和神经营养因子就促进了 ES 细胞向神经细胞诱导分化。但是生长激素对于 ES 细胞的作用还不明确, Schuldiner 通过研究八种生长因子对 hES 细胞的作用, 得出大多数生长因子的诱导分化作用是因为抑制了其他胚层的细胞生长, 而且没有一种生长因子能够诱导出一致、单一的分化细胞的结论^[14]。

1.2.2 直接分化 有报道让 hES 细胞在未更换的饲养层细胞上高密度延长培养 3 周, 细胞集落中没有出现明显的拟胚体结构, 在接下来的神经细胞培养液中 hES 细胞能自发分化为神经样细胞, 经免疫

细胞化学法证实为原始神经上皮。分离出的这些神经前体细胞既可以在 EGF、bFGF 的作用下繁殖, 又能够自发进行分化, 表达成熟神经元的特异性抗原^[15]。Reubinoff 等人继续深入该实验, 使用无血清神经细胞培养液让 hES 细胞过度生长, 在细胞集落中央获得了高纯度的原始神经上皮, 通过进一步诱导得到大量神经细胞, 并成功移植入新生鼠的大脑内, 分化为各种神经细胞^[16]。

这种直接分化法的应用不仅免去了反复培养饲养层细胞, 减少了换液、细胞传代的次数, 并且可产生高纯度的神经前体细胞, 值得尝试并推广。只是其中涉及到的分子机制尚不清楚, 与现有的神经细胞分化理论相矛盾, 有假说认为是通过与 TGF- β 相关的内定神经细胞分化模式起作用, 还有待于进一步研究证明。

1.3 其他诱导方法

1.3.1 基质细胞饲养层 尽管传统的拟胚体诱导法被广泛使用, 日本学者 Kawasaki 认为由于拟胚体中含有三个胚层的细胞, 不利于分析和研究神经细胞分化的调节; 并且诱导剂能干扰神经形成的模式和神经元的均一性^[17]。为此他们尝试将 mES 细胞与各种基质细胞共培养, 发现一种来自于颅骨骨髓的基质细胞 PA6 与 ES 细胞共培养时, 92% 的克隆表现 NCAM 阳性, 且多巴胺能神经元较多。这种结构尚不清楚的诱导物质暂被命名为“基质细胞来源的诱导活性(stromal cell-derived inducing activity, SDIA)”。亦有报道将 mES 细胞与人类肝癌细胞系 HepG2、或其制成的条件培养液 MEDII 共培养, 有 91.33% 的 ES 细胞无需 EBs 形成, 也不经筛选直接分化成神经元^[18]。以上方法无疑为神经元的诱导, 尤其是用于治疗的一种神经元的富集提供了一个更简洁更有效的方法。

1.3.2 神经分化内定模式(default model) 在对脊椎动物神经发育的研究中, 学者们发现外胚层细胞可在无外界信号诱导下自发分化为神经细胞, 因此提出了“神经分化内定模式”^[19]。不少实验证实体外培养的未分化 ES 细胞在无外源性刺激因子的作用下也能自发分化为神经细胞^[20, 21], 当去除神经抑制因子, 包括细胞内各种抑制神经分化的信号传导(如内源性生长因子)和细胞间相互抑制作用, 未分化的 ES 细胞就会自发向神经细胞分化。

一个突出的例子来自于 Tropepe 等人的实验^[21], 他们发现低密度、无血清、无饲养层细胞的 mES 细

胞培养7天后有0.2%左右可聚集形成神经球(neurosphere),并进一步自发分化为神经细胞。虽然有70%左右的细胞在24小时内死亡,但存活的细胞中有82%表达神经标志物nestin,该结果有力的证实了分散培养的mES细胞的确自发向神经细胞分化。然而诱导hES细胞向神经细胞诱导分化的实验却显示高密度延时培养有利于产生神经细胞^[15,16],而且细胞的死亡率并不高。这种差异可能是因为人、鼠之间的种属差异,对外界刺激的反应不同、信号传导的通路不同等;还有一种可能的解释:细胞密度并不决定细胞的分化方向,而培养条件(均为低营养,内源性生长因子可能耗尽)才具有决定作用。

“神经分化内定模式”理论认为TGF- β 超家族,包括TGF β 家族、BMP家族、活化素(activin)等信号分子有抑制神经分化的作用。在神经分化过程中,可检测到BMP、TGF等基因的表达下调^[7,14]。神经发育早期,BMPs作为表皮细胞诱导因子,通过细胞表面丝/苏氨酸受体激活Smad蛋白,后者进入核内,抑制bHLH转录因子(包括Mash1、Math1、Ngn1/2、NeuroD等)的活性来调节下游基因表达,从而抑制神经分化^[20]。Finley等人实验证实,BMP-4可抑制神经分化,在用BMP-4处理过的mES细胞集落中,神经元的数量减少了5~10倍,并可观察到早期中胚层基因的表达^[22];BMPs的拮抗剂noggin、follistatin、chordin、Cerberus等可抑制其作用,均可促进ES细胞向神经细胞分化。进一步研究“神经分化内定模式”所涉及的分子机制,清楚不同发育阶段的hES细胞对信号分子的适应性是很有必要的,它能作为一种体外模型帮助人们了解神经发育的过程。

2 基因修饰

基因修饰已被应用于对哺乳动物ES细胞的定向诱导,它是研究干细胞分化或增殖机理的重要手段之一,然而基因修饰不仅涉及到伦理问题,还有更令人担心的致癌性、不稳定性及其他不可预见的危险性。如今通过众多学者的努力,基因治疗、基因修饰已不再是不可触及的禁地,许多成功的例子已证明了它的可行性。

2.1 转染与选择

将一个神经特异性基因转染入ES细胞,再通过筛选报告基因或标志基因,即可得到高纯度的神经细胞。Nestin是一种较常用的神经前体细胞标志

蛋白,将它与报告基因增强型绿色荧光蛋白(EGFP)共同转染入mES,经过筛选纯化神经前体细胞,将它们植入鼠体内,可在体内外监测这些神经前体细胞向神经元、胶质细胞的分化情况^[23]。Sox2作为一个SRY相关的转录因子表达于早期神经嵴细胞,当它与 β neo重组入mES细胞并经G418筛选后,得到了高纯度的神经前体细胞(>90%)^[24]。因ES细胞体外操作的简易性,这一方法可大量提供高纯度的神经前体细胞,进一步用于科研或移植应用。

2.2 强制分化(基因过度表达)

向ES细胞导入一段增殖基因(propagating gene),使其过度表达,从而实现ES细胞的定向分化。将促多巴胺能神经元生成的转录因子Nurr1通过质粒稳定转入mES细胞系,建立Nurr1 ES细胞系,再经过五步法序贯诱导,得到50%多巴胺能神经元,为治疗帕金森氏症提供了大量细胞来源^[25]。

随着对人类神经发育分子机制的逐渐了解,越来越多参与神经生发的基因可得到定位,这将为转染干细胞的研究提供更准确、有效的靶基因信息。尽管目前人类基因修饰研究尚未证明其有害,但我们不得不正视它可能带来的隐患:由于基因修饰导致的基因组不稳定,介入基因可能引起的不明下游基因异常表达,这些都不能通过短期实验得到验证,因此这一方法的大量开展还有待于我们更清楚地了解各基因间的影响和作用。

3 结语

胚胎干细胞研究虽起步较晚但进展迅速,通过哺乳动物尤其是mES细胞的神经诱导实验为hES细胞分化研究提供了大量经验,使人们能够快速、方便地进行细胞诱导,为进一步的临床应用提高了可能性。但hES细胞与mES细胞生长周期、体积大小不同,对诱导剂的剂量、作用时间反应也不同,特别是各种信号分子所激活的通路也不尽相同,各种适用于mES细胞的诱导方法均需要逐一试用于hES细胞,以检测其可行性。我们仍应继续进行哺乳动物实验,不断为hES细胞培养及诱导方法提供新的方案、新的理论;同时也要对诱导的hES细胞进行严格鉴定及体内实验,使其能够尽早进入临床,为患者带来福音。

参 考 文 献

- [1] BAIN G, KITCHENS D, YAOM M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro [J]. *Dev Biol*, 1995, 168:

- 342 – 357.
- [2] SCHULDINER M, EIGES R, EDEN A, *et al.* Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Brain Res*, 2001, **913**: 201 – 205.
- [3] CARPENTER M K, INOKUMA M S, DENHAM J, *et al.* Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells [J]. *Exp Neurol*, 2001, **172**: 383–397.
- [4] FRAICHARD A, CHASSANDE O, BILBAUT G, *et al.* In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons [J]. *J Cell Sci*, 1995, **108**: 3181 – 3188.
- [5] GUAN K, CHANG H, ROLLETSCHEK A, *et al.* Embryonic stem cell-derived neurogenesis retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2001, **305**: 171 – 176.
- [6] WOHL C A, WEISS S. Retinoic acid enhances neuronal proliferation and astroglial differentiation in cultures of CNS stem cell-derived precursors [J]. *J Neurobiol*, 1998, **37**: 281 – 290.
- [7] WILES MV, JOHANSSON B M. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium [J]. *Exp Cell Res*, 1999, **247**: 241 – 248.
- [8] HEMMATI-BRIVANLOU A. Inhibitory control of neural differentiation in mammalian cells [J]. *Dev Genes Evol*, 1997, **207**: 19 – 28.
- [9] LEE S H, LUMELSKY N, STUDER L, *et al.* Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(6): 675 – 679.
- [10] ZHANG S C, WERNIG M, DUNCAN I D, *et al.* In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 1129 – 1133.
- [11] GALLO R, ZAZZERONI F, ALESSE E, *et al.* REN: a novel, developmentally regulated gene that promotes neural cell differentiation [J]. *J Cell Biol*, 2002, **158**: 731 – 740.
- [12] CALDWELL M A, HE X, WILKIE N, *et al.* Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 475 – 479.
- [13] CARPENTER M K, CUI X, HU Z Y, *et al.* In vitro expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells [J]. *Exp Neurol*, 1999, **158**: 265 – 278.
- [14] SCHULDINER M, YANUKA O, ITSKOVITZ-ELDOR J, *et al.* Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**: 11307 – 11312.
- [15] REUBINOFF B E, PERA M F, FONG C Y, *et al.* Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 399 – 404.
- [16] REUBINOFF B E, ITSYSKON P, TURETSKY T, *et al.* Neural progenitors from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 1134 – 1140.
- [17] KAWASAKI H, MIZUSEKI K, NISHIKAWA S, *et al.* Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity [J]. *Neuron*, 2000, **28**: 31 – 40.
- [18] RATHJEN J, HAINES B P, HUDSON K M, *et al.* Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: homogeneous formation and differentiation of a neuroectoderm population [J]. *Development*, 2002, **129**: 2649 – 2661.
- [19] HEMMATI-BRIVANLOU A, MELTON D. Vertebrate neural induction [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1997, **20**: 43–60.
- [20] MUÑOZ-SANJUÁN I, BRIVANLOU A H. Neural induction, the default model and embryonic stem cells [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, **3**: 271 – 280.
- [21] TROPEPE V, HITOSHI S, SIRARD C, *et al.* Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism [J]. *Neuron*, 2001, **30**: 65 – 78.
- [22] VON BUBNOFF A, CHO K W. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? [J]. *Dev Biol*, 2001, **239**: 1 – 14.
- [23] ANDRESSEN C, STOCKER E, KLINZ F J, *et al.* Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation [J]. *Stem Cells*, 2001, **19**: 419 – 424.
- [24] LI M, PEVNY L, ROBIN LOVELL-BADGE, *et al.* Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection [J]. *Current Biology*, 1998, **8**: 971 – 974.
- [25] KIM J H, AUERBACH J M, RODRIGUEZ-GOMEZ J A, *et al.* Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease [J]. *Nature*, 2002, **418**: 50 – 56.

The Study of Methods Used in Neural Induction of Embryonic Stem Cells

GU Wen Jia, PANG Xi Ning*

(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health of China, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Embryonic stem cells (ES cells) are pluripotent cells which have a unique capacity to renew themselves and to give rise to various types of cells. So much progress was made to date on the study of neural induction of the embryonic stem cells, and relative laboratory techniques and theories were also established gradually. This review concentrated on the methods that researchers used in the directed induction of ES cells to neural cells, and analysed the mechanism and relative theories of some of the methods, then gave out some practical methods. ES cells that can proliferate indefinitely and be easily genetically operated may be a particularly effective donor cells for therapies of neurological diseases.

Key words: embryonic stem cells; induction; neural cells

*Corresponding author, E-mail: pxining@yahoo.com