

胶质细胞的神经干细胞 / 祖细胞特性

吴军兵 孙 益*

(浙江大学生命科学院, 杭州 310027)

摘要 近年来, 关于胶质细胞有许多令人惊奇的发现。其中最令人感兴趣的是部分胶质细胞在体内外都表现出神经干细胞 / 祖细胞的特性, 在适当条件下能分化成神经元、星形胶质细胞和 / 或少突胶质细胞。不仅存在于非哺乳类脊椎动物整个生命周期的放射胶质显示出这一特性, 存在于成年哺乳动物脑室下区和颗粒下层的星形胶质细胞也是如此。在体外培养中, 部分胶质细胞具有形成多潜能神经球的能力。在体内, 胶质细胞充当前驱细胞时的命运受到细胞间相互作用、细胞因子、血脉系统、胞外基质以及基膜等所构建的微环境的影响。胶质细胞的这些特性将对神经修复产生深远影响。

关键词 胶质细胞; 神经干细胞 / 祖细胞; 微环境

神经胶质细胞和神经元一样, 是神经系统内最重要细胞类型之一。在中枢神经系统内, 神经胶质细胞大致可分为小胶质细胞和大胶质细胞, 而后者又可分成星形胶质细胞和少突胶质细胞。传统观点认为, 小胶质细胞是特化的免疫活性细胞, 形成脑的局部免疫系统; 少突胶质细胞主要形成中枢轴突的髓鞘, 介导动作电位的跳跃式传递; 而星形胶质细胞在神经系统内起结构支持、营养供给、参与形成血脑屏障、参与代谢以及保护神经系统等功能。然而, 随着实验技术的改进和新技术的应用, 越来越多的证据表明: 至少有部分数量和类型的胶质细胞在体内外显示出神经干细胞 / 祖细胞的特征, 在适当条件下能分化成不同的神经细胞。

神经干细胞主要有以下几个特征^[1]: 源自神经系统, 能分化成主要的神经细胞类型; 能自我更新; 通过不同的分裂方式产生干细胞和 / 或祖细胞 (progenitor)。神经祖细胞 (neural progenitor) 和神经干细胞相比, 其分化能力和自我更新能力都受到了一定的限制。神经祖细胞还有可能转化成神经干细胞, 但其分化产生的神经元祖细胞 (neuronal progenitor) 和胶质祖细胞 (glial progenitor) 就仅具有分别向神经元和胶质细胞分化的单向分化潜能了。

近年来, 在以往被认为是高度分化的成年哺乳动物中枢神经系统内, 发现了具有神经干细胞 / 祖细胞特性的星形胶质细胞。而在鸟类、爬行类等其他脊椎动物的整个生命周期中, 也发现了这类特性的放射胶质。在对胶质细胞神经干细胞 / 祖细胞特

性的体外研究中, 还建立了一系列研究方法和模型。此外, 神经系统内微环境对这些胶质细胞命运的影响也有广泛的研究。

1 体内胶质细胞的神经干细胞/祖细胞特性

胶质细胞和神经元一样, 均起源于胚胎中呈假复层柱状的神经上皮细胞 (neuroepithelial, NEP)。在神经发生的开端, 放射胶质是最早能与神经上皮细胞从形态上区分开来的细胞类型之一, 其顶突起和基部突起分别与脑室和软脑膜 (pia) 表面相连, 在引导成神经细胞 (neuroblast) 迁移到特定部位后, 绝大多数放射胶质先后缩回它们的顶突起和基突起, 并分化为成熟的星形胶质细胞。

在成年哺乳动物中枢神经系统内, 放射胶质细胞和脑室下区 (subventricular zone, SVZ) 星形胶质细胞, 以及颗粒下层 (subgranular zone, SGZ) 星形胶质细胞均显示出多潜能神经干细胞的特性^[2]。此外, 一部分室管膜细胞 (ependymal cells) 也能产生新神经元, 但缺乏自我更新的能力。

1.1 放射胶质细胞的神经干细胞 / 祖细胞特性

放射胶质同神经上皮细胞一样呈现双极性形态, 两者也有一些共同的分子特征, 如均表达 nestin 和单抗 RC1、RC2 识别的抗原^[3,4], 但是两者

收稿日期: 2005-03-28 接受日期: 2005-07-06

浙江省自然科学基金资助项目 (No. Y204331)

* 通讯作者。Tel: 0571-88206134, Fax: 0571-88206006, E-mail:

ysun@zju.edu.cn

还是有很大的不同的, 主要表现在超显微结构特征上: 放射胶质的放射状突起内含有 20~25 nm 微管和 8~9 nm 中间纤维, 在胞质内含有糖原颗粒, 而糖原颗粒又正好是成体星形胶质细胞的标志^[5]; 另外, 放射胶质还表达许多成年动物体内星形胶质细胞的特征蛋白, 如胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、谷氨酸-天冬氨酸转运体(glutamate-aspartate transporter, GLAST)、脑脂质结合蛋白(brain lipid-binding protein, BLBP)、腱生蛋白 C (tenascin C, TN-C)等^[6-9]; 此外, 在灵长类动物新皮质、海马和小脑中, 在放射胶质消失时刚好出现星形胶质细胞^[10]。所有这些资料均提示, 放射胶质可能是从神经上皮细胞到星形胶质细胞分化的过渡形式, 并可能因此具有干细胞 / 祖细胞的分化潜能。

在胚胎时期和出生初期哺乳动物的中枢神经系统内, 放射胶质显示出神经干细胞 / 祖细胞的特性。研究 E15 大鼠的新皮质发现放射胶质能以垂直和水平两种方式分裂^[11], 前者被认为是对称分裂, 产生两个前驱细胞(precursor cells), 而后者则为不对称分裂, 产生一个神经元和一个前驱细胞。荧光活性染料 DiI 标记 E14 小鼠大脑皮层的放射胶质也显示单个放射胶质不对称分裂产生神经元, 而神经元不仅继承了放射胶质投射到软脑膜的突起, 并且在几小时内仍有突起投射到脑室^[12]。这些资料均表明, 放射胶质具有分化成神经元或神经元祖细胞的能力。

ROSA26R 转基因小鼠的两个 LoxP 重组位点中间嵌有终止序列, 下游含有标记基因 LacZ, 与 hGFAP-Cre 小鼠交配产生 hGFAP-Cre:lacZ 后代。在胚胎早期, 放射胶质特异性的启动子 hGFAP 启动 Cre 重组酶表达, 在最后一 LoxP 位点发生重组, 从而能表达 LacZ。追踪 LacZ 标记发现, 大多数皮层神经元和至少部分星形胶质细胞源自放射胶质^[4]。

然而, 在成年哺乳动物中枢神经系统内, 绝大多数放射胶质都已消失, 仅有少量存于某些特化区域^[10], 如视网膜 Müller 细胞、小脑 Bergmann 细胞和下丘脑伸长细胞(tanycyte); 而在许多非哺乳类脊椎动物中, 放射胶质却存在于整个生命周期。

对包括鸟类和爬行类在内的一些非脊椎动物而言, 脑室区(ventricular zone, VZ)单纤毛的放射胶质可能就是最初的前驱细胞^[2,13], 其分化形成的神经元沿放射胶质的突起迁移到脑深部。用高度选择

性的神经毒素 3-乙酰吡啶(3-AP)破坏蜥蜴部分脑区, 放射胶质大量分化产生神经元并迁移到损伤的部位, 重新生成缺失的组织^[14]。

此外, 在出生后的鸡视网膜出现急性损伤时, 发现 Müller 细胞能重新进入细胞周期, 并在很短时间内表达 CASH-1、Pax6 和 Chx10 等胚胎视网膜祖细胞表达的转录因子。新形成的细胞有一部分分化成视网膜神经元, 还有一小部分形成 Müller 细胞, 剩余的保持未分化状态, 继续表达 Pax6 和 Chx10^[15]。可见, 鸡视网膜中的 Müller 细胞能成为神经元祖细胞, 而人类视网膜 Müller 细胞的情况目前尚不得而知。

1.2 星形胶质细胞的神经干细胞 / 祖细胞特性

虽然成年哺乳动物中枢神经系统内缺少放射胶质细胞, 但位于侧脑室(lateral ventricle, LV)脑室下区与海马齿状回颗粒下层的星形胶质细胞则扮演了神经干细胞 / 祖细胞的角色, 并有可能是成年哺乳动物体内最初的前驱细胞。

脑室下区是沿侧脑室侧壁延伸的分化细胞层, 和侧脑室由单层的、多纤毛的室管膜细胞隔离开来。然而, 还是有些 SVZ 星形胶质细胞的突起插入到室管膜细胞间的空隙, 与侧脑室接触。这些 SVZ 星形胶质细胞和胚胎神经上皮细胞一样, 有一些较短的单纤毛。成年小鼠体内, SVZ 星形胶质细胞首先分化成迅速分裂的未成熟的前驱细胞(C 细胞), 后者又分化为成神经细胞^[2,16]。成神经细胞聚集成链状, 形成吻侧迁移流(rostral migratory stream, RMS), 沿着由 SVZ 星形胶质细胞的突起形成的胶质通道迁移到嗅球。

成年 GFAP-TVA 小鼠体内的星形胶质细胞, 在 GFAP 启动子的作用下能表达 A 亚群禽白血病病毒(subgroup A avian leucosis virus, ALV-A)的受体 TVA, 而野生型哺乳动物则不表达这类受体, 因而可用来标记、跟踪分化的星形胶质细胞。将编码碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)、有复制能力的禽白血病病毒(RCAS-AP)注射到 GFAP-TVA 小鼠脑内时, 将感染表达 GFAP 的分化细胞, 并表达 AP 标记^[16]。感染后 3.5 天, 在 RMS 中发现很多 AP⁺ 成神经细胞处在往嗅球迁移的途中; 而感染后 15 天, AP⁺ 细胞已迁移到嗅球并具备了两种抑制性神经元——颗粒细胞和球周细胞(periglomerular cells)的典型形态^[17]。

颗粒下层位于颗粒细胞层和门(hilus)之间, 其

星形胶质细胞和 SVZ 星形胶质细胞一样表达 GFAP。它首先分化产生短时存在的 GFAP 阴性、多唾液酸神经细胞黏附分子阳性(PSA-NCAM⁺)的前驱细胞,前驱细胞再分化产生 PSA-NCAM⁺ 颗粒神经元,后者迁移一小段距离即可到达颗粒细胞层^[2]。

在成年小鼠脑膜下用阿糖胞嘧啶(Ara-C)和 Pro-carbazol 一起作用 7 天后,仅有部分 GFAP⁺ 的 SGZ 星形胶质细胞存活,而完全不存在 GFAP⁻ 前驱细胞。15 天后,幸存的 GFAP⁺ 的 SGZ 星形胶质细胞分化出大量 GFAP⁻ 前驱细胞;进一步用 RCAS-AP 感染 GFAP-TVA 小鼠来追踪星形胶质细胞,发现它们确实能产生颗粒神经元^[18]。这些证据提示,SGZ 星形胶质细胞可能是颗粒下层内最早的前驱细胞。

当然,有关胶质细胞的神经干细胞/祖细胞特性的证据并非全由体内实验获取。虽然体内实验的证据更为直接、更具说服力,但往往实验手段较为单一、研究对象范围受限,并且容易受到微环境中众多因素的影响。因而,一些简易直观的体外实验往往可以作为一个良好的补充。

2 胶质细胞在体外的神经干细胞/祖细胞特性

通常,体外实验的步骤是首先把动物脑内认为含有分化潜能细胞的区域解剖出来,分离解聚成单细胞后用 EGF 和 / 或 FGF-2 培养。培养中的神经干细胞能够自我增殖并呈集落生长,形成许多细胞聚集在一起的神经球(neurosphere)。一般认为,体外培养的胶质细胞若能形成神经球,并具有分化成神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞的能力,则所培养的胶质细胞就可认为具有神经干细胞/祖细胞的特性。

分别用荧光乳胶微球(latex microsphere beads)和构建 hGFAP-GFP 小鼠两种不同方式标记放射胶质,然后将其用流式细胞仪分离。经体外培养后发现,胚胎早期放射胶质主要由神经元的前驱细胞和星形胶质细胞的前驱细胞组成^[19]。

GFAP-TK 小鼠中,GFAP 启动胸苷激酶基因(thymidine kinase,TK)的表达,使抗病毒药物更昔洛韦(ganciclovir, GCV)磷酸化,从而终止 DNA 的合成。在体外,GCV 杀死原代培养的 GFAP-TK 小鼠神经球中的 GFAP⁺ 细胞后传代不能再形成神经球;在体内,用能通过血脑屏障的 E-GCV(elaidic acid GCV)清除 GFAP-TK 小鼠体内 GFAP⁺ 细胞后,也导

致脑室下区细胞形成神经球的能力丧失^[20]。这些均表明所有的神经球最终都源自 SVZ 星形胶质细胞。然而,杀死 GFAP 阳性的 SVZ 星形胶质细胞很可能导致它直接后代——未成熟的前驱细胞(C 细胞)的减少。因此,仅仅依据这一点尚不能区分是 SVZ 星形胶质细胞还是 C 细胞在神经球的形成中起着主要作用^[2]。

从成年动物脑室下区分离的细胞用 EGF 培养,能产生大量的神经球。然而,将其中的 C 细胞用流式细胞仪分拣出来,在 EGF 存在的条件下培养产生的神经球是原来的 53 倍^[21]。这表明:这些神经球中大多数细胞并非源自体内相对沉默的干细胞,而是来自高度有丝分裂活性的 C 细胞。

此外,在成年动物脑区以外的中枢神经系统内也可能存在多潜能的星形胶质细胞。在脊髓损伤的成年大鼠脊髓中就发现一群细胞呈现 nestin 免疫活性,而这群细胞同时也表达 GFAP,因此可被认定为星形胶质细胞。培养从侧索分离的具 nestin 免疫活性的星形胶质细胞能形成神经球,并具有分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力^[22]。

毕竟,体外的环境和体内还是有很大差异的,从体内分离胶质细胞在体外培养,可能带来细胞分化潜能的改变。例如,皮层放射胶质细胞通常并不能产生少突胶质细胞,然而在体外的实验却发现有一些还是能形成神经球并分化产生一定数量的少突胶质细胞、星形胶质细胞和神经元^[9]。所以,体外实验尚需转移到体内进一步鉴定,而正是这一步却有着很大的难度。尽管如此,体外的实验还是给了我们很多的启示。

3 微环境的影响

事实上,胶质细胞的干细胞/祖细胞命运在体内是受所处微环境众多因素影响的,而在体外实验中这些因素往往可能被单一化、理想化。胶质细胞在体内所处微环境是由细胞间的相互作用及信号传导、细胞因子、发生区的血管微环境以及细胞外基质和基膜等共同构建的^[23]。

广泛的细胞间的相互作用能通过反馈、信号传导以及分裂方式(对称分裂或是不对称分裂)来影响干细胞的维持和分化。

星形胶质细胞的长而曲折的突起能和所有类型的细胞结合,并且其终足终止于血管的基膜,因此能感受到神经元及其前驱细胞数目的变化并传导从

血管系统和其他发生区接受的信号。星形胶质细胞间还存在广泛的间隙连接, 因而使得微环境中信号的传递十分迅捷^[23]。除此之外, 星形胶质细胞自身还分泌能在体外促进神经发生的因子^[24]。

室管膜细胞也是构成神经发生微环境的重要组成部分之一。脑室下区的细胞在一定条件下表达骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)及其受体, BMP在体内外都能抑制神经发生, 而室管膜细胞通过分泌noggin蛋白阻断内源性的BMP信号途径从而促进神经发生^[25]。另外, 它又临近侧脑室, 还能捕获脉络丛分泌到脑脊液中的信号分子。

细胞因子对体内胶质细胞也起到调控作用。将EGF注入侧脑室后7 h发现^[21]: ①和脑室接触的SVZ星形胶质细胞数量增加; ②未成熟的前驱细胞(C细胞)增多; ③成神经细胞数量减少。其他因子如FGF-2、BDNF、IGF-1以及血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等也能影响其充当神经干细胞时的分化命运^[26-28]。

血管是微环境的组成部分之一。在颗粒下层发现, 分化细胞形成的致密的聚集簇往往和血管紧密关联, 并且在所有分化细胞中大约有37%对内皮细胞的标记——大鼠内皮细胞抗原(rat endothelial cell antigen, RECA)或von Willebrand因子(von Willebrand factor, VWF)显示出免疫活性^[29], 而内皮细胞分泌的VEGF也是影响胶质细胞命运的因子。

基膜在微环境中结合分子、锚定细胞并提供空间支持。成年动物体内脑室下区中含有丰富的胶原蛋白、硫酸类肝素蛋白聚糖以及硫酸软骨素蛋白聚糖, 其中仅硫酸类肝素蛋白聚糖就能结合BMP-2、BMP-4、Shh和Wnt等促进神经发生的因子^[23]。

正因为体内微环境的影响十分复杂, 才使得体外实验非常必要, 同时它也作为体外实验转移到体内作进一步鉴定提供了参照。当然, 微环境的影响并非仅限如此。作为一个系统, 它往往意味着一个复杂的调控网络, 综合作用于胶质细胞。

综上所述, 除了幼年脊椎动物中枢神经系统内放射胶质具有神经干细胞 / 祖细胞的特性外, 有些

非哺乳类脊椎动物中枢神经系统内终生存在的放射胶质也具有这种特性。此外, 在哺乳动物中枢神经系统的脑室下区以及颗粒下层还存在具有神经干细胞 / 祖细胞特性的星形胶质细胞。在体外的实验中, 它们也显示出了神经干细胞 / 祖细胞应有的特征。胶质细胞作为神经干细胞 / 祖细胞, 其命运受到所处微环境的重要影响。

胶质细胞的神经干细胞 / 祖细胞特性有着重大的意义, 一方面它对神经系统发育、神经系统疾病病理甚至学习记忆等高级功能的研究产生了重要影响, 另一方面也为神经系统修复、退行性疾病及脑肿瘤的治疗指明了一个新的方向。

参考文献 (References)

- [1] Gage FH. *Science*, 2000, **287**: 1433
- [2] Doetsch F. *Nat Neurosci*, 2003, **6**: 1127
- [3] Chanas-Sacre G et al. *Dev Dyn*, 2000, **219**: 514
- [4] Malatesta P et al. *Neuron*, 2003, **37**: 751
- [5] Choi BH et al. *Brain Res*, 1978, **148**: 295
- [6] Shibata T et al. *J Neurosci*, 1997, **17**: 9212
- [7] Feng L et al. *Neuron*, 1994, **12**: 895
- [8] Yuasa S. *Arch Histol Cytol*, 2001, **64**: 149
- [9] Campbell K et al. *Trends Neurosci*, 2002, **25**: 235
- [10] Rakic P. *Cereb Cortex*, 2003, **13**: 541
- [11] Weissman T et al. *Cereb Cortex*, 2003, **13**: 550
- [12] Miyata T et al. *Neuron*, 2001, **31**: 727
- [13] Alvarez-Buylla A et al. *J Neurosci*, 1998, **18**: 1020
- [14] Font E et al. *Brain Res*, 1997, **754**: 245
- [15] Fischer AJ et al. *Nat Neurosci*, 2001, **4**: 247
- [16] Doetsch F et al. *Cell*, 1999, **97**: 703
- [17] Holland EC et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 1218
- [18] Seri B et al. *J Neurosci*, 2001, **21**: 7153
- [19] Malatesta P et al. *Development*, 2000, **127**: 5253
- [20] Imura T et al. *J Neurosci*, 2003, **23**: 2824
- [21] Doetsch F et al. *Neuron*, 2002, **36**: 1021
- [22] Lang B et al. *Neuroscience*, 2004, **128**: 775
- [23] Doetsch F. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, **13**: 543
- [24] Lim DA et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 7526
- [25] Lim DA et al. *Neuron*, 2000, **28**: 713
- [26] Peterson DA. *Curr Opin Pharmacol*, 2002, **2**: 34
- [27] Lai K et al. *Nat Neurosci*, 2003, **6**: 21
- [28] Jin K et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 11946
- [29] Palmer TD et al. *J Comp Neurol*, 2000, **425**: 479

The Characteristics of Glia as Neural Stem Cells/Progenitors

Jun-Bing Wu, Yi Sun*

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract In recent years, there are many amazing findings about glia. The most attractive one is that some 'glia' can behave as multipotent neural stem cells or neural progenitors, which can generate neurons, astrocytes and/or oligodendrocytes both *in vitro* and *in vivo*. Not only radial glia that exist throughout the whole lifespan of the non-mammal vertebrates, but also the astrocytes in the brain regions of adult mammals such as subventricular zones and subgranular zones can play these roles. The ability to form the multipotent neurospheres is currently the best *in vitro* assay for some glia which act as neural stem cells. *In vivo*, the fates of glia as precursor cells are affected by the surrounding niche constructed by the cell-cell interactions, cytokines, the vasculature, the extracellular matrix and even the basal lamina. These characteristics of glia will have a significant impact on the neural repair.

Key words glia; neural stem cell/progenitor cell; niche

Received: March 28, 2005 Accepted: July 6, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y204331)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88206134, Fax: 86-571-88206006, E-mail: ysun@zju.edu.cn