

神经球的异质性、发生方式及神经球方法的适用性

杨瑶斐 孙 益*

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310058)

摘要 神经球是神经干细胞在体外扩增培养中的一般表现形式。早先认为神经球是神经干细胞的单克隆细胞团, 并在这一假设基础上形成了目前广为应用的神经球方法。但最近神经球被证实并非神经干细胞的单克隆群体, 在神经球内部和神经球之间存在着普遍的异质性; 神经球的发生除了细胞增殖外, 还包括细胞重团聚、神经球融合等方式; 在神经球的形成过程中, 亦有诸多因子参与影响。这些研究结果说明目前神经球方法的精确性需要重新定义, 神经球方法的适用性还需要进一步探讨。

关键词 神经球方法; 神经球异质性; 神经球发生方式

神经干细胞是具有自我更新和多向分化等特性的中枢原始细胞^[1], 常取自于胚胎组织和成年动物的室下区和海马齿状回^[2]。神经球(neurosphere)是神经干细胞体外培养于含有丝分裂原组织培养液中表现出的一般形式, 该悬浮球状细胞团中的细胞被认为保持了神经干细胞的基本增殖和分化特性。产生的原代神经球可被分散并多次继代培养, 而在撤除丝裂原后可分化为神经元和胶质细胞^[3]。Reynolds 等^[3]于1996年首次利用小鼠纹状体神经干细胞建立了神经球制备和继代培养方法。因为具有可多次传代和可诱导分化的双向优越性, 该方法在神经干细胞体外培养中得以普遍应用。

神经球方法(neurosphere assay)是基于神经球的单克隆性建立的一系列测量方法, 主要通过神经球产生数目、大小、抗原性等参数来判定原神经干细胞数量、分化潜力等性质。其理论基础来自于一个默认的假设, 即神经球是神经干细胞的单克隆细胞团^[4]。在细胞类型上, 神经球细胞被认为具高度的均一性; 在抗原特性上, 普遍认为神经球仅表达干细胞特异性的中间纤维巢蛋白(nestin)、RNA 结合蛋白 musashi、转录因子 Sox1 和 Sox2 等分子标记, 而不表达分化标记如未成熟神经元特异抗原 β -III 微管蛋白和胶质细胞特异标记 GFAP^[5]。

然而, 目前越来越多的证据表明, 神经球并非真正的单克隆细胞团^[4], 在神经球之间^[6]和神经球内部细胞之间^[1,6]存在着广泛的异质性(heterogeneity)。神经球自身也一直处于一种动态的平衡之中, 而神经球方法的精确性和有效性也正不断被提出质疑。与此

同时, 神经球的形成机制并未完全清楚, 神经干细胞为什么会在体外形成这样一种扩增性的、保持正常细胞特性的特殊细胞群结构, 仍然是一个疑问^[7]。

1 神经球和神经球细胞异质性

1.1 神经球的超微结构异质性

神经球异质性最直接的证据来自显微观察^[1,8](图1)。神经球内部细胞具不同的大小、粒度(granularity)

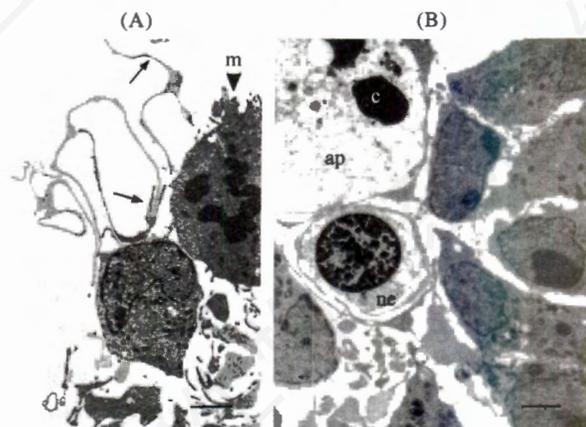


图1 悬浮神经球超微结构^[1]

(A)神经球外层细胞产生伪足(箭头所示), 有丝分裂细胞也常见于神经球外层。m: 有丝分裂细胞。(B)神经球内层的分裂间期细胞、凋亡细胞和坏死细胞。注意正常细胞在形态和大小上显示不均一性, 细胞间存在很大细胞间隔。ne: 坏死细胞, ap: 凋亡细胞, c: 染色质。Bar=2 μ m。

收稿日期: 2007-07-04 接收日期: 2007-09-14

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

和时相(大部分处于 G_0/G_1 期),表现出不同程度的增殖、生存、凋亡和细胞吞噬活动特性。而神经球异质性与神经球的几何结构层次密切相关。处在神经球内外层不同位置的细胞,分别表现出梯度性的有丝分裂、转录、凋亡、吞噬和坏死等现象。例如,标记增殖性细胞的BrdU染色阳性细胞常常位于神经球边缘;标记活细胞核的亲脂性染色剂SYTO 59染色阳性细胞一般位于神经球外层;而标记受损或死亡细胞核的碘化丙啶(propidium iodide)阳性细胞则常常位于神经球内部。在神经球内部还观察到存在凋亡小体,而且细胞凋亡的吞噬过程常发生于神经球内层区域。此外,坏死细胞也全部出现于神经球内层。当神经球扩大而使内核营养供应不足时,凋亡和坏死的现象更加普遍。

神经球的细胞构筑(cytoarchitecture)是非紧密形态的,细胞间存在很大的细胞间隔^[1]。神经球中正常的细胞之间相互粘连,细胞具伪足(pseudopodia)和随机出现的单根纤毛(cilium)。早期凋亡细胞和坏死细胞则常被正常细胞的突起所包围,形成一种巢式结构。在巢式结构中细胞完成凋亡或坏死过程,最后细胞片段和残余小体被完全吞噬。

神经球结构具有高度活动性。不同时间的共聚焦显微观测表现出不同的荧光模式,证实神经球内部细胞总是处于活动之中。一个典型的现象是神经球外周的细胞甚至可以迁移到球中心。神经球的这种运动现象与体内神经干/祖细胞的迁移特性是一致的,可能是体外培养细胞保留了体内神经干细胞的迁移能力^[9]。除悬浮的神经球外,贴壁神经球中的细胞以及神经球本身也表现出不断运动的性状^[4]。

1.2 神经球的抗原免疫反应异质性

神经球表达多种细胞特异性蛋白,证明在神经球内部包含不同的细胞亚型。在神经球中,多能神经干细胞、祖细胞、放射胶质细胞可能与限制性的(restricted)神经元祖细胞和胶质细胞祖细胞共存^[10,11]。体外培养形成的神经球是异质性的细胞团,包括不对称的干细胞亚型。其组成成分是仅小部分(1%~5%)慢速分裂的神经干细胞,以及较快速分裂的Nestin阳性祖细胞^[12],甚至更加分化的细胞形式,如神经元和神经胶质细胞^[1,8,10,13]。

神经球除表达神经干细胞特异性标记Sox2、nestin外,同时表达新生未成熟神经元标记物双皮质素(doublecortin, DCX),以及在神经球形成和增长中起重要作用的musashi。此外还低量表达GFAP^[5,14]、

β -III微管蛋白^[14]等分化细胞特异性蛋白,说明异质性的神经球亦包含已分化细胞^[15]。分化型的GFAP阳性或 β -III微管蛋白阳性细胞存在于神经球内部,被nestin、EGF受体(EGFR)、 β_1 整联蛋白(β_1 -integrin)阳性的未分化细胞所包围^[16]。另外,比较神经干细胞、胚胎干细胞、造血干细胞和神经球的表达谱后发现,中枢神经系统来源的神经球比其他三者表达更少的“干细胞样(stem-like)”基因^[17]。它们的表达谱更加接近于分化的神经细胞。值得注意的是,当神经干细胞被培养成神经球后,它们的表达方式从“干细胞样”模式转换到更加分化的表达模式。

1.3 神经干细胞亚型

神经球异质性的一个很好印证是中枢神经系统中干细胞具不同亚型。中枢神经干/祖细胞能产生一系列从多能干细胞到更加限制性祖细胞的细胞类型^[15,18]。在中枢神经系统中,根据细胞分裂方式的不同即可划分出两类细胞类型。例如脑室膜下区(subependymal zone)含FGF反应性(FGF-responsive)和EGF反应性(EGF-responsive)两类细胞。FGF反应性细胞以不对称分裂方式产生子代FGF反应性细胞和EGF反应性干/祖细胞。而EGF反应性细胞仅于对称分裂方式产生子代EGF反应性细胞。有观点认为不对称分裂方式导致了细胞的多样性,而对称分裂方式则保持了干细胞的单一性^[19]。

1.4 神经球之间的异质性

除神经球细胞之间存在异质性以外,神经球之间也具有广泛的时空异质性。在形态上,除标准圆球形的神经球外,还存在具不规则边缘的细胞团(cell cluster)结构。在一些神经球表面还发现具纤毛样突起的细胞(ciliated-like cells)^[8]。在分子标记上,不同来源的神经球也表现不同的蛋白质表达组合形式。DNA微阵列方法揭示来自不同年龄人群大脑神经干细胞的神经球表达不同的分子标记^[18],即这些神经球具有不同的分子表型(molecular phenotype)。年龄上的差异也可以通过其他一些性状表现出来:幼龄大鼠神经球比年老大鼠神经球具更高的成球能力、增殖能力和端粒酶活性^[20]。

除了年龄上的差异性外,神经干细胞的来源区域对神经球特征亦具明显影响。分离自人中枢神经系统不同区域的神经球可表达区域特异性的不同分子标记,而且这种区域特异性的基因表达模式随体外传代过程长期不变^[10]。但这种区域特异性也并非无法改变,如将人源神经球与小鼠切片共培养后区域特异

性标记模式会发生改变。

2 神经球的发生方式

神经球的异质性提示神经球并不完全是神经干细胞由体内到体外的单克隆扩增形式,而是不同细胞亚群的混合体。这些细胞亚群以不同的速率分裂增殖,使每个神经球在细胞数量、细胞类型和细胞生长上综合为一个独一无二的个体。神经球的形成除细胞自身的增殖外,还包括细胞重团聚、神经球融合和神经球对单细胞的吸纳等方式。

2.1 细胞重团聚

从人神经干细胞单细胞扩增形成神经球是低效且费时的^[7],这个过程甚至需要8周时间^[21]。而较低密度(1.0×10^4 个/ml)接种培养神经干细胞时成球速度要快得多,一般4天后就能成球。显然神经球的快速形成另有原因。神经球包括不同来源的细胞类型提示神经球的形成不仅来自于单个干细胞的扩增,同时也来自细胞间的自组装(self-assembly),即重团聚(reaggregation)^[5,7,22]。重团聚现象是分离的神经干/祖细胞在培养基中重新聚合到一起的过程。该现象在神经球传代过程中较为常见,高密度培养条件下甚至在数分钟之内就有神经干细胞聚集到一起。更为直观的是,用3种不同的荧光染料标记神经干/祖细胞后混合培养,形成的神经球均带上3种标记^[7]。另外,神经干/祖细胞在U形管比平底管中更易重团聚形成神经球,前者比后者大约快1.5倍^[7],提示物理条件是重团聚的一个重要因素。

重团聚有两种类型^[22]:(1)短期重团聚,维持数分钟到数小时,被广泛用于分析细胞-细胞间相互作用和细胞表面特性,并用于探讨细胞黏附分子的作用;(2)长期重团聚,维持数周,用以可控条件下探讨细胞的组织样结构(tissue-like cell arrangements)形成机制。鸟类视网膜结构的重建是长期重团聚的一个很好例子:具干细胞特性的鸟类胚胎视网膜细胞在适当的诱导条件下,经过大约10天的时间长期重团聚为各种类型的细胞球,最后形成具成熟视网膜层状结构特征的组织结构——该“模拟眼睛”仅仅缺少了玻璃体和视网膜色素上皮细胞。从神经球形成的快速和结构层次性两方面看来,神经球的形成同时兼顾重团聚的两种类型。

2.2 神经球融合

在神经球的活动性上,除在球内部细胞发生持续性的细胞迁移外^[13],神经球之间也发生互相融合现

象。神经球培养两周后,随着总的神经干/祖细胞增加,神经球的数量发生递减,提示培养过程中发生神经球融合^[7]。实时摄影显微图象显示,即使在高度分散、低密度神经干细胞的“克隆”培养条件下,悬浮神经球、甚至已经贴壁生长的神经球都倾向于合并到一起^[4]。这些神经球不仅能够移动,而且互相拖拽、相互吸收形成一个更大的神经球。这些高度活动的神经球具有自动定向的能力,部分动力来自于球外表细小的细胞突起。融合现象是一种快速普遍的现象,并不依赖于组织、年龄、来源物种或培养基。将来自7周龄人胚胎皮层形成的神经球和小鼠前脑神经干细胞形成的神经球共培养,两种不同标记的神经球最终融合到一起,形成嵌合体^[4]。

神经球融合后球内细胞可以进行随机的自由运动,最终细胞均匀分散在神经球各处,形成嵌合球。而神经球的形状从融合初期的不规则状逐渐变成椭圆形,最后变成球形^[13]。

2.3 神经球对单细胞的吸纳

除神经球之间发生融合外,神经球也会在其外表伸出纤维状细胞突起,将运动的单个细胞“纳入囊中”^[5]。除运动的悬浮细胞外,黏连于培养皿底部的单个细胞也经常被吸收与合并到运动的神经球中,成为多克隆(polyclonality)神经球的一部分^[4]。

2.4 细胞增殖

细胞增殖在神经球的形成过程中具有重要作用。经打散后即使较低密度(大约 1.0×10^4 个/ml)接种培养的神经干细胞也能够在几天内(3~4天)成球,而且细胞总数显著增加^[4]。

在单细胞克隆成球实验中,细胞增殖起到了决定性的作用,但这个过程竟长达3~8周。那些具备分裂倾向性甚至已经开始进行分裂(G_2/M 期细胞)的单细胞,在胞质分裂完成后可建立细胞-细胞间联系,通过膜的不对称性建立细胞信号通路、信号途径间的交互作用,随后通过不对称分裂产生不同细胞亚型,最终形成神经球^[15]。

3 神经球形成过程中的影响因子

细胞-细胞间和细胞-胞外基质间的相互作用是影响神经球形成的重要因素。在神经球中普遍表达的相关分子主要包括 β_1 整联蛋白、EGFR、钙黏蛋白(cadherins)等^[1,15]。

3.1 β_1 整联蛋白

β_1 整联蛋白作为一种胞外基质受体,可作为调控

因子通过 MAPK 途径^[23,24]调节神经干细胞扩增、迁移和分化过程,以及维持神经干细胞的干细胞性^[12]。同时, β_1 整联蛋白在细胞中的表达可通过生长因子信号途径调制次级神经球的形成^[15]。 β_1 整联蛋白缺失神经球中,小型神经球的比例增大;而 EGF、FGF 和 NGF 等生长因子信号可以掩盖 β_1 整联蛋白的缺失。神经球细胞的相互黏附和迁移也依赖于 β_1 整联蛋白^[12]。此外, β_1 整联蛋白也可能通过介入 EGF 受体途径提高细胞应答生长因子的灵敏性^[15]。值得注意的是,在乳腺癌细胞的研究中发现,EGFR 与 β_1 整联蛋白的交互作用(crosstalk)在 3D 结构中得到加强,而在类似单层细胞这样的 2D 环境中难以发生^[24],而神经球正是一种理想的 3D 结构。

3.2 钙黏蛋白

神经球中富含 Ca^{2+} 依赖性的钙黏蛋白超家族分子^[1]。它是一种跨膜连接受体,通过位于细胞间的连环蛋白(catenin)连接到肌动蛋白微丝。钙黏蛋白与整联蛋白一样可介入 EGF 受体信号途径和影响 MAPK 激活^[25]。“钙黏蛋白/连环蛋白/细胞骨架复合体”介导神经球形成过程中重要的细胞缩聚(condensation)过程^[26],神经球细胞通过该过程最终形成非紧密连接细胞群体结构^[1]。

3.3 胞外基质(extra cellular matrix, ECM)

ECM 对体外神经球中细胞的迁移活动具有重要影响^[9],从而有可能影响重团聚过程。ECM 可加快细胞迁移,但不同类型 ECM 对神经球中细胞迁移的调节能力不同。层黏连蛋白(laminin)和纤维结合蛋白(fibronectin)比硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG)具有更强的诱导迁移能力。这些 ECM 分子对神经元和神经胶质细胞的细胞分化选择并无影响。因为层黏连蛋白和纤维结合蛋白可连接一系列整联蛋白,所以基质的变化可能导致整联蛋白信号途径受到不同程度的影响。除影响迁移外,基质和整联蛋白相互作用可影响细胞扩增和成熟。

4 神经球形成机制假说

神经球是悬浮细胞通过聚合形成的“细胞球”的一种,理论上来说任何组织的分裂细胞在无血清培养基中置于非黏附基质上时都会聚合为悬浮的细胞团^[4,17]。因此神经球形成似乎并无特异性。但因为神经球和神经球细胞存在广泛的异质性,神经球来自于神经干细胞单克隆的观点正不断被否定。神经球

中干细胞的产生有两种假说:一是由神经干细胞产生祖细胞,二是由祖细胞产生神经干细胞。前者认为一个真实的多能干细胞首先通过对称分裂产生一个内核,再逐渐扩增形成神经球,并在成球过程中产生其他的细胞类型。后者认为一个原始的祖细胞分裂多次后,形成的群体才具有在球外缘通过诱发不对称分裂产生神经干细胞的足够环境条件,它们包括 ECM、细胞沉淀物(deposition)、细胞间的连接和一些生长因子^[15]。

扩增性非干细胞在神经球中的存在位置更加符合祖细胞到干细胞的转换假说^[27]。神经球中 nestin⁺ 的分裂细胞总是包围着一个由分化的 GFAP⁺ 细胞和 β -III 微管蛋白⁺ 细胞组成的内核。分裂活动主要发生于神经球外缘,而神经干细胞特异性标记如 Notch1 和 nestin 也在此表达^[15]。事实上,神经球本身可以产生 ECM 分子(层黏连蛋白、纤维结合蛋白、 β_1 整联蛋白)^[15]和生长因子受体^[1],甚至可以分泌生长因子 EGF-2^[1]。

尽管神经干细胞的确切成球机制并不清楚,但是有证据表明 Notch 信号途径和成球过程存在密切关系。很早以前,在体外培养中发现神经干细胞的接种密度可显著影响其生存和增殖状态^[28],最近的研究表明 Notch 信号在其中起到重要的调节作用^[29],由此推测神经球的形成过程也可能与此信号途径相关。进一步研究发现 Notch 效应物——Hes1 和 Hes5 表达水平随神经球体积增大而升高^[7]。另一方面,Notch 信号途径的组成性(constitutive)激活增强神经球的形成^[30]。提示细胞-细胞之间联系的加强可激活 Notch 信号途径,导致神经干/祖细胞增殖的加快;而 Notch 信号途径也可通过阻止细胞分化^[31]、提高细胞间相互作用和调节细胞周期来提高神经球细胞自我更新^[30]。

如前所述,神经球的形成并不仅仅来自于神经干细胞和/或祖细胞的扩增。神经球的建立应该是一个动态的、不断被调整的复杂过程,除通过分裂扩增产生外,尚存在细胞重团聚、神经球融合等混合方式(图 2),其中哪一种因素占主导地位,各占多大比例尚待进一步证明。

5 神经球方法适用性

尽管神经球方法在神经生物学研究中被广泛应用,但是神经球的超微结构和抗原反应提示:神经球并不是神经干细胞克隆,而是保持细胞独立性的微型

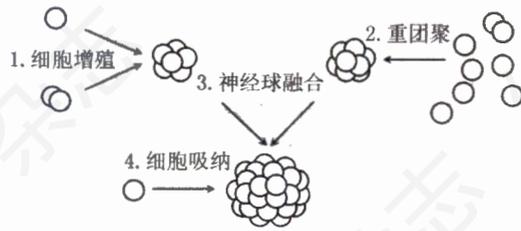


图2 神经球产生的几种可能方式

(1)单细胞分裂增殖后可建立细胞-细胞间联系,再通过不对称分裂产生不同细胞亚型,最终形成神经球;(2)细胞之间的重团聚是神经球培养过程中常见的现象。(3)神经球之间也可以发生融合,产生更大的神经球。(4)悬浮或贴壁的单个细胞可被神经球表面的细胞突起吸纳。

“生态系统”^[10]。因此,神经球方法的适用范围必须重新定位^[4]:利用神经球来测量干细胞的克隆性(clonality)、数目和分化潜能是具有风险的。必须在认识到该方法的使用范围的同时注意它的灵敏性和专一性^[4]。

这种风险性的成因归根结底就是神经球和神经干细胞之间并非一一对应^[32]。首先两者之间存在显著的数量差异:大部分的神经球细胞实际上来自非干细胞。以往的大量培养(bulk-passaged cells)^[33]和单神经球分离培养(single-sphere dissociation)^[34]方法培养结果与实际情况比较具有很大出入。它们都高估了神经干细胞的数量^[4]。其次,神经球和神经干细胞之间存在表达差异。神经球是更加限制性的细胞群体^[17],它的表达谱从“干细胞样(stem-like)”向更加分化的状态偏移。此外,神经球具高度的活动性,体现在其内部和外部,并且神经球之间可以融合,神经球也可以不断吸纳单个细胞,由此形成更大的神经球。另外,神经球细胞具有可塑性:细胞融合^[35]、干细胞的跨越分化(transdifferentiation)等现象为神经球的复杂性和随意性增加了新的因素。干细胞的跨越分化是成体干细胞受微环境影响脱离其正常分化途径,而转向分化为其他类型细胞的现象。例如,在诱导条件下,造血干细胞能够分化成肌细胞;肌肉祖细胞可分化为血细胞。在神经干细胞上亦有典型例子:来源于成年小鼠大脑的神经干细胞可移植到鼠胚甚至鸡胚,形成嵌合鼠胚和嵌合鸡胚,并最终发育为各个胚层的细胞^[36]。

基于上述原因,在神经球方法的适用范围上,必须给予一个新的定义,即神经球形成是一种有用的细胞培养方法,而不能作为一种计量工具^[4]。例如人们不能通过测量神经球直径来判断神经干细胞增殖。

因为球是三维结构,而测量直径只是二维的方法,在神经球表面的某些增殖细胞因为整合进入三维神经球内而在直径的增长上并未作多大贡献。鉴于神经球方法的这些缺点,在微孔板内接种单个神经干细胞培养成球是确认克隆关系(clonal relationship)的相对最严谨方法。

尽管如此,神经球制备及神经球方法仍然是目前神经生物学中难以替代的方法。神经干细胞的体外扩增仍然需要借用这种经典的操作手段。在移植手术中,相比建立3D基质控制神经干细胞生长分化,神经球更易制备,并可批量的生产。神经球的3D结构构建了一个可应答生长因子和ECM复合体,并可反馈调控环境变化的微环境^[15]。在移植实验方面,神经球移植亦有成功例子:人神经球的植入显著性减轻实验鼠的大脑缺血损伤。神经球细胞可迁移至受损部位,分化为成熟神经元,并最终与宿主细胞神经网络建立突触联系^[37]。

目前并不能对神经干细胞在体外为什么和如何成球给出一个精确的答案,有一种假设是神经球的形成是细胞对体外环境的适应,因为成球是热动力学上最优化的组合形式^[8]。在其它类型细胞中同样发现成球的事实为成球机制提出了新问题:成球是否真的不具有组织特异性?这些细胞到底为什么倾向于成球?因为神经球存在异质性以及神经球方法的局限性,在进行移植应用之前,弄清神经球发生的确切机制是十分必要的。

参考文献 (References)

- [1] Lobo MV *et al.* *J Histochem Cytochem*, 2003, **51**: 89
- [2] Parati EA *et al.* *Brain Res*, 2002, **925**: 213
- [3] Reynolds BA *et al.* *Dev Biol*, 1996, **175**: 1
- [4] Singec I *et al.* *Nat Methods*, 2006, **3**: 801
- [5] Widera D *et al.* *Eur Cell Mater*, 2006, **11**: 76
- [6] Brazel CY *et al.* *Aging Cell*, 2005, **4**: 197
- [7] Mori H *et al.* *J Neurosci Res*, 2006, **84**: 1682
- [8] Bez A *et al.* *Brain Res*, 2003, **993**: 18
- [9] Kearns SM *et al.* *Exp Neurol*, 2003, **182**: 240
- [10] Kim HT *et al.* *Exp Neurol*, 2006, **199**: 222
- [11] Caldwell MA *et al.* *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 475
- [12] Leone DP *et al.* *J Cell Sci*, 2005, **118**: 2589
- [13] Wang TY *et al.* *Brain Res*, 2006, **1107**: 82
- [14] Mori H *et al.* *J Biosci Bioeng*, 2007, **103**: 384
- [15] Campos LS. *J Neurosci Res*, 2004, **78**: 761
- [16] Hall PE *et al.* *Stem Cells*, 2006, **24**: 2078
- [17] Parker MA *et al.* *Exp Neurol*, 2005, **194**: 320
- [18] Suslov ON *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 14506
- [19] Shen Q *et al.* *Development*, 2002, **129**: 4843

- [20] Chen J *et al. Neuroscience*, 2006, **140**: 377
[21] Uchida N *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 14720
[22] Layer PG *et al. Trends Neurosci*, 2002, **25**: 131
[23] Campos LS *et al. Development*, 2004, **131**: 3433
[24] Wang F *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 14821
[25] Betson M *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 36962
[26] Gumbiner BM. *Cell*, 1996, **84**: 345
[27] Raff M. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, **19**: 1
[28] Johe KK *et al. Genes Dev*, 1996, **10**: 3129
[29] Oishi K *et al. Dev Biol*, 2004, **276**: 172
[30] Nagao M *et al. Mol Cell Biol*, 2007, **27**: 3982
[31] Louvi A *et al. Nat Rev Neurosci*, 2006, **7**: 93
[32] Reynolds BA *et al. Nat Methods*, 2005, **2**: 333
[33] Tropepe V *et al. Dev Biol*, 1999, 208: 166
[34] Vanderluit JL *et al. J Cell Biol*, 2004, **166**: 853
[35] Chen KA *et al. Exp Neurol*, 2006, 198: 129
[36] Clarke DL *et al. Science*, 2000, **288**: 1660
[37] Ishibashi S *et al. J Neurosci Res*, 2004, **78**: 215

Heterogeneity, Formation of Neurosphere, and Re-evaluation of Neurosphere Assay

Yao-Fei Yang, Yi Sun*

(College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Neural stem cell can be grown *in vitro* as the free-floating structure known as neurosphere. Based on the conception that neurospheres are the clonal cell clusters of neural stem cells, neurosphere assay has been widely used in neurobiological research for a long time. However, it is reported recently that most cells in neurospheres are not *bona fide* neural stem cells. Heterogeneity characterizes not only the neurospheres but the neurosphere-forming cells as well. Besides of cell proliferation, cell reaggregation and neurosphere mergence also play their roles in the formation of neurospheres. Moreover, several important molecules take part in the process. Therefore, before therapeutic applications of neurospheres are finally reached, a more complete understanding of neurosphere assay should be needed, as the sensitivity and specificity of the assay should be well re-defined, and the usefulness of the assay has to be re-examined carefully.

Key words neurosphere assay; neurosphere heterogeneity; neurosphere formation

Received: July 24, 2007 Accepted: September 14, 2007

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