

神经干细胞的研究进展

孟晋宏 罗娜 鞠躬

(第四军医大学神经科学研究所 西安 710032)

神经干细胞(Neural stem cells, NSCs)是指神经系统中处于较早发育阶段的细胞群体,它们可以通过自身的对称性或不对称性两种分裂方式进行自我复制,产生神经组织中不同发育阶段和不同分化方向的细胞,最终生成具有一定细胞数目和多种细胞类型的神经组织^[1,2]。本文就 NSCs 的发生和分化、定位、特点、影响其分化的因素以及当前对 NSCs 的应用做如下介绍。

一、神经干细胞的发生和分化

在发育中,最早期的细胞是受精卵(Zygote),这种细胞具有最强的分化潜能,但是不具备自我复制能力。然后受精卵发育分化成为胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES 细胞),这种 ES 细胞可以自我复制,并且可以被诱导分化为不同组织中的干细胞。在适当的条件下,ES 细胞可以被诱导成为 NSCs,成为神经组织各种类型细胞的来源。以后,NSCs 又可以根据不同的时间和空间因素进一步分化,经过双潜能细胞(bipotential cell,如 O-2A 细胞)、单潜能细胞(unipotential cell,如神经元母细胞 neuroblast)等等,最终生成终末分化细胞(terminal differentiated cells)^[2]。

在啮齿类动物,NSCs 在中枢神经系统(Central nervous system, CNS)的发生和分化情况如下:胚胎期的 NSCs 能够迅速分裂、增殖,产生大量细胞,以满足发育期 CNS 对细胞数目的大量需求。同时,它还具有一种不对称分裂的能力,能够产生一个与它自身完全相同的子细胞和一个已经开始分化的子细胞。通过这种特殊的分裂方式产生一系列分化程度不同的子代细胞,直到最终形成终末分化细胞,以满足神经系统细胞多样化的需求。胚胎期 NSCs 的这种活跃增殖只持续一周左右,出生后神经系统已基本成形,这些 NSCs 的增殖渐渐变慢,只存留于中枢神经系统的一些特定部位。到了成年期,NSCs 的特点是维持相对静息状态,只在机体需要的时候快速扩增,这时它们的自我更新只是为了维持体内 NSCs 群体的存在^[3]。

二、神经干细胞的定位

在啮齿类动物,胚胎期的 NSCs 主要位于纹状体^[4]、大脑皮层^[5,6]、视网膜^[7-9]以及脊髓^[6]等部位,成年期的 NSCs 则主要存在于侧脑室的室管膜下区(Subependyma)^[10]和脊髓的室管膜区(Ependyma)^[11],近来又有研究表明在成年动物眼睛的睫状缘含有静息态 NSCs^[12,13]。利用细胞培养技术目前已经成功地从上述部位分离出多潜能 NSCs 或神经前体细胞(Progenitor)。除了啮齿类动物外,人的胚胎组织也可以作为 NSCs 的来源^[14-17],目前已经成功地从人的胚胎中分离和培养了 NSCs,建立了人源性的可移植神经干细胞系。

三、神经干细胞的特点

NSCs 最突出的两个特点是自身复制和多方向分化潜能^[18-20]。这两个特点的实现在于神经干细胞的分裂。如前所述,神经干细胞可以进行不对称分裂^[21]。简单的说,不对称分裂即 $A \rightarrow A + B$ 的分裂方式。是指一个干细胞 A 通过分裂,可以产生两个互不相同的子代细胞,其中的一个细胞 A 是和母代干细胞完全相同的细胞,也具有多潜能特性,即具有分化成神经系统不同类型细胞的能力;另外一个细胞 B 可能因为启动了某种基因机制,成为一个已具有一定分化方向的神经前体细胞。神经前体细胞并非终末分化细胞,它仍然保持部分干细胞的特性,如可以自身复制,进行不对称分裂等等。这种细胞进一步的不对称分裂就可能产生一个分化上相对更加成熟的神经前体细胞。如此经过许多代的分裂和复制,最终产生终末分化细胞。当然,NSCs 本身也可以进行对称性分裂 $A \rightarrow A + A$,产生和它自身完全相同的两个子代干细胞。在培养状态下,NSCs 受生长因子的刺激,复制分裂,形成一个个干细胞团,这些干细胞团实际上由干细胞和前体细胞组成。将细胞团吹打成单细胞悬液,其中的干细胞又可以继续在生长因子的作用下,产生新的干细胞团,而其余的前体细胞,如果种植到适合其生长分化的基质

上,就开始朝一定的方向分化,最终形成终末状态的神经元、星形胶质细胞或少突胶质细胞。

四、影响分化的因素

1. 外源性因子对 NSCs 分化的影响

表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是两种应用最广泛的刺激干细胞分裂的生长因子^[18],它们可以维持 NSCs 的存活,刺激分裂;一方面保持 NSCs 的未分化状态,另一方面在一定程度上影响它们的分化。其中,EGF 多诱导 NSCs 向星形胶质细胞分化,而 bFGF 则具有更强的使 NSCs 向神经元方向分化的作用^[22]。有的文献认为,对 bFGF 反应的 NSCs 出现于胚胎 8.5 天,而对 EGF 反应的 NSCs 则出现较晚,并且具有一定的空间特异性。分别阻断 EGF 和 bFGF 的作用,则发现单独 EGF 或单独 bFGF 均可引发 NSCs 的增殖,而且,在低细胞浓度培养条件下,同时使用两种因子可以增加培养细胞的增殖速度,从而提示对 EGF 反应的 NSCs 和对 bFGF 反应的 NSCs 分别属于不同的干细胞群^[23]。

不同浓度的骨形成蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)对不同时期 NSCs 的分化具有不同作用。在 E16 大鼠的皮层,1-10 ng/ml BMPs 可以促进神经元和星形胶质细胞的分化,100 ng/ml 则使细胞死亡。到了胚胎晚期, BMPs 主要促进星形胶质细胞的生成,抑制少突胶质细胞的生成^[24]。

睫状神经营养因子/白血病抑制因子(Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor, CNTF/LIF)通过 Jak-Stat 信号转导系统诱导 CNS 细胞向星形胶质细胞分化^[25]。甲状腺素 3(T3)诱导产生少突胶质细胞的前体。血小板源生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)诱导神经上皮干细胞的化学趋化性。Sonic hedgehog(Shh)可以促进鼠类脊髓前体细胞向神经元方向的分化,并且和神经营养因子 3(Neurotrophin 3, NT3)一起,诱导运动神经元标记物 Islet-1 的表达^[26]。

最近的研究结果显示,分离成年小鼠室管膜下区(Subependyma)组织,当以高细胞浓度培养时,分化成神经元的比例下降,提示细胞-细胞相互作用或组织中的旁分泌机制也可能影响 NSCs 的分化^[27]。

对于不同种属来源的 NSCs,外源性因子发挥不同的作用。如对啮齿类动物 NSCs, PDGF 可以增加

神经元的生成;而对来源于人中脑的 NSCs, PDGF 却降低神经元的生成。对于人源性 NSCs, CNTF/LIF 可以像对鼠源性 NSCs 那样,支持向星形胶质细胞的分化,但同时它们也使分化的神经元数量增加了 2 倍^[28]。细胞内 cAMP 依赖性信号转导通路也被证实与神经前体细胞向星形胶质细胞方向的分化有关^[29]。

2. 体内诱导分化的证据

1) 被移植的 NSCs 易受移植部位局部环境因素的影响,向移植部位特异性细胞的方向分化。如将海马源神经干细胞系 HiB5 移植到新生雪貂的海马和小脑,发现这种细胞可以整合到宿主神经组织中,并且表达移植区的细胞形态及特性^[30]。从成体海马分离出的贴壁生长的 NSCs 在体外培养一年后,再移植到成年大鼠的海马,发现仍向海马神经元分化^[31]。

2) 被移植 NSCs 的分化也受其本身内在性质的影响。分离较早发育时期的皮层神经前体细胞,移植到较晚发育时期的受体皮层时,供体细胞可以分化成为受体皮层的各层细胞^[32];而将较晚发育时期的皮层前体细胞植入较早发育时期的动物皮层时,细胞只分化成为发育上较晚的皮层细胞^[33],提示某些内在性质也能够影响细胞的分化。最近有人将成年小鼠室管膜下区的 NSCs 移植到大脑的不同部位,发现移植细胞在嗅球处发生广泛的整合,并分化为成熟神经元,而在纹状体和皮层只有小范围的整合和分化^[34]。这些结果提示 NSCs 的分化是其本身性质和环境因素共同作用的结果。

五、应用

研究 NSCs 的分化能力和特性,最终目的都是为了寻求更好的解决中枢神经系统损伤及变性疾病的临床治疗方法。NSCs 的体内移植,已经被认为是一种较为理想的治疗工具。

目前 NSCs 对各种 CNS 疾病动物模型进行移植,已经取得的进展有:将 C17.2-LacZ 细胞移植到光解作用造成的神经元变性的大鼠大脑中,发现 15±7% 的细胞在损伤区分化成锥体细胞,补充受损变性的宿主细胞;而在对照大鼠,移植细胞仅分化成胶质细胞或者保持未分化状态^[35]。将 NSCs 移植到缺髓鞘(md)大鼠的脊髓,发现 NSCs 在移植区主要分化为少突胶质细胞,并在移植部位局部围绕脊髓轴突形成新的髓鞘,补充 md 大鼠缺失的功能。而在体外培养的情况下, NSCs 一般主要分化成为

星形胶质细胞^[36]。将 C17.2 细胞移植到由于髓鞘碱性蛋白(Myelin basic protein, MBP)缺失造成 CNS 广泛髓鞘异常小鼠(shiver 小鼠)的大脑,发现 C17.2 细胞分化成大量正常的少突胶质细胞,并在轴突处形成正常髓鞘,广泛替代突变的少突胶质细胞,并可以一定程度上恢复突变小鼠的功能^[37]。用已向神经元方向分化的 ES 细胞移植到外伤后 9 天的大鼠脊髓,5 星期后发现移植细胞在受体脊髓存活并分化为星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元,迁移距离 8mm。此外,功能恢复实验也证明接受细胞移植大鼠的后肢持重及运动协调性有极大的改善^[38]。

根据上述的这些移植结果,有人开始尝试用基因调控的手段,将神经营养因子转染到神经干细胞系中,观察表达或分泌神经营养因子的 NSCs 对神经再生或神经疾病的作用。用逆转录病毒法将神经营养因子 NT3 基因转入神经干细胞系 C17.2 中,并将这种细胞注入正常大鼠的脊髓中,发现转染后的 C17.2-NT3 细胞可以在宿主脊髓内存活,分化成为神经元和胶质细胞,并且观察到长距离的迁移^[39]。

这些实验均从一定的角度证明,NSCs 由于其在发育中的特殊位置和其本身所具有的分化特性,可以作为一种颇具前景的细胞用于 CNS 损伤和变性疾病的治疗^[40]。

参 考 文 献

- [1] Gage FH, Fisher LJ. 1995, *Annu Rev Neurosci*, **18**: 159 - 92.
- [2] Gage FH. 2000, *Science*, **287**(5457): 1433 - 8.
- [3] Price J. 1995, *Curr Biol*, **5**(3): 232 - 4.
- [4] Reynolds BA, Tetzlaff W, et al., 1992, *J Neurosci*, **12**(11): 4565 - 4574.
- [5] Davis AA, Temple S. 1994, *Nature*, **372**(6503): 263 - 266.
- [6] Williams BP, Price J. 1995, *Neuron*, **14**(6): 1181 - 1188.
- [7] Turner DL, Cepko CL. 1987, *Nature*, **328**(6126): 131 - 136.
- [8] Jensen AM, Raff MC. 1997, *Dev Biol*, **188**(2): 267 - 279.
- [9] Reh TA, Levine EM. 1998, *J Neurobiol*, **36**(2): 206 - 220.
- [10] Morshead CM, Reynolds BA, et al., 1994, *Neuron*, **13**(5): 1071 - 1082.
- [11] Namiki J, Tator CH. 1999, *J Neuropathol Exp Neurol*, **58**(5): 489 - 498.
- [12] Ahmad I, Tang L, et al., 2000, *Biochem Biophys Res Commun*, **270**(2): 517 - 521.
- [13] Tropepe V, Coles BL, et al., 2000, *Science*, **287**(5460): 2032 - 2036.
- [14] Flax JD, Aurora S, et al., 1998, *Nat Biotechnol*, **16**(11): 1033 - 1039.
- [15] Vescovi AL, Gritti A, et al., 1999, *J Neurotrauma*, **16**(8): 689 - 693.
- [16] Momma S, Johansson CN, et al., 2000, *Curr Opin Neurobiol*, **10**(1): 45 - 49.
- [17] Johansson CB, Momma S, et al., 1999, *Cell*, **96**(1): 25 - 34.
- [18] Gritti A. 1996, *J Neurosci*, **16**(3): 1091 - 1100.
- [19] Reynolds BA, Weiss S. 1996, *Dev Biol*, **175**(1): 1 - 13.
- [20] Weiss S, van der Kooy D. 1994, *Neuron*, **13**(5): 1071 - 1082.
- [21] Matsuzaki F. 2000, *Curr Opin Neurobiol*, **10**(1): 38 - 44.
- [22] Palmer TD, Markakis EA, et al., 1999, *J Neurosci*, **19**(19): 8487 - 8497.
- [23] Tropepe V, Sibilio M, et al., 1999, *Dev Biol*, **208**(1): 166 - 188.
- [24] Mehler MF, Mabie PC, et al., 2000, *Dev Neurosci*, **22**(1 - 2): 74 - 85.
- [25] Molne M, Studer L, et al., 2000, *J Neurosci Res*, **59**(3): 301 - 311.
- [26] Dutton R, Yamada T, et al., 1999, *J Neurosci*, **19**(7): 2601 - 2608.
- [27] Dutton R, Bartlett PF. 2000, *Dev Neurosci*, **22**(1 - 2): 96 - 105.
- [28] Galli R, Pagano SF, et al., 2000, *Dev Neurosci*, **22**(1 - 2): 86 - 95.
- [29] McManus MF, Chen LC, et al., 1999, *J Neurosci*, **19**(20): 9004 - 9015.
- [30] Renfranz PJ, Cunningham MG, et al., 1991, *Cell*, **66**(4): 713 - 729.
- [31] Gage FH, Coats PW, et al., 1995, *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**(25): 11879 - 11883.
- [32] McConnell SK. 1988, *J Neurosci*, **8**(3): 945 - 974.
- [33] Frantz GD, McConnell SK. 1996, *Neuron*, **17**(1): 55 - 61.
- [34] Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, et al., 1999, *Ann Neurol*, **46**(6): 867 - 877.
- [35] Snyder EY, Yoon C, et al., 1997, *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**(21): 11663 - 11668.
- [36] Hammang JP, Archer DR, et al., 1997, *Exp Neurol*, **147**(1): 84 - 95.
- [37] Yandava BD, Billingham LL, et al., 1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**(12): 7029 - 7034.
- [38] McDonald JW, Liu XZ, et al., 1999, *Nat Med*, **5**(12): 1410 - 1412.
- [39] Liu Y, Himes BT, et al., 1999, *Exp Neurol*, **158**(1): 9 - 26.
- [40] Shihabuddin LS, Palmer TD, et al., 1999, *Mol Med Today*, **5**(11): 474 - 480.