

质膜的张力非常敏感^[19]。

鉴于 Ca^{2+} 是细胞的多功能信使, Ca^{2+} 常常作为触发信号引起胞吐作用(如神经递质释放), 目前已发现细胞膜表面的钙受体不仅对胞外游离 Ca^{2+} 浓度起调节作用, 而且参与某些重要的生理与病理过程^[20]。因此, 很可能, 在胞吐过程中膜表面的钙受体也参与了膜融合机制, 这方面的问题很值得进一步开展研究。

参 考 文 献

- [1] Monck, JR. et al., 1994, *Neuron*, 12: 707-716.
 [2] Schweizer, FE. et al., 1995 *Neuron*, 14: 689-696.
 [3] 崔宗杰, 1996, 生理科学进展, 27(3): 233-237.
 [4] Harris, KM. et al., 1995, *Neuropharmacology*, 34(1): 1387-1395.
 [5] Ramaswami, M. et al., 1994, *Neuron*, 13: 363-375.
 [6] Li C, 1995, *Nature*, 375: 594-599.
 [7] McMahon HT, et al., 1995, *J Biol. Chem.* 270: 2213-2217.
 [8] 宋玲, 陈宜张, 1995, 神经科学, 2(1): 22-45.
 [9] 徐晓虹, 吴馥梅, 1997, 细胞生物学杂志, 19(3): 123-128.
 [10] Okamoto M et al., 1997, *J Bio. chem.* 272(50): 31459-31464.
 [11] Nakata T, et al., 1998, *J cell Bio*, 140(3): 659-674.
 [12] Calakos, N. et al., 1996, *Physiol. Rev.*, 76(1): 1-29.
 [13] 吴馥梅等, 1997, 生物化学与生物物理进展, 24(3): 211-214.
 [14] Redecker, P. 1996, *Cell Tissue Res.*, 283: 443-454.
 [15] Schneider, SW. et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 94: 316-321.
 [16] Jena, BP, 1997, *Cell Biol. International*, 21(5): 257-259.
 [17] Neher, E, 1993, *Nature*, 363: 497-498.
 [18] De Camilli, P, et al., 1996, *Neuron*, 16: 481-486.
 [19] Solsona C, et al., 1998, *Biophys. J.*, 74: 1061-1073.
 [20] 王玺, 1998, 国外医学: 分子生物学分册, 20(3): 122-126.

神经干细胞和祖细胞

刘仕勇 杨 辉

(第三军医大学新桥医院神经外科 重庆 400037)

利用细胞培养技术分离的神经干细胞和祖细胞是近年来研究的热点之一。1988年 Fred-erken 等将癌基因 c-myc 和 sv 40 大抗原(sv 40 large antigen)转入发育中的胚胎细胞而获得了永生性神经祖细胞(Immortalized neural progenitor cell), 并证明它们在体外培养时具有无限增殖能力, 移植到体内可分化为神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。由于此类细胞具有干细胞样属性, 因此有学者称作神经干细胞^[1,2]。此后, Reynolds 等利用无血清细胞培养直接从胎鼠和成年大鼠分离出具有干细胞属性的细胞群, 由于此类神经干细胞须在具有丝裂原作用的生长因子刺激下才能维持干细胞特性, 因此被称为生长因子维系的(Growth factor extended, GFE)神经干细胞^[3-7]。

一、神经干细胞和祖细胞的定义及其属性

作为干细胞(stem cell), 它应具有以下属性:(1)自我维持和自我更新的能力;(2)具有多种分化潜能, 能分化为本系大部分类型细胞;(3)增殖分裂能力;(4)这种自我更新能力和多种分化潜能可以维持相当长的时间, 甚至终生;(5)对损伤和疾病具有反应能力^[7,8]。而作为神经干细胞(neural stem cell), 据 Mckay 1997年在 Science 上发表的文章, 就是指具有分化为神经元细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞的能力, 能自我更新并足以提供大量脑组织细胞的细胞^[9]。祖细胞(neural progenitor)是相对于干细胞而言, 其分化能力和自我维持、自我更新能

感谢张可成先生对本文的指导。

力受到限制,仅具有单潜能或双潜能分化能力或其干细胞样特性只能维持较短的时间。而前体细胞(neural precursor)则是一个不太严格的术语,即某种前体细胞是在发育进程中较另一种细胞处于更早的阶段,可统称干细胞和祖细胞^[8,9]。

自我更新和多分化潜能是神经干细胞的两个基本属性。GFE 维系的神经干细胞能在丝裂原信号的刺激下不断增殖,并维持干细胞特性,此类因子主要包括表皮生长因子(EGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF),也有报道胰岛素样生长因子(IGF)和转化生长因子(TGF)有类似作用^[5,6,13]。在永生性神经干细胞系中,增殖和自我更新的能力更为突出,不使用丝裂原信号也能维持干细胞属性。无论是 GFE 干细胞还是永生性干细胞均能在体外分化为三种主要神经系细胞,使用免疫组化可以显示有大量神经元标记物(如神经元特异性烯醇化酶、神经丝蛋白等)、星形胶质细胞标记物(胶质纤维酸性蛋白)、少突胶质细胞标记物(半乳糖脑苷甙等)的存在,同时亦可见到 TH(酪氨酸羟化酶)、5-HT(5-羟色胺)阳性细胞,电生理实验证明了谷氨酸、 γ -氨基丁酸和乙酰胆碱等神经递质的存在^[3-7]。祖细胞的分化潜能相对于干细胞则受到限制,只具有单潜能或双潜能分化的能力,如 0-2A(Oligodendrocyte-2 and Astrocyte, 0-2A)祖细胞只能分化为星形胶质细胞和少突胶质细胞^[13]。

迄今为止,人们在发育中的胎脑和成年个体脑区都成功地分离了符合上述定义的神经干细胞。哺乳类动物如大鼠,在胚胎的大部分脑区,包括皮层、室管膜下层、纹状体、海马、中脑等区域都存在神经干细胞,而在正常成年大鼠的纹状体、皮层和室管膜下层也都证实了神经干细胞的存在^[3-7]。此外,在人胚的皮层和纹状体也成功地分离了神经干细胞^[6]。值得注意的是,人们在研究靠近侧脑室的室管膜下层(Subependymal zone, SZ)的细胞时发现 SZ 细胞可分为两类,一类为正在增殖的祖细胞,另一

类为基本处于静息状态的干细胞,祖细胞存在时间短,增殖后不断地向外迁移分化或死亡,干细胞则缓慢分裂,在维持干细胞库稳定的同时产生祖细胞以补充丢失的祖细胞^[10-12]。

目前的神经干细胞多采用无血清细胞培养和细胞克隆技术分离。培养液在使用合成培养基的基础上添加谷酰胺、胰岛素、转铁蛋白、黄体酮、腐胺和具有丝裂原作用的生长因子(如 EGF, bFGF 等)^[3-7]。待原代克隆形成后挑选单个克隆机械分离继续进行亚克隆培养,也可采用单细胞克隆分离。干细胞在无血清培养液中生长时呈悬浮球形,不贴壁也不生长突起,改变培养液(有血清培养液)后贴壁分化为成熟神经细胞。悬浮的干细胞表达神经上皮细胞的特异性抗原 Nestin,而无成熟神经细胞抗原的表达。Nestin 抗原属第 IV 类中间丝,在神经板上皮细胞即开始表达,当神经细胞的迁移基本完成后 Nestin 的表达量开始下降,并随神经细胞分化的完成而停止表达,已被广泛应用于神经干细胞的鉴定^[3-7,13,15]。此外,波形蛋白的表达也比较早,起始于神经迁移完成时,分化完成后波形蛋白的表达下降,因此波形蛋白也被一些人作为祖细胞的标志物。

二、神经干细胞和祖细胞的发育

神经干细胞和祖细胞的分离为我们勾画了一条从胚胎干细胞到神经干细胞再到神经祖细胞及成熟神经细胞的粗略分化线条。从神经板的出现、神经管的形成到脑泡的发育都经历了从神经干细胞到祖细胞再到成熟神经细胞的发育过程,而神经细胞的增殖、迁移与分化则无疑是此过程中最具代表性的环节。

1. 神经干细胞的增殖和自我更新

目前的研究表明,丝裂原信号在增殖过程中起着相当重要的作用。在体外细胞培养中,丝裂原信号能使干细胞不断增殖,并使其具有形成单细胞克隆的能力,撤去丝裂原信号则失去此能力。Gritti 曾报道神经干细胞在含 bFGF 的培养液中传代 50 代后仍具有克隆能

力。在体内实验中,连续6天注射EGF和TGF- α 到事先用 ^3H 胸腺嘧啶、BrdU(5-溴尿嘧啶)和LacZ基因标记的前胸区细胞后发现标记细胞较对照组增加了18倍和14倍,且分离到体外形成神经干细胞克隆的数目增加了3.7倍^[16]。不仅如此,无论是体外培养的干细胞还是体内的前体细胞都检测到了丝裂原信号受体,在发育过程中也证实了bFGF等因子的存在。不具有丝裂原作用的其他细胞因子如神经营养因子虽然也能使前体细胞数目增多,但已有证据表明此类因子的作用是由于其神经营养作用避免了细胞死亡而使细胞数目相对增多^[17]。

丝裂原信号还与神经干细胞的自我更新和自我维持有关。在体外培养实验中,丝裂原信号刺激增殖后的细胞仍能维持干细胞属性,原代培养仅有1%的克隆形成率,而在次代培养中则有20%的克隆形成率,并在此后保持相对稳定^[5,7]。体内注射EGF后95%增殖细胞仍呈Nestin阳性。事实上,增殖与自我更新并不是一个相同的概念,因为在于细胞分裂过程中并不是每次分裂都要产生能自我更新的干细胞。神经干细胞的不对称分裂可产生一个干细胞和一个祖细胞,对称分裂则要么产生两个干细胞要么产生两个祖细胞^[14]。

2. 神经干细胞和祖细胞的迁移

目前已经证实,在神经发育过程中存在两种类型的迁移。在发育中的大部分脑区,神经元的迁移需要放射状胶质细胞的参与,祖细胞沿着放射状胶质细胞的突起前进,例如在端脑发育过程中,祖细胞沿着放射状胶质细胞从生发层向皮层迁移。另外一种迁移方式则不需要放射状胶质细胞的参与,它们以切线方式(tangential migration)迁移,即沿垂直线方向到达目的地,在到达皮层的祖细胞中有14%以这种方式迁移。据认为,这种切线迁移的引导与迁移经过的环境有关,可能是来自迁移环境中的信号引导了祖细胞的迁移^[10-12]。

哺乳动物成年后的大部分脑区不具有产生

新生神经元的能力,但在海马结构的齿状回和环绕侧脑室的室管膜下层却是例外^[10-12]。这两个脑区都具有产生神经元的能力,但齿状回新生神经元产生后不再迁移,而室管膜下层的祖细胞则沿着侧脑室前角的一条固定路线向嗅脑迁移。尽管神经干细胞和祖细胞分布于环绕侧脑室的室管膜下层,但这些即将随着迁移而分化为嗅脑中间神经元的祖细胞主要分布在侧脑室室管膜下层的头侧,尤其是侧脑室头侧的1-2mm的地方,故被称作SZa(Anterior subventricular zone, SZa)^[10,11]。SZa区祖细胞主要由具有神经元分化潜能的单潜能祖细胞构成,很少分化为胶质细胞。

在成年个体SZa区到嗅脑的迁移路线上,这些正在分化或将要分化为神经元的祖细胞首尾相连形成一条链状带,周围则被星形胶质细胞包围。链状带中的祖细胞能迁移相当长的一段距离,但并不突破周围的星形胶质细胞鞘而侵犯脑实质^[10,11]。这些星形胶质细胞在SZa祖细胞迁移过程中的作用尚不清楚,有人推测可能参与了长距离迁移的引导作用,并为神经元迁移提供体液支持^[10]。令人惊奇的是SZa细胞并不向比嗅脑更近的其他区域如纹状体、前脑迁移,究竟是祖细胞链周围的星形胶质细胞鞘的作用还是来自迁移环境中信号的影响也是人们研究的方向。

3. 神经干细胞和祖细胞的分化

尽管尚存在于细胞自身基因调控和外来信号调控干细胞分化的分歧,但外来信号在神经干细胞和祖细胞分化发育中的作用愈来愈多地受到人们的重视。在神经干细胞移植试验中发现移植后干细胞的分化结果与宿主邻近区域细胞相类似,而且即使是同一起来源的神经干细胞移植到不同部位后其分化结果也各不相同,但都与受体细胞相似,这证明神经干细胞或祖细胞在发育过程中受到了外来信号的调控,尤其是受到接触区域外来信号的影响,致使其分化为与移植区域相类似的细胞^[18-21]。目前已发现多种外来信号包括细胞因子、神经营养因子、

肽类物质(如神经肽)、及一些化学物质(如维甲酸)有助于神经干细胞和祖细胞的分化,提示这些信号在神经发育中有着重要的作用。

众多的外来信号在干细胞分化中究竟起着怎样的作用是人们关注的焦点。一种观点认为外来信号在干细胞发育分化过程中起选择性作用(Selective action),即这些外来信号只能调控干细胞及其后代的存活而影响干细胞的分化^[14]。另一种观点则认为外来信号以指导性机制(Instructive mechanism)调控干细胞和祖细胞的分化,即外来信号能特异性地调控干细胞的分化,指导干细胞和祖细胞沿着特异性路线向某一谱系分化。指导性外来信号可以增加或减少干细胞选择某一谱系的机会,但并不意味着它是以全或无的方式参与分化。在神经嵴,有人发现BMP2(骨形成蛋白-2)、GGF(Glia growth factor, GGF)和TGF β (转化生长因子 β)以指导性方式诱导神经嵴干细胞分化为自主神经元、雪旺氏细胞和平滑肌细胞^[14,22]。同样,睫状神经营养因子也以指导性机制参与干细胞分化为星形胶质细胞的过程^[14]。

在干细胞和祖细胞的诱导实验中发现多种细胞因子协同诱导比单一细胞因子诱导效果更佳,在Zao的实验中,使用IL-1(白细胞介素-1)、GDNF(胶质细胞来源的神经营养因子)、IL-11、LIF(白血病抑制因子)协同诱导中脑祖细胞时多巴胺能神经元的分化明显占优,多巴胺能神经元的比例已占有所有神经元细胞的50%,占有所有细胞25%^[23]。此外,在使用一些成熟或非成熟神经细胞的培养液时也可以诱导干细胞的分化,并推测可能是由于培养液中含有神经细胞释放的多种已知或未知信号诱导所致^[23]。除了上述的细胞因子和条件培养液可以诱导干细胞和祖细胞的分化外,在神经干细胞移植实验中发现移植区域的外来信号也可以诱导干细胞和祖细胞的分化^[19-21,24,25],例如在帕金森氏病(PD)模型纹状体区多巴胺能神经元已经毁损情况下,移植神经干细胞可部分地分化为多巴胺能神经元。这种移植区域信号

的特异性诱导现象在其他部位也得到了证明,如在脱髓鞘白质区域,移植祖细胞后大量细胞分化为少突胶质细胞^[26]。

上述的外来信号在干细胞和祖细胞的发育分化中起着重要的作用,这并不意味着否定干细胞自身基因在调控分化发育中的作用。外来信号从根本上讲也是有基因产生的,而且神经干细胞本身就可以产生多种信号调控分化,尤其是邻近的干细胞和祖细胞可以产生信号调控其分化。有证据表明神经细胞发育的多样性可能与干细胞表达多种多样的转录因子有关,不同转录因子的表达导致不同谱系的分化,这也是目前研究的热点之一^[27]。此外,神经发育的次序性似乎也是由干细胞自身决定的,通过受体表达的次序性在特定的时间只接受特定的信号从而引起特定的生物学效应^[14]。

三、神经干细胞在中枢功能重建中的作用

以帕金森氏病为代表的中枢退行性疾病是神经疾病治疗的难点之一。目前的药物对退行性疾病的长期疗效普遍较差,探索新的治疗途径已成为人们研究的重点。在众多治疗途径中,脑组织移植尤其是人们关注的焦点^[28]。但由于在移植供体源上所面临的障碍限制了其在临床的应用,迫切需要寻找可大量提供的供体源^[28]。神经干细胞为解决脑组织移植供体源问题带来了新的希望,它已经具备了成为理想移植供体的一些条件。

在目前神经移植中,普遍存在移植存活率低的问题,各家报道在2% - 20%之间,因此严重地影响了脑组织移植的疗效^[6]。已有的研究表明,神经移植的疗效与供体组织的胎龄有着密切的关系,愈是年幼的胚胎组织,其分裂能力愈强,存活率愈高,因此移植更早期的胚胎细胞具有更大的优越性。神经干细胞系原始早期胚胎细胞,具有很强的分裂能力,移植后不仅能在体内很好地存活,而且能与宿主细胞发生神经整合^[2,11,21,24,25]。同时,神经干细胞尚未生长轴突和树突,具有无氧代谢的特点,能充分耐

受离体后的恶劣条件。因此,神经干细胞具有早期胚胎移植物特性,移植后存活率高,有利于功能重建。

同时,神经移植的疗效尚与移植量有关。在帕金森氏病的脑组织移植中,单侧纹状体内需要4—8个胚胎中脑移植物才能有效地改善临床症状。要在短期内收集这么多的胎脑是不现实的,而且还会受到伦理和法律的限制,因此临床迫切需要便于体外操作,能大量提供的供体组织^[6]。神经干细胞具有不断分裂增殖的能力,能为神经移植提供大量的供体组织^[3-7]。不仅如此,神经干细胞来源于神经组织,在去除丝裂原信号后分化为神经系细胞,不再具有过度增殖能力,因此移植后不具有致瘤性^[11]。此外,神经干细胞系分裂细胞,适合于目前效果最肯定、方法最成熟的逆转录病毒的转染,便于基因操作。总之,神经干细胞已具备了成为理想神经移植供体的一些条件,将为脑组织移植治疗神经退行性疾病提供大量、可靠、方便的供体源。

此外,由于正常成年个体室管膜下层,纹状体等地方仍存在神经干细胞,这些干细胞在正常情况下处于静息状态,如能将其在体内诱导分化以替代上述疾病中缺乏的神经细胞,则将为神经干细胞的应用提供更为广阔的前景^[2,11,12]。目前尽管尚不能诱导神经干细胞特异性地、完全地分化为某种特定神经元,但随着人们对胚胎发育机制认识的不断加深和新的细胞因子、化学信号的不断发现,必将推动上述研究的进一步深入。因此与此相关的研究是非常有前途的,也是非常具有挑战性和难度的,更多的研究将侧重于把神经干细胞作为一种研究手段或研究模型,甚至将脑组织移植本身也作为一种研究策略去研究神经发育的机制,探索诱导神经干细胞分化为神经元治疗神经退行性疾病的可能性。

摘 要

近年来利用细胞培养技术分离的神经干细

胞和祖细胞为研究神经发育提供了一条新的途径,研究神经干细胞和祖细胞的增殖、迁移和分化将为阐明神经发育机制提供有力的证据。同时,神经干细胞还为治疗中枢退行性疾病带来了希望。无论是作为脑组织移植的供体,还是作为在体诱导的靶细胞,神经干细胞都为中枢神经系统功能重建和神经再生提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Bartlett PF, et al. , 1988, *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**:3255 - 3259.
- [2] Martinez-Serrano A, et al. , 1997, *TINS*, **20** (11): 530 - 538.
- [3] Reynolds BA, et al. , 1992, *Science*, **255**: 1707 - 1709.
- [4] Davis AA, et al. , 1994, *Nature*, **372**:263 - 266.
- [5] Gritti A, et al. , 1996, *J Neurosci*, **16** (3): 1091 - 1100.
- [6] Svendsen CN, et al. , 1996, *Exp Neurol*, **137**: 376 - 388.
- [7] Reynolds BA, et al. , 1996, *Dev Biol*, **175**: 1 - 13.
- [8] Weiss S, et al. , 1996, *TINS*, **19** (9): 387 - 394.
- [9] McKay R, et al. , 1997, *Science*, **276**: 66 - 71.
- [10] Goldman SA, et al. , 1998, *TINS*, **21** (3): 107 - 114.
- [11] Zigova T, et al. , 1998, *Cell transplantation*, **7**: 135 - 154.
- [12] Lois C, et al. , 1994, *Science*, **264**: 1145 - 1148.
- [13] Hulsbas R, et al. , 1997, *Exp Neurol*, **148**: 147 - 156.
- [14] Morrison SJ, et al. , 1997, *Cell*, **88**: 287 - 298.
- [15] 冬向军等, 1998, *细胞生物学杂志*, **2**: 63 - 68.
- [16] Craig CG, et al. , 1996, *J Neurosci*, **16** (8): 2649 - 2658.
- [17] Lu N, et al. , 1996, *Dev Brain Res.*, **94**: 31 - 36.
- [18] Meltzer H, et al. , 1998, *J Neuro Surg.*, **88**: 93 - 98.
- [19] Renfranz PJ, et al. , 1991, *Cell*, **66**: 713 - 729.
- [20] Vicario-Abejon C, et al. , 1995, *J Neurosci*, **15** (10): 6351 - 6363.
- [21] Svendsen CN, et al. , 1997, *Exp Neurol*, **148** (1): 135 - 146.
- [22] Shah NM, et al. , 1994, *Cell*, **97**: 347 - 360.
- [23] Zao DL, et al. , 1998, *Exp Neurol*, **149**: 411 - 423.
- [24] Lundberg C, et al. , 1997, *Exp Neurol*, **145**: 342 - 360.
- [25] Lundberg C, et al. , 1996, *Brain Res.*, **737**: 295 - 300.
- [26] Robin JM, et al. , 1997, *J Anat*, **190**: 23 - 33.
- [27] Mehler MF, et al. , 1997, *TINS*, **20** (8): 357 - 365.
- [28] Madrazo I, et al. , 1991, *Neurosurg*, **29** (2): 165 - 177.