

神经干细胞脑内移植后的存活、迁移和分化^{*}

王 颖 段德义 徐群渊^{**}

(首都医科大学北京神经科学研究所 北京市神经修复再生重点实验室 北京 100054)

摘要 从胚胎或成体大鼠脑组织、人胚脑组织均能分离到神经干细胞,将它们进行体外原代培养扩增或永生化后植入脑内,均能观察到其在脑内的迁移和分化现象。其分化能力主要取决于移植部位的脑内微环境,但这种影响作用是相对的。同时,体外培养环境如培养时间和细胞融合程度、维甲酸类诱导分化剂处理、NGF 转导处理再移植或与嗜铬细胞(分泌 NGF)共移植等,也能决定神经干细胞脑内移植后向神经元方向分化的能力。神经干细胞移植为中枢神经系统功能重建和神经再生带来新的希望。

关键词 神经干细胞 移植 分化

Reynolds 等^[1]于 1992 年首先从成年小鼠脑纹状体分离出能在体外不断分裂增殖、具有多种分化潜能的细胞群,正式提出了神经干细胞(neural stem cell, NSC)的概念。随后 McKay^[2]于 1997 年又概括了神经干细胞的特点,即:具有分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞能力,能自我更新并足以提供大量脑组织细胞的细胞。2000 年 Gage^[3]进一步将神经干细胞的特性描述为:可生成神经组织;具有自我更新能力;可通过不对称细胞分裂产生新的细胞。

大量研究已经表明,神经干细胞具有极大的可塑性,它不仅可以替代丢失的神经元,在神经发育及神经损伤中发挥作用;而且还可以作为运载细胞用于神经系统疾病的基因治疗。因此,观察神经干细胞脑内移植后的增殖、迁移和分化对研究中枢神经系统发育机制及对疾病的治疗具有重要意义。

1 神经干细胞分化的特异性标记物

神经干细胞的体外分化一般是取活体动物脑组织在体外培养基中孵育,经过增殖,诱导细胞向不同的子细胞方向分化后进行生物学鉴定,同时研究分化的细胞和分子机理。

进行神经干细胞的体内分化研究则首先要将

其在体外培养基中孵育、扩增,并转入外源基因(如 GFP)或用 BrdU 孵育标记,这些细胞再植入脑内后可以通过观察干细胞的标志物表达来确定移植细胞在宿主细胞的转归;将体外标记物与脑内分化后表达的特异分子进行免疫或/和荧光双标记进行生物学鉴定,就可以确定移植细胞向不同方向分化的情况。神经干细胞在分化过程中出现的标志蛋白有^[3,4]:Nestin、Musashi 和 Vimentin 等标记神经干细胞; β -tubulin III(TUJ1)标记分化早期神经元;NFs(NF68, NF150, NF200)、MAP2、MAP5、NeuN、Tau1、NSE 等标记分化成熟神经元;GFAP、S-100 标记星形胶质细胞;O4、A2B5 标记分化早期少突胶质细胞;GC、MBP 标记分化成熟少突胶质细胞;OX42 标记小胶质细胞。

2 原代神经干细胞脑内移植后的分化和迁移

将成年大鼠神经前体细胞或胎脑神经前体细胞移植于大鼠脑内不同区域,观察这些神经前体细胞的分化和迁移能力。许多研究表明,移植的 NSC 与移植部位的微环境如特异性生长因子相互作用可确定其分化方向。

Gage 等^[4]将成年大鼠海马前体细胞移植到成年大鼠海马,3 个月后观察到 NeuN 阳性神经元和 GFAP 阳性星形胶质细胞,尤其是移植在海马齿状回部位上的前体细胞约 64% 分化为神经元,而移植到脑其余部位却未见到分化的神经元,说明移植部位特异性生长因子可能确定其分化方向。

收稿日期:2004-06-11 修回日期:2004-07-21

^{*} 国家自然科学基金资助项目(30270433),教育部科学技术研究重点项目(03003)

^{**} 通讯作者,电子信箱:wyqy@pums.edu.cn

Aleksandrova 等^[5] 将人胚前脑神经前体细胞分别植入前脑和小脑, 移植后 20 天结果显示移植细胞出现在前脑的新皮质、侧脑室周围、尾状核以及小脑的分子层、浦肯野细胞层和颗粒细胞层。在浦肯野细胞层的细胞表达 Calbindin 钙结合蛋白, 表明移入小脑的细胞可以分化为浦肯野氏细胞。

但也有研究表明移植部位的特异微环境对 NSC 分化影响是相对的, 并不是只有微环境才决定其分化方向。Nishino 等^[6] 将大鼠胚胎中脑和皮层来源的 NSC 分别植入单侧黑质毁损后的大鼠纹状体, 发现中脑来源的 NSC 能分化为多巴胺能神经元, 且能使动物的旋转行为改善, 但皮层来源的 NSC 在纹状体既不能分化为多巴胺能神经元也不能改善动物的旋转行为。

将培养的人胎脑神经前体细胞植入到成年大鼠脑内不同脑区, 其分化和迁移能力也有所不同。Fricker 等^[7] 在具有再生能力的脑区如侧脑室周边部位的脑室下周围区(subventricular zone, SVZ) 和海马齿状回, 植入细胞不仅能表达受体部位的特异性抗原, 且同该部位的神经元一样向特定部位移动, 如沿嘴侧迁移流(rostral migratory stream, RMS) 进入嗅球分化为嗅神经元, 其分化命运与 SVZ 的内源性 NSC 相同。在成年大鼠脑内不具有神经再生能力的脑区如纹状体, 植入细胞能表达该部位的特异性抗原, 但不向其它脑区迁移。

针对神经前体细胞植入纹状体分化率较低的事实, Zhang 等^[8] 将神经干细胞在体外培养一段时间后再次植入纹状体可看到能提高其分化和迁移能力。分离成年大鼠 SVZ 区的细胞, 在含有 bFGF 的培养基中体外培养, 并表达神经元早期特异性标记 β -tubulin III (TuJ1), 体外培养 8 天后植入成年大鼠的纹状体, 发现移植后 28 天细胞由移植中心向周围迁移 1.5 mm, 并且可以通过磁共振成像的方法检测到。形态学结果显示, 这些迁移细胞的形态与宿主纹状体内的投射神经元相似, 由细胞体发出多分支的突起。免疫双标结果显示多数细胞表达微管相关蛋白(MAP2) 或神经元核蛋白(NeuN), 与宿主表达 MAP 2 的细胞相似。少数细胞的形态类似于星型胶质细胞, 表达胶质纤维酸性蛋白(GFAP)。

研究发现脑损伤因素本身也可以促进 NSC 的存活和增生能力。Wennersten 等^[9] 将冻存复苏的长期以遗传外(epigenetically) 方式扩增的人胚前脑神经前体细胞移植到大鼠单侧顶叶皮层挫伤区的深、

浅点(4mm 和 2mm 深), 移植后 2 周和 6 周均能观察到细胞分布在损伤区周围、同侧海马和胼胝体以及同侧室管膜下带; 但 6 周组出现的抗人细胞核(HuN) 阳性细胞明显增多, 且能越过中线迁移到对侧胼胝体和对侧皮层中, 双标显示分化为神经元和星型胶质细胞, 无少突胶质细胞, 细胞在皮层分化为神经元的能力不如在海马。

移植细胞移植入不同脑区存在分化上的差异, 但植入到出生后大鼠及成年大鼠后, 其形态学、行为及分化上并未表现不同^[10], 细胞的迁移能力、生存能力相同, 均未见明显的免疫反应或胶质反应^[11]。

3 永生化神经细胞脑内移植的分化和迁移

在体外培养条件下, 很难维持原代神经干细胞生存或增殖达到足够长的时间以检测其特性或对外源性因子的反应, 因此人们企图通过基因转移技术来得到永生化神经干细胞系以便为体外观察和移植研究提供更稳定的材料。产生永生化神经干细胞的经典方法是通过逆转录病毒将编码癌基因的基因克隆到发育中的脑细胞, 改变细胞的表型, 使部分细胞渡过细胞分裂的危相期, 而停留在细胞分裂的某一时期, 不能进行终末分化, 并获得长期传代的能力, 从而使 NSC 得到“永生”。

将永生化神经干细胞应用于细胞的替代治疗和转基因治疗为很多神经系统疾病提供了新治疗策略。目前 *v-myc*、*neu*、*p53*、腺病毒 E1 A 和 SV40-T 抗原等都被用于使不同年龄动物和不同脑区(如原始纹状体、中脑腹侧、小脑、脑隔区、海马) 细胞的永生化, 其中 SV40 大 T 抗原的使用最为广泛。另外, 从人胚端脑组织中分离细胞导入 *v-myc* 基因, 建立了 HB1F3 细胞系。这为 CNS 神经元替代治疗、转基因治疗和脑损伤修复提供干细胞特性细胞来源提供了可能。

永生化神经干细胞在脑内分化与原代神经干细胞并无明显差异。Shihabuddin 等^[12] 将 lacZ 标记的 RN33b 细胞系分别植入成年及新生大鼠的海马及皮层, 移植 24 周后观察到移植区内细胞稳定整合, 在皮层分化为形态相似的锥体细胞和星形胶质细胞; 海马中分别分化为类似 CA1、CA3 区的锥体神经元, 类似齿状回颗粒细胞层、多形层的神经元和门区的多形神经元, 说明脑内不同的微环境对细胞分化有不同影响。应用电镜和免疫组织化学对

上述结果进行进一步分析^[13],发现 RN33b 细胞分化后大小与内源神经元相似,与宿主整合,并形成突触连接;成年鼠与新生大鼠之间不存在明显差异^[14]。Englund 等^[15]将 RN33b 细胞系移植于新生大鼠皮层、海马,并应用膜片钳技术检测分化细胞的生理功能,检测到分化细胞的突触后电位,证明 RN33b 细胞系在脑内有功能性整合。

Yang 等^[16]将 *v-myc* 癌基因永生化的新生小鼠小脑神经干细胞系 C17-2 用 *lacZ* 基因标记后植入 6-OHDA 毁损后的大鼠纹状体,细胞可在动物脑内迁移,并分化为表达酪氨酸羟化酶的细胞,并整合入宿主脑组织;移植细胞表现为神经样细胞,其中 70% 细胞同时表达 β -半乳糖苷酶蛋白及酪氨酸羟化酶。当 C17-2 移植给正常大鼠或毁损侧对侧的脑内,移植细胞仍可表达酪氨酸羟化酶,这与以往实验结果不同。Yang 认为是细胞在体外的培养环境就决定了细胞内部的变化,决定了它更容易向神经元方向分化。他在体外培养神经干细胞时,不是按照传统方法即细胞生长聚集率达到 100% 时传代和保存,而是在聚集率达到 50% 的时候传代和保存。Yang 认为这种生长方式更有利于细胞核受体 *Nurr1* 的表达,而 *Nurr1* 的过表达可以提高神经干细胞向多巴胺能神经元的分化^[17]。

4 提高神经干细胞在脑内的存活和分化能力的措施

神经干细胞移植目前主要存在的问题包括细胞存活能力、体内定向分化、脑内功能整合、肿瘤形成和免疫排斥作用等^[18]。

中枢神经系统损伤后,自我修复效果不良的原因不单是因为神经干细胞的数量不足,更重要的是由于损伤局部微环境抑制神经元细胞的新生^[19]。嗜铬细胞可以产生多种神经营养因子如 FGF-2 等。因此,为了维持细胞的生存、增殖,在体外将编码神经营养因子 (nerve growth factor, NGF) 等因子的基因导入神经干细胞后再移植或将神经前体细胞与肾上腺髓质嗜铬细胞共移植,均取得了良好的效果。

Martinez 等^[20]利用条件温度敏感型永生化的细胞系建立了高效 NGF 分泌细胞系,细胞含有 NGF 基因的多重拷贝,并在体外分泌具有生物活性的 NGF。将该种细胞移植到完全切断穹隆的大鼠纹状体及隔区后,仍能持续分泌 NGF,并使 90 % 的胆

碱能神经元得到恢复。移植细胞能良好地存活于脑组织中,主要分化成胶质形态的细胞,并迁移、整合到宿主的脑组织中。

Schumm 等^[21]将神经前体细胞与肾上腺髓质嗜铬细胞体外共培养发现嗜铬细胞可以提供一个支持神经干细胞生长的微环境,促进神经前体细胞的生长及分化。将孕 14 天大鼠皮层神经前体细胞与牛嗜铬细胞共同移植于成年大鼠纹状体,结果显示共移植明显改善了 BrdU 标记细胞的存活,同时减少了免疫炎性细胞的浸润。嗜铬细胞提供神经营养因子可提高细胞存活,但并不促进细胞的分化能力^[22]。由于嗜铬细胞既可以在损伤处起到保护作用又可以促进神经前体细胞的扩增和存活,因此神经前体细胞与嗜铬细胞共同移植可能成为新的治疗策略。

维甲酸 (retinoic acid, RA) 是一种分化因子,体外培养神经干细胞加入 RA 可以使其向神经元的分化率提高 3 倍^[23]。在脑内移植区或静脉直接注射 RA 或 RA 与其他神经营养因子的混合制剂可促进成年海马神经前体细胞向神经元方向分化^[24]。Dziewczapolski 等^[25]将成年大鼠海马来源的神经前体细胞移植于 6-OHDA 损毁的成年大鼠纹状体中,细胞移植前在培养基中加入 RA,移植后继续腹腔注射 RA。结果显示移植后 5 周,可以观察到大约有 60% 的移植细胞在宿主脑内存活,并在移植部位成广泛的放射样分布,细胞形态与周围宿主细胞形态相似并形成整合。其中 18% 的 BrdU 阳性细胞表达胶质前体细胞特异性标志 NG2,少数细胞 (< 0.1%) 表达神经元特异性标志 TuJ1。RA 组细胞分化率与对照组并未有显著性差异,故 RA 对神经前体细胞的分化作用尚需进一步研究。

Messina 等^[26]还比较了单一神经干细胞移植和将不同胚胎时期取材的神经干细胞混合培养后再移植的分化情况。结果显示,混合培养的细胞移植后分化率比较高,提示移植细胞不同组成对于细胞分化也是重要的。

在移植方法上,Kon 等^[27]将 HB1F3 细胞系通过尾静脉注入前脑短暂缺血的成年大鼠体内,观察到植入细胞大部分出现在缺血的脑内,肾、脾等部位可观察到少量细胞,无组织破坏,无肿瘤组织形成。早期细胞主要分布在脑膜和脑实质血管的内膜,逐渐向缺血的海马齿状回及 CA1 区迁移,并表达神经元和星形胶质细胞特异性标志。实验比较

了脑室注射和尾静脉注射, 移植细胞在分化和数量上无明显差异, 但静脉移植可减少脑损伤以及移植部位的炎性聚集。

5 国内相关研究

在国内近年来也进行了大量神经干细胞移植方面的研究并取得了一些成绩, 张新化等^[28]将神经干细胞植入大鼠海马观察其迁移情况。结果显示移植至海马齿状回中的神经干细胞能存活, 并可沿正常海马齿状回中固有的神经干细胞迁移路径即颗粒下层迁移。切割海马伞侧海马内存活和迁移的神经干细胞明显多于正常侧海马内的神经干细胞。提示切割海马伞侧海马齿状回内促进神经干细胞存活并诱导其迁移、分化的物质表达增强。李学坤等^[29]将神经干细胞移植于帕金森病模型小鼠脑内研究其存活与分化, 结果显示移植的神经干细胞能在 PD 模型小鼠纹状体内存活, 并可分化出特定的多巴胺能神经元。此外, 我所在的研究所也在从事永生神经干细胞系的建立, 神经干细胞体外诱导分化以及体内的存活、迁移和分化。

6 结 语

成年与胚胎来源的神经干细胞存在哪些不同尚不清楚, 但从移植实验的结果来看, 神经干细胞在脑内的分化主要取决于移植部位的微环境, 而细胞在体外的培养条件不同也能决定这些前体细胞在移植后的分化能力。

用流产胎儿脑组织来源的神经干细胞用于治疗大量临床病人尚有伦理和来源等多方面因素的制约; 细胞系可以提供足够量的细胞, 但还存在安全性和治疗稳定性的问题。使用不具有致瘤性、非基因转导处理的体外扩增神经干细胞进行移植, 为神经系统损伤后结构和功能重建、神经再生等带来新的希望, 即为中枢神经系统疾病的治疗开辟出新的途径。

参考文献

- [1] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, 255 (5052): 1707~ 1710
- [2] McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997, 276: 66~ 71
- [3] Gage F H. Mammalian neural stem cells. *Science*, 2000, 287 (5457): 1433~ 1438

- [4] Gage F H, Coates P W, Palmer T D. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 11879~ 11883
- [5] Aleksandrova M A, Saburina I N, Poltavtseva R A, et al. Behavior of human neural progenitor cells transplanted to rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 134(1-2): 143~ 148
- [6] Nishino H, Hida H, Takei N, et al. Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine depleted striatum than in intact striatum. *Exp Neurol*, 2000, 164(1): 209~ 214
- [7] Fricker R A, Carpenter M K, Winkler C, et al. Site specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci*, 1999, 19(14): 5990~ 6005
- [8] Zhang R L, Zhang L, Zhang Z G, et al. Migration and differentiation of adult rat subventricular zone progenitor cells transplanted into the adult rat striatum. *Neuroscience*, 2003, 116(2): 373~ 382
- [9] Wennersten A, Meier X, Holmin S, et al. Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury. *J Neurosurg*, 2004, 100(1): 88~ 96
- [10] Aleksandrova M A, Saburina I N, Poltavtseva R A, et al. Behavior of human neural progenitor cells transplanted to rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 134(1-2): 143~ 148
- [11] Englund U, Fricker Gates R A, Lundberg C, et al. Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long distance axonal projections. *Exp Neurol*, 2002, 173(1): 1~ 21
- [12] Shihabuddin L S, Hertz J A, Holets V R, et al. The adult CNS retains the potential to direct region specific differentiation of a transplanted neuronal precursor cell line. *J Neurosci*, 1995, 15 (10): 6666~ 6678
- [13] Shihabuddin L S, Brunschwig J P, Holets V R, et al. Induction of mature neuronal properties in immortalized neuronal precursor cells following grafting into the neonatal CNS. *J Neurocytol*, 1996, 25 (2): 101~ 111
- [14] Lundberg C, Englund U, Trono D, et al. Differentiation of the RN33B cell line into forebrain projection neurons after transplantation into the neonatal rat brain. *Exp Neurol*, 2002, 175 (2): 370~ 387
- [15] Englund U, Björklund A, Wictorin K, et al. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(26): 17089~ 17094
- [16] Yang M, Stull N D, Berk M A, et al. L Neural stem cells spontaneously express dopaminergic traits after transplantation into the intact or 6-hydroxydopamine lesioned rat. *Exp Neurol*, 2002, 177(1): 50~ 60
- [17] Wagner J, Akenud P, Castro D S, et al. Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1 overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(7): 653~ 659

- [18] Björklund L M, Sanchez Pernaute R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(4): 2344~ 2349
- [19] Castellanos D A, Frydel B R, Sagen J. Enhanced viability and neuronal differentiation of neural progenitors by chromaffin cell co-culture. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 137(2): 115~ 125
- [20] Martinez S A, Lundberg C, Horelbu P, et al. CNS derived neural progenitor cells for gene transfer of nerve growth factor to the adult rat brain: complete rescue of axotomized cholinergic neurons after transplantation into the septum. *J Neurosci*, 1995, 15(8): 5668~ 5680
- [21] Schumm M A, Castellanos D A, Frydel B R, et al. Direct cell-cell contact required for neurotrophic effect of chromaffin cells on neural progenitor cells. *Brain Res Dev Brain Res*, 2003, 146(1-2): 1~ 13
- [22] Schumm M A, Castellanos D A, Frydel B R, et al. Improved neural progenitor cell survival when co-grafted with chromaffin cells in the rat striatum. *Exp Neurol*, 2004, 185(1): 133~ 142
- [23] Takahashi J, Palmer T D, Gage F H. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult derived neural stem cell culture. *J Neurobiol*, 1999, 38, 65~ 81
- [24] Nakatani H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*, 2002, 110(4): 429~ 441
- [25] Dzięczapolski G, Lie D C, Ray J, et al. Survival and differentiation of adult rat derived neural progenitor cells transplanted to the striatum of hemiparkinsonian rats. *Exp Neurol*, 2003, 183(2): 653~ 664
- [26] Messina D J, Adler L, Tresco P A. Comparison of pure and mixed populations of human fetal derived neural progenitors transplanted into intact adult rat brain. *Exp Neurol*, 2003, 184(2): 816~ 829
- [27] Kon Chua, Manho Kima, Sang Wuk Jeonga, et al. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*, 2003, 343(2): 129~ 133
- [28] 张新化, 金国华, 田美玲, 等. 神经干细胞植入大鼠海马中的迁移. *南通医学院学报*, 2002, 22(2): 119~ 122
- [29] 李学坤, 张卿, 郭安臣, 等. 移植的神经干细胞在帕金森病模型小鼠脑内的存活与分化. *中国康复理论与实践*, 2003, 9(7): 387~ 390

Survival, Migration and Differentiation of Neural Stem Cells After Transplantation into the Brain

WANG Ying DUAN De yi XU Qun yuan

(Beijing Institute for Neuroscience, The Beijing Center of Neural Regeneration & Repairing Beijing 100054, China)

Abstract Neural stem cells (NSC) have been successfully isolated from embryonic or adult rat brain, as well as from embryonic human brain. NSC can be expanded epigenetically *in vitro* as primary cultures or immortalized genetically for large-scale production. They could migrate, integrate into the host brain and differentiate into mature neurons after transplantation into the animal brain. The potential of NSC differentiation is mainly dependent upon the microenvironment in the brain where they are grafted. However, other factors, including the *in vitro* culture condition such as periods of culture time, level of cell confluence, treatment with retinoic acid, transduction with NGF gene, and the co-transplantation of chromaffin cell, also play roles in deciding on their capability of differentiation. The transplantation of neural stem cells can provide a powerful way for the functional rebuilding and regeneration in the CNS.

Key words Neural stem cells Transplantation Differentiation