

http://www.journals.zju.edu.cn/med

# 神经干细胞的增殖分化与神经变性疾病治疗

李 珉 综述,陈 高 审校

(浙江大学医学院 附属第二医院,浙江 杭州 310009)

**[摘要]** 神经干细胞可作为细胞移植替代材料和基因转移载体,治疗神经变性疾病。除细胞因子对神经干细胞的增殖和分化调控外,中枢神经系统区域特异性和神经递质合成相关酶对神经干细胞的定向分化有重要影响。神经生长因子和基因工程化干细胞能改善神经元的退变,治疗神经变性疾病。

**[关键词]** 神经变性;神经干细胞;定向分化;神经生长因子

**[中图分类号]** R 726 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2004)03-0272-05

神经变性疾病(neurodegenerative diseases)是一类原因不明的进行性中枢神经系统疾病,主要为系统性的特殊神经细胞亚群退变而致,其中包括中脑多巴胺神经元退变的帕金森病(Parkinson disease, PD)、纹状体中间神经元和 GABA 能投射神经元退变的遗传性舞蹈病(Huntington's disease)以及胆碱能神经元退变的阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等,目前该类疾病尚无良好治疗方法,神经干细胞的出现为其治疗带来希望。

神经干细胞(neural stem cell, NSC)是来源于神经系统,可生成神经组织,能自我更新,不对称分裂分化的细胞<sup>[1]</sup>。因其多潜能分化和与宿主神经组织良好的融合性,故可作为细胞移植替代材料和基因转移载体,用于神经变性疾病治疗。神经干细胞可来自胚胎、骨髓、中枢神经系统特殊部位等;其来源细胞有巨大的多向分化潜能,现已有分化为心肌<sup>[2]</sup>、脂肪<sup>[3]</sup>、上皮以及血管内皮<sup>[4]</sup>等细胞类型的报道。NSC 移植成活率低<sup>[1]</sup>且向目标细胞分化少,因此进一步研究神经干细胞增殖和定向分化以及基因工程化是治疗中枢神经系统变性疾病的关键。

## 1 细胞因子对神经干细胞的增殖和分化调控

### 1.1 表皮生长因子(EGF)和碱性成纤维生长因子(FGF-2)的促增殖作用

EGF 和 FGF-2 均促进 NSC 增殖,但来源于中枢神经系统从头端至尾端不同部位的 NSC 对 EGF 的应答反应性逐渐下降,考虑其增殖信号传导机制不同。

Janulis<sup>[5]</sup>等研究发现只对 FGF-2 应答的神经前体细胞中,存在一个蛋白激酶家族新成员 p97。p97 作为一个相关激酶,可以被作为生长和分化的一个主要调节器原癌基因 Raf 激活;激活的 p97 磷酸化其反式激活位点的转录因子 Elk-1 和 Ets-2 产生生物学效应。p97 对生长因子的选择性应答提供了一个调控细胞增殖信号特异传导机制。而只能被 EGF 激活的干细胞中存在的相关激酶是 ERK5;活化的 ERK5 则磷酸化 MEF2C 产生增殖效应。FGF-2 激活神经干细胞有丝分裂必需一种自分泌/旁分泌的辅因子协作调控,该辅因子是一种 N 端糖基化 cystatin C (CCg),糖基是其活性所在。Taupin<sup>[6]</sup>等进一步证明了活体内 FGF-2 和 CCg 的联合应用可刺激成人脑齿状回的神经形成。而 EGF 增殖作用中目前尚未发现协作调控的辅因子。

应答增殖成的神经球对 EGF 反应性可改变。Ciccolini<sup>[7]</sup>发现体外培养的仅对 FGF-2 应答的 NSC 神经球中含有对 EGF 和 FGF-2 都应答的前体细胞(E/F 细胞);E/F 细胞非常大,显示强烈的巢蛋白反应,与来源细胞不同;但在体外培养期间要经历一个生长因子应答过渡期。可以推断,E/F 细胞独特的形态是进一步分化的基础。

收稿日期:2003-05-12 修回日期:2003-09-26

作者简介:李 珉(1974-),男,硕士生,住院医师,从事神经外科专业。

增殖的 NSC 均具有向神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞三个谱系分化的能力,但 EGF 增殖的细胞受限于星形胶质细胞谱系,FGF-2 增殖的细胞则更具有向神经元分化的能力,两因子在促进增殖的同时抑制其分化。

**1.2 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 的促增殖作用** 鉴于 IGF-1 的受体在鼠纹状体发育早期出现,Arsenijevic<sup>[8]</sup>等研究发现,无 IGF-1 存在时,EGF 和 FGF-2 都不能诱发 E14 鼠的纹状体神经干细胞的增殖;追加 IGF-1 后则产生了多潜能的神神经球,并具有剂量依赖性。细胞谱系分析表明:无论 EGF 还是 FGF-2,在 IGF-1 存在时,均能直接激活 NSC;IGF-1 和 EGF 都不能单独影响神经干细胞的生存,仅 FGF-2 可促进 50% 的神经干细胞的生存。有 EGF 时,NSC 短期暴露于 IGF-1 后诱发增殖,并通过自分泌机制分泌 IGF-1。这提示 IGF-1 是神经干细胞激活调节的关键因素。

**1.3 睫状神经营养因子(CNTF)、白血病抑制因子(LIF)的促增殖作用** CNTF、LIF 和 IL-6 均能增殖神经干细胞。CNTFR- $\alpha$ 、gp130 和 LIFR- $\beta$  形成受体复合体,gp130 是共同的受体亚单位。CNTF 诱导  $\beta$  亚单位形成异二聚体,通过相关的 JAKs 磷酸化酪氨酸。活化后的受体提供了 STAT 蛋白的相接位点。激活的 STATs 二聚体化并移位和结合于特定的 DNA 序列,增强基因转录而发挥效应<sup>[9]</sup>。Shimazaki<sup>[10]</sup>等研究 CNTF 在活体内作用,发现 LIFR 缺乏鼠成年后神经干细胞数量减少;经脑室内注入 CNTF,无论有无 EGF 存在,NSC 自我更新加强。CNTF 在体外维持并增加了 EGF 增殖的神经干细胞数目。LIF 在人神经干细胞的长期培养中促进干细胞的增殖,抑制其分化。

#### 1.4 神经干细胞移植前的分化调控

**1.4.1 NSC 向神经元方向分化的调控:** IGF-1 的结合蛋白和抗体可抑制体外增殖的 NSC 克隆自发产生神经元,证明内源性的 IGF-1 可能是 NSC 分化为神经元的的一个主要调节因子<sup>[11]</sup>。添加外源性的 IGF-1 后 2 h,可明显增加 NSC 向神经元分化数量而不影响其增殖。高水平的 IGF-1 及胰岛素能促进神经元成熟,并影

响神经递质的表型。低浓度胰岛素虽不能激活神经前体细胞上的 IGF-1 受体,但能作用于自身受体引起的分裂活性加强 IGF-1 的作用。

脑源性神经营养因子(BDNF)可加强 IGF-1 和胰岛素的分化作用<sup>[12]</sup>,但只能促进 EGF 产生的细胞向神经元分化。BDNF 处理海马和皮层干细胞可生成锥体样神经元,而来自小脑、中脑和纹状体的干细胞则不能,提示中枢神经系统不同区域的干细胞在 BDNF 刺激下分化的神经元具有区域特性表型。BDNF 也能促进移植于体内的 NSC 的分化和成熟<sup>[13]</sup>。

血小板源性生长因子(PDGF)在向神经元分化期间起作用。NSC 在分化期间持续表达 PDGF-a 受体,在抗原刺激后表达 PDGF-b 受体增加。PDGF 不仅能增殖干细胞分化早期阶段未成熟的神经元<sup>[14]</sup>,而且有利于分化神经元的存活。PDGF 诱导海马神经干细胞系 HiB5 分化研究发现,存在短暂的磷脂酶 C(PLC) 和磷脂酶 D(PLD)的激活,阻碍任何一者的产生,则明显抑制 PDGF 诱发的轴突生长。尽管 PLD 比 PLC 活化更迅速,但灭活 PLD 活性不能抑制 PDGF 对 PLC 的激活。这提示具有不同的信号转导途径的磷脂酶在 PDGF 诱导的神经元分化中有重要作用<sup>[15]</sup>。

**1.4.2 NSC 向神经胶质细胞方向分化的调控:** 在 EGF 和 FGF2 增殖的干细胞群中,三碘甲状腺原氨酸促进 NSC 向少突胶质细胞分化。CNTF 则增加了星形胶质细胞的数量,并强化了 EGF 增殖的 NSC 向神经胶质前体细胞转化的谱系限制。星形细胞前体的分化依赖 LIFR 信号通道。在无刺激 LIFR 信号时,干细胞的存在与神经元的产生率大致相同,未能检测星形细胞产生的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)。加用 LIFR 刺激信号后可见星形细胞的发生。确定 NSC 分化谱系的关键在于体内和体外培养中发展成的神经前体细胞的性质,该过程能够通过细胞内在和外在的机制调控<sup>[16]</sup>。

#### 2 中枢神经系统区域特异性对神经干细胞分化的影响

神经干细胞移植后的存活、分化和成熟与所依赖的环境密切相关,移植区域不同将诱导

神经干细胞向不同方向分化。

Doering<sup>[17]</sup>移植神经干细胞进入成年鼠隔膜/斜带核团,研究其向胆碱能神经元分化的潜能。发现移植后整合入神经核团中的干细胞可生存达 9 个月,并向星形细胞和神经元方向分化。海马穹窿—伞部通路曾有损伤的比未曾损伤的鼠脑,更能增强移植干细胞的存活,并获得胆碱能神经元表型,表达胆碱乙酰转移酶和 P75 神经营养因子受体。可以考虑损伤的胆碱能神经系统更能促进神经干细胞的分化。

Tang<sup>[18]</sup>移植神经干细胞进入黑质纹状体通路(被 6-OHDA 损害的鼠脑多个区域),研究其向酪氨酸羟化酶(TH)阳性细胞的分化。存活的前体细胞中大约 13.6%~16.1%具有神经元特点,20.7%~25.7%分化为星形细胞。免疫组化显示移植入中前脑束(MFB)前部的移植细胞有强烈的 TH 免疫反应,而黑质纹状体区的移植细胞则不能。证明成年脑的多巴胺能系统能诱导移植神经干细胞向本区域神经细胞特点分化。

### 3 神经递质合成相关酶对神经干细胞定向分化的影响

Joby<sup>[19]</sup>发现来自鼠胚胎干细胞的神经细胞表达 GABA 能神经元特点的 mRNA。进一步研究提示谷氨酸脱羧酶基因(Gad1 和 Gad2),对于 GABA 合成和囊状抑制氨基酸转运基因(Viaat)是必需的,后者的表达产物用于 GABA 囊状包装。近一半胚胎干细胞来源的神经细胞表达 Gad1 的产物 GAD67 蛋白,因此,使用敲除 Gad1 并代之以 lacZ 报告基因的胚胎干细胞系,更易监测胚胎干细胞分化期间 Gad1 的表达方式和水平。

Jia<sup>[20]</sup>注射含有编码 GAD 基因的腺相关病毒载体进入鼠的下丘脑核团。GAD 酶能催化 GABA 的合成,下丘脑的谷氨酸能神经元能被诱导表达 GAD;并因此由兴奋性神经核变成,终端主要释放抑制性递质 GABA 的系统,从而保护其支配的黑质神经元,治疗 PD。

Akamatsu<sup>[21]</sup>等应用酪氨酸羟化酶增强子调控下的 GFP 表达,从转基因鼠的神经干细胞成功得到酪氨酸羟化酶阳性的神经元;移植进

入 PD 鼠模型的纹状体中,能够作为多巴能神经元,改善其神经缺失症状。这提示操纵神经干细胞的神经递质合成相关酶定向分化获得的神经元,能很好的适应宿主的中枢神经系统。

### 4 神经生长因子和基因工程干细胞对退变神经元的保护作用

4.1 神经生长因子(NGF)能够减轻神经元退变 Armstrong<sup>[22]</sup>认为脑组织处于细胞退变和补充的动态平衡中,内源性干细胞可以在环境和药物的调节下增殖分化替代丢失的细胞。AD、PD 和 Huntington's 病等持续神经元死亡而未被替代,可能是由于内源性神经干细胞增殖、迁移或分化等方面缺陷,造成细胞丢失和神经环路的破坏。在移植神经干细胞替代尚有困难的前提下,减少神经元退变也是治疗变性疾病的一个方向。现已发现 NGF 能够阻止或减轻神经元退变,大量研究显示 NGF 能防止胆碱能神经元死亡,改善与年龄相关的脑萎缩病理和行为。

Capsoni<sup>[23]</sup>研究发现敲除 NGF 活性的转基因鼠(AD11 鼠)能出现进展性的类似 AD 样神经变性疾病,该疾病早期阶段能够被 NGF 和胆碱酶抑制剂阻断或改善;NGF 能够经嗅觉通路传导,对抗 AD11 鼠表达的抗-NGF 抗体,逆转已造成的神经退变。

### 4.2 基因工程化干细胞对退变神经元的保护

神经营养因子重建神经环路被认为是理想的保护退变神经元的方法。神经营养因子可经直接注射,导入神经营养因子基因(在体基因治疗)或移植包囊化的神经营养因子分泌细胞(离体基因治疗)三种方法入脑<sup>[24]</sup>。由于分子生物学技术的发展,已制造出多种神经营养因子分泌细胞,用来治疗 PD、AD 等特定神经疾病。

直接注入胶质源性生长因子(GDNF)基因到 PD 动物模型的黑质和纹状体内,可以有效的保护多巴胺能神经元。移植基因修饰分泌 GDNF 的工程细胞进入脑内,能够更好地改善 PD 神经功能缺失;因为这些细胞能长时间存活,无需多次脑内注入,即有持续 GDNF 分泌。基因工程化 GDNF—分泌干细胞移植治疗 PD 有较好前途。

舞蹈病主要影响纹状体的 GABA 能投射神经元。Martinez 等移植基因修饰后分泌 NGF 或 BDNF 的神经干细胞,进入喹啉酸损害的纹状体内,研究其保护纹状体神经元免于兴奋性毒害作用。BDNF-分泌神经干细胞保护的损伤区纹状体一月后仍有变性,DARPP-32 阳性的投射神经元丢失,但是 NGF-分泌神经干细胞则保护了纹状体对靶区(黑质网状部和苍白球)的 GABA 能投射支配功能。NGF-分泌干细胞不仅完全挽救了损伤的胆碱能性纹状体中间神经元;而且损伤区星形胶质和小神经胶质病理反应也减少。可以认为,基因修饰的神经干细胞能持续提供神经营养因子,对抗损伤神经元的退变。

鼠端脑基底部的胆碱能纤维的受损可导致皮层刺激唤醒功能下降。Rahimi<sup>[25]</sup>移植基因工程化的 NGF-分泌成纤维细胞到单侧端脑基底部损伤的鼠脑的三个位点,以不分泌 NGF 的单纯成纤维细胞作对照。仅移植 NGF-分泌成纤维细胞到 ACh 丢失后出现偏身感觉障碍的皮层,可改善功能活性,但乙酰胆碱酯酶染色仍下降;侧脑室或端脑基底部移植都无效,单纯成纤维细胞在任何位点都无效。NGF 作用机制不明,其高亲和力受体 trkA 是否存在于大脑皮层尚无定论。

## 5 结 语

加深神经干细胞的增殖和定向分化机制研究是移植治疗中枢神经系统变性疾病的基础和关键。调控神经干细胞向已退变的特殊神经细胞亚群分化,或以神经营养因子以及分泌神经营养因子的基因工程化神经干细胞阻止神经元退变;恢复神经系统原有的细胞结构平衡和功能,使神经变性疾病的治疗前景更加光明。

## References:

- [1] GAGE FH. Mammalian neural stem cells [J]. *Science*, 2000,287(5457):1433-1438.
- [2] LOU Yi-jia, ZHU Dan-yan (楼宜嘉,朱丹雁). Embryonic stem cells of mouse differentiate into myocardial cells in response to pharmacal manipulations in vitro [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报:医学版), 2002, 31(1): 5. (in Chinese)
- [3] CEN Hang-hui, HAN Chun-mao, LAI Ping-ping, et al (岑航辉,韩春茂,赖平平,等). Isolation, culturation and adipogenesis committed differentiation of adult human mesenchymal stem cell [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报:医学版), 2003, 32(2): 137-140. (in Chinese).
- [4] ZHANG Hong-kun, ZHANG Nan, WANG Zhong-gao, et al (张鸿坤,张楠,汪忠镐,等). Induction of differentiation of CD34<sup>+</sup> cells in vitro and application in endothelialization of blood vessel prostheses [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences* (浙江大学学报:医学版), 2004, 33(2): 147-150. (in Chinese)
- [5] JANULIS M, TRAKUL N, GREENE G, et al. Anovel mitogen-activated protein kinase is responsive to Raf and mediates growth factor specificity. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(6): 2235-2247.
- [6] TAUPIN P, RAY J, FISCHER W H, et al. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor [J]. *Neuron*, 2002, 28(2): 385-397.
- [7] CICCOLINI F. Identification of two distinct types of multipotent neural precursors that appear sequentially during CNS development [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 17(5): 895-907.
- [8] ARSENIJEVIC Y, WEISS S, SCHNEIDER B, et al. Insulin-like growth factor-1 is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 [J]. *Neurosci*, 2001, 21(18): 7194-202.
- [9] SLEEMAN M W, ANDERSON K D, LAMBERT P D, et al. the ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha [J]. *Pharm Acta Helv*, 2000, 4(2-3): 265-272.
- [10] SHIMAZAKI T, SHINGO T, WEISS S. The ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(19): 7642-7653.
- [11] BROOKER G J, KALLONIATIS M, RUSSO V C, et al. Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 59(3): 332-341.
- [12] ARSENIJEVIC Y, WEISS S. Insulin-like growth factor-1 is a differentiation factor for postmitotic CNS stem cell-derived neuronal precursors: distinct actions from those of brain-derived neurotrophic factor [J]. *J Neurosci*, 1998, 18(6): 2118-2128.
- [13] SUZUKI T, OOTO S, AKAGI T, et al. Effects of prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor

on the fate of neural stem cells transplanted into the developing rat retina. **Biochem Biophys Res Commun**, 2003,309(4):843-8437.

[14] ERLANDSSON A, ENARSSON M, FORSBERG N K. Immature neurons from CNS stem cells proliferate in response to platelet-derived growth factor [J]. **J Neurosci**,2001,21(10):3 483-3 491.

[15] SUNG J Y, LEE S Y, MIN D S, et al. Differential activation of phospholipases by mitogenic EGF and neurogenic PDGF in immortalized hippocampal stem cell lines [J]. **J Neurochem**, 2001, 78 (5): 1 044 - 1 053.

[16] SUN Y E, MARTINOWICH K, GE W. Making and repairing the mammalian brain-signaling toward neurogenesis and gliogenesis [J]. **Semin Cell Dev Biol**,2003,14(3):161-168.

[17] DOERING L C,SNYDER E Y. Cholinergic expression by a neural stem cell line grafted to the adult medial septum/diagonal band complex [J]. **J Neurosci Res**, 2000,61(6):579-604.

[18] TANG Z,YU Y, GUO H,et al. Induction of tyrosine hydroxylase expression in rat fetal striatal precursor cells following transplantation [J]. **Neurosci Lett**, 2002,324(1):13-16.

[19] WESTMORELAND J J,HANCOCK C R,CONDIE B G. Neuronal development of Embryonic Stem Cells:a model of GABAergic neuron differentiation [J].

**Biochem Biophys Res Commun**, 2001,284(3):674-680.

[20] LUO J,KAPLITT M G,FITZSIMONS H L, et al. Subthalamic Gad gene therapy in a Parkin son's disease rat model [J]. **Science**, 2002,298(5592):425-429.

[21] AKAMATSU W, OKANO H. Neural stem cell as a source of graft material for transplantation in neuronal disease [J]. **No To Hattatsu**,2001,33(2):114-120.

[22] ARMSTRONG R J, BARKER R A. Neurodegeneration: a failure of neuroregeneration? [J]. **Lancet**,2001,358(9288):1 174-1 176.

[23] CAPSONI S,GIANNOTTA S,CATTANEO A. Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2002,99(19):12 432-12 437.

[24] DATE I, SHINGO T, OHMOTO T. Neurotrophic factor delivery by encapsulated cell grafts [J]. **International Congress Series**,2003,1252:247-251.

[25] RAHIMI O, JULIANO S L. Transplants of NGF-secreting fibroblasts restore stimulus-evoked activity in barrel cortex of basal-forebrain-lesioned rats [J]. **J Neurophysiol**,2001,86(4):2 081-2 096.

[责任编辑 张荣连]

(上接第 271 页)

References:

[1] YANG Z G, MIN P Q, SONG S, et al. Tuberculosis versus lymphomas in the abdominal lymph nodes: evaluation with contrast-enhance CT [J]. **AJR**, 1999, 172(3):619-623.

[2] RADIN D R, ESPLIN J A, LEVINE A M, et al. AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma: Abdominal CT findings in 112 patients [J]. **AJR**, 1993,160(5):1 133 -1 139.

[3] YOUNG Z G, WEN P Q, LIAO Z Y, et al (杨志刚, 闵鹏秋, 廖正银, 等). CT features and anatomic distribution of malignant lymphoma in abdominal lymph nodes involvement. **Chin J Radiol (中华放射学杂志)**, 1996,30(11):727-731. (in Chinese)

[4] OLIVER T W Jr, BERNARDINO M E, SONES P J Jr. Monitoring the response of lymphoma patients to therapy: correlation of abdominal CT findings with clinical course and histologic cell type [J]. **Radiology**, 1983,149(1):219-224.

[5] ZHOU K R (周康荣). **CT of the Abdomen (腹部 CT)** [M]. Shanghai: Shanghai Medical University Publishing House,1993:274-278. (in Chinese)

[6] HUANG Y R, YAN Q H, SHI M L, et al (黄一容, 严庆汉, 石木兰, 等). **Modern diagnosis and treatment of malignant lymphoma** [M]. Zhengzhou: Henan Medical University Publishing House, 1997: 70 - 72. (in Chinese)

[责任编辑 黄晓花]