文章编号:1000-5404(2008)06-0465-03

论著

神经前体细胞移植 Aβ 损伤大鼠海马后分化神经元的形态学观察

李志方[1,2],唐 军[2],李露斯[1],杨 丽[2],徐海伟[2] (第三军医大学:[1]西南医院神经内科,[2]基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 观察小鼠胚胎干细胞来源的神经前体细胞移植 Aβ 损伤大鼠海马后新生神经元的分化情况。**方法** 将表达绿色荧光蛋白的小鼠胚胎干细胞采用无血清方法定向诱导为神经前体细胞,移植至 $A\beta_{1-40}$ 损伤的大鼠海马齿回,免疫荧光染色观察分化神经元的递质表型、受体表达以及与受者神经元的突触性接触。**结果** 小鼠胚胎干细胞来源的神经前体细胞移植后能长时间存活并分化为谷氨酸能、γ-氨基丁酸能神经元,表达 NMDA 受体和 $GABA_A$ 受体;发出类似神经元的长突起伸入到受者脑组织中去,并且在其胞膜和突起周围可观察到大量受者神经元来源的突触素阳性颗粒。**结论** 神经前体细胞移植 Aβ 损伤大鼠海马后能分化为不同类型的神经元,与受者神经元之间可能存在突触结构。

关键词: 胚胎干细胞;神经前体细胞;细胞移植;分化
中图法分类号: R329.24;R338.1;R741.02 **文献标识码:** A

Morphological observation of embryonic stem cell-derived neurons after transplanted into Aβ-injured rat hippocampus

LI Zhi-fang[1,2], TANG Jun[2], LI Lu-si[1], YANG Li[2], XU Hai-wei[2] ([1]Department of Neurology, Southwest Hospital, [2]Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the morphology of embryonic stem cell-derived neurons after transplanted into Aβ-injured rat hippocampus. Methods Neural precursor cells (NPCs) were generated from mouse embryonic stem cells (ESCs) expressing EGFP with modified serum-free methods and then transplanted into the hippocampus of $A\beta_{1-40}$-injuried rats. The morphology, neurotransmitter phenotypes and receptors of EGFP-positive donor cells were observed with immunofluorescene methods. Results The engrafted NPCs survived and differentiated into glutamatergic and GABAergic neurons and expressed both glutamatergic and GABAergic neurotransmitter receptors. Synaptophysin-positive dots were found surrounding somata and dendrites of transplanted neurons, suggesting the presence of presynaptic terminals adjacent to their membranes. Conclusion NPCs derived from ESCs can differentiate into excitatory and inhibitory neurons after grafted into Alzheimer's disease model rats, and maybe form synapse with the host neurons.

Key words: embryonic stem cell; neural precursor cell; cell transplantation; differentiation

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)具有自我增殖和分化的生物学特性,为神经损伤和退行性疾病的治疗带来了新的曙光[1]。尽管成年脑内依然存在 NSCs,但在损伤后完全依靠其自身的增殖分化尚不足以修复损伤的神经系统,因此通过移植外源性 NSCs 替代因疾病或损伤而丢失的神经细胞,进而修复神经系统的功能引起了神经科学家的极大兴趣[2]。虽然有大量的研究表明细胞替代治疗能改善患者和动物模型的运动和认知能力,但是对于移植细胞与受者神经系统的整合却很少涉及[3]。为此,本研究将小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)体外无血清诱导为神经前体细胞(neural precursor cells, NPCs),移植至 $A\beta_{1-40}$ 损伤的大鼠海马齿回,观察移植细胞来源的分化神经元的递质表型、受体表达以及与受者神经元的突触性接触,为 AD 的干细胞治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 表达绿色荧光蛋白的小鼠胚胎干细胞系 MESPU35 购自北京大学生命科学院。

基金项目: 国家自然科学基金(30571770)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30571770)
作者简介: 李志方,男,湖南省沅江市人,博士研究生,主要从事神经退行性疾病细胞替代治疗的实验性方面的研究。电话:(023)68752253, E-mail: lzflzf@mail.tmmu.com.cn
通信作者: 徐海伟,电话:(023)68752253
收稿日期: 2007-07-19;**修回日期:** 2008-01-25

1.1.2 实验动物 雄性 SD 大鼠，体质量 200～230 g，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.3 主要试剂 ES 级胎牛血清、谷氨酰胺、N_2（Gibco）；β-巯基乙醇、丝裂霉素、纤维连接蛋白、多聚鸟氨酸（Sigma）；鼠白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor，LIF）（Chemicon）；兔抗 EAAT3、兔抗 GAD67、兔抗 NMDA 受体亚单位 NR1、兔抗 $GABA_A$ 受体、小鼠抗 NF200（Boster），小鼠抗 synaptophysin（Chemicon）；SABC-Cy3（北京中山）。

1.2 方法

1.2.1 ESCs 的培养及无血清诱导分化 参照本实验室以前的 ESCs 培养及改良的无血清诱导方法[4]，概述如下：将小鼠胚胎成纤维细胞用丝裂霉素 C（10 μg/ml）处理 2.5 h 用作饲养层。ESCs 在饲养层上培养，培养液含 15% 胎牛血清、LIF（1 000 IU/ml）、β-巯基乙醇（100 μmol/L）。诱导分化时先将 ESCs 悬浮培养 4 d 形成胚胎体，再将胚胎体转入经多聚鸟氨酸和纤维连接蛋白预处理的 6 孔板中培养 24 h 以使其贴壁。然后换成含 N2 的 DMEM/F12 无血清培养 6 d，再更换为含 bFGF 的 DMEM/F12 培养基以增殖 NPCs。Nestin 免疫荧光染色进行神经前体细胞鉴定。

1.2.2 AD 大鼠模型的制备 参照本实验室已有方法[5]，根据包新民 SD 大鼠脑立体定位图谱，确定大鼠右侧海马齿回坐标：前囟后 3.0 mm，中线右侧旁开 2.0 mm，硬脑膜下 3.5 mm。立体定位单点注射老化态 $A\beta_{1-40}$ 10 μg（2 μg/μl）。

1.2.3 细胞移植 于 $A\beta_{1-40}$ 注射后 2 周进行细胞移植。将生长旺盛的 NPCs 消化后离心，PBS 稀释以制备浓度约为 1×10^6/μl 的单细胞悬液进行海马移植，按照每只大鼠 1 μl 的量移植到 $A\beta_{1-40}$ 注射位点。

1.2.4 移植后免疫荧光染色 于移植后 8 周取脑组织进行组织学检测，4% 多聚甲醛灌注固定，冰冻切片，片厚 30 μm。常规 ABC 三步法，三抗选用 SABC-Cy3。

2 结果

2.1 ESCs 的培养及向 NPCs 的定向诱导

ESCs 在细菌培养皿内培养 4 d 后形成胚胎体，呈球形，表面光滑，由数百个细胞组成。更换成含 N_2 的 DMEM/F12 无血清培养 6 d 后，大量细胞死亡脱落，存活的细胞变扁平，有多个突起。行 nestin 免疫荧光染色（Cy3 显色），大部分绿色荧光细胞为 nestin 阳性（绿色与红色阳性细胞叠加后呈橘黄色），见图 1。

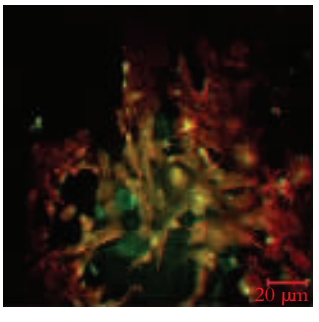
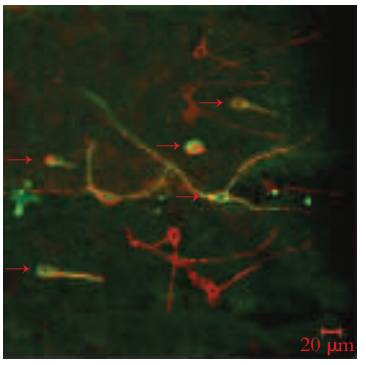


图 1 EGFP/NPCs 的 nestin 免疫荧光染色

2.2 NPCs 移植后的分布及向神经元样细胞的分化

NPCs 移植 AD 大鼠海马后，因其自身表达绿色荧光蛋白，可在荧光显微镜下进行追踪。移植后 8 周，大部分移植细胞绿色荧光较强，主要分布在注射处，并从针道向两侧迁移，个别细胞远离针道，约 14.3% 的移植细胞分化为 NF200 阳性的神经元。分化细胞的突起清晰可见，可长达胞体的数倍，并深入到周围受者脑组织中去，双重荧光显示分化神经元呈橘黄色（图 2）。

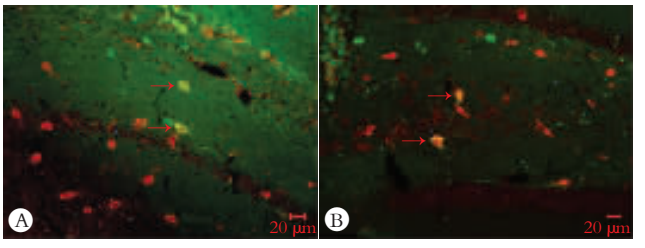


→：NPCs 分化而来的阳性细胞，绿色荧光表示 NPCs 来源的分化细胞，红色荧光表示 NF200 阳性神经元，色彩重叠呈橘黄色

图 2 NPCs 移植 8 周后向 NF200 阳性神经元分化

2.3 NPCs 移植后的递质表型分化

移植后 8 周，约（6.7 ± 1.6）% 的移植细胞分化为 EAAT3（神经元性谷氨酸转运体蛋白）阳性细胞（cy3 红色荧光染色），表明其为谷氨酸能神经元。其胞体较大，多数可发出长达胞体数倍的突起（图 3A）。约（2.1 ± 0.8）% 的移植细胞分化为 GAD67（谷氨酸脱羧酶）阳性细胞，表明其为 GABA 能神经元（图 3B）。色彩重叠呈橘黄色。



→：NPCs 分化而来的阳性细胞，绿色荧光表示 NPCs 来源的分化细胞，红色荧光分别表示 EAAT3（图 A）、GAD67（图 B）阳性神经元，色彩重叠呈橘黄色

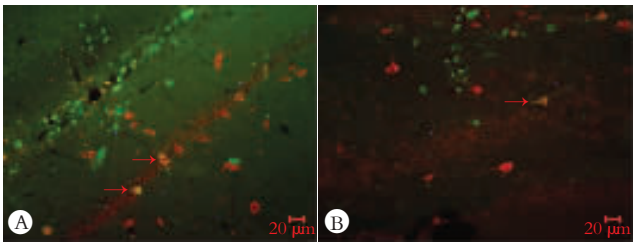
图 3 NPCs 移植 8 周后的递质表型分化

2.4 移植细胞来源的分化神经元递质受体的表达

移植后 8 周，部分移植细胞表达 NMDA 受体 NR1 亚单位（图 4A）和 GABAA 受体 β 链（图 4B），阳性颗粒主要分布在细胞膜、细胞质和突起上，表明移植细胞来源的神经元能表达兴奋性和抑制性神经递质受体。

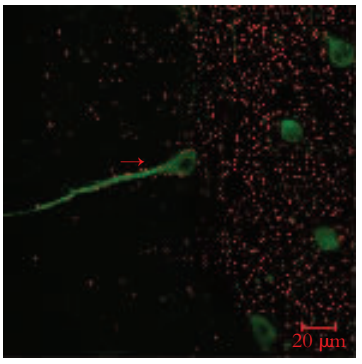
2.5 移植细胞与受者神经元之间的突触性接触

激光共聚焦观察突触素（synaptophysin，SYN）免疫荧光染色，在部分移植细胞胞膜和突起周围可观察到大量受者神经元来源的突触素阳性颗粒（Cy3 染色，见图 5）。受者来源的突触前终末与移植细胞紧密接触提示两者之间可能存在突触结构。



→：NPCs 分化而来的阳性细胞，绿色荧光表示 NPCs 来源的分化细胞，红色荧光分别表示 NMDA 受体 NR1 亚单位（A）、GABAA 受体 β 链（B）阳性神经元，色彩重叠呈桔黄色

图 4　NPCs 移植 8 周后神经递质受体的表达



→：NPCs 分化而来的细胞，其胞膜和突起周围存在大量受者神经元来源的突触素阳性颗粒（红色）

图 5　NPCs 与受者神经元之间的突触性接触

3　讨论

干细胞移植重建神经功能的关键在于新生神经元能和受者神经环路产生功能性整合。但在许多移植实验中，功能恢复的程度很少与移植神经元的绝对数量成正比。文献[6]报道，将外源性 NSCs 植入到新生大鼠皮质和海马，4 周后移植细胞来源的分化细胞不仅具有神经元的典型形态和特异性标志，而且发出长的轴突，分别投射到皮质和对侧海马，并与周围神经组织形成了广泛的兴奋性和抑制性突触连接。但是由于发育中的大脑富含各种神经诱导因子，因而有利于植入细胞的存活、分化和整合[7]，而成年或发生退行性病变的大脑微环境跟未发育成熟的大脑明显不同，在成年条件下，移植细胞是否能与损伤或退变的神经系统发生整合尚不清楚。

本室以前的研究表明，将小鼠 ESCs 来源的 NPCs 移植至 $A\beta_{1-40}$ 损伤的成年大鼠海马齿回，能显著改善 AD 大鼠的学习记忆能力。移植的细胞能较好的存活和增殖，并向损伤部位迁移[5]。在此基础上，本实验进一步研究了这些新生神经元的递质表型、受体表达以及与受者神经元之间可能存在的突触结构。发现移植后 8 周，约 14.3% 的移植细胞分化成 NF200 阳性的神经元。部分细胞分化为谷氨酸能和 γ-氨基丁酸能神经元，表达 NMDA 受体和 $GABA_A$ 受体；发出类似神经元的长突起伸入到受者脑组织中去，并且在其胞膜和突起周围可观察到大量受者神经元来源的突触素阳性颗粒，受者来源的突触前终末与移植细胞紧密接触提示两者之间可能存在突触结构。以上结果说明在成年病理环境下，移植的 NPCs 能分化为各种类型的神经元。其机制可能是由于当神经系统受损或变性时，体内调节神经元分化和突触形成的某些机制被重新激活，有利于 NSCs 的存活、分化和整合[8]。

目前，在动物模型上已积累了干细胞移植治疗帕金森病、亨廷顿病、脊髓损伤、缺血性卒中等中枢神经系统疾病的大量依据，为中枢神经系统损伤和退行性疾病的治疗开辟了新的途径。但这些研究主要聚焦于移植后的存活、迁移、分化以及对模型动物症状的改善方面，很少涉及到移植细胞与受者神经系统的整合这一重要问题。虽然本研究观察到在 $A\beta_{1-40}$ 损伤的病理环境下，移植细胞能分化为兴奋性和抑制性神经元、表达多种递质受体，但比例依然非常低，并且这些神经元是否具有功能尚不清楚。因此，后续工作将进一步探讨移植后的分化神经元能否与受者神经系统形成有功能的突触联系，是否直接参与到 AD 大鼠的学习与记忆过程，从而为 AD 等神经退行性疾病的细胞替代治疗提供实验依据。

参考文献：

[1] Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work[J]. Nat Med, 2004, 10(Suppl): S42 – S50.

[2] Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders[J]. Nature, 2006, 441(7097): 1094 – 1096.

[3] Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells [J]. Nat Rev Neurosci, 2006, 7(5): 395 – 406.

[4] Xu H, Fan X, Tang J, *et al*. A modified method for generation of neural precursor cells from cultured mouse embryonic stem cells[J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2005, 15(1): 52 – 58.

[5] 唐　军，徐海伟，周光纪，等. ES 细胞来源的神经前体细胞移植 Ab 损伤大鼠海马后的分化及对学习记忆的改善[J]. 第三军医大学学报，2007，29(2)：108 – 111.

[6] Englund U, Bjorklund A, Wictorin K, *et al*. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(26): 17089 – 17094.

[7] Kennea N L, Mehmet H. Perinatal applications of neural stem cells [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004, 18(6): 977 – 994.

[8] Lee J P, Jeyakumar M, Gonzalez R, *et al*. Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease[J]. Nat Med, 2007, 13(4): 439 – 447.

（编辑　汪勤俭）