维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1. Hashimoto I, Murakami G, Nakanishi H, et al. First cutaneous branch of the internal pudendal artery: an anatomical basis for the so-called gluteal fold flap. Okajimas Folia Anat Jpn, 2001, 78 (1): 23-30.
2. Perez Brayfield MR, Smith EA, Gatti J, et al. Vaginal reconstruction using a vertical rectus abdominis myocutaneous flap in a child: a case report. J Pediatr Surg, 2001, 36 (7): 1070-1072.
3. Filipas, D. Vaginal reconstruction/fistulae. Curr Opin Urol, 2001, 11(3): 267-270.
4. Giraldo F, Mora MJ, Solano A, et al. Anatomic study of the superficial perineal neurovascular pedicle: implications in vulvoperineal flap design. Plast Reconstr Surg, 1997, 99: 100-108.
5. 李森恺,刘元波,李养群. 阴股沟皮瓣阴道再造术12例分析. 中华妇产科杂志,2000,35(4):216-218.
6. 段德臣,孟祥平,李连生,等. 带血管蒂乙状结肠阴道再造术二例. 中华器官移植杂志,1999,20(2):83.
7. 杨日普. 带血管蒂回肠移植阴道成形26例临床观察. 中华妇产科杂志,1999,34(6):369-370.
8. 王显伦,周 刚,钟安国,等. 应用阴唇瓣的阴道再造术. 中华整形烧伤外科杂志,1 985,1 (2):47。
9. Tolhurst DE, van der Helm TW. The treatment of vaginal atresia. Surg Gynecol Obstet, 1991, 172: 407-414.
10. 袁相斌,林子豪,何清濂,等. 轴型皮瓣再造阴道126例经验体会. 中华显微外科杂志,2001,24(3):170-171.
11. Esrig D, John A. Freeman JA, et al. New technique of vaginal reconstruction following anterior exenteration. Urology, 1997, 49 (5): 768-771.
12. Simman R, Jackson IT, Andrus L. Prefabricated buccal mucosa-lined flap in an animal model that could be used for vaginal reconstruction. Plast Reconstr Surg, 2002, 109 (3): 1050-1051.
13. Niazi ZB, Kutty M, Petro JA, et al. Vaginal reconstruction with a rectus abdominis musculoperitoneal flap. Ann Plast Surg, 2001, 46 (5): 563-568.
14. Rangaswamy M, Machado NO, Kaur S. Laparoscopic vaginoplasty: using a sliding peritoneal flap for correction of complete vaginal agenesis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 2001, 98(2): 244-248.

(收稿日期:2002-06-04)

神经干细胞分化研究进展

张 宏* 王 玮*

20世纪90年代是脑科学蓬勃发展的时期。1992年,Reynolds[1]等首先利用一种称为"Neurosphere"法的特殊培养技术,从成年鼠纹状体分离出神经干细胞,从而提出了神经干细胞的概念。神经干细胞概念的提出冲破了成年动物神经元不能再生的传统观念,使人们对神经系统退行性疾病和损伤修复的治疗前景充满了希望,于是研究者把焦点集中到神经干细胞的研究上。神经干细胞培养体系,包括啮齿类动物和人类神经干细胞培养体系相继建立,使神经干细胞的增殖和分化研究得以迅速开展。只有实现神经干细胞定向分化,才能在临床上有的放矢,取得预期效果。本文将对此作一综述。

一、神经干细胞的生物学特征

神经干细胞作为神经系统的干细胞有其生物学特征:①能生成神经组织或源自神经系统;②有自我更新能力,通过对称分裂能生成同己的子代细胞;③有多分化潜能,通过不对称分裂能生成非己的子代细胞,包括神经系统三大主要细胞系——神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。研究发现,神经干细胞要比预期的有更广的分化方向,跨胚层分化为骨骼肌细胞和造血样细胞,使人们对其有更深的了解。所以有学者称之为神经多潜能干细胞。

神经干细胞在成人体内多处于静息状态,不表达任何抗原,现在尚无鉴定单个神经干细胞的"marker",故而新近文章多用"神经前体细胞"一词涵盖神经干细胞和神经祖细胞两个阶段。目前多用一种神经元中间丝蛋白——巢蛋白,即Nestin,作为神经干细胞的标志物。Okano[2]等亦应用一种RNA结合蛋白即Musashi,作为神经干细胞的标志物。对上述"Neurosphere"法分离的神经干细胞,Nestin和Musashi呈双重阳性,它们作为早期原始神经细胞的标志物已被广泛用于神经干细胞的鉴定。

二、神经干细胞的分布

在胚胎中许多部位,包括大脑皮层、纹状体、小脑均存在一定数量的神经干细胞,这已由体外培养证实。在成年动物脑中,两个区域有高密度的细胞分裂:室管膜下带(SEZ)和海马结构齿状回的颗粒细胞层下带(SGZ),在这些区域的最原始细胞的确切表型还不清楚。1992年,Reynolds[1]等利用"Neurosphere"法成功从成鼠纹状体分离到神经干细胞,此后研究者证实了神

* 作者单位:350004 福建医科大学人体解剖学与组织胚胎学系

维普资讯 http://www.cqvip.com

经干细胞也存在于海马齿状回、嗅球和第三脑室的室管膜细胞中，近来 Laywell[3] 等提出成人脑室管膜和室管膜下带细胞均有增殖潜能，但只有室管膜下区细胞具备神经干细胞的特性。在脊髓内，1996年，Weiss 等首次成功地从成年哺乳动物脊髓内分离到神经干细胞，后来通过实验证实在胚胎乃至成体的脊髓室管膜下带都有神经干细胞的存在，1999年，Johnasson[5] 等通过实验证明，成年哺乳动物脊髓中央管壁的室管膜细胞即是神经干细胞。

以上所述的是哺乳动物神经干细胞的分布，对人类中枢神经系统神经干细胞也有研究。Gage[6] 等在病人的海马组织中发现了一定数量的处于原始增殖状态的神经细胞，Goldman 和 Okano[2] 等以另一种干细胞标记物 Musashi，在成人侧脑室外侧的脑室下区证实了神经干细胞的存在。由于伦理方面的原因，人类神经干细胞的定位还不明了，但确实存在于胚胎和成人中枢神经系统中。有研究发现，在成年短尾猴的海马齿状回有比啮齿类少10倍的神经发生，推测在成年灵长类动物中也保留多潜能神经干细胞，对人类的神经发生组织研究有意义。

三、神经干细胞的分化

神经干细胞在临床上的成功应用，取决于对神经干细胞增殖和分化的调控。迄今为止，分化研究大部分着眼于各种细胞因子对体外培养系中的神经干细胞分化的影响，如表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、血小板衍生的生长因子(PDGF)、睫状神经营养因子(CNTF)、白血病抑制因子(LIF)、胰岛素样生长因子(IGF-1)、神经营养因子(NT)等细胞因子以及骨形成蛋白(BMPs)、甲状腺素(T_3)、维甲酸等因子；另一部分研究涉及在体神经干细胞的分化研究。

1.体外培养系中神经干细胞的分化

这方面的研究是通过观察各种细胞因子对体外培养体系中神经干细胞分化的作用，以图建立一套稳定的神经干细胞分化调控模式，为神经干细胞顺利应用于临床铺平道路。先给予丝裂原 EGF 、bFGF 将分离的神经干细胞体外扩增，再给予诱导分化的因子观察神经干细胞的分化方向，根据神经干细胞对丝裂原的反应分为 EGF 反应性和 bFGF 反应性干细胞。在培养液中撤除丝裂原后，EGF 反应性干细胞大多数分化为胶质细胞，分化为神经元者不足1%，并随传代数目增加而分化为神经元比例下降，而 bFGF 反应性干细胞则向神经元表型祖细胞分化，研究者将此称为缺席分化，属于自然分化的范畴。

EGF 和 bFGF 不但在神经干细胞的扩增中作为丝裂原，而且还有诱导神经干细胞分化的作用，是目前研究较为透彻的两种细胞因子。早在20世纪90年代初期，研究者把 bFGF 加入神经干细胞培养液中就发现能影响 EGF 反应性干细胞产生两种祖细胞，一种是单潜能的(神经元)，另一种是双潜能的(神经元/胶质细胞)。bFGF 可与其它因子共同调节神经干细胞的增殖和分化。在 IGF 和 PDGF 存在下，bFGF 对能分化成少突胶质细胞和Ⅱ型星形胶质细胞的双潜能(O-2A) 胶质前体细胞具有促增殖作用，bFGF 减少时，神经干细胞即分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞，从而发现了 bFGF 不仅起丝裂原的作用，也可促进细胞分化并决定分化方向，而且细胞增殖或分化呈 bFGF 浓度依赖性，低浓度 bFGF 启动分裂信号，高浓度启动分裂和分化信号；给体外培养的 bFGF 反应性皮质神经前体细胞加入 NT_3 后增殖减少而分化增加；加入 BDNF、IGF-1、PDGF 和维甲酸主要促其向神经元方向分化，Takahashi[7] 等证实维甲酸和神经营养因子在神经发生中作用于不同的阶段，维甲酸首先促进神经元命运的获得，神经营养因子随后通过 Trk 受体的维甲酸依赖性表达来增进成熟，这些连续效果足以刺激干细胞源的祖细胞分化成多种神经递质表型的神经元。Bicano-Abejon[8] 等发现 BDNF 可使 E16 海马 bFGF 反应性干细胞分化为 GABA 能神经元的比例高达70%，而 NT_3 则使分化为谷氨酸能神经元比例高达96%。在含血清的神经干细胞增殖分化实验中证实，aFGF 是 NT_3 之外另一种使神经干细胞向神经元分化的因子。Schinstine[9] 等观察到 BDNF 也促进 EGF 反应性神经干细胞产生神经元。此外，BMPs 主要促进神经干细胞向胶质细胞方向分化，T_3 能导致干细胞成为少突胶质细胞，CNTF 能在体外诱导神经干细胞形成星形胶质细胞。

有证据表明，bFGF 在胚胎发育早期对维持神经前体细胞生存，促进其增殖起作用；EGF 在发育晚期促进神经前体细胞增殖和分化。EGF、bFGF 和其它因子相互作用，或单独作用，调节神经干细胞分化为神经元、神经胶质细胞。

发育中的人中枢神经系统包含的多潜能前体细胞与相应的鼠类不同，因为它们需要 EGF 和 bFGF 的协同刺激才能表现干细胞特征，在去生长因子时能分化为主要的三种脑组织细胞——神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。Galli[10] 等指出神经生长因子(NGF)不影响神经元和胶质细胞的形成，令人惊讶地 PDGF 减少神经干细胞产生神经元的比例，其效果与在鼠类前体细胞上观察不同，而且也观察到 LIF 和 CNTF 作用于体外培养的人类中枢神经系统干细胞，产生的神经元比例增加了两倍。Pagano[11] 等发现暴露于 LIF 后，从成年病人分离并克隆的神经干细胞能分化更多的神经元，和 Galli 的结果相同。这些发现突出了关于细胞因子等调节神经干细胞分化情形，在人类和啮齿类有重要不同。

目前在体外神经干细胞分化研究多是少数几个因素作用，实际上体内分化调控是一个多因素网络，如神经系统内神经递质、粘附分子、酶等因素都可能参与其中，所以单因素或少数几个因素的研究不能很好地阐明神经干细胞的增殖和分化问题，这促使了在体神经干细胞分化研究的发展。

2.在体神经干细胞的分化

在体神经干细胞的分化研究又分为两种：一是将神经干细胞移植到体内以观察神经干细胞的增殖分化，了解内环境对神经干细胞分化的影响；二是对体内存在神经干细胞通过改变内环境，激发原来静止状态的神经干细胞增殖分化。

由于体外神经干细胞培养体系的成熟，方便了用于移植的干细胞的获取。将体外扩增得到的异质性神经干细胞直接或经基因修饰后植入脑内，然后进行跟踪观察研究，发现有神经

维普资讯 http://www.cqvip.com

发生的部位支持神经干细胞的分化,如纹状体、海马,并且可分化为具有这个区域性质的神经元,而并非生成干细胞源部位类型的神经元和胶质细胞,充分展示了它们的可塑性。Nishino[12]等将取自E12中脑的干细胞移植到成年大鼠偏侧帕金森病模型的双侧纹状体区,结果证实病损侧较健侧脑组织内神经前体细胞更易分化为酪氨酸羟化酶阳性(TH+)神经元,即DA已被耗竭的纹状体区提供了更适于中脑干细胞分化为成熟DA能神经元的内环境。Toda[13]将成年大鼠海马源神经干细胞移植入短暂性全脑缺血的大鼠海马中,有效地增加CA1区神经元数量,并且恢复了空间认知功能。这些为神经退行性病变和损伤的治疗带来了希望。神经干细胞也有主要分化为胶质细胞的倾向,Yandava[14]等发现脱髓鞘病变shiverer(shi)小鼠的少突胶质细胞因为缺乏髓鞘基本蛋白(MBP)而呈现全神经系统的功能障碍,因此治疗需要表达MBP的少突胶质细胞的广泛替代。克隆的神经干细胞移植于小鼠脑室内,许多移植细胞分化为少突胶质细胞,使多于52%的宿主神经细胞突起形成接近正常的髓鞘,一些接受性强的小鼠症状性颤动减少。Cao[15]等将E14大脑皮质和成年大鼠脑室下区源的干细胞移植入正常和挫伤的脊髓,发现有很强的生存能力,但只生成胶质细胞,主要为星形胶质细胞,他们建议移植前在体外先进行诱导,对于分化成神经元和大量少突胶质细胞是重要的。从上面这些研究中让人觉得神经干细胞的分化不局限于它们的来源区域,具有很强的可塑性,内环境在其中起的作用似乎占主要地位。因此在神经干细胞移植中,有效的治疗是利用神经干细胞的强可塑性以及基因操作技术,在植入前即操纵细胞或宿主,改变内环境,重现发育期信号,比如利用神经干细胞作为载体细胞,导入编码神经营养因子,神经系统酶或神经递质的基因,达到治疗疾病的目的。

中枢神经系统内存在神经干细胞,但处于静止状态。如果能通过改变内环境,激活干细胞并诱导其增殖、分化、整合,则可以完成损伤的修复和神经退行性病变的神经元再生。Craig[16]等将EGF注入成年鼠的侧脑室中,发现室管膜细胞的数量增加,新生成的细胞从侧脑室壁迁移到临近的皮质、纹状体、透明隔区,且这些细胞都显示Nestin阳性,停止注入EGF后,发现一部分细胞分化为新的神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞。Kuhn[17]等连续两周分别向成鼠脑室内注射EGF和bFGF,随后观察了嗅球处的神经元和神经胶质细胞再生的情况,其结果与Craig等的实验结果相似。另外有研究表明,在短暂性四血管结扎导致年轻大鼠全脑缺血后,也能刺激海马内祖细胞分化为神经元,这对体内激活干细胞研究有重要意义。在体外诱导分化研究的基础上进一步将各种因子用于体内干细胞的激活是今后研究的重要方向。

四、神经干细胞分化的分子机制

我们所研究的细胞因子等只是配体,传递某种生物学信号,神经干细胞上的受体、细胞内的信号传导以及基因表达是最终阐明神经干细胞分化机制的关键。一种细胞因子对不同干细胞有不同作用,相同干细胞对不同的细胞因子反应性也不同,均是由于其激活特定受体、启动相应细胞内信号传导通路,引起不同细胞效应的结果。目前分子机制的研究正在兴起。

Zhang[18]等为了理解干细胞是如何分化成少突胶质前体细胞时发现,从新生鼠纹状体分离的神经干细胞在EGF存在下形成悬浮神经球,把神经球暴露在不断增加的B104细胞条件培养基(B104CM)后,结果细胞只对B104CM产生反应,而不再对EGF产生反应,进一步研究表明它们是Pre-O2A祖细胞,只表达α-PDGF受体和FGF受体的mRNA而不表达EGF受体。研究表明,EGF受体是酪氨酸激酶受体,由ErbB基因编码。敲除ErbB基因,缺乏EGF受体功能的鼠皮质神经发生区消失,提示EGF在前体细胞增殖和分化中是通过其受体而发挥作用的。其它受体如核受体Nurr1也参与干细胞的分化。

各种配体作用于受体后,需要通过一定的信号系统传入细胞内。干细胞分化似乎依赖于多种信号通道相互作用的结果,一些促进而另一些抑制具体细胞系的分化,细胞内信号通路JAK/STAT、MAPK途径都可能与神经前体细胞对因子的反应性有关。新的证据表明神经干细胞分化为胶质细胞是由Notch信号传导完成的,通过成神经细胞表达的Notch配体可能在相邻干细胞上指导一种细胞可遗传转换,使其转换为成胶质细胞,即Notch配体激活Notch,使干细胞发生一快速的、不可逆的成神经元能力的丧失,而加速向胶质细胞的分化[19]。基因表达的调控最终决定神经干细胞分化。近年来,许多bHLH转录调控因子被克隆,它们参与了中枢神经系统神经干细胞的分化,有负调控因子调控bHLH蛋白。Sun等发现除了诱导神经元发生,bHLH转录因子neurogenin1(Ngn1)阻止干细胞向星形胶质细胞分化,它作为转录激活子激活神经元发生,通过使CBS-Smad1转录复合体与星形胶质细胞分化基因分离而阻止向星形胶质细胞的分化,并且还阻止对胶质细胞发生起重要作用的STAT转录因子的活性。Sakurada[21]发现核因子Nurr1激活与位于TH基因启动子区的反应元件相结合是使海马区干细胞向DA能神经元定向分化的机制之一。在具体的细胞因子调节基因表达研究方面,Miyasaka[22]分离了十种不同的cDNAs,它们的mRNA水平被bFGF所调节,其中一个被bFGF调节的基因,即clone 2C,是脑特异性表达的,对它进一步的分析将揭示bFGF在调节脑发育中的重要角色。

五、展望

神经干细胞的发现和方兴未艾的研究使人们接受神经元能够再生的理论,并对其应用于临床治疗神经退行性病变以及神经系统损伤寄予厚望。有些治疗策略已经成功地应用于疾病动物模型上,是否能应用于人类,安全有效地发挥作用,实现神经元的完美替代,神经干细胞的增殖、分化调控机制的研究无疑是重要的方向。在分子水平上阐明细胞的增殖、分化调控机制,并通过基因调控实现定向分化是今后努力的方向。神经干细胞的研究尚处于起步阶段,要应用于临床仍有许多问题需要解决,但在对神经干细胞认识上每前进一步,都将对人类健康有着重要意义。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1. Reynold BA , Weiss S. Generarion of neurons and astricytes from isolated cells of the adult mammalian nervous system. Science, 1992, 255:1707 - 1710.
2. Pincus DW, Keyoung H, Restelli C, et al. FGF2/BDNF - responsive neuronal progenitor cells in the adult human subependyma, Ann Neurol, 1998, 43:576 - 585.
3. Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, et al. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(25): 13883 - 13888.
4. Weiss S, Dunne C, Hewson J, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. J Neurosci, 16:7599 - 7609.
5. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell, 1999, 96:25 - 34.
6. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjirk Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nat Med, 1998, 4:1313 - 1317.
7. Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophons cillabirate to regulate neurigenesis in adult-derived neural stem cell cultures. J Neurobiol, 1999, 38:65 - 81.
8. Bicario Abejon C, Collin C, Tsoulfas P, et al. Hippocampal stem cells differentiate into excitatory and inhibitory neurons. Eur J Neurosci, 2000, 12:677 - 688.
9. Schinstine M, Iacovitti L. 5-Azacytidine and BDNF enhance the maturation of neurons derived from EGF - generated neural stem cells. Exp Neurol. 1997, 144(2): 315 - 325.
10. Galli R, Pagano SF, Gritti A, et al. Regulation of neuronal differentiation in human CNS stem cell progeny by leukemia inhibitory factor. Dev Neurosci. 2000, 22(1 - 2): 86 - 95.
11. Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, et al. Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. Stem Cells. 2000, 18(4): 295 - 300.
12. Nishino H, Hida H, Takei NK, 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.
13. Toda H, Takahashi J, Iwakami N, Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. Neurosci Lett, 2001, 316(1):912 - 918.
14. Yandava BD, Billinghurst LL, Snyder EY. "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(12): 7029 - 7034.
15. Cao QL, Zhang YP, Howard RM, et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. Exp Neurol, 2001, 167(1): 48 - 58.
16. Craig CG, Tropep V, Morshead CM, et al. In vivo growth factor expansion of endogenous subeoendymal neural precursor cell populaeions in the asult mouse brain. J Neurosci, 1996, 16:2649 - 2658.
17. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, et al. Epidermal growth factor and fibroblast gowth factor - 2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. J Neurosci, 1997, 17:5820 - 5829.
18. Zhang SC, Lundberg C, Lipsitz D, et al.. Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells. J Neurocytol, 1998, 27 (7): 475 - 489.
19. Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, et al. Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. Cell, 2000, 101(5): 499 - 510.
20. Sun Y, Nadal Vicens M, Misono S, et al. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. Cell, 2001, 104(3): 365 - 376.
21. Sakurada K, Ohshima Sakurada M, Palmer TD, et al. Nurrl, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. Development, 1999, 126:4017 - 4026.
22. Miyasaka N, Matsuoka I. Identification of basic fibroblast growth factor - responsive genes by mRNA - differential display in an immortalized neural stem cell line. Biol Pharm Bull, 2000, 23(3): 349 - 351.

(收稿日期:2002 - 09 - 25)

骨髓基质细胞与凋亡

罗 丽*

骨髓基质细胞、细胞间基质(ECM)、血管神经等构成了骨髓造血微环境。骨髓基质细胞由成纤维细胞、内皮细胞、脂肪细胞、巨噬细胞等多种成分组成,是造血干细胞生长、分化、和自我更新的重要场所[1]。骨髓基质细胞在造血调控方面发挥重要作用,它可以合成多种造血正负调控因子,这些因子一般是分布在细胞外基质和结合在基质细胞的膜蛋白上(锚定因子),与造血干细胞或白血病细胞局部共存,发挥高效的调控作用。凋亡(apoptosis)是机体某些功能性细胞的一种自我调节方

* 作者单位:400038 重庆市第三军医大学校务部门诊部