DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.032
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

文章编号:1000-5404(2004)22-2061-03

论著

人不同胎龄胎脑海马神经干细胞发育规律初探

尹晓娟,杜 江,封志纯 (第一军医大学附属珠江医院儿科,广州 510282)

提 要:目的 探讨人不同胎龄胎脑海马部位神经干细胞的发育规律。方法 收集胎龄16~32周的水囊引产胎儿100例,采用免疫组织化学和光镜技术对人胎脑海马部位神经干细胞的分布、形态、存在方式以及数量进行检测。结果 不同胎龄胎脑海马均存在神经干细胞,神经干细胞位于海马多形细胞层、锥体细胞层、颗粒细胞层及分子层,以多形细胞层、锥体细胞层及颗粒细胞层多见。细胞呈圆形、椭圆形、三角形及星形,以圆形和椭圆形多见,未见明显突起。细胞胞浆丰富,核呈圆形及椭圆形,染色质疏松,2~6个核仁不等。多数单个散在分布于其它神经元间,可见对称分裂现象,但有的神经干细胞呈簇状及群状分布,各组神经干细胞随着胎龄的增加呈减少趋势。结论 人不同胎龄胎脑海马广泛存在神经干细胞,各胎龄神经干细胞在分布部位、形态、存在方式及数量上存在一定的差异,海马可能是神经干细胞新的生发区。

关键词:神经干细胞;神经巢蛋白;人脑;海马
中图法分类号:R321;R322.81;R329.2 文献标识码:A

Development of neural stem cells in human hippocampus in the fetal brain at different developmental stages

YIN Xiao-juan, DU Jiang, FENG Zhi-chun (Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China)

Abstract: Objective To study the development of neural stem cells from human fetal brains at different developmental stages. Methods A total of 100 cases of embryos at 16—32 gestational weeks by induction of labor with water bag were collected for the determination of the distribution, forms, existing modes, and the number of neural stem cells in the hippocampus by SABC immunohistochemical method and light microscopy. Results Neural stem cells were found in the hippocampus at different fetal ages and located in the polymorphic layer, pyramidal, granular and molecular layers of hippocampus, mainly in polymorphic layer, pyramidal layer, and granular layer. Neural stem cells in hippocampus were round, ellipse, triangle, and stellate, particularly round and ellipse. No obvious enation was found. Neural stem cells had plenty of cytoplasm. The nuclei were round and ellipse with rare chromatin and nucleoli from 2 to 6. Most of neural stem cells were distributed among other neurons, and symmetric cleavage was found in some of them, but some neural stem cells were distributed in cluster and nest. The number of neural stem cells in hippocampus were different between groups and gradually decreased with the increasing gestational age. Conclusion Neural stem cells exist widely in the hippocampus at different gestational ages. There are differences in distribution, forms, existing modes, and number of neural stem cells in hippocampus at different gestational ages. Hippocampus may be the new originating region of neural stem cells.

Key words: neural stem cell; nestin; human brain; hippocampus

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的发现彻底打破了神经不能再生的传统观念,不仅将神经科学研究推向了前沿,为神经发育和神经组织移植等领域开辟了广阔前景,同时给临床颅脑损伤或其它神经系统退行性疾病等治疗带来新的希望。国外研究表明,哺乳动物成年脑在未受损部位出现了间断性神经生发,诱导因素能使在体的脑组织发生内源性神经再生[1]。目前采用神经干细胞植入脑组织已经在临床取得了肯定的疗效,但激活脑内源性的神经干细胞实现自我修复仍然处在实验研究的初期[1,2]。迄今对于神经干细胞的原位调节仍然是一无所知,这负面影响了细胞移

基金项目:广东省科技联合攻关项目(B30502)
Supported by the Key Sci & Tech Research Project of Scientific Committee of Guangdong Province (B30502)
作者简介:尹晓娟(1966—),女,湖南省邵阳市人,博士研究生,主治医师,主要从事新生儿疾病、遗传性疾病及胚胎神经发育方面的研究,现在在第三军医大学西南医院儿科,重庆 400038。电话:(023)66359952
通信作者:封志纯,电话:(020)61643369,E-mail:zhjfengzc@sohu.com
收稿日期:2004-03-04;修回日期:2004-07-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

植的效果[3]。因此，了解不同胎龄胎脑神经干细胞在体内的分布及生长特点，显得尤其重要。近年来，国内外有关胚胎脑神经干细胞体内定位仅限于大鼠[4]，本研究采用免疫组织化学和光镜技术对人胎脑神经干细胞在胚胎发育过程中的分布规律进行逐步探讨，为进一步研究神经发育和拓宽临床应用前景提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本 收集胎龄 16～32 周的水囊引产胎儿 100 例，并按胎龄 16、20、24、28、32 周分为 5 组，每组 20 例。每例研究对象取海马部位的脑组织为实验材料。胎儿母亲均查体健康，水囊引产胎儿经家属及胎儿母亲签字同意后由广州市武警总院妇产科提供，并经第一军医大学主管部门同意后方可进行研究。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 nestin 多克隆抗体(Chemicon)，SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(博士德公司)，其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 取材、固定及切片 水囊引产胎儿娩出后立即开胸暴露心脏，剪开右心房放出血液，再剪开左心室将灌注头插入主动脉用动脉夹固定，先输入 D-Hanks 液将血管内的血球冲洗干净，再用 4%多聚甲醛固定液灌注固定 3 h，打开头皮及颅骨，撕除脑表面之被膜，切取海马组织，后续固定 24 h，放入 30%蔗糖液中浸泡沉底后置－70 ℃冰箱 2 h，－20 ℃冰冻切片机中平衡 4 h 后切成 8～10 μm 厚的冰冻切片，贴在预先用多聚赖氨酸处理的载玻片上，待做免疫组化用。

1.2.2 免疫组化染色 冰冻切片用 0.01 mol/L PBS 洗 10 min×3 次，浸入含有 0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 30 min，再用 0.01 mol/L PBS 洗 10 min×3 次，甲醇-H_2O_2 室温下作用 30 min，0.01 mol/L PBS 洗 5 min×3 次。羊血清室温封闭 8 min，滴加兔抗人 Nestin 多克隆抗体(1∶200)，37 ℃孵育 2 h，0.01 mol/L PBS 洗 5 min×4 次。滴加生物素化的羊抗兔抗体 37 ℃孵育 30 min，0.01 mol/L KPBS 洗 5 min×4 次。滴加 SABC 复合物 37 ℃孵育 30 min，0.01 mol/L KPBS 洗 5 min×4 次。黄色 DAB 显色液显色 5 min，蒸馏水终止反应。苏木精液淡染核 1 min，脱水、透明及封固，OlympusBH-2 光学显微镜下观察。用替代法作阴性对照实验[5]。

1.2.3 免疫组化判断标准 在 400 倍光学显微镜下观察，胞浆黄染者判为神经干细胞，每组每个样本取 2 张载玻片，每张载玻片选 2 个视野，每组计算镜下 80 个视野的总细胞数和神经干细胞数。从而计算出每组神经干细胞阳性检出率。

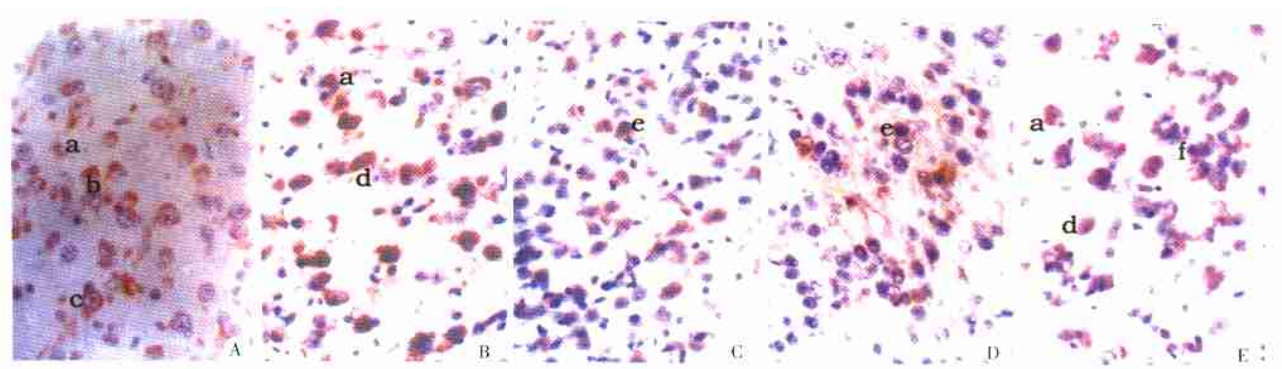
1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件中 R×C 表资料的 χ^2 检验比较组间神经干细胞阳性检出率。

2 结果

2.1 人胎脑海马组织神经干细胞分布特征

不同胎龄胎脑海马均存在神经干细胞，神经干细胞位于海马多形细胞层、锥体细胞层、颗粒细胞层及分子层，以多形细胞层、锥体细胞层及颗粒细胞层多见。细胞呈圆形、椭圆形、三角形及星形，以圆形和椭圆形多见，未见明显突起。细胞胞浆丰富，核呈圆形及椭圆形，染色质疏松，2～6 个核仁不等。多数单个散在分布于其它神经元间，可见对称分裂现象，但有的神经干细胞呈簇状及群状分布。不同胎龄组又有各自的分布特点。32 周组人胎脑海马神经干细胞主要分布在锥体细胞层及内颗粒细胞层，分子层可见，细胞呈圆形，大小不均，多数细胞单个散在分布，可见对称分裂及 2～3 个细胞集落样分布，见图 1A。28 周及 24 周人胎脑海马神经干细胞主要分布在多形细胞层及锥体细胞层，细胞呈圆形、椭圆形及三角形，细胞有大有小，核呈圆形及椭圆形，1～5 个核仁不等，细胞呈簇状以及群状方式存在，有对称分裂现象，见图 1B、C。20 周及 16 周人胎脑海马神经干细胞分布于海马组织的各层，细胞呈圆形及椭圆形，以圆形细胞多见，1～6 个核仁不等，细胞呈群状方式存在，见图 1D、E。



A: 32 weeks; B: 28 weeks; C: 24 weeks; D: 20 weeks E: 16 weeks

a: Large round NsCs; b: Small round NSCs; C: Clone with two NSCs; D: Ellipsc NSCs; e: NSCs; f: NSCs in nest

图 1 人胎脑海马 NSCs (SABC×400)

Fig 1 NSCs in hippocampus of human fetus week (SABC×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　不同胎龄海马部位神经干细胞的定量比较

不同胎龄组神经干细胞的数量存在显著性差异($P<0.01$)。随着胎龄的增加, 神经干细胞呈现减少趋势, 见表 1。

表 1　不同胎龄海马组织 NSCc 比较

Tab 1　Comparison of NSCs in hippocampus of human embryos at different gestational ages

Group	Negative cells	Positive cells	Total	Rate of NSCs(%)
16 weeks	13 248	5 616	18 860	29.8
20 weeks	18 910	5 776	24 686	23.4
24 weeks	28 160	5 680	33 840	16.8
28 weeks	19 008	2 640	21 648	12.2
32 weeks	5 856	656	6 512	9.09

$\chi^2=2\,780.2$, $P<0.01$

3　讨论

神经干细胞是一类具有自我更生及广泛分化潜能的细胞, 处于分化的非终末状态, 可通过对称或不对称分裂出新的干细胞或分化成逐渐变小的子细胞, 最终产生中枢神经系统的 3 种主要细胞, 即神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞[6]。神经巢蛋白(nestin)是神经干细胞的标志性抗原, 属于第 Ⅵ类中间丝蛋白质, 其表达起始于神经板的形成, 在神经元迁移和分化开始后逐渐消失, 并随神经细胞的分化完成而停止表达, 被广泛作为定性脑组织及其在体外鉴定神经干细胞的主要标志, 现已利用此神经干细胞的特征性标志物相继在体内体外发现神经干细胞。尽管长期以来国内外公认哺乳动物脑的室下区和海马的齿状回是神经干细胞的发源地[7], 但相继的研究表明, 哺乳动物的嗅球、室管膜、室管膜下区及海马齿状回存在神经干细胞, 并且随着胎龄的增加神经干细胞数目有减少趋势[4], 免疫组化研究表明在人胎脑的纹状体、海马、室管膜下区存在神经干细胞[8], 体外培养表明在人的海马及大脑皮层存在神经干细胞[2,5,9]。

本研究采用免疫组化技术在不同胎龄胎脑海马组织中发现神经干细胞, 且神经干细胞位于海马多形细胞层、锥体细胞层、颗粒细胞层及分子层, 以多形细胞层、锥体细胞层及颗粒细胞层多见。这不仅证实海马齿状回是神经干细胞的生发中心[7], 而且提示海马本身可能就是神经干细胞的生发区。同时发现, 海马部位的神经干细胞呈圆形、椭圆形、三角形及星形, 以圆形和椭圆形多见, 未见明显突起。细胞胞浆丰富, 核呈圆形及椭圆形, 染色质疏松, 2~6 个核仁不等, 可见对称分裂现象。这说明神经干细胞是幼稚细胞, 具有增殖、分裂能力。少部分神经干细胞呈簇状及群状分布, 这提示这些簇状及群状分布的神经干细胞可能是海马新的生发中心。研究还表明, 各组神经干细胞随着胎龄的增加呈减少趋势, 不同胎龄海马组织神经干细胞在分布部位、形态、存在方式、数量方面存在一定的差异。这也揭示了胎脑发育过程中神经干细胞的另一个发育特点。

本研究表明人胎脑海马存在神经干细胞, 且随着胎龄的增大神经干细胞呈现减少的发育规律; 并从神经干细胞的簇状、群状神经干细胞存在方式推测, 海马可能是神经干细胞新的发源地。本研究为神经发育、激活脑内源性的神经干细胞实现自我修复以及神经干细胞的原位调控拓宽了视野。

参考文献:

[1] Abrahams J M, Gokhan S, Flamm E S, *et al*. De novo neurogenesis and acute stroke: are exogenous stem cells really necessary[J]? Neurosurgery, 2004, 54(1): 150—155. discussion 155—156.

[2] 廖维靖, 范　明. 神经干细胞及其对脑缺血损伤的潜在治疗作用[J]. 生理科学进展, 2002, 33(1): 38—40.

[3] Calza L, Fernandez M, Giuliani A, *et al*. Stem cells and nervous tissue repair: from *in vitro* to *in vivo*[J]. Prog Brain Res, 2004, 146(2): 75—91.

[4] 肖新莉, 刘　勇, 徐　曦, 等. 大鼠脑发育过程中神经干细胞分布的免疫组织化学研究[J]. 西安医科大学学报, 2002, 23(2): 114—116.

[5] 李　巍, 蔡文琴, 吴　康, 等. 人胚胎大脑皮层神经干细胞的分离培养[J]. 解剖学报, 2002, 33(3): 241—244.

[6] Cataudella T, Conti L, Cattaneo E. Neural stem and progenitor cells: choosing the right Shc[J]. Prog Brain Res, 2004, 146(2): 127—133.

[7] Galli R, Gritti A, Bonfanti L, *et al*. Neural stem cells: an overview[J]. Circ Res, 2003, 92(6): 598—608.

[8] 周细中, 封志纯, 王　斌, 等. 人胎脑 Nestin 阳性神经元的发育[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(4): 311—313.

[9] Johansson C B, Momma S, Dlarke D T, *et al*. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system[J]. Cell, 1999, 96(1): 25—34.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net