DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.037
第25卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 20
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)20-1859-03

综述

永生化神经干细胞

Immortalized neural stem cells

王 彬 综述,杨 辉 审校 (第三军医大学附属新桥医院神经外科,重庆 400037)

干细胞的研究工作近年取得了重大突破,作为其中最特殊的一种,神经干细胞受到了越来越多的重视。神经干细胞是指具有分化为神经元、星型胶质细胞及少突胶质细胞的能力,能自我更新并足以提供大量脑组织细胞的细胞。而神经祖细胞是指相对神经干细胞而言,其分化和自我更新能力受到一定限制,仅具有单或双潜能分化能力或其干细胞样特征仅能维持较短时间的细胞[1]。神经干细胞具有以下特性:①可自我复制更新,产生与自己相同的子代细胞,维持稳定的细胞储备。②处于较原始的未分化状态,无相应成熟细胞的特异性标志。③具有多向分化的潜能,即演变成不同类型成熟细胞的能力。

中枢神经系统疾病中有很多是因为某种特定的脑细胞发生退行性死亡,使得一些重要的神经递质、蛋白因子或某些重要结构的匮乏所致。因此在体外使用具有丝裂原信号作用的细胞因子如表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)等成功地培养了神经干细胞之后[2],人们就自然地想到了直接用它进行移植治疗,或通过病毒载体将目的基因导入神经干细胞,将筛选得到的体外高效表达目的基因的克隆进行移植。为了达到移植的目的,首先需要大量表型、基因型稳定的神经干细胞供源。但是在体外培养的过程中却发现神经干细胞在传递若干代(最多为50~60代)后会突然出现停止分裂,称为复制衰老。原因可能在于在有丝分裂过程中位于染色体末端起着稳定染色体作用的端粒逐渐丧失所致[3]。而且人源性神经干细胞繁殖速度慢,传代周期长,多为多克隆起源[4]。这样就为其直接进行临床应用带来了不利影响。而永生化神经干细胞由于它的克隆性、均一性以及更快的分裂速率,使他们比体外培养的神经干细胞在某些方面更适合于上述应用。

1 永生化神经干细胞生物学特性

永生化神经干细胞目前尚无确切定义。体外通过基因操作可使神经干细胞获得永生化。最常用的方法是通过逆转录病毒载体将编码癌基因蛋白的基因转导入胚胎神经干细胞中,使细胞停留于分化过程的某一阶段,不能进行终末分化,并获得长期传代的能力[5]。目前不同形式的myc、neu、p53、腺病毒EIA以及SV40大T抗原都被证实能将不同脑区及年龄的神经干细胞制成永生化神经干细胞。其中v-myc和SV40大T抗原使用得最为广泛。特别是大T抗原的突变等位基因,即癌蛋白的tsA58温度敏感型基因具有良好的性能,在体外培养温度(33 ℃)条件下非常稳定,而在体内温度(37~39 ℃)条件下则会发生降解[6,7]。这些永生化神经干细胞在体外生存分裂也需要细胞因子如EGF及bFGF等参与[8]。表1中列举的是已较多用于神经再生和转基因体内实验的来自哺乳动物CNS的永生化神经干或祖细胞系。这些细胞系在脑内移植及基因转移的研究中具有下述优点:①它们在体外可以自我更新,并能大量增殖。②能通过基因操作使细胞稳定地表达报告基因及治疗基因。③可以分离出单个细胞克隆。④通过加入了外源基因而获得的永生化细胞,在体内仍然能像干细胞一样具有多相分化潜能[9]。

表1 来源于哺乳动物CNS的永生化神经干或祖细胞系

细胞系名称	种类	来源	永生化基因	分化潜能
HiB5	大鼠	胚胎16 d海马	tsA58/U19 T-ag	多潜能
ST14A, ST79-13A	大鼠t	胚胎14 d纹状体	tsA58/U19 T-ag	多潜能
RN33B	大鼠t	胚胎13 d髓缝	tsA58 T-ag	神经元
RN46A	大鼠	胚胎13 d髓缝	tsA58 T-ag	神经元
C17-2, C27-3	小鼠	新生鼠小脑外颗粒层	v-myc	多潜能
CSM 14.1.4	大鼠t	胚胎14 d腹侧中脑	tsA58 T-ag	?

永生化神经祖细胞一个非常值得注意的特征是在他们植入胚胎或成熟脑组织后能够发生整合与分化。且其分化具有可塑性,即能随移植部位微环境的改变而分化为不同的细胞表型。Renfranz和Synder等首先发现tsA58或v-myc永生化细胞系在植入新生大小鼠脑内特定部位后至少能够部分地分化成神经元与胶质细胞。将此类细胞植入成年动物脑内也能良好存活,而且没有组织破坏及肿瘤形成的迹象[7~9]。然而多数研究较为深入的永生化神经干细胞系被发现在移植后更多地分化为胶质细胞,例外的是来自胚胎中缝的RN33B细胞系,他们在植入发育或成熟的CNS环境中更多地分化为神经元(当然也有胶质细胞)[10]。

来源于中枢神经系统的温度敏感型永生化细胞系在移植进入成年大鼠纹状体后,其后过程是在移植后的前5 d分裂2~3次,然后主动迁移至离移植点1~1.5 mm的地方而逐渐与宿主组织完全整合。用[^{3}H]胸腺嘧啶放射自显影标记细胞记数发现细胞数量在2周内达到稳定后可保持很长时间。如植入来自海马的HiB5细胞系可稳定至少6个月[11]。不同类型的永生化神经干细胞在移植后成活的时间也不同。RN33B细胞系在植入3~10周后会减少75%,来源于纹状体的ST14A细胞系在植入2~4周后则会减少40%[11]。而tsA58和v-myc永生化细胞系在植入发育的或成熟的CNS后能发生良好的分化,稳

作者简介:王 彬(1975-),男,湖北省襄樊市人,硕士研究生,医师,主要从事神经干细胞的基础方面的研究。电话:(023)68774610

收稿日期:2003-05-15;修回日期:2003-09-18

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

定地整合并能存活较久，故很适合做体外转基因载体。

2 永生化机制

近年来人们对细胞永生化的机制进行了深入研究。一般认为，永生化是体外培养细胞经过自发的或受外界因素的影响而从增殖危机中逃逸，从而具有无限增殖能力的过程。自发性永生化的几率非常小，啮齿类动物细胞为 10^{-5} ~ 10^{-6}，人类细胞更罕见，小于 10^{-12}[12]。因此，研究者们努力通过基因转染等技术将各种外源性永生化基因如病毒、原癌基因和抑癌基因突变体等转入目标细胞内，以增加永生化的发生几率。对于细胞自身而言，端粒及端粒酶在细胞永生化的过程中扮演着十分重要的角色。端粒是存在于染色体末端，由重复的 TTAGGG 序列组成的 DNA 序列[13]。它的生物学功能是防止染色体降解、端-端融合、重排和染色体丢失。由于 DNA 聚合酶不能合成 DNA 的全末端，DNA 每复制一次，染色体大约丢失 50 ~ 100 bp 长度的端粒 DNA。端粒随着细胞分裂或衰老而进行性缩短，当缩短到一定限度时便不能维持染色体的稳定，细胞失去分裂增殖的能力，进而衰老死亡[14]。Kim 等[15]在检测多种永生化细胞的端粒长度时，发现它并未随细胞分裂而出现净丢失，同样提示着端粒长度的维持可能和细胞的无限增殖能力有密切关系。而端粒酶正是合成及维持端粒重复序列的一种特殊的核糖核酸蛋白质复合体。它主要由 3 个部分组成：端粒酶 mRNA（Telomerase mRNA，TR），端粒酶相关蛋白（Telomerase associated protein，TP1）和端粒酶催化亚单位（Telomerase reverse transcriptase，TERT）。其中TR 提供端粒合成的模版，TP 的功能不清楚，而 TERT 是维持端粒酶活性最重要的成分[16,17]。

人们在对 myc 基因介导的细胞永生化机制的研究中发现 myc 蛋白对细胞作用的靶点在 TERT。TERT 启动子含有许多 myc 结合部位，它们可以介导 TERTmRNA 的与细胞增殖和其它蛋白合成无关的快速表达，从而激活端粒酶，使细胞永生化[18]。在以 SV40 大 T 抗原使细胞获得永生化机制的研究中 Shay 和 Haber 等人认为端粒酶同样起着重要的作用，他们发现细胞永生化的机制是由两个独立的阶段即死亡阶段 1（Mortality stage 1，M1）和死亡阶段 2（Mortality stage 2，M2）控制的。细胞经多次分裂以后，在肿瘤抑制因子 p53 和 Rb 作用下，细胞进入 M1 期也称为衰老期（Senescence），此时细胞对生长因子等失去反应，产生 DNA 合成蛋白抑制因子，细胞周期检查点（Cell-cycle checkpoint）发送细胞周期停止信号，DNA 合成停止，细胞开始衰老，但不一定死亡。而 SV40 与 p53 及 Rb 结合后导致 M1 机制失效，细胞寿命延长；细胞经过 20 ~ 30 群体倍增次数（Population doublings，PDs）后，进入 M2 期亦称为危机期（crisis，M2），细胞出现退化，如双着丝粒形成、染色体变短而失稳，分裂细胞逐渐减少，绝大多数细胞发生凋亡，当控制 M2 的基因发生点突变或丢失时则导致 M2 机制失效，端粒酶被激活，以其自身 RNA 为模板不断合成端粒酶 DNA 来补充和延长端粒有限长度，以维持端粒长度，恢复染色体的稳定性，从而使细胞得以度过危机阶段而成为永生化细胞。

3 永生化神经干细胞的完全分化

Dinah 和 Fred 等[19]研究发现，用温度敏感型突变 SV40 大 T 抗原制备的永生化神经干细胞是制备成永生化细胞系的主要选择。然而仅通过将细胞环境从体外培养温度 33 ℃改变为体内生存的温度 37 ~ 39 ℃很难实现该细胞系的完全分化。因此，在除了改变温度以外，若干细胞生长因子添加在特殊的底物上，对于永生化神经干细胞的分化是必需的。虽然这些细胞系在分化后也表达神经元标志物（NFH），但是它们依然可表达神经干细胞标志物 Nestin。这些结果表明虽然这些永生化细胞在分化后表达了神经元的标志物，但它们仍处在干细胞阶段，并未完全分化。分析表明造成这种现象的原因在于仅通过上述方法，不能充分下调癌基因的表达，而且试图去完成最终分化经常会导致细胞凋亡。因此，若能构建一种简便的可调性抑制永生化神经干细胞中癌基因的表达，使其能彻底地分化为神经元而无须生长因子及底物辅助作用的系统将是十分有用的。为了构建这种外来因子调节癌基因的表达的结构，Hoshimarn 和 Rag 等使用了四环素控制的基因表达系统。在这种系统中，一种四环素控制的转录激动剂，也就是大肠杆菌 Tn10 来源的抗四环素操纵子阻抑物及单纯疱疹病毒 VP16 酸式区的融合蛋白，强有力地激活了从 Phcmv-1 开始的转录，而 Phcmv-1 是一种在没有四环素存在条件下构建的人类巨细胞病毒末端启动子融合至四环素操纵子的系列。低浓度的四环素（0.01 ~ 1.0 μg/ml），在不产生明显毒性的时候，几乎能够完全取消这种激动剂的转录活性。使用这种载体系统，他们构建了逆转录病毒载体 LINXV-myc，其中，癌基因 v-myc 以一种四环素调节的方式被转录。构建成功后转染分离培养的成年鼠海马神经祖细胞得到了稳定转染的克隆。Southem 印迹分析显示这些细胞只有一个逆转录病毒的整合位点，故可认为它们为单细胞克隆，取名为 HCS2S。这些细胞为多角型，有很短小的突起，每 12 小时分裂一次，生长表现为接触抑制，免疫组化显示 Nestin 及 Vimentin 阳性。然而在细胞培养液中添加四环素（1.0 μg/ml）后，这些细胞停止分裂，大多数为 phase-bright，并开始伸展其突起。Brdu 掺入研究显示当生长在没有四环素的条件下，所有的 HC2S2 细胞都结合了 Brdu。然而，当添加四环素后 2 d，摄入 Brdu 的细胞数仅剩下了 1% ~ 2%。在添加四环素的 5 d 后，差不多所有的细胞均表现为 NFH 阳性，超过半数的细胞为 tau 及 NeuN 阳性。然而，在这些细胞中却已经检测不到 Nestin 及 Vimentin。这些现象说明在这种永生化细胞系中通过添加低浓度四环素后，会迅速完全地抑制癌基因的表达，从而促进该细胞系的彻底分化。

4 永生化神经干细胞的应用价值

以往神经系统疾病的移植治疗发展缓慢，主要是受到胚胎脑组织来源、数目及伦理等方面的限制。而神经干细胞的发现、分离及培养成活，尤其是永生化神经干细胞系的建立，理论上可以无限地提供神经元和胶质细胞，解决了胎脑移植数量不足的问题。同时避免了伦理学方面的争论，为中枢神经系统疾病及损伤后进行替代治疗提供了充足的材料，从而为某些中枢神经系统疾病的彻底治疗提供了可能。

目前诱导干细胞向具有合成某些特异性地递质能力的神经元分化尚未找到成熟的方法，利用基因工程修饰体外培养的干细胞是这一领域的又一重大进展。另外发现许多细胞因子可以调节发育期甚至成熟神经系统的可塑性和结构的完整性，

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

将编码这些递质或因子的基因转导入永生化神经干细胞，使其成为合适的体外转基因载体，移植后可在局部发生整合、分化与基因的表达，可同时达到细胞替代和基因治疗的作用。

永生化神经干细胞作为合适的体外转基因治疗载体，具有许多良好的性质：①安全性，多次实验已证实永生化神经干细胞可完全整合入宿主脑组织中，对宿主无害，没有明显的干扰基因信息转移至宿主组织的证据。并且没有成瘤性。②稳定性及长期的高效率，永生化神经干细胞介导的基因转移可长期、稳定、高效的表达。③不引起免疫反应，永生化神经干细胞在移植后不需要特殊的抑制免疫反应的治疗也能良好生存。④永生化神经干细胞可根据宿主的年龄通过多种方式与宿主脑组织发生整合。⑤可调节性，最近构建了一些药物控制的永生化神经干细胞基因表达系统，通过施加外源性作用因子调节转移基因的表达。⑥可控制性。⑦符合伦理道德。

目前永生化神经干细胞已被用作外源性基因的载体，转入的基因包括各种报告基因（大肠杆菌 β-半乳糖苷酶 *E. coli* LacZ 和荧光素酶 Luciferase，神经营养因子基因（NGF 及 BDNF），递质合成酶基因（酪氨酸羟化酶 tyrosine hydroxylase）以及代谢酶基因（β-葡糖苷酸酶 glucuronidase 和 β-氨基已糖酶 hexosaminidase）等。

由于神经营养因子是一类具有潜在治疗意义的大分子，在正常情况下不能通过血脑屏障，而通过某种手段使它们在脑内出现时，这些肽能够对于带有特定受体的神经元行使复杂的神经保护及刺激生长的作用。因此，针对某些神经变性疾病植入能够表达神经营养因子的转基因载体是防止神经变性并恢复其功能的重要策略。在这方面，最初的工作是构建了逆转录病毒介导的细胞系 HiB5，使其能分泌 NGF，短期的实验发现将其植入脑内后这种细胞生存良好，并能表达 NGF 至少 10 周以上。将这种细胞植入橄榄核或纹状体后对周围的胆碱能神经元能发挥明显的神经营养作用，包括细胞体的肥大、向植入点伸出胆碱能轴突。不仅如此，在切断穹窿伞模型的脑内植入 HiB5-NGF 细胞 2 周可看到它能够防止内侧膈区胆碱能神经元的变性。上述现象说明这种细胞系确能在脑内产生具有生物学活性 NGF 而具有实用性。

对于帕金森病的基因治疗依赖于向体内转移酪氨酸羟化酶（TH）基因以达到能够在纹状体内更多的合成多巴胺。最初的实验是用肿瘤来源的细胞（因在体内不能控制其增殖而受到限制）及非神经元性细胞，如纤维细胞及肌细胞作为载体并都能成功的在试管中合成及释放多巴，但多数不能合成多巴胺。因为它们缺乏能将多巴转变为多巴胺的多巴脱羧酶。Anton 等在这方面的研究取得了一定的进展，他们使用温度敏感型永生化细胞系（来自 E14 大鼠腹侧中脑区）作为转基因载体（又称为 CSM14. 1. 4 细胞）；这些细胞在移植前经过某些处理（如加入 FGF 和视黄酸以及辅助 TH 酶具有功能的 BH4），然后将其植入偏身帕金森大鼠模型，动物在移植后至少 2～4 个月内维持了 TH 表达以及功能改善。Synder 等[6]用永生化的小鼠小脑干细胞携带人 β-葡萄糖醛酸酶（GUS）基因，治疗 Ⅶ型粘多糖储积病小鼠模型，结果显示脑内部分区域粘多糖的储积明显减少。这种小脑干细胞系体内可存活 8 个月之久，并能表达 GUS。

总之，永生化神经干细胞系的建立，为神经系统损伤修复和退行性病变的治疗带来了新的希望，也为研究神经发生、神经系统遗传病的发病机制提供了理想的载体。同时我们也应清醒的意识到永生化细胞毕竟是将正常细胞的基因组及遗传形状改变了的细胞。由于研究时间尚短，对其应用价值有待于进一步评价。

关键词：中枢神经系统；永生化神经干细胞；分化；基因治疗
中图法分类号：R329. 2　　文献标识码：A

参考文献：

[1] Mc K R. Stem cells in the central nervous system[J]. Science, 1997, 276(5309): 66－71.
[2] Svendsen C N, Smith A G. New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system[J]. Trends Neurosci, 1999, 22(8): 357－364.
[3] Wang J, Hannon G J, Beach D H. Risky immortalization by telomerase [J]. Nature, 2000, 405(6788): 755－756.
[4] Vescovi A L, Parati E A, Gritti A, *et al*. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation[J]. Exp Neurol, 1999, 156(1): 71－83.
[5] Gottlieb D I. Large-scale sources of neural stem cells[J]. Annu Rev Neurosci, 2002, 25(6): 381－407.
[6] Prestoz L, Relvas J B, Hopkins K, *et al*. Association between integrin-dependent migration capacity of neural stem cells in vitro and anatomical repair following transplantation[J]. Mol Cell Neurosci. 2001, 18(5): 473－484.
[7] Miyasaka N, Matsuoka I, Kurihara K. An immortalized septal cell line that expresses trkA mRNA in response to basic fibroblast growth factor[J]. Neurochem Int, 1997, 31(4): 557－562.
[8] Flax J D, Aurora S, Yang C, *et al*. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(11): 1033－1039.
[9] Martinez S A, Bjorklund A. Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(11): 530－538.
[10] 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 USA, 2002, 99(26): 17089－17094.
[11] Lundberg C, Martinez S A, Cattaneo E, *et al*. Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum[J]. Exp Neurol, 1997, 145(2 Pt 1): 342－360.
[12] Katakura Y, Alam S, Shirahata S. Immortalization by gene transfection [J]. Methods Cell Biol, 1998, 57: 69－91.
[13] Blasco M A. Mouse models to study the role of telomeres in cancer, aging and DNA repair[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(17): 2222－2228.
[14] Comolli L R, Smirnov I, Xu L, *et al*. A molecular switch underlies a human telomerase disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(26): 16998－17003.
[15] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, *et al*. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266(5193): 2011－2015.
[16] Fu W, Lu C, Mattson M P. Telomerase mediates the cell survival-promoting actions of brain-derived neurotrophic factor and secreted amyloid precursor protein in developing hippocampal neurons[J]. J Neurosci, 2002, 22(24): 10710－10719.
[17] 方泽强，李慧增，王常勇. 永生化软骨细胞体内软骨形成的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2003，25(9)：786－788.
[18] Wu K J, Grandori C, Amacker M, *et al*. Direct activation of TERT transcription by c-MYC[J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 220－224.
[19] Sah D W, Ray J, Gage F H. Bipotent progenitor cell lines from the human CNS[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(6): 574－580.

（编辑　陈聪连）

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