DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.035
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)03-0267-03

综述

胚胎干细胞向神经细胞分化的研究进展

Neural differentiation of embryonic stem cell *in vitro*

徐海伟,吴 旋 综述,黎海蒂 审校 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ESc)是从附置前胚胎内细胞团或原始生殖细胞经体外抑制分化培养的一种全能性细胞系。早在1981年,英国剑桥大学的Evans和Kaufman用延缓着床的胚泡、美国加州大学旧金山分校的Martin用条件培养基分别成功地分离、体外培养了小鼠ESc。除小鼠外,还有金黄地鼠、猪、牛和猴等动物的胚胎干细胞系成功建立。1998年Thomson和Gearhart分别建立了人胚胎干细胞系[1]。ESc既具有细胞系可扩增、遗传操作和冻存的特点;又类似胚胎细胞,含有正常的二倍体核型,具有发育的全能性。将ESc与受体胚胎嵌合或直接移植到发育中的脑和脊髓,能形成各种类型的神经细胞。采用体外培养ES细胞获得的材料进行神经移植,在动物实验上已取得初步成功。

1 ES细胞分化为神经细胞的体外培养方法

ES细胞体外分化为神经细胞主要有两种方法:全反式维甲酸(RA)的方法和无血清培养的方法。这两种方法都是从培养胚胎体(Embryonic body, EB)开始,撤去饲养层和白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF),将ES细胞置于不粘附的培养表面就能形成胚胎体。标准的EB由多种类型的细胞组成,其中只有很少比例细胞具有神经元的形态[2]。

1981年徐洁等[3]用RA和双丁酰基环腺苷单磷酸对小鼠ES细胞进行诱导分化,得到神经元样细胞,这些细胞不仅表达专一性神经丝M和β-微管蛋白,还有钠、钾、钙等离子通道的特征。Okabe[4]在1996年采用无血清的胰岛素-转铁蛋白-硒-纤维连接蛋白(Insulin-transferrin-selenium-fibronectin, ITSFn)培养法,将85%的ES细胞诱导为巢蛋白nestin阳性细胞。传代并在培养基中添加碱性成纤维生长因子bFGF(Basic fibroblast growth factor)能使Nestin阳性细胞增加6倍。撤消bFGF,nestin阳性细胞能分化成神经元和胶质细胞。

RA方法和无血清方法相同之处是诱导都从形成胚胎体开始,而且都能得到神经元和胶质细胞。不同之处有:RA方法培养基成分更为复杂,无血清方法培养基成分相对简单也易于控制;无血清培养方法使ES细胞经历了:ES—胚胎体—神经前体细胞—神经元/神经胶质细胞这样几个阶段,较之RA方法更接近于胚胎正常发育过程。从应用来看,无血清方法既是研究神经发育的更好模型,又是获取更好神经移植材料的方法。目前在ES细胞来源细胞做神经移植的研究领域,无血清方法是广泛采用的方法[5]。

2 来源于ES细胞的神经元的生理特性

ES细胞来源的神经元在以下几方面与原代培养的神经元相同:①ES细胞来源的神经元有电压和配体依赖的离子通道。②ES细胞来源的神经元都能产生动作电位,它们的静息电位为-40~-70 mV。③ES细胞来源的神经元用电压钳可以检测到内向和外向的电流,而Na^+离子拮抗剂河豚毒素(Tetrodotoxin)能快速阻断内向Na^+流,外向K^+流。ES细胞来源的神经元也表达电压依赖Ca^{2+}通道,其不同的组成部分对不同的拮抗剂敏感。④ES细胞来源的神经元对各种神经递质和选择性受体激动剂敏感,抑制性的递质γ氨基丁酸GABA和甘氨酸能激活多数此类神经元的Cl^-选择性通道。⑤ES细胞来源的大多数神经元表达一种或多种谷氨酸受体,如AMPA、NMDA。⑥ES细胞来源的神经元整个细胞钙流的不同成分能被G蛋白偶联的GABA和其他递质的受体调节[6]。

ES细胞来源神经元的电压和配体依赖的电流随细胞的成熟而增强[7]。电压依赖的Na^+和K^+流在EB贴壁后1 d或2 d内就能检测到,6~10 d后,它们的密度增加到150 pA/pF,与原代分离的神经组织相当。递质依赖的电流在EB贴壁后第2~3天可检测到,以后逐渐增高,12~16 d内达到稳定的水平。与此同时,细胞产生足量的突起,产生明显的轴突和树突,开始形成功能的突触联系。免疫组化检测到多种神经元特有的抗原的表达,如NCAM、NF、微管相关蛋白、突触素等[8]。

在ES细胞来源的神经元之间可以检测到功能联系[8],贴壁后8~10 d可检测到突触活动,包括兴奋性和抑制性的两种,大多数ES细胞来源的神经元是兴奋性的(几乎80%),其余20%为抑制性的,这个比例与原代培养的皮层和海马细胞相似[9]。GABA和甘氨酸的阻断剂能阻断ES细胞来源的抑制性突触的电流,证明它们由GABA和甘氨酸介导。以上结果表明ES细胞来源的神经元具有相当成熟的神经元特征。

在ES分化实验中可观察到明显的胶质细胞生成。Bain等[10]的研究显示GFAP(星形胶质细胞的标志)mRNA只在分化培养中观察到,在未分化培养中观察不到。这种时间特点与体内脑发育相似,提示ES细胞的体外分化与正常发育相似,都有能产生神经元和胶质细胞的共同祖先——多能干细胞的存在。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900169、30100087);全军"十五"青年基金资助项目(01Q099);重庆市应用基础基金资助项目(2001)

作者简介:徐海伟(1972-),男,江苏省江阴市人,博士,讲师,主要从事褪黑素的神经保护作用及机制方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752254

收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-28

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

3 利用胚胎干细胞进行神经分化机制研究

由于ES细胞体外分化模型和胚胎发育在某些方面有很好的对应关系,可利用ES细胞体外分化模型进行分化机制研究。与在体的方法比较,ES细胞体外分化模型具有以下优点:①ES细胞体外分化模型可提供大量前体细胞进行研究,如可用于比较ES细胞、神经前体细胞和成熟神经元的差异基因表达;②将在发育过程中起关键作用的基因,在ES细胞水平进行定点突变,再研究其对分化的影响有利于揭示分化的机制,这种研究在在体情况下往往会因为突变导致胚胎的死亡而不能进行[11];③体外分化各阶段细胞可以大量培养,使生化研究成为可能;④精确控制细胞生长的微环境,方便研究各种环境因素对分化的影响。总之,ES细胞体外分化模型为解决分化过程中决定分化途径(Lineage commitment)的机制提供了很好的模型。

ES细胞结合转基因动物技术,为研究发育过程基因时空调控的分子机制提供了一个理想的研究体系[12]。当一个完全或部分缺失转录调控元件的报告基因被导入细胞后,其表达完全依赖于内源基因的顺式作用元件,即报告基因的表达格式反映了内源基因的正常表达格式;同时,由于报告基因整合到基因内部而破坏了内源基因本身的结构,产生了突变,将携带该突变的ES细胞重新导入囊胚后产生嵌合体动物,再通过近交纯合等手段,报告基因即随之掺入至转基因动物的基因库中,这样就可研究该基因在发育中的功能,进而阐明在胚胎发育中基因表达的时空格式。若报告基因诱捕到的是在ES细胞中沉默,而在发育过程中启动的基因座位则更具意义。

4 神经诱导因子的寻找

几十年来人们致力于神经诱导因子(Neural inducing factors,NIF)的寻找。早在1924年Spemann和Mangold的蝾螈胚胎实验建立了神经诱导的概念。在以后的几十年中人们一直将神经的发生作为诱导的结果,而表皮的发生被认为是一种没有诱导的内定过程(Default state)。然而以后的实验使人们得出了相反的结论。Grunz[13]将外胚层中本应发育成表皮的部分取出后消化,在离体培养条件下产生了神经组织。将正常发育中不形成神经的中胚层组织消化后培养,几小时后也有神经组织产生[9],表明神经的发生是一内定过程,这一过程需要TGFβ超家族成员的参与。其中BMP4具有诱导表皮发生的作用,activin受体tAR(Truncated type Ⅱ activin receptor)通过抑制BMP信号起作用。目前已发现的神经诱导因子有noggin、follistatin和chordin。其神经诱导作用可能是通过阻断骨形成蛋白(Bone morphogenetic protein,BMP)而发生[14]。实验表明,抑制BMP信号就足以导致神经的发生[15]。所以目前研究支持这样的观点:神经发生不是一个主动诱导的过程,而是阻断向表皮诱导信号——BMP而产生的内定过程。

5 移植研究

神经移植理想的组织细胞来源应具备:①移植的细胞或组织在体外可以象细胞系样大量繁殖和扩增;②安全可靠;③移植组织能够分化为神经元和神经胶质细胞;④不需要长时期使用免疫抑制剂。

ES细胞的特性决定了它可作为移植材料的理想来源[16]。这是因为:胚胎干细胞是一种具有分化全能性的细胞,即具有向各种细胞分化的潜能,包括神经元和神经胶质细胞。它是稳定的细胞系,可在体外大量繁殖和扩增并进行基因操作,且基因操作后仍具有向各种组织细胞分化的潜能。有两条途径可以使来源于ES的细胞不产生免疫排斥反应,其一是采用核移植的方法获得遗传物质与患者完全相同的ES细胞系。另一种方法是通过体外基因操作,降低人胚胎干细胞的免疫原性,如敲除HLA Ⅰ类或Ⅱ类抗原,从而减少或消除机体对胚胎干细胞来源的移植物的排斥反应,可得到适用于各种人体的组织器官原材料。因为ES细胞及其分化形成的细胞具有以上优点,所以应用ES来源细胞的移植研究是近年来的活跃领域。

ES细胞直接移植到大鼠损伤的脊髓,能使大鼠的运动功能明显改善[17]。将ES细胞来源的EB部分消化后移植到大鼠损伤的脊髓,移植细胞可存活至少5周,从移植位点迁移至少8 mm。43%细胞分化为少突胶质细胞、19%为星形胶质细胞、8%为神经元,没有肿瘤形成。

1997年,Brustle等[18]将采用Okabe方法得到的神经前体细胞移植到胚胎大鼠(胎龄16 d和18 d)脑中,出生后0~15 d观察结果。发现移植细胞迁移到大脑皮层、纹状体、隔区、下丘脑、丘脑和顶盖等各脑区。移植细胞形成的神经元和胶质细胞的形态、大小与周围脑组织没有差别,它们很好地整合到周围组织,神经元突起有的扩展到临近的神经纤维网几百毫米。ES细胞来源的少突胶质细胞在出生后2周才出现,仅出现在白质。存留在受体动物脑室中的细胞参与形成神经上皮结构。

1999年Brustle[5]将ES细胞来源的胶质祖先细胞移植到无髓鞘的基因缺陷幼鼠脑和脊髓的背索,两周后9只移植动物中有6只长出无数的髓鞘,而且这些细胞不局限在移植部位,他们沿纵轴和水平方向扩散。一次注射100 000个细胞产生的髓鞘可以在背索节段上跨过3 mm,在2 mm范围内的腹侧索和脊髓灰质中也有移植细胞形成的髓鞘。这些髓鞘具有正常的超微结构。将细胞移植到脑室,在大脑皮层、胼胝体、前联合、海马、和顶盖都可检测到髓鞘形成。

1998年Deacon首先将ES细胞移植到损伤的纹状体,移植细胞在移植部位有很好的整合,并分化成多巴胺能神经元和五羟色胺能神经元。2000年12月Arnhold[19]将胚胎干细胞来源的神经前体细胞移植到纹状体,发现其分化成多种类型的神经细胞。

6 未解决问题和未来展望

ESc分化为神经细胞的研究才起步,许多基本问题还有待解决。如RA诱导神经通路的细胞和分子机制还不清楚,在细胞水平,对于EB中什么细胞对RA直接起反应还不清楚,有假设认为EB中的大多数细胞为双潜能细胞,既能形成外胚层也能形成中胚层。在分子水平,虽然对于通过RAR和RXR受体家族起作用较为肯定,但是这两种受体涉及到多个靶基因和更多的信号蛋白,RA的具体通路还不清楚。

ES细胞分化为神经细胞的体外模型与胚胎发育4~16 d相似,所以利用此模型,已可以进行大量的研究工作。特别是利用遗传学、生化学和细胞生物学的研究手段。但是现在我们

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

对神经干细胞向某种亚型神经元分化的调节通路还不清楚，利用 ES 系统有助于揭示这方面的调节机制。

另一个有待解决的问题是 ES 来源神经元的表型，我们已经知道 ES 来源的神经元有轴突和树突，能形成突触，释放 GABA、谷氨酸等神经递质。就这方面特点而言，ES 来源细胞更接近于中枢神经系统的神经元。但是它们符合脑和脊髓中哪种亚型的神经元和胶质细胞呢？比如中枢神经系统的 GABA 能神经元包括许多不同的形态和生化类型，ES 来源的 GABA 能神经元更接近于哪一种或几种呢？ES 细胞来源的神经元表达何种区域特异性的基因呢？(如 HOX 基因表达于后脑和脊髓)。

在利用 ES 来源细胞进行移植研究中，虽然移植细胞能存活和有一定程度的整合，但移植后神经细胞的功能还有待进一步研究。

关键词：胚胎干细胞；神经元；诱导因子
中图法分类号：R329.21 文献标识码：A

参考文献：

[1] Thomson J A, Itskovitz E J, Shapiro S S, *et al*. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts[J]. Science, 1998, 282(5391): 1145—1147.
[2] Shihabuddin L S, Ray J, Gage F H. Stem cell technology for basic science and clinical applications[J]. Arch Neurol, 1999, 56(1): 29—32.
[3] 徐 洁，丛笑倩，姚 鑫. 维生素 A 酸和双丁酰基单磷酸对小鼠胚胎干细胞的诱导分化[J]. 实验生物学报，1991，24(4)：353—360.
[4] Okabe S, Forsberg N K, Spiro A C, *et al*. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*[J]. Mech Dev, 1996, 59(1): 89—102.
[5] Brustle O, Jones K N, Learish R D, *et al*. Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants[J]. Science, 1999, 285(5428): 754—756.
[6] Strubing C, Rohwedel J, ahnerhilger G, *et al*. Development of G protein-mediated Ca^{++} channel regulation in mouse embryonic stem cell-derived neurons[J]. Eur J Neurosci, 1997, 9(5): 824—832.
[7] Bain G, Kitchens D, Yao M, *et al*. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*[J]. Dev Biol, 1995, 168(2): 342—357.
[8] Finley M, kulkarni N, Hucttner E. Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells[J]. J Neurosci, 1996, 16(9): 1056—1065.
[9] Godsave S, Slack J. Single cell analysis of mesoderm formation in the Xenopus embryo[J]. Development, 1991, 111(3): 523—530.
[10] Bain G, Ray W J, Yao M, *et al*. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 223(3): 691—694.
[11] Rohwedel J, Kleppisch T, Pich U, *et al*. Formation of postsynaptic-like membranes during differentiation of embryonic stem cells *in vitro*[J]. Exp cell Res, 1998, 239(2): 241—225.
[12] Filippi M D, Porteu F, Le Pesteur F, *et al*. Embryonic stem cell differentiation to hematopoietic cells: A model to study the function of various regions of the intracytoplasmic domain of cytokine receptors *in vitro*[J]. Exp Hematol, 2000, 28(12): 1363—1372.
[13] Grunz H, Tacke L. Neural differentation of Xenopus laevis ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer[J]. Cell diff Dev, 1989, 28(2): 211—218.
[14] Holly S, Neul J, Attisano L, *et al*. The Xenopus dorsalizing factor noggin ventralizes Drosophila embryos by preventing DPP from activting its receptor[J]. Cell, 1996, 86(5): 607—617.
[15] Wilson P A, Hemmati B. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4[J]. Nature, 1995, 476(2): 331—333.
[16] Marshall E. A versatile cell line raises scientific hopes, legal questions[J]. Science, 1998, 282(5391): 1021—1022.
[17] McDonald J, Liu X, Qu Y, *et al*. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord[J]. Nature Med, 1999, 5(11): 1410—1412.
[18] Brustle O, Spiro A C, Karram K, *et al*. *In vitro*-generated neural precursors participate in mammalian brain development[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(26): 14809—14814.
[19] Arnhold S, Lenartz D, Kruttwig K, *et al*. Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum[J]. J Neurosurg, 2000, 93(6): 1026—1032.

(编辑 汪勤俭)

文章编号：1000-5404(2003)03-0269-03

综述

阿片成瘾记忆的分子机制研究进展

Advances in the studies of molecular mechanism of memory of opium addiction

庞 勇 综述，黎海蒂 审校 (第三军医大学基础医学部生理学教研室，重庆 400038)

药物成瘾是由滥用药物与大脑奖赏系统相互作用产生的慢性、复发性脑疾病，主要表现为强迫性用药症状和持续性渴求状态[1]。成瘾一旦形成，可延续终生。病人数年、甚至十几年戒断之后，只要回到相关的环境中，即可激发强烈的药物渴求感，导致复吸。这种现象说明：药物成瘾后大脑发生了极其稳定的形态或功能改变，形成了成瘾记忆，这是成瘾者长期、甚至终生行为异常的主要原因。

研究药物成瘾的机制时发现其与学习记忆有许多相似之处，从行为学角度来看，成瘾的某些主要特征被描述为记忆的

作者简介：庞 勇(1972—)，男，四川省南充县人，博士，助教，主要从事阿片耐受及成瘾的机制方面的研究。电话：(023)68752254
收稿日期：2002-10-08；修回日期：2002-12-17

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