

文章编号: 1004-0374(2010)10-0995-05

室管膜下区神经干细胞与神经发生的研究进展

惠董娜, 王晓雯, 王念, 吴民耀*

(陕西师范大学生命科学学院, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 西安710062)

摘要 室管膜下区(subventricular zone, SVZ)存在着神经干细胞(neural stem cells, NSCs),是成年哺乳动物脑内重要的神经发生区域。神经发生过程极为复杂,包括一系列的生物学事件。在病理状态下,SVZ区的细胞增殖,新生的神经细胞迁移到病灶处,取代或修复受损的细胞,起到保护脑组织的作用。该文就SVZ区的神经干细胞、神经发生过程及病理状态下神经发生的相关研究做一综述。

关键词: 室管膜下区; 神经干细胞; 神经发生

中图分类号: Q426;R338.2

文献标识码: A

Recent research on neural stem cells and neurogenesis of subventricular zone

HUI Dong-na, WANG Xiao-wen, WANG Nian, WU Min-yao*

(National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: Neural stem cells persist in the subventricular zone, which is a main area of neurogenesis in adult mammalian brain. The process of neurogenesis is extremely complex, including a series of biological events. Under the pathological conditions, the cells in subependymal zone can proliferate and newborn neurons migrate to the lesions, where they replace or repair the damaged cells, playing a role in protecting brain. Here, after describing the neural stem cells and its character, we review recent advances in the process of neurogenesis in subependymal zone and its changes in pathological states.

Key words: subventricular zone; neural stem cell; neurogenesis

室管膜下区(subventricular zone, SVZ)是指沿侧脑室侧壁分布的区域,终生保持着产生新生神经元的能力。Reynolds和Weiss于1992年从成年啮齿动物SVZ区成功地分离和培养出了神经干细胞,这一发现打破了传统理论中认为“神经不可再生”的观念,并证实了成年动物中枢神经系统中存在神经干细胞。成体脑中神经干细胞增殖并产生新的神经细胞,它们经过迁移、分化形成成熟的神经元,进而整合到已有的神经回路中,这一系列过程称为神经发生(neurogenesis)。在病理状态下,成体神经发生过程中产生的新生神经细胞可替代或修复受损细胞,有助于受损的神经系统得以恢复或再生。因而,通过研究成体神经干细胞及神经发生过程,采用适当的因子刺激机体自身的神经发生,有望为中枢神经系统疾病的治疗提供一种有效的再生疗法。

1 室管膜下区的神经干细胞

神经干细胞(neural stem cells, NSC)是指具有长期的自我更新能力,并能分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的一类多潜能细胞。成年啮齿动物SVZ区的神经干细胞主要分布于侧脑室的侧壁上。然而,近来研究发现在SVZ区细胞迁移通道——嘴侧迁移流(rostral migratory stream, RMS)中也存在有神经干细胞^[1]。位于SVZ区中的神经干细胞具有一定的增殖能力,能够分化为嗅球中间神经元。目前对室管膜下区神经干细胞的认识有两种:一种认为室管膜细胞是SVZ区的神经干细胞。它们

收稿日期: 2010-04-13; 修回日期: 2010-05-10

基金项目: 陕西师范大学211工程重点项目(884067)

*通讯作者: E-mail: mingyaowu@snnu.edu.cn

可以快速地增殖产生神经祖细胞, 这些祖细胞最终分化为神经元并迁移至嗅球。在脊髓损伤后, 室管膜细胞急剧地增殖产生迁移细胞并分化为星形胶质细胞, 参与瘢痕的形成^[2, 3]。另一种认为表达胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)的星形胶质细胞为SVZ区的神经干细胞, 而室管膜细胞在正常条件下不具有干细胞特性^[4]。星形胶质细胞又称B型细胞, 或类辐射状胶质细胞, 表达胶质细胞的分子标记GFAP, 具有典型的星形胶质细胞的超微结构特征(成束的中间纤维、胞质致密体、间隙连接等), 表现出类似于胚胎神经上皮中神经祖细胞的单纤毛特性, 可延伸到达侧脑室的表面^[5]。除上述特征外, 星形胶质细胞还具有一定的电生理学特性, 能够产生由钾离子通道引起的外向电流^[6]。Merkle等^[7]认为这类星形胶质细胞来源于辐射状胶质细胞。辐射状胶质细胞存在于胚胎期和出生早期的侧脑室侧壁上, 具有一些类似于星形胶质细胞系的特征, 包括血管终末、中间丝蛋白和糖原颗粒。它们不仅可以作为多种神经元和胶质细胞的祖细胞, 而且可分化为SVZ区的星形胶质细胞。虽然人们已经从SVZ区中分离并获得了神经干细胞, 但它们的生物学特性在体内单细胞水平上并没有得到证实, 因而有待于进一步研究。

2 神经干细胞的鉴定

鉴定成体脑内增殖细胞通常采用5-溴脱氧尿苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)对细胞进行标记。BrdU是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 在细胞周期的S期掺入到增殖或分裂细胞的核内, 只要细胞不凋亡, BrdU将永久地存留在胞核DNA中。神经干细胞的鉴定可通过BrdU标记结合细胞表面特有的标志物, 用双重免疫组化染色法进行检测。用于鉴定SVZ区神经干细胞的标志物主要有: 巢蛋白(Nestin)、胶质细胞的特殊标志物GFAP、Musahil、胚胎多能干细胞表达的一种碳水化合物Lewis X(Lex)、CD133、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和血小板衍生生长因子受体 α (platelet-derived growth factor receptor alpha, PDGFR α)等^[8-10]。然而, BrdU在免疫组织化学染色过程中的一个很大的缺点是需要通过酸化或加热处理使DNA变性, 从而将BrdU结合到BrdU抗体上。这种染色处理过程可能损伤组织结构并潜在地破坏了细胞的表面抗原。近来, 研究者选用了一种新的胸腺核苷类似物5-乙炔脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-

deoxyuridine, EdU)检测处于DNA合成期的细胞^[11, 12]。这种方法的优点在于不会引起DNA变性, 能够保持组织结构及细胞表面抗原的完整性。同时, EdU标记可以与多种荧光标记很好地融合, 能以较高的分辨率、快速简便地区分出增殖细胞的类型。因而, EdU可被用作标记物来有效地鉴定具有增殖能力的细胞。

3 SVZ区的神经发生

SVZ区是中枢神经系统中原始生发层的残余部分, 由发育早期的室层神经上皮细胞分化而成, 终生具有产生神经元的能力。从胚胎期到成年期, SVZ区始终存在着神经发生。神经发生是一个复杂的过程, 由一系列的生物学事件所构成, 包括神经干细胞增殖产生神经前体细胞, 神经前体细胞增殖、迁移、分化产生成熟的神经元以及新生神经元形成突触结构并整合到现有的神经回路中。

3.1 细胞的增殖

SVZ区有三种类型的神经前体细胞: A型成神经细胞、B型星形胶质细胞和C型未成熟神经祖细胞。B型星形胶质细胞即SVZ区的神经干细胞, 大多数处于相对静止的状态, 在正常生理条件下, 它们能够缓慢地分裂产生C型未成熟神经祖细胞; C型未成熟神经祖细胞沿侧脑室的侧壁成簇分布, 是SVZ区增殖最活跃的细胞, 可快速地分裂为A型成神经细胞; A型成神经细胞是SVZ区数量最多的一种细胞, 表达 β -微管蛋白以及与迁移相关的分子标记doublecortin和唾液酸化的神经细胞黏附分子(polysialated form of neuronal cell adhesion molecule, PSA-NCAM)。与神经干细胞不同, A型成神经细胞的命运已特化, 定向为神经元细胞谱系。神经干/祖细胞所在的SVZ区为神经发生提供了一个特定的微环境, 对调节神经干细胞的增殖和分化具有重要的作用。现已证实, 血管系统是SVZ区干/祖细胞微环境的重要组成部分^[13]。在细胞动态平衡和再生过程中, 神经干细胞和未成熟神经祖细胞与血管系统连接紧密, 一些小分子物质可通过SVZ中独特的血脑屏障进入SVZ区, 调节细胞的自我更新和分化能力。将经基因转染血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的腺病毒注入到大鼠SVZ区内, VEGF表达上调促进SVZ区神经干细胞的增殖和分化^[14]。碱性成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor 2, FGF2)通过结合SVZ区神经前体细胞表达的FGF受体, 促进神经干/祖细胞的增殖^[15]。由血

管内皮细胞分泌的其他一些因子, 包括脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)等也会影响神经前体细胞的增殖^[13]。除此之外, 一些信号分子也参与对神经前体细胞增殖的调控。研究表明, 体内抑制Sonic hedgehog(Shh)信号时, 会减少SVZ区细胞的增殖。在体外, Shh可调节SVZ区神经干细胞的自我更新能力, 并且作为一种有丝分裂原促进细胞的增殖以及增加神经元的数量^[16]。另外, 增强Notch1信号的活性也可促进SVZ区的细胞增殖^[17]。

3.2 细胞的迁移

由神经干细胞增殖产生的成神经细胞组成链状细胞群, 沿RMS通过长距离的迁移最终到达嗅球。在RMS的迁移通道中, 成神经细胞能够继续增殖, 并且依靠其表面相同的抗原形成链锁式结构, 以切线方式进行迁移, 被称作“链式迁移”。排列紧密的成神经细胞嵌入到由特异性表达GFAP的星形胶质细胞环绕而成的“胶质管”中, 一旦到达嗅球, 迁移的成神经细胞便彼此分离, 从胶质管中脱离出来, 进而转变为放射状的迁移方式, 定位于颗粒细胞层或小球层。目前对成神经细胞在RMS迁移中迁移方式转变的机制仍不清楚, 但报道称有两种胞外基质分子可能引导迁移的细胞转变方向。Hack等^[18]发现由僧帽细胞层分泌的一种糖蛋白Reelin可诱导成神经细胞脱离链状细胞群, 使细胞彼此分开。Saghatel'yan等^[19]发现颗粒细胞层的肌腱蛋白-R(tenascin-R)不仅能诱导成神经细胞脱离链状细胞群, 而且能触发成神经细胞进行辐射状迁移。通过含铁氧化物原位标记小鼠SVZ区的成神经细胞, 利用磁共振成像技术(MRI)体内追踪细胞迁移的动态过程, 发现正常生理条件下成神经细胞在RMS中的迁移速度可达到100 $\mu\text{m}/\text{h}$ ^[20]。

3.3 细胞的分化

成神经细胞迁移至嗅球不同的细胞层后, 大约90%的细胞分化为GABA能颗粒细胞, 而其余细胞则分化为多巴胺能的球旁中间神经元^[21]。Petreanu等^[22]将含GFP的逆转录病毒注射到成年鼠SVZ区, 连续地观察到新生神经元的成熟过程, 并将其划分为5个阶段: 第1、2阶段的未成熟神经细胞(产生后2~7 d)在RMS中以切线方式迁移, 此时细胞形态简单, 仅具有一个明显的主突起和一个小的尾状突起; 第3阶段的细胞(产生后9~13 d)到达颗粒细胞层, 停止迁移, 形成一个朝向僧帽细胞层延伸的

简单的树突结构; 第4阶段的细胞(产生后11~22 d)有大量的树突轴, 但并未形成树突棘; 第5阶段的细胞(产生后15~30 d)具有成熟颗粒细胞的形态, 形成了树突棘, 大约50%的新生颗粒细胞在产生2~8周后死亡, 这可能是由于它们不能整合到神经回路中。新生颗粒细胞的成熟过程并非简单地重复胚胎期神经元成熟的发育模式, 它们具有独特的电生理学特征, 表现出自发的兴奋性与抑制性突触后电流, 只有在完全发育成熟后才能产生动作电位^[23]。

3.4 新生神经元突触的功能性整合

与发育中大脑类似, 成年哺乳动物脑内新生神经元必须整合到已建立的神经回路中, 才能够参与神经活动。已有一些研究表明, SVZ区新生神经元的轴突可延伸, 与周围神经元建立突触联系, 接受突触输入, 进而整合到神经回路中。Kelsch等^[24]采用两种特异性定位于突触前后膜的基因标记GFP融合蛋白和PSD-95, 研究了SVZ区新生颗粒神经元的突触形成, 结果发现在特定的树突域中, 颗粒神经元突触的形成具有顺序性。基因标记第14天时, 近端树突域最先形成轴-树突触, 接收兴奋性谷氨酸能输入。第17天时, 远端树突域中形成树-树突触, 既能接收兴奋性谷氨酸能输入, 也能释放抑制性 γ -氨基丁酸能。同时, 基底树突域中也形成了谷氨酸能输入的轴-树突触。他们还进一步指出, 突触形成的顺序性可能是减少新生颗粒神经元功能性整合过程中对原有神经回路干扰的一种细胞机制。新生的球旁中间神经元也能与主体神经元建立有效的突触联系。将含突触后膜标记的慢病毒载体注入到小鼠SVZ区, 采用双光子延时成像技术观察脑内新生球旁中间神经元突触形成的动态过程, 发现新生的球旁中间神经元能与僧帽细胞和(或)簇绒细胞形成突触结构, 在形态成熟的过程中, 它们继续修正之间的突触连接, 并且会一直持续到新生神经元整合到神经回路中。同时, 嗅觉信息的输入可促进新生神经元的成熟和突触结构的形成^[25]。

4 病理状态下SVZ区的神经发生

中枢神经系统在受到不同程度的损伤时, 可以激活SVZ区的神经干细胞, 促进神经干细胞的大量增殖, 从而不断地产生新的神经元, 替代或修复受损的神经组织。已有研究表明, 脑缺血能够促进啮齿动物SVZ区细胞的增殖和神经发生, 而缺血诱导的神经发生并不是一个短暂的生命活动, 可至少持续4个月^[26]。最近的研究发现, 缺血还会促使成神

经细胞从同侧的SVZ迁移到受损的纹状体区,这种迁移路线的改变与缺血脑组织中巨噬细胞或小胶质细胞产生的骨桥蛋白相关^[27]。Hou等^[28]对缺血后新生神经元做了进一步的研究。他们在SD大鼠大脑中动脉阻塞前24 h时,向侧脑室注入含增强绿色荧光蛋白(EGFP)的逆转录病毒来标记分裂的细胞,发现脑缺血4周后迁移至受损纹状体区域的EGFP⁺细胞分化为两种神经元:GABA能神经元(EGFP⁺-NeuN⁺-GAD₆₇⁺)和类胆碱能神经元(EGFP⁺-MAP-2⁺-ChAT⁺)。随着时间推移,这两种类型的神经元可形成树突,产生动作电位,并与受损纹状体内的神经元建立突触联系。这说明脑缺血后SVZ区新生神经元能够功能性地整合到神经回路中,具有与正常情况下SVZ区神经发生相类似的过程。还有研究表明,FGF2可作为一种有效的丝裂原,促进缺血后SVZ区神经干细胞的增殖和分化,有助于修复受损的脑组织^[29]。

神经系统退行性疾病也会影响脑内SVZ区的神经发生。Batista等^[30]在亨廷顿舞蹈病(HD)R6/2小鼠模型中,观察到病变后SVZ区干/祖细胞增殖显著增加,细胞增殖能力与疾病症状的严重程度呈正相关。将模型小鼠脑内诱导增殖的神经干细胞在体外进行传代,它们可以保持干细胞的增殖特性,而取自症状发生前的神经干细胞在体外传代中却不能进行增殖。同时,病变后小鼠脑内成神经细胞的迁移路线也发生了改变,它们沿RMS迁移至受损的纹状体部,而不是嗅球处。在6-羟多巴胺制备的进行性帕金森病(PD)大鼠模型中发现,与假损伤组相比,病变3~28 d后,在病变同侧的SVZ区、纹状体、中脑内BrdU免疫阳性细胞显著增加,且纹状体内广泛分布着BrdU⁺/GFAP⁺细胞,但未检测到新生神经元以及神经发生现象^[31]。这些内源性祖细胞并未分化为神经元,推测局部微环境的改变是诱导这些内源性神经祖细胞定向分化为多巴胺能神经元的重要因素,进而取代PD患者脑内退化的神经元。

5 展望

成年哺乳动物脑内存在着神经发生,这个发现改变了我们长期以来认为的神经系统不能再生的观点。通过在啮齿类动物中的研究,对成年鼠脑内神经干细胞及神经发生的机理取得了一些重大的发现,但还远远不够清楚。随着科学技术的进步以及实验方法的改进,进一步揭示在正常和病理情况下的神经发生过程的内外机制及其变化特性是神经科

学领域及神经干细胞研究领域的重要使命,也是人类更好地战胜神经系统疾病的重要步骤和希望所在,有着重要的临床和科学研究意义。相信通过全世界同行的不懈努力,我们一定会进一步取得令人鼓舞的成果。

[参 考 文 献]

- [1] Alonso M, Ortega-Pérez I, Grubb MS, et al. Turning astrocytes from the rostral migratory stream into neurons: a role for the olfactory sensory organ. *Neuroscience*, 2008, 28(43): 11089-102
- [2] Zhao CM, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 2008, 132(4): 645-60
- [3] Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 1999, 96(1): 25-34
- [4] Duan X, Kang EC, Liu CY, et al. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*, 2008, 18(1): 108-15
- [5] Doetsch R, Caille I, Lim DL, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 1999, 97(6): 703-16
- [6] Lai B, Mao XO, Chang SY, et al. Electrophysiological properties of subventricular zone cells in adult mouse brain. *Brain Res*, 2010, 1340: 96-105
- [7] Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 2007, 317(5836): 381-4
- [8] Basak O, Taylor V. Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(6): 1057-72
- [9] Coskun V, Wu H, Bianchi B, et al. CD133⁺ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(3): 1026-31
- [10] Danilov AI, Gomes-Leal W, Ahlenius H, et al. Ultrastructural and antigenic properties of neural stem cells and their progeny in adult rat subventricular zone. *Glia*, 2009, 57(2): 136-52
- [11] Chehrehasa F, Meedeniya AC, Dwyer P, et al. EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system. *J Neurosci Methods*, 2009, 177(1): 122-30
- [12] Zeng CB, Pan FH, Jones LA, et al. Evaluation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine staining as a sensitive and reliable method for studying cell proliferation in the adult nervous system. *Brain Res*, 2010, 1319: 21-32
- [13] Tavazoie M, Vekken LV, Silva-Vargas V, et al. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(3): 279-88
- [14] Sum JQ, Sha B, Zhou WH, et al. VEGF-mediated angiogenesis stimulates neural stem cell proliferation and differentiation in the premature brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 394(1): 146-52
- [15] Frinchi M, Bonomo A, Trovato-Salinaro A, et al. Fibroblast growth factor-2 and its receptor expression in proliferating precursor cells of the subventricular zone in the adult rat brain. *Neurosci Lett*, 2008, 447(1): 20-5

- [16] Palma V, Lim DA, Dahmane N, et al. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*, 2005, 132(2): 335-44
- [17] Wang XM, Mao XO, Lin X, et al. Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain *in vivo*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(10): 1644-54
- [18] Hack I, Bancila M, Loulier P, et al. Reelin is a detachment signal in tangential chain migration during postnatal neurogenesis. *Nat. Neurosci*, 2002, 5(10): 939-45
- [19] Saghatelian A, de Chevigny A, Schachner M, et al. Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 2004, 7(4): 347-56
- [20] Nieman BJ, Shyu JY, Rodriguez JJ, et al. *In vivo* MRI of neural cell migration dynamics in the mouse brain. *Neuroimage*, 2010, 50(2): 456-64
- [21] LIedo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci*, 2008, 31(8): 392-400
- [22] Petreanu L, Alvarez-Buylla A. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*. 2002, 22, (14): 6106-13
- [23] Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, et al. Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci*. 2003, 23(32): 10411-8
- [24] Kelsch W, Lin CW, Lois C. Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(43): 16803-8
- [25] Livneh Y, Feinstein N, Klein M, et al. Sensory input enhances synaptogenesis of adult-born neurons. *J Neurosci*, 2009, 29(1): 86-97
- [26] Thored P, Arvidsson A, Cacci E, et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 739-47
- [27] Yan YP, Lang BT, Vemuganti R, et al. Osteopontin is a mediator of the lateral migration of neuroblasts from the subventricular zone after focal cerebral ischemia. *Neurochem Int*, 2009, 55(8): 826-32
- [28] Hou SW, Wang YQ, Xu M, et al. Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain. *Stroke*, 2008, 39(10): 2837-44
- [29] Sum JQ, Sha B, Zhou WH, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in neonatal rats after ischemic brain injury. *Brain Dev*, 2009, 31(5): 331-40
- [30] Batista CM, Kippin TE, Willaime-Morawek S, et al. A progressive and cell non-autonomous increase in striatal neural stem cells in the Huntington's disease R6/2 mouse. *J Neurosci*, 2006, 26(41): 10452-60
- [31] Aponso PM, Faull RL, Connor B. Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2008, 151(4): 1142-53