

人胚胎干细胞定向分化为神经前体细胞

李彬^{1,2}, 陈洪伟^{1,2}, 胡智兴^{1,2}, 谭韬^{1,2}, 金立方^{1,2}, 王淑芬^{1,2}, 季维智^{1,*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南省动物生殖生物学重点实验室, 云南 昆明 650223;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 采用单层贴壁分化的方法在无血清条件下诱导同源饲养层培养的人胚胎干细胞定向分化, 得到了高比例的神经前体细胞 (97.5 ± 0.83)% ($P < 0.05$)。这些神经前体细胞具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力。在长期的传代培养中发现, 随着培养时间的延长, nestin 阳性的神经前体细胞比例下降, 同时发育能力也发生了变化。在传代培养的早期, 神经前体细胞发育为神经元的比例很高, 几乎没有胶质细胞分化出来。随着培养时间的延长, 胶质细胞的比例逐渐上升。这与体内神经系统的发育过程非常相似。进一步研究发现具有 bHLH (basic helix-loop-helix) 结构域的转录因子 neurogenein2 (Ngn2) 和 Olig2 可能在这一变化中起重要作用。因此, 人胚胎干细胞来源的神经前体细胞能够模拟体内神经发育的模式, 为在体外研究人的神经发育和再生医学奠定了基础。

关键词: 人胚胎干细胞; 分化; 神经前体细胞

中图分类号: Q813; Q256

文献标识码: A

文章编号: 0254–5853 (2007) 03–0311–09

Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Neural Progenitors

LI Bin^{1,2}, CHEN Hong-wei^{1,2}, HU Zhi-xing^{1,2}, TAN Tao^{1,2},
JIN Li-fang^{1,2}, WANG Shu-fen^{1,2}, JI Wei-zhi^{1,*}

(1. Yunnan Key Laboratory for Animal Reproductive Biology, Kunming Institute of Zoology,

the Chinese Academy of Science, Kunming 650223, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: Human embryonic stem cells (hES), derived from the inner cell mass of the pre-implantation embryo, may serve as a valuable experimental tool for early human neurogenesis, due to their capacity for multipotency and self-renewal. They may also provide an unlimited cell source for cell replacement therapy. Neural progenitors differentiated from hES cells have considerable therapeutic potential for use in drug screening studies, or cell-based therapies for neurodegenerative diseases, because of their ability to generate defined neuronal cell types. However, for clinical application, generating a highly purified and homologous population of neural progenitors from hES cells without contamination remains a challenge. In this study, we identified an adherent culture system for efficiently differentiating neural progenitors from hES cells, cultured on homogenous feeder layers. These neural progenitors can differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes. During prolonged propagation, similar to *in vivo* embryonic neural progenitors, the differentiation potential of the neural progenitors shifts from neuronal to glial fate. We demonstrated that the proneural transcription factor neurogenein2 (Ngn2), and the basic helix-loop-helix transcription factor Olig2, are critical to the transition from neurogenesis to gliogenesis. Therefore, neural progenitors derived from hES cells can mimic the developmental pattern of the central nervous system and provide options for regeneration medicine.

Key words: Human embryonic stem cell; Differentiation; Neural progenitors

胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ES cells) 来源于植入前胚胎的内细胞团, 具有自我更新能力

和发育全能性, 能够在体内外分化为代表三个胚层的细胞类型 (Evans et al, 1981; Thomson et al,

* 收稿日期: 2006–12–12; 接受日期: 2007–02–01

* 通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0871–5139413, E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn

1998; Reubinoff et al, 2000)。Thomson et al (1998)建立了第一株人胚胎干细胞系(hES细胞),使胚胎干细胞由实验室研究向临床应用迈进了一大步,此后,hES细胞的研究取得了突飞猛进的发展。尽管面临许多伦理上的争议,但是hES细胞在未来再生医学方面的应用前景正吸引着越来越多的科学家。hES细胞的体外分化为研究胚胎早期发育的细胞和分子机制提供了良好的模型,也可对未来临床上的移植治疗提供供体细胞来源。由于许多神经系统的病理学损伤,如痴呆、癫痫或神经退行性疾病,如帕金森症、阿尔茨海默氏症等疾病目前只能通过药物来防止病情的恶化,而没有根治的疗法。因此,将功能性的神经细胞移植入体内可能给这些疾病的治疗带来希望。移植能够产生多巴胺的神经细胞治疗帕金森症是细胞替代治疗神经系统疾病的最早尝试(Kordower et al, 1995);而神经前体细胞不仅能够自我更新和分化为所有类型的神经细胞,而且能够迁移并整合到中枢神经系统的受损部位,因此,利用多能性的神经前体细胞修复脑和脊髓的损伤则是细胞替代性治疗的巨大前景。由ES分化得到的神经前体细胞要应用于临床必需满足几个条件:供体细胞来源充足、纯度高、无污染。

目前,关于hES细胞定向诱导分化为神经细胞的研究报道较多,采用的分化方法大致可分为三种:一是类胚体EB(embryoid bodies)法。ES细胞在去除了维持干细胞特性的因子之后自发形成包含三个胚层细胞类型的聚集体EB,然后用特定的选择性培养基使神经细胞增殖(Carpenter et al, 2001; Reubinoff et al, 2001; Schuldiner et al, 2001; Zhang et al, 2001)。这种方法基于细胞的自发分化,随机性大。EB包含三个胚层的细胞类型,神经细胞往往被非神经细胞所包裹,且神经细胞的成熟程度不一致,纯度低。这些缺点都无法满足移植治疗的需要。二是与具有特殊诱导能力的细胞共培养(Zeng et al, 2004)。某些基质细胞(如PA6, MS5等)具有特殊的诱导ES细胞定向分化为神经细胞的能力,能够维持分化细胞的存活,因此,这个系统能够提供大量的成熟细胞。然而,由于饲养层诱导细胞分化的机制还不清楚,而且分化产物不可避免地受到饲养层不明成分的污染,这样就对进一步研究分化过程中的信号通路等基础问题不利。三是使胚胎干细胞直接黏附在细胞外基质上,在特定的诱导因子作用下使之定向分化(Ying et al, 2003;

Gerrard et al, 2005; Shin et al, 2006)。这种新方法不采用血清,不使用条件培养基,也没有形成多细胞的聚集体,这样省去了筛选的步骤就能得到高比例的神经前体细胞,同时细胞产物没有受到外源成分的污染,为进一步应用于临床提供了可能,也为研究神经细胞分化的分子机制搭建了一个平台。

本实验用同源饲养层培养的hES细胞在单层培养条件下,高效地分化得到了神经前体细胞。这种神经前体细胞具有多能性,具有与体内神经发育相似的模式和基因表达变化。

1 材料与方法

1.1 材料

hES细胞BG02购于美国BresaGen公司。

人成纤维细胞HAFi (immortalized human adult fibroblast)由美国约翰霍普金斯大学医学院赠送,来源于转端粒酶基因的成年人乳腺皮肤成纤维细胞ccd-1087sk。

1.1.1 试剂和培养基 BG02 hES细胞无血清培养基: 80% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12 (1:1) (Invitrogen), 20% KnockOut Serum Replacement (KSR) (Invitrogen), 2 mmol/L L-谷氨酰胺 (Sigma), 0.1 mmol/L β -巯基乙醇 (Sigma), 1% 非必需氨基酸 (Invitrogen), 50 U/mL 青霉素, 50 μ g/mL 链霉素 (Invitrogen), 4 ng/mL Basic fibroblast growth factor (bFGF) (Sigma)。

HAFi细胞培养基: 90% Minimum Essential Medium (MEM) (Hyclone), 10% 胎牛血清 (Hyclone), 2 mmol/L L-谷氨酰胺 (Glutamine), 1% 非必需氨基酸 (Invitrogen), 1% 丙酮酸钠 (Sigma), 50 U/mL 青霉素, 50 μ g/mL 链霉素 (Invitrogen)。

神经前体细胞基础培养基 (NPM): 50% DMEM/F12 (1:1), 50% NeuroBasal Medium (Invitrogen), 1% N2 supplement (Invitrogen), 1% B27 (Invitrogen), 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 50 U/mL 青霉素, 50 μ g/mL 链霉素 (Invitrogen)。

细胞外基质: Extracellular matrix gel (ECM GEL) (Sigma); 0.5% Gelatin (Sigma); 20 μ g/mL Laminin (Sigma); Poly-L-lysine (Sigma)。

实验中所使用的一抗有: ES Cell Marker Sample Kit [SSEA1 (1:50), SSEA3 (1:50), SSEA4 (1:50), TRA-1-60 (1:50)] (Chemicon); 鼠抗人CK-7单克隆抗体 (Dako, 1:200); 鼠抗人nestin单克

隆抗体 (Chemicon, MAB5326, 1:200); 大鼠抗人 NCAM 单克隆抗体 (Biolegend, 1:100); 鼠抗人 β -tub III 单克隆抗体 (Chemicon, MAB1637, 1:200); 鼠抗鸡 A2B5 单克隆抗体 (Chemicon, MAB312R, 1:100); 兔抗牛 GFAP 多克隆抗体 (Chemicon, AB5804, 1:1000); 鼠抗牛 O4 单克隆抗体 (Chemicon, MAB345, 1:100) 等。二抗: FITC-conjugated 和 PE-conjugated 相应二抗均购于 Santa Cruz 公司。核染料 Hoechst33342。

1.2 方 法

1.2.1 hES 细胞的培养 hES 细胞 BG02 在丝裂霉素 (Sigma) 处理的小鼠饲养层上培养 23 代后, 用巴斯德管制成的玻璃针将胚胎干细胞集落分割成约 1 000 个细胞的小团块, 再将这些小团块转移至 γ 射线处理过的人成纤维细胞 HAFi 上继续培养, 机械法每 5—7 天传代。

1.2.2 细胞外基质铺板 细胞外基质 ECM GEL (Sigma) 以 1:30 溶于预冷的 DMEM/F12 中, 过夜, 使凝集物完全溶解, 室温放置 1 h 或 4℃ 过夜。吸出 ECM GEL, 用 DMEM/F12 清洗一次, 自然干燥, 备用。

0.5% Gelatin (Sigma) 37℃ 处理培养板 2 h。

20 μ g/mL Laminin (Sigma) 37℃ 处理培养板 2 h 或 4℃ 过夜。

PLL/Laminin 铺板: 细胞培养板先用 10 μ g/mL Poly-L-lysine (Sigma) 预处理 5 min, 吸出, 用无菌 PBS 清洗一次, 使表面自然干燥, 再用 20 μ g/mL Laminin 37℃ 过夜处理, 吸出 Laminin, 无菌 PBS 清洗一次, 备用。

1.2.3 hES 细胞向神经前体细胞诱导分化和体外扩增 将 hES 细胞集落机械地分割成约 1 000 个细胞的小团块, 再将这团块转移至用细胞外基质 ECM GEL 处理过的四孔板上贴壁培养, 培养基为 NPM 添加 100 ng/mL 重组人 noggin (Peprotech), 以及 20 ng/mL bFGF (Sigma)。对照组为 NPM 培养基, 不添加 noggin。培养约两周后, 实验组中, 集落中间开始出现神经上皮样结构 (neural rosettes), 此时用浓度为 0.05% 的胰酶 (Sigma) 将集落消化成单细胞, 然后接种在 PLL/laminin 处理的四孔板上, 扩增培养, 培养基为 NPM 添加 20 ng/mL bFGF (Sigma) 和 20 ng/mL EGF (Chemicon)。这些单细胞用 nestin 抗体进行染色, 结果为阳性的细胞即为神经前体细胞 NPCs。对这些 nestin 阳性的细胞进

行统计, 得出 NPCs 的分化率。

1.2.4 神经前体细胞的分化 为得到分化的神经细胞, 将 NPCs 以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种在 PLL/laminin 处理过的四孔板上, 以 NPM 培养基培养使其自发分化, 一周后用免疫细胞化学方法检测神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的分化比例。

1.2.5 免疫细胞化学 去除培养基, 用 PBS 冲洗细胞两次, 再用 4% 多聚甲醛室温下固定 10 min, PBS 冲洗 3 次, 然后加入 0.4% Triton X-100 (Sigma) 透膜 10 min, PBS 冲洗 3 次, 之后加入 5% 羊血清 (Sigma) 室温封闭 30 min。细胞孵育在一抗中, 4℃ 过夜, 用 PBS 冲洗 3 次, 然后加入相应的二抗, 室温孵育 30 min, 再用 PBS 冲洗 3 次。最后, 在 Hoechst 中孵育 5 min, 使细胞核着色。免疫标记的细胞在激光共聚焦扫描显微镜 (Zeiss, LSM 5105 META) 下进行检测。

1.2.6 RNA 提取和 RT-PCR 细胞总 RNA 采用 TRIZOL RNA (Invitrogen, 15596-026) 试剂盒提取, 操作方法参照试剂盒说明书。取样 NPCs 第 2、4、6、8、10、12 代细胞以及神经上皮 Neural Rosettes, 分别提取总 RNA, 在逆转录酶 (Takara) 作用下合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 以特定引物进行 PCR 扩增。扩增产物用 2% 琼脂糖 (Invitrogen) 凝胶电泳检测。PCR 引物序列、反应条件及产物片段大小见表 1。

1.2.7 实验数据的统计分析 实验重复 3 次, 统计数据以平均值 $\pm$ 标准误表示。统计分析采用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 视为有显著差异。

2 结 果

2.1 hES 细胞在同源饲养层 HAFi 上长期培养能够保持未分化的状态

以小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层, 以血清作为主要培养成分培养的 hES 细胞可能会受到小鼠饲养层来源的病毒、蛋白或血清中的不明成分污染, 如 Neu5Gc, 成为 ES 细胞临床应用的障碍 (Martin et al, 2005)。为排除干扰, 我们将在小鼠饲养层上培养 23 代的 hES 细胞 BG02 转移到同源饲养层 HAFi 上继续培养。结果表明, hES 细胞 BG02 在 HAFi 饲养层上传代培养 8 个月, 仍保持胚胎干细胞的各项表型特征和抗原特性: 细胞小而圆, 核质比高, 集落致密, 边界清晰。hES 细胞

Marker SSEA-1 呈阴性; SSEA3、SSEA-4、TRA-1-60 呈阳性 (图 1)。因此, 同源饲养层 HAFi 能够支持 hES 细胞的长期培养, 这样就从培养条件上避免了异源物质污染的可能性。

2.2 hES 细胞分化成神经前成体细胞

hES 细胞团块贴壁效率的高低是向神经前体细胞分化的第一步。将机械方法分割的 hES 细胞团块分别转移到细胞外基质 ECM GEL, Gelatin 和

Laminin 上包被的四孔板, 每组接种 3 孔, 每孔 50 个细胞团块, 待充分贴壁后, 统计贴壁率。结果显示, 细胞团块在 ECM GEL 上的贴壁率 ($77.3 \pm 4.73\%$) ($P < 0.05$), 高于另外两种胞外基质 Gelatin ($41.89 \pm 2.25\%$) ($P < 0.05$) 和 laminin ($40.44 \pm 1.97\%$) ($P < 0.05$)。可见, 选用 ECM GEL 作为初始分化的胞外基质是决定 hES 细胞向神经前体细胞分化的前提条件。

表 1 基因及引物序列
Tab. 1 Gene and primer sequences

基因名称 Gene	引物序列 Primer Sequence	退火温度 (°C) Annealing temperature	循环数 Cycle	产物片段 Product (bp)
Nestin	Forward: CGCTGGAGGAGCAGAATGAG Reverse: CCAGCGACGCTCTCCATGTGT	55	30	531
Olig2	Forward: AGGCACTGGCTTCAAGTCAGC Reverse: CCACTGCGCTTCATCTCCTCC	59	35	314
Ngn2	Forward: CGTAGACTGAAGGCCAACAAAC Reverse: CACTGCCTCGGAGAAGAGC	58.5	35	234
GAPDH	Forward: TGAAGGTCCGAGTCAACGGA Reverse: TGGTGCAGGAGGCATTGCTG	55	25	449

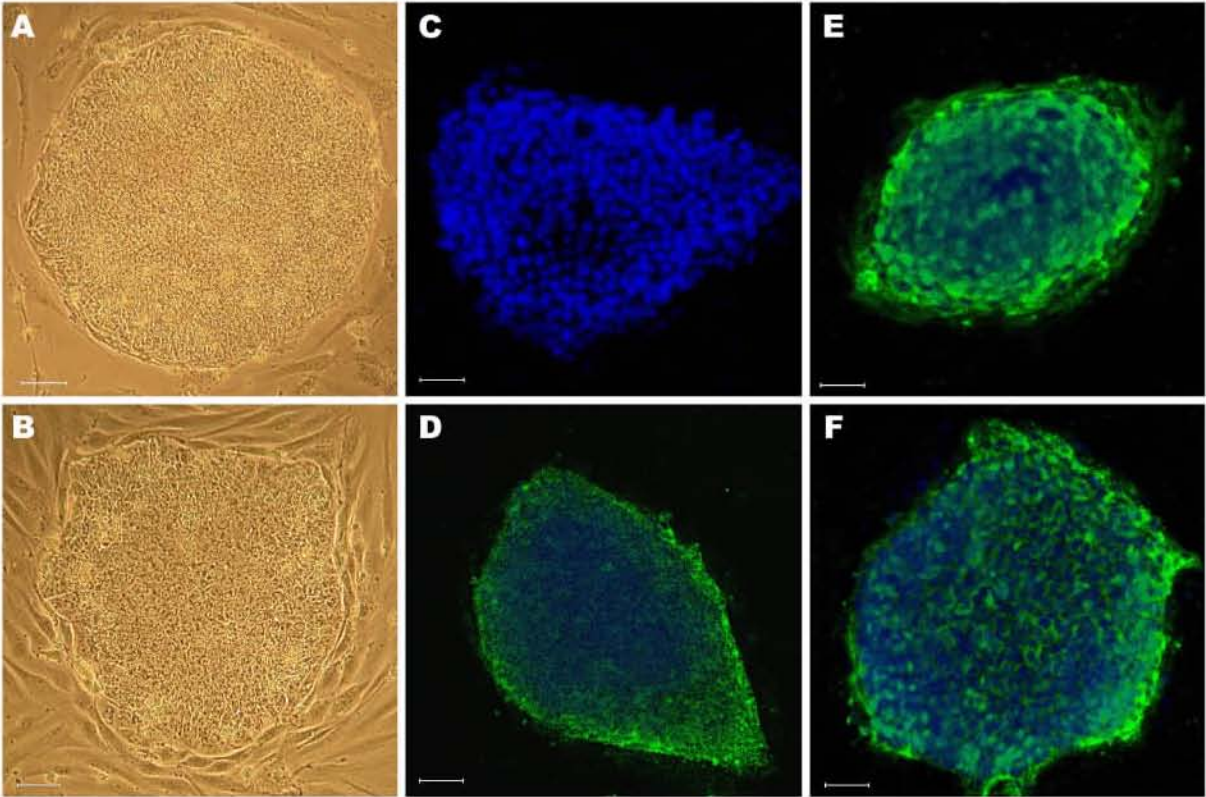


图 1 hES 细胞在小鼠饲养层和 HAFi 饲养层上的培养情况

Fig. 1 Cultured human embryonic stem cells on mouse embryonic fibroblast feeder and homologous feeder HAFi
A: hES 细胞培养在小鼠饲养层上 (Cultured human embryonic stem cells on mouse embryonic fibroblastfeeder); B: hES 细胞培养在饲养层 HAFi 上 (Cultured human embryonic stem cells on HAFi); C: SSEA-1; D: SSEA3; E: SSEA-4; F: TRA-1-60.
标尺 = 50 μm (Scale bars = 50 μm).

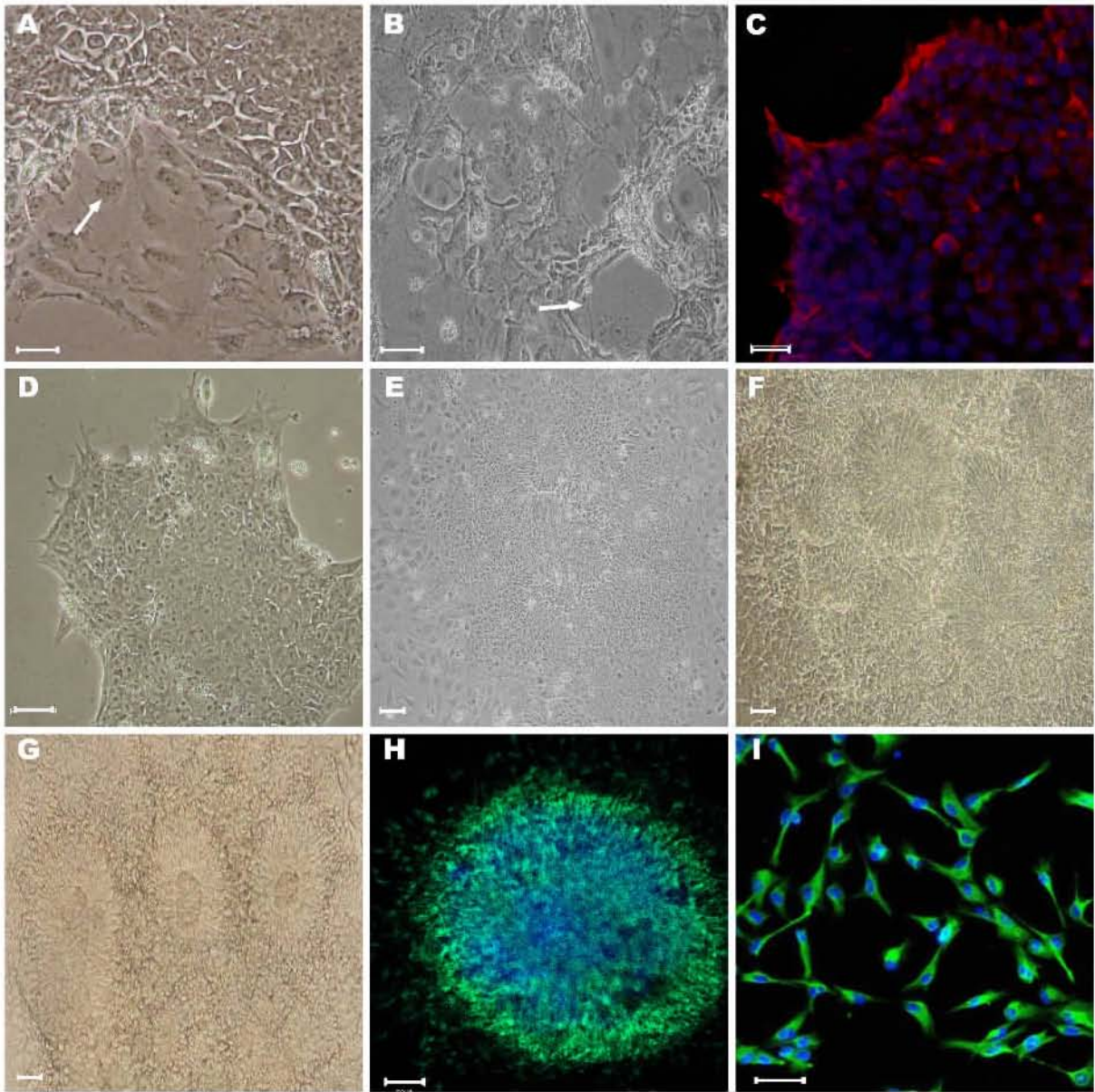


图 2 hES 细胞在单层培养体系中分化神经前体细胞

Fig. 2 Differentiation of hES cells to neural progenitors in adherent culture

A: 在没有 Noggin 的对照组中, hES 细胞集落开始变得扁平, 并有合胞体出现。箭头示分化的细胞形成的合胞体 (Differentiation of hES cells without Noggin. Arrow indicates syncytium);
B: 扁平的细胞迅速扩展, 出现充满液体的囊泡结构。箭头示分化细胞形成的囊状结构 (Flat cells expand rapidly and form fluid-filled cysts. Arrow indicates cysts);
C: 免疫染色呈 CK-7 阳性 [Immunostaining with CK-7 antibodies (red)];
D: 在添加 Noggin 的实验组中, hES 细胞集落的形态 (Differentiation of hES cells with Noggin);
E: 约 10 天的 ES 细胞分化状态 (approximately 10 days of differentiation);
F: 约两周的 ES 细胞分化状态, 有大量 Rosettes 结构出现 (approximately two weeks of differentiation, rosette structures);
G: 约两周的分化状态, 出现神经管样的结构 (at approximately 20 days, neural tube-like structures);
H: 免疫染色 Rosettes 呈 nestin 阳性 [Immunostaining with nestin antibodies on rosettes (green)];
I: nestin 阳性 (P1) [Immunostaining with nestin antibodies on Passage 1 cells (green)].
标尺 = 50 μm (Scale bars = 50 μm).

有研究表明, 在含有 bFGF 的无血清培养条件下, BMP-2 能够诱导 hES 细胞分化为滋养层细胞, 这些细胞呈扁平的上皮样, 或形成充满液体的腔,

有合胞体出现, 并表达外胚层标记 cytokeratin (CK) 和 α -fetoprotein (AFP) 等蛋白 (Xu et al, 2002; Pera et al, 2004)。因此, 用 BMP 的拮抗剂

Noggin 来阻断 BMP 信号通路将有助于 hES 神经细胞分化。本实验, 在没有添加 noggin 的对照组中, 细胞集落在分化的第 4 天开始变得扁平, 出现囊泡状结构, 且有合胞体出现 (图 2A, 2B), 与滋养外胚层形态非常相似, 免疫细胞化学实验显示 CK-7 呈阳性 (图 2C)。在添加 Noggin 实验组中, hES 细胞集落开始仍保持胚胎干细胞的形态特征, 核质比高 (图 2D), 随着培养时间的延长, 集落不断扩大, 中间逐渐变得紧密, 细胞形态变成长条状 (图 2E)。约两周后, 集落中间出现神经上皮样的 Rosettes 结构, 细胞呈 Nestin 阳性 (图 2F, 2H)。继续培养 3—5 天 Rosettes 结构形成类似神经管样的结构 (图 2G)。将 Rosettes 用胰酶消化成单细胞后以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度接种在 pLL/laminin 处理过的

培养板上, 扩增培养。第二天待细胞完全贴壁后, 取部分细胞染色, 用激光共聚焦扫描显微镜拍照。以照片显示的阳性细胞数进行统计并计算分化率。3 次重复的实验结果显示, 有 $(97.5 \pm 0.83)\%$ ($P < 0.05$) 表达神经干细胞标记 nestin (图 2I), 但不表达早期神经元标记 NCAM, 胶质前体细胞标记 A2B5 和星形胶质细胞标记 GFAP。

继续培养神经前体细胞, 每 5 天以 1:3 传代。随着传代次数的增加和培养时间的延长, nestin 阳性的细胞数量逐渐减少, 到第 9 代 (约 45 天) 后, nestin 阳性细胞的比例已由开始的 $(97.5 \pm 0.83)\%$ ($P < 0.05$) 下降到 $(60.7 \pm 2.44)\%$ ($P < 0.05$)。

2.3 神经前体细胞的体外分化

将所得到的神经前体细胞以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种

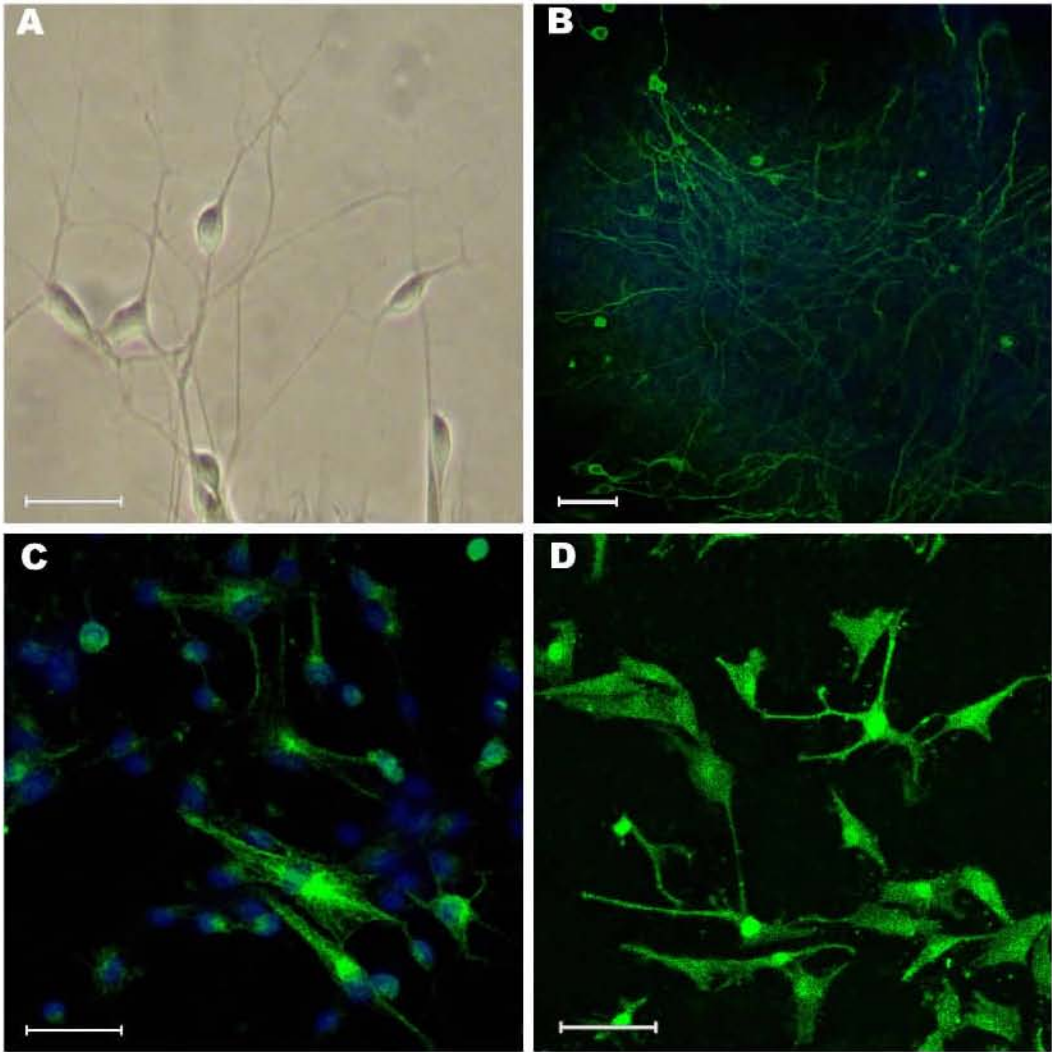


图 3 hES 细胞来源的神经前体细胞在体外分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞
Fig. 3 hES cell-derived neural progenitors differentiate *in vitro* into neurons, astrocytes and oligodendrocytes
A: 神经元 (neurons); B: β -tub III; C: GFAP; D: O4; 标尺 = $50 \mu\text{m}$ (Scale bars = $50 \mu\text{m}$).

在 pLL/laminin 处理过的培养板上，去除生长因子，以 NPM 培养基培养，使其自发分化，一周后分化得到的细胞用免疫细胞化学方法检测。结果显示，传代培养早期（P2）的神经前体细胞， β -tub III 阳性的神经元分化比例较高（ 81.74 ± 5.77 ）%（ $P < 0.05$ ）（图 3A、3B），没有 GFAP 和 O4 阳性的胶质细胞分化出来，而到 P6 开始有少量 GFAP 阳性的星形胶质细胞出现，在 P8 星形胶质细胞的分化达到高峰（ 85.64 ± 1.37 ）%（图 3C），而少量的 O4 阳性的少突胶质细胞直到 P10 才能观察到（图 3D）。几乎不再能检测到神经元的存在（图 4）。可见，hES 细胞来源的神经前体细胞能够在体外分化为神经系统的 3 种主要细胞类型，且随着培养时间的延长，分化能力由神经元向胶质细胞转换。

2.4 基因表达分析

神经前体细胞在体外长期传代的过程中，nestin 阳性的细胞比例逐渐下降，发育潜能也发生了由神经元向胶质细胞的转换。分析与神经发育相关的基因在长期培养中的表达变化将有助于我们研究这一现象。取神经上皮 Rosettes，P2、P4、P6、P8、P10、P12 的神经前体细胞提取总 RNA，以看家基因 GAPDH 的表达量作为参照，进行半定量 RT-

PCR 分析。结果显示，Nestin 的表达量随培养时间的延长逐渐下降；proneural 基因 Neurogenin2（Ngn2）的表达量呈下降趋势，P8 之后没有表达；转录因子 olig2 的表达量随培养时间的延长逐渐降低，而在 P12 又有相对较高的表达量（图 5）。

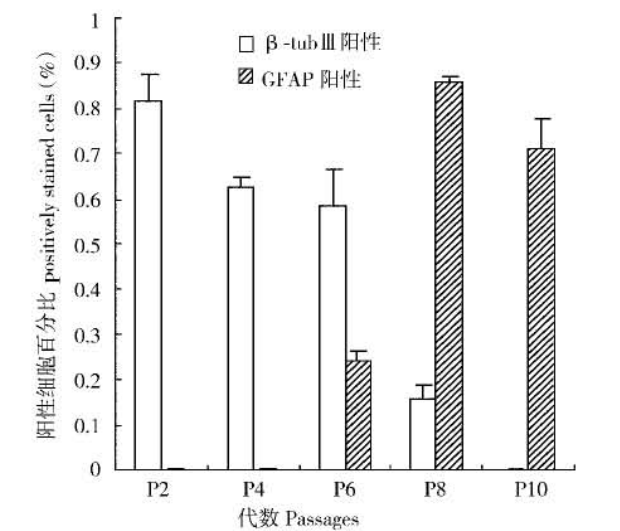


图 4 不同代数神经前体细胞分化为神经元与胶质细胞的比例
Fig. 4 The percentage of cells expressing β -tub III and GFAP at sequential passage of the neural progenitors

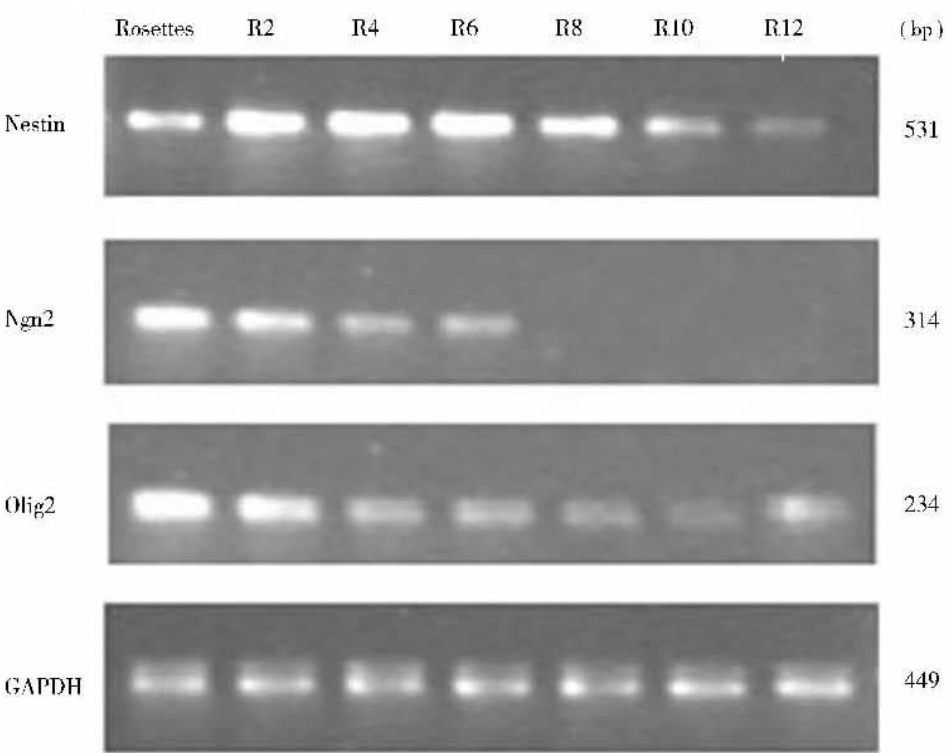


图 5 半定量 RT-PCR 分析不同代数神经前体细胞的基因表达变化
Fig. 5 Gene expression of neural progenitors by semi-quantitative RT-PCR

3 讨论

hES 细胞定向分化为神经前体细胞的研究不但可以提供神经系统发育的研究模型, 同时也可作为细胞替代性治疗提供可能的供体细胞来源。因此, 神经分化的研究具有重要的理论和实践意义。然而, 神经前体细胞要用于临床上的移植, 必须要有大量的稳定的细胞来源, 这就要求得到的神经前体细胞是高纯度的, 无污染的。本试验中, 我们采用无血清培养基和同源饲养层培养 hES 细胞, 在培养条件上避免了动物来源的污染; 在分化条件上, 成分确定的培养基和单层贴壁分化的方法, 为进一步研究神经细胞分化的分子机制等问题提供了平台。此外, 单层培养的分化方法, 细胞接触培养条件的机会均等, 分化有较高的同步性, 因此能够得到具有一致性的高比例的神经前体细胞。

细胞的贴壁是单层贴壁分化的第一步, 也是关键一步。细胞外基质的选择决定了细胞贴壁率的高低, 而细胞的培养和分化对细胞外基质的要求又有不同。ECM GEL 对细胞团块的贴壁率高。Flanagan et al (2006) 研究表明, 神经前体细胞表面表达整合素 $\alpha 6$, laminin 与其受体整合素 $\alpha 6$ 相互作用调节神经前体细胞的迁移、分化以及神经突起的扩展。因而, 在神经前体细胞的分化中, 我们选用 PLL/Laminin 作为细胞外基质, 不但保证了较高的贴壁率, 而且有利于神经前体细胞的分化。

本实验中, 由 hES 细胞分化得到的神经前体细胞是以单细胞形式传代培养的。神经前体细胞被消化为单细胞后, 存活率显著下降, 且持续培养约 30 天就可能有 GFAP 阳性的星形胶质细胞分化出来, 神经元分化能力很快失去。体外培养的神经前体细胞其培养方式影响了发育潜能的维持。Itsykson et al (2005) 报道, 以集落形式体外培养的神经上皮样细胞其神经元的分化能力可以持续到 25 周。由于集落中间的细胞致密, 细胞之间相互作用较强, 使得集落中间的细胞能够较长时间保持早期神经上皮细胞的特性, 而外周的细胞则容易分化, 这样所得到的细胞既含有神经前体细胞也同时含有神经元和胶质细胞, 甚至同种细胞处于不同的成熟状态。因此, 传代培养的方式可能影响了神经前体细胞的分化。

随着培养时间的延长和传代次数的增加, 神经前体细胞 Nestin 的表达量逐渐下降, Nestin 阴性的

细胞却没有检测到分化细胞的表面抗原, 如 β -tub III、A2B5、GFAP 等。由此推测, 体外长期培养过程中, 在胞内信号分子的作用下, 这些 nestin 阳性的细胞可能不断失去前体细胞的特性而表现为某种过渡的细胞类型, 而这些过渡类型的细胞尚未表达成熟神经细胞的抗原。

在体内, 早期的神经发生 (neurogenesis) 经历 3 个阶段: (1) 神经前体细胞的增殖 (proliferation); (2) 神经元发生 (neuronogenesis); (3) 胶质细胞发生 (gliogenesis)。神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞在特定的发育阶段顺序产生。即使在有胶质细胞的诱导因子存在下, 早期的神经前体细胞也不能直接分化产生胶质细胞。外源因子只能在特定时间影响特定的细胞早熟或延迟其分化, 而不能改变细胞的命运决定 (Sauvageot et al, 2002; Morrow et al, 2001)。我们的实验结果与体内胚胎神经前体细胞的发育过程以及前人的研究结果相吻合 (Sauvageot et al, 2002; Colognato et al, 2004; Shen et al, 2006; Itsykson et al, 2005)。早期神经前体细胞 (P2) 分化为神经元的比例很高 ($81.74 \pm 5.77\%$) ($P < 0.05$), 几乎没有胶质细胞分化出来, 而到了后期 (P6), 神经元分化能力减弱而胶质细胞的分化则逐渐占据优势。

关于神经发生的机理目前还没有一致的结论, 在中枢神经系统发育过程中, 这一过程可能受到生长因子信号通路和下游转录因子的相互竞争。目前认为 proneural 转录因子 Ngn2 和含有 basic helix-loop-helix transcription (bHLH) 的转录因子 Olig 决定了神经元和胶质命运的转换以及神经元亚类的特化。在皮层发育的早期, proneural 基因 Ngn2 高表达, 通过与共同激活子相互作用促进神经元发生; 在皮层发育后期, Ngn2 的表达量下降, 受 Ngn2 和 Olig2 共同抑制的星形胶质细胞分化出来 (Britz et al, 2006), Zhou et al (2002) 的组合编码 (combinatorial code) 模型展示了神经元和胶质细胞如何来源于共同的前体细胞。他们认为在神经发育的早期, Olig 和 proneural 基因同时开启, 神经前体细胞特化为运动神经元 (motoneuron); 若 Olig 基因关闭, 而 proneural 基因开启则特化为中间类型神经元 (interneuron); 两个基因同时关闭神经前体细胞则特化为星形胶质细胞; 在神经发育的晚期, Olig 基因开启, 而 Proneural 基因关闭, 则少突胶质细胞分化。我们的实验结果与体内神经发生过程

中的基因表达模式相似。Ngn2 在早期的神经前体细胞中高表达,与 Olig2 共同调控了神经元的发生,随后表达量逐渐下降,神经元的分化能力也逐渐下降,同时受 Ngn2 和 Olig2 抑制的星形胶质细胞分化出来,而在少突胶质细胞分化的后期 Olig2 则起了主要作用。由此可见,受 Ngn2 和 Olig2 的共同调控,神经前体细胞在体外的长期传代培养中逐渐失去早期神经干细胞的多能性,而成为某种命运决定的祖细胞,从而发生了由神经元向胶质细胞

的命运转换。

总之,中枢神经系统发育是在许多复杂的生长因子及信号通路的共同作用下完成的,神经细胞分化的分子机制非常复杂,还有待进一步的研究。我们的实验在一定程度上反映了来源于 hES 细胞的神经前体细胞能够模拟体内神经系统发育的模式和基因表达 Patterning,从一个侧面解释了分化命运的转换,可能为研究命运决定的分子机制和神经前体细胞的潜在应用提供参考。

参考文献:

- Britz O, Mattar P, Nguyen L, Langevin LM, Zimmer C, Alam S, Guillemot F, Schuurmans C. 2006. A role for proneural genes in the maturation of cortical progenitor cells [J]. *Cerebral Cortex*, **16** (Supl.): i138-i151.
- Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. 2001. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells [J]. *Exp Neurol*, **172**: 383-397.
- Colognato H, Ffrench-Constant C. 2004. Mechanisms of glial development [J]. *Curr opin Neurobiol*, **14**: 37-44.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos [J]. *Nature*, **292**: 154-156.
- Flanagan LA, Rebaza LM, Derzic S, Schwartz PH, Monuki ES. 2006. Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins [J]. *Neurosci Res*, **83** (5): 845-856.
- Gerrard L, Rodgers L, Cui W. 2005. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling [J]. *Stem Cells*, **23**: 1234-1241.
- Itsykson P, Ilouz N, Turetsky T, Goldstein RS, Pera MF, Fishbein I, Segal M, Reubinoff BE. 2005. Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin [J]. *Mol Cell Neurosci*, **30** (1): 24-36.
- Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, Smith DA, Nauert GM, Perl DP, Warren Olanow G. 1995. Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease [J]. *N Engl J Med*, **332** (17): 1118-1124.
- Martin MJ, Muotri A, Gage A, Varki A. 2005. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid [J]. *Nat Med*, **11** (2): 228-232.
- Morrow T, Song MR, Ghosh A. 2001. Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors [J]. *Development*, **128**: 3585-3594.
- Pera MF, Andrade J, Houssami S, Reubinoff B, Trounson A, Stanley EG, Waed-van Oostwaard D, Mummery C. 2004. Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin [J]. *J Cell Sci*, **117**: 1269-1280.
- Reubinoff B, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro [J]. *Nat Biotechnol*, **18**: 399-404.
- Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T. 2001. Neural progenitors from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, **19**: 1134-1140.
- Sauvageot CM, Stiles CD. 2002. Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis [J]. *Curr Opin Neurobiol*, **12**: 244-249.
- Schuldiner M, Eigens R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, Benvenisty N. 2001. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Brain Res*, **913**: 201-205.
- Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, Lemischka IR, Ivanova NB, Stifani S, Morrissey EE, Temple S. 2006. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells [J]. *Nat Neurosci*, **9** (6): 743-751.
- Shin S, Mitalipova M, Noggle S, Tibbitts D, Venable A, Rao R, Stice SL. 2006. Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions [J]. *Stem Cells*, **24**: 125-138.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. *Science*, **282**: 1145-1147.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 7844-7848.
- Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA. 2002. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast [J]. *Nat Biotechnol*, **20**: 1261-1264.
- Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. 2003. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monolayer [J]. *Nat Biotechnol*, **21**: 183-186.
- Zeng XM, Cai JL, Chen J, Luo YQ, You ZB, Fotter E, Wang Y, Harvey B, Miura T, Backman C, Chen GJ, Rao MS, Freed WJ. 2004. Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, **22**: 925-940.
- Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. 2001. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, **19**: 1129-1133.
- Zhou Q, Anderson DJ. 2002. The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification [J]. *Cell*, **109**: 61-73.

“遗传学进步与人口健康高峰论坛”征文通知

人口健康是关乎国计民生的重大战略问题。进入 21 世纪以来,遗传学及基因组学的巨大进步,为人口健康研究带来了空前的机遇,提供了强有力的科技支撑。为了交流人类与医学遗传学领域的新技术、新方法、新成果、新进展,定于 2007 年 11 月 17—20 日在昆明举办“遗传学进步与人口健康高峰论坛”。

主办单位: 中国遗传学会、中华医学会医学遗传学分会、中国科学院遗传与发育生物学研究所

协办单位: 中国医学科学院医学生物学研究所、中国科学院昆明动物研究所、云南大学生命科学学院

承办单位: 中国科学院遗传与发育生物学研究所《遗传学报》《遗传》编辑室

大会名誉主席: 刘德培院士

大会主席: 张亚平院士、贺林院士

大会执行主席: 薛勇彪教授、金力教授

大会筹备组: 褚嘉祐、安锡培、张学、肖春杰、李绍武

大会征文: 大会将邀请国内外著名专家学者进行学术交流,并从征文中遴选优秀论文作者作学术报告,征文送审后视学术水平分别在 2007 年第 11 期《遗传学报》、第 11 期《遗传》和 2007 年《遗传》增刊集中发表。征文范围包括下列领域有创新性的研究论文、文献综述和技术方法等。

- (1) 医学遗传学: 孟德尔遗传病, 复杂性状疾病, 表观遗传学, 疾病基因定位与克隆;
- (2) 临床遗传学: 产前诊断与遗传咨询, 细胞遗传学, 生化遗传学, 植入前遗传学诊断;
- (3) 发育遗传学: 干细胞, 转基因动物与动物克隆, 模式动物遗传学;
- (4) 群体遗传学与遗传多样性: 遗传流行病学, 进化遗传学, 遗传多样性, 法医遗传学, 生物信息学;
- (5) 转化基因组学: 基因诊断与基因治疗, 蛋白质组学;
- (6) 医药生物技术, 药物遗传学与药物基因组学, 生物反应器;
- (7) 肿瘤遗传学与遗传毒理学;
- (8) 病原微生物遗传学与基因组学;
- (9) 遗传伦理学, 医学遗传学教学与遗传教育。

征文中英文均可, 篇幅不限, 均须附中英文摘要, 中文稿的图表和中文参考文献须英文对照。写作格式参考 2007 年《遗传》杂志, <http://www.chinagene.cn/yc/index.asp>。征文请用电子邮件附件发送到《遗传》编辑部, E-mail: yczz@genetics.ac.cn; 邮件主题“论坛征文”。征文截止日期: 2007 年 9 月 1 日。

参会报名: 无论是否参加征文, 均请通过网站报名: <http://www.chinagene.cn/xshy.asp>

参会费用: 2007 年 8 月 31 日之前注册交费, 每人 700 元 (学生 500 元); 9 月 1 日—10 月 31 日注册交费, 每人 800 元 (学生 600 元); 大会现场注册交费, 每人 900 元 (学生 700 元)。交通及住宿费用自理。

参展费用: 每个展位 5000 元。

会议联系人: 《遗传学报》《遗传》编辑部 李绍武 (征文/报名) E-mail: yczz@genetics.ac.cn;

张艳 (注册费/发票) zhangyan@genetics.ac.cn; 电话/传真: 010-64889354。

中国遗传学会

2007 年 4 月 26 日