

## • 专题研究 •

## 成体哺乳动物脑内的神经发生及其调节

李学坤 左萍萍\*

[关键词] 哺乳动物; 大脑; 神经发生; 调节; 综述

中图分类号: R741.05 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2003)07-0401-04

“成年哺乳动物的中枢神经系统不存在神经发生”一直是神经科学界的权威性观点。尽管从 20 世纪 60 年代开始, Altman 等开始此方面的研究, 由于客观条件的限制, 未能提出强有力的证据挑战这一传统观点。随着技术和研究手段的进步, 1992 年, Reynolds 和 Weiss 首先从成年小鼠纹状体分离得到了能够在体外分裂, 并可以分化为神经细胞和星形胶质细胞的神经干细胞(neural stem cell, NSC)。神经干细胞增殖、存活和分化的过程称为神经发生(neurogenesis)。

1 哺乳动物脑内的神经发生<sup>[1-2]</sup>

在胚胎发育过程中, 神经干细胞最初位于脑室区, 后逐渐定位于侧脑室的脑室下区(subventricular zone, SVZ), 因而 SVZ 区终生保持着旺盛的有丝分裂能力。一般认为, 成年哺乳动物脑内来源于神经干细胞的神经发生限于侧脑室的脑室下区和海马齿状回的颗粒下区(subgranular zone, SGZ)。

SVZ 的增殖性细胞分布在侧脑室边缘, 特别是前角区。该区新生的细胞沿嘴侧迁移流迁移到嗅球, 分化为抑制性的中间神经元。即便在嗅球切除后, SVZ 区神经前体细胞的增殖和迁移依然存在, 表明反馈调节作用并不明显。尽管 SVZ 区干细胞的特征还不十分明确, 电镜观察显示该区的干细胞至少可分为 3 类: A 型为持续增殖的成神经细胞; B 型为 GFAP 阳性的星形胶质样细胞; C 型数量最少但增殖最活跃。海马齿状回的新生细胞则迁移到颗粒细胞层, 最终具有颗粒细胞的表型特征。但也有学者认为, 室管膜区存在 NSC, 但海马齿状回仅存在限制性的祖细胞(restricted progenitors)。

1.1 脑室下区<sup>[3-8]</sup> SVZ 区位于侧脑室的侧壁, 已证明该区终生存在可增殖细胞。拮抗骨形态发生蛋白(BMP)的信号转导能够促进胚胎和成年时期的神经发生。室管膜细胞表达 Noggin 蛋白, 该蛋白能够阻止 BMP 的信号转导过程。当 Noggin 缺失时, BMP 促进胶质发生胜过神经发生。

<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶和 BrdU 标记实验均表明, 该区的新生细胞沿嘴侧迁移流迁移到嗅球, 并分化为抑制性中间神经元。在鼠类, 大约需要 2—6 天的时间完成这段长约 8 mm 的距离。这些迁移的神经元前体细胞称为 A 型细胞, 它们形成了迁移链, 而无需轴突或放射状胶质的引导。该结构被 GFAP<sup>+</sup> 的 B 型细胞包盖住。B 型细胞又分为与室管膜接触的 B1 型和不接触的 B2 型。

A 型细胞呈 nestin、TuJ1 和 PSA-NCAM 阳性。PSA-NCAM 对于迁移非常重要。在 PSA 缺失和被降解的小鼠细胞迁移受损, 而且嗅球变小。SVZ 区至少还存在其他两种细胞: C 型和脑室凹内的 E 型细胞。目前, 对 SVZ 区的哪种细胞是产生 A 型细胞的多能干细胞有很大争议。

1.2 海马齿状回<sup>[9-10]</sup> (Dentate gyrus of hippocampus)

海马齿状回的神经发生可分为 3 个时相: ①位于海马门区和颗粒细胞层的神经前体细胞开始分裂; ②新生细胞开始向颗粒细胞层迁移, 并长出突起。这一阶段的标记物为 PSA-NCAM 和 Doublecortin; ③细胞整合到颗粒细胞层并表达神经细胞标志NSE。需要指出的是海马 DG 区的神经发生随年龄增加而降低。

Praag 等把表达绿荧光蛋白的逆转录病毒注射到成年小鼠的海马齿状回, 免疫组织化学和海马脑片的电生理实验均证实, 表达绿荧光蛋白的细胞具有神经细胞的形态, 不仅呈神经细胞特异性标志阳性, 而且还有被动膜反应特性, 动作电位和功能性突触传入。

## 2 神经发生的调节

2.1 增殖水平的调节<sup>[11-15]</sup> 已证实存在几种相互作用调节细胞分裂的信号途径。不同的生长因子在不同的发育阶段作用于干细胞。早期的神经干细胞仅对碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)产生反应, bFGF 及其受体的丢失都会导致干细胞增殖的显著降低。迟后出现的神经干细胞则对 bFGF、表皮生长因子(EGF)都起反应。分化能力更为定向的前体细胞如胶质前体细胞在 PDNF 或 FGF 作用下产生增殖, 而 Shh、NT-3 和 FGF 可使神经细胞前体细胞增殖。生长因子的这种促增殖作用受到在发育不同阶段而特异性表达的细胞外基质成分(如肝素多糖)的调节。在体外, LIF 刺激鼠

作者单位: 100005 北京市, 中国医学科学院、中国协和医科大学基础医学院药理学系。作者简介: 李学坤(1973-) 男, 山东省广饶县人, 博士, 研究方向: 神经干细胞与神经发生及药物干预。\* 通讯作者: 左萍萍。

胚胎神经嵴和脊髓神经干细胞的增殖。

细胞粘附分子是一类调控干细胞行为的重要信号蛋白。整合素是神经干细胞分泌的调节细胞增殖、迁移和分化的蛋白家族,整合素之间以及整合素与细胞外基质成分如纤联蛋白的结合而导致细胞内信号转导途径,如  $PI_3$  和 Akt 激酶的激活。

此外,神经递质也参与了该过程的调控。在发育早期,即发现有  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)和谷氨酸及其受体的表达。它们可能通过剂量依赖性地影响细胞内钙和 DNA 合成而发挥作用。而且,GABA 和谷氨酸促进脑室区神经干细胞的增殖,但对脑室下区的神经干细胞表现为抑制。NMDA 受体能够调节发育大脑的神经发生,该受体阻断剂 MK801 能够诱发齿状回祖细胞的增殖,并增加颗粒细胞层新生神经细胞的数量。通过损伤内嗅皮质而降低谷氨酸传入和 NMDA 受体激活也可以刺激齿状回细胞增殖。

其他有关的传导信号还有 cAMP 和 PKA 等。

**2.2 存活水平的调节** 实验表明,衰老不是减少祖细胞的数目,而是明显影响新生神经细胞的生存。新生成的神经细胞经过一段时间后只有部分得以存活,并迁移到相应脑区进行分化。目前研究认为,这些新产生的神经细胞也经历了凋亡和坏死过程。在发育早期,细胞凋亡(PCD)通过精细调控干细胞或前体细胞而影响终末分化细胞的数目。研究发现,PCD 的中心执行者 Caspase 家族成员 Caspase-3 和 Caspase-9 在 VZ 区的端脑都有分布。Caspase-3 激活可引起神经祖细胞的 PCD,反之,抑制 Caspase-3 可防止 PCD。需要指出的是,对成熟神经细胞 PCD 有重要作用的 bcl-X 和 Bax 对神经祖细胞并无作用,说明该家族的不同成员有着明确分工而在不同时期起作用。同时,这些凋亡分子在脑区分布上也有所不同。培养的大鼠 SVZ 区神经干细胞,MEK1 阻断剂可显著减少 nestin 阳性细胞数,并增加凋亡细胞数目。此外,LIF、CNTF 和 TGF- $\beta$  也都能促进 PCD。

时至今日,对于细胞的生存环境精确保持神经祖细胞的生存与死亡平衡的关键环节,仍不得而知。

**2.3 分化水平的调节**<sup>[16,17]</sup> 在神经干细胞生存的微环境(niche)中,多种细胞因子及相关的信号转导途径影响和调控神经干细胞的分化。Song 等的研究表明,来自神经元和星形胶质细胞的细胞因子能特异性地促进神经发生。但当神经干细胞分别与原代神经元和星形胶质细胞共同培养时,前者得到的神经元数量较对照组无明显改变,而后的神经元数量是对照组的 10 倍,显示星形胶质细胞特异性地促进神经发生。进一步实验证实,星形胶质细胞分泌的弥散性及膜绑细胞因子都对成年神经干细胞的发生过程产生重要影响。

NGF 不影响人端脑神经干细胞生成神经元或胶质细胞,而 PDGF 显著减少干细胞分化形成神经元。LIF 和 CNTF 均促进向星形胶质细胞的分化,而且二者同时存在时能使人干细胞分化形成的神经元数目提高 2 倍。单独使用 EGF 或 FGF-2 均可促进鼠类神经干细胞的增殖,但人的神经干细胞增殖两者必须同时存在。说明人与鼠类的神经干细胞特性存在较大差别。

在丝裂原 FGF-2 存在时,神经营养素并不能启动鼠海马神经干细胞的分化,BDNF 不增加 BrdU 阳性的细胞数;丝裂原撤掉后分别加入 NT-3 和 BDNF,发现在前 5 天,NT-3 和 BDNF 并不影响分化成的神经元数目,但可促进轴突生长。在第 10 天时,两者均明显促进向神经元的分化和生存。但 NT-3 更易增加谷氨酸神经元的数目,而 BDNF 主要增加 GABA 神经元的数量。膜片钳实验证实,分化的细胞之间形成了兴奋性和抑制性突触。

亲神经细胞的碱性螺旋-转角-螺旋蛋白(bHLH 蛋白)能够兴奋细胞周期,激活大量神经细胞分化基因的表达,这很可能是神经上皮细胞变为神经细胞的关键因素之一。

**2.4 神经发生的调节因素** 研究表明,青年鼠的每侧海马每天约产生 200—300 个细胞,其中约有 100—150 个存活,占海马齿状回全部神经细胞数目的 0.03%。成年动物脑内的神经发生受到多种因素的调节,包括生理因素和病理因素。促进神经发生的因素有丰富环境、生理活动(如奔跑、学习)、抗抑郁药、维生素 E 缺乏、生长因子(如 bFGF、BDNF、IGF-1)、能量限制、缺血等。抑制神经发生的有阿片类物质、衰老、应激和 5-羟色胺缺失等。此外,遗传背景、机械损伤和人为氧化应激诱导的凋亡也能影响神经发生。

**2.4.1 遗传背景**<sup>[18,19]</sup> 遗传背景从增殖、存活和分化 3 个水平影响海马区的神经发生。Gage 研究小组对 C57BL/6、BALB/c、CD1 和 129Sv/J 4 种品系小鼠海马齿状回的神经发生情况进行了比较。发现 C57BL/6 小鼠的增殖率最高,CD1 小鼠的新生细胞生存率最高。在 4 种品系小鼠中,大约 60% 的新生细胞都呈神经细胞表型,但 129Sv/J 的星形胶质细胞更多。在 6 天时,上述 4 种品系小鼠海马区的新生细胞分别占颗粒细胞总数的 0.36%(颗粒细胞总数 239000)、0.30%(颗粒细胞总数 242000)、0.32%(颗粒细胞总数 351000)和 0.16%(颗粒细胞总数 280000)。该小组进一步对 A/J、C3H/HeJ、DBA/2J 和 Mus spretus 4 种品系小鼠的海马神经发生进行了比较研究,发现它们的细胞增殖情况接近,4 周后 C3H/HeJ 的细胞存活率最高,A/J(63%)和 C3H/HeJ(67%)分化出的神经元明显高于

DBA/2J(47%)。对恒河猴的研究发现,其海马的神经发生可能只有啮齿类的 1/10 左右,说明神经发生也存在种属差异。

**2.4.2 生理活动<sup>[20-21]</sup>** 海马区与学习记忆功能密切相关。奔跑、丰富环境均可促进海马区的神经发生,说明生理活动能够调节海马区的神经发生,增进突触可塑性和学习。Gage 等推测,生命早期的刺激更有助于保持海马齿状回的神经发生能力;进一步研究证实,新鲜度高的复杂刺激比长期复杂刺激更能诱发生体海马区的神经发生。

**2.4.3 应激<sup>[22-23]</sup>** 研究发现,出生前应激可损伤动物的记忆功能,但机制一直不清。对怀孕大鼠施以光照应激后,其产出的大鼠(4月龄)学习记忆功能受损,海马区神经细胞增殖大量减少,甚至发生终生减少的现象。急性的心理社会应激也造成海马区 BrdU 阳性细胞急剧减少,给予 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 后能够阻止这种变化,表明兴奋性氨基酸受体 NMDA 受体参与了神经发生的调节,具体的信号传导机制尚需进一步研究。

**2.4.4 生长因子<sup>[24-26]</sup>** FGF-2 在体外对神经干细胞具有促增殖作用,在 FGF-2 基因敲除的小鼠腹腔注射海人酸(KA)或中脑动脉阻塞后,BrdU/NeuN 阳性细胞数明显低于野生型小鼠,但当心室内注射携带 FGF-2 基因的病毒后,BrdU 阳性细胞数显著增加。有趣的是,常规用来促进血管内皮细胞增殖的血管内皮细胞生长因子(VEGF)对体内外的神经发生也有作用。脑室注射 VEGF 后,侧脑室区和海马颗粒下区的 BrdU 阳性细胞增加,更确切的说,它们是通过促进增殖而不是减少死亡来实现细胞数的增加。

胰岛素样生长因子(IGF-1)不仅可以促进培养的神经祖细胞的增殖、分化和成熟,体内注射也可增加海马区的神经发生。衰老和应激导致的神经发生抑制可能都与 IGF-1 的减少有关。

**2.4.5 病理损伤<sup>[27-29]</sup>** 癫痫发作可增加海马区的神经发生,但这种发生可能参与了异常可塑性而增加了异位发生的情况。这提醒研究人员脑内神经发生并不一定都是有利的。

缺血后神经发生大体分为 3 个步骤:增殖、迁移和分化。在沙土鼠短暂全脑缺血后,用 BrdU、PSA-NCAM、NeuN 和 GFAP 分别作为相应阶段的标志,结果发现,BrdU 阳性的细胞增加了 7 倍,颗粒下区阳性细胞数增加了 3 倍。20 天后,SGZ 和颗粒细胞层(GCL)首次发现表达 PSA-NCAM 的 BrdU 阳性细胞。BrdU 标记的 NeuN 阳性细胞在 60 天后才逐渐增加,DG 区只有少量的 BrdU 标记的 GFAP 阳性细胞。表明神经干细胞的增殖开始于 SGZ 区,而后才迁移到

GCL 区,其中多数分化为神经细胞。

缺血后在 DG 区只有很少的 BrdU/GFAP 双阳性细胞,没有发现 PSA-NCAM/GFAP 双标阳性细胞,但胶质细胞的放射状突起与 PSA-NCAM 阳性细胞的胞体和突起相联系。这表明神经干细胞的增殖始自颗粒下区,然后迁移到颗粒细胞层后分化为神经细胞。该过程在缺血后 2 个月基本结束。成年沙土鼠在全脑缺血 5—10 分钟后,7 天后海马齿状回颗粒下区新生神经细胞开始增多,11 天达到峰值,随后开始下降。1 个月后又大约 25% 的新生神经细胞消失。在剩余的细胞中,约 60% 的迁移到颗粒细胞层,其中 2/3 分化为 NeuN、calbindin 和 MAP-2 阳性的神经细胞,约 40% 迁移到齿状门,其中约 1/4 分化为 GFAP 阳性的细胞。

值得注意的是,局部缺血也造成双侧的 SVZ 区和 SGZ 区的神经发生增加,具体机制还不明确,但可能不是单一因素的作用。促进神经发生的信号如何从刺激或损伤部位传递到神经发生区域,是一个非常有趣的问题。

### 3 成体脑内神经发生的功能<sup>[10-20]</sup>

研究表明,齿状回的新生细胞在应激时 HPA 轴对海马的调节中发挥一定作用。鉴于海马在学习记忆中的重要作用,而且学习过程可以增加海马区的新生细胞,研究人员认为海马区的神经发生对海马依赖性的学习记忆等具有重要意义。同时还发现神经发生低的小鼠学习能力差。奔跑(running)可以促进海马区的神经发生,提高水迷宫实验的成绩,又选择性地提高海马齿状回的长时程易化(long-term potentiation, LTP)。这都支持海马神经发生与空间学习能力的功能相关联。

Eriksson 等的研究显示,人类海马区终生具有产生新神经细胞的能力。由于该区与学习记忆的密切关系,随后的许多研究开始探讨这种神经发生是否与其功能有关。大鼠全脑或局部缺血后,饲养在丰富环境中的动物认知功能改善明显好于一般环境。这种记忆恢复和认知功能的改善都与海马齿状区的神经发生有关。新近研究证实,全脑缺血后,新生颗粒细胞的轴突可延伸到 CA3 区,与靶神经细胞建立突触联系。正是这些实质性的变化介导了脑缺血后海马的记忆功能恢复。

### 4 方法与问题<sup>[30]</sup>

成年神经发生给神经变性和脑外伤导致的脑功能退化提供了可能的治疗策略,包括移植外源性的神经干细胞和体内自身神经干细胞的再动员。这两者可能通过两种途径实现功能修复:①新产生的神经细胞与宿主脑的神经回路整合,接受神经传入,表达神经递质和对靶区的投射;②通过分泌神经递质和生长因子促

进原有神经细胞的生存。对于前者,神经干细胞移植已有大量的研究和成功的实验报道;对于后者,一方面研究如何增加自体的神经发生,另一方面还要注意体内抑制神经发生的因素,如基因和细胞因子,探讨神经发生的种属和脑区特异性,最终能够调控干细胞沿神经细胞方向分化并迁移到更远的脑区。这些均有待于深入研究。

目前,还不能完全肯定依赖新生的细胞重新充盈于损伤区能实现神经功能的修复和重建,特别是新生细胞也会发生凋亡。同时,新生神经细胞生存时间问题在研究神经发生时也应该特别予以注意。现在,有关神经发生调控的研究还有很多问题需要探索,但可以预测,药物干预可能是下一阶段研究的热点领域。

#### [参考文献]

- [1] Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone[J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 629—634.
- [2] Seaberg RM, van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors[J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 1784—1793.
- [3] Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system[J]. *Cell*, 1999, 96: 25—34.
- [4] Lim DA, Alvarez-Buylla A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis[J]. *PNAS*, 1999, 96: 7526—7531.
- [5] Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, et al. Noggin antagonizes BMP signalling to create a niche for adult neurogenesis[J]. *Neuron*, 2000, 28: 713—726.
- [6] Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain[J]. *J Neurosci*, 1997, 17: 5046—5061.
- [7] Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the mammalian brain[J]. *Cell*, 1999, 97: 703—716.
- [8] Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, et al. Identification of a multipotent astrocyte stem cell in the immature and adult mouse brain[J]. *PNAS*, 2000, 97: 13883—13888.
- [9] van Praag H, Schinder AF, Christie BR, et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus[J]. *Nature*, 2002, 415: 1030—1034.
- [10] Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus[J]. *Nature Medicine*, 1998, 4: 1313—1317.
- [11] Raballo R, Rhee J, Lynn Cook R, et al. Basic fibroblast growth factor( FGF-2) is necessary for cell proliferation and neurogenesis in the developing cerebral cortex[J]. *J Neurosci*, 2000, 20: 5012—5023.
- [12] Tropepe V, Sibilia M, Ciruna BG, et al. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon[J]. *Dev Biol*, 1999, 208: 166—188.
- [13] Kalyani A, Hobson K, Rao MS. Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis[J]. *Dev Biol*, 1997, 186: 202—223.
- [14] Gritti A, Frolichsthal-Schoeller P, Galli R, et al. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain[J]. *J Neurosci*, 1999, 19: 3287—3297.
- [15] Haydar A, Wang F, Schwartz ML, et al. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones[J]. *J Neurosci*, 2000, 20: 5764—5774.
- [16] Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induced neurogenesis from adult neural stem cells[J]. *Nature*, 2002, 417: 39—44.
- [17] Kintner C. Neurogenesis in embryos and in adult neural stem cells[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(3): 639—643.
- [18] Kempermann G, GH, Gage FH. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice[J]. *PNAS*, 1997, 94: 10409—10414.
- [19] Kornack DR, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey[J]. *PNAS*, 1999, 96: 5768—5773.
- [20] van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, et al. Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice[J]. *PNAS*, 1999, 96: 13427—13431.
- [21] Kempermann G, Kuhn GH, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus[J]. *J Neurosci*, 1998, 18: 3206—3212.
- [22] Le Maire V, Koehl M, Le Moal M, et al. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus[J]. *PNAS*, 2000, 97: 11032—11037.
- [23] Gould E, McEwen BS, Tanapat P, et al. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation[J]. *J Neurosci*, 1997, 17: 2492—2498.
- [24] Yoshimura S, Takagi Y, Harada J, et al. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury[J]. *PNAS*, 2001, 98: 5874—5879.
- [25] Jin KL, Zhu YH, Sun YJ, et al. Vascular endothelial growth factor( VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo[J]. *PNAS*, 2002, 99: 11946—11950.
- [26] Uberg MAI, Aberg ND, Hedbacker H, et al. Peripheral infusion of IGF-1 selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus[J]. *J Neurosci*, 2000, 20: 2896—2903.
- [27] Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, et al. Dentate granular cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus[J]. *J Neurosci*, 1997, 17: 3727—3738.
- [28] Jin KL, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat[J]. *PNAS*, 2001, 98: 4710—4715.
- [29] Yoshiki Yagita, Kazuo Kitagawa, Toshiho, et al. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus[J]. *Stroke*, 2001, 32: 1890—1896.
- [30] Rakic P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis[J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 614—618.

(收稿日期: 2003-06-30)