·论著·

人胎脑 Nestin 阳性神经元的发育

周细中[1],封志纯[1],王斌[1],安舰[2],李进[2]

(1. 第一军医大学附属珠江医院儿科,广东 广州 510280; 2. 第一军医大学基础部组胚教研室,广东 广州 510515)

[摘 要] **目的** 观察人胎脑有无 Nestin 阳性细胞存在及其发育。**方法** 收集胎龄为 16～32 周不等的自愿终止妊娠引产的正常胚胎 15 例。应用 HE 染色和免疫细胞化学方法观察不同胎龄的人胎脑脑室管膜下区、海马、纹状体的 Nestin 阳性细胞。**结果** 分别在胎龄 16 周、17 周、20^{+3}周、22 周、23 周、24^{+5}周、25 周和 27 周的胎脑上述 3 个部位中发现有数量不等的 Nestin 阳性表达细胞,且呈现两种不同形态。**结论** 人胎脑的脑室管膜下区、海马、纹状体存在 Nestin 阳性表达细胞,且呈两种不同形态。 [中国当代儿科杂志,2003,5(4):311 - 313]

[关 键 词] 胚胎;神经干细胞;神经巢蛋白;免疫细胞化学;人
[中图分类号] Q421 [文献标识码] A [文章编号] 1008 - 8830(2003)04 - 0311 - 03

Development of the Positive Nestin Cells in the Embryonic Human Brain

Xi-Zhong ZHOU, Zhi-Chun FENG, Bin WANG, Jian AN, Jin LI. Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510280, *China (Email: xizhong@fimmu.com)*

Abstract: Objective To understand if there are positive nestin cells in the embryonic human brain. **Methods** Fifteen normal embryoes with gestational ages of 16 - 32 weeks due to termination of pregnancy were enrolled in this study. The cells from hippocampus, striatum and ependyma in the embryonic human brain were studied using HE staining and immunocytochemistry. **Results** Different amounts of positive nestin cells were found in the hippocampus, striatum and under ependyma of the embryonic human brain with gestational age of 16 w, 17 w, 20^{+3} w, 22 w, 23 w, 24^{+5} w, 25 w and 27 w respectively. The positive nestin cells were displayed two different types in morphology, more in small round form than in big oval-shap one. **Conclusions** There are positive nestin cells, with two different forms, in the embryonic human brain. **[Chin J Contemp Pediatr, 2003, 5(4): 311 - 313]**

Key words: Embryo; Neural stem cell; Nestin; Immunocytochemistry; Human

人们已经把神经干细胞视为中枢神经系统移植和替代治疗的理想材料[1,2],尤其是近年来,神经科学家们试图通过研究神经干细胞的结构分化及影响因素来解决中枢神经系统的发育问题[3～6]。尽管已有不少关于人胚胎干细胞的文献报道,但目前尚未见人胎脑神经干细胞的报道。为此,本研究收集自愿于中晚期妊娠引产的胎儿,应用 HE 染色和免疫细胞化学方法对胎脑脑室管膜下层区、海马、纹状体的脑细胞进行研究,以证明是否有神经巢蛋白(Nestin)阳性细胞的存在及其可能的胚胎发育规律。

1 材料和方法

1.1 取材与固定

收集自愿中晚期妊娠引产的正常胎儿 15 例,均为水囊引产,分别为 16 周、17 周、19 周、23 周、24^{+5}周、25 周、27 周、28 周、29 周、31 周和 32 周各 1 例,20^{+3}周和 22 周各 2 例,平均死亡时间为 2.5 h。每例在娩出后 0.5 h 内取完整脑组织固定于 Bouin 液,待脑外层稍硬后,用手术刀轻轻刺破脑膜至浅层皮质以利固定液浸入,视胎脑组织大小固定 12～24 h。然后小心剔除蛛网膜、软脑膜及血管,用

[收稿日期] 2002 - 11 - 06; [修回日期] 2003 - 03 - 11
[基金项目] 广东省科技联合攻关重点课题(B30502)
[作者简介] 周细中(1970 -),男,硕士,主治医师,讲师。主攻方向:小儿神经系统疾病临床与基础。
[通讯作者] 周细中,广州第一军医大学附属珠江医院儿科,邮编:510280。

手术刀(23 #)两面涂匀甘油分别从脑室管膜下区、海马、纹状体部位切取厚约 0.5～1 cm 脑组织 3～5 块,切后勿使任何东西接触切面,迅速浸入 Bouin 液(新配)再根据厚薄固定 12～24 h。

1.2 石蜡切片制作

先置 70 %酒精脱色 12 h,再按常规系列酒精脱水、二甲苯透明、恒温箱(55～56 ℃)浸蜡、包埋、石蜡切片(切片机购自德国 LeiCa 公司),切片厚约 6 μm。

1.3 HE 染色

将组织切片浸入二甲苯 I、II 各 5 min;100 %→100 %→90 %→80 %→70 %乙醇各 1～2 min;苏木精染色 10 min;0.5 %盐酸酒精(分色)约 1 min;自来水冲洗 30 min;70 %→80 %乙醇→伊红→90 %→95 %→100 %→100 %乙醇各 1～2 min;二甲苯 I、II 各 2～3 min;中性树脂封片。

1.4 免疫细胞化学反应

将组织切片在 APES(3-Amino propyltriethoxy silane,博士德公司)液处理的载玻片上进行下列免疫细胞化学反应步骤:①切片以二甲苯脱蜡及系列酒精入水,PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)洗 5 min;②0.3 % H_2O_2-甲醇孵育切片 10 min(室温),PBS 洗 3×5 min,加以 10 %正常绵羊血清-PBS 封闭剂在 37 ℃湿盒中温育 20 min,吸去封闭剂、勿洗;③加入 Purified Mouse Anti-rat Nestin 的工作液(美国 Pharmingen 公司,1∶500),4～8 ℃过夜;④PBS 洗片,加稀释配制的生物素化二抗工作液(C 液),同时稀释亲和素 A 和辣根过氧化物酶 B,然后取等量 A、B 工作液混合(华美公司,1∶50),37 ℃湿盒温育 30 min;⑤PBS 洗片,加混合 A 和 B(即 ABC),37 ℃湿盒温育 30 min;⑥DAB 显色试剂盒显色(博士德公司),部分切片 Delafield 苏木精液复染约 1 min,水洗、脱水、透明、中性树胶封片后在 OLYMPUS BH-2 显微镜下观察、照相。

对照用血清稀释代替 Purified Mouse Anti-rat Nestin Protein 进行上述免疫细胞化学反应步骤。

2 结果

Nestin 阳性产物呈黄褐色,较均匀地分布在胞质中。16 周和 17 周胎脑的纹状体、脑室管膜下区观察到两种 Nestin 阳性细胞:一种呈椭圆型、体积较大、直径为(21 ±1.8) μm,核染色质疏松,1 个或多个核仁,胞浆量中等;另一种 Nestin 阳性细胞稍小而圆、直径(18 ±3.4) μm,染色质致密、核较大、1～2 个核仁、胞浆量较少,后者较前者多见。见图 1～3。20^{+3}周胎脑的海马可见散在 Nestin 阳性细胞分布,纹状体则见椭圆形和圆形、核染色质疏松均匀、胞浆量较少的 Nestin 阳性细胞,同时其周围可见梭形或纺锤形的神经元细胞。见图 4,5。22 周胎脑脑室管膜下区可见大量圆形、体积较小、染色质均匀、含 1～2 个核仁的 Nestin 阳性细胞及少数略呈椭圆形、体积稍大、染色质疏松、多个核仁的 Nestin 阳性细胞,无明显分布规律。见图 6。23 周胎脑海马可见多个略呈椭圆形、体积较大、染色质疏松、1 个或多个核仁、胞浆量中等的 Nestin 阳性细胞。见图 7。24^{+5}周胎脑纹状体可见胞体较大的 Nestin 阳性细胞有的堆积呈集落形式,和胞体较小、散在的 Nestin 阳性细胞。见图 8。25 周胎脑脑室管膜下区可见大量圆形或略呈椭圆形的 Nestin 阳性细胞。见图 9。27 周胎脑脑室管膜下区可见圆形或略呈圆形的 Nestin 阳性细胞,散在分布,周围为各种形状的神经元细胞和胶质细胞。见图 10。27 周胎脑纹状体可见大量上述两种形态的 Nestin 阳性细胞,其中有的胞体较大的 Nestin 阳性细胞呈集落方式,周围胶质细胞多见。见图 11。(全部图片见封Ⅳ)。

归纳起来,共 8 例不同胎龄胎儿的脑室管膜下区或海马或纹状体有 Nestin 阳性细胞表达,且不同胎龄、不同部位 Nestin 阳性细胞数量不一。Nestin 阳性细胞有的呈现小集落(单个细胞构成),细胞接触紧密,间隙不清。

3 讨论

神经干细胞研究是神经发育学、神经细胞生物学与临床神经科学研究者共同关心的热点课题。研究神经干细胞的目的在于阐明神经发育的一般线索,明确神经发育的阶段性变化规律,探索成年脑组织可能存在的具有分化增殖潜能的特定区域,以及寻找在神经系统伤病情况下脑组织反应性增殖的特点与规律,从而为神经干细胞的功能调控及移植积累实验依据,以逐渐过渡到临床应用实践中[7～9]。

一般来说,在中枢神经组织中,神经干细胞是与神经元细胞和神经胶质细胞同时并存的细胞类型之一,且以一定比例存在。以大、小鼠为实验对象,研究各发育阶段的神经干细胞已有不少报道,有研究表明大鼠胎脑组织中的中枢神经干细胞比例为 23 %～40 %[10]。许汉鹏等已经成功地从临床流产的胚胎中分离培养出人胚神经干细胞,并有特异的 Nestin 抗体阳性表达[11]。国外有学者把成年人脑

中具有自我更新、繁殖能力的神经干细胞作为移植的嫁接材料应用在神经系统疾病[12]。但在人胎脑组织的特定区域有无神经干细胞存在及其胚胎发育规律和形态特征如何？这些问题一旦阐明将对人脑中枢神经干细胞应用于临床有着积极的意义。

Nestin 为神经上皮细胞的特异性抗原，属第 IV 类中间丝，在神经板上皮细胞即开始表达，当神经细胞的迁移基本完成后 Nestin 的表达量开始下降，并随神经细胞分化的完成而停止表达，已被广泛应用于神经干细胞的鉴定[13]。本实验分别在 16 周，17 周，20^{+3}周，22 周，23 周，24^{+5}周，25 周，27 周胎脑的脑室管膜下层区、海马或纹状体发现有 Nestin 阳性表达的细胞存在，且数量不一。Nestin 阳性细胞呈现两种形态：一种细胞略呈椭圆形，体积稍大，核大，染色质疏松，核仁 1 个或多个，胞浆量中等；一种细胞小而圆，体积小，核较大、染色质致密均匀，1～2 个核仁，胞浆少，且以后一种细胞多见。有的 Nestin 阳性表达细胞构成小集落，接触紧密，间隙不清，这符合神经干细胞的集落生长方式。其余 7 例未发现 Nestin 阳性细胞表达可能与下列因素有关：①取材部位不准确(所取组织块没有神经干细胞)或切片时未切到含神经干细胞的脑组织；②石蜡切片制作中处理不当使抗原失活；③免疫细胞化学反应操作不当。由于样本量小，因而尚不能依据不同胎龄、不同区域对 Nestin 阳性细胞进行定量分析，从而进一步说明人胚胎神经干细胞可能的发育规律。

本实验首次发现在人胎脑中存在数量不等的 Nestin 阳性表达细胞，并且以两种细胞形态存在。至于其在不同胎龄、不同区域可能存在的发育规律和在中枢神经系统中如何调控分化、迁移将是我们在今后的实验中进一步要探索的。

[参 考 文 献]

[1] Campbell K, Bjorklund A. Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle [J]. Neuron, 1995, 15(6): 1259 - 1273.

[2] Winkler C, Fricker RA, Gates MA, et al. Incorporation and glial differentiation of mouse EGF-responsive neural progenitor cells after transplantation into the embryonic rat brain [J]. Mol Cell Neurosci, 1998, 11(3): 99 - 116.

[3] Reynolds BA, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes [J]. Jneurosci, 1992, 12(11): 4565 - 4574.

[4] Gage FH. Stem cells of the central nervous system [J]. Curr Opin Neurobiol, 1998, 8(5): 671 - 676.

[5] Frisen J, Lothian C, Lendahl U. Central nervous system stem cells in the embryo and adult [J]. Cell Mol Life Sci, 1998, 54(9): 935 - 945.

[6] Gage FH, Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS [J]. Annu Rev Neurosci, 1995, 18(6): 159 - 192.

[7] Momma S, Johansson CB, Fris NJ, et al. Get to know your stem cells [J]. Curr Opin Neurobiol, 2000, 10(1): 45 - 49.

[8] Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, et al. Neural stem cells in the adult human brain [J]. Exp Cell Res, 1999, 253(2): 733 - 736.

[9] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287(5457): 1433 - 1438.

[10] 高国一，李莉，卢亦成，等. 大鼠脑神经干细胞神经巢蛋白表达的流式细胞术检测 [J]. 第二军医大学学报，2000, 21(2): 117 - 119.

[11] 许汉鹏，刘淑娟，鞠躬，等. 人胚脑神经干细胞体外培养体系的成功建立 [J]. 第四军医大学学报，2001, 22(2): 185 - 186.

[12] Akamatsu W, Okano H. Neural stem cell, as a source of graft material for transplantation in neuronal disease [J]. No To Hattatsu, 2001, 33(2): 114 - 120.

(本文编辑：俞燕)

人胎脑Nestin阳性神经元的发育

（正文见第311页）

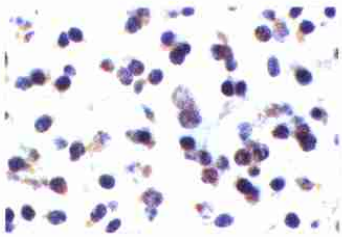

图1　16周胎脑纹状体Nestin阳性细胞（×40）

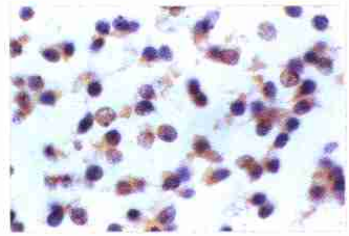

图2　17周胎脑脑室管膜下区Nestin阳性细胞（×40）

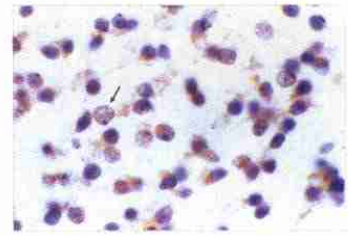

图3　17周胎脑纹状体Nestin阳性细胞（×40）

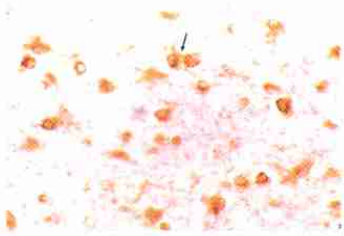

图4　20^{+3}周胎脑海马Nestin阳性细胞（×40）

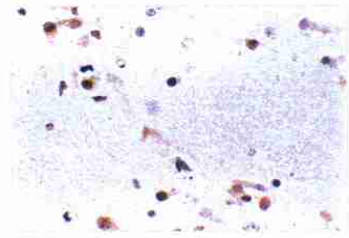

图5　20^{+3}周胎脑纹状体Nestin阳性细胞（×40）

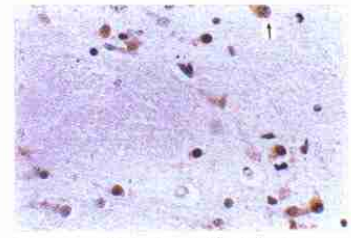

图6　22周胎脑脑室管膜下区Nestin阳性细胞（×40）

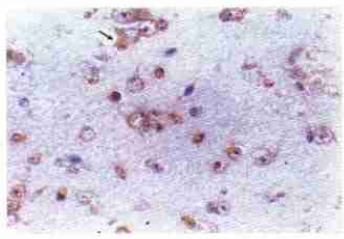

图7　23周胎脑海马Nestin阳性细胞（×40）

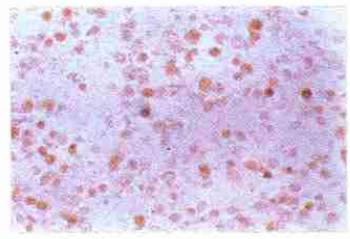

图8　24^{+5}周胎脑纹状体Nestin阳性细胞（×40）

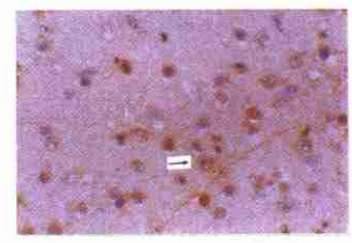

图9　25周胎脑脑室管膜下区Nestin阳性细胞（×40）

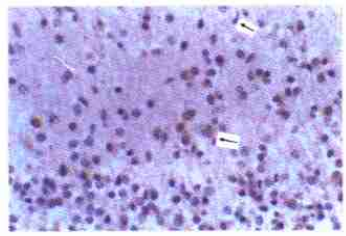

图10　27周胎脑脑室管膜下区Nestin阳性细胞（×40）

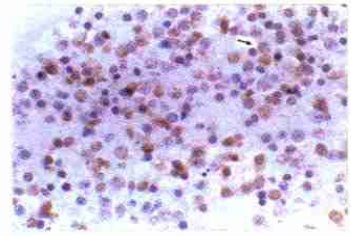

图11　27周胎脑纹状体Nestin阳性细胞（×40）

国内统一刊号：CN 43－1301/R　邮发代号：42－188　国内定价：7.80元