

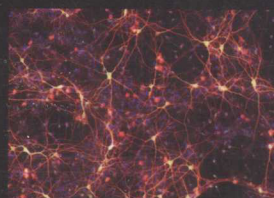
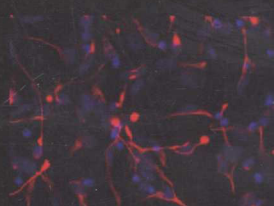
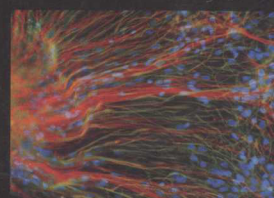
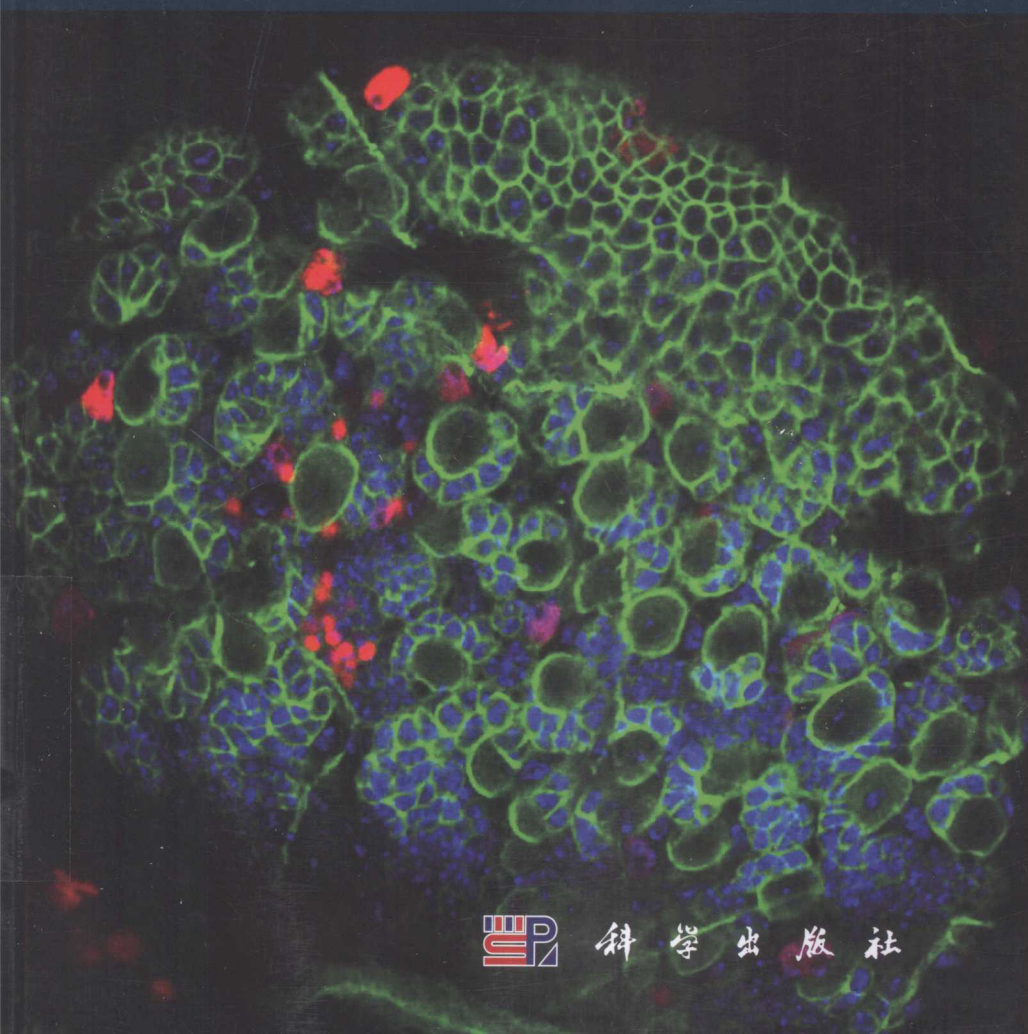


生命科学实验指南系列



神经干细胞研究技术与应用

主 编 梁国标 刘民培
副主编 于春泳 李 欣 陈 伟
陶英群 宋起滨



科学出版社

神经干细胞研究技术与应用

主 编 梁国标 刘民培

副主编 于春泳 李 欣 陈 伟

陶英群 宋起滨



科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书重点介绍神经干细胞的实验研究技术,以及对神经系统有关疾病移植治疗的应用研究。在实验技术部分主要包括神经干细胞的鉴定方法、神经嵴干细胞系永生化的建立、蛋白质组学和高通量基因表达的分子生物学分析、神经干细胞的标记、转基因和基因治疗、克隆性神经干细胞、iPS 细胞技术与神经干细胞的研究等。在应用研究方面,除了对神经系统疾病的治疗研究外,并对其有关的问题和政策法规等进行介绍。

全书内容新颖系统和全面,突出前瞻性和实用性,注重实验技术的有关操作步骤,可供神经科学基础与临床专业人员、本科生和研究生,以及从事细胞生物学、细胞工程和干细胞研究等人员阅读和实验参考。

图书在版编目(CIP)数据

神经干细胞研究技术与应用/梁国标,刘民培主编. —北京:科学出版社, 2016

(生命科学实验指南)

ISBN 978-7-03-048244-0

I. ①神… II. ①梁… ②刘… III. ①神经生理学—干细胞—研究
IV. ①Q421

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 098934 号

责任编辑:罗静 刘晶 / 责任校对:桂伟利 张凤琴 刘亚琦 张小霞

责任印制:张伟 / 封面设计:刘新新

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京教图印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张:46 5/8 插页:2

字数:1 080 000

定价:218.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《神经干细胞研究技术与应用》编写人员名单

- 主 编 梁国标 中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所
刘民培 中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所
副主编 于春泳 中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所
李 欣 沈阳药科大学生理教研室
陈 伟 中国人民解放军沈阳军区总医院全军肿瘤诊治中心
陶英群 中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所
宋起滨 中国医科大学附属盛京医院整形美容外科

编 者（以汉语拼音排序）

- 曹 鹏 芬兰赫尔辛基大学神经外科中心
陈 江 中国人民解放军沈阳军区总医院全军胆胰疾病及消化内镜诊治中心
董连生 辽宁省鞍山钢铁集团公司总医院神经外科
董玉书 中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所
段 阳 中国人民解放军沈阳军区总医院放射诊断科
傅炜昕 中国医科大学科学实验中心
高 旭 美国加州大学洛杉矶分校神经外科
高丹丹 中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所
高明宏 中国人民解放军沈阳军区角膜眼表疾病治疗中心
韩 松 中国人民解放军第三军医大学大坪医院神经外科
韩玉成 中国石油天然气集团公司中心医院检验科
郝广志 辽宁省锦州医科大学神经外科
侯 磊 中国人民解放军总医院神经内科

黄带发	中国人民解放军沈阳军区总医院干部病房二科
蒋 为	辽宁省大连医科大学附属二院神经外科
焦明义	辽宁省锦州医科大学神经外科
李 冠	中国人民解放军沈阳军区总医院放射诊断科
李京伟	北京儿童医院顺义妇儿医院乳腺外科
李学彦	中国人民解放军沈阳军区总医院全军胆胰疾病及消化内镜诊治中心
李延锋	中国人民解放军沈阳军区总医院放射诊断科
李志清	中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所
廖艳艳	中国人民解放军沈阳军区总医院皮肤科
林 军	中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所
刘 洋	中国人民解放军第四军医大学西京医院神经医学研究所
潘冬生	日本奈良县立医科大学医院脑神经外科神经医学研究所
任丽楠	中国人民解放军沈阳军区总医院全军胆胰疾病及消化内镜诊治中心
宋丽新	中国人民解放军沈阳军区总医院浑南医院皮肤科
孙安科	中国人民解放军沈阳军区总医院耳鼻咽喉科
唐 涛	辽宁省肿瘤医院神经外科
王 维	中国医科大学附属第一医院神经外科
王聿杰	中国人民解放军沈阳军区总医院干部病房二科
闻 亮	辽宁省大连医科大学附属二院神经外科
武彩虹	中国石油天然气集团公司中心医院检验科
许炎竹	中国人民解放军沈阳军区总医院皮肤科
薛晓东	中国人民解放军沈阳军区总医院全军心血管病研究所
姚 健	沈阳医学院附属第二医院心胸外科
尤振宇	中国人民解放军第二〇二医院肿瘤介入科

袁冠前	中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所
张 龙	中国石油天然气集团公司中心医院检验科
张佑迁	辽宁省葫芦岛市中心医院神经外科
周 姝	吉林省肿瘤医院麻醉科

前 言

本书由我和刘民培教授共同负责主编。刘民培教授曾和他的恩师、我国干细胞研究的奠基人吴祖泽院士一起研究的“造血干细胞群的不均一性与动力学研究”于1987年获得国家自然科学奖二等奖。此后，他仍继续关注国内外干细胞的研究，并一直跟踪这方面的动态和信息，以及进行有关的探讨。1992年起，获国务院政府特殊津贴终身享受奖励。他已主编学术专著8部大约700余万字，其中干细胞方面的有3部近400万字。2015年，被国家出版基金管理委员会、国家出版基金规划管理办公室聘为国家出版基金评审专家。

在现代科学技术中，不管“阿尔法狗”等是怎样的智能、尖端、神奇和奥秘，这些都是人类智慧的结晶和大脑的产物。人脑的神经细胞数量超过千亿，相当于银河系星体的总数。其神经细胞连接点的“突触”数量又是神经细胞的1000倍，达到 10^{14} 。这些细胞构成极端复杂而庞大的神经环路和网络，使人类得以产生感觉、形成意识、学习记忆，拥有思维和认知能力。这些环路每秒可完成高达千万次的动态链接，人类大脑储存的信息相当于美国国会图书馆藏书总量的50倍。因此，揭示人类大脑的奥秘已成为当代生命科学研究面临的最大挑战。

在21世纪“脑科学时代”的神经科学研究领域中，鉴于神经干细胞的特性、修复、再生与重建功能等现已成为当前研究的热点和前沿课题。此书是在即将由我国顶级的科学出版社出版的《神经干细胞基础与培养》的基础上编写的，共计两篇31章。其中全面系统地介绍了目前国内外在神经干细胞实验研究中的有关技术，以及在治疗应用方面的主要内容。在所编的内容中，力求做到新颖、实用和操作性强。而且，尽力把各方面有关内容的特点、现状、存在问题和研究前景等呈献给广大读者，力争为我国神经干细胞的研究贡献绵薄之力。

在本书的编写中，得到许多同仁的真诚鼓励、热心支持和大力帮助。参加编写的各位同道在十分繁忙的临床等工作中，克服各种困难认真撰稿，反复修改。值此，对这些关心、支持和厚爱此书，并对本书做出贡献的志士仁人，特别是对科学出版社的领导、责任编辑等一直给予的指点、帮助和辛勤付出表示衷心的感谢！

神经干细胞研究的发展十分迅速，有些方法和技术均在不断地更新和发展。由于编著者水平有限，加之时间关系，难免有不妥、遗漏及错误之处，祈望各位读者予以批评指正，以使本书更臻完善。

梁国标

中国人民解放军沈阳军区总医院神经外科 主任 主任医师

中国人民解放军沈阳军区总医院全军神经医学研究所 所长 博士生导师

2016年5月

目 录

前言

上篇 神经干细胞的实验技术

第一章 神经干细胞研究的有关实验条件	3
第一节 实验室的基本要求	3
第二节 主要的仪器设备	8
第三节 常用试剂	9
主要参考文献	11
第二章 神经干细胞的鉴定	13
第一节 概述	13
第二节 神经干细胞的电生理学测定	16
第三节 LacZ 标记神经干细胞的电子显微镜检测	18
第四节 神经干细胞的端粒酶分析	25
第五节 神经干细胞的染色体分析	31
第六节 神经干细胞分化的鉴定	36
第七节 神经干细胞体外迁移的测定	39
第八节 荧光金对神经元投射的解剖学示踪	45
第九节 神经干细胞凋亡的测定	47
第十节 神经干细胞培养的克隆分析	54
第十一节 成体神经干细胞的标志物鉴定	58
第十二节 体外标记神经干细胞移植后不同表型的鉴定	71
主要参考文献	76
第三章 克隆性神经干细胞	78
第一节 概述	78
第二节 克隆技术及分类	80
第三节 体细胞核移植	83
第四节 胚胎干细胞的建立	98

第五节 胚胎干细胞源性神经干细胞	103
主要参考文献	105
第四章 绿色荧光蛋白转基因小鼠神经干细胞的培养与鉴定	109
第一节 概述	109
第二节 绿色荧光蛋白转基因小鼠的制备	109
第三节 转基因小鼠神经干细胞的培养及鉴定	113
第四节 移植治疗的实验研究	115
第五节 基因操控和细胞标记的电穿孔技术	118
主要参考文献	122
第五章 iPS 细胞技术与神经干细胞研究	124
第一节 概述	124
第二节 基本原理	129
第三节 人 iPS 细胞的制备	136
第四节 问题与展望	140
主要参考文献	143
第六章 神经干细胞的分子生物学分析	147
第一节 概述	147
第二节 神经干细胞的 RT-PCR 差异基因表达分析	148
第三节 神经干细胞高通量基因表达的分析	159
第四节 神经干细胞及祖细胞的分析	163
第五节 神经干细胞蛋白质组学的双向凝胶电泳分析法	166
主要参考文献	171
第七章 神经干细胞介导的基因治疗	173
第一节 概述	173
第二节 永生化神经干细胞系的建立	183
第三节 基因转移技术	190
第四节 基因组编辑技术	195
第五节 神经干细胞介导基因治疗的问题与展望	198
主要参考文献	200
第八章 神经干细胞移植治疗神经变性疾病的实验研究	203
第一节 概述	203
第二节 实验材料	204

第三节 实验方法	206
第四节 问题与展望	212
主要参考文献	214
第九章 神经干细胞实验研究的常用动物模型	216
第一节 脑损伤动物模型	216
第二节 脊髓损伤动物模型	220
第三节 退行性神经疾病的神经干细胞模型	224
第四节 脑缺血动物模型	230
第五节 帕金森病动物模型	238
第六节 亨廷顿病动物模型	246
第七节 阿尔茨海默病动物模型	251
第八节 癫痫动物模型	257
主要参考文献	269
第十章 神经干细胞的冻存、复苏及运输	270
第一节 概述	270
第二节 神经干细胞的冻存	271
第三节 神经干细胞的复苏	274
第四节 神经干细胞的运输	276
主要参考文献	277
下篇 神经干细胞移植治疗的应用研究	
第十一章 神经干细胞移植治疗前的准备工作	281
第一节 移植治疗的实验室要求	281
第二节 神经干细胞的制备	287
第三节 神经干细胞的质量控制检测	287
主要参考文献	296
第十二章 神经干细胞移植技术	298
第一节 概述	298
第二节 神经干细胞静脉注射移植术	300
第三节 神经干细胞脑室内或腰穿注射移植术	304
第四节 神经干细胞精确定位移植技术	309
第五节 中枢神经系统干细胞移植的要求	320
第六节 神经干细胞移植标记示踪技术	322

第七节 成年啮齿动物神经干细胞的移植方法	334
主要参考文献	341
第十三章 神经干细胞移植治疗前后的处理	343
第一节 移植前的处理	343
第二节 神经干细胞移植后的一般处理	351
第三节 神经干细胞移植患者的营养支持治疗	353
第四节 神经功能康复训练	365
第五节 神经干细胞移植治疗后的护理	370
主要参考文献	374
第十四章 中枢神经系统疾病的神经干细胞治疗	375
第一节 中枢神经系统疾病治疗的有关细胞	375
第二节 多能神经干细胞的治疗作用	387
第三节 人神经嵴干细胞系的永生化建立、特性及移植作用	392
第四节 NT2N 细胞在神经移植治疗中的临床前研究	399
第五节 极小胚胎样干细胞的神经再生作用	405
第六节 神经干细胞移植治疗的影响因素	413
主要参考文献	415
第十五章 成体少突胶质祖细胞的移植治疗研究	418
第一节 概述	418
第二节 成体少突胶质祖细胞的研究	419
第三节 少突胶质祖细胞的特性	420
第四节 少突胶质祖细胞的实验治疗研究	423
主要参考文献	426
第十六章 神经干细胞移植治疗脑出血性疾病	428
第一节 概述	428
第二节 脑出血性疾病的诊断与治疗	433
第三节 神经干细胞治疗脑出血的实验研究	435
第四节 神经干细胞治疗脑出血的临床实验研究	437
主要参考文献	440
第十七章 神经干细胞移植治疗缺血性脑卒中	441
第一节 概述	441
第二节 缺血性脑卒中的诊断与治疗	449

第三节 神经源性干细胞移植治疗脑缺血卒中的作用	453
主要参考文献	459
第十八章 神经干细胞移植治疗脑损伤	461
第一节 概述	461
第二节 脑损伤导致神经功能损害的诊断与治疗	467
第三节 神经干细胞治疗重型颅脑伤后遗症的实验研究	475
第四节 神经干细胞治疗脑损伤的临床研究	481
主要参考文献	483
第十九章 神经干细胞移植治疗脊髓损伤	485
第一节 概述	485
第二节 脊髓损伤的检查与诊断	487
第三节 脊髓损伤的一般治疗	490
第四节 神经干细胞治疗脊髓损伤的动物实验研究	493
第五节 神经干细胞治疗脊髓损伤的临床实验研究	498
主要参考文献	501
第二十章 神经干细胞移植治疗长期昏迷	503
第一节 概述	503
第二节 持续性植物状态的发病与苏醒机制	505
第三节 检查诊断与治疗	509
第四节 临床和实验研究	516
主要参考文献	518
第二十一章 神经干细胞移植治疗周围神经损伤的研究	519
第一节 概述	519
第二节 周围神经损伤检查诊断与治疗	523
第三节 神经干细胞对周围神经损伤的治疗作用	527
主要参考文献	531
第二十二章 神经干细胞移植治疗癫痫	533
第一节 概述	533
第二节 癫痫的诊断和治疗	538
第三节 神经干细胞在癫痫治疗中的作用	546
主要参考文献	548

第二十三章 神经干细胞移植治疗阿尔茨海默病	550
第一节 概述	550
第二节 阿尔茨海默发病的可能机制	552
第三节 阿尔茨海默病的检查诊断及治疗	554
第四节 神经干细胞移植治疗阿尔茨海默病的作用研究	559
主要参考文献	562
第二十四章 神经干细胞移植治疗帕金森病	564
第一节 概述	564
第二节 诊断与治疗	572
第三节 神经干细胞移植治疗帕金森病的作用	577
主要参考文献	585
第二十五章 神经干细胞移植治疗恶性脑胶质瘤	587
第一节 概述	587
第二节 脑胶质瘤的诊断与治疗	588
第三节 神经干细胞移植治疗胶质瘤的动物实验研究	593
第四节 神经干细胞在治疗胶质瘤中的作用	603
主要参考文献	604
第二十六章 神经干细胞移植治疗小儿脑瘫	607
第一节 概述	607
第二节 诊断与治疗	612
第三节 动物实验研究	616
第四节 神经干细胞对小儿脑瘫治疗作用的研究	619
主要参考文献	621
第二十七章 神经干细胞移植治疗失语症	624
第一节 概述	624
第二节 分类分级及临床表现	627
第三节 失语症的检查与诊断	637
第四节 失语症的治疗	642
第五节 神经干细胞移植治疗失语症的应用研究	645
主要参考文献	646
第二十八章 神经源性干细胞移植治疗脱髓鞘疾病	648
第一节 概述	648

第二节 脱髓鞘病的诊断与治疗·····	650
第三节 脱髓鞘疾病的动物实验研究·····	653
第四节 神经源性干细胞移植治疗的临床实验研究·····	656
主要参考文献·····	657
第二十九章 神经干细胞移植治疗小脑萎缩性疾病·····	660
第一节 概述·····	660
第二节 病因、临床表现特点与治疗·····	661
第三节 动物实验研究·····	672
第四节 临床神经干细胞移植治疗的作用·····	673
主要参考文献·····	675
第三十章 神经干细胞移植治疗肌营养不良病·····	678
第一节 概述·····	678
第二节 肌营养不良病的治疗及预后·····	681
第三节 基因与干细胞移植治疗肌营养不良病的应用研究·····	682
主要参考文献·····	686
第三十一章 神经干细胞移植治疗精神障碍·····	688
第一节 概述·····	688
第二节 诊断与治疗·····	693
第三节 神经干细胞治疗精神障碍的作用·····	697
主要参考文献·····	700
附录一 《干细胞临床研究管理办法（试行）》解读·····	703
附录二 英汉名词对照·····	707
彩图	

上 篇

神经干细胞的实验技术

第一章 神经干细胞研究的有关实验条件

第一节 实验室的基本要求

一、实验室的有关要求

神经干细胞（NSC）研究实验室设计的关键问题是要有长期的规划，这包括实验室的规模、功能设计、空间的利用和仪器设备的配置。其设计方面的特点与其他细胞培养的实验室相似，即实验室的物理空间需要以一种能有效地反映预期工作流程，并考虑到将要共享这一空间、设备和预期工作量的操作人员数量的方式进行设计。如果可能的话，实验室应由一个模块化的框架组成，这样有利于将来对实验室进行重新配置。

在实验室设计的方案中，应符合《实验室生物安全通用要求》、《医药工业洁净厂房设计规范》及《机关、团体、企业、事业单位消防安全管理规定》。实验室的设计应保证对生物、化学、辐射和物理等危险源的防护水平控制在经过评估的可接受程度，为关联的办公区和邻近的公共空间提供安全的工作环境及防止危害环境。

二、实验室的设置

NSC 研究实验室的布局应当包括基本实验室和辅助实验室两部分。基本实验室包含实验准备室、洗刷室、消毒室、无菌操作室和细胞培养室；辅助实验室一般包含细胞学实验室、分子生物学实验室、动物实验室、精密仪器室、储藏室（库房）、摄影室和暗室等，并且可以根据工作需要布局调整。

（一）基本实验室

1. 实验准备室

进行一切与实验有关的准备工作，包括实验耗材准备和包装、培养液及相关试剂的配制等。应配备实验台、冰箱、天平、酸度计、常用化学试剂及实验耗材等。

2. 洗刷室和消毒室

进行可重复使用耗材的洗涤和消毒，应配备水槽、清洗液浸泡缸、自动虹吸清洗器、超声波清洗器、干燥箱、高压灭菌器及干热灭菌器等。