

## · 综述 ·

## 嗅鞘细胞的生物学特性及其治疗创伤性脊髓损伤的研究进展

闫金玉 李剑锋 张旭 刘遵南 李冬生

创伤性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中枢神经系统的一种严重损伤,多因车祸、坠落伤等造成脊柱骨折、脱位所致。有统计数字表明,创伤性 SCI 占全身创伤的 0.2% ~ 0.5%,在脊柱骨折中有 16% ~ 40% 并发 SCI,常遗留严重伤残。随着人类社会现代化的进程,创伤性 SCI 的发病率在全球呈现出上升的趋势,由其引起的损伤段以下感觉、运动和括约肌功能全部或部分丧失,使患者出现截瘫或四肢瘫,导致日常生活困难,给家庭和社会造成极大负担。因此创伤性 SCI 后的康复治疗是医患双方迫切需要解决的问题。近年来,学者们进行了大量关于嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)修复受损脊髓的研究并取得了很大的进展。现综述如下。

## 嗅鞘细胞的来源

嗅鞘细胞存在于外周的鼻腔嗅黏膜、嗅神经和中枢的嗅球。由于受到伦理学的限制,嗅球的 OECs 移植用于治疗 SCI 并不是一个理想的选择。Bianco 等<sup>[1]</sup>通过经鼻嗅黏膜活检成功培养人周围源性 OECs,并发现含 NT-3 无血清培养基可纯化和扩增 OECs,为临床自体嗅鞘细胞移植开辟了新的方法,使 OECs 自体移植的临床应用又前进了一步。不仅如此,很多学者仍在不断探索,用基因修饰等各种手段得到用于治疗 SCI 较为理想的 OECs。Moreno-Flores 等<sup>[2]</sup>在体外培养了有无限传代能力的大鼠嗅鞘细胞,这一系嗅鞘细胞能够维持原代培养的 OECs 促进轴突再生的特征,而且发现这些细胞在移植入 SCI 的模型后,能与脊髓整合在一起,促进了感觉投射轴突、皮质脊髓束的轴突长入损伤区,SCI 的大鼠损伤平面以下的感觉和运动功能也得以改善。Rubio 等<sup>[3]</sup>研究了灵长类动物的嗅鞘细胞的生物学特性,以明确其是否适合 SCI 的移植治疗,他们将取自灵长类动物的嗅鞘细胞和啮齿类动物的嗅鞘细胞的特性进行比较。与啮齿类动物嗅鞘细胞相比,灵长类动物的嗅鞘细胞衰老速度慢,平均寿命期更长,长达 2.5 个月,对富氧培养环境敏感性较低,而且非常适应体外培养环境。取自一只猕猴的嗅鞘细胞进行 3 周的短期培养,可以为急性损伤期的自体移植提供足够的细胞;而经过 2.5 个月长期的细胞培养,细胞数量可增至 200 亿,而且可将嗅鞘细胞冻存。由此可见,灵长类动物的成熟嗅鞘细胞是嗅鞘细胞移植治疗其 SCI 的可靠来源。

## 嗅鞘细胞的生物学特性

嗅鞘细胞是一种特殊类型的神经胶质细胞,兼有 Schwann 细胞和星型胶质细胞的特性<sup>[4]</sup>,起源于嗅基底膜,广泛分布于嗅黏膜、嗅神经和嗅球的表面两层,具有终生分裂和再生的能

力,并可伴随嗅神经轴突迁徙入脑。嗅神经的轴突每 30 ~ 60 d 就可以穿越周围神经系统与中枢神经系统的交界区,重新长入嗅鞘并建立起突触联系,并且这样的过程还能不断重复<sup>[5]</sup>。嗅鞘细胞能够分泌很多生长因子,如内源性神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)<sup>[6]</sup>、外源性神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)、神经肽-Y 和 S-100 等。研究表明,NGF 能够防止脊髓红核神经元萎缩,增强皮质脊髓束发芽和促进红核脊髓神经通路的再生;BDNF 和 NT-3 均能阻止轴突切断损伤的成年大鼠红核脊髓束细胞死亡,解救濒死的神经元,促进轴索再生<sup>[7]</sup>。除此之外,嗅鞘细胞在它们的胞膜上还表达另外一些分子,如 N-CAM 等涉及细胞黏附和轴突的生长。由于嗅鞘细胞的这些特点,OECs 被认为是细胞移植修复 SCI 很有希望的种子细胞之一。

虽然嗅鞘细胞与 Schwann 细胞在很多生物学特性方面存在相似之处,但是有研究发现,在细胞移植治疗 SCI 方面,OECs 还有很多其他细胞不具有的特性。Lankford 等<sup>[8]</sup>将嗅鞘细胞移植入经 X 线照射损伤的脊髓,并将 Schwann 细胞作为对照,发现在 OECs 移植 3 周后可以迁移到损伤部位的灰质和白质当中,并在宿主中形成新的髓鞘,并且证实 OECs 是治疗 SCI 继发损害的理想种子细胞。Leung 等<sup>[9]</sup>研究还发现,嗅鞘细胞具有吞噬细菌的功能,是阻挡经由嗅神经侵犯中枢神经系统的细菌,并引起内源性免疫应答的主要组成部分,这一功能保护嗅系统及中枢神经系统组织免受细菌感染。这一观点随后也被 Harris 等<sup>[10]</sup>研究证实。

## 嗅鞘细胞的鉴定及标记

P75 低亲和力神经生长因子受体(low affinity nerve growth-factor receptor, P75NTR)被认为是嗅鞘细胞的特异性抗体,另外还有常用的抗体如 S-100 和神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)<sup>[11]</sup>,常用来进行嗅鞘细胞的免疫组化鉴定。为了研究 OECs 移植后的存活情况以及其与宿主的相互影响,学者利用固蓝盐、PKH26、DiO 及 CMFDA 等对嗅鞘细胞进行标记,并进行对照研究后发现固蓝盐是 OECs 最佳示踪标记物<sup>[12]</sup>。Othon 等<sup>[13]</sup>还用单细胞印迹的方法对嗅鞘细胞进行标记。

## 嗅鞘细胞治疗 SCI 的机制

SCI 后造成损伤部位不同程度的变性、坏死,以及外侧白质脊髓束的脱髓鞘病变,轴突不能重新建立连接。嗅鞘细胞移植治疗 SCI 的确切机制目前尚不十分明确,但经过科研工作者的不断努力,关于 OECs 治疗 SCI 的机制研究仍然取得了较大的进展。其主要的机制包括:①促进髓鞘再生,用细胞移植的方法来治疗 SCI 的脱髓鞘疾病已成为目前一个研究热点,实验

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.10.023

基金项目:国家自然科学基金支持项目(30860300)

作者单位:010030 呼和浩特,内蒙古医学院第二附属医院康复医学科

研究发现 OECs 具有促进髓鞘再生的能力,从而修复受损的脊髓。一般来说,使用 OECs 移植治疗 SCI 只能使轴突获得中等程度的再生,但它可能为观察到的功能改善提供足够的支持作用<sup>[14]</sup>。②促进局部残存轴突萌芽发出侧枝,并能够包绕轴突使髓鞘朗飞氏结节的钠离子通道再生以保证其必要的冲动传导<sup>[15]</sup>。③OECs 发挥神经保护作用,保护了残存的轴突;嗅鞘细胞会分泌出许多因子,而这些因子可能就是促进这些功能恢复的原因,其中包括神经营养因子和血管源性因子等<sup>[16]</sup>。④Takeoka 等<sup>[17]</sup>最近研究发现,移植 OECs 后的大鼠脊髓腰骶段脊髓胆碱能神经元和 5-HT 的量明显较对照组多,并认为嗅鞘细胞移植后损伤远端增多的 5-HT 是激活腰骶段运动神经功能恢复的动力之一。

### 嗅鞘细胞移植在 SCI 中的应用

#### 一、OECs 移植治疗 SCI

SCI 后神经功能之所以恢复困难,主要原因有中枢神经系统轴突再生能力极其有限,成年人脊髓的少突胶质细胞不能像神经膜细胞那样在轴突断裂后引导轴突生长并形成髓鞘,神经营养因子分泌不足、轴突生长的微环境中存在抑制因素,以及 SCI 后胶质瘢痕和空洞的形成阻止了轴突进入远端等。目前临床治疗 SCI 的思路大多是减少 SCI 早期各种损害因素,抑制过氧化反应、稳定溶酶体膜改善脊髓血流量并减轻细胞水肿等;急性期过后加强神经功能保护,补充外源性神经营养因子,并尽可能重建神经支配以促进神经功能的恢复。脊髓挫伤构成各种复杂损伤,包括细胞损伤、轴突受损、小胶质细胞和巨噬细胞活化以及脱髓鞘病变等,这些损伤导致持久性神经功能缺失与周围神经损伤后轴突再生不同,中枢神经系统轴突损伤后很难再生,这是由于中枢神经损伤缺乏有益的再生环境,而且还有很多限制中枢神经系统轴突再生的抑制分子,这些分子在周围神经系统中是非常少的<sup>[18]</sup>。基于嗅鞘细胞在动物实验修复 SCI 中明确的促进轴突再生、恢复损伤平面以下神经支配的作用,同时至今尚没有治愈 SCI 的可靠方法,有人开始将嗅鞘细胞治疗 SCI 从动物实验转到临床试验上来。2006 年 Lima 等<sup>[19]</sup>进行了临床试验,他们对 7 例 SCI 患者(损伤时间为 0.5~6.5 年)进行自体嗅黏膜组织移植,术后显示患者的神经功能有不同程度的恢复。所以他们也认为嗅黏膜自体移植是可行且相对安全的,有潜在的修复作用,但也涉及手术风险,还需进一步长期监测一些滞后的副作用和远期疗效。

#### 二、嗅鞘细胞与其他细胞及生物因子联合移植的研究

目前除了利用嗅鞘细胞移植来治疗 SCI 之外,还有不少学者利用神经干细胞(neural stem cell, NSC)、Schwann 细胞等治疗 SCI。利用不用种类的细胞及一些生物因子联合移植治疗 SCI 的研究也在不断深入。Bretzner 等<sup>[20]</sup>利用嗅鞘细胞与 BDNF 联合移植改善实验动物的运动功能和浅感觉程度较两者单独应用明显提高,而且二者联合应用治疗组的降钙素基因相关肽阳性标记的轴突能够进入损伤区域,这在单独进行 OECs 和 BDNF 移植治疗组中是看不到的。除此之外,很多学者还致力于不同种类细胞的联合移植, Salehi 等<sup>[21]</sup>将 95% 纯度的 OECs 和胚胎干细胞诱导分化的神经元细胞联合移植入 SCI 的大鼠,发现实验动物后肢运动功能得到明显改善,而且认为两者共同移植有协同作用可以促进神经再生, OECs 可以促进植入的神经细胞存

活以及部分功能恢复。嗅鞘细胞可以表达多种生长因子和细胞粘附因子,并能促进 SCI 动物模型及 SCI 患者轴突再生和神经功能恢复。将 NSC 与 OECs 联合移植,不仅能够有效促进移植的 NSC 的存活,而且能明显促进神经化学物质的分泌<sup>[22]</sup>。除与 NSC 联合移植的相关研究之外,还有许多种类细胞与 OECs 联合移植方面的研究,包括 Schwann 细胞等<sup>[23-24]</sup>。

#### 三、基因工程应用于嗅鞘细胞的研究

目前基因工程与嗅鞘细胞移植联合应用的研究主要集中于利用基因转染等技术,从而改变嗅鞘细胞的某些特性,使其更有利于满足临床治疗 SCI 的需要。最近有学者利用减除杂交法从嗅鞘细胞中提取出 Tn-C、Igfbp-5、COX1 以及 CNPase 等 4 种新的基因<sup>[25]</sup>。Garcia-Escudero 等<sup>[26]</sup>利用 BM11/TERT 基因转染制备成可调控的永生化嗅鞘细胞,而且能够保持其原有抗原标记和神经再生等特性。经过 NT-3 基因修饰的嗅鞘细胞用于移植治疗大鼠 SCI 能够有效促进轴突再生和神经功能恢复,并能大量分泌 NT-3 以达到滋养神经细胞的目的,也取得了较好的效果<sup>[27]</sup>。

### 存在的问题及展望

虽然目前嗅鞘细胞进行体外试验及动物实验的研究已不断深入,而且在我国、葡萄牙等国家嗅鞘细胞移植治疗 SCI 的临床应用已取得一定的进展,但随之也带来一些问题,如细胞移植后虽可以看到其能够促进轴突再生及包绕髓鞘,但是 SCI 后微细结构的变化是否能够真正使患者神经功能得到良好的恢复仍需进一步探讨。由于在手术中采用的 OECs 来源于流产的胚胎,存在着一些不足,如伦理学问题、异体细胞移植面临的免疫排斥,以及由于细胞植入是否引起肿瘤发生等等,都是需要医学工作者不断探索并解决的问题。近来陆续有关于嗅鞘细胞肿瘤被发现<sup>[28-29]</sup>,所以移植的安全性仍然需要长时间的评估。而且 Dobkin 等<sup>[30]</sup>还提出,由于嗅鞘细胞移植手术治疗 SCI 尚处于不完善阶段,所以其安全性仍需要逐渐评估,并对手术操作标准化进一步规范。

### 参考文献

- [1] Bianco JJ, Perry C, Harkin DG, et al. Neurotrophin 3 promotes purification and proliferation of olfactory ensheathing cells from human nose. *Glia*, 2004, 45:111-123.
- [2] Moreno-Flores MT, Bradbury EJ, Martin-Bermejo MJ, et al. A clonal cell line from immortalized olfactory ensheathing glia promotes functional recovery in the injured spinal cord. *Mol Ther*, 2006, 13:598-608.
- [3] Rubio MP, Mufioz-Quiles C, Ramón-Cueto A. Adult olfactory bulbs from primates provide reliable ensheathing glia for cell therapy. *Glia*, 2008, 56:539-551.
- [4] Fairless R, Barnett SC. Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37:693-699.
- [5] Chen X, Fang H, Schwob JE. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *J Comp Neurol*, 2004, 469:457-474.
- [6] Pellitteri R, Spatuzza M, Russo A, et al. Olfactory ensheathing cells represent an optimal substrate for hippocampal neurons: an in vitro study. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 27:453-458.
- [7] Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. BDNF-expressing marrow stromal

- cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2005, 191:344-360.
- [8] Lankford KL, Sasaki M, Radtke C, et al. Olfactory ensheathing cells exhibit unique migratory, phagocytic, and myelinating properties in the X-irradiated spinal cord not shared by Schwann cells. *Glia*, 2008, 56: 1664-1678.
- [9] Leung JY, Chapman JA, Harris JA, et al. Olfactory ensheathing cells are attracted to, and can endocytose, bacteria. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65:2732-2739.
- [10] Harris JA, West AK, Chuah MI. Olfactory ensheathing cells: nitric oxide production and innate immunity. *Glia*, 2009, 57:1848-1857.
- [11] Smithson LJ, Kawaja MD. A comparative examination of biomarkers for olfactory ensheathing cells in cats and guinea pigs. *Brain Res*, 2009, 1284:41-53.
- [12] Pettersson J, Lobov S, Novikova LN. Labeling of olfactory ensheathing glial cells with fluorescent tracers for neurotransplantation. *Brain Res Bull*, 2010, 81:125-132.
- [13] Othon CM, Wu X, Anders JJ, et al. Single-cell printing to form three-dimensional lines of olfactory ensheathing cells. *Biomed Mater*, 2008, 3:034101.
- [14] Nash HH, Borke RC, Anders JJ. Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 2002, 22:7111-7712.
- [15] Radtke C, Vogt PM. Peripheral nerve regeneration: a current perspective. *Eplasty*, 2009, 12:47.
- [16] Barnett SC, Riddell JS. Olfactory ensheathing cell transplantation as a strategy for spinal cord repair-what can it achieve? *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3:152-161.
- [17] Takeoka A, Kubasak MD, Zhong H, et al. Serotonergic innervation of the caudal spinal stump in rats after complete spinal transection: effect of olfactory ensheathing glia. *J Comp Neurol*, 2009, 515:664-676.
- [18] Radtke C, Sasaki M, Lankford KL, et al. Potential of olfactory ensheathing cells for cell-based therapy in spinal cord injury. *J Rehabil Res Dev*, 2008, 45:141-151.
- [19] Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, et al. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J Spinal Cord Med*, 2006, 29:191-203.
- [20] Bretzner F, Liu J, Currie E, et al. Undesired effects of a combinatorial treatment for spinal cord injury—transplantation of olfactory ensheathing cells and BDNF infusion to the red nucleus. *Eur J Neurosci*, 2008, 28:1795-807.
- [21] Salehi M, Pasbakhsh P, Soleimani M, et al. Repair of spinal cord injury by co-transplantation of embryonic stem cell-derived motor neuron and olfactory ensheathing cell. *Iran Biomed J*, 2009, 13:125-135.
- [22] Shukla S, Chaturvedi RK, Seth K, et al. Enhanced survival and function of neural stem cells-derived dopaminergic neurons under influence of olfactory ensheathing cells in parkinsonian rats. *J Neurochem*, 2009, 109:436-451.
- [23] Techangamsuwan S, Kreutzer R, Kreutzer M, et al. Transfection of adult canine Schwann cells and olfactory ensheathing cells at early and late passage with human TERT differentially affects growth factor responsiveness and in vitro growth. *J Neurosci Methods*, 2009, 176:112-120.
- [24] Techangamsuwan S, Imbschweiler I, Kreutzer R, et al. Similar behaviour and primate-like properties of adult canine Schwann cells and olfactory ensheathing cells in long-term culture. *Brain Res*, 2008, 1240: 31-38.
- [25] Rojas-Mayorquín AE, Torres-Ruiz NM, Gudifio-Cabrera G, et al. Subtractive hybridization identifies genes differentially expressed by olfactory ensheathing cells and neural stem cells. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 9:817-823.
- [26] García-Escudero V, García-Gómez A, Gargini R, et al. Prevention of senescence progression in reversibly immortalized human ensheathing glia permits their survival after deimmortalization. *Mol Ther*, 2009, 12: 24.
- [27] Jun WU, Tian-Sheng SUN, Ji-Xin REN, et al. Ex vivo non-viral vector-mediated neurotrophin-3 gene transfer to olfactory ensheathing glia: effects on axonal regeneration and functional recovery after implantation in rats with spinal cord injury. *Neurosci Bull*, 2008, 24: 57-65.
- [28] Ippili K, Ratnam BG, Gowrishankar S, et al. Olfactory ensheathing cell tumor. *Neurol India*, 2009, 57: 76-78.
- [29] Lin SC, Chen MH, Lin CF, et al. Olfactory ensheathing cell tumor with neurofibroma-like features: a case report and review of the literature. *J Neurooncol*, 2010, 97:117-122.
- [30] Dobkin BH, Curt A, Guest J. Cellular transplants in China: observational study from the largest human experiment in chronic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*, 2006, 20:5-13.

(修回日期:2010-07-29)

(本文编辑:阮仕衡)

## 《中华物理医学与康复杂志》第六届表彰编辑委员名单

(按姓氏笔画排序)

|                   |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ernest W. Johnson | 刘世文 | 孙启良 | 孙星炯 | 何作云 | 李 晶 | 杜宝琮 | 汪培华 |
| 邱 平               | 邱纪方 | 陆廷仁 | 陈景藻 | 郭龙德 | 傅成礼 | 董时富 | 裘法祖 |