

· 综述 ·

骨髓间质干细胞移植治疗神经系统疾病的疗效及相关机制探讨

李蹕 倪朝民

骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是存在于骨髓基质中、具有干细胞特性的一类细胞,经特定条件诱导后, MSCs 能在体内或体外环境中分化成神经组织细胞。目前国内、外有许多学者采用 MSCs 移植治疗神经系统疾病(如脑血管病、帕金森病等)均取得了显著疗效,同时也对 MSCs 移植治疗效应的相关机制进行了初步探讨。本文拟就 MSCs 移植治疗神经系统疾病的疗效及相关机制作一综述。现报道如下。

MSCs 移植治疗神经系统疾病的研究现状

MSCs 是一类存在于骨髓基质中的非造血细胞,该细胞于 20 世纪 70 年代被发现,此后研究者们观察到 MSCs 具有干细胞特性,能够进行自我更新,有多向分化的潜能^[1],而且取材容易,体外易于增殖,因此各相关学科都对其进行了广泛研究。Brazelton 等^[2]于 2000 年报道了 MSCs 能够在体外环境中分化成神经元样细胞,并表达神经元特异性核蛋白(neuron-specific nuclear protein, NeuN)及 β -微管蛋白 III。此后有更多的研究者通过实验发现, MSCs 在体内或体外环境下均可向神经细胞分化,呈现神经元或神经胶质细胞表型,如可检测到神经元标志物神经微丝、NeuN、神经元特异性烯醇酶、神经元轴突标志物 Tau-蛋白、星型胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、多巴胺神经元前体细胞标志物 Nurr1 以及 γ -氨基丁酸等^[3-5]。

MSCs 能向神经组织分化这一发现,开辟了神经系统疾病治疗的新领域。许多研究者都建立了多种神经系统疾病模型,通过多种途径将 MSCs 移植到神经组织内,用以探讨 MSCs 进行移植治疗的可行性。目前的研究主要集中在以下方面:如利用 MSCs 移植来修复各种损伤所造成的神经功能缺损;利用 MSCs 移植治疗一些神经退行性疾病(如帕金森病)或者利用 MSCs 作为基因治疗的载体。

目前研究者们已经建立了比较成熟的 MSCs 分离纯化方法,并且能够在体外大量扩增该细胞;同时在建立实验动物相关模型的基础上,对其进行 MSCs 移植干预,取得了大量的成果,这在一定程度上也有助于阐明 MSCs 的生物学特性及其移植治疗效应的相关机制。

MSCs 移植治疗神经系统损伤及其可能机制

MSCs 作为一种干细胞,既能自我更新及多向分化,又可以分泌多种细胞因子,还能通过多种途径参与到神经系统损伤修复过程中,从而改善神经功能。

当神经系统损伤后,机体一般以胶质细胞增生的方式进行

修复,由于神经元和神经纤维组织的再生及修复能力较弱,故容易造成神经功能缺损。当人们发现 MSCs 能向神经组织分化后,很多学者开始研究利用 MSCs 移植来改善缺损的神经功能。如 Mahmood 等^[6]应用 MSCs 向脑内直接注射和静脉注射治疗大鼠外伤性脑损伤(tramatic brain injury, TBI),发现采用这 2 种方法移植到大鼠脑内的 MSCs 均能存活并表达 NeuN,而且 MSCs 移植组大鼠的运动功能及神经功能均较对照组有明显改善。

Li 等^[7]将 MSCs 移植到大脑中动脉梗死(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型体内,使用改良的神经系统疾病严重程度评分(modified neurological severity score, mNSS)来评定大鼠的神经功能,发现实验组大鼠的运动及躯体感觉功能均明显恢复,其 mNSS 较对照组改善显著。这些研究均表明 MSCs 移植治疗神经功能缺损是有效及可行的。

Shen 等^[8]通过随机对照实验发现,治疗组 MCAO 模型大鼠于制模后 24 h 从颈内动脉注射 MSCs,对照组则注射生理盐水,48 h 后进行 mNSS 评分和拐弯测试等,发现治疗组大鼠神经功能恢复情况显著优于对照组,并且其血管再生数量、突触体素表达和少突胶质祖细胞标志物 NG2 阳性细胞数量均显著增加,脑梗死体积缩小。

当 MSCs 移植到生物机体后,该细胞在种种“信号”的诱导下可以迁移至脑组织,并能在特定微环境下分化成神经元及神经胶质细胞,替代受损伤死亡或凋亡的神经细胞,修复损伤神经组织,改善神经功能。

Mahmood 等^[9]通过静脉注射 MSCs 治疗大鼠脑损伤,发现 MSCs 能迁移至大鼠脑部并聚集于脑损伤组织边缘,部分(约有 6%)细胞分化成神经元,另有 13%的 MSCs 能表达 GFAP,而且实验组大鼠神经功能较以前改善显著。

Mimura 等^[10]在体外环境下诱导 MSCs 向施旺(Schwann)细胞分化,并最终得到骨髓间充质干细胞来源的施旺细胞(BMSC-derived Schwann cells, BMSC-DSCs)。将 BMSC-DSCs 移植到坐骨神经被横断的模型大鼠体内,6 个月后发现大鼠坐骨神经离断处聚集 MSCs,呈 P0 蛋白(施旺细胞膜上的一种结构蛋白)和髓鞘相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein)阳性反应,同时还可观察到有郎飞结、轴突及髓鞘重建;电生理检查显示 MSCs 移植组大鼠运动神经传导速度及坐骨神经功能均明显优于对照组。

MSCs 不仅能多向分化,而且还能合成细胞外基质及分泌多种细胞因子,这些神经营养和保护因子可通过不同机制促进神经组织的修复及功能重建。Mahmood 等^[11]利用 MSCs 移植治疗 TBI 模型大鼠,发现大鼠的神经功能得到明显改善,进一步还检测了宿主脑组织内脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)含量,结果表明 MSCs 移植大鼠脑组织内 BDNF 和 NGF 含

量均明显增加,其作用为神经保护、减少神经细胞凋亡及促进神经组织再生等。

Li 等^[7]采用 MSCs 移植治疗 MCAO 模型大鼠,通过 4 个月的观察后发现,实验组大鼠脑损伤侧有部分 MSCs 分化为星形胶质细胞和少突胶质细胞,脑室下区也有胶质细胞增生,此外还发现脑损伤区有较多细胞增生,部分细胞还表达轴突标记物 GAP-43 阳性等。Chen 等^[12]也认为 MSCs 移植可增加 MCAO 模型大鼠脑组织中 bFGF 的表达,并且还可以减少神经组织内的细胞凋亡,改善受损神经功能。Li 等^[13]通过实验后发现,MSCs 能够合成细胞外基质(包括 I 型、II 型胶原蛋白),分泌多种细胞因子如 IL-7、IL-8、骨形态蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)等。这些细胞外基质、细胞因子有助于形成促进神经组织修复的微环境,保护神经元免于凋亡,而且这些生长因子还可以通过 Trk 信号转导系统,激活 MEK/MAPK 和 PI-3K/Akt 途径,进而促进神经组织生长及功能重建,同时还能抑制神经元的凋亡等^[14]。

Akiyama 等^[15]利用绿色荧光蛋白标记 MSCs,将细胞直接注射到免疫抑制大鼠的脱髓鞘脊髓中,发现其 GFP 阳性细胞也呈现髓磷脂碱性蛋白阳性反应;经电镜观察后发现,再生神经轴突呈现中枢及外周髓鞘特点,轴突传导速度加快,表明 MSCs 能进入脱髓鞘脊髓中并形成有功能的髓磷脂,但目前关于 MSCs 合成髓磷脂的具体机制尚不清楚。

此外, MSCs 还可为脑损伤组织提供了某种促分化因子,促进了宿主脑组织内的神经干细胞和前体细胞的增殖、迁移、分化和成熟过程,生成新的脑神经元和胶质细胞,进而促进神经功能改善^[16]。

MSCs 移植治疗神经退行性疾病及其可能机制

临床上帕金森病等神经退行性病变是神经系统治疗难点之一。帕金森病的主要病理机制是脑组织黑质-纹状体通路中的多巴胺能神经元发生退行性改变,导致纹状体内多巴胺含量不足。近年来关于 MSCs 移植治疗帕金森病的实验研究已大量开展,如 Li 等^[17]将经 5 溴-2 脱氧尿苷(BrdU)标记的 MSCs 移植到 PD 模型大鼠右侧纹状体内,并同时设置注射磷酸盐缓冲液的模型组及正常大鼠作为对照,术后第 28 天发现,实验组模型大鼠行为学功能明显改善,经 BrdU 标记的 MSCs 阳性细胞中有部分表现为酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)阳性,说明该细胞能在 PD 大鼠纹状体内存活,并分化为 TH 阳性神经元从而释放多巴胺,起到改善 PD 症状的作用。

Dezawa 等^[18]在体外利用 Notch 胞内区域(Notch Intracellular Domain, NICD, 即 Notch 蛋白水解产物)联合 bFGF、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor)等诱导 MSCs 分化为高表达性的 TH 阳性神经元,并将其用绿色荧光蛋白标记后,移植到 PD 模型大鼠(由 6-OHDA 致单侧毁损模型)纹状体内,术后 4 周时发现 MSCs 移植大鼠 PD 症状明显改善。

MSCs 在体外可以经诱导分化为多巴胺能神经元^[19],在体内也可表达酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)活性^[17],只是分化率较低(约有 0.8% 的 MSCs 呈 TH 阳性反应)。在经转基因操作后,将携带有特定基因(如 TH 基因)的 MSCs 移植到脑组织后,能持续有效地分泌多巴胺^[20],因而能更好地改善帕金森病患者症状。Schwarz 等^[20]用逆转录病毒作为载体,将 TH 和 GTP 环水解酶(GTP cyclohydrolase)基因转入 MSCs,转导后

的 MSCs 能合成、分泌左旋多巴(L-DOPA);将转导成功的 MSCs 注入到帕金森病模型大鼠纹状体内,可从其脑组织中检测到 L-DOPA 及代谢产物,并且与对照组比较,发现前者由阿朴吗啡诱导的旋转实验结果明显改善,以上这些研究均表明, MSCs 移植为 PD 患者治疗提供了新的思路及方法。

Duchenne 肌营养不良是临床上最常见的肌肉组织遗传性变性疾病之一,由于患者 dystrophin 基因缺失,导致其肌细胞膜结构蛋白 dystrophin 蛋白缺乏。有学者采用 MSCs 移植治疗 Duchenne 肌营养不良小鼠,发现该方法能促进小鼠骨骼肌细胞膜骨架蛋白恢复,加快肌肉病理改变好转,其肌电图检查结果亦有明显改善,提示局部骨骼肌肌肉内 MSCs 移植治疗对 Duchenne 肌营养不良具有一定疗效^[21]。

综合目前的相关研究结果, MSCs 移植治疗神经系统疾病的可能机制主要包括以下方面:首先,移植的 MSCs 能够向损伤区域迁移并聚集,而且能够分化为神经组织,因而 MSCs 能够替代因损伤而坏死、凋亡的神经元及神经胶质细胞,弥补损伤造成的神经系统功能缺损;其次, MSCs 可以合成多种活性物质,这些神经营养和保护因子可通过不同机制发挥神经保护作用,减少神经细胞凋亡,同时还可能提供适宜的微环境以促进神经组织修复及功能重建。对于因机体组织发生退行性病变而导致某种有效物质缺乏时, MSCs 经特定操作后可分泌或合成相应物质,表现出显著治疗效应。应用基因技术将某种特定基因转入 MSCs 内,能够促使 MSCs 更有效地分泌神经生长因子及合成生物活性物质,从而提高疗效。如 Kurozumi 等^[22]将 BDNF 基因转染至 MSCs 内,并利用携带有 BDNF 基因的 MSCs 移植治疗 MCAO 大鼠,结果发现实验组大鼠脑组织 BDNF 的表达水平是对照组的 23 倍,其缺血边缘带凋亡细胞数量较对照组明显减少,神经功能亦较对照组显著改善,说明采用转染 BDNF 基因的 MSCs 治疗缺血性脑损伤是可行的,预示基因治疗可能是未来研究重点之一。

MSCs 治疗中的问题与前景展望

MSCs 以其良好的干细胞特性及诸多优点已成为干细胞工程和基因工程最有潜力的研究重点之一,但是 MSCs 用于细胞移植与基因治疗才刚刚起步,有很多问题尚待解决,如 MSCs 在脑内分化为神经细胞的确切机制; MSCs 细胞移植后能否整合入宿主的神经系统环路中;能否与其它神经细胞产生突触联系进而分泌神经递质;其合成多巴胺等活性物质的具体机制等,这些问题均有待于进一步研究。

缺血性脑血管病患者采用 MSCs 移植治疗主要有静脉输注和动脉输注 2 条途径;退行性疾病如帕金森病多采用立体定位注射法。中枢神经系统损伤后所出现的血脑屏障开放可能有助于 MSCs 选择性进入脑受损区域内。此外,脑损伤后炎症反应也有可能诱导及促进 MSCs 发生迁移,如脑缺血后 1~7 d 期间,脑组织中单核细胞趋化因子-1、巨噬细胞炎症蛋白-1 和 IL-8 水平平均明显增高,这些细胞因子与 MSCs 表达的受体(如 IL-1R、IL-4R、IL-8R 及趋化因子受体等)相互作用,能促进 MSCs 向脑缺血区迁移^[23]。关于 MSCs 通过血脑屏障的机制及过程仍有待深入研究。

由于 MSCs 在体外的传代次数过多会影响其生物学活性,而移植细胞数量的增多也会加大对其安全性的顾虑,因此确定

合适的细胞移植数量显得尤为重要,但目前还很难将移植细胞数量进行统一标准化。Mahmood 等^[24]发现采用不同剂量(2×10^6 , 4×10^6 , 8×10^6 个细胞)静脉注射 MSCs 治疗 TBI 大鼠 3 个月,各不同剂量组大鼠 BDNF 水平均较对照组显著增加,并且后 2 组大鼠 NGF 水平及神经功能较对照组和小剂量组明显提高。Shen 等^[8]通过研究发现,治疗组 MCAO 模型大鼠经动脉注射 2×10^6 个 MSCs 后,其疗效也比较满意。Bang 等^[25]在一项利用体外扩增 MSCs 移植治疗 MCAO 患者过程中发现,当向患者静脉内输注 1×10^8 个 MSCs 细胞后,发现治疗组患者 Barthel 指数及改良 Rankin 评分均较对照组有明显改善,随访 1 年后未发现与移植细胞相关的血清学或影像学上的任何不良反应。

关于 MSCs 分化为神经元细胞后其电生理特性和神经递质的分泌,有许多学者发现,维甲酸加胶质细胞源神经营养因子及配合使用低浓度血清能够有效诱导 MSCs 向成熟神经细胞分化,且分化的神经元样细胞具有快速激活、失活的电压依赖性 Na^+ 通道,类似于正常神经细胞的电生理特性^[26]。然而 Wenisch 等^[27]在不使用诱导分化因子的情况下,通过电镜观察到 MSCs 可分化为幼稚的神经元细胞,但并未探测到任何自发或在电刺激下产生的电信号。由 MSCs 分化而来的神经元细胞其电生理特性仍需进一步研究,有资料表明,在适宜条件作用下,兔 MSCs 可在体外分化成神经干细胞及神经元样细胞,并且能合成及分泌神经递质如去甲肾上腺素等^[28]。

MSCs 因其具有来源丰富、采集方便、安全及具有多向分化等优点,正日益受到各相关学科的高度重视。未来的研究方向不应仅是单纯的 MSCs 移植,而应与基因技术相融合,使 MSCs 既可分泌生长因子保护退变的神经元,又能分泌神经活性物质发挥治疗作用。随着对 MSCs 移植治疗效应研究的不断深入, MSCs 的临床应用一定会更加广泛。

参 考 文 献

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284: 143-147.
- [2] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 2000, 290: 1775-1779.
- [3] Yang LY, Zheng JK, Wang CY, et al. Differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells into Schwann-like cells in vitro. *Chin J Traumatol*, 2005, 8: 77-80.
- [4] Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells*, 2005, 23: 392-402.
- [5] Long X, Olszewski M, Huang W, et al. Neural cell differentiation in vitro from adult human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 2005, 14: 65-69.
- [6] Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery*, 2004, 55: 1185-1193.
- [7] Li Y, Chen J, Zhang CL, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*, 2005, 49: 407-417.
- [8] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience*, 2006, 137: 393-399.
- [9] Mahmood A, Lu D, Lu M, et al. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*, 2003, 53: 697-703.
- [10] Mimura T, Dezawa M, Kanno H, et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg*, 2004, 101: 806-812.
- [11] Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 2004, 21: 33-39.
- [12] Chen J, Li Y, Katakowski M, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res*, 2003, 73: 778-786.
- [13] Li Y, Chopp M, Chen J, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 1311-1319.
- [14] Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, et al. Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci*, 2004, 24: 6650-6658.
- [15] Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *J Neurosci*, 2002, 22: 6623-6630.
- [16] Li Y. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of bone marrow stromal cells. *Neurology*, 2001, 56: 1666-1672.
- [17] Li Y, Chen J, Wang L, et al. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2001, 316: 67-70.
- [18] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest*, 2004, 113: 1701-1710.
- [19] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, 418: 41-49.
- [20] Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, et al. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 2539-2549.
- [21] 谢模英, 杨慧民, 褚倩, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗肌 Duchenne 营养不良型 mdx 小鼠后的肌电图和 dystrophin 蛋白表达改变. *中华物理医学与康复杂志*, 2005, 27: 523-525.
- [22] Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, et al. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther*, 2004, 9: 189-197.
- [23] Ji JF, He BP, Dheen ST, et al. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem Cells*, 2004, 22: 415-427.
- [24] Mahmood A, Lu D, Qu C, et al. Long-term recovery after bone marrow stromal cell treatment of traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg*, 2006, 104: 272-277.
- [25] Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*, 2005, 57: 874-882.
- [26] 郭再玉, 姜晓丹, 徐如祥. 骨髓基质细胞源性神经干细胞体外分化及电生理特性的研究. *中华神经医学杂志*, 2005, 4: 545-550.
- [27] Wenisch S, Trinkaus K, Hild A, et al. Immunochemical ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. *Bone*, 2006, 38: 911-921.
- [28] 陈剑荣, 徐如祥, 金澎, 等. 骨髓源性神经干细胞去甲肾上腺素神经递质变化的实验研究. *中国临床解剖学杂志*, 2004, 22: 638-640, 651.

(收稿日期: 2006-01-12)

(本文编辑: 易 浩)