

综述

脊髓组织工程构建中的种子细胞

王树森, 罗卓荆

(第四军医大学西京医院全军骨科研究所 710032 西安市)

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-10-0622-03

目前对脊髓损伤仍缺少有效的治疗措施。近年来促进脊髓功能恢复的策略主要有: (1) 应用神经营养因子促进轴突的存活与再生; (2) 应用下游信号分子促进轴突的再生; (3) 中和使轴突再生失败的抑制性分子; (4) 细胞移植。细胞移植治疗脊髓损伤的目的主要有两个, 一是在损伤后形成的囊腔为再生轴突提供支架; 二是替代损伤缺失的细胞和组织。目前随着组织工程和神经科学的发展, 人们逐渐意识到解决脊髓损伤的关键在于神经的组织工程。因

此, 在脊髓组织工程构建中选择合适的种子细胞成为重要的一环, 现对脊髓组织工程构建中种子细胞的研究进展综述如下。

1 嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)

OECs 既具有周围神经系统雪旺细胞的特性, 也具有中枢神经系统星形胶质细胞的特点。嗅神经是体内唯一可以在成体有规律再生的中枢神经, OECs 就存在于具有终生再生功能的中枢神经嗅球中的大胶质细胞, 可在整个神经通路中对再生的神经纤维包裹保护, 防止轴突与周围的其它胶质细胞接触, 形成适合神经轴突生长的微环境^[1]。因此, OECs 为自体移植提供了可能性。Ramaon-Cueto^[2]在大

第一作者简介: 男 (1968-), 医学博士, 主治医师、讲师, 研究方向: 脊柱脊髓损伤

电话: (029)83375288 E-mail: Wangss@fmmu.edu.cn.

7 参考文献

1. Minguell J J, Erices A, Conget P, et al. Mesenchymal stem cells [J]. Experimental and Biological Medicine, 2001, 226 (6): 507-520.
2. Lin JR, Guo KY, Li JQ, et al. In vitro culture of human bone marrow mesenchymal stem cell clones and induced differentiation into neuron-like cells [J]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 251-253, 264.
3. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC, et al. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells [J]. Cytotherapy, 2001, 3 (5): 393-396.
4. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multineage potential adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284: 143-147.
5. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies [J]. Exp Hematol, 2002, 30(7): 783-791.
6. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, et al. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 313: 503-508.
7. Jin K, Mao XO, Bateur S, et al. Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression [J]. Exp Neurol, 2003, 184 (1): 78-79.
8. Sanchez RJ, Song S, Cardozo PF, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro [J]. Exp Neurol, 2000, 164(2): 247-256.
9. Zhang H, Wang JZ, Sun HY, et al. The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitor cells and their differentiation [J]. Chin J Traumatol, 2004, 7(1): 3-6.
10. Garcia R, Aguiar J, Alberti E, et al. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316 (3): 753-754.
11. 杨立业, 刘相名, 惠国桢, 等. 丹参诱导鼠骨髓间充质细胞向神经元分化 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2003, 2(1): 29-32.
12. 刘金保, 董晓先, 董燕湘, 等. 当归诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞 [J]. 广东医学, 2003, 24(5): 466-468.
13. 肖庆忠, 温冠媚, 李浩威, 等. 麝香组分诱导成年大鼠骨髓间充质干细胞体外定向分化为神经元样细胞的能力 [J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(6): 405-408.
14. 贾延劫, 杨于嘉, 周燕, 等. 黄芩素诱导大鼠骨髓基质细胞向神经细胞分化的研究 [J]. 中华医学杂志, 2002, 82 (19): 1337-1341.
15. Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD, et al. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells [J]. J Neurosci, 2002, 22(15): 6623-6630.
16. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2199-2204.
17. Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation [J]. Neuroreport, 2000, 11(13): 3001-3005.
18. Wu S, Suzuki Y, Ejiri Y, et al. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord [J]. J Neurosci Res, 2003, 72(3): 343-351.
19. Rismanchi N, Floyd CL, Berman RF, et al. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols [J]. Brain Res, 2003, 991(1-2): 46-55.

(收稿日期: 2004-10-12 修回日期: 2005-03-09)

(本文编辑 卢庆霞)

鼠横断脊髓中注射 OECs, 5-羟色胺轴突可以穿越损伤区域, OECs 可以在损伤旁侧沿着脊髓长轴迁移, 示踪法表明再生轴突可长达 1.5cm。

除了修复能力, 移植的细胞还要符合以下的标准, 以适应临床应用的需要。例如, 可以从患者获得相关组织行自体移植, 以避免移植排斥反应的发生, 并在一定的培养条件下可以获取足够数量的细胞。人类的 OECs 可以直接通过嗅粘膜获得而没有明显的不良反应, 易于纯化和大量扩增。OECs 移植可以使脱髓鞘的轴突再髓鞘化^[3], 并促进轴突的再生^[4]。再生的神经纤维可以长出嗅鞘细胞桥索之外, 长入损伤对侧的宿主脊髓内。

OECs 如何促进中枢神经再生目前尚不清楚。主要归因于 OECs 可以分泌多种神经营养因子, 以保护神经元的生存和提供神经轴突生长及髓鞘化所需的细胞外基质等。OECs 移植促进功能恢复也许有着多种无需损伤通路重建连接的机制。(1)在脊髓部分损伤的动物, 可以建立代偿性的旁路而不受损伤的直接影响。(2)对于不完全性或完全性横断脊髓的动物再生的下行纤维可以在无突触的位点释放单胺类物质, 从而影响反射通路的兴奋性, 或提升运动神经元的活动度。(3)移植 OECs 可能改善损伤局部的微环境, 保护周围组织中残余神经纤维的功能, 它们也可能分泌神经营养因子, 减少由胶质细胞或崩解的髓鞘产生的轴突再生抑制性因子, 使脱髓鞘的轴突再髓鞘化。有研究发现在没有轴突再生时行为学观察运动功能得到了改善^[5]。

OECs 细胞外基质在中枢神经系统修复中也有重要作用。(1)提供细胞支架。在未经纯化而用于移植的 OECs 中很可能含有细胞外基质, 可以提供结构性支持并保持足够的张力, 作为细胞粘附和迁移的基质, 调节细胞的分化和代谢, 促进细胞粘附于基底膜。细胞外基质在髓鞘形成、保护神经元、调节突触的整合中也发挥了重要的作用^[6]。(2)分泌神经营养因子。在未经纯化即行移植的 OECs 中存在着其它细胞及其细胞外基质的组分, 可能提供对于形成髓鞘、轴突再生和突触形成中所需的下游信号。它们也可能分泌对于促进修复进程发挥作用的生长因子。例如血管内皮生长因子就是由平滑肌细胞所分泌的, 在中枢神经系统损伤愈合中发挥着重要作用^[7]。

对于 OECs 移植也有很多争议。OECs 移植可见神经纤维再生, 但还没有直接的证据表明通过 OECs 桥索的再生轴突可以穿越脊髓损伤区域重建功能性连接。Williams 等^[8]在嗅神经损伤大鼠没有观察到 OECs 的反应性增殖和迁移, 表明从嗅上皮新生的神经穿过的胶质导管是早已由其它胶质细胞所形成的。Boyd 等^[9]实验表明, OECs 既不与脊髓轴突相接触, 也不能形成髓鞘或基模板。Gomez 等^[10]研究显示, OECs 移植并不能促进大鼠后根神经纤维长入颈髓。

OECs 的移植还面临一大难题, 那就是如何移植才能更好地促进轴突再生。将 OECs 直接移植于脊髓全横断断端间隙, OECs 悬液与脊髓断面接触不佳, 难以迁移进入脊髓实质内, 不能建立桥梁。将 OECs 悬液以注射的方式植

入脊髓断端实质内, 可能会对脊髓造成继发性损伤, 加重局部的水肿和空洞的形成。

2 少突胶质细胞

少突胶质细胞包裹髓磷脂于中枢神经的轴突周围, 但在轴突再生效应上却与雪旺细胞完全相反。(1)少突胶质细胞常常是一个正常细胞要包绕多条轴突, 一旦少突胶质细胞损伤或退变则再生的轴突无轨迹可寻。(2)在轴突断裂修复时, 少突胶质细胞前体向靶区生长晚于轴突, 轴突先向前迁移, 少突胶质细胞再生迁移进行髓鞘包裹, 对先迁移的轴突无方向诱导作用, 从而导致轴突生长迁移“迷路”。(3)产生抑制性因子, 如 GIF、N-250、N-35 等, 抑制并终止轴突生长。少突胶质细胞主要被用于移植治疗由辐射和化学损伤引起的轴突脱髓鞘损伤的动物模型。Blakemore 等^[11]报道其对髓鞘有良好的再生作用, 并能迁移再生 6mm。而在 SCI 动物实验中, 少突胶质细胞对轴突修复再生有较强的抑制作用。同时, 人类的少突胶质细胞或其前体细胞的培养、传代尚没有成功。因此, 人类的少突胶质细胞移植治疗中枢神经损伤的可能性很小。

3 激活的巨噬细胞

巨噬细胞和其它免疫细胞在中枢神经系统损伤后释放抑制轴突再生的细胞因子, 同时提高了抑制再生的蛋白多糖的合成^[12]。但激活的巨噬细胞却能促进神经的再生, 这是由于其可以清除变性崩解的含有毒素和抑制因子的组织碎片, 同时可以释放促进再生的神经营养因子和细胞因子^[13]。激活的巨噬细胞可以促进局部有利于神经再生的细胞外基质的增多, 可以通过释放细胞因子而直接刺激局部胶质细胞分泌神经营养因子。因此, 在脊髓损伤后移植巨噬细胞将是一种可能的新方法, 它将营造有利于神经轴突再生的微环境, 并通过释放细胞因子和与其它非神经细胞的直接相互作用而促进神经轴突再生。因此中枢神经再生可以用被外周神经激活的自体巨噬细胞局部注射而得以促进。

4 雪旺细胞(Schwann cell, SC)

SC 有很多适合移植治疗中枢神经系统损伤的性质。SC 易于从周围神经组织获得、纯化和大量扩增。Richardson 首先将坐骨神经植入损伤的脊髓, 观察到这种外周神经移植体能吸引众多的中枢神经元轴突长入。Bravin 将橄榄核小脑纤维束切断, 移植入 SC 悬液后发现它能有效地桥接横断间隙, 不但引导再生轴突生长入小脑皮质, 而且还能重新支配靶细胞。以 Hoechst33342 标记 SC, 发现带有荧光的 SC 移植入 CNS 后能够存活和增殖, 并在再生的轴突外产生髓鞘。

SC 在轴突再生中的作用主要有:(1)分泌神经营养因子(NTF)。SC 产生的 NTF 对神经元的存活具有协同作用, 并促进神经突起的生长。(2)产生细胞外基质和细胞粘附

分子。SC 能合成和分泌细胞外基质,包括层粘连蛋白、纤维粘连蛋白以及胶原、硫酸肝素等。这些蛋白都有不同程度的支持和促进神经元轴突生长的能力。

但 SC 并不是理想的移植细胞,星形胶质细胞对 SC 的反应限制了 SC 在中枢神经系统损伤中的应用。SC 在发育过程中向中枢神经系统的迁移只有在没有星形胶质细胞的情况下才可以观察到,并且会在星形胶质细胞的边缘被阻止,移植的 SC 不能与星形胶质细胞同在^[13]。同时 SC 并不能和宿主组织很好地整合,移植 SC 后往往引发星形胶质细胞的大量增生,继发上调硫酸软骨素等抑制性因子的数量,抑制细胞迁移、再髓鞘化和轴突再生。虽然 SC 移植可以支持损伤轴突向 SC 桥索内生长,但轴突的再生仅限于移植的局部区域,再生轴突不能向外长出延伸到宿主的中枢神经系统。

5 神经干细胞(neural stem cell, NSC)

NSC 移植最明确的目的就是替代缺失的细胞,还有着其它的潜在功能,包括分泌促进神经再生的各种因子,调节免疫反应酶解抑制性瘢痕,激发内在的干细胞活性,清除细胞碎片,建立新的细胞桥索,保护细胞免于继发损伤,重建其它的对功能恢复必不可少的非神经因素,如血管等。一些学者已经在实验中移植了 NSC,不仅使其存活、长距离迁移,并能够在正确的解剖位置与宿主组织相整合,使轴突再髓鞘化^[14]。这种移植提高了电生理检测中的神经传导速度,也提高了功能恢复程度。但目前内在的 NSC 只能来源于中枢神经系统,只有存在于大脑的一些部位和脊髓的室管膜的 NSC 可以被分离、培养、扩增后用于移植治疗^[15]。一些学者认为,NSC 可以由其它组织细胞转化而来,如血液、骨髓和脂肪,但这种细胞可以引发大量的细胞融合,向 NSC 的转化至少目前是不现实的^[16]。因此,干细胞移植最大的障碍是这种细胞只能来源于中枢神经系统,只能通过手术的方法获得。同时需要很长时间去扩增移植所需的大量细胞。

NSC 移植入体内后主要有三种结局:(1)实现功能性整合、迁移、分化;(2)在移植部位处于休眠状态;(3)因移植过程中受损或移植后局部条件不适合而在移植部位死亡。NSC 移植后的转归主要受移植时间影响,如 NSC 在损伤后 9d 以内移植,此时因仍有兴奋性氨基酸等毒性物质,会杀伤 NSC,而在第 9 天后移植,效果就会明显提高。

NSC 具有多项分化潜能,但脊髓的微环境却仅适合 NSC 分化为胶质细胞而不利于其分化为神经元。许多成体移植研究表明,移植的 NSC 大多分化成神经胶质细胞,移植后在体内发生迁移的也大多为胶质细胞,分化为神经元的数量和迁移的距离均不能达到治疗的需求。如何将 NSC 定向分化为神经元将是重要的课题。

6 参考文献

1. Woodhall E, West AK, Chuah MI, et al. Cultured olfactory en-

sheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors[J]. Brain Res, 2001, 88(1-2): 203-213.

- Santos-Benito FF, Ramon-Cueto A. Olfactory ensheathing glia transplantation: a therapy to promote repair in the mammalian central nervous system[J]. Anat Rec, 2003, 271B(1): 77-85.
- Kato T, Honmou O, Ueda T, et al. Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord[J]. Glia, 2000, 30(3): 209-218.
- Nash HH, Borke RC, Anders JJ. Ensheathing cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord [J]. J Neurosci, 2002, 22(16): 7111-7120.
- Ribotta MG, Provencher J, Feraboli-Lohnherr D, et al. Activation of locomotion in adult chronic spinal rats is achieved by transplantation of embryonic raphe cells reinnervating a precise lumbar level[J]. J Neurosci, 2000, 20(13): 5144-5152.
- Dityatev A, Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(6): 456-468.
- Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. J Clin Invest, 2003, 111(12): 1843-1851.
- Williams SK, Franklin RJ, Barnett SC. Response of olfactory ensheathing cells to the degeneration and regeneration of the peripheral olfactory system and the involvement of the neuregulins[J]. J Comp Neurol, 2004, 470(1): 50-62.
- Boyd JG, Lee J, Skihar V, et al. LacZ-expressing olfactory ensheathing cells do not associate with myelinated axons after implantation into the compressed spinal cord[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(7): 2162-2166.
- Gomez VM, Averill S, King V, et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells fails to promote significant axonal regeneration from dorsal roots into the rat cervical cord [J]. J Neurocytol, 2003, 32(1): 53-70.
- Blakemore WF, Gilson JM, Crang AJ. Transplanted glial cells migrate over a greater distance and remyelinate demyelinated lesions more rapidly than endogenous remyelinating cells[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(3): 288-294.
- Jones LL, Yamaguchi Y, Stallcup WB, et al. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors[J]. J Neurosci, 2002, 22(7): 2792-2803.
- Lakatos A, Franklin RJ, Barnett SC. Olfactory ensheathing cells and Schwann cells differ in their in vitro interactions with astrocytes[J]. Glia, 2000, 32(3): 214-225.
- Diers-Fenger M, Kirchhoff F, Kettenmann H, et al. AN2/NG2 protein-expressing glial progenitor cells in the murine CNS: isolation, differentiation, and association with radial glia[J]. Glia, 2001, 34(3): 213-228.
- Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, et al. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus[J]. J Neurosci, 2000, 20(23): 8727-8735.
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes[J]. Nature, 2003, 425(6961): 968-973.

(收稿日期: 2004-12-14 修回日期: 2005-02-16)

(本文编辑 彭向峰)