

综述

人脐带间充质干细胞及其治疗脊髓损伤的研究进展

高璐, 贾连顺

(第二军医大学附属长征医院骨科 200003 上海市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.11.15

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-11-0952-03

脊髓损伤(spinal cord injuries, SCI)是人类致残率最高的疾患之一, 全球范围内脊髓损伤的年发病率大约为 22/100 万^[1]。因为脊髓轴突再生能力有限, 恢复的难度大, 常导致严重的神经后遗症。对 SCI 治疗方法的探索已成为各医疗机构的研究热点。近年来, 随着干细胞生物学研究的发展, 干细胞移植为 SCI 后神经修复及再生提供了新的思路。其中, 人脐带间充质干细胞(HUC-MSCs)因易于分离扩增、来源丰富等优势已成为研究热点之一。虽然目前 HUC-MSCs 移植治疗 SCI 面临的困难和问题还有很多, 但随着对其生物学特性的深入研究、动物实验成果和经验的不断积累, HUC-MSCs 可能为 SCI 和其他神经系统疾病患者的治疗提供了一条新的途径。

1 HUC-MSCs 的特征及分离培养

2003 年, Mitchell 等^[2]首次自脐带沃顿胶(Wharton's Jelly)中成功分离出了间充质样干细胞并证实了其神经分化潜能, 为利用 HUC-MSCs 治疗 SCI 提供了理论依据, 也为应用细胞移植技术治疗 SCI 提供了更广阔的研究空间和应用前景。由于 HUC-MSCs 存在于分娩后的废弃物——脐带中, 不存在伦理及道德问题, 相较于目前最常用的骨髓间充质干细胞(BM-MSCs), 无论从细胞数量、扩增水平还是多次传代后的分化潜能上, 都有一定优势^[3-5]。与脐带血干细胞(ucb-MSCs)相比, 从脐带中成功分离出 MSCs 的概率最大仅为 63%, 而从脐带 Wharton's Jelly 和骨髓中分离出 MSCs 的成功率为 100%, 即使处理时间延迟至 48h^[6]。种子细胞的采集过程简单, 易于冷冻和保存。Ma 等^[7]研究发现人脐带 Wharton's Jelly 中的 HUC-MSCs 不表达移植物抗宿主病相关的抗原主要组织相容性复合体 II (MHC-II), 仅低表达 MHC-I, 可作为较好的同种异体细胞移植的种子细胞来源。Kermani 等^[8]将增强型绿色荧光蛋白(EGFP)和人类脑源性神经营养因子(hBDNF)导入 HUC-MSCs, 获得了稳定表达外源性基因的细胞系, 从而证明了 HUC-MSCs 的易转染性, 使其可能成为良好的转基因靶细胞。HUC-MSCs 在向脂肪细胞分化的潜能上相对

较弱; 与 BM-MSCs 相比, 具有更短的倍增时间, 但在传代细胞群中也表现出了较大的衰老率^[9]。

目前分离培养 HUC-MSCs 主要通过植块法或酶消化法^[10, 11], 酶消化法操作技术要求较高, 耗时较长, 分离后的培养系中较易见到造血细胞、内皮细胞或平滑肌细胞的混杂; 而植块法则操作相对简单, 并且分离后能够更好地保持细胞活力、减少污染机会。Zhu 等^[12]采用复合胶原酶、中性蛋白酶-II、透明质酸酶三种酶消化 3h, 然后加入 PBSA 溶液稀释, 离心后也可以快速大量分离出 HUC-MSCs, 但成本较高。

2 HUC-MSCs 的神经分化潜能

早在 2003 年, Mitchell 等^[2]就从 HUC 中分离出了间充质样干细胞。他们应用 Woodbury 等^[13]的方法先用碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)预处理过夜, 再用多种化学诱导剂进行诱导。结果发现, 大部分细胞转变为神经元样细胞。此后, 科研工作者又进行了大量的尝试, 结果发现以下方法均可成功诱导 HUC-MSCs 向神经系统细胞分化。

Fu 等^[14, 15]使用神经元培养基进行诱导, 发现 3d 后 HUC-MSCs 开始表达神经元抗核抗体和神经微丝, 第 6 天时细胞聚集、胞体回缩, 并开始表达红藻氨酸受体和谷氨酸脱羧酶; 第 9~12 天时 87% 的 MSCs 都可表达神经微丝, 并可检测到谷氨酸诱发的内向电流, 表明这时的细胞已转化为成熟神经元。他们还发现如果再加入音猬因子(sonic hedgehog)和 bFGF, 还可得到表达酪氨酸羟化酶的多巴胺能神经元。Ding 等^[16]使用含有 bFGF、 β -巯基乙醇、神经营养因子-3 (NT-3)、hBDNF 和神经生长因子的培养基诱导 HUC-MSCs, 作用 14d 后, 60% 的 MSCs 微管相关蛋白染色阳性, 32% 的 MSCs 神经胶质酸性蛋白染色阳性, 还有一部分细胞表达 γ -氨基丁酸(GABA), 进一步从表型特征和分子特征验证, 均证实成功完成了向神经细胞的诱导分化。

HUC-MSCs 除了具有向神经细胞分化的潜能, 还可产生大量的多巴胺神经元营养因子, 如神经胶质细胞源性的神经营养因子(GDNF)和纤维母细胞生长因子-20 (FGF-20); 同时还可分泌其他几种神经营养因子, 如白介素-6(IL-6)、FGF-2 和脑源性神经营养因子(BDNF)。除此

第一作者简介: 男(1986-), 医学硕士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (021)81886806 E-mail: gaoluray001x@126.com

通讯作者: 贾连顺 E-mail: jialianshun@163.com

之外,相较于 BM-MSCs, HUC-MSCs 在分化前后都可产生更多的粒细胞集落刺激因子、血管内皮生长因子和 GDNF。这些营养因子的产生可能解释了动物实验中神经功能修复的机制^[17]。

3 HUC-MSCs 治疗 SCI

3.1 HUC-MSCs 单独移植

Hu 等^[18]将人脐带 MSCs 移植到 SCI 24h 后大鼠模型的损伤部位, 5 周后大鼠的下肢运动功能得到显著改善, 而且损伤部位的神经微丝长度和类圆锥结构的数量显著增加, 移植的 HUC-MSCs 存活, 并短距离迁移生长, 同时还能释放神经营养因子和 NT-3。Yang 等^[19]分别将未处理的 HUC-MSCs 用神经元条件培养基培养 3d 和 6d 的 HUC-MSCs 移植到大鼠的 SCI 部位, 并设立对照组, 3 周后发现与对照组相比, 移植 HUC-MSCs 的三组大鼠运动功能显著改善, 皮质脊髓束轴突再生增加, 神经微丝数目也有增多, 移植的 MSCs 可在体内存活 16 周, 并可产生人中性粒细胞激活蛋白-2、NT-3 等多种可促进脊髓恢复的生长因子, 从而证实了单独移植 HUC-MSCs 治疗 SCI 的可行性。

3.2 HUC-MSCs 联合细胞移植

诸多研究已经证实雪旺细胞(schwanncells, SCs)在中枢及外周神经损伤修复中的作用, SCs 对损伤部位微环境的改造作用可能对移植的干细胞产生积极的影响。朱玉海等^[20]应用 SCs 与 HUC-MSCs 联合移植, 结果显示联合移植大鼠自体激活雪旺细胞(AASCs)组的 HUC-MSCs 存活率高, NF-200 及 GFAP 阳性染色面积均明显高于单纯移植 HUC-MSCs 组, 大鼠后肢运动功能明显好转, BBB 评分达 15 分左右, 生物素葡聚糖胺(BDA)标记的再生神经纤维延伸至损伤远端大于 1cm。证实了 AASCs 对 HUC-MSCs 具有支持作用, 其机制可能为: ①充当“营养因子泵”作用, 在损伤局部持续分泌多种神经生长因子及细胞外基质, 促进神经再生; ②充当“细胞支架”, 桥接损伤区缺损, 引导轴突再生; ③AASCs 混悬液中存在的巨噬细胞能够吞噬胶质瘢痕, 清除神经再生机械屏障。

3.3 HUC-MSCs 联合生长因子移植

生长因子可以通过信号转导系统促进或抑制细胞的分裂增殖、迁移和基因表达。将 HUC-MSCs 与适当的生长因子联合移植, 以促进 HUC-MSCs 在体内向神经细胞分化并延长存活的时间, 是移植 HUC-MSCs 时可以考虑的策略之一。Zhang 等^[21]将 HUC-MSCs 诱导成的神经球与脑源性神经营养因子(BDNF)联合移植到 SCI 大鼠模型, 结果发现与单一移植 HUC-MSCs 相比, 联合移植后的 HUC-MSCs 更大比例的表达 β 微管蛋白-3 和 MAP-2 抗体等神经元特异性分子; 并更多地向成熟的类神经元细胞和类少突胶质细胞分化; 大鼠移植后 BBB 评分也是联合移植组最高; 经 NF-200 阳性染色和荧光金逆行束路追踪技术检测, 联合移植组的轴突再生情况比对照组有显著提高。从

而证实 HUC-MSCs 和 BDNF 联合移植对 SCI 有良好的促恢复作用。

3.4 HUC-MSCs 联合药物移植

SCI 后会引发一系列诸如炎性改变、瘢痕组织形成等的病理改变, 对 SCI 的恢复极为不利, 因此移植 HUC-MSCs 时联合应用相关药物如抗炎药等也是可考虑的策略之一, 以提高移植细胞存活率并延长存活时间。目前虽然还没有直接应用 HUC-MSCs 与药物联合移植治疗 SCI 的实验报道, 但相关实验已经证实了这一思路的有效性。Xu 等^[22]使用软骨素酶联合雪旺细胞移植治疗 SCI, 发现联合移植组比单一移植雪旺细胞组和对照组的轴突再生情况更为良好, 其原因可能为硫酸软骨素酶通过降解 SCI 后局部的抑制性细胞外基质硫酸软骨素蛋白多糖(CSPGs), 改善局部的微环境, 使之更有利于轴突的生长。Bretzner 等^[23]将咯利普兰与嗅鞘细胞联合移植, 发现可以改善单独移植嗅鞘细胞时发生的红核脊髓束大量细胞萎缩及再生相关基因表达受限的现象。Khalathary 等^[24]将儿茶素(epigallocatechin gallate)注入 SCI 的大鼠体内, 结果发现儿茶素(EGCG)对 SCI 修复也有很强的促进作用。

4 存在的问题与展望

HUC-MSCs 移植治疗 SCI 的研究才刚起步, 目前的研究之所以仅局限于动物模型的实验研究, 并未应用于临床, 就是因为目前面临的问题和困难还有很多, 主要有: ①需要进一步阐明 HUC-MSCs 的生物学特点, 以更好地诱导其向神经细胞分化; ②优化细胞分离培养技术, 探索更加高效、经济、方便的分离培养手段; ③多次传代和诱导分化后细胞恶变风险的评估与预防; ④进一步降低同种异体的 HUC-MSCs 的免疫源性问题; ⑤探索诱导后细胞植入时机及植入方式的选择; ⑥移植后细胞修复损伤的机制还有待进一步研究。

今后的研究重点应放在继续通过动物实验深入探索 HUC-MSCs 在体内的生物学效应, 将 HUC-MSCs 的取材、分离、培养和鉴定方法等标准化, 探索细胞相关信号分子和传导通路在诱导分化和机体免疫中所起的作用等方面, 从而加速间充质干细胞的研究并为今后的临床应用打下基础。相信随着组织工程技术的逐步规范与成熟, HUC-MSCs 的科学利用必将为 SCI 的治疗提供更加广阔的前景。

5 参考文献

1. Serge R, Martin S, Michal S, et al. Spinal cord injury: time to move[J]. J Neurosci, 2007, 27(44): 11782-11792.
2. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia [J]. Stem Cells, 2003, 21(1): 50-60.
3. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of the stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro

- surveys[J]. Stem Cells, 2007, 25(2):319-331.
4. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow[J]. Stem Cells, 2007, 25(6):1384-1392.
 5. Lund RD, Wang S, Lu B, et al. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease [J]. Stem Cells, 2007, 25(3):602-611.
 6. Shetty P, Cooper K, Viswanathan C. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potentials of cord matrix, cord blood, and bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Asian J Transfus Sci, 2010, 4(1):14-24.
 7. Ma L, Feng XY, Cui BL, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells[J]. Chin Med J (Engl), 2005, 118(23):1987-1993.
 8. Kermani AJ, Fathi F, Mowla SJ. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy[J]. Rejuvenation Res, 2008, 11(2):379-386.
 9. Troyer DL, Weiss ML. Concise review: Wharton's Jelly-derived cells are a primitive stromal cell population [J]. Stem Cell, 2008, 26(5):591-599.
 10. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, et al. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors[J]. Stem Cells, 2005, 23(2):220-229.
 11. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord[J]. Stem Cells, 2004, 22(7):1330-1337.
 12. Zhu JX, Shen ZL, Qin JB, et al. A novel method to isolate mesenchymal stem cells from the human umbilical cord [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(6):1164-1169.
 13. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4):364-370.
 14. Fu YS, Shih YT, Cheng YC, et al. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons in vitro [J]. J Biomed Sci, 2004, 11(5):652-660.
 15. Fu YS, Cheng YC, Lin MY, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism[J]. Stem Cells, 2006, 24(1):115-124.
 16. Ding DC, Shyu WC, Chiang MF, et al. Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model [J]. Neurobiol Dis, 2007, 27(3):339-353.
 17. Fan CG, Zhang QJ, Zhou JR. Therapeutic potentials of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord[J]. Stem Cell Rev Rep, 2011, 7(1):195-207.
 18. Hu SL, Luo HS, Li JT, et al. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Crit Care Med, 2010, 38(11):2181-2189.
 19. Yang CC, Shih YH, Ko MH, et al. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord [J]. PLoS One, 2008, 3(10):e3336.
 20. 朱玉海, 冯世庆, 孔晓红, 等. 人脐带间充质干细胞与自体激活雪旺细胞联合移植修复脊髓损伤的实验研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2009, 11(8):747-751.
 21. Zhang L, Zhang HT, Hong SQ, et al. Cocultured Wharton's jelly cells-derived neurospheres and BDNF promote functional recovery after rat spinal cord transection [J]. Neurochem Res, 2009, 34(11):2030-2039.
 22. Xu YQ, Feng SQ, Wang P, et al. The combined therapy of chondroitinase and Schwann cells transplantation after spinal cord injury in rats[J]. Chin J Exp Surg, 2010, 27(7):972-975.
 23. Bretzner F, Plemel JR, Liu J, et al. Combination of olfactory ensheathing cells with local versus systemic cAMP treatment after a cervical rubrospinal tract injury [J]. J Neurosci Res, 2010, 88(13):2833-2846.
 24. Khalatbary AR, Tiraihi T, Boroujeni MB, et al. Effects of epigallocatechin gallate on tissue protection and functional recovery after contusive spinal cord injury in rats [J]. Brain Res, 2010, 13(6):168-175.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-05-10)

(本文编辑 卢庆霞)