

干细胞移植修复脊髓损伤的研究进展

梁锦前, 沈建雄, 邱贵兴

(北京协和医院骨科 100730 北京市)

中图分类号: R683.2, Q813.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-06-0475-04

脊髓损伤是交通、劳动和运动意外事故中常见的创伤类型。美国每年发生脊髓损伤近 14000 例, 每年为这些截瘫患者支付的医疗费用高达 60 亿美元^[1]。而在中国截瘫患者人数约 40 万, 每年新增 1 万人^[2]。由于损伤后脊髓缺乏自身修复能力, 脊髓功能的损害往往呈不可逆性改变, 患者受伤后往往终身丧失劳动力, 生活不能自理, 造成沉重的家庭和社会负担。因此, 如何促进脊髓损伤后神经元再生、引导脊髓功能恢复是神经科学领域迫切需要解决的课题。近年来, 随着胚胎干细胞、神经干细胞等分离技术的成熟和定向分化技术的发展, 应用于干细胞移植修复神经损

伤的前景被普遍看好。虽然采用不同干细胞移植的研究都取得了肯定性的神经修复效果, 但对于不同种类干细胞的适用范围、疗效差异等却缺乏足够的关注。鉴于干细胞类型选择对神经修复效果可能具备的决定性作用, 笔者通过综述文献对此问题进行阐述。

1 胚胎干细胞和胎儿干细胞

胚胎干细胞作为用于治疗脊髓损伤的干细胞最早被研究。它来源于胚胎分化 5d 后的内细胞团。为了观察胚胎干细胞的移植疗效, 杨建华等^[3]将小鼠胚胎干细胞进行体外培养后移植入脊髓半切伤小鼠的椎管内, 利用逆转录酶 PCR 分析、免疫荧光等方法观察移植细胞在受损脊髓中的存活和分化情况, 结果发现移植后胚胎干细胞能够存活并且向脊髓损伤部位迁移并分化为神经元。但是, 胚胎干细

第一作者简介: 男(1981-), 硕士在读, 医师, 研究方向: 脊柱外科
电话: (010)65296080 E-mail: String218@126.com
通讯作者: 沈建雄

10. Diedrich O, Perlick L, Schmitt O, et al. Radiographic characteristics on conventional radiographs after posterior lumbar interbody fusion; comparative study between radiotranslucent and radiopaque cages[J]. J Spinal Disord, 2001, 14(6): 522-32.
11. Ray CD. Threaded titanium cages for lumbar interbody fusions[J]. Spine, 1997, 22(6): 667-679.
12. Brantigan JW, Steffee AD. A carbon fiber implant to aid interbody lumbar fusion: two-year clinical results in the first 26 patients[J]. Spine, 1993, 18(14): 2106-2117.
13. Toth JM, Wang M, Estes BT. Polyetheretherketone as a biomaterial for spinal applications[J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 324-334.
14. Grobler LJ, Novotny JE, Wilder DG, et al. L4-5 isthmic spondylolisthesis: a biomechanical analysis comparing stability in L4-5 and L5-S1 isthmic spondylolisthesis[J]. Spine, 1994, 19(2): 222-227.
15. Grobler LJ, Robertson PA, Novotny JE, et al. Decompression for degenerative spondylolisthesis and spinal stenosis at L4-5: the effects on facet joint morphology [J]. Spine, 1993, 18(11): 1475-1482.
16. Pfeiffer M, Griss P, Haake M, et al. Standardized evaluation of long term results after anterior lumbar interbody fusion[J]. Eur Spine J, 1996, 5(5): 299-307.
17. Blumenthal S, Gill KI. Can lumbar spine radiographs accurately determine fusion in postoperative patients? correlation of routine radiograph with a second surgical look at lumbar fusion[J]. Spine, 1993, 18(9): 1186-1189.
18. 杨雍, 王炳强, 李东, 等. 下腰椎单节段 TFC 椎间融合术后影像学改变[J]. 临床和实验医学杂志, 2002, 1(2): 122-125.
19. Shah RR, Mohammed S, Saifuddin A, et al. Comparison of plain radiographs with CT scan to evaluate interbody fusion following the use of titanium interbody cages and transpedicular instrumentation[J]. Eur Spine J, 2003, 12(4): 378-385.
20. McAfee PC, Regan JJ, Peter Geis W, et al. Minimally invasive anterior retroperitoneal approach to the lumbar spine: emphasis on lateral BAK[J]. Spine, 1998, 23(13): 1476-1484.
21. Kim KS, Yang TK, Lee JC. Radiological changes in the bone fusion site after posterior lumbar interbody fusion using carbon cages impacted with laminar bone chips: follow-up study over more than 4 years[J]. Spine, 2005, 30(6): 655-660.
22. Wada E, Yonenobu K, Suzuki S, et al. Can intramedullary signal change on magnetic resonance imaging predict surgical outcome in cervical spondylotic myelopathy[J]? Spine, 1999, 24(5): 455-461.
23. 贾宁阳, 陈雄生, 史建刚, 等. 磁共振对脊髓型颈椎病前路减压及融合术后评价[J]. 中国矫形外科杂志, 2001, 8(8): 757-759.
24. 邱贵兴. 脊柱外科的回顾与展望[J]. 继续医学教育, 2005, 19(7): 4-6.

(收稿日期: 2007-07-26 修回日期: 2007-09-19)

(本文编辑 卢庆霞)

胞的应用存在颇多障碍,由于采用胚胎干细胞进行临床治疗时必须取材于人类胚胎,有限的来源和取材过程难以回避的伦理学问题成为其广泛应用过程中的障碍。此外,未分化的胚胎干细胞具有潜在的致瘤效应^[4-5],且植入成熟中枢神经系统的非神经区后保持不分化或主要向神经胶质细胞分化^[6-7]。因此,进行细胞移植之前,需要对胚胎干细胞进行细胞分筛以及定向诱导分化。

胎儿干细胞也可以作为脊髓损伤修复细胞的来源。Keyoung 等^[8]在神经元特异性基因促进因子的调控下利用含荧光蛋白基因的逆转录病毒感染分裂期的人胎儿脑细胞,根据荧光蛋白的表达使用荧光活性细胞筛选仪从 7~23 周胎儿的中脑或前脑中分离出人胎儿干细胞。Wu 等^[9]利用重组人碱性生长因子、肝磷脂、层粘蛋白等营养因子对来源于自然流产胎儿皮层的胎儿干细胞进行体外诱导,免疫细胞生化检测发现这些细胞能够成功定向诱导分化为胆碱能神经元,该方法的诱导分化效率高达 27.8%。人胎儿干细胞在神经损伤修复中的优势在于成功定向诱导分化后经过长时间培养仍能表现出较高的增殖稳定性,为其临床应用的疗效确切性初步奠定了基础^[10,11]。

然而,将人胎儿干细胞作为修复脊髓损伤靶细胞的研究时间尚短,目前仅处于实验室研究阶段。人胎儿干细胞在体内的分化受到干细胞前分化期的影响,也为疗效的稳定性增添了不少变数。因此目前应用于临床还比较困难。

2 神经干细胞

神经干细胞是从接受手术治疗的癫痫、创伤以及肿瘤患者体内分离出的成年神经干细胞^[12]。它存在于成年哺乳动物的脊髓、海马和室管膜下层,正常状况下处于静息状态。Vroemen 等^[13]通过对急性脊髓损伤的成年小鼠进行观察发现,在损伤脊髓内细胞因子的刺激下,神经干细胞可增殖分化为神经元、少突胶质细胞或星形胶质细胞。这些细胞也可产生神经营养因子改变体内抑制机制,从而刺激内源性神经元再生以及受损轴突再髓鞘化。

Pallini 等^[14]从小鼠胚胎中提取神经干细胞后将其移植到 T8~T9 水平背侧受损的小鼠脊髓中,12 周后采用开放野运动评分和足迹分析法观察小鼠的运动功能,同时采用组织学、免疫组化等方法对受损脊髓进行分析。术后 12 周时小鼠的运动评分显著提高,组织学研究发现植入 12 周后神经干细胞在脊髓内仍然存活且向损伤区迁移。Liang 等^[15]从自然流产胎儿皮层中获得人神经干细胞,经过离心提纯以及体外增殖后将其植入 T11 脊髓完全横断的小鼠体内,小鼠皮质脊髓束纤维显著再生并且重新形成突触连接,小鼠的后肢运动功能恢复。上述研究结果均表明神经干细胞移植在修复脊髓损伤和改善肢体运动功能方面具有肯定疗效。此外,由于神经干细胞通常取材于患者自身,此类细胞可以较好地解决其他类型的异体干细胞难以回避的个体排斥问题。因此,理论上神经干细胞是移

植替代治疗的首选干细胞类型。

然而,动物实验发现,在受损脊髓内炎症细胞因子的作用下,神经干细胞植入体内后不再分化或仅向星形胶质细胞分化从而参与瘢痕组织形成^[14-16]。某些神经因子可能对神经干细胞的分化也有影响。Ishii 等^[17]从小鼠胚胎中提取的神经干细胞植入受损的小鼠脊髓后,采用睫状神经营养因子(CNTF)抗体阻断 CNTF 作用,8 周后组织学观察发现脊髓内胶质瘢痕形成显著减少。与仅移植神经干细胞而未使用 CNTF 抗体的对照组相比,实验组小鼠脊髓内神经干细胞分布较广且再生的传导纤维数量显著增多。因此神经干细胞在脊髓损伤治疗中的应用受到限制。另外,虽然相比胚胎干细胞,神经干细胞具备取材不牵涉伦理学纠纷的优势,但取材来源有限,获取材料时手术具有侵袭性,治疗的同时会对患者造成损伤,难以获得患者认同。而且,神经干细胞分离提纯技术要求苛刻,诸多限制因素,使得神经干细胞在脊髓损伤修复组织工程中应用的研究进展缓慢,目前尚未进入临床试验阶段。

3 神经定向分化祖细胞

体外培养的神经定向分化祖细胞在纤维生长因子-2(FGF-2)和神经营养蛋白(NT3)存在的条件下可以定向分化为神经元,参与形成新的突触连接;也可向星形胶质细胞分化,引导轴突生长;还可以向少突胶质细胞分化,使轴突再髓鞘化等^[18]。鉴于神经定向分化祖细胞的多向分化潜能,来源于生长脊髓的神经定向分化祖细胞被公认为脊髓损伤细胞移植治疗的最佳种子细胞^[19]。

Mitsui 等^[20]在小鼠脊髓挫伤 9d 后将从转基因小鼠胚胎中分离出的神经定向分化祖细胞于损伤局部注入小鼠受损脊髓,发现移植细胞能够分化为成熟的神经元和神经胶质细胞,从而填充损伤部位,改善膀胱以及肢体运动功能,减轻温觉过敏以及调节髓内神经通路,效果较永生化神经干细胞移植更好。但单纯将神经定向分化祖细胞于脊髓损伤急性期植入受损脊髓内并不能在脊髓受损部位形成广泛的轴突再生。这可能与植入细胞不能适应体内抑制性微环境有关。为此,Davies 等^[21]在体外诱导神经定向分化祖细胞分化为星形胶质细胞后将其植入小鼠受损脊髓背侧,由神经定向分化祖细胞分化而来的星形胶质细胞使得延伸至损伤中心的上行背柱轴突增加了 60%以上,其中 66%跨越了损伤区域,与下方神经元形成有效连接,从而恢复受损的运动功能。Lepore 等^[22]通过动物实验证实植入中枢神经系统的神经定向分化祖细胞分布广泛、长期存活(长达 15 个月)并且能够分化为各种类型的成熟细胞(神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞),电子显微镜观察发现由神经定向分化祖细胞转化而来的神经元能够与宿主细胞之间形成突触。也可以将转基因技术与神经定向分化祖细胞联合应用,使移植细胞在受损脊髓局部表达多种细胞因子,从而改善局部抑制性微环境、促进神经定向分化祖细胞向神经元和少突胶质细胞转化,替代受损神经元以

及促进轴突生长^[23,24]。

动物实验总体表明神经定向分化祖细胞对神经损伤修复的疗效与胚胎干细胞相似,但相比胚胎干细胞,神经定向分化祖细胞取材回避了伦理问题、无致瘤效应且不存在取材方面的限制^[25]。而且它能够在宿主体内长期存活并且与宿主神经元形成有效突触连接。经过体外诱导分化后即使在脊髓损伤急性期移植也能取得良好的疗效^[21]。

但是神经定向分化祖细胞来源也比较有限。再者,神经定向分化祖细胞取材技术要求较高,操作困难,取材失败率较高。此外,不同研究对神经定向分化祖细胞修复神经损伤的疗效存在争议。Cao 等^[19]通过动物实验研究发现,虽然神经定向分化祖细胞可在体外和正常脊髓中分化为多种神经细胞,但在受损脊髓的病理微环境下,移植细胞不能向神经元分化。Talbot 等^[26]发现,神经营养因子在体外能够促进神经定向分化祖细胞定向分化为神经元,在小鼠体内却不能有效促进其髓鞘再生。Hill 等^[27]也报道神经定向分化祖细胞植入小鼠体内后不能继续分化或分化为星形胶质细胞,仅有少数分化为少突胶质细胞。可见,神经定向分化祖细胞的进一步分化受到微环境的影响,疗效具有不确切性。以上问题都限制了神经定向分化祖细胞在神经损伤修复治疗中的临床应用。

4 骨髓间充质干细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs)

BMSCs 存在于骨髓中,对髓内造血起重要作用。该细胞除具备干细胞的基本特征外,还可根据所锚靠局部组织的微环境定向分化为靶组织细胞,其多向分化潜能受到学术界广泛关注。Hofstetter 等^[28]将来源于路鼠股骨和胫骨内的 BMSCs 移植入同种鼠受损脊髓中,组织学检查发现植入的 BMSCs 可以向神经细胞分化,使受损脊髓恢复功能。此外 BMSCs 可能能够分泌一些营养物质从而促进内源性细胞增殖、生长^[29]。

Ohta 等^[29]将来源于小鼠骨髓的 BMSCs 注入同种小鼠的脑脊液中,BMSCs 通过脑脊液迁移并粘附至受损脊髓的表面,与对照组相比,该组小鼠脊髓损伤后形成的空洞小,BBB 评分高。Himes 等^[30]利用高流量方法扩增从人造血系统中提取 BMSCs 后采用流式细胞仪、酶联免疫标记法(ELISA)等方法提纯,通过静脉注射方式将 BMSCs 植入脊髓损伤的小鼠体内,2 周后小鼠的 BBB 评分显著提高,温度觉以及行走功能显著恢复。Lee 等^[31]将人骨髓间充质干细胞(hMSCs)于脊髓损伤 1 周后植入小鼠受损脊髓内,2 个月后 BBB 评分和疼痛测试显示细胞移植组小鼠的后肢运动和感觉功能得到改善;此外,细胞移植组小鼠的脊髓体感诱发电位(SSEP)潜伏期较对照组显著缩短。因此,Lee 等认为 hMSCs 移植能够改善动物受损脊髓的功能。Kim 等^[32]在脊髓损伤 1 周后分别将 hMSCs 和 hMSCs 与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的混合物通过脑脊液途径移植入小鼠受损脊髓内,观察发现联合移植组小鼠的运动功能

较单纯 hMSCs 移植组改善明显,表明神经营养因子和 hMSCs 联合应用有利于损伤脊髓的组织修复和功能恢复。

在所有干细胞中,BMSCs 最先获得临床应用。Sykova 等^[33]采用椎动脉导管内途径和静脉途径两种移植方式将急性(7 例)和慢性脊髓损伤(13 例)患者的自体 BMSCs 移植入患者自体内,采用 ASIA 评分、Frankel 评分、记录运动和感觉诱发电位以及 MRI 等方式分别于移植术后 3 个月、6 个月、12 个月观察疗效。5 例急性脊髓损伤患者和 1 例慢性脊髓损伤患者 3 个月内恢复运动和感觉功能。2 年随访期间所有患者均没有出现任何并发症。因此,Sykova 等认为自体 BMSCs 移植安全、有效,且脊髓损伤后 3~4 周内为细胞移植治疗的最佳时机。但研究结果仍需要大量的临床病例和进一步随访来证明。

与其他移植细胞相比,BMSCs 易于提取、分离,能够自体移植且组织兼容性好。然而和其他类型的干细胞一样,BMSCs 在体内的定向分化也受到脊髓病理微环境的影响,可能定向不佳。此外,Himes 等^[30]发现将来源于小鼠骨髓的 BMSCs 植入同种小鼠受损脊髓后,BMSCs 的数量将随时间的推移而减少。因此,如何使 BMSCs 在体内病理环境下获得稳定的定向分化以及提高移植细胞在体内的存活时间是目前迫切需要解决的问题。

总之,干细胞移植修复脊髓损伤到目前为止仍然处于实验室研究阶段。由于不同类型干细胞取材、定向分化效率、分化稳定性等方面的特点优劣互现、参差不齐,干细胞移植修复脊髓损伤迄今为止仍然缺乏一种优化的方案。但干细胞移植修复脊髓损伤的研究已经取得了阶段性的成果,相信随着干细胞定向分化技术的逐步成熟,干细胞移植修复脊髓损伤的疗效必然趋于稳定,临床应用前景值得期待。

5 参考文献

- DeVivo MJ, Go BK, Jackson AB. Overview of the national spinal cord injury statistical center database[J]. Spinal Cord Med, 2002, 25(4): 335-338.
- 蒋晖, 金大地, 江建明. 神经干细胞在脊髓修复中的应用研究进展[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(12): 114-116.
- 杨建华, 李长德, 翟饶生, 等. 胚胎干细胞移植修复脊髓损伤的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2007, 21(5): 487-491.
- Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, et al. High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells[J]. Lab Invest, 2003, 83(7): 949-962.
- Stewart R, Christie VB, Przyborski SA. Manipulation of human pluripotent embryonal carcinoma stem cells and the development of neural subtypes [J]. Stem Cells, 2003, 21(3): 248-256.
- 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.
- Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C, et al. Site-specific mi-

- gration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(14):5990-6005.
8. Keyoung HM, Roy NS, Benraiss A, et al. High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(9):843-850.
9. Wu P, Tarasenko YI, Gu Y, et al. Region-specific generation of cholinergic neurons from fetal human neural stem cells grafted in adult rat [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(12):1271-1278.
10. Faulkner J, Keirstead HS. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors for the treatment of spinal cord injury [J]. *Transpl Immunol*, 2005, 15(2):131-142.
11. Zeng X, Rao MS. Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement [J]. *Neuroscience*, 2007, 145(4):1348-1358.
12. Galvin KA, Jones DG. Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system [J]. *Med J Aust*, 2002, 177(6):316-318.
13. Vroemen M, Aigner L, Winkler J, et al. Adult neural progenitor cell grafts survive after acute spinal cord injury and integrate along axonal pathways [J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 18(4):743-751.
14. Pallini R, Vitiani LR, Bez A, et al. Homologous transplantation of neural stem cells to the injured spinal cord of mice [J]. *Neurosurgery*, 2005, 57(5):1014-1025.
15. Liang P, Jin LH, Liang T, et al. Human neural stem cells promote corticospinal axons regeneration and synapse reformation in injured spinal cord of rats [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119(6):1331-1338.
16. Ricci-Vitiani L, Casabore P, Petrucci G, et al. Influence of local environment on the differentiation of neural stem cells engrafted onto the injured spinal cord [J]. *Neurol Res*, 2006, 28(5):488-492.
17. Ishii K, Nakamura M, Dai H, et al. Neutralization of ciliary neurotrophic factor reduces astrocyte production from transplanted neural stem cells and promotes regeneration of corticospinal tract fibers in spinal cord injury [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(8):1669-1681.
18. Rao MS. Multipotent and restricted precursors in the central nervous system [J]. *Anat Rec*, 1999, 257(4):137-148.
19. Cao QL, Howard RM, Dennison JB, et al. Differentiation of engrafted neuronal-restricted precursor cells is inhibited in the traumatically injured spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2002, 177(2):349-359.
20. Mitsui T, Shumsky JS, Lepore AC, et al. Transplantation of neuronal and glial restricted precursors into contused spinal cord improves bladder and motor functions, decreases thermal hypersensitivity, and modifies intraspinal circuitry [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(42):9624-9636.
21. Davies JE, Huang C, Proschel C, et al. Astrocytes derived from glial-restricted precursors promote spinal cord repair [J]. *J Biol*, 2006, 5(3):7.
22. Lepore AC, Neuhuber B, Connors TM, et al. Long-term fate of neural precursor cells following transplantation into developing and adult CNS [J]. *Neuroscience*, 2006, 139(2):513-530.
23. Tang BL, Low CB. Genetic manipulation of neural stem cells for transplantation into the injured spinal cord [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2007, 27(1):75-85.
24. Cao Q, Xu XM, Devries WH, et al. Functional recovery in traumatic spinal cord injury after transplantation of multi-neurotrophin-expressing glial-restricted precursor cells [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(30):6947-6957.
25. Lepore AC, Fischer I. Lineage-restricted neural precursors survive, migrate, and differentiate following transplantation into the injured adult spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2005, 194(1):230-242.
26. Talbott JF, Cao Q, Bertram J, et al. CNTF promotes the survival and differentiation of adult spinal cord-derived oligodendrocyte precursor cells in vitro but fails to promote remyelination in vivo [J]. *Exp Neurol*, 2007, 204(1):485-489.
27. Hill CE, Proschel C, Noble M, et al. Acute transplantation of glial-restricted precursor cells into spinal cord contusion injuries: survival, differentiation, and effects on lesion environment and axonal regeneration [J]. *Exp Neurol*, 2004, 190(2):289-310.
28. 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.
29. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation [J]. *Exp Neurol*, 2004, 187(2):266-278.
30. Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, et al. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2006, 20(2):278-296.
31. Lee KH, Suh-Kim H, Choi JS, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2007, 67(1):13-22.
32. Kim KN, Oh SH, Lee KH, et al. Effect of human mesenchymal stem cell transplantation combined with growth factor infusion in the repair of injured spinal cord [J]. *Acta Neurochir*, 2006, 99(Suppl):133-136.
33. Sykova E, Homola A, Mazanec R, et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury [J]. *Cell Transplant*, 2006, 15(8-9):675-687.

(收稿日期:2007-06-25 修回日期:2007-11-08)

(本文编辑 李伟霞)