

阿尔茨海默病的神经干细胞治疗进展*

武 强¹ 李露斯¹ 范文辉^{1,2}

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是中枢神经系统一种常见的进行性神经退行性疾病,是老年前期和老年期痴呆主要的原因。临床上主要表现为进行性记忆力减退、认知功能下降等。目前全球约有 2 千万—3 千万患者,欧美各国报道,65 岁以上老年人痴呆患病率为 3.0%—5.0%,其中半数以上为 AD,在美国 AD 已经成为继心血管疾病、肿瘤和脑卒中之后的第 4 位死亡原因。国内与国外的情况类似,我国 AD 病例数达 10 万。随着世界人口日趋老龄化,AD 已成为当今老年医学面临的最为严峻的课题之一。

AD 最主要的病理特征是在大脑皮质和海马区域出现老年斑(senile plaque, SP)和神经元纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT),进一步的研究表明, β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)是 SP 的主要成分,它的沉积可能是所有因素导致 AD 的共同途径^[1]。传统的药物治疗包括:改善脑循环药物、能量代谢促进剂、乙酰胆碱酯酶抑制剂、M1 胆碱受体激动剂、乙酰胆碱释放促进剂、神经生长因子、抗氧化药物等,这些治疗手段虽然能够减轻 AD 的症状,但无法补充大脑皮质和海马大量丢失的神经细胞,因而对于中晚期的 AD 患者疗效有限。近年来,神经干细胞(neural stem cell, NSC)在胚胎和成年个体神经系统中的发现和体外培养的成功为 AD 的治疗提供了一个崭新的视野。

神经干细胞生物学特性包括:①自我更新:神经干细胞具有高度增殖和自我更新能力。②多潜能分化:神经干细胞分化后可形成神经细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞,其分化与局部微环境密切相关。③迁移功能和良好的组织融合性:在人类和哺乳动物神经系统发育过程中,神经干细胞沿着发育索方向迁移。移植后的神经干细胞同样具有迁移能力,受病变部位神经源性信号的影响,移植后的神经干细胞具有向病变部位迁移的嗜好,随后分化成特异性细胞^[2]。④低免疫源性:神经干细胞是未分化的原始细胞,不表达成熟细胞抗原,具有低免疫源性,因此,在移植后相对较少发生异体排斥反应,有利于其存活^[3]。神经干细胞的独特生物学特征给人们带来攻克中枢神经系统退行性疾病的希望。

AD 的神经干细胞治疗目的是修复和替代受损神经细胞,重建细胞环路和功能。主要有 2 种途径:①内源性途径,即诱导内源性神经干细胞增殖与分化,使损伤的中枢神经系统进行自我修复;②外源性途径,即直接替代缺损组织或植入基因工程细胞,这一类细胞能分泌促进干细胞增殖与存活的因子。

1 内源性途径

通过激活内源性神经干细胞,使其再进入细胞循环,并诱导其增殖、分化,产生各种神经细胞替代缺损的细胞,这对修复神经系统细胞损伤颇具潜力。研究表明,成年大鼠新皮质第 6 层神经元在凋亡性损失后,内源性的前体细胞可在原

位被诱导分化为层状和区域特异性的神经元,并重新建立靶向性有功能的轴突投射,替代了原有的神经元^[4]。然而在阿尔茨海默病,大量神经元持续破坏的情况下,并没有大量神经元再生。有人认为神经退行性病的过程其实是内源性神经再生失败的过程。Haughey 等^[5]研究发现,在体外培养条件下,A β 可抑制取自大鼠脑室下区/脑皮质区神经干细胞和源自人胚胎神经干细胞的增殖、分化,并能诱导其凋亡。接着他们发现在转基因鼠早发家族性 AD 模型中海马齿状回的神经干细胞增殖、存活明显减少,用 A β 同样可抑制此部位分离纯化后体外培养的神经干细胞增殖分化,并诱导凋亡。其机制可能是由于细胞内钙离子失调导致钙激活蛋白酶激活和 caspase 凋亡途径激活^[6]。Miguel 等^[7]却持有不同的观点,他们的研究发现 A β 不但没有损害内源性神经干细胞的神经再生能力,而且可以增加离体培养的神经干细胞的再生能力,进一步的研究表明 A β 42(而非 A β 40 或 A β 25-35)可以增加海马神经干细胞的增殖活性,没有出现神经干细胞的凋亡,尤其是 A β 42 的浓度为 1 μ M 时,这种诱导神经干细胞再生的效应非常显著,其机制是介导了酪氨酸激酶磷酸化和有丝分裂原活性蛋白酶通路。他们分析 A β 的形式及聚集状态是实验差异的关键。意大利的学者认为成年个体中枢神经系统中的神经干细胞具有很大的潜能,他们给 AD 大鼠脑室内持续 14 天注射碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)后又持续 14 天注射神经生长因子(nerve growth factor, NGF),结果发现内源性的神经干细胞显著增生,动物的认知功能得到改善。提示内源性的神经干细胞不能主动激活,而在一些外源性药物的诱导下可大量增生修复损伤^[8]。Sugaya 等^[9]认为除了 A β ,早老素(PS)可能亦影响到内源性神经干细胞的增殖分化。因此,可以认为内源性神经干细胞抑制和 AD 的病理过程存在联系。目前对神经干细胞的分化机制尚不清楚,且诱导神经干细胞定向分化的调控机制及技术亦未成熟,在大多数情况下,仅由内源性干细胞产生的神经组织可能不足以替代损伤后缺失的神经组织,尤其在像脊髓和纹状体等神经组织发生很少的部位^[10]。如何诱导脑内的内源性神经干细胞增生并分化为神经元,形成功能网络是今后研究的方向。

2 外源性途径

外源性途径,即通过实验室由未分化的神经细胞生长为适合移植到患者体内的已分化细胞。方法是在种植前把未分化细胞培养分化为神经细胞,或直接把干细胞移植到体内,

* 基金项目:国家自然科学基金(30100058)

1 第三军医大学第一附属医院(西南医院)神经内科,重庆市,400038

2 通讯作者:范文辉, [第三军医大学第一附属医院(西南医院)神经内科,重庆市,400038]

作者简介:武强,男,在读博士,副主任医师

收稿日期:2005-11-07

通过信号引导作用使其分化成神经元等。外源性神经干细胞应用治疗神经系统疾病中主要包括细胞移植和基因治疗。

2.1 神经干细胞移植

实验表明, 体外培养的神经干细胞移植到脑内后能够迁移分化为特定部位的神经细胞, 其分化方向与所处的微环境密切相关。成年脊髓来源的神经干细胞在移植入海马齿状回后分化为神经元, 但当被移回成年脊髓后则不能产生神经细胞^[11]; 从成年海马获得的干细胞当被移植入成年大鼠室管膜下区后, 产生嗅球的神经元能表达嗅球内相应的神经递质, 而不是海马中的神经递质, 移植入海马后则产生新的海马神经元^[12]。这些研究表明, 局部环境而不是神经干细胞自身的内在特性决定了移植细胞的最终命运。传统认为神经干细胞移植只是被用于局灶性神经系统病变, 研究较多的为神经干细胞移植治疗帕金森病。然而在许多遗传因素或其他因素导致的中枢神经退行性疾病中, 神经损伤通常散发在整个脑和脊髓。按照传统的观念, 这种弥散分布的多发性的退行性病变并不是神经移植的典型范围。然而神经干细胞的迁移性特征为上述疾病的治疗提供了新的视野。神经干细胞移植已经广泛的应用于包括 AD 和帕金森病在内的各种神经系统的退行性病变的实验研究, 尤其是在 AD 中的应用越来越受到重视。移植后的神经干细胞能被特异性吸引到脑内神经退行性变区域。Tate 等^[13]发现注射人 A β 能在大鼠脑内引发炎症反应, 注射到对侧脑室的小鼠神经干细胞能够迁移并包围 A β 注射区。对转基因 AD 小鼠的研究也表明, 表达外源性基因的神经干细胞能迁移到 A β 堆积区, 提示神经干细胞具有 A β 损伤区的自主追踪性, 可以在治疗 AD 等全脑神经退行性病变中起传递治疗性分子的作用, 然而尚不清楚刺激神经干细胞迁移的信号为 A β 本身还是 A β 造成的损伤区释放的炎症分子。2002 年 Kim 等^[14]发现, 当神经干细胞的迁移性被抑制时, 其分化能力同样也被抑制。这也表明, 神经干细胞必须迁移到靶区域才能表现出它们的神经可塑性。目前利用神经干细胞进行临床治疗的实验已初步展开并且取得了令人振奋的结果。Qu 等^[15]将体外扩增的人类神经干细胞注射入老龄大鼠的侧脑室, 数周后在 Morris 水迷宫实验得出的认知能力得分的结果看, 实验组明显好于对照组, 表明外源性神经干细胞改善了老龄大鼠的认知能力。有人用兴奋毒素破坏鼠前脑胆碱能功能区域制成 AD 损伤模型, 将一种源自第 14 天胎鼠海马趾原基的永生化神经干细胞系 MHP36 细胞注入, 发现外源性干细胞主动迁至损伤区域, 分化为神经元和胶质细胞, 重建锥体细胞层的大体结构, 鼠认知功能恢复, 证明外源性 MHP36 细胞能在损伤部位替代分化为胆碱能神经元^[16]。Wu 等^[17]将人胚胎神经干细胞体外培养增殖过程中增加了一个新的预充步骤, 能促进其在体内微环境中几乎完全诱导分化为神经元, 将处理后的神经干细胞移植入成年鼠中枢神经系统, 发现在局部胆碱能神经元通路区域神经干细胞被微环境诱导分化后获得胆碱能神经元表型。他们将神经干细胞移植治疗从单纯神经干细胞移植到功能型神经干细胞移植向前迈进了一步。由于神经干细胞在去除丝裂原信号后分化为神经细胞, 不再具有增殖能力, 移植后不具有致癌性。有研究报道, 长期培养的人神经干细胞移植入成年大鼠纹状体后, 其

分化成神经元和神经胶质细胞的能力仍保存, 但未见肿瘤形成, 即便是免疫缺陷的宿主, 移植后的神经干细胞也未见瘤样生长^[18]。但也有报道, 部分神经干细胞移植后可发展为脑瘤^[19]。任何诱导神经干细胞向修复所需的神经功能(目的)细胞分化则成为研究的核心。不同来源的神经干细胞对同一分化因子反应各异, 同一来源的神经干细胞对不同分化因子或不同浓度的分化因子反应各异, 神经干细胞对外源性因子的反应具有多样性, 这也使得从离体实验结论推论出某种因子在神经干细胞成熟过程中的作用非常困难, 而要摸索、找出一种最佳因子, 最佳浓度的组合更是一件十分艰巨的工作, 尚待时日和研究者的共同努力。

2.2 基因治疗

现阶段对中枢神经系统疾病治疗的很多大分子物质, 如神经生长因子、脑源性生长因子等都不能通过血脑屏障, 使部分中枢神经系统疾病的治疗受到了一定的限制。基因治疗为此开辟了新途径, 用神经干细胞有许多其他载体所没有的优点, 如: ①有自我复制功能; ②细胞迁移功能, 可远距离迁移至病损部位; ③表达稳定, 维持时间长; ④避免排异反应。因此它是非常理想的基因载体, 目前转导的基因有报告基因、神经营养因子基因、递质合成酶基因和代谢酶基因等。神经干细胞应用于基因治疗主要是通过利用永生细胞系作为体外转基因载体, 植入病变的神经组织, 从而转入神经生长因子, 某些代谢酶等基因, 使其在脑内表达, 主要用于治疗病变比较弥散的神经变性病或以中枢神经系统为主要病损的遗传性代谢疾病。这一治疗技术弥补了以病毒作为载体的基因治疗的一些不足, 使外源性基因在脑内更易于表达, 移植后可定向迁移到受损部位。神经干细胞携带各种生长因子或细胞因子的报告基因植入体内, 可表达外源性基因, 产生相应的生长因子或细胞因子, 如 bFGF、BDNF、NT-3 等, 诱导自身干细胞定向分化, 从而达到细胞替代和基因治疗的双重作用。Philips 等^[20]在脑损伤后 24h, 将能分泌 NGF 和不能分泌 NGF 的神经干细胞移植到脑损伤附近的大脑皮质。1 周后观察到移植了神经干细胞的大鼠的神经功能和空间识别能力较未移植神经干细胞的大鼠明显改善; 与移植了不能分泌 NGF 的神经干细胞的大鼠这一对照组相比, 移植了能够分泌 NGF 的神经干细胞的大鼠能够明显减少海马 CA3 区的细胞死亡。

3 小结

虽然人们在动物实验中已取得了令人鼓舞的进展, 但目前还没有将神经干细胞应用到人类 AD 治疗中获益的证据。如何诱导神经干细胞在病变部位定向分化为胆碱能神经元, 如何建立功能连接, 优化用于对神经干细胞进行修饰的基因或药物等问题还需要人们进一步的研究。人类的神经干细胞是宝贵的医学资源, 随着人们对神经干细胞认识的深入, 研究的重点是建立激活自身神经干细胞为主, 移植为辅, 以解决细胞来源不足及存活率低、存活时间短的问题。当神经干细胞的基础研究进一步解决了神经干细胞的增殖、迁移、分化及与宿主融合的机制等制约临床应用的问题之后, 相信利用神经干细胞治疗 AD 等引起的脑损伤会成为现实。

参考文献

- [1] Selkoe DJ. Defining molecular targets to prevent Alzheimer disease[J]. Arch Neurol, 2005, 2(62):192—195.
- [2] Amar AP, Zlokovic BV, Apuzzo MLJ. Endovascular restorative neurosurgery: A novel concept for molecular and cellular therapy of the nervous system[J]. Neurosurgery, 2003, 52(2):402—413.
- [3] Modo M, Rezaie P, Heuschling P, et al. Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response[J]. Brain Research, 2002, 958(8):70—82.
- [4] Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice[J]. Nature, 2000, 405(6789):951—955.
- [5] Haughey NJ, Liu D, Nath A, et al. Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Neuromolecular Med, 2002, 1(2):125—135.
- [6] Haughey NJ, Nath A, Chan SL, et al. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 2002, 83(6):1509—1524.
- [7] Miguel A, Shelanski ML. Neurogenic effect of β -amyloid peptide in the development of neural stem cells[J]. J Neuroscience, 2004, 24(23):5439—5444.
- [8] Calza L, Giuliani A, Fernandez M, et al. Neural stem cells and cholinergic neurons: regulation by immunolesion and treatment with mitogens, retinoic acid, and nerve growth factor[J]. PNAS, 2003, 100(12):7325—7330.
- [9] Sugaya K, Brannen C. Stem cell strategies for neuroreplacement therapy in Alzheimer's disease[J]. Med Hypotheses, 2001, 57(6):697—700.
- [10] Cao Q, Benton RL, Whittemore SR. Stem cell repair of central nervous system injury[J]. J Neurosci Res, 2002, 68(5):501—510.
- [11] Shihabuddin LS, Homer 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.
- [12] Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, et al. Differentiation of adult hippocampus derived progenitors into olfactory neurons in vivo[J]. Nature, 1996, 383(6601):624—627.
- [13] Tate BA, Werzanski D, Marciniack A, et al. Migration of neural stem cells to Alzheimer-like lesions in an animal model of AD[J]. Soc Neurosci Abstr, 2000, 26(2):496—497.
- [14] Kim HM, Qu T, Kriho V, et al. Reelin function in neural stem cell biology[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(6):4020—4025.
- [15] Qu T, Brannen C, Kim HM, et al. Human neural stem cells improve cognitive function of aged brain[J]. Neuroreport, 2001, 12(6):1127—1132.
- [16] Gray J, Grigoryan G, Virley D, et al. Conditionally immortalized, multipotential and multifunctional neural stem cell lines as an approach to clinical transplantation[J]. Cell Transplant, 2000, 9(2):153—168.
- [17] Wu P, Tarasenko Y, 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.
- [18] Vescovi AL, Parati EA, Gritti A, et al. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation[J]. Exp Neurol, 1999, 156(1):71—83.
- [19] Gvetchen V. Rat brains respond to embryonic stem cells[J]. Science, 2002, 295(5553):254—255.
- [20] Philips MF, Mattiasson G, Mieloch T, et al. Neuroprotective and behavioral efficacy of nerve growth factor transfected hippocampal progenitor cell transplants after experimental traumatic brain injury[J]. J Neurosurg, 2001, 94(5):765—774.

· 综述 ·

力学因素在构建组织工程化软骨中的应用*

吴 华¹ 吴纪饶¹ 王曼莹²

由于关节软骨的缺损及病变严重影响患者的生存质量,而且关节软骨自身修复能力很差,因此,寻找关节软骨组织的修复方法就成为实验室和临床上攻克的难题。近年来,随着组织工程学技术的发展,开展体外构建组织工程化软骨的研究越来越被人们所重视。组织化工程软骨(engineered cartilage)构建的基本过程大体上可分为两步:第一步是将体外扩增培养的种子细胞黏附于一种生物相容性和可塑性良好,并在体内能降解吸收的生物材料上,在这种三维结构的复合体中,细胞能生长成为正常软骨细胞所具有的表型、功能并形成预制的形状;第二步是将组织工程化软骨植入病损部位,逐步达到修复各种形状的缺损和重建关节软骨目的。可是研究发现,体外培养的工程软骨,虽然能在形态、生化表象上成功仿制天然的软骨,但在力学特性与天然软骨相比存在较大差距^[1]。例如,工程化软骨的压缩刚度不如在体内皮下培养的软骨,而体内皮下培养软骨的压缩刚度仍低于天然关节软骨的 48.7%^[2]。多数学者认为,天然关节软骨所特有的力学性能可能与其生长在体内微动力环境下并不断受到功能负荷、肌肉牵张力等刺激分不开,而传统的体外培养条件却不能满足这样需求。由此,利用上述组织化工程软骨进行修复,其疗效

和功能及耐用性都受到极大的挑战,而如何在体外培养条件下,优化组织工程化软骨的性能成为亟待解决的问题。

1 软骨组织生物力学特性

关节软骨表现出一些独特的力学性质,它是一种各向异性、非均匀、粘弹性、充满液体的可渗透物质^[3],能抵抗一定拉力、剪切力、压力及耐受磨损,这主要由材料的多相结构决定,即是由材料各种成分的性质、分布及相互作用来决定。关节软骨是一种双相性的材料,即一个多孔的、有通透性的、且由纤维增强的固体相和一个自由流动的液体相组成,其成分主要是软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)包含胶原纤维(Ⅱ型胶原占 90%—95%)、蛋白多糖(proteoglycan, PG),小分子的糖蛋白(glycoprotein, GP)等固体相和由主要是水组成的液体相^[4]。

* 基金项目:省重点实验室开放基金资助项目

1 海南师范大学体育系,

2 江西师范大学生命科学学院

作者简介:吴华,女,硕士,助教

收稿日期:2005-10-08