

· 综述 ·

成体内源性神经干细胞的激活及活化策略*

黄艳君¹

神经干细胞具有自我更新和分化潜能,其应用为中枢神经系统神经再生和功能重建提供了全新的治疗思路。侧脑室外侧壁的室下带(subventricular zone, SVZ)和海马齿状回(dentate gyrus, DG)的颗粒下层是所有成年哺乳动物脑内存在的 2 个神经干细胞富集区^[1],其他区域如脊髓、隔区、纹状体等也分离出了神经干细胞。目前应用神经干细胞修复中枢神经系统损伤已形成两种思路:移植外源性干细胞的“替代治疗”策略和激活内源性干细胞的“补充治疗”策略,而内源性神经干细胞具有来源稳定可靠、无伦理道德问题、无免疫排斥反应、无致瘤性等优势,因此如何充分调动内源性神经干细胞治疗神经系统疾病已成为当前新的研究热点。本文就内源性神经干细胞的激活及近年来的活化策略作一简述。

1 内源性神经干细胞的激活

1.1 脑缺血

脑缺血可激活脑内的神经干细胞。在大鼠大脑中动脉闭塞造成的局灶性脑缺血模型中可见到同侧 SVZ 和纹状体有新生神经元增殖,且呈链状向缺血纹状体迁移^[2]。Tanaka 等^[3]用带有增强型绿色荧光蛋白的反转录病毒载体标记全脑短暂性缺血模型中的新生细胞,发现增强型绿色荧光蛋白阳性细胞几乎都存在海马齿状回颗粒下层,这些细胞增殖并迁移到颗粒层,表达生长中的神经元标记多聚唾液酸神经细胞黏附分子和双可的松,30d 后分化为成熟神经元,表达神经元特异性核蛋白和钙结合蛋白。最近认为,血管外膜是灵长类神经前体细胞的最新发源地^[4]。Iwai 等^[5]认为脑缺血后的神经发生大致分为增殖、迁移、分化三个阶段;在 SVZ 增殖的神经干细胞经过吻侧迁移流迁移到嗅球,最终分化为成熟神经元。

近来对新生细胞的功能研究已成为热点。Arvidsson 等^[6]研究发现增殖的神经干细胞向严重缺血损伤的纹状体迁移,并分化成神经元,且取代缺血坏死神经元并与苍白球和黑质建立起纤维联系,重建部分基底核的运动环路。Kawai 等^[7]研究发现,脑缺血后 7—14d 增殖的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxy-uridine, BrdU)标记细胞共表达 bHLH 转录因子 NeuroD,脑缺血后 50d 后侧脑室内注射 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)这些细胞表现出细胞外信号调节激酶的磷酸化特征,随时间推移数量增加,胞体增大,由此认为新生细胞对兴奋性氨基酸产生了反应,具有成熟细胞功能。这些研究证明了新生神经元能够部分替代脑缺血导致的缺失神经元而改善其神经功能,内源性神经干细胞具有一定的修复能力。

1.2 脑外伤

资料显示脑外伤也可以激活内源性神经干细胞。Dash 等^[8]发现兴奋毒性和机械损伤海马齿状回颗粒细胞层可刺激前体细胞增殖。实验发现脑损伤后 3d,可见海马齿状回的颗粒细胞层 BrdU 阳性细胞增殖达到高峰。损伤 30d 后这些细胞大部分标有成熟神经元标记物钙结合蛋白,说明颗粒细胞

层的增生细胞主要分化成为神经元。Sun 等^[9]认为冷冻损伤主要是通过干细胞因子受体 c-kit 的激活促进神经前体细胞增殖、迁移。Chirumamilla 等^[10]研究却表明,虽然损伤后 SVZ 区和海马均有增殖细胞出现,但未发现 SVZ 区的细胞分化,海马区的细胞主要分化为未成熟的星型胶质细胞和活化的小胶质细胞,没有发现神经元分化。

1.3 癫痫

癫痫发作可诱导 DG 和前脑 SVZ 内的神经元产生增加,癫痫持续状态后伴随的自发性反复发作可增加齿状回的神经发生^[11]。Jiang 等^[12]研究发现,化学致惊厥剂引起的癫痫持续状态,在经过几天的潜伏期以后,可增加成年大鼠 DG 内细胞的增殖,大多数新生的细胞分化成神经元并且分散到颗粒细胞层。在红藻氨酸所致的颞叶癫痫模型中,早期脑室内和腹膜内注射红藻氨酸均导致神经发生水平增加,而注射后 5 个月下降,且 FGF-2 和 IGF-1 水平也下降^[13]。电惊厥所致的癫痫模型细胞增殖主要发生在额叶皮质,主要分化为上皮细胞和少突胶质细胞^[14]。痫性发作诱导的脑损伤可在成年啮齿类动物齿状回导致各种形式的神经可塑性,包括轴索重组、星形胶质细胞活化、树突重组和颗粒细胞层分散,类似的情况在人类和灵长类动物中也有发生。

1.4 神经变性疾病

研究发现,在小鼠新皮质中的部分接受丘脑投射的神经元发生退行性死亡后,新皮质中的神经前体细胞开始分裂并产生新的神经元,而且这些新生神经元具有迁移的能力,可以建立正确的皮质丘脑投射^[15]。研究还发现,亨廷顿舞蹈病患者毗邻尾状核的室管膜下层细胞增殖明显,且病情越严重增殖程度越高,而且大部分增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)阳性细胞共表达 β III-tubulin 或胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)说明有新生神经元或胶质细胞产生^[16]。这使人们认识到利用内源性神经干细胞治疗神经变性疾病有一定的可靠性,这种治疗有两种可能的方案:从患者体内分离出干细胞,体外进行增殖,加工后再移回到相应的病变部位;诱导病变部位的干细胞增殖、分化而进行自我修复。

1.5 生理状态

成年动物脑内神经干细胞的活化受到多种因素的影响,丰富环境、生理活动(如奔跑、学习)、生长因子、能量限制等均可促进神经干细胞的增殖、迁移和分化。研究发现,在丰富环境中活动的短暂性全脑缺血的大鼠 BrdU 阳性细胞明显增

* 基金项目:重庆市科委攻关项目(渝科发计字[2003] 43 号文, 2003-7)、重庆市卫生局科研项目(渝卫科教[2005] 31 号文, 编号: 2005-2-179)资助

审校:罗勇(重庆医科大学附属第一医院神经内科)

1 重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆市神经病学重点实验室, 400016

作者简介:黄艳君,女,硕士学位,主治医师

收稿日期:2006-07-03

加, 更多的新生细胞表达成熟神经元标志 NeuN, 活动能力也明显强于普通实验室中的大鼠^[17]; 环境强化更能促使新生神经元存活, 提高大鼠长时程记忆能力, 改善认知功能, 但可被有丝分裂剂 (methylazoxymethanol acetate, MAM, 一种能使 DNA 甲基化的药剂) 阻断^[18]。这些研究说明环境刺激是成年大鼠神经发生的重要调节因素。

2 成体内源性神经干细胞的活化策略

成体内源性神经干细胞在一定条件下增殖、迁移、分化, 新生的神经元可替代丢失的神经细胞发挥一定的功能, 但仅靠这些激活的神经干细胞还不足以完全修复神经功能。在缺乏任何外源性干预的情况下, 新生细胞的数量和存活时间均很有限。目前人们已采用了一些干预手段和活化策略, 由脑缺血、脑外伤、癫痫、神经变性疾病等所激活的神经干细胞在这些干预手段和活化策略下进一步增殖、迁移、分化, 本文重点讨论脑缺血后成体内源性神经干细胞进一步活化的策略。

2.1 电针

研究表明, “针刺”具有“整体良性调整”作用, 对机体可发挥多环节、多水平、多途径的调节作用。电针可使内源性神经干细胞增殖、向病灶区迁移、分化为神经元及胶质细胞进行补偿、修复等起重要作用。Kim 等^[19]在短暂全脑缺血的沙土鼠海马齿状回上观察到, 针刺“足三里”穴可使齿状回中细胞增殖数量明显增加。我室研究发现^[20], 电针大鼠双侧“合谷”穴区能使局灶脑缺血/再灌注后 SVZ 和 DG 区神经干细胞增殖更明显, 且神经干细胞迁移轨迹呈立体模式。李常新等^[21]采用易卒中型肾性高血压大鼠模型, 电凝法凝闭大脑中动脉, 针刺病灶对侧相当于人的“手三里”、“外关”、“伏兔”及“足三里”处, 观察到梗死灶边缘、双侧镜区及双侧海马均有 Brdu 阳性细胞分布、且病灶侧多于病灶对侧、病灶周围分布密集, 随着治疗时间增加细胞增多更明显。电针也可促进缺血后皮质、海马、纹状体巢蛋白阳性细胞数量的增加, 提示这种作用可能是电针治疗脑缺血的重要作用机制之一^[22]。陈加俊等^[23]观察到, 局灶性脑缺血诱导反应型星形胶质细胞重表达神经上皮干细胞样蛋白 (neuroepithelial stem protein, Nestin), 又称巢蛋白, 电针可促使 Nestin mRNA 的表达, 认为针刺可促进脑梗死灶中巢蛋白的表达, 从而在神经再生中发挥作用。

2.2 中药

祖国医学认为水瘕毒邪、害络损髓是脑缺血急性期抑制神经干细胞诱导分化的关键性病理因素, 中药具有多途径、多靶点的整体治疗优势, 不但可以通过阻断损伤后级联反应, 改善脑内微环境, 而且可能通过诱生细胞因子, 提高神经营养因子表达, 诱导神经干细胞的定向分化。程龙等^[24]通过免疫组织化学的方法发现给予三七总皂甙后去大脑皮质血管成年大鼠前脑侧脑室 SVZ 中 Nestin 标记细胞的数目明显增多, bFGF 表达明显增强。刺五加促进脑缺血/再灌注后 5d 和 7d 时海马、室管膜、室管膜下区和缺血区神经干细胞阳性 Nestin 阳性细胞数明显增加, 表明刺五加对大鼠脑缺血损伤有一定修复作用^[25]。HD02 为中药复方制剂, 实验表明 HD02 能使慢性前脑缺血大鼠神经干细胞增殖相关蛋白表达, 增加神经干细胞增殖分化能力, 减少神经细胞凋亡^[26]。申丽红等^[27]

认为长期给予人参皂苷 Rg1 可以显著提高海马区新生功能细胞的存活率, 保护 CA1 区神经元细胞免受缺血性损害, 同时明显改善全脑缺血对沙土鼠被动回避记忆能力造成的损伤, 并提高动物的空间学习记忆能力。这些研究表明, 中药可以充分调动脑内源性神经保护机制, 维持并构建脑内稳态系统, 促进神经干细胞向损伤脑区神经元的定向分化, 维持新生神经元的存活, 促进突触联系的重建, 最终实现神经结构与功能的重建。

2.3 电磁场

细胞是在弱磁环境中发育、成熟的。Tepper 等^[28]研究认为, 脉冲电磁场可以刺激体内内皮细胞通过自分泌和旁分泌方式释放 FGF-2、血管生成素-2、促血小板生成素及 EGF, 并进一步促进血管生成。将新生大鼠中脑神经干细胞分别置于 5Hz 和 20Hz 正弦交变磁场 (8mT) 中诱导分化, 发现均出现促进神经干细胞神经元向的分化, 神经干细胞分化为神经元的比例随 20Hz 电磁场干预时程的延长逐渐增高^[29]。Hoffmann 等^[30]研究发现低频磁场可影响成年沙鼠海马 DG 区增殖细胞数量, 每天 30min, 持续 14d 的磁场慢性处理, 其中 1、29、50Hz 导致 Brdu 标记的细胞减少, 50Hz 组减少最明显, 8、12Hz 组变化不明显, 推测可能是通过影响沙鼠体内神经递质和激素水平来影响神经发生。邢萱等^[31]也将新生大鼠中脑神经干细胞置于极低频电磁场中, 发现极低频正弦交变磁场以不同的效应模式促进神经干细胞向神经元分化, 以 20Hz 磁场连续刺激 10d 最显著。尽管离体与在体研究可能存在差异, 但这些研究提示我们细胞微环境中物理条件如生物磁场可能具有不可忽略的作用, 电磁场有望成为调控神经干细胞分化的经济而又便捷的新手段。

2.4 高压氧

研究表明, 高压氧 (hyperbaric oxygen, HBO) 可抑制中性粒细胞浸润, 减少“半影区”神经元坏死, 从而缩小脑缺血/再灌注损伤的梗死灶面积, 减轻神经系统症状, 其治疗作用是多方面的。高压氧可明显减轻脑缺血后海马 CA1、CA2、CA3 区神经营养因子-3 mRNA 水平^[32]。余海等^[33]应用 HBO 治疗缺血缺氧性脑病的新生鼠后检测脑内 bFGF 及其 mRNA, 发现 HBO 组 bFGF 表达及 bFGF mRNA 表达均显著增强。HBO 可促进 DG 区 Brdu 阳性细胞明显增多, Nestin 蛋白表达增加, 从而减少新生大鼠缺血缺氧性脑损伤后内源性神经干细胞的死亡和减轻髓鞘损伤^[34]。我们推测, HBO 有可能通过促进脑内神经营养因子等的表达促进内源性神经干细胞的激活, 成为调控内源性神经干细胞的又一手段。

3 问题与展望

成年中枢神经系统中神经干细胞的发现鼓舞了人们设想利用内源性神经干细胞作为治疗工具治疗以神经元死亡为特征的一系列疾病, 如脑缺血、阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿舞蹈病等。由于内源性神经干细胞可针对环境的变化调整增殖与分化的速度, 而且这种潜力不局限于正在进行神经组织生成的区域, 因此我们可以用各种干预因素对其加以调整和改善, 以期通过综合利用神经营养因子、针刺或电刺激、药物、康复治疗等促进神经干细胞的增殖、迁移、分化、整

合,恢复缺血区神经细胞的结构和功能。因此,如何充分调动内源性神经干细胞的内在潜力,如何在体内诱导其增殖、迁移、分化,如何促进这些细胞向神经元和星形细胞转化并形成正常的神经网络,会成为今后的研究方移、分化,如何促进这些细胞向神经元和星形细胞转化并形成正常的神经网络,会成为今后的研究方向。

参考文献

- [1] Gage FH. Mammalian neural stem cells [J]. Science, 2000, 287(5457): 1433—1438.
- [2] Zhang R, Zhang Z, Wang L, et al. Neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(4): 441—448.
- [3] Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, et al. Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector [J]. Stroke, 2004, 35(6): 1154—1459.
- [4] Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, et al. Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia [J]. Hippocampus, 2004, 14 (7): 861—875.
- [5] Iwai M, Sato K, Kamada H, et al. Temporal profile of stem cell division, migration, and differentiation from subventricular zone to olfactory bulb after transient forebrain ischemia in gerbils[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(3): 331—341.
- [6] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke[J]. Nat Med, 2002, 8(9): 963—970.
- [7] Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, et al. Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24 (5): 548—555.
- [8] Dash PK, Mach SA, Moore AN. Enhanced neurogenesis in the rodent hippocampus following traumatic brain injury [J]. J Neurosci Res, 2001, 63(4): 313—319.
- [9] Sun L, Lee J, Fine HA. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury[J]. J Clin Invest, 2004, 113(9): 1364—1374.
- [10] Chirumamilla S, Sun D, Bullock MR, et al. Traumatic brain injury induced cell proliferation in the adult mammalian central nervous system[J]. J Neurotrauma, 2002, 19(6): 693—703.
- [11] Cha BH, Akman C, Silveira DC, et al. Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis[J]. Brain Dev, 2004, 26(6): 394—397.
- [12] Jiang W, Wan Q, Zhang ZJ, et al. Dentate granule cell neurogenesis after seizures induced by pentylentetrazol in rats [J]. Brain Res, 2003, 977(2): 141—148.
- [13] Hattiangady B, Rao MS, Shetty AK. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus [J]. Neurobiol Dis, 2004, 17(3): 473—490.
- [14] Madsen TM, Yeh DD, Valentine GW, et al. Electroconvulsive seizure treatment increases cell proliferation in rat frontal cortex[J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(1): 27—34.
- [15] Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice [J]. Nature, 2000, 405(6789): 951—955.
- [16] Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, et al. Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (15): 9023—9027.
- [17] Briones TL, Suh E, Hattar H, et al. Dentate gyrus neurogenesis after cerebral ischemia and behavioral training[J]. Biol Res Nurs, 2005, 6(3): 167—179.
- [18] Bruel-Jungerman E, Laroche S, Rampon C. New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment[J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(2): 513—521.
- [19] Kim EH, Kim YJ, Lee HJ, et al. Acupuncture increases cell proliferation in dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils[J]. Neurosci Lett, 2001, 297(1): 21—24.
- [20] 赵振强, 罗勇. 电针对大鼠局灶性脑缺血/再灌注后神经干细胞增殖、迁移的影响 [D]. 重庆医科大学硕士学位论文, 2004, 1—97.
- [21] 李常新, 黄如训, 陈立云, 等. 大鼠脑梗死后神经前体细胞的增殖及电针作用的实验研究 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2004, 30(3): 190—193.
- [22] 刘喆, 赖新生. 电针对局灶性脑缺血大鼠神经干细胞巢蛋白表达的影响 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(10): 591—594.
- [23] 陈加俊, 方乐, 董春梅, 等. 针刺对巢蛋白表达的影响 [J]. 吉林医学, 2006, 27(1): 59—60.
- [24] 程龙, 朱培纯, 司银楚, 等. 三七总皂甙对去大脑皮层血管后成年大鼠前脑侧脑室、室管膜下层 Nestin 和 bFGF 表达的作用 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(3): 18—20.
- [25] 林洪, 王有为, 邢玉芝, 等. 刺五加对大鼠脑缺血损伤修复作用的研究[J]. 四川大学学报·自然科学版, 2006, 43(1): 217—221.
- [26] 高唱, 吴伟康. HD02 对前脑缺血大鼠神经干细胞增殖分化蛋白的作用[J]. 中国临床康复, 2003, 7(19): 2648—2649.
- [27] 申丽红, 张均田. 人参皂苷 Rg1 对脑缺血沙土鼠神经干细胞存活率和学习记忆能力的影响[J]. 中南药学, 2004, 2(1): 8—11.
- [28] Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, et al. Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2 [J]. FASEB J, 2004, 18(11): 1231—1233.
- [29] 李怡, 赵仑, 邢萱, 等. 5Hz 和 20Hz 磁场对中脑神经干细胞分化的影响[J]. 航天医学与医学工程, 2002, 15(5): 374—376.
- [30] Hoffmann K, Bagorda F, Stevenson AF. Electromagnetic exposure effects the hippocampal dentate cell proliferation in gerbils (Meriones unguiculatus) [J]. Indian J Exp Biol, 2001, 39(12): 1220—1226.
- [31] 邢萱, 李怡, 王小平, 等. 极低频电磁场对中脑神经干细胞体外诱导分化的影响 [J]. 中国临床康复, 2004, 8 (13): 2458—2459.
- [32] Yang JT, Chang CN, Lee TH, et al. Hyperbaric oxygen treatment decreases post-ischemic neurotrophin-3 mRNA down-regulation in the rat hippocampus[J]. Neuroreport, 2001, 12(16): 3589—3592.
- [33] 余海, 田润兰, 潘小雯, 等. 高压氧治疗在神经修复与再生过程中的作用及分子学机制[J]. 现代康复, 2001, 5(3): 48—49.
- [34] 余小河, 杨于嘉, 王霞, 等. 高压氧对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠内源性神经干细胞和髓鞘的保护作用 [J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(1): 33—37.

· 综述 ·

四种截瘫步行矫形器在脊髓损伤患者中的应用

石芝喜¹ 刘四文¹ 唐 丹¹ 欧阳亚涛¹ 王 俊¹

脊髓损伤所致截瘫是人体最严重的残疾之一。近年来,脊髓损伤的诊断、治疗取得了一定的进展,但完全性脊髓损伤仍难以恢复。随着现代生物力学、生物工程学的发展,使截瘫患者在应用矫形器方面特别是步行矫形器 (walking ortho-

sis)的应用有了明显进步。目前截瘫患者步行矫形器主要有新

1 广州工伤康复医院,广州从化温泉,510970

作者简介:石芝喜,男,治疗师

收稿日期:2006-08-15