

·综述·

功能训练对脑梗死后神经干细胞影响的研究进展*

方 杰¹ 胡昔权^{1,2}

脑梗死是神经系统的常见病和多发病,绝大多数存活者会遗留运动、感觉、认知等功能障碍,给患者本人、家庭乃至社会带来沉重的负担。现已证实,早期介入正规的功能训练,可以促进脑梗死后神经功能恢复,提高患者的生存质量,明显降低继发性残疾。其机制目前认为与中枢神经系统可塑性和脑功能重组有关,但具体的机制仍不十分清楚。

近年来,随着对神经干细胞研究的关注,已相继在成年动物和人类中枢神经系统内分离并纯化了神经干细胞。根据神经干细胞多分化潜能对受损部位进行修复,成为当前中枢神经系统损伤的研究热点,本文就功能训练对脑梗死后神经干细胞的影响进行文献综述。

1 神经干细胞

1.1 神经干细胞的概念

一直以来,成年哺乳动物神经元被认为是永久性细胞,受损后无法恢复,仅能通过胶质细胞来填充,并且随着年龄增长而逐渐退化和减少。1992年,Reynolds等^[1]从成年小鼠纹状体分离出能在体外不断分裂增殖、具有多种分化潜能的细胞群,提出了“神经干细胞(neural stem cells, NSCs)”的概念。

1.2 NSCs的特征及分布

NSCs的特征:①来源于神经系统,具有增殖能力;②自我维持或自我更新能力;③向神经组织多细胞系分化的能力;④损伤或疾病等病理改变可以激发 NSCs 的增殖分化;⑤除对称分裂外,根据细胞内活性物质的不对称分布,可分裂为一个干细胞和一个前体细胞(向终末端分化)。

在哺乳动物胚胎期,NSCs 主要分布在大脑皮质、纹状体、海马、室管膜下层和中脑等区域^[2]。成年后在侧脑室下区(subventricular zone, SVZ)、纹状体、海马齿状回(dentate gyrus, DG)的颗粒细胞下区、脊髓等处也发现存在 NSCs。

1.3 NSCs的鉴定

NSCs 鉴定最常用的是免疫组化方法,利用各种分子标志物特异性的不同,对 NSCs 或分化而来的细胞进行定性、定位或定量的检测。体外鉴定 NSCs 最常用的是巢蛋白(nestin),另外,Musashi1、vimentin、CD133 等也常作为 NSCs 鉴定的标志物;微管相关蛋白 2(MAP2)、神经元特异性核蛋白(NeuN)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)等高度特异地定位于神经元;星形胶质细胞常用胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和非神经元烯醇化酶(NNE)标记;少突胶质细胞则常用半乳糖脑苷脂(GC)标记。另外,SPECT、PET、MRI 等影像学方法结合免疫标记技术也是活体鉴定 NSCs 常用的可靠手段。

1.4 影响 NSCs 增殖、迁移和分化的因素

大致分为:①内源性因素:指可以对外界信号发生反应并通过一系列的信号转导途径调节自身 NSCs 的因素,包括一些 NSCs 内的蛋白成分、各种因子(如 EGF、FGF、IGF 等)、离子、激素以及神经介质都是 NSCs 赖以存在和分化的必要

因素。另外,一些转录因子和基因的激活与沉默也可影响 NSCs 的分化方向。②外源性因素:包括葡萄糖、氨基酸、维生素等是维持细胞存活的基本元素,细胞间各种因素的协调平衡、渗透压、pH 值、氧浓度和温度等都对 NSCs 的增殖、迁移以及分化产生重要影响。另外,某些病理状态如脑缺血也是 NSCs 的激活因素^[3]。

随着对 NSCs 修复神经损伤研究的深入,发现可以通过作用于内源性或外源性因素来提高 NSCs 的增殖、迁移和分化。而且,近期越来越多的研究发现,给予脑梗死动物进行功能训练、丰富环境刺激等也可以促进 NSCs 的增殖、迁移和分化,从而提示,这些干预措施有望成为促进神经系统损伤修复和功能重建的治疗手段之一。

2 功能训练对脑梗死后 NSCs 的影响

2.1 功能训练对脑梗死后外源性 NSCs 的影响

NSCs 以及其分化的神经细胞移植是脑梗死后神经系统修复的一种方法。植入大脑的外源性 NSCs 可以和内源性 NSCs 一同启动一系列的分子信号,控制细胞的分化、轴突和树突的出芽等建立起神经网络连接,达到修复和功能重建的目的。Toda 等^[4]将 NSCs 植入短暂性脑缺血大鼠的海马后,1%—3%的移植细胞可以存活,其中 3%—9%分化为神经元,改善了脑梗死大鼠的空间认知功能。Veizovic 等^[5]给脑梗死大鼠注射 NSCs 后发现梗死灶体积缩小,缺血半暗带出现分化而来的神经元和少突胶质细胞,并与宿主细胞产生突触联系,改善脑梗死大鼠的行为功能。许多研究都发现在脑梗死动物移植 NSCs 后进行行为学和认知功能等功能训练可以促进这一过程的发生^[6]。对脑梗死大鼠移植 NSCs 后进行跑台训练,可以促进移植的 NSCs 迁移、分化,并提高移植细胞在脑梗死大鼠脑内的存活率,促进神经功能障碍的康复^[7]。

2.2 功能训练对脑梗死后内源性 NSCs 的影响

进行 NSCs 移植之前,常需要对待移植的细胞在体外进行导入癌基因的永生化处理,所以可能出现成瘤性、免疫排斥及社会伦理等问题^[8],使得外源性 NSCs 的应用受到许多限制,而内源性 NSCs 不存在以上问题,逐渐成为研究的热点。

2.2.1 运动训练对脑梗死后内源性 NSCs 的影响:Borghet 等^[9]将小鼠分别给予睡眠-觉醒节律、睡眠剥夺和运动训练处理,发现前两组的小鼠海马区神经前体细胞增殖没有改变,表明海马区的神经细胞增殖并不像其他细胞一样有昼夜节律。而训练组增殖水平明显提高,并且在运动间隙时期增殖现象消

* 基金项目:广东省自然科学基金(8151008901000102)

1 中山大学附属第三医院康复医学科,广州,510630

2 通讯作者

作者简介:方杰,男,在读硕士研究生

收稿日期:2009-01-14

失,说明正常小鼠海马区神经细胞增殖水平可以因运动训练而提高。另外,运动训练对中年小鼠的海马齿状回 NSCs/前体细胞的增殖也有促进作用^[10]。

在国内外相继有人报道,运动训练对脑梗死动物 NSCs 的增殖和神经细胞新生的影响。周晓琳等^[11]给予脑梗死大鼠滚筒、转棒及平衡木训练,于梗死后 7d、14d、21d 发现梗死侧海马区的 nestin 阳性细胞较对侧显著增多,第 7 天达到高峰,且训练组梗死侧海马区 nestin 阳性细胞较未训练组显著增加,表明运动训练可促进脑梗死大鼠海马区 NSCs 的增殖。

2.2.2 学习记忆训练对脑梗死后内源性 NSCs 的影响:功能训练引起的 NSCs 增殖不仅促进脑梗死后运动功能恢复,还可改善学习能力^[12]。学习记忆是中枢神经系统的一种高级活动方式,有研究表明,学习记忆训练也能促进海马神经细胞新生。Lemaire 等^[13]发现 Morris 水迷宫学习能促进海马齿状回 NSCs/前体细胞的增殖,并且有利于海马 DG 新生神经元的存活^[14]。也有实验将大鼠分为 Y 迷宫训练组和对照组,给予 3d 的训练后,Y 迷宫训练组海马齿状回的 BrdU 阳性细胞较对照组显著增多,且学习记忆能力也明显改善,提示学习记忆的训练在促进 NSCs 增殖中发挥重要作用^[15]。在给予脑梗死大鼠 Morris 水迷宫训练后发现,经过训练的大鼠海马齿状回 PSA-NCAM 水平升高,可能是促进 NSCs 增殖后迁移的因素之一^[16]。

2.2.3 运动训练方案对脑梗死后内源性 NSCs 的影响:功能训练涉及的内容很多,如训练的项目、时机、时间以及强度等,具体方案不同,发挥的作用也可能出现差异。Yagita^[17]使用 Wistar 大鼠建立前脑缺血的模型及假手术组,经过 14d 的运动训练后,假手术组和脑缺血组 SGZ 和 GCL 的 BrdU 阳性细胞都较未经训练的大鼠明显增加,但是假手术运动组明显高于脑缺血运动组,并提出短时期的运动训练可能通过激活大鼠 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)的水平促进细胞增殖,引发了对适应证、训练量与 NSCs 增殖之间关系的探索。Naylor 等^[18]发现自发性高血压模型的大鼠过度运动训练后会致下丘脑-垂体-肾上腺轴的反应性增高,血浆中肾上腺素和皮质酮的水平升高以及胸腺重量的降低,其海马区神经前体细胞的增殖水平低于正常训练量的大鼠,表明高强度运动带来的压力也是影响 NSCs/前体细胞增殖的一个因素。国内也有报道运动训练可显著增强脑缺血再灌注大鼠海马区 nestin 阳性细胞表达的数量,但强化运动训练并不能增强此作用^[19]。这些结果提示我们对缺血性脑损伤后进行运动训练时应该考虑到训练的时机、时间和强度等。

2.2.4 丰富环境对脑梗死后内源性 NSCs 的影响:尽管大多数研究都表明功能训练等刺激对内源性 NSCs 的增殖有促进作用,但是也有报道称缺血性损伤后的主动运动对 SVZ 的 NSCs 的增殖没有影响,而给予丰富环境的刺激,可使 SVZ 的 NSCs 的增殖增加,对海马齿状回的颗粒下层(subgranular zone,SGZ)仍然没有明显影响^[20]。

丰富环境,是指复杂的无生命物与社会刺激的复合体,即动物的饲养环境空间增大,内置物体丰富而新奇,成员较多,不仅提供了多感官刺激和运动的机会,而且赋予了相互间社交行为的可能^[21]。Biernaskie 等^[22]研究表明,在脑梗死后

第 5 天、14 天、30 天给予丰富环境的刺激可以进一步促进神经功能的恢复。Komitova 等^[23]建立自发性高血压大鼠脑缺血模型,在第 5 周发现丰富环境组大鼠 SVZ 的 NSCs 增殖水平明显高于未接受丰富环境刺激的大鼠,也有研究表明丰富环境可以提高脑梗死大鼠在进行神经干细胞移植后的细胞迁移和神经功能的恢复^[24]。说明此种方法可作为修复中枢神经损伤的潜在方法。在对比各种不同刺激对大鼠齿状回的 NSCs 影响的实验中,将大鼠分为水迷宫训练组、限制时间游泳组、主动滚轮训练组、丰富环境组 and 对照组,结果发现,在水迷宫训练组和限制时间游泳组的大鼠 DG 的 BrdU 阳性细胞并无增加,而主动滚轮训练组和丰富环境组新生的神经细胞都显著增加,早期主动滚轮训练组的 BrdU 阳性细胞居多,但 4 周后发现丰富环境组新生神经元的存活率更高^[25]。

所以,对于应该给予怎样的环境才能最有利于损伤后神经功能的修复,以及干预的时机、强度、是否会有不利的影响和怎样消除不利影响等一系列问题还有待于解决。随着对于丰富环境干预的进一步认识,此种手段有可能会成为一种临床实用的康复治疗方法。

3 问题与展望

尽管利用 NSCs 治疗脑损伤被认为是很具有潜力的方法,但仍存在许多问题:①NSCs 只存在于某些特定部位,细胞来源常受到限制;②分化潜能可能很有限;③解决移植细胞的成瘤性及免疫排斥等问题也是当前面临的困难之一;④如何提供准确的细胞信号,以诱导 NSCs 准确地增殖、迁移和分化成恰当类型的神经元,从而具有所需要的特定功能,这是最根本的问题。因为无论是移植外源性 NSCs 或是利用内源性 NSCs,都要有适宜的内环境和相应的诱导因素才能使其生存、增殖和朝着正确的方向迁移和分化,并最终重建正确的神经网络,使受损的功能得以修复;⑤功能训练的方式目前种类繁多,训练的方式、时机、强度等尚缺乏规范,且功能训练对 NSCs 的增殖、迁移、分化的影响机制尚未十分明确。

鉴于内源性 NSCs 在修复脑梗死后神经损伤方面具有的优势,我们认为目前该领域仍然有以下一些问题有待我们进一步研究:①脑梗死后 NSCs 的增殖、迁移和分化是多因素参与的过程,明确并掌握其具体调控因素和信号机制,诱导 NSCs 分化和向受损区域迁移进行修复才是我们的目标,因此,进一步加强对 NSCs 增殖、迁移、分化等调控因素的研究至关重要;②NSCs 的数量极其有限,且易凋亡,应当加强对提高增殖水平和存活率的各种因素的研究;③星形胶质细胞数量多,且可大量分泌各种细胞因子诱导 NSCs 向神经元方向分化,降低凋亡比率^[26]。充分利用其功能也可能是 NSCs 治疗的一项突破;④NSCs 修复后出现功能的恢复是最根本的问题,所以对于专门研究功能恢复的学科——康复医学来说,应加强对促进功能恢复的各种方法的研究,将实验研究与临床治疗相结合,提供更多有效的治疗手段;⑤多项研究发现功能训练可能是通过使各类神经营养因子及细胞因子等的释放增加、促进血管新生、改善血液循环,使海马区兴奋性氨基酸受体活性上调和 5-HT 合成增加以及促进细胞分裂所需物质增加等提高 NSCs 的增殖。所以,加强功能训练的细胞分

子生物学机制的研究,并把功能训练对神经系统修复影响的认识提高到神经干细胞的水平,需要进一步探索。

参考文献

- [1] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. *Science*, 1992, 255(5052): 1707—1710.
- [2] Davis AA, Temple S. A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex [J]. *Nature*, 1994, 372(6503): 263—266.
- [3] 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.
- [4] Toda H, Takahashi J, Iwakami N, et al. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 316(1): 9—12.
- [5] Veizovic T, Beech JS, Stroemer RP, et al. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells[J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1012—1019.
- [6] Dobkin BH. Behavioral, temporal, and spatial targets for cellular transplants as adjuncts to rehabilitation for stroke [J]. *Stroke*, 2007, 38(2 Suppl): 832—839.
- [7] 贾杰, 胡永善, 吴毅, 等. 跑台运动训练促进脑梗死大鼠外源性移植的神经干细胞迁移分化的实验研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(7): 594—597.
- [8] 徐如祥. 神经干细胞[M]. 第1版. 北京: 军事医学出版社, 2006. 35—40.
- [9] van der Borght K, Ferrari F, Klauke K, et al. Hippocampal cell proliferation across the day: increase by running wheel activity, but no effect of sleep and wakefulness[J]. *Behav Brain Res*, 2006, 167(1): 36—41.
- [10] Wu CW, Chang YT, Yu L, et al. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice[J]. *J Appl Physiol*, 2008, 105(5): 1585—1594.
- [11] 周晓琳, 赵永波, 段淑荣, 等. 脑梗死后康复训练对成年大鼠海马结构中 NSCs 的影响[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2004, 4(6): 430—434.
- [12] Xu WP, Shan LD, Gong S, et al. Forced running enhances neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult rats and improves learning ability [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2006, 58(5): 415—420.
- [13] Lemaire V, Koehl M, Le M, et al. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(20): 11032—11037.
- [14] Gould E, Beylin A, Tanapat P, et al. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation [J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(3): 260—265.
- [15] 徐卫平, 龚珊, 蒋星红, 等. Y 迷宫训练对成年大鼠海马齿状回细胞的增殖作用[J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2005, 25(3): 366—369.
- [16] 江山, 李玲, 袁华, 等. 行为学训练对大鼠海马梗死后齿状回区神经干细胞迁移能力的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2006, 28(8): 510—514.
- [17] Yagita Y, Kitagawa K, Sasaki T, et al. Postischemic exercise decreases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus [J]. *Neurosci Letters*, 2006, 409(1): 24—29.
- [18] Naylor AS, Persson AI, Eriksson PS, et al. Extended voluntary running inhibits exercise-induced adult hippocampal progenitor proliferation in the spontaneously hypertensive rat [J]. *J Neurophysiol*, 2005, 93(5): 2406—2414.
- [19] 陆敏, 张苏明, 常立英, 等. 常规和强化运动训练对脑缺血再灌注大鼠海马齿状回区 nestin 表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(10): 986—989.
- [20] Komitova M, Mila K, Zhao LR, Gido G, et al. Postischemic exercise attenuates whereas enriched environment has certain enhancing effects on lesion-induced subventricular zone activation in the adult rat [J]. *Euro J Neurosci*, 2005, 21(9): 2397—2405.
- [21] Will B, Galani R, Kelche C, et al. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990—2002)[J]. *Prog Neurobiol*, 2004, 72(3): 167—182.
- [22] Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(5): 1245—1254.
- [23] Hicks AU, Hewlett K, Windle V, et al. Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke[J]. *Neuroscience*, 2007, 146(1): 31—40.
- [24] Komitova M, Mila K, Bengt M, et al. Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats[J]. *Stroke*, 2005, 36(6): 1278—1282.
- [25] van Praag H, Kempermann G, Gage FH, et al. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus[J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(3): 266—270.
- [26] 罗杰峰, 黎海燕, 沈岳飞. 星形胶质细胞对神经干细胞分化的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(42): 8515—8519.