

骨髓间充质干细胞联合细胞因子及其他细胞对脊髓损伤康复研究进展*

杨拯¹ 袁章² 陈建敏¹ 张晓^{1,3}

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)具有高发生率、高致残率、高耗费、低病死率的特点,SCI后的截瘫常造成患者永久性的运动、感觉障碍及直肠、膀胱功能的缺失等,因此SCI不仅严重威胁人类健康,也给社会和家庭带来沉重负担。而以前治疗并促进SCI康复的方法主要是靠药物治疗和外科治疗。这些方法在不同程度上缓解了SCI的病理改变,但仍不可避免地造成了患者截瘫。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)的出现给患者带来了新的希望,由于它具有易于分离、培养、扩增、长期培养的过程中始终保持多向分化的潜能、免疫原性低、遗传背景稳定等特性,因此BMSCs移植成为治疗并促进SCI康复的一种行之有效的方法。BMSCs移植后可以存活并迁移,自分泌和旁分泌多种神经保护性营养因子,减少神经细胞凋亡,并可支持血管神经再生和神经网络的重建,从而使损伤组织得以修复^[1-2],一些细胞单独移植也可治疗SCI,因此,不少学者将BMSCs联合一些细胞因子或其他细胞移植治疗并促进SCI康复,并取得了一定的进展。以下就此作一综述。

1 BMSCs的生物学特性

1968年,Friedenstein等用体外培养法和实验动物体内移植法研究骨髓基质细胞,发现一类可以单克隆形式增殖,细胞形态与集落方式类似成纤维细胞的细胞,而且这类细胞与造血干细胞完全不同,研究者将其命名为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)。BMSCs是骨髓中除肝星状细胞外的一大类具有多向分化潜能的多能成体干细胞,是中胚层发育的早期细胞。在适宜的条件下,BMSCs可发育、分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、内皮细胞和肺上皮细胞等^[3-5]。在相差显微镜下,BMSCs显示出成纤维细胞的外观,其主要形态为梭形和纺锤形,体积较大。在透射电镜下,大部分BMSCs表现为椭圆形,核大,胞质内的细胞器少。多数细胞处于G0/G1期,提示BMSCs具有强大的分化增殖能力。迄今,BMSCs没有特定的表面标志,比较重要的细胞表面标志包括黏附分子、生长因子、细胞因子及受体和整合素等。例如:SH-2、SH-3、SH-4、GM-CSF、G-CSF、IL-3R、IL-4R、IL-6R、IL-7R、G-CSFR、CD44、CD166、CD29等。另外,BMSCs还强烈表达细胞外基质蛋白,如collagen I、Ⅲ、Ⅳ, fibronectin, laminin等^[6-8]。因此,BMSCs的初步鉴定可以通过细胞的表面标志并结合细胞形态进行。BMSCs大多从幼年的动物骨髓中提取分离,目前BMSCs的分离方法主要有贴壁筛选法、密度梯度离心法、流式细胞仪分离法和免疫磁珠法等。

2 BMSCs联合细胞因子及其他细胞促进SCI的康复

近年来,很多学者已经探明在SCI的动物模型中移植BMSCs能够促进脊髓功能的恢复。BMSCs能够合成生长因子

和细胞因子,从而促进神经元的存活和轴突的生长^[9],也能减少炎症应答和空腔的形成^[10]。BMSCs表达脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF),神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等体液因素,参与中枢神经系统的再生^[11]。以下将从BMSCs联合各种细胞因子和各种细胞两方面谈谈BMSCs对SCI的修复。

2.1 BMSCs联合细胞因子对脊髓损伤的修复

2.1.1 BMSCs联合脑源性神经营养因子:BDNF是神经系统中重要的调节蛋白,可以调节神经元的存活、轴突生长、突触可塑性和神经递质的产生,对神经元的生存、分化、生长和维持神经元正常的生理功能起着重要的作用,并且能延缓神经元的变性和自然死亡。BDNF不仅是一种诱导剂,同时也是一种抗凋亡剂,在体外能单独诱导BMSCs分化为神经元样细胞^[12-13]。BMSCs单独移植治疗并修复脊髓损伤时,BMSCs可以分泌BDNF,从而减少热休克诱导的脊髓神经元凋亡比率和支持轴突的再生^[14-15]对损伤的脊髓神经元起保护作用。但由于BMSCs自身分泌的BDNF量很少,因此许多研究者将二者联合应用,BDNF能诱导BMSCs分化形成神经元样细胞,且分化后细胞的存活时间更长,能抑制SCI后的细胞凋亡及促进脊髓细胞再生作用,因而促进脊髓外伤性截瘫结构和功能的部分恢复作用更明显^[13,16-17],其机制可能是外源性的BDNF的加入,提高了局部BDNF的浓度,进一步改善局部的微环境,延长迁移到损伤处BMSCs的存活时间,保护了残存的神经元及促进轴突的再生越过损伤处的瘢痕组织与其他神经元建立突触联系,建立完整的神经信号通路^[15,17]。Koda等^[15]用腺病毒为载体先体外后体内将BDNF转染入BMSCs,并移植到横断T8的脊髓处,并建立MG和BMSC-LacZ对照组,BMSC-BDNF组大鼠的酪氨酸羟化酶和降钙素基因相关肽显著高于对照组,这可能是转染的BMSCs更能促进轴突的再生,但不能增强大鼠后肢功能的恢复。

2.1.2 BMSCs联合神经生长因子:NGF是兼有神经元营养和促突起生长双重生物学功能的一种细胞生长调节因子,它对中枢神经元的发育、生长、分化、再生和功能的维持均具有重要的调控作用,能维持和促进交感和感觉神经元的存活、分化和成熟。BMSCs能通过血脑(脊髓)屏障,并在靶点分泌

* 基金项目:四川省科技厅课题项目基金资助(2008SZ0053);成都医学院创新性实验项目基金资助(CX200907);成都医学院实验室开放项目基金资助(KF200936)

1 成都医学院基础医学实验教学示范中心,四川成都,610083

2 成都医学院2006级临床医学本科

3 通讯作者

作者简介:杨拯,男,助教

收稿日期:2009-04-23

NGF^[19]。NGF 在 SCI 后的表达增加,从而产生更多的 NGF,但由于 BMSCs 自身分泌的 NGF 量很少且自身存活的时间也不长,得不到足够 NGF 的神经元就会死亡^[16]。因此,人们通过将 BMSCs 和 NGF 联用弥补以上两种不足。在 BMSCs 中加入 NGF 后较单独移植组脊髓功能恢复更加明显^[20],主要原因可能为:①NGF 可以促进受损神经元轴突再生,并诱导再生轴突向神经纤维转化^[21];②NGF 有保护 BMSCs 不受损害并促进其增殖分化、发挥其相应功能的作用^[22-23]。其机制可能是 NGF 与 BMSCs 上的 NGF 受体结合,激活并启动细胞内的信号通路,通过细胞分裂生长因子来调节 BMSCs 增殖分化成神经细胞^[24]。

2.1.3 BMSCs 联合粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF):G-CSF 是一种促粒细胞增殖的细胞因子,主要应用于各种原因引起的粒细胞减少症,它能够动员骨髓间充质及外周血中的造血干细胞,在干细胞移植领域中为干细胞的释放、富集、动员、促进迁移、诱导分化等一系列问题的解决提供了一种新的解决途径。G-CSF 作为一种促粒细胞增殖的细胞因子,同时具有损伤修复的作用。G-CSF 与自体的 BMSCs 共同移植入脊髓损伤处,有利于大鼠行为功能的恢复^[25]。Koda 等^[26]将被 G-CSF 处理后的 BMSCs 移植入脊髓损伤处,6 周后,与对照组相比,GFP⁺细胞数量以及 GFP 和神经胶质标记的双阳性细胞数量都明显增加,其机制是 G-CSF 能促进脊髓白质的修复。

2.2 BMSCs 联合其他细胞对脊髓损伤的修复

2.2.1 BMSCs 联合雪旺细胞(Schwann cells,SCs):SCs 是包裹于周围神经的特有胶质细胞,它对周围神经的再生起支持和保护营养的作用。SCs 分泌各种神经营养类物质,可诱导神经元的生长锥生成、延长,还可抑制胶质瘢痕形成,营造有利神经再生的微环境和促进受损神经元的存活及轴突再生,而骨髓间充质干细胞具有多分化潜能,在移植脊髓损伤区后可以补充损伤的神经元数量。智晓东等^[27]将 SCs 和骨髓间充质干细胞联合移植,使其优势互补,联合移植组大鼠瘫痪右下肢能够较快的恢复,自 3 周左右就开始恢复,足底可暂负重行走,3 个关节出现大范围活动,而磷酸盐缓冲液组 4 周还没有出现肢体瘫痪改善症状。两种细胞联合移植使二者相互作用,充分利用其各自生理特性,如 SCs 分泌多种神经营养素,骨髓间充质干细胞分化神经元的潜能,既补充了丢失的神经元,又保护了残存的神经细胞,抑制了不利神经再生的因素,减少了胶质瘢痕和囊性病变,最大化达到了结构上的重建,为功能重建打下组织学基础。

2.2.2 BMSCs 联合嗅鞘细胞(olfactory esheathing cells,OECs):OECs 是存在于嗅觉系统的一种特殊类型的神经胶质细胞,它表达胶质纤维酸性蛋白,参与形成胶质界膜。OECs 也能在其细胞膜上表达出很多与细胞黏合和轴突生长相关的分子,如 N-CAM、laminin、PSA-N-CAM、fibronectin 以及具有促进神经生长作用的微管连接蛋白(nexin)。自体 BMSCs 和异体 OECs 共同培养两者之间无相互抑制现象,近期观察二者联合移植修复脊髓损伤是安全的^[28]。张燕青等^[29]将 OECs 和 BMSCs 共培养,发现 OECs 能够明显促进 BMSCs 向神经样细胞分化,而且这些细胞具有形成突触的潜能。其机制可能

是:①OECs 能够分泌大量不同种类的细胞活性因子,如 PDGF、神经肽 Y、S100、NGF、BDNF 和 NT23 等^[30]。OECs 通过多种神经营养因子来促进 BMSCs 向神经元分化。②OECs 还能分泌细胞黏附因子,这提示 OECs 也有可能通过分泌细胞黏附因子以及 OECs 与 BMSCs 的直接接触等机制促进 BMSCs 向神经元分化^[31]。

3 小结与展望

BMSCs 联合一些细胞因子或其他细胞移植治疗并修复 SCI 的研究在近几年取得了较大的进展,但其在实际研究和临床应用中还存在一些问题有待解决:①各种细胞因子与 BMSCs 之间相互影响的具体机制,它们各自对 SCI 治疗所发挥的是哪些具体的作用;②细胞的联合移植中,SCs 或 OECs 对 BMSCs 的影响及其机制并未研究清楚,SCs 或 OECs 单独治疗 SCI 的机制;③目前诸多研究局限于动物实验,距临床应用还有一段距离。但我们相信随着对 SCI 研究的不断深入,这些问题必将得到解决,最终为 SCI 的临床治疗和康复带来全新的方法和途径。

参考文献

- [1] Harvey RL,Chopp M. The therapeutic effects of cellular therapy for functional recovery after brain injury [J].Phys Med Rehabil Clin N Am,2003,14(1 Suppl):S143—151.
- [2] Bareyre FM. Neuronal repair and replacement in spinal cord injury[J].J Neurol Sci, 2008,265(1—2):63—72.
- [3] Pittenger MF,Mackay AM,Beck SC,et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J].Science,1999,284(5411):143—147.
- [4] Azizi SA,Stokes D,Augelli BJ,et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts[J].Proc Natl Acad Sci USA,1998,95(7):3908—3913.
- [5] Kopen GC,Prockop DJ,Phinney DG.Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J].Proc Natl Acad Sci U S A,1999,96(19):10711—10716.
- [6] Hu Y,Liao L,Wang Q,et al.Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas [J].J Lab Clin Med,2003,141(5):342—349.
- [7] Yaghoobi MM,Mahani MT.NGF and BDNF expression drop off in neurally differentiated bone marrow stromal stem cells [J].Brain Res,2008,1203:26—31.
- [8] Song S, Kamath S, Mosquera D,et al.Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells[J].Exp Neurol,2004,185(1):191—197.
- [9] Neuhuber B, Timothy Himes B, Shumsky JS, et al.Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations [J].Brain Res, 2005,1035(1):73—85.
- [10] Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats[J]. Exp Neurol, 2004,190(1):17—31.
- [11] Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, et al.Bone marrow stromal cells promoting corticospinal axon growth through the release of humoral factors in organotypic cocultures in neonatal rats[J].J Neurosurg Spine,2007,6(5):412—419.
- [12] 黄文,张成,陈松林,等.BDNF 诱导骨髓间质干细胞分化中神经元特异性蛋白表达与细胞凋亡的关系 [J]. 中国病理生理杂志,

- 2006,22(2):337—341.
- [13] 黄文,张成,陈松林,等.脑源性神经营养因子体外诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[J].第一军医大学学报,2004,24(8):854—858.
- [14] 吴永超,郑启新,胡东,等.骨髓间充质干细胞神经营养因子的表达及对脊髓神经元的保护作用[J].中国康复医学杂志,2006,21(10):867—870.
- [15] Lu P, Jones LL, Tuszyński MH. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2005, 191(2):344—360.
- [16] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro[J]. *Exp Neurol*, 2000, 164(2):247—256.
- [17] 康德智,王灯亮,林建华,等.骨髓间质干细胞和脑源性神经营养因子联合应用促进兔脊髓外伤性截瘫的修复[J].中国临床解剖学杂志,2007,25(1):60—63,67.
- [18] Koda M, Kamada T, Hashimoto M, et al. Adenovirus vector-mediated ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor to bone marrow stromal cells promotes axonal regeneration after transplantation in completely transected adult rat spinal cord[J]. *Eur Spine J*, 2007, 16(12): 2206—2214.
- [19] Brunello N, Reynolds M, Wrathall JR, et al. Increased nerve growth factor receptor mRNA in contused rat spinal cord[J]. *Neurosci Lett*, 1990, 118(2):238—240.
- [20] 王俊芳,方煌,罗永湘,等.骨髓基质干细胞和神经营养因子悬液移植对脊髓损伤修复的影响[J].中华创伤骨科杂志,2006,8(8):764—768.
- [21] Houweling DA, Bar PR, Gispén WH, et al. Spinal cord injury: bridging the lesion and the role of neurotrophic factors in repair[J]. *Prog Brain Res*, 1998, 117:455—471.
- [22] Mahmood A, Lu D, Lu M, et al. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells [J]. *Neurosurgery*, 2003, 53(3):697—702.
- [23] Huang F, Wang J, Chen A. Effects of co-grafts mesenchymal stem cells and nerve growth factor suspension in the repair of spinal cord injury[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2006, 26(2):206—210.
- [24] 朱长庚.神经解剖学[M].北京:人民卫生出版社,2002.347—351.
- [25] Urdzíkóvǎ L, Jendelová P, Glogarovǎ K, et al. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(9):1379—1391.
- [26] Koda M, Nishio Y, Kamada T, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilizes bone marrow-derived cells into injured spinal cord and promotes functional recovery after compression-induced spinal cord injury in mice[J]. *Brain Res*, 2007, 1149:223—231.
- [27] 智晓东,吕刚.大鼠骨髓间充质干细胞和雪旺细胞联合移植治疗脊髓损伤[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(16):3015—3018.
- [28] 赵廷宝,卢兆桐,赵凌云,等.骨髓间充质干细胞与嗅鞘细胞联合移植治疗脊髓损伤的早期观察[J].中国矫形外科杂志,2006,14(5):346—348.
- [29] 张燕青,曾园山,张静,等.体外培养的嗅鞘细胞能够促进骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[J].中国神经精神疾病杂志,2007,33(10):612—614.
- [30] Wewetzer K, Verdú E, Angelov DN, et al. Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: two of a kind [J]? *Cell Tissue Res*, 2002, 309(3):337—345.
- [31] Serruys PW, Regar E, Carter AJ, et al. Rapamycin eluting stent: the onset of new era in interventional cardiology [J]. *Heart*, 2002, 87(4):305—307.

第三届全国门诊实用疼痛注射及 神经阻滞技术新进展高级培训班的通知

由中华医学会继续教育部和首都医科大学宣武医院疼痛诊疗中心主办的国家级继续教育项目 [编号:2009-04-11-098]-“第三届全国门诊实用疼痛注射及神经阻滞技术新进展高级培训班”定于2009年10月20—25日在北京举办。

学习班邀请我国著名疼痛学专家严相默、倪家骧、安建雄、岳剑宁、武百山、戈晓东、马骏、何明伟等专家教授结合自己长期的临床经验,通过大量图片和现场录像进行专题讲解。本次学习班将专门设立小型专题讨论会,给学员提供与专家面对面交流的机会。并将为部分优秀学员提供宣武医院疼痛科门诊和病房现场观摩。学员可获得学习班讲座汇编和国家级继续教育学分10分。

会议日期:2009年10月20日报到(全日),10月21日—25日;会议地点:京都紫禁城饭店(北京宣武区广安门南街48号)费用:会务费:1080元,住宿费:130元/床/天/人,由学员单位报销。报名:可通过电子邮件、手机短信报名,如需纸质通知请与我们联系。报名截止日期2009年10月15日。北京市宣武区长椿街45号首都医科大学宣武医院疼痛诊疗科,杨惠婕。邮编:100053。电话:010-83198161、010-63175890(传真)、13911907383。e-mail: yanghuijie@vip.sina.com。北京东四西大街42号中华医学会继续教育部“门诊疼痛会议”,梁鸿;邮编:100710;电话:杨桂芳,010-88820399、51798200;梁鸿,010-85158402。E-mail: jxjy@vip.163.com,短信报名:13611002300(请注明会议名称、地点、工作单位、邮编、姓名及人数)。