

· 综述 ·

## 骨髓基质细胞移植治疗脊髓损伤机制的研究进展

方 波<sup>1</sup> 马 虹<sup>1,2</sup>

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重威胁人类健康及生存质量的疾病。引起脊髓损伤的原因包括脊柱损伤、脊椎退变及脊髓缺血等,其中以脊柱损伤最为常见。然而,目前对脊髓损伤的治疗手段非常有限,尚没有取得突破性的进展。近几年来随着干细胞技术的发展,通过细胞移植治疗SCI已经成为当代医学研究的一个热点。干细胞作为各种成熟细胞的前体细胞,不仅具有分化能力,还可以在体外方便的扩增自身数量,成为细胞移植的理想材料。目前的干细胞移植主要集中在:胚胎干细胞、神经干细胞、脐带血干细胞和骨髓基质干细胞。

骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)是一种骨髓中存在的非造血实质干细胞,它不仅能分化成中胚层的成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞等,还有向神经外胚层细胞分化的能力,于是又称其为间充质干细胞。动物实验表明, MSCs 移植到受损的脊髓后, MSCs 在体内分化为神经元样细胞和分泌神经营养因子,促进神经元补充存活和轴突生长;缩小病灶囊腔,恢复感觉、运动等功能。但用于临床治疗尚处于探索阶段。研究 MSCs 移植在 SCI 中的作用机制能够为临床治疗提供更准确可靠的方案,本文拟对此机制作一综述。

### 1 移植后 MSCs 的分化、迁移

#### 1.1 MSCs 分化

体内和体外培养的 MSCs 不仅在形态上与神经元相似,而且表达神经细胞特异性蛋白<sup>[1~2]</sup>。Masaaki 等<sup>[2]</sup>从表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的 4~8 周转基因小鼠提取 MSCs;从胎鼠大脑皮质提取神经元,并以 PKH-26 标记。采用细胞共培养技术将 MSCs 与神经元共培养。结果显示 MSCs 在形态上模仿神经元,MAP-2、Tuj-1、巢蛋白、GFAP 表达显著增加,而且 20%—30% 的 MSCs 与神经元融合表现出阳性 PKH-26。这些研究结果提示 MSCs 移植到 SCI 的动物体内可分化为神经细胞。Venkata<sup>[3]</sup>等发现 MSCs 在体外和 SCI 体内分化有所不同,在体外分化为神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞,以神经元为主;而在 SCI 体内以少突胶质细胞为主。MSCs 的分化受多种因素的影响,体内局部微环境的变化,相邻或相接触细胞的诱导作用及其分泌的

细胞因子等都可能是很重要的诱导因素。脊髓损伤局部可能由于损伤应激或刺激动员了局部或全身相关的各种细胞因子聚集到损伤部位,增强了 MSCs 向神经元方向的诱导分化作用<sup>[4]</sup>。

除此之外,经证实移植的 MSCs 还具有神经功能。Shi-chinohe 等发现 MSCs 在脑梗周围区域通过表达 GABA 受体,提高苯二氮卓受体的结合力<sup>[5]</sup>。还有报道称在特定环境下培养 MSCs 可表现出类似神经元的电生理功能<sup>[6]</sup>。但仍存在争议,Hofstetter 等<sup>[7]</sup>研究表明,体内移植 MSCs 后虽然能表达神经元表型,但是这些细胞缺乏产生动作电位的电压门控通道。研究表明 MSCs 移植后与宿主细胞(包括神经元)融合,获得它们的表现型,模拟分化为宿主细胞<sup>[8~9]</sup>。近年来分子研究也证实 MSCs 受外界刺激影响,改变基因表达谱,神经细胞相关基因表达增加<sup>[10]</sup>。

#### 1.2 MSCs 迁移

Hill 等<sup>[11~12]</sup>发现移植的 MSCs 会主动迁移到中枢神经系统受损处,如脑梗区和脊髓损伤区。迁移的机制可能涉及缺血区趋化因子受体<sup>[13]</sup>和黏附因子,如神经细胞粘附分子、细胞间粘附分子和血管细胞粘附分子等上调<sup>[14]</sup>。现已发现几种 MSCs 表达的黏附相关抗原<sup>[15]</sup>。

### 2 在结构上修复脊髓损伤

移植的 MSCs 聚集和充填在脊髓受损部位,抑制不利于神经再生的瘢痕形成,弥合脊髓的上下中断。MSCs 来源的神经细胞和星形胶质细胞已形成明显的树突,通过与其他神经细胞建立广泛的传入和传出联系,甚至重建神经通路,补偿由于损伤破坏丢失的细胞结构<sup>[16]</sup>。Hofstetter 等<sup>[17]</sup>将大鼠的 MSCs 注射到脊髓损伤后截瘫 1 周的大鼠脊髓内,发现 MSCs 形成束并且桥接损伤中心,促进脊髓组织再生和功能恢复。该研究提示 MSCs 在受损部位的有益作用不仅是分化为再生组织,还包括形成引导链。

### 3 抗细胞凋亡作用

脊髓损伤后,损伤区周围脊髓灰质和白质中的凋亡细胞数量明显增加,这提示脊髓损伤后,损伤周围存在大量的神

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.10.026

1 中国医科大学附属第一医院麻醉科,沈阳, 110001;2 通讯作者  
作者简介:方波,男,博士,讲师;收稿日期:2010-12-31

经细胞凋亡,凋亡所导致的神经细胞死亡是扩大脊髓损伤范围的一个因素<sup>[18]</sup>。脊髓损伤后,凋亡细胞以白质内神经细胞为主,而白质内存在的主要神经细胞为形成髓鞘的少突胶质细胞,这说明凋亡在脊髓损伤中、远期慢性脱髓鞘过程中起着重要作用。于德水等<sup>[18]</sup>研究发现脊髓损伤后局部移植MSCs能够抑制损伤周围组织内神经细胞的凋亡。Dasari等研究发现MSCs移植通过抑制细胞凋亡通路发挥神经保护作用。蛋白酶caspase家族活性增强与细胞凋亡关系密切,caspase-3是凋亡过程中最重要的半胱氨酸蛋白酶,是多种凋亡途径的共同下游效应部分,是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,在SCI介导的白质细胞凋亡中发挥重要作用<sup>[19]</sup>。Fas激活能触发caspase-8,caspase-10和caspase-3激活。Venkata等<sup>[3]</sup>对大鼠造成中度SCI后发现距病灶尾端2mm处可见大量凋亡的神经元和少突胶质细胞。MSCs移植后,通过减少细胞膜Fas激活抑制神经元和少突胶质细胞caspase-3激活;另一方面,上调胞浆中作为凋亡通路关卡的FLIP(Fas相关死亡区域蛋白样白介素-1β转换酶抑制蛋白)和凋亡抑制蛋白XIAP的表达抑制细胞凋亡。同时在细胞核水平抑制PARP的清除。

#### 4 促进髓鞘再生

神经轴突不能再生是脊髓损伤后功能永久性残疾的主要原因。越来越多的证据显示MSCs治疗SCI后的功能恢复主要是由于对损伤神经元的营养支持和促进神经元的可塑性,而不是组织替代。目前促进神经轴突再生的方法包括:细胞或组织移植、轴突抑制因子抗体及外源性神经生长因子等。丁鹏等<sup>[20]</sup>研究发现, MSCs移植到脊髓全横断损伤区后8周,可见大量的NF200阳性纤维,而对照组未见明显的NF200阳性纤维,说明MSCs促进神经纤维再生。但是移植的MSCs和再生的轴突无明显空间联系。作者又观察MSCs移植后宿主自身细胞的变化,发现在脊髓损伤区nestin、NF200、GFAP和CNP阳性细胞存活数较对照组明显增加。于是作者考虑MSCs移植可能是通过提高宿主自身CNP和许旺细胞存活间接促进轴突再生和髓鞘形成。Nogo-A是神经轴突生长抑制因子,对轴突再生具有极强抑制作用。黄洁萍等<sup>[21]</sup>研究证实MSCs移植对脊髓损伤后神经功能恢复的影响与下调Nogo-A表达有关。

还有研究发现将脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)基因导入到MSCs后移植能够增加5-HT能、蓝斑脊髓传导路径以及后柱感觉神经纤维的生长,促进轴索的再生和运动功能恢复<sup>[22]</sup>。

#### 5 分泌神经营养因子

神经营养(neurotrophin, NT)因子是一类由神经所支配

的组织和星形胶质细胞产生的且为神经元生长与存活所必需的蛋白质分子。神经营养因子家族包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、BDNF、神经营养因子-3(neurotrophin 3, NT-3)、神经营养因子-4/5(neurotrophin 4/5, NT-4/5)、胰岛素样生长因子-1(insulin like-growth factor-1, IGF-1)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、胶质细胞源神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)和肝素结合性生长因子/heparin binding growth factor, HBGF)等<sup>[23]</sup>。

SCI后NT及其受体表达明显增加<sup>[24]</sup>。NT通过调节神经递质、神经肽的合成和释放,影响神经元存活<sup>[25—26]</sup>,还能够促进轴突再生,改善感觉-运动功能<sup>[27]</sup>。补充外源性NT可提供营养支持,促进轴突生长<sup>[28]</sup>,减少空泡形成<sup>[29]</sup>,减轻细胞应激和神经源性休克,并改善细胞间交流<sup>[30]</sup>。此外,NT改变细胞内钙水平,减轻氧化应激反应,下调NOS和HO-2表达,保护受损的脊髓<sup>[31—32]</sup>。

植入的MSCs与定居部位神经组织间相互作用,生成具有营养和保护作用的细胞因子和营养因子,保护损伤脊髓组织内的神经细胞免受或逆转脊髓继发损伤所导致的伤害。以往研究表明, MSCs能够刺激受体组织分泌及自身分泌一系列具有保护和营养神经细胞作用的生长因子和营养因子<sup>[33—34]</sup>,如BDNF、NGF、集落刺激因子-1和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等。Masaaki等<sup>[2]</sup>将小鼠MSCs与神经元三维混合培养发现MSCs产生NGF、BDNF、SDF-1α、HGF、TGF-β-1、IGF-1,减轻谷氨酰诱导的神经元损伤。

#### 6 促进局部新生血管生成和血管重建

Shi等<sup>[35]</sup>研究了MSCs移植对脊髓缺血损伤的作用。作者在兔肾动脉以下水平阻断腹主动脉20min或30min,造成脊髓缺血性损伤,脊髓损伤后鞘内注射MSCs。结果发现移植的MSCs更多分布到腰段受损区的脊髓灰质, MSCs组后肢运动功能恢复更好,未受损的神经元更多,同时发现腹侧灰质毛细血管密度明显高于对照组。作者认为鞘内注射MSCs能促进宿主脊髓血管再生,增加血运,从而改善脊髓缺血损伤的运动功能恢复。

#### 7 减轻脊髓水肿

SCI后30s就出现脊髓水肿形成,2—5min显著,持续15天<sup>[36]</sup>,在灰质最明显。水肿液扩散到未受损的脊髓可引起不良的细胞反应,增加凋亡基因表达,诱发DNA分裂,导致细胞凋亡和死亡<sup>[37—38]</sup>。吴碧莲等<sup>[39]</sup>研究发现静脉注射MSCs可

抑制大鼠损伤脊髓的水通道蛋白-4(AQP-4)表达,减轻脊髓水肿程度,消除脊髓的继发性损伤,从而保护了残存的正常脊髓组织,促进脊髓神经组织的重建和脊髓功能的恢复。Joshi M等<sup>[40]</sup>认为脊髓损伤时血管性水肿是过多的水分可能通过受损的血脊髓屏障进入细胞外间隙,这是一条不依赖AQP-4的通路。但是血管性水肿的消除却需要AQP-4蛋白的参与。

## 8 小结

MSCs移植后能够迁移到SCI病灶部位并在体内分化为神经和胶质细胞,在结构上支撑,并分泌神经营养因子,抗神经细胞凋亡,促进髓鞘和血管再生,减轻脊髓水肿,从而治疗脊髓损伤。目前MSCs移植在SCI动物模型中治疗作用已得到公认,但对于MSCs移植治疗SCI的机制研究尚不完全。SCI的病理过程大致可分为原发性损伤和继发性损伤。继发性损伤可导致损伤的进一步扩大,并持续数月到数年之久,成为神经功能不能恢复的主要原因。继发性损伤的因素包括脊髓出血缺血、血脊髓屏障破坏、生物化学因子、炎症等,机制非常复杂。MSCs移植治疗SCI是否通过干预上述因素发挥作用有待深入研究。

## 参考文献

- [1] 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.
- [2] Masaaki H, Satoshi K, Hideo S, et al. Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms[J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(5):1024—1035.
- [3] Dasari VR, Spomar DG, Cady C, et al. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats[J]. *Neurochem Res*, 2007, 32(12):2080—2093.
- [4] 石健,赵新刚,侯铁胜. 骨髓基质干细胞移植与脊髓损伤[J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(12): 926—928.
- [5] Shichinohe H, Kuroda S, Yano S, et al. Improved expression of gamma-aminobutyric acid receptor in mice with cerebral infarct and transplanted bone marrow stromal cells: an autoradiographic and histologic analysis [J]. *J Nucl Med*, 2006, 47 (3):486—491.
- [6] Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, et al. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (Suppl 1):11854—11860.
- [7] 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.
- [8] Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion [J]. *Nature*, 2002, 416(6880):542—545.
- [9] Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cerebellar granule neurons, and hepatocytes [J]. *Nature*, 2003, 425(6961): 968—973.
- [10] Hermann A, Liebau S, Gastl R, et al. Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 83(8): 1502—1514.
- [11] Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, et al. SDF-1(CX-CL12) is up-regulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(1):84—96.
- [12] Zhang X, Du F, Yang D, et al. Transplanted bone marrow stem cells relocate to infarct penumbra and co-express endogenous proliferative and immature neuronal markers in a mouse model of ischemic cerebral stroke [J]. *BMC Neurosci*, 2010, 11: 138.
- [13] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11):2739—2749.
- [14] Bonfanti L, Theodosis DT. Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb [J]. *Neuroscience*, 1994, 62(1):291—305.
- [15] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *J Neurol Sci*, 2001, 189(1—2):49—57.
- [16] 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]. *Experimental Neurology*, 2004, 190(1): 17—31.
- [17] 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.
- [18] 于德水, 吕刚, 梅晰凡, 等. 骨髓基质细胞移植对大鼠脊髓损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 辽宁医学院学报, 2009, 30(2): 100—101.
- [19] Citron BA, Arnold PM, Sebastian C, et al. Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell

- [20] 丁鹏,薛黎萍,宋晓斌,等.骨髓基质细胞移植促进脊髓全横断损伤区神经元轴突的再生变化[J].中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(49): 9631—9636.
- [21] 黄洁萍,翁金森,王峰,等.骨髓间充质干细胞移植对急性脊髓损伤大鼠神经功能恢复及Nogo-A表达的影响[J].中国康复医学杂志, 2009, 24(7): 582—586.
- [22] 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, 2007, 16(12): 2206—2214.
- [23] Hari SS. Neurotrophic factors in combination: a possible new therapeutic strategy to influence pathophysiology of spinal cord injury and repair mechanism [J]. Current Pharmaceutical Design, 2007, 13(18): 1841—1874.
- [24] Reynolds M, Alvarea D, Middleton J, et al. Neonatally wounded skin induces NGF-independent sensory neurite outgrowth in vitro[J]. Brain Res Dev Brain Res, 1997, 102(2): 275—283.
- [25] Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord [J]. Phys Rev, 1996, 76 (2): 319—370.
- [26] Huber KA, Kriegstein K, Unsicker K. The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4 but not NGF, TGF- $\beta$ 1 and GDNF, increases the number of NADPH-diaphorase-reactive neurons in rat spinal cord cultures [J]. Neuroscience, 1995, 69: 771—779.
- [27] Sharma HS. Post-traumatic application of brain-derived neurotrophic factor and glia-derived neurotrophic factor on the rat spinal cord enhances neuroprotection and improves motor function [J]. Acta Neurochir Suppl, 2006, 96: 329—334.
- [28] Hannila SS, Kawaja MD. Nerve growth factor-mediated collateral sprouting of central sensory axons into deafferented regions of the dorsal horn is enhanced in the absence of the p75 neurotrophin receptor [J]. J Comp Neurol, 2005, 486 (4): 331—343.
- [29] Novikova L, Novikov L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor reduces necrotic zone and supports neuronal survival after spinal cord hemisection in adult rats [J]. Neurosci Lett, 1996, 220(3): 203—206.
- [30] Lu J, Waite P. Advances in spinal cord regeneration [J]. Spine, 1999, 24(9): 926—930.
- [31] Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesberry WR. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, and neurotoxicity and increase antioxidants enzyme activities in hippocampal neurons[J]. J Neurochem, 1995, 65 (4): 1740—1751.
- [32] Hokfelt T, Ceccatelli S, Gustafsson L, et al. Plasticity of NO synthase expression in the nervous and endocrine systems [J]. Neuropharmacology, 1994, 33(11): 1221—1227.
- [33] Li Y, Chen J, Chen XG, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery [J]. Neurology, 2002, 59(4) : 514—523.
- [34] Liu Y, Dulchavsky DS, Gao X, et al. Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production [J]. J Surg Res , 2006, 136(2) : 336—341.
- [35] Shi E, Kazui T, Jiang X. Therapeutic benefit of intrathecal injection of marrow stromal cells on ischemia-injured spinal cord [J]. Ann Thorac Surg, 2007, 83(4): 1484—1490.
- [36] Demediuk P, Saunders RD, Anderson DK, et al. Early membrane lipid changes in laminectomized andtraumatized cat spinal cord [J]. Neurochem Pathol , 1989, 7(1): 79—89.
- [37] Matz PG, Lewen A, Chan PH. Neuronal, but not microglial, accumulation of extravasated serum proteins after intra-cerebral hemolysate exposure is accompanied by cytochrome C release and DNA fragmentation [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(8): 921—928.
- [38] Matz PG, Fujimura M, Lewen A, et al. Increased cytochrome C-mediated DNA fragmentation and cell death in manganese-superoxide dismutase-deficient mice after exposure to subarachnoid hemolysate [J]. Stroke, 2001, 32(2): 506—515.
- [39] 吴碧莲,贾小力,陈少强.静脉注射骨髓间充质干细胞可抑制大鼠损伤脊髓水通道蛋白-4的表达[J].解剖学杂志, 2008, 31(5): 691—708.
- [40] Joshi M, Fehlings MG. Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 2. Quantitative neuroanatomical assessment and analysis of the relationships between axonal tracts, residual tissue, and locomotor recovery[J]. J Neurotrauma, 2002, 19(2): 191—203.