

神经干细胞在脑性瘫痪中的临床应用

杨智权¹ 米立新^{1,2}

对于干细胞的研究在20世纪末生命科学发展进程中占有举足轻重的地位,在推进医疗事业的发展和某些疾病的诊治方面具有重要的现实意义和研究价值。依据发育阶段的差异,干细胞可分为胚胎干细胞和成体干细胞。

神经系统疾病的临床前期研究较多应用的是脐血干细胞、神经干细胞(neural stem cells, NSCs)和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),其中NSCs的研究近年来更是成为脑科学研究的重要领域。

1 脑性瘫痪与神经干细胞简述

脑性瘫痪(cerebral palsy, CP)是从出生前至婴儿期由于各种原因引起的非进行性脑损伤或发育缺陷所致的综合征,主要表现为中枢性运动障碍及姿势异常,并可同时伴有癫痫、智力低下、语言和视觉障碍等。自20世纪80年代初康复医学引入我国以来,小儿CP的康复在李树春教授等老一辈专家的开创下,在不断涌现的一批批中青年专家学者及热爱儿童康复医学的专业工作者的努力下,经历了20余年从无到有,从开创到发展的历史阶段^[1]。但到目前为止,尚无一种针对其原发病——脑损伤的确切而有效的治疗方法,尤其是对于重度CP,现行的各种康复治疗手段效果甚微。干细胞指的是处在分化过程当中,有分裂增殖能力,而且可以分化产生多种特定细胞的原始细胞。Anderson等^[2]早在1989年就提出了神经干细胞的概念,并通过实验首先证实了NSCs的存在。后来Cattaneo和Reynolds等^[3]分别在Science及Nature上登载了关于NSCs发现和其特性的文章。NSCs指能自我更新,有多向分化潜能的细胞,可分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞等。2000年,Gage^[4]曾把NSCs的特性总结为:①能分化成神经组织或源自神经系统;②可自我更新;③能够以不对称细胞分裂的方式产生新细胞。人们对神经干细胞的研究,改变了神经元不会再生的传统观念,现在神经干细胞已被从胚胎及成年哺乳动物的中枢神经系统中分离纯化出来。NSCs的形态、位置和表面标志已被初步认识、分离,培养技术日趋成熟,对其调控机制、迁移特性的研究也进一步深入,外源性神经干细胞移植治疗和内源性神经干细胞激活疗法等临床实验也已展开,临床开展的神经干细胞移植已经应用于人类神经组织损伤和神经系统退行性疾病的治

疗^[5]。CP作为一种现有医疗手段下还不能有效治疗的疾病,该病可使患者不同程度地丧失生活自理能力,使我们的社会、家庭以及患者本人都遭受极大的精神痛苦和经济负担,从而成为人类社会面临的共同挑战。近些年来,有关NSCs治疗CP的基础与临床研究,显示出了令人欣慰的治疗前景。

2 目前的观点

NSCs不但有利于神经元的再生和脑功能的重组,而且有望以基因治疗的方式,利用基因修饰治疗神经系统疾病,表达外源性的神经递质、神经营养因子及代谢性酶,为神经系统的诸多疑难疾病提供新的治疗途径^[6]。这种具有广泛应用前景的干细胞,有望作为脑内移植的供体细胞以及基因治疗的载体用于临床,这也为CP的治疗提供了新的思路。虽然NSCs的来源、定向诱导和靶向迁移、植入细胞的调控、免疫耐受以及NSCs移植治疗机制、活体示踪等太多的疑问和技术难点有待突破,而且一直以来胚胎干细胞移植在其安全性和伦理学方面存在着争议,而大部分NSCs也是由胚胎干细胞培养分化而来的,因此国内外的一些专家学者并不鼓励患者去尝试。

3 基础研究进展

在基础研究领域,涉及干细胞移植治疗神经系统疾病的有效性的研究,已经取得共识,但在干细胞移植后的作用机制、细胞归宿及干细胞治疗的最佳途径方面仍无定论^[7]。近年来,人们从神经系统中分离出来的神经干细胞作为神经细胞和神经胶质细胞的共同前体细胞,不仅具有极强的自我更新和增殖能力,同时在神经损伤的修复过程中也发挥着极其重要的作用。有研究表明,移植后的神经干细胞不仅可以在受体内存活,而且可以进一步增殖、分化,完成受损部位结构和功能的修复^[8]。

Englund等^[9]把人NSCs移植到大鼠大脑皮质后,利用免疫组化检测及膜片钳技术显示:移植以后的细胞可完整地整合到宿主组织中,分化成具有正常的电生理特征的皮质样细胞和海马区锥体神经细胞,可接受邻近细胞兴奋性和抑制性刺激信号,与邻近部位的神经细胞形成突触联系,构成一定长度的轴突投射,并具有神经电信号传递功能。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.01.024

1 北京康复中心康复科,北京,100144; 2 通讯作者

作者简介:杨智权,男,硕士,康复医师; 收稿日期:2009-05-02

Cummings 等^[10]将人 NSCs 移植入小鼠损伤的脊髓中后, NSCs 与宿主组织可良好整合、形成突触联系,并有髓鞘形成,这些可证实 NSCs 除可在自体移植,重建受损神经网络中应用外,还存在异体,甚至异种间移植使用的可能性。还有人在免疫缺陷的裸鼠脊髓中应用 NSCs 移植,三个月后同样发现移植体良好地整合到宿主组织中,并且检测到多种神经递质及递质受体(谷氨酰胺、GABA、胆碱类递质及其相关受体),通过人特异性和鼠特异性单抗标记移植体和宿主的轴突投射和突触连接,证明移植体与宿主脊髓神经元形成了突触联系,提示移植的 NSCs 可以分化为功能性神经细胞^[11]。

在研究中同时也发现移植的 NSCs 除能分化为功能性细胞外,可能通过移植细胞分泌神经营养因子(如脑源性神经营养因子),对损伤部位的宿主细胞产生营养、修复作用,使因损伤而变小的细胞恢复正常,提高宿主神经元轴突可塑性,增加移植区的轴突数量和密度^[12]。此外,激活体内内源 NSCs 治疗神经损伤也逐渐得到广泛关注。因此,NSCs 在治疗神经损伤中的应用研究已成为当前神经生物学基础理论和临床应用研究的热点。通过分析与研究可以看出 NSCs 治疗脑损伤中有着明显优势,而限于目前的争议,如 NSCs 移植后是否存在致瘤性、免疫排斥以及细胞存活等问题,而且许多问题尚未解决或没有一致性的看法。现有的动物模型如小鼠及大鼠等,寿命较短,适合研究部分免疫应答和反应方面的机制问题,尚不能完成在一个个体上连续跟踪 NSCs 移植后的各种变化和反应,特别是慢性排斥反应及致瘤性,故不能成为理想的人 NSCs 移植治疗模型。所以,将来使用寿命长、遗传背景清楚和一致的动物为模型,以便长期观察自体 and 异体的 NSCs 移植后的治疗效果、慢性排斥反应以及致瘤性等,可能成为 NSCs 移植治疗研究需要考虑的问题^[13]。

近几年国内外一些关于 NSCs 用于 CP 临床治疗方面的基础性研究取得了新的进展,例如:Levison 等^[14]认为脑室下带(subventricular zone, SVZ)的少突胶质细胞祖细胞及神经干细胞在一过性缺氧缺血后导致室周白质再生困难,同时导致神经元的增生及分化障碍以及髓鞘的形成障碍,继而出现脑瘫;也有学者推测,在产前因素和不明因素所导致的脑瘫儿童中,由于某种因素导致了神经干细胞和少突胶质细胞祖细胞受到破坏而数量不足;各种起调控作用的神经营养因子的缺乏或改变而引起的调控干细胞分化功能障碍;脑发育过程中胶质细胞的发育障碍而导致引导功能的紊乱^[15]。Akiyama 等^[16]将骨髓基质干细胞在显微镜下注入免疫抑制型大鼠的脱髓鞘脊髓中,在中枢神经和周围神经中均可看到髓鞘再生的轴突,而且轴突的传导速率得到了提高。

Geuna S 等^[17]将骨髓基质干细胞注入大鼠的坐骨神经横断面的远残端,发现移植细胞在坐骨神经断端至少存活 33d,其中 5%呈雪旺细胞样表现型,提示骨髓基质干细胞注入在

坏死的周围神经中能生存,并能分化成雪旺细胞,促进功能恢复等等。这样基于干细胞研究对于儿童脑瘫的发生及演进的了解,参照动物实验的成果,有些专家也在从事这方面的临床治疗工作。

4 临床应用进展

NSCs 在脊髓损伤和脑卒中后遗症的治疗中应用较早,脊髓损伤患者损伤平面以下感觉、运动、反射及尿便功能障碍,胚胎的脊髓组织、雪旺细胞以及基因修饰的功能细胞等载体移植均有助于神经系统的恢复,其中神经干细胞因与损伤区域的细胞同源,故具有独特的治疗优势^[18],有学者做了探讨神经干细胞移植注射治疗脑卒中后遗症的方法、效果、安全性及可行性的研究,采用鞘内注射法将培养的人胚胎神经干细胞移植到脑卒中后遗症患者脑内,并随访观察 24 个月,采用欧洲卒中量表评分标准、生活功能评分标准进行评分评价其疗效。欧洲卒中量表评分标准提高 1 分以上为有效,无提高或下降为无效。对所有患者行头颅电子计算机体层扫描、头部磁共振成像、心电图、肺部 X 射线片及血液生化学检查,评价此方法临床应用的安全性。结论认为鞘内注射移植神经干细胞治疗脑卒中后遗症有效可行^[19]。

NSCs 用于 CP 的治疗相对较晚,李贵涛等^[20]应用矫形手术,自体骨髓源神经干细胞移植并正中神经部分切断方法治疗重型脑性瘫痪上肢痉挛患儿(男,12 岁,病程 12 年)。采用韦氏儿童智力量表评定患儿智商,应用巴氏指数评价日常生活自理能力,改良的 Ashworth 方法评定肌张力,徒手肌力检查评定肌力,被动关节活动范围检查判断痉挛及挛缩程度,结果脑性瘫痪患者所致肘、腕关节严重痉挛和屈曲挛缩,行正中神经部分切断和自体骨髓源神经干细胞移植后,不但降低了屈肌痉挛的状态,而且改善了正中神经部分切断后腕手指屈曲无力和感觉异常。说明此方法不仅有利于周围神经横断导致感觉运动功能缺损的修复,而且对肌痉挛状态具有较好的作用。干细胞有可能改变中枢神经和周围神经自身的修复模式^[21]。

2005 年 11 月—2006 年 12 月,吴芳等^[22]应用脐血间质干细胞鞘内注入治疗 20 例 CP 患者,对治疗前、治疗后 CP 患者的肢体运动(GMFM 评分)、肌张力(改良 Ashworth 评分)各方面的功能进行评估,结果移植治疗前 CP 患者 GMFM、改良 Ashworth 评分与治疗后比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$),认为脐血间质干细胞移植治疗可以显著改善 CP 患者的部分神经系统功能(治疗后 1 个月进行评估,未提及配合使用其他治疗)。2005 年 8 月—2007 年 6 月,吴芳等^[23]做了脑瘫患儿应用脐血间质干细胞的临床安全性研究,通过脐血间质干细胞鞘内和静脉注射治疗 44 例脑瘫患儿,对治疗前、治疗后脑瘫患儿的血常规、肝肾功能、电解质、血清酶学、血清免疫蛋白

及补体、T细胞亚群进行对比研究。结果显示患儿的血常规、肝肾功能、电解质、细胞与体液免疫各项指标治疗前后的检测结果差异无显著性意义($P > 0.05$),说明无论静脉输注还是腰椎穿刺蛛网膜下腔干细胞移植,对于人体各项重要指标不产生重大影响,可认为脐血源神经干细胞的临床应用(短期内观察)是安全可行的,还将进行长期随访,以进一步对其安全性进行全面完整的评价。栾佐等^[24]2005年5月—2006年5月对45例脑性瘫痪患儿进行了人胚胎来源神经前体细胞移植治疗,并于手术治疗前28天、手术治疗后28天、3个月、6个月分别采用零到六岁儿童神经心理发育检查表、Peabody运动发育评估量表和粗大运动功能测试量表(gross motor function measure, GMFM)及相关检查包括头颅正电子发射型计算机断层扫描(positron emission tomography, PET)、脑电图、头颅核磁共振平扫(MRI)、功能磁共振成像(functional magnetic resonance imaging, fMRI)、视觉诱发电位(visual evoked potential, VEP)、脑干听觉诱发电位(BAEP)进行评定和疗效分析,认为手术后出现家长及管床医师共同认可的精神运动方面临床表现有显著改善,同时精神运动发育量表评估有显著提高。选择的44患儿均有明确的围产期损伤病史,临床表现重度脑损伤,术前平均康复时间6个月,家长反映康复治疗无效或进展缓慢,所有患儿均无生活自理能力,需要家长监护和照顾,中断康复训练治疗后患儿有不同程度倒退现象,因而自愿接受手术治疗。患儿手术疗效最早于术后3天出现,大部分有效患儿在术后1个月内出现,个别患儿在2个月开始显现疗效;除1例患儿术后患单纯疱疹病毒感染,临床表现退回术前水平外,所有患儿显效后临床观察无倒退现象,术前、术后康复训练与未进行康复训练的患儿有效率无显著性差异。刘瑞文等^[25]对4例因出生时缺血缺氧确诊为脑性瘫痪的患者(男2例,女2例,年龄分别为14岁、9岁、28个月、17岁)在局麻下行微创立体定向嗅鞘细胞移植术,选取双额放射冠为注射靶点,每侧 1.0×10^6 个细胞,术后给予止血、抗感染、康复等常规处理,分别于嗅鞘细胞移植前、移植后4周采用脑瘫综合评定量表、脑瘫日常生活力量表进行评价,结果嗅鞘细胞移植术后4周,4例患者较术前均有不同程度地神经功能改善,未出现手术并发症,认为嗅鞘细胞移植治疗脑性瘫痪患者近期评价安全可行,可部分改善神经功能与生活质量,长期效果有待进一步随访。陈琳等也曾嗅鞘细胞脑内移植治疗肌萎缩侧索硬化,通过移植前后肌电图改变来反映治疗的有效性,结果认为嗅鞘细胞移植近期能改善肌萎缩侧索硬化患者的神经功能,延缓病情的进行性恶化^[26]。随着神经干细胞研究的深入,在阻止脑细胞的死亡及凋亡,调控干细胞的分化与迁移,改善神经营养因子活性或胶质细胞的功能等方面都将会为阻止脑瘫的形成或促进脑瘫后的康复提供美好的前景^[27]。

5 小结

随着内源性神经干细胞研究的深入,证实在自我更新及分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的潜能方面,不管是从神经系统分离的神经干细胞,还是骨髓间充质干细胞、脐血干细胞等成体干细胞,在体外均具有这种能力,但要实现干细胞移植尤其是神经干细胞移植作为一种新型的生物治疗方法在CP临床治疗中科学合理的应用与推广,人们还有很长的路要走。目前神经干细胞移植的有效性虽未得到公认,但究其机制细胞移植后的神经营养作用,对神经轴突的恢复和生长有明显的作用,也有学者认为或许是细胞的移植启动了损伤脑组织的某种自身修复机制,从而产生效果。但目前尚缺乏可靠的证据来证明移植细胞和宿主细胞之间确实建立了某种可靠的信息传递连接^[28]。时至今日,神经干细胞研究越来越受到人们的关注,在医学研究领域中去粗取精,去伪存真,更好的发挥好其临床应用的巨大潜力,将为重度小儿脑瘫的治疗,带来新的希望。

参考文献

- [1] 李晓捷.浅析我国小儿脑瘫康复治疗现状[C].黑龙江省康复医学会第二届儿童康复学术会议论文汇编,2006.1—5.
- [2] Anderson DJ, Michelsohn A. Role of glucocorticoids in the chromaffin-neuron developmental decision[J]. *Int J Dev Neurosci*, 1989, 7(5):475—487.
- [3] 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.
- [4] Gage FH. Mammalian neural stem cells[J]. *Science*, 2000, 287(5457):1433—1438.
- [5] 陈汉想.神经干细胞相关研究进展[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(28):5580—5583.
- [6] 田增民,孙君昭.神经干细胞应用研究进展[J].中国实用内科杂志,2007,27(10):734—736.
- [7] 王任直,魏俊吉.应用成体干细胞临床治疗神经系统疾病——极具转换医学研究价值的领域[J].基础医学与临床,2008,28(8):789—791.
- [8] 黄家红,刘俊峰,黄军华.神经干细胞在缺氧缺血性脑病治疗中的作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(16):3144—3146.
- [9] Englund U, Bjorklund A, Wictorin K, et al. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26):17089—17094.
- [10] Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(39):14069—14074.
- [11] Yan J, Xu L, Welsh AM, et al. Extensive neuronal differentiation of human neural stem cell grafts in adult rat spinal cord[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(2):e39.
- [12] Redmond DE Jr, Bjugstad KB, Teng YD, et al. Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(29):12175—12180.
- [13] 张彭跃,沙红英,彭钢,等.神经干细胞在治疗脑损伤中的应用[J].生命科学,2008,20(4):646—649.
- [14] Levison SW, Rothstein RP, Romanko MJ, et al. Hypoxia/isch-

- emia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells[J]. Dev Neurosci, 2001, 23(3):234—247.
- [15] Mito T, Ando Y, Takeshita K, et al. Ultrasonographical and morphological examination of subependymal cystic lesions of maturely born infants[J]. Neuropediatrics, 1989, 20(4):211—214.
- [16] Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells[J]. J Neurosci, 2002, 22(15):6623—6630.
- [17] Geuna S, Borriero P, Filogamo G. Postnatal histogenesis in the peripheral nervous system[J]. Int J Dev Neurosci, 2002, 20(6):475—479.
- [18] 王磊,王连仲.神经干细胞与脊髓损伤的治疗[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(12):2335—2338.
- [19] 杨清成,梁长春,李敏霞,等.神经干细胞移植治疗脑卒中后遗症59例[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(20):4033—4035.
- [20] 李贵涛,徐如祥,姜晓丹.自体骨髓源神经干细胞移植加矫形手术治疗脑性瘫痪上肢重度痉挛性畸形1例:2年随访[J].中国临床康复,2005,9(30):63—65.
- [21] 杨柳,段小军.骨组织工程学中种子细胞研究的前沿问题[J].中国临床康复,2002,3(4):532—533.
- [22] 吴芳,杨佳勇,张敏,等.脐血间质干细胞移植对脑性瘫痪儿童神经系统功能的影响20例分析[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(16):3198—3200.
- [23] 吴芳,杨万章,张敏,等.脑瘫患儿应用脐血间质干细胞的临床安全性研究[J].中西医结合心血管病杂志,2008,6(12):1405—1406.
- [24] 栾佐,刘卫鹏,屈素消,等.人神经前体细胞移植治疗脑性瘫痪患儿疗效观察[C].首届国际神经修复学会年会论文汇编,2008,94—97.
- [25] 刘瑞文,黄红云,郝海涛,等.胚胎嗅鞘细胞移植治疗脑性瘫痪:4例术后4周结果报告[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,2(28):5645—5648.
- [26] 陈琳,黄红云,江昭,等.肌电图评价肌萎缩侧索硬化389例嗅鞘细胞脑内移植的效果[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(43):8422—8424.
- [27] 温恩懿,赵聪敏.儿童脑性瘫痪神经干细胞机制的研究进展[J].中国临床康复,2002,6(23):3537.
- [28] Hess DC, Borlongan CV. Stem cells and neurological diseases[J]. Cell Proliferation, 2008, 41(Suppl 1):94—114.

·综述·

神经肌肉促进术治疗脑卒中后偏瘫侧肢体骨质疏松症的研究现状*

王聪聪¹ 张秀清^{1,2}

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是老年人,尤其是绝经后老年妇女的一种常见病。脑卒中患者因长期卧床和运动障碍可引起不同程度的骨质疏松症^[1],偏瘫侧尤为明显,而且脑卒中患者较正常人更易摔倒,导致骨折发生率也明显增高。据Watanabe报道83例脑卒中患者40%合并骨质疏松,脑卒中后股骨颈骨折达30%,髋关节骨折发生的危险性比一般人群高4倍。因此,采取有效的治疗措施防止脑卒中后骨质疏松症的发生和发展,降低脑卒中患者骨折的发生率,提高生存质量具有重要意义。据国内外最新研究发现,运动疗法和作业疗法为主的神经肌肉促进术通过上调瘦素水平促进骨化细胞增殖、分化同时抑制破骨细胞的生成,而有效防止骨质疏松症是脑卒中后偏瘫患者最有效和标准的康复治疗措施,及早应用能够降低骨折的发生率。本文就神经肌肉促进术治疗脑卒中后偏瘫侧肢体骨质疏松症的研究现状作一综述。

1 骨质疏松症

1996年国际骨质疏松症会议把OP定义为:低骨量、骨显微结构破坏,引起骨的脆性增加从而易骨折。

目前,OP诊断主要依靠骨密度(bone mineral density,

BMD)测量^[2],双能X线吸收法(DEXA)所测定的BMD值是WHO确认的用于诊断OP的金标准。OP在临床上主要分为原发性和继发性两大类。废用性骨质疏松是继发性骨质疏松中的最常见类型,它是多种原因引起骨骼承受的应力减少,导致骨吸收、骨形成脱耦联——骨吸收大于骨形成,出现低骨量及骨组织微结构退变为特征的一种骨骼疾病,脑卒中导致的肢体偏瘫是废用性骨质疏松发生的主要原因。

1.1 骨质疏松症与脑卒中

一般认为脑卒中患者偏瘫1个月后就出现骨密度和骨量减少的表现,偏瘫和卧床时间越长,这种改变就越明显,在6个月左右达到高峰。国内有研究发现^[3],脑卒中后偏瘫患者在发病2个月时骨质疏松症患病率为6.7%,3—6个月为46.9%,6—10个月骨量丢失无明显进展。王晓玲^[4]选择了136例脑卒中后偏瘫患者作为观察组,118例健康体检的正常人作为对照组,采用DEXA测定观察组患侧、健侧肢体和对照组双侧肢体,结果显示观察组的患侧股骨颈、大转子和Ward三角的骨密度值明显低于对照组和健侧($P < 0.05 - 0.01$),而且患侧肢体运动能力越差、病程越长、ADL能力越差,骨密度越低。提示脑卒中后容易并发骨质疏松症^[5],而且偏瘫患者的骨量减低与运动和活动能力密切相关^[6],后两者

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2012.01.025

*基金项目:山东省科技厅立项课题(2007ZRB14213)

1 山东大学附属千佛山医院神经内科,济南,250014; 2 通讯作者
作者简介:王聪聪,女,硕士研究生; 收稿日期:2011-02-12