

脊髓损伤后内源性神经干细胞增殖和分化的影响因素*

陈丹莹¹ 王琳² 张立新^{1,3}

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的修复是目前康复界热议的话题,由于其病理生理过程复杂,运用传统的药物及手术治疗手段对于细胞水平损害造成的神经功能缺失往往难以逆转^[1]。内源性神经干/祖细胞(endogenous neural stem/progenitor cell, eNSC/eNPC)^[2-3]在脊髓损伤的修复过程中发挥了重要的作用,因此许多学者对脊髓损伤后内源性神经干细胞的病理生理反应,以及如何能够调动内源性神经干细胞使其有利于脊髓损伤的修复,进行了广泛的研究。重新激活和动员成熟脊髓的eNSC,可以使eNSC能够分泌营养因子,从而提供有利于神经生长的内环境,形成新的神经元和新的少突胶质细胞,使神经再生和残余轴突再髓鞘化,来促进神经功能恢复^[4-5]。脊髓损伤的方式不同,其对于eNSC的激活也有所不同^[6-9]。在治疗方面,除了药物,康复界近几十年兴起的物理治疗,如电针、高压氧、磁刺激和运动训练,其作用机制都与eNSC的激活有着密不可分的关系^[9-12]。本文就脊髓损伤后的内环境、脊髓损伤的方式及物理治疗对eNSC增殖及分化之影响的国内外研究进展进行综述,以供同行参考。

1 内环境对eNSC增殖和分化的影响

1.1 神经营养因子

神经营养因子-3(neurotrophins-3, NT-3)、NT-4可以促进eNSC的增殖、迁移和活化。在神经营养因子的研究中,Mikami等^[13]移植外周树突细胞到脊髓损伤大鼠体内,发现树突细胞激活eNSC的同时还分泌NT-3,因此推测NT-3可能参与了NSC增殖、活化。同样的,NT-3也有助于NSC的迁移和分化,2015年,有研究将NT-3壳聚糖生物材料插入到横断切除5mm脊髓组织的大鼠体内,发现通过NT-3的缓慢释放,可以促进神经干细胞迁移到受损的脊髓组织,分化成神经元并且形成功能性的神经网络^[14],同样的发现也见于NT-4的研究^[15]。曾茜等^[15]还进一步发现NT-4对神经干细胞的分化作用大于其增殖作用。

吴海鹰等^[16-17]发现脑源性神经营养因子(brain derived

neurotrophic factor, BDNF)的表达,可以促进内源性神经干细胞增殖、分化,进而促进单侧皮质脊髓束(corticospinal tract, CST)损伤后的大鼠肢体功能恢复。但是Mortazavi Y等^[18]将神经生长因子(nerve growth factor, NGF)基因重组进入骨髓间充质干细胞中,96h后发现NGF促进了神经干细胞和髓鞘蛋白标记物基因表达,但是重组后BDNF的表达减少,即eNSC的增殖和分化,不一定是BDNF表达增加的结果。因此,BDNF对于eNSC增殖和分化的影响有待进一步研究。

1.2 炎症因子

有研究发现某些炎症因子不利于神经修复,利用药物等手段抑制这些炎症因子能够促进eNSC向有利于神经修复的方向增殖和分化。大鼠脊髓损伤后早期应用肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)拮抗剂联合酪氨酸激酶C-神经干细胞移植,抑制TNF- α 的表达,可有效促进大鼠神经元轴突及髓鞘再生,进而促进运动功能恢复^[19]。张钦等^[20]在PPAR γ 激动剂对脊髓损伤神经保护作用的研究中,发现治疗组TNF- α 、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)表达降低,同时增殖标记物BrdU和干细胞标记物Nestin双重标记数也明显多于对照组。

虽然目前主流的观点认为,SCI后继发的免疫炎症反应会进一步损伤神经组织,但是也有些学者试验证实,抑制炎症因子并不是促进神经干细胞再生的充分必要条件,免疫反应在脊髓损伤修复中也起到正面的作用。Schröter A等^[21]发现甲泼尼龙减少内源性神经干细胞增生,而其机制可能与减轻了炎症有关。另外也有研究表明,某些小胶质细胞可以表达肿瘤生长因子 β (tumour growth factor β , TGF β)、精氨酸酶-1、IL-10、IL-4和IL-13,这些炎症因子会促进内源性神经干细胞的活化^[22-24]。

2 不同脊髓损伤模型对于NSC的增殖和分化的影响

SCI动物模型主要分为横断、挫伤和挤压伤,对于不同的SCI模型,其损伤后eNSC的反应有相似也有不同。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.10.021

*基金项目:国家自然科学基金项目(81101462);辽宁省自然科学基金项目(201602875);辽宁省公益科学基金项目(2016003001)

1 中国医科大学附属盛京医院康复中心,110135; 2 中国医科大学附属第四医院骨外科; 3 通讯作者

作者简介:陈丹莹,女,硕士研究生; 收稿日期:2017-09-24

哺乳动物脊髓损伤后 eNSC 增殖反应在某些方面是相同的,但是细胞增殖的位置和细胞增殖率等,却随着损伤类型和严重程度不同而存在差异。在大部分损伤模型中,增殖开始于 24h 之内,并且都在第 3 天达到增殖的高峰,但是增殖反应在 1—2 周时减少,并且在 3—4 个月时下降到对照组水平^[8-9,25-27]。而对于横断损伤,细胞增殖率相对更高,但这种增殖反应持续时间可能相对短一些^[6-7,26,28]。

此外,增殖的细胞的转归却因模型的不同而不同。在横断损伤后,大部分的增殖细胞表达星形胶质细胞标记物(GFAP+或 S100b+cells),有助于纤维胶质瘢痕的形成^[25-26];但是在挫伤和挤压伤的模型中,其导致的缺血和细胞坏死使脊髓脱髓鞘化从而导致细胞死亡,大部分在损伤区域以外的新生的细胞表达少突胶质细胞前体细胞(oligodendrocyte precursor cell, OPC)的标志物 Ng2,而后分化成为 CC1+的成熟少突胶质细胞^[8-9,29]。

3 物理治疗对内源性神经干细胞增殖、迁移和分化的影响

3.1 电针

目前认为电针产生的脉冲电磁场可使神经元发生有效极化,增加酶的活性,轴突运输加强,有利于受损神经元再生^[30]。

在耿鑫^[31]的实验中电针组相比其他对照组,神经干细胞标志物 Nestin 阳性细胞数量更多。电针还可促进 eNSC 分化成功能性少突胶质细胞,使受损的神经元再髓鞘化,已有实验证实电针能促使 eNSCs 向 OPC 分化,OPC 继而分化为成熟的少突胶质细胞,并形成轴突髓鞘^[9]。在 Wu H 等^[32]的研究中,电针组随着时间的延长,NG2 等少突胶质细胞的标记物增高,而 GFAP 的星形胶质细胞的标志物却没有显著差异。其实,并不是电针治疗对神经干细胞分化为星形胶质细胞没有影响,而是电针治疗在损伤早期(损伤后 7d, 14d)能促进星形胶质细胞的活化,并在后期(损伤后 28d)抑制 GFAP 的免疫反应性,从而有利于神经功能重塑^[33]。

3.2 高压氧

高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)对于脊髓内源性神经干细胞的增殖和分化的研究并不多见。其中刘海等^[10]对于脊髓半横断的大鼠模型给予高压氧治疗,发现在 HBO 的作用下,eNSCs 的增殖得到了加强;增殖的 eNSCs 少部分分化为神经元和星形胶质细胞,并且随时间的推移分化过程亦在进行,该试验表明 HBO 能够促进损伤脊髓组织内源性神经干细胞的增殖、分化。

3.3 磁刺激

重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)是利用电磁感应原理,促进脊髓损伤大鼠运动功能的恢复,其机制可能与促进 eNSC 增殖和分化有关^[34]。

许涛等^[11]研究发现,Allen's 法脊髓损伤后 24h,开始给予大鼠频率为 0.5Hz,峰值强度为 1.9T 磁刺激治疗,治疗后损伤脊髓组织局部 Nestin 的表达增强,且大鼠行为学评分也明显高于治疗组,说明磁刺激可促进损伤脊髓大鼠的再生修复和功能恢复;李哲等^[12]通过溴乙锭注射入大鼠脊髓左侧背索,来复制局灶性的脊髓损伤模型,而后给予大鼠强度为 0.76T、1.52T、1.9T,刺激频率为 1Hz 的磁刺激治疗,发现随着磁刺激强度的增加,GFAP 的阳性表达显著增强。

3.4 运动训练

Lee Y 等^[35]发现,褪黑素和运动训练联合治疗大鼠脊髓损伤,可以在 14 天和 21 天时显著地促进后肢功能的恢复,伴随着脊髓背侧、腹侧和中央部 GFAP+细胞的增加,和 BrdU+/Nestin+细胞的增加。在运动训练对于 eNSCs 的分化的研究中,发现康复训练可以延迟星型胶质细胞的增生^[36]。所以,运动训练能够促进内源性神经干细胞的增殖和分化,从而替代受损区域的细胞,进而有利于受损神经的恢复。

4 小结

eNSC 可以一方面保持自我更新,另一方面不断分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。在疾病状态下,eNSC 会改变分化和迁移的模式,其中生长因子和炎症因子都参与了 eNSC 的增生和分化,如果寻找恰当的动员措施,增加促生长因子的表达,抑制不利炎症因子的表达,就有希望修复受损的神经功能。

内源性神经干细胞的反应对于不同 SCI 的模型也明显不同,所以治疗方法也应该针对不同损伤类型而选择最优的方法。如抑制胶质瘢痕形成的抑制剂可以在横断损伤中更有效,因为在这种损伤中阻碍了轴突的出芽的更多的是胶质瘢痕。在挫伤模型中,补充内源性星形胶质细胞可能会更为有效,因为有证据表明特定的星形胶质细胞亚型可能会有助于 SCI 后功能的恢复^[34,37]。

此外,由于干细胞的增殖发生于损伤后前 3d,各种物理治疗时间点也应设定在第 3 日之前。在后来的时间,治疗干预也不能停止,因为需要给细胞创造分化和成熟的合适环境。

eNSC 在中枢神经系统创伤修复方面具有其独特的优势,找到合适的动员方式,改善受损区域周围微环境,有望成为中枢神经系统创伤修复的极具潜力的治疗途径。

参考文献

- [1] Yuan Q, Liu H, Wu X, et al. Characteristics of acute treatment costs of traumatic brain injury in Eastern China--a multi-centre prospective observational study[J]. Injury, 2012, 43(12):2094—2099.
- [2] Duan H, Song W, Zhao W, et al. Endogenous neurogenesis in adult mammals after spinal cord injury[J]. Sci China Life Sci, 2016, 59(12):1313—1318.

- [3] Zheng W, ZhuGe Q, Zhong M, et al. Neurogenesis in adult human brain after traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2013, 30(22):1872—1880.
- [4] Koblar SA, Turnley AM, Classon BJ, et al. Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6):3178—3181.
- [5] Lepore AC, Fischer I. Lineage-restricted neural precursors survive, migrate, and differentiate following transplantation into the injured adult spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2005, 194(1):230—242.
- [6] Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, et al. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(4):470—482.
- [7] Meletis K, Barnabé-Heider F, Carlén M, et al. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells[J]. *PLoS Biology*, 2008, 6(7):e182.
- [8] Lytle JM, Wrathall JR. Glial cell loss, proliferation and replacement in the contused murine spinal cord[J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 25(6):1711—1724.
- [9] Zai LJ, Wrathall JR. Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury[J]. *Glia*, 2005, 50(3):247—257.
- [10] 刘海,王忠诚.高压氧对大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞的诱导作用[J].*中国康复理论与实践*,2006,12(5):369—371.
- [11] 许涛,郭风劲,郭铁成,等.磁刺激对损伤大鼠脊髓组织巢蛋白表达的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2005,(12):720—723.
- [12] 李哲.磁刺激对星形胶质细胞迁移的影响及机制研究[D].武汉:华中科技大学,2010.
- [13] Mikami Y, Okano H, Sakaguchi M, et al. Implantation of dendritic cells in injured adult spinal cord results in activation of endogenous neural stem/progenitor cells leading to de novo neurogenesis and functional recovery[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 76(4):453—465.
- [14] Yang Z, Zhang A, Duan H, et al. NT3-chitosan elicits robust endogenous neurogenesis to enable functional recovery after spinal cord injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(43):13354—13359.
- [15] 曾茜,向虹雨,饶莹,等.神经电刺激对大鼠脊髓挫伤后神经营养因子4和增殖细胞核抗原表达影响的研究[J].*中国康复医学杂志*,2015,30(11):1100—1104.
- [16] 吴海鹰.电针对SCI大鼠轴突及干细胞可塑性影响及相关机制研究[D].昆明:昆明医科大学,2013.
- [17] Germanà A, Sánchez-Ramos C, Guerrero MC, et al. Expression and cell localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB during zebrafish retinal development[J]. *J Anat*, 2010, 217(3):214—222.
- [18] Mortazavi Y, Sheikhsaran F, Khamisipour GK, et al. The evaluation of nerve growth factor over expression on neural lineage specific genes in human mesenchymal stem cells[J]. *Cell J*, 2016, 18(2):189—196.
- [19] 王乐,陈宁宁,李婷婷,等.肿瘤坏死因子 α 拮抗剂联合酪氨酸激酶C基因修饰神经干细胞移植治疗脊髓损伤[J].*中国组织工程研究*,2017,21(21):3338—3345.
- [20] 张钦.PPAR γ 激动剂对脊髓损伤神经保护作用的机制研究[D].苏州:苏州大学,2010.
- [21] Schröter A, Lustenberger RM, Obermair FJ, et al. High-dose corticosteroids after spinal cord injury reduce neural progenitor cell proliferation[J]. *Neuroscience*, 2009, 161(3):753—763.
- [22] Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage[J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(1):101—106.
- [23] Beers DR, Henkel JS, Zhao W, et al. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 5):1293—1314.
- [24] Miron VE, Franklin RJ. Macrophages and CNS remyelination[J]. *J Neurochem*, 2014, 130(2):165—171.
- [25] Mothe AJ, Tator CH. Proliferation, migration, and differentiation of endogenous ependymal region stem/progenitor cells following minimal spinal cord injury in the adult rat[J]. *Neuroscience*, 2005, 131(1):177—187.
- [26] Horvath LL, Galimi F, Gage FH, et al. Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury[J]. *J Comp Neurol*, 2006, 498(4):525—538.
- [27] Namiki J, Tator CH. Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58(5):489—498.
- [28] Takahashi M, Arai Y, Kurosawa H, et al. Ependymal cell reactions in spinal cord segments after compression injury in adult rat[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003, 62(2):185—194.
- [29] Keirstead HS, Levine JM, Blakemore WF, Blakemore. Response of the oligodendrocyte progenitor cell population (defined by NG2 labelling) to demyelination of the adult spinal cord[J]. *Glia*, 1998, 22(2):161—170.
- [30] 罗燕,许能贵,易玮,等.电针对局灶性脑缺血大鼠大脑皮层缺血灶周围区星形胶质细胞的影响[J].*针刺研究*,2009,34(2):101—105.
- [31] 耿鑫.电针调控Notch信号通路修复大鼠脊髓损伤的实验研究[D].昆明:昆明医科大学,2016.
- [32] Wu H, Hu M, Yuan D, et al. Electroacupuncture promotes the proliferation of endogenous neural stem cells and oligodendrocytes in the injured spinal cord of adult rats[J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(15):1138—1144.
- [33] 孙连珠.夹脊电针干预脊髓损伤大鼠OL分化 and 脊髓再生的研究[D].杭州:浙江中医药大学,2014.
- [34] Davies SJ, Shih CH, Noble M, et al. Transplantation of specific human astrocytes promotes functional recovery after spinal cord injury[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3):e17328.
- [35] Lee Y, Lee S, Lee SR, et al. Beneficial effects of melatonin combined with exercise on endogenous neural stem/progenitor cells proliferation after spinal cord injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2):2207—2222.
- [36] 雷晓婷,刘兴波,王红星,等.康复训练对脊髓损伤后大鼠脊髓内再生微环境的影响[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009,29(04):429—434.
- [37] Davies JE, Pröschel C, Zhang N, et al. Transplanted astrocytes derived from BMP- or CNTF-treated glial-restricted precursors have opposite effects on recovery and allodynia after spinal cord injury[J]. *Journal of Biology*, 2008, 7(7):24.