

22(2):134-136

- [17] Ezhilarasan R, Jadhav U, Mohanam I, et al. The hemopexin domain of MMP-9 inhibits angiogenesis and retards the growth of intracranial glioblastoma xenograft in nude mice. *Cancer*, 2009, 124: 306-315.
- [18] Breier G, Lieht AH, Nicolaus A, et al. HIF in vascular development and tumour angiogenesis. *Novartis Found Symp*, 2007, (283) 126-133.
- [19] MacDonald T J, Rood BR, Santi MR, et al. Advances in the diagnosis, molecular genetics, and treatment of pediatric embryonal CNS tumors. *Oncologist*, 2003, 8(2): 174-186.
- [20] Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*, 2006, 311(5769): 1880-1885.
- [21] Marin L, Minguela A, Torio A, et al. Flow cytometric quantification of apoptosis and proliferation in mixed lymphocyte cul-

ture. *Cytometry A*, 2003, 51(2):107-118.

- [22] 徐传杰, 刘林林, 王贵全, 等. PEX 基因在肿瘤细胞中的表达及其体外对微血管生成的影响. *实验诊断学*, 2010, 14(1):14-16
- [23] 高歌, 牛朝诗, 董永飞, 等. PEX 基因修饰人骨髓间质干细胞体外培养鉴定的研究. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2009, 14(8):361-363
- [24] 高歌, 牛朝诗, 张俊等. PEX 基因修饰骨髓间质干细胞对 C6 胶质瘤细胞增殖和凋亡的影响. *中国微侵袭神经外科杂志*, 2010, 15(4):175-177
- [25] Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(2): 139-147.
- [26] Joyce JA. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 2005, 7(6):513-520.

## 神经干细胞移植治疗高血压脑出血的研究进展

王志军 综述 薛洪利 审校  
沈阳军区总医院, 辽宁 沈阳 110016

**摘要:**干细胞移植作为脑出血可能的治疗方法之一,动物实验研究表明移植细胞不但能够在脑内存活,而且促进神经功能恢复。作为一种可能治疗方法,干细胞在临床上的实验已经开始。本文就神经干细胞移植的可能机理、动物实验及在脑出血治疗方面的研究现状进行综述。

**关键词:**神经干细胞;移植;脑出血

脑出血以 50 岁左右高血压病人最常见,发病率、残疾率高,各种治疗方法虽在一程度上挽救了患者生命或改善者残疾状态,但不能从根本上治愈,人们希望通过神经干细胞替代治疗,达到预期效果。目前,关于神经干细胞的研究及移植主要用于动物试验,在临床应用方面还处于初级阶段。临床用于试验性治疗较多的有脑缺血性疾病、帕金森病等。也有不少报道显示神经干细胞移植可以在一定程度上改善脑出血患者的残疾状态,改善生活质量。

### 1 神经干细胞移植机理

神经干细胞主要来源于胚胎干细胞、成体神经

干细胞、骨髓间质干细胞、人脐带血细胞、人类脂肪间充质细胞。各类干细胞共有的生特学特性是有自我更新能力以及能通过不对称分裂产生除自我子代以外的其它类型细胞。神经干细胞的临床应用潜能源自它的生物学特性,神经干细胞及其子代细胞能在宿主脑内的许多区域发育成多种神经细胞,如神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞,未成熟的神经祖细胞以及能替代许多功能缺失的或功能异常的神经细胞,并发挥原有受损神经细胞的功能,其机制可能是:①在神经元之间形成突触中继,重建或增加了神经元回路;②通过突触中继的形成使轴突主动再生;③为轴突再生提供基质;④

收稿日期:2010-06-24;修回日期:2011-01-17

作者简介:王志军(1978-),男,神经外科硕士研究生。临床医师,主要从及神经干细胞治疗脑疾病的研究。

帮助无髓或新生轴突形成髓鞘;⑤可能与移植的细胞释放的营养因子有关。

## 2 移植干细胞的动物试验研究

Seyfried 等<sup>[1]</sup>将雄性大鼠的骨髓干细胞(BMSCS)移植到脑出血后的雌性大鼠体内,用免疫测定法测嘧啶核苷(Bru)和神经标记物证明,Bru 阳性细胞显著增加,这表明内源性神经发生,并表明不成熟神经标记物阳性率大大增加。原位杂交显示更多 BMSCS 位于血肿周围。结果表明当静注射入脑出血大鼠体内时,BMSCS 显著改善雌性大鼠神经功能恢复并减少组织损伤。Liao 等<sup>[2]</sup>等将脐血来源的间充质细胞移植入脑出血后 24 小时的大鼠体内,在出血后 3 天的血肿周围,治疗组较对照组会减少白细胞浸润、小神经胶质细胞的激活、基质金属蛋白酶的产生,此外间充质干细胞显著增加血肿周围的血管密度,且在出血 14 天,移植的间充质干细胞能够进入同侧半球的血管系统。结果表明间充质细胞治疗显著改善神经功能缺失,减轻组织损伤程度。其主要机制可能是阻止炎症,提高血管生成。Fatar 等<sup>[3]</sup>将脂肪间质干细胞通过静脉注入脑出血后 24 小时的大鼠体内,4 周后的旋转试验显示,在功能上治疗组是对照组的 1.5 倍。内生祖细胞数量的评估显示治疗组是对照组的 2 倍。结果显示脂肪干细胞的治疗提高神经功能恢复,但这个结果是通过对内源性祖细胞的刺激而不是脂肪干细胞的分化或整合达到的。上述动物试验表明无论是分化、整合成神经细胞或是对内源性祖细胞的刺激,其结果是神经功能恢复确实有所提高。

## 3 移植干细胞的临床应用

朱建新等<sup>[4]</sup>通过钻孔或开颅血肿清除后,利用血肿腔引流管向血肿腔边缘注入自体骨髓间充质干细胞,与对照组和移植前比较,移植后 6 个月治疗组神经功能缺损程度评定(NIHSS 评分)显著降低,日常生活活动能力评定(Barthel 指数)指数显著升高。治疗组 2 例患者在移植后出现一过性发热,对症处理后症状缓解。移植后 6 个月随访,除 1 例患者因肺癌导致肿瘤标记物 CA-153 升高外,颅内 MRI 及血生化指标均未出现明显异常,说明自体骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血是比较安全的,且近期效果确定,远期尚待进一步观察。

卢旺盛等<sup>[5]</sup>采用立体定向将来源于流产胎儿的神经干细胞移植至病变侧基底节区治疗脑出血后遗症,结果表明:接受移植的患者无严重手术并

发症,6 个月内临床症状改善率达 82.25%,采用国际公认的功能独立性测量进行功能评分,术后 1 个月较术前 1 个月及术后 6 个月较术后 1 个月均有明显增高。在临床应用上国外的报道较少,我们拭目以待。

## 4 神经干细胞移植治疗高血压脑出血目前存在的问题

### 4.1 宿主和移植体之间的反应

供体细胞若是来源于异体,宿主会表达 MHC 蛋白,发生免疫排斥反应。血肿周边的炎症反应会加重靶点移植部位的炎症反应,同时循环血液中的炎细胞也可能对外源性移植体进行攻击,这些因素都有可能造成移植失败。马希峰等<sup>[6]</sup>研究表明,人胚胎源性神经干细胞具有免疫原性,但脑内接种未发现明显的移植排斥反应。用动物源性血清作为干细胞培养液,可能将动物源性病毒传染给宿主,对人类造成极大危害。采用含有各种细胞因子和化学成份的无血清细胞培养液,在细胞保存和扩增过程中可能导致干细胞某些内在特性发生变化,影响细胞活力,达不到治疗效果。因此优良的无血清培养液,严格、标准的干细胞保存、扩增技术,对移植的安全性和成功率来说至关重要。

### 4.2 出血性疾病自身特点影响细胞移植后神经功能恢复

4.2.1 年龄对神经干细胞移植的影响 有研究认为由于老年人皮质醇过高或卵巢相关激素水平下降,导致随着年龄的增长侧脑室下区和颗粒下区等部位正常情况下内源性神经再生能力会下降<sup>[7]</sup>。部分研究显示齿状回颗粒细胞的发生老年人明显比青年人差,提示老年人脑出血后认知功能的恢复可能比年青人差<sup>[8]</sup>。而老年人恰是脑出血的高危人群。

4.2.2 病灶周围局部微环境 脑出血后血肿周围的水肿及低灌注区甚至在远隔病灶皮质、双侧大脑半球和小脑也会出现局部脑血流降低,由于缺血缺氧以及血肿的凝固、溶解和吸收,可导致多种生物活性物质的释放,许多物理和化学的因素,如凝血酶、红细胞裂解产物、兴奋性氨基酸、自由基、NO 和多种细胞因子,可直接或间接启动细胞凋亡程序,使内源性和外源性神经干细胞失活。但是缺血缺氧会诱导血管生成和血管发生的细胞因子及其受体在脑内明显增加,如血管内皮生长因子、碱性成纤维生长因子、表皮生长因子等,促进血管的生成<sup>[9]</sup>。新生的血管能将坏死的细胞碎片和毒性物

质清除并能运送诱导干细胞增殖、分化、迁移和新生神经元存活需要的生长因子、营养因子<sup>[10]</sup>。Veizovic 等<sup>[11]</sup>报道,将大鼠神经干细胞注入成年鼠脑内神经发生正在进行的部位如嗅球、海马,则主要分化为神经元,而注入到成年鼠纹状体黑质等非神经发生的环境时,则主要分化为星形胶质细胞,推测神经干细胞移植入脑组织后可以存活,并且保持多向分化潜能,其分化取决于局部微环境。

**4.2.3 内源性神经干细胞** 正常生理情况下哺乳动物侧脑室下区和海马齿状回结构的颗粒下区可以持续产生新生神经元。在受到脑出血性损伤后,这些区域的神经发生活动明显增加。内源性干细胞的原位激活对损伤的神经修复作用十分重要,但其数量有限,无法达到完全修复受损神经元。

**4.2.4 细胞和细胞因子** 星形胶质细胞是中枢神经系统内数量最多的神经细胞,对神经元提供结构支持,通过突触的形成来控制神经元的活动,并且可能直接参与局部毛细血管的形成过程。星形胶质细胞激活后可以通过其纤维突起的形成,穿越移植物和宿主组织之间的界面,使移植物和宿主组织整合并可以释放一系列神经营养因子、生长因子发挥作用。但是过度增生所致的胶质瘢痕却阻碍神经元轴索的再生,影响神经组织的结构重建<sup>[12]</sup>。脑出血后,某些细胞因子在脑内的含量会明显增加,若是人为加入这些因子则可以加快损伤的修复。研究较多的因子有:脑源性生长因子、血小板衍化生长因子、胰岛素样生长因子等,联合应用细胞因子将会大提高干细胞移植治疗效果。

## 5 细胞的移植技术

### 5.1 移植部位

Jeong 等<sup>[13]</sup>采用尾静脉注入的方法,利用神经干细胞具有定向迁徙的特性,能够很好的到达血肿周围。另一种常见的方法是在脑出血模型制成后依靠立体定向仪直接移植到血肿周围。Kelly 等<sup>[14]</sup>认为在缺血性脑血管意外疾病中神经干细胞直接移植的部位与病灶的位置关系是决定移植细胞成活的重要因素之一。实验表明细胞直接移植到病灶中,其成活不好,原因可能是病灶区大量的细胞死亡、水肿带形成、各种炎性反应产生,导致微环境的改变,不利于移植细胞存活。相反,若移植的细胞与病灶保持一定的距离则能很好的成活。实验还表明成活率的高低和移植入的细胞与病灶之间的距离的大小无相关性。但是安沂华等<sup>[15]</sup>报道

了未分化的胚胎神经干细胞注入大鼠 ICH 模型的血肿同侧或对侧尾状核内,结果表明,血肿同侧移植干细胞的大鼠运动功能的改善显著好于血肿对侧移植的对照组。Nonaka 等<sup>[16]</sup>将神经干细胞移植入脑出血 7 天后的大鼠出血对侧的侧脑室内,移植后 28 天可以在所有实验大鼠原血肿腔周围发现胚胎源性神经元和胶质细胞形成的细胞聚集体,这说明通过侧脑室移植干细胞也是一种可行的治疗脑出血的方法。

### 5.2 移植时间窗

移植的神经干细胞在各阶段的脑出血模型中均能存活,Jeong 等<sup>[13]</sup>于脑出血一天后移植入神经干细胞显示出较好的存活率,但是薛村水等<sup>[17]</sup>报道胚胎神经干细胞移植对实验动物模型的运动功能恢复具有明显的促进作用,而 7 天后干细胞移植组效果明显优于 3 天后移植组。因为急性期脑组织损伤后局部所分泌的一些炎性介质形成的微环境对移植细胞存活不利,虽然有报道认为一些促炎性因子有促进细胞增殖和趋化作用,但是过多的毒性介质可能对细胞具有杀伤作用<sup>[18]</sup>。因此,认为最佳的移植时间窗应该在急性期过后。罗文芳等<sup>[19]</sup>的研究认为大鼠脑出血后 2 天移植的神经干细胞在大鼠脑内存活率最高,其原因是脑出血后 2 天内各种不利因素都处于高峰期,一直到 2 天以后才逐渐恢复,因此应避免在 2 天内移植。在脑出血后 3 天进行移植,效果也不是非常理想,其原因可能是脑出血 2 天以后各种神经营养因子分泌也逐渐下降。而随着时间的延长,血肿区胶质瘢痕结构越来越紧密,不利于神经干细胞的生长,同时也难参与神经修复。

### 5.3 植入途径

干细胞可以经腰椎穿刺鞘内、脑室内注射或动、静脉注射,或者采用立体定向靶点注射等多种途径移植至病变区,甚至可以皮下注射,目前应用较多的是腰椎穿刺鞘内和立体定向靶点注射,但不同的移植方式各有优缺点。经血管和经脑室移植相对创伤小,但是需要的细胞数量要多,必要时还需应用适当的手段使移植细胞向病变部位迁移;立体定向病变局部移植相对需要的细胞量少,而且移植细胞在局部就可以发挥作用,创伤相对较小,但是技术要求高。

## 6 展望

干细胞移植治疗脑出血的动物试验虽然取得

了一定的进展,但应用于临床还有许多问题尚待解决,如神经干细胞移植临床还面临许多问题:如脑出血后患者内源性(外周血与脑内)干细胞水平与时间的关系,何时、何地及用什么频率将神经干细胞传送到受体脑内,以发挥最大的效果?怎样最有效地获得可用于治疗的神经干细胞?应该建立适用于所有患者的稳定的神经干细胞系还是从每一个患者身上提取神经干细胞然后做自身移植?移植后怎样调控神经干细胞的定向分化,诱导分化的神经干细胞是否能像正常神经细胞一样能分泌神经递质,是否具有复杂的电生理及替代受损细胞的功能?根据不同的出血部位、患者年龄,怎样选择最有效的移植方式等,然而干细胞移植治疗脑出血现状的确让人们看到了希望。

### 参 考 文 献

- [1] Seyfried MD, Han Y, Yang D, et al. Localization of bone marrow stromal cells to the injury site after intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosurgery*, 2010, 112(2):329-335.
- [2] Liao W, Zhong J, Yu J, et al. Therapeutic benefit of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rat: implications of anti-inflammation and angiogenesis. *Cell Physiol Biochem*, 2009, 24(3-4):307-316.
- [3] Fatar M, Stroick M, Griebel M, et al. Lipoaspirate-derived adult mesenchymal stem cells improve functional outcome during intracerebral hemorrhage by proliferation of endogenous progenitor cells stem cells in intracerebral hemorrhages. *Neurosci Lett*, 2008, 433(3):174-178.
- [4] 朱建新,李忠民,肖太武等.自体骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血32例.中国组织工程研究与临床康复. 2010,14(6):159-162.
- [5] 卢旺盛,田增民,赵全军等.立体定向神经干细胞移植治疗脑出血后遗症疗效分析.中华神经外科疾病研究杂志. 2008,7(6):27-29.
- [6] 马希峰等.人胚源性神经干细胞特性及免疫原性研究.中国临床康复, 2008,8(28):6058-6059.
- [7] Heine VM, Maslam S, Joels M, et al. Prominent decline of newborn cell proliferation, differentiation, and apoptosis in the aging dentate gyrus, in absence of an age-related Hypothalamus-pituitary-adrenal axis activation. *Neurobiol Aging*, 2004, 25:361-375.
- [8] Buckwalter MS, Yamane M, Coleman BS, et al. Chronically increased transforming growth factor-strongly inhibits hippocampal neurogenesis in aged mice. *Am J Pathol*, 2008, 169(1):154-164.
- [9] Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, et al. A Critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci*, 2006, 26(4):1269-1274.
- [12] Tsai PT, Ohab JJ, N. Kertesz M, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci*, 2006, 26(4):1269-1274.
- [10] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*, 2009, 114(3):330-338.
- [11] Veizovic T, Beech JS, Stroemer RP, et al. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke*, 2008, 32:1012-1019.
- [12] Fidler PS, Schuette K, Asher RA, et al. Comparing astrocytic cell lines that are inhibitory or permissive for axon growth: the major axon-inhibitory proteoglycan is NG2. *J Neurosci*, 2009, 19(20):8778-8788.
- [13] Jeong SW, Clu K, Jung HK, et al. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental. *Stroke*, 2003, 34(9):2258-2263.
- [14] Kelly S, Bliss TM, Shah AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32):11839-11844.
- [15] 安沂华,王红云,张相彤,等.大鼠胚胎神经干细胞移植治疗脑出血的实验研究.中华神经外科杂志, 2009,18:50-52.
- [16] Nonaka M, Yoshikawa M, Nishimura F, et al. Intraventricular transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in intracerebral hemorrhage rats. *J Neurol Res*, 2008, 26(3):265-272.
- [17] 薛村水,李光来,贺杰峰,等.大鼠脑出血后神经干细胞移植的实验研究.中西医结合脑血管病杂志. 2009,2(5):283-285.
- [18] Vasthare US, Heinel LA, Rosenwasser RH, et al. Leukocyte involvement in cerebral ischemia and reperfusion injury. *Surg Neural*, 2008, 33(4):260-265.
- [19] 罗文芳,黎杏群,罗杰坤等.神经干细胞移植治疗脑出血大鼠模型时间窗的研究.中国老年学杂志, 2008, 28(7):625-628.