

Ad-VEGF-骨髓间充质干细胞移植在脑梗死治疗中的作用

张锋¹ 胡昌龙¹ 综述 陈波^{*2} 李巧玉^{*2} 审校

1. 江苏大学临床医学院, 江苏 镇江 212000

2. 江苏大学附属人民医院神经外科, 江苏 镇江 212002

摘要: 脑梗死以高致死率和致残率而备受关注,但目前为止,仍没有有效的治疗手段。近些年,携带血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的骨髓间充质干细胞移植疗法成为了热点。研究表明:携带 VEGF 的骨髓间充质干细胞可以向神经元样细胞定向诱导分化、刺激内源性神经干细胞的增殖、分泌神经营养因子和保护因子,从而促进脑梗死患者的感觉、认知和运动功能的恢复。本文就 VEGF-MSCs 在治疗脑梗死中的作用机制做以下综述。

关键词: 骨髓间充质干细胞; VEGF; 脑梗死; 神经保护; 血管再生

脑血管疾病(cerebrovascular disease, CVD)包括脑出血和脑梗死,但脑梗死占 70% 左右^[1],目前治疗方法包括:抗凝、脱水降压、溶栓和神经营养等,但溶栓治疗会引发二次出血等危险,而其他治疗方法都不能有效地改善缺血区域残存神经细胞的存活,而干细胞移植治疗成为了一种新型的治疗手段^[2],尽管可以移植的干细胞种类众多,但是由于涉及到伦理及免疫上的问题,目前研究最广泛的还是骨髓间充质干细胞的移植。

而参与脑修复再生的因子众多,包括胶质源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、VEGF 等。GDNF、BDNF 在中枢神经系统发育过程中,对神经元的存活、分化、生长发育起着重要的作用,并可以防止神经元受损导致的死亡。而 VEGF 家族中的 VEGF-A 和胎盘生长因子(placental growth factor, PlGF)则是通过参与血管和神经系统的形成、发生和发展来保护神经细胞。可能的机制:血管发生:刺激骨髓内皮祖细胞和造血祖细胞参与新生血管的形成^[3]、残存的血管通过发芽的形式形成新生的毛细血管以及在脉压差的作用下,微动脉相互融合成为吻合支^[4,5]。另外,VEGF 通过分泌一些营养因子和保护因子,从而在神经保护方面起着重要的作用^[6]。本文就 VEGF-MSCs 联合治疗脑梗死的机制做一综述。

1 MSCs 向神经元样细胞的定向诱导分化

骨髓间充质干细胞(MSCs)来源于中胚层,形

成于骨髓腔,是骨髓中除造血干细胞的另一类干细胞。具有自我更新和多向分化潜能。MSCs 在体外分离、纯化培养过程中,予以不同条件的诱导刺激能够向中胚层的脂肪、骨、软骨等细胞等分化,也可以向内外胚层的肝、肾、皮肤、神经等细胞分化^[7-9]。最近的一些研究显示^[10]:利用碱性成纤维细胞生长因子(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)、维甲酸(retinoic acid, RA)、二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)诱导 MSCs 后可以产生类似于胚胎干细胞来源的神经元样干细胞,诱导后的细胞能够有效增殖,并且具有了向成熟神经元样细胞分化的能力,但失去了间充质干细胞的特性,且可以表达神经元样细胞的特异性蛋白,比如:nestin, NeuN 和 GFAP 等,且 MSCs 与胎鼠中脑神经元共培养后,我们发现 NeuN 阳性细胞数明显增加。而 Spees 和其助手^[11]将 MSCs 和热烧伤的小气道上皮细胞共培养后,发现 MSCs 分化成为上皮样细胞且能用于粘膜修复。这些研究表明, MSCs 可以向神经元样细胞分化,来代替和修复受损的神经细胞。

2 VEGF-MSCs 联合治疗脑梗死的作用机制

2.1 VEGF-MSCs 刺激内源性神经干细胞增殖分化

研究表明^[12]脑梗死模型中移植 MSCs 可以通过自分泌和旁分泌分泌多种神经营养因子和生长因子等来刺激内源性神经干细胞增殖和分化成为神经元细胞,例如:神经生长因子(NGF)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)、BDNF、VEGF 等,从而修复受损的神经细胞和促进功能的恢复。

收稿日期:2013-09-15; 修回日期:2013-11-17

作者简介:张锋(1987-),男,江苏大学临床医学院在读硕士,主要从事脑血管疾病方面的研究。

通讯作者:李巧玉(1962-),男,教授,硕士生导师,博士,主要从事神经外科疾病基础和临床研究。

2.2 VEGF-MSCs 促进血管生成

脑梗死大鼠模型侧脑室移植 VEGF-MSCs 后,移植的 VEGF-MSCs 通过 SDF-1/CXCR4 途径迁移至缺血半暗带,早期分布在血管周围,后迁移至皮质,分泌 VEGF-A,而 VEGF-A 是促进大脑血管发生的主要的介质,在缺血区域通过刺激 NO 供体 (DETANONate) 和 VEGF 受体 2 (VEGFR2) 后,增加了新生血管的形成;促进微动脉融合成为吻合支,从而利于功能性微血管的形成,改善微环境,增加神经功能的恢复^[13]。

2.3 MSCs-VEGF 的神经保护机制

MSCs 除了分泌神经营养因子和生长因子来刺激内源性神经干细胞增殖分化,最重要的是可以通过减轻谷氨酸诱导的神经损伤来支持残存神经细胞的存活^[14,15]。有实验表明:在原代培养脊髓背根神经节时, MSCs 条件培养基可以通过激活 MAPK/ERK/PI3K/Akt 等通路促进其轴突的生长^[16]。这些研究都表明 MSCs 可以调节内源性信号通路,从而增加神经细胞的存活和自我修复。更有意思的是, Miyamoto^[17] 用 micro-PET/CT 定量葡萄糖代谢,发现经 MSCs 治疗后,梗死区域的葡萄糖代谢得到了明显的恢复,从而降低了缺血区域神经细胞的凋亡,增加了神经功能的恢复。

而 VEGF-A 过去被认为主要作用于内皮细胞,促进血管发生,但是有研究报导,在脑缺血模型中,它可以通过降低缺氧引起的损伤和兴奋性中毒^[18,19],从而增加中枢神经和外周神经的神经元的存活率。VEGF-A 对神经元的保护主要通过 VEGF-A 与 VEGFR-2、PI3K 和 ERK1/2 相结合,从而发挥着神经保护作用。而另一个 VEGF 家族的 PlGF 主要通过 VEGFR-1 结合从而发挥作用^[20],但是前者起着主要的作用。

综上所述,在脑缺血 24 h 之后, MSCs 迁移至缺血半暗带,通过向神经元样细胞分化和刺激内源性神经干细胞增殖分化来代替已死亡的神经细胞,从而实现突触连接,发生电生理活动,同时分泌 GDNF、BDNF 等神经营养因子来为残存的缺氧神经细胞的生存提供良好的微环境;而 VEGF 通过直接作用于神经元和胶质细胞,刺激神经细胞的发生和分泌神经营养因子和保护因子,从而减少海马和皮质神经细胞的死亡,来促进感觉、认知和运动功能的恢复。可能是 VEGF-MSCs 通过调节 VEGF 信号通路来保护神经细胞,改善神经功能。但是具体控制

下游哪个基因来发挥神经保护作用还需要进一步探究。而与静脉单纯的注射 MSCs 或者 VEGF 治疗进行对比,发现联合治疗比单个治疗更能减少脑萎缩和提高神经功能恢复^[21]。且通过体外研究^[22]发现,在缺氧缺糖的环境下,神经细胞和 MSCs 共培养,用 SU1498 (酪氨酸磷酸化抑制剂) 阻断 VEGFR-2 后,与未用抑制剂组相比,结果发现神经细胞死亡数目增加,表明 MSCs 可以通过调节 VEGFR-2 发挥神经保护作用。而另一项体内实验表明^[23]:在 MCAO 后,在第 7 d,将 MSCs 移植至患侧大脑皮质,结果发现,2~5 w 后,发现梗死灶面积减少、行为得到了明显的改善,而使用 VEGFA 拮抗剂 (贝伐单抗) 后,发现 MSCs 没能发挥保护作用。结果认为移植的 MSCs 可能通过释放 VEGFA 发挥神经保护作用。

3 展望

近几年来,干细胞移植在治疗脑卒中、脊髓损伤等方面的研究取得了很大的进展,且美国 FDA 也批准在心肌梗塞、卒中、肢体缺血和自身免疫性疾病等疾病中进行干细胞移植的临床试验。但是要将其大量用于临床治疗仍然有许多问题仍未解决。包括:①干细胞的定向诱导分化和纯化问题。②MSCs 是具有多向能力的细胞,植入体内是否会发生突变,从而引起肿瘤的发生?③移植后 MSCs 在体内存活后,能否与其他神经细胞发生神经电活动,改善神经功能?④VEGF 尽管可以促进血管发生和神经保护,但是它还可以增加血管的通透性,增大缺血区域的水肿程度,是否能找到治疗的时间窗,减少水肿的发生?尽管存在上述的种种问题,但随着基础和临床研究的不断深入,我们相信,以 MSCs 为载体的治疗将在脑梗死类的疾病中成为新的治疗方法。

参 考 文 献

- [1] Towfighi A, Ovbiagele B, Save JL, et al. Therapeutic milestone: stroke declines from the second to the third leading organ-and disease-specific cause of death in the united states. *Stroke*, 2010, 41(3): 499-503.
- [2] Dharmasaroja P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *J Clin Neurosci*, 2009, 16(1): 12-20.
- [3] Hirashima M. Regulation of endothelial cell differentiation and arterial pecification by VEGF and notch signaling. *Anat Sci Int*, 2009, 84(3): 95-101.

- [4] Shibuya M. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: therapeutic aspects of vascular endothelial growth factor. *FEBS J*, 2009, 276(17): 4636-4643.
- [5] Schaper W. Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(1): 5-21.
- [6] Mackenzie F, Ruhrberg C. Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development*, 2012, 139(8): 1371-1380.
- [7] Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, et al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*, 2005, 319(2): 243-253.
- [8] Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 2004, 40(6): 1275-1284.
- [9] Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol*, 2009, 218(2): 237-245.
- [10] Yamaguchi S, Kuroda S, Kobayashi H, et al. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC) - a preliminary study using microarray analysis. *Brain Res*, 2006, 1087(1): 15-27.
- [11] Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, et al. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(5): 2397-2402.
- [12] Seung-Wan Yoo, Sung-Soo Kim, et al. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Experimental Molecular Medicine*, 2008, 40(4): 387-397.
- [13] Zhang R, Wang L, Zhang L, et al. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in rat. *Circ Res*, 2003, 92(3): 308-313.
- [14] Zhong C, Qin Z, Zhong CJ, et al. Neuroprotective effects of bone marrow stromal cells on rat organotypic hippocampal slice culture model of cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 2003, 342(1-2): 93-96.
- [15] Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J Neurosci Res*, 2008, 86(5): 1024-1035.
- [16] Gu Y, Wang J, Ding F, et al. Neurotrophic actions of bone marrow stromal cells on primary culture of dorsal root ganglion tissues and neurons. *J Mol Neurosci*, 2010, 40(3): 332-341.
- [17] Miyamoto M, Kuroda S, Zhao S, et al. Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of local glucose metabolism after cerebral infarction in rats: A serial 18F-FDG PET study. *J Nucl Med*, 2013, 54(1): 145-150.
- [18] Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J*, 2001, 15(7): 1218-1220.
- [19] Svensson B, Peters M, König HG, et al. Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(10): 1170-1175.
- [20] Du H, Li P, Pan Y, et al. Vascular endothelial growth factor signaling implicated in neuroprotective effects of placental growth factor in an in vitro ischemic model. *Brain Res*, 2010, 1357: 1-8.
- [21] Miki Y, Nonoguchi N, Ikeda N. Vascular endothelial growth factor gene-transferred bone marrow stromal cells engineered with herpes simplex virus type 1 vector can improve neurological deficits and reduce infarction volume in rat brain ischemia. *Neurosurgery*, 2007, 61(3): 586-594.
- [22] Harms KM, Li L, Cunningham LA. Murine neural stem/progenitor cells protect neurons against ischemia by HIF-1 α -regulated VEGF signaling. *PLoS ONE*, 2010, 5(3): e9767.
- [23] Horie N, Pereira MP, Niizuma K, et al. Transplanted stem cell-secreted vascular endothelial growth factor effects post-stroke recovery, inflammation, and vascular repair. *Stem Cells*, 2011, 29(2): 274-285.