

基于干细胞移植的联合治疗策略治疗脊髓损伤的实验研究进展

张敬星 综述 胡建国 审校

1. 蚌埠医学院第一附属医院检验科,安徽 蚌埠 233004

2. 蚌埠医学院组织移植安徽省重点实验室,安徽 蚌埠 233000

摘要: 脊髓损伤是一种中枢神经系统的灾难性疾病,预后极差,至今缺乏有效的治疗措施。由于脊髓损伤病理过程的复杂性,目前认为任何单一的治疗措施都不足以修复损伤的脊髓。因此,各种基于干细胞移植的联合治疗策略被提出并应用于实验研究当中,且日益受到重视。联合治疗的效果优于单一组分治疗,有望成为一种治疗脊髓损伤的有效途径。

关键词: 脊髓损伤;干细胞移植;联合治疗策略

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)多见于车祸、高空坠落和运动意外等,可导致损伤平面以下的感觉和运动功能丧失,以及大小便功能障碍,高位颈髓损伤还可导致呼吸功能障碍危及生命。损伤后期形成的瘢痕样屏障,极大地阻碍了神经再生和功能恢复。如何有效地促进神经再生一直是脊髓损伤治疗领域难以克服的障碍。

研究表明,干细胞移植可通过细胞替代和营养支持双重途径发挥治疗作用,促进运动功能的恢复,是治疗SCI最具潜力的策略之一^[1]。目前,神经干细胞^[2]、骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)^[3]、脐带干细胞^[4]等已被广泛应用于SCI治疗的实验研究,并显示出具有促进运动功能恢复的作用。干细胞移植较手术治疗、药物治疗等治疗手段能在一定程度上修复神经组织的损伤缺损,实现功能恢复。尽管干细胞移植是治疗SCI的一种潜在途径,但任何单一的治疗措施都可能存在许多缺陷,都不足以修复受损的脊髓^[5]。因此,干细胞移植与其他单一治疗组分的联合应用这一联合治疗策略被提出并广泛应用于实验研究之中,已成为治疗SCI的研究热点。联合治疗策略主要目的是发挥协同作用,从改善损伤局部微环境、提供营养支持和结构支撑等方面为脊髓损伤的修复创造有利条件。

1 干细胞移植与药物联合应用

前期研究表明,损伤局部的抑制性因子和胶质疤痕能直接抑制轴突再生,恶化局部微环境,使植

入的干细胞难以成活并分化为需要的神经细胞。去除这些抑制性的因素能为干细胞移植创造有利条件,提高治疗效果。

治疗SCI所用的药物一般都是通过拮抗损伤部位的髓磷脂相关抑制性因子来发挥治疗作用的,如软骨素酶ABC、Nogo-A抗体等^[6]。Nogo-A是髓磷脂产生的一种抑制性因子,不仅抑制植入细胞的分化,还可与神经营养因子竞争性结合相应受体部位,减弱神经营养因子作用。Xu等^[7]利用NgR(神经元Nogo66受体)疫苗免疫脊髓损伤大鼠后产生的抗体来竞争性结合NgR,阻断抑制性因子Nogo-A的作用,发现此法不仅保护了更多的运动神经元,还有利于神经干细胞向神经细胞分化以及运动功能的恢复。

NEP140是一种NgR的拮抗剂,可阻断Nogo-A与NgR结合,有促进轴突再生的作用^[8]。Zhou等^[9]将NEP140与BMSCs诱导产生的神经干细胞一同植入大鼠SCI模型,发现NEP140可促进植入细胞分化,增强神经营养因子的作用,提高后肢的运动功能。实验发现BMSCs和NEP140的单独应用并不能促进运动功能的恢复,说明两者可协同发挥作用。后来其团队^[10]又将紫杉醇和人性脐带干细胞联合植入大鼠SCI模型,发现比单独应用能更好地促进运动功能的恢复。但实验中并没有发现植入细胞向神经细胞分化,提示脐带干细胞可能是通过分泌细胞因子来发挥作用的。

基金项目:本课题受国家自然科学基金(81171465, 81271363)资助

收稿日期:2013-10-31;修回日期:2013-12-10

作者简介:张敬星(1989-),男,在读硕士研究生,研究方向为神经损伤修复。

通讯作者:胡建国(1972-),男,博士,教授,研究方向为神经损伤修复。

2 干细胞移植与细胞因子协同作用

损伤部位缺乏适量的营养支持是影响植入细胞存活的重要原因之一。生长因子、神经营养因子等细胞因子不仅能改善局部微环境,促进组织存活和神经再生,还可以诱导内源性少突胶质前体细胞的活化、增殖、成熟,促进轴突髓鞘化,恢复运动功能^[11]。

大量研究表明,生长因子、神经营养因子、粒细胞集落刺激因子等细胞因子对植入干细胞的存活和分化至关重要。Karimi-Abdolrezaee等^[12]将神经干细胞和生长因子同时注入大鼠SCI模型,发现这种联合治疗的策略能显著促进神经干细胞的长期存活、迁移和整合,促进受损脊髓的结构重建和功能恢复。最重要的是这一策略没有增强痛觉传入的异常突触连接,没有加剧损伤后的神经性疼痛。有学者认为注入细胞因子的方式难以长期发挥治疗作用,他们认为通过向干细胞转入相应的基因,并使其在体内表达,可以长期发挥联合治疗的作用^[13]。但转入基因的表达受到植入细胞存活状态的影响,且难以实现对基因表达时机的精确调控。此外,外源性细胞因子的注入是否会影响干细胞的生物学特性和相关功能的发挥,还需要进一步证实。

3 干细胞与其它细胞联合

迄今,少突胶质前体细胞、雪旺细胞、嗅鞘细胞等细胞类型已被用作脊髓损伤移植治疗的供者细胞,并获得了不同程度的成功^[14,15]。但是单一细胞的移植不仅不足以修复损伤的脊髓,还可能会加重胶质瘢痕的形成。

Ban等^[16]将BMSCs与雪旺细胞(Schwann cells, SCs)联合植入大鼠SCI模型,发现BMSCs可分化为神经元和少突胶质细胞替代死亡的宿主细胞,同时分泌神经营养因子改善局部微环境。SCs可发挥桥接作用,促进轴突再生和运动功能恢复。由于这两种细胞均可从患者自身获取,可避免伦理学的争议,使其有望应用于临床研究。但是Pourheydar^[17]发现这两种细胞共同移植在促进运动功能恢复的同时会加剧异常性疼痛。因此要慎重权衡联合治疗方式的利弊,不能只关注正面效果。Kim等^[18]发现来源于胚胎干细胞的GABA能神经元能够减轻SCI引起的疼痛。Payam等^[19]将BMSCs诱导产生的GABA能细胞同BMSCs联合作用于挫伤性大鼠脊髓损伤模型,他们发现两者的联合应用可促进移植

物与脊髓组织的整合,减小坏死腔,促进神经再生。更重要的是GABA能细胞的应用减轻了细胞移植带来的异常性疼痛,实现了对联合移植的疗效和副作用的兼顾,使联合移植策略更加完善。

4 干细胞移植与基因修饰技术的运用

由于损伤部位恶劣的微环境,使得植入细胞的存活率较低,影响治疗效果的发挥。近期发现,经过基因修饰的干细胞较单纯的干细胞更易在损伤部位存活,其治疗效果也较好。

Jin等^[20]利用损伤脊髓局部的缺氧环境,将经过血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因修饰后的神经干细胞植入大鼠SCI模型,发现VEGF基因的表达可减少细胞凋亡,利于细胞存活,但没有发现其具有促进行为学恢复的功能。后来Kim等^[21]利用相同的原理将缺氧诱导的粒-巨噬细胞集落刺激因子(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)基因转入神经干细胞,并将其植入大鼠SCI模型,结果发现经过修饰的神经干细胞不仅能够抵抗细胞凋亡,促进细胞存活,更重要的是它能明显促进脊髓修复和相关行为学功能的恢复,且没有发现肿瘤形成。

近年来,应用间充质干细胞移植治疗SCI已成为研究的热点,但单纯的间充质干细胞移植治疗SCI效果有限。Zhang等^[13]将神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)基因转入BMSCs,并将细胞植入大鼠SCI模型中,结果发现,经过处理的BMSCs治疗效果优于单纯的BMSCs,能促进损伤脊髓结构和功能的恢复。然而,实验发现经过处理的BMSCs在体内分化为神经细胞的能力有限。Lin等^[22]将经过神经球蛋白(neuroglobin, Ngb)基因修饰的MSCs植入兔SCI模型,结果发现Ngb基因的过表达可以改善脂质过氧化,能更显著地减轻继发性损伤。经过基因修饰的干细胞移植在具有细胞移植治疗效果的同时,其特定基因的表达还能够针对治疗的某一方面发挥特定效应。但转入基因的表达是否特异可控以及经过基因修饰的干细胞是否会影响其正常地发挥替代和桥接作用,都还需要进一步的研究。

5 干细胞移植治疗SCI的新策略—仿生基质材料应用

水凝胶等多聚体材料多孔性的结构和可修饰的表面有利于植入细胞的粘附和存活。多聚体材料不仅能够作为干细胞的移植载体,还可以桥接坏

死腔,为神经再生提供结构和营养支撑。

近期 Hwang 等^[23]联合过表达 NT-3 的神经干细胞和多聚体支架共同应用于半切除大鼠 SCI 模型的急性期,结果发现两者联合应用的治疗效果在细胞的存活、迁移等方面都优于单独治疗,同时发现在急性期多聚体支架的单独应用也可以促进大鼠运动功能的恢复。然而 Hejcl 等^[24]用新型的水凝胶(HPMA-RGD 水凝胶)作为间充质干细胞的移植载体,应用于 SCI 慢性期,发现其联合作用可在慢性期减轻组织萎缩,为组织内生提供营养,显著改善运动功能。然而单独的水凝胶在慢性期几乎没有促进功能恢复的作用。有研究表明将功能性基团或分子连接到生物材料的表面有利于植入细胞的分化和迁移。Mothe 等^[25]将经血小板源性的生长因子-A 共价修饰的水凝胶联合神经干细胞植入亚急性 SCI 大鼠模型,结果发现此法能够缩减坏死腔,促进移植物的存活,分化形成的少突胶质细胞增多,较单纯的干细胞移植更能促进功能的恢复。Ruzicka 等^[26]将经过 5-羟色胺修饰的水凝胶联合人胚胎神经干细胞共同植入大鼠 SCI 模型,发现在急性期和亚急性期植入细胞均能较好地存活、增殖并分化为相关的神经细胞,减轻组织萎缩,促进轴突和血管的内生,但不能长期地促进组织重建和运动、感觉功能的恢复。

由于大部分的实验都集中在 SCI 的急性期和亚急性期,干细胞联合生物材料能否在慢性期发挥治疗作用仍需后续实验证实。目前,干细胞联合生物材料这一策略仍处于起步阶段,实现对材料选择的最优化和表面修饰的最佳化将可能进一步提高其治疗效果。

6 展望

干细胞技术的发展以及联合治疗策略的提出和应用,使得基于干细胞的联合治疗策略在治疗 SCI 中展现出巨大的治疗潜能和广泛的应用前景。大量研究已经表明,干细胞同药物、细胞因子、其它细胞、生物材料及基因修饰技术的联合应用在促进 SCI 后脊髓结构重塑和功能恢复方面具有重要作用。但不同的损伤条件下,其治疗的效果往往有明显差别。

基于干细胞的联合治疗策略弥补了单一治疗方法存在的缺陷和不足。各组分可协同发挥治疗作用,在显著提高有效性的同时,还可减轻副作用。但目前对联合治疗策略发挥治疗作用的机制

还没有透彻的理解,如何实现联合方式的最优化选择仍需要进一步研究。

7 结语

基于干细胞移植的各种联合治疗措施在取得了较好的实验成果的同时,也极大地拓展了 SCI 的治疗思路,为脊髓损伤的治疗带来新的希望。许多开拓性的实验成果不仅引领了 SCI 治疗领域的前沿,更为其临床应用奠定了基础。尽管基于干细胞的联合治疗策略仍受到伦理学制约,其安全性和有效性还有待进一步证实,相信随着研究的深入,不断完善的联合治疗策略将有望成为治疗 SCI 的有效手段。

参 考 文 献

- [1] Roh DH, Seo MS, Choi HS, et al. Transplantation of human umbilical cord blood or amniotic epithelial stem cells alleviates mechanical allodynia after spinal cord injury in rats. *Cell transplantation*, 2013, 22(9):1577-1590.
- [2] Amemor T, Romanyuk N, Jendelova P, et al. Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat. *Stem Cell Research & Therapy*, 2013, 4(3):68.
- [3] Nakano N, Nakai Y, Seo TB, et al. Effects of bone marrow stromal cell transplantation through CSF on the subacute and chronic spinal cord injury in rats. *PLoS one*, 2013, 8(9):e73494.
- [4] Shang AJ, Hong SQ, Xu Q, et al. NT-3-secreting human umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantation for the treatment of acute spinal cord injury in rats. *Brain research*, 2011, 1391:102-113.
- [5] Park SS, Lee YJ, Lee SH, et al. Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells. *Cytotherapy*, 2012, 14(5):584-597.
- [6] Zhao RR, Andrews MR, Wang D, et al. Combination treatment with anti-Nogo-A and chondroitinase ABC is more effective than single treatments at enhancing functional recovery after spinal cord injury. *European Journal of Neuroscience*, 2013, 38(6):2946-2961.
- [7] Xu CJ, Xu L, Huang LD, et al. Combined NgR vaccination and neural stem cell transplantation promote functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *Neuropathology and applied neurobiology*, 2011, 37(2):135-155.
- [8] Gou X, Wang Q, Yang Q, et al. TAT-NEP1-40 as a novel therapeutic candidate for axonal regeneration and functional recovery after stroke. *Journal of drug targeting*, 2011, 19(2):86-95.

- [9] Zhilai Z , Hui Z , Yin Hai C , et al. Combination of NEP 1-40 infusion and bone marrow-derived neurospheres transplantation inhibit glial scar formation and promote functional recovery after rat spinal cord injury. *Neurology India* ,2011 ,59(4) : 579.
- [10] Zhilai Z , Hui Z , Anmin J , et al. A combination of taxol infusion and human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation for the treatment of rat spinal cord injury. *Brain research* ,2012 ,1481 :79-89.
- [11] Osada T , Watanabe M , Hasuo A , et al. Efficacy of the co-administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor in the activation of intrinsic cells after spinal cord injury in mice. *Journal of Neurosurgery: Spine* ,2010 ,13(4) :516-523.
- [12] Karimi-Abdolrezaee S , Eftekharpour E , Wang J , et al. Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells , chondroitinase , and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. *The Journal of Neuroscience* ,2010 ,30(5) :1657-1676.
- [13] Zhang W , Yan Q , Zeng Y , et al. Implantation of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells transfected with the neurotrophin-3 gene and pretreated with retinoic acid in completely transected spinal cord. *Brain research* ,2010 ,1359 :256-271.
- [14] Hu JG , Wang XF , Deng LX , et al. Co-transplantation of glial restricted precursor cells and Schwann cells promotes functional recovery after spinal cord injury. *Cell transplantation* ,2013 , [Epub ahead of print].
- [15] Mayeur A , Duclos C , Honore A , et al. Potential of olfactory ensheathing cells from different sources for spinal cord repair. *PloS one* ,2013 ,8(4) : e62860.
- [16] Ban DX , Ning GZ , Feng SQ , et al. Combination of activated Schwann cells with bone mesenchymal stem cells : the best cell strategy for repair after spinal cord injury in rats. *Regenerative Medicine* ,2011 ,6(6) :707-720.
- [17] Pourheydar B , Joghataei MT , Bakhtiari M , et al. Co-transplantation of bone marrow stromal cells with schwann cells evokes mechanical allodynia in the contusion model of spinal cord injury in rats. *Cell* ,2012 ,13(4) :213-222.
- [18] Kim DS , Jung SEJ , Nam TS , et al. Transplantation of GABAergic neurons from ESCs attenuates tactile hypersensitivity following spinal cord injury. *Stem cells* ,2010 ,28(11) :2099-2108.
- [19] Mohammad-Gharibani P , Tiraihi T , Delshad A , et al. Improvement of contusive spinal cord injury in rats by co-transplantation of gamma-aminobutyric acid-ergic cells and bone marrow stromal cells. *Cytotherapy* ,2013 ,15(9) :1073-1085.
- [20] Jin HL , Pennant WA , Lee MH , et al. Neural stem cells modified by a hypoxia-inducible VEGF gene expression system improve cell viability under hypoxic conditions and spinal cord injury. *Spine* ,2011 ,36(11) :857-864.
- [21] Kim HJ , Oh JS , An SS , et al. Hypoxia-specific GM-CSF-overexpressing neural stem cells improve graft survival and functional recovery in spinal cord injury. *Gene therapy* ,2011 ,19(5) :513-521.
- [22] Lin WP , Chen XW , Zhang LQ , et al. Effect of neuroglobin genetically modified bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on spinal cord injury in rabbits. *PloS one* ,2013 ,8(5) : e63444.
- [23] Hwang DH , Kim HM , Kang YM , et al. Combination of multifaceted strategies to maximize the therapeutic benefits of neural stem cell transplantation for spinal cord repair. *Cell transplantation* ,2011 ,20(9) :1361-1379.
- [24] Hejcl A , Sedy J , Kapcalova M , et al. HPMA-RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *Stem cells and development* ,2010 ,19(10) :1535-1546.
- [25] Mothe AJ , Tam RY , Zahir T , et al. Repair of the injured spinal cord by transplantation of neural stem cells in a hyaluronan-based hydrogel. *Biomaterials* ,2013 ,34(15) :3775-3783.
- [26] Ruzicka J , Romanyuk N , Hejcl A , et al. Treating spinal cord injury in rats with a combination of human fetal neural stem cells and hydrogels modified with serotonin. *Acta neurobiologiae experimentalis* ,2013 ,73 :102-115.