

嗅黏膜间充质干细胞在神经修复中的研究进展

葛丽特 综述 卢明 审校

湖南师范大学第二附属医院/解放军 163 医院神经外科 湖南 长沙 410003

摘要: 嗅黏膜间充质干细胞 (olfactory mucosa mesenchymal stem cells, OM-MSCs) 是一类存在于嗅黏膜的多分化潜能的干细胞, 在一定的体外条件下可分化为成骨细胞、脂肪细胞、平滑肌细胞、神经细胞等, 且易于取材, 可自体移植, 无免疫排斥反应, 无伦理道德问题, 为神经系统疾病治疗提供了新的细胞来源, 可在神经修复和功能重建中发挥治疗作用。

关键词: 嗅黏膜; 间充质干细胞; 生物学特性; 细胞移植

嗅黏膜间充质干细胞 (olfactory mucosa mesenchymal stem cells, OM-MSCs) 也称为外胚间充质干细胞 (ectomesenchymal stem cells, OE-MSC)。又因定位于嗅黏膜固有层中, 所以也称嗅黏膜固有层间充质干细胞 (lamina propria mesenchymal stem cell, LP-MSCs)。1998 年 Huard 等人^[1]首次发现在人嗅黏膜中存在干细胞且能够向神经元与非神经元细胞分化。大量研究证明: OM-MSCs 具有与骨髓间充质干细胞相似的生物学特性及类似的免疫表型, 而且在体外能够向脂肪细胞、成骨细胞、神经细胞、平滑肌细胞等分化, 将嗅黏膜细胞植入鸡胚中, 还能分化出典型的心脏、肌肉、肝脏、脑、脊髓等组织^[2]。OM-MSCs 具有以下优点^[3-4]: ①具有更强大的增殖效率和更短的传代时间; ②位于鼻腔中, 易于取材; ③可自体移植, 无免疫排斥反应; ④安全性高, 据文献报道染色体核组分析和肿瘤基因分析显示体外无限传代后没有基因变异; ⑤无伦理道德问题。因此 OM-MSCs 在组织工程、细胞移植和基因治疗中将具有广阔的应用前景。

1 OM-MSC 生物学特性

1.1 分离及培养

嗅黏膜间充质干细胞的提取较为简单, 一般在鼻甲骨上部, 中隔或者侧壁进行取样。最新的研究发现, OM-MSCs 广泛存在于鼻黏膜各部位中, 包括沿侧壁和鼻中隔的上鼻甲、中鼻甲、下鼻甲^[5]。

在培养方面目前还没有标准的方案, 培养条件也有很多争议, 目前较为常用的有三种培养法: 酶

消化法^[6]、组织块贴壁法^[7]、流式细胞仪分选法^[8]。酶消化法较常用, 但消化时间不易掌握, 消化的细胞个数较少。组织块贴壁法简单有效, 成本低廉, 对细胞损伤小, 但纯度不高。流式细胞仪分选法依据间充质干细胞表面特殊标志, 采用流式细胞仪分离, 获得细胞纯度较高但对细胞活性影响大且对实验条件要求高。

1.2 OM-MSCs 的形态和表面标志

培养后的细胞呈单个梭形或三角形, 2 周后可达到 80% 以上的融合, 延长培养时间或传代后可见 OM-MSCs 呈典型的成纤维状, 其表面标志物具有非单一性, 流式细胞仪分析发现 OM-MSCs 高表达间质细胞标志 (CD44、CD90、CD73)、整合素受体 (CD29、CD49a、CD49e、CD51、CD61)、四旋蛋白 TSPAN (CD63、CD81 和 CD151), 不表达造血系标志 (CD34、CD45、CD31)、血管内皮细胞生长因子受体、内皮标志 (CD31 或 CD33、CD14、CD56) 等^[7]。除此之外, OM-MSCs 可表达间充质干细胞标记物 STRO-1, 神经干细胞标记物 NG2、Nestin 和平滑肌肌动蛋白 (SMA)^[8], 表明 OM-MSCs 除具有间充质干细胞一般特性之外, 还具有自身的独特性。由于缺少公认性的特异性表面标志物, 目前 OM-MSCs 鉴定的方法都是通过形态、表面标记表型和多向分化特性。

1.3 分化潜能

间充质干细胞具有干细胞的“可塑性”, OM-MSCs 在不同的诱导条件下能够向不同胚层的细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81371358)、湖南省自然科学基金项目 (14JJ2060) 湖南省教育厅湖南省高校科研项目 (编号: 12C0238) 和湖南省研究生创新项目 (编号: CX20121230)

收稿日期: 2013-10-12; 修回日期: 2013-12-21

作者简介: 葛丽特 (1989-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事嗅黏膜间充质干细胞方面研究。

通讯作者: 卢明, 男, 医学博士, 硕士生导师, 教授, 主要从事中枢神经系统修复方面研究。

分化。目前 OM-MSCs 向中胚层来源的成骨细胞、脂肪细胞分化的实验报道较多,除培养基不同外,使用的诱导基大致相同。向神经元分化^[6]的诱导基主要包括 B-27、谷氨酰胺和谷氨酸。通过免疫荧光染色,可以表达 GFAP、tubulin、Nestin。另外在无血清培养基加入 EGF 和 FGF 可促进形成干细胞球^[9]。

2 在神经修复中的作用

2.1 小儿先天性感觉神经性耳聋治疗作用

小儿先天性感觉神经性耳聋是一种儿童常见的先天性疾病,这类疾病大多与遗传因素有关,目前认为毛细胞的缺失和(或)功能障碍时造成本疾病的主要病因。由于耳蜗再生能力有限,干细胞治疗被认为是一种具有临床应用前景的治疗方式。目前已有在体外成功诱导干细胞表达成熟毛细胞标记物,形成突触并表达突触囊泡标记的报道^[1,10]。Doyle 等^[11]将嗅黏膜干细胞同耳蜗细胞共培养,在体外诱导嗅上皮神经前体细胞分化形成耳蜗毛细胞,分化的细胞在形态上与毛细胞相似,且表达多种毛细胞的标志分子,包括 myosin VIIa、FM1-43、calretinin、phalloidin 和 espin。在动物实验方面,Pandit 等人^[12]通过耳蜗底转造口将 OM-MSCs 内耳移植到 A/J 模型小鼠观察 OM-MSCs 对于早发性听力损伤的作用,发现移植后的 OM-MSCs 能够存活 2 周以上,且集中在鼓阶和前庭阶,膜蜗管则较少。通过测定听性脑干反应(ABR)的临界阈值发现移植后 A/J 小鼠较移植前明显降低,证明移植后的 A/J 小鼠听力有效的恢复。

2.2 帕金森病

帕金森病是一种以纹状体多巴胺能神经元功能进行性丧失为主要特征的神经退行性疾病,目前尚无特异性的有效治疗方法。Murrell 等人^[13]将 OM-MSCs 在体外诱导分化为表达多巴胺能神经蛋白抗体、酪氨酸羟化酶等特异性标记物的多巴胺能神经元,将此诱导后的细胞移植入帕金森病模型大鼠纹状体,移植后大鼠的不对称性运动明显改善。推测其机制与 OM-MSCs 替代内源性神经元、分泌多巴胺有关,证明 OM-MSCs 在一定条件下可转化为特定的神经元,为帕金森治疗提供理想的细胞来源。

2.3 中枢神经系统损伤

Nivet 等人^[14]将 OM-MSCs 移植到海马病变的模型小鼠上发现,移植后的海马区中存在再生的神经元,OM-MSCs 通过分泌多种因子营养海马区促进

了神经网络结构的恢复。

OM-MSCs 移植治疗脊髓损伤尚无文献报道,但嗅黏膜组织移植目前已进入临床阶段。Lima 等人^[15]于 2005 年首次进行了人自体嗅黏膜组织移植治疗脊髓损伤的临床实验。结果证明,嗅黏膜移植治疗脊髓损伤是一种安全、可行、有效方法。2009 年他们又通过自体嗅黏膜组织移植治疗了 20 名脊髓损伤慢性恢复期的患者,其中包括 7 例截瘫和 13 例四肢瘫痪,通过 MRI 和脊髓损伤评分判定,移植后所有患者感觉和运动有不用程度的恢复,大多数患者出现下肢麻木的感觉或膀胱出现尿充盈感。且嗅觉没有受到损害^[16]。Centenaro 等人^[17]应用鼠嗅黏膜固有层移植治疗了大鼠完全脊髓损伤模型,移植后的大鼠脊髓损伤处髓鞘再生,反射重新建立,躯体运动功能有所恢复。嗅黏膜组织移植之所以能够有效治疗脊髓损伤,研究人员认为正是 OM-MSCs 的作用。然而嗅黏膜组织成分复杂,细胞构成繁多,使嗅黏膜组织移植治疗效果不如 OECs、施万细胞等单细胞移植^[18],因此,OM-MSCs 的单独移植将会更具有临床应用的价值。除此之外,研究还发现:用 OM-MSCs 的上清液培养的 OECs 及嗅鞘细胞移植到脊髓损伤的小鼠模型中,使 OECs 迅速增殖,有效促进髓鞘、轴突的生长,促进 OECs 对脊髓损伤处髓鞘的包绕^[8]。而 OECs 是一种特殊类型的胶质细胞,可分泌大量与神经生长和再生相关的蛋白^[19-21],如 NGF、BDNF、GDNF、NT3、NT4、GGF2 等;且联合培养后可促使脐血间充质干细胞向神经元分化^[22],因此对于二者之间的相互关系与作用仍需要进一步深入的研究。

2.4 OM-MSCs 移植改善中枢神经系统功能的可能机制

①细胞替代作用:OM-MSCs 移植后迁移至损伤灶周围,分化为神经细胞,以替代坏死的神经细胞,达到重建神经环路恢复神经功能的目的。OM-MSCs 是一种多分化潜能的间充质祖细胞,体外在一定条件下可诱导分化为神经元样细胞,在特定条件下还可诱导分化为具体的如多巴胺能神经元细胞。②分泌作用:神经生长因子(neurotrophic factor, NTF)作用于脑损伤后,颅内可引起 NTF 的分泌变化,而 BMSC 的植入会明显提高多种 NTF 的分泌^[23]。③刺激内源性神经干细胞的增殖分化:在有损伤的局部环境信号变化的刺激下,分泌一些促分化因子,刺激内源性神经干细胞代偿性增殖、分

化。④促进血管生成、改善局部血液供应:目前国内均证实骨髓间充质干细胞、脐带间充质可自体分泌多种细胞因子,如 VEGF、interleukin-1 等,而二者均有较强的促进血管新生的作用^[24]。OM-MSCs 作为间充质干细胞家族的一员是否同样可分泌这些因子,将是研究 OM-MSCs 治疗机制的一个重要课题。

3 前景与展望

据报道,人类之所以能够保持终生的嗅觉,就是源于嗅黏膜中神经元能够持续更新^[25]。而神经元之所以持续更新,正是由于干细胞的存在^[26]。嗅黏膜由嗅上皮和固有层组成。嗅上皮由基底细胞组成^[27],但固有层中的细胞鲜有报道,直到 OM-MSCs 的发现才得以对固有层内的构成有了一定了解。OM-MSCs 在体外易于提取培养,生物学性状稳定并能保持其多向分化潜能,临床治疗安全性高,可自体移植,无免疫排斥反应,无伦理问题,是组织工程的理想的种子细胞。

OM-MSCs 在神经损伤修复及再生、细胞组织工程及临床应用上,具有以下研究前景:①干细胞治疗:直接将间充质干细胞移植入体内,修复缺损神经细胞、组织,或体外培养再生组织。②作为基因治疗载体:OM-MSCs 是良好的基因载体^[28],可用于联合基因转染技术,携带靶基因或生长因子基因来治疗神经系统疾病。③组织工程材料与种子细胞联合移植:OM-MSCs 以其独特优势,成为组织工程的种子库来源之一,同时与可降解支架材料联合培养,修复组织缺损或替代器官的部分功能,治疗难治性疾病。OM-MSCs 的研究才刚刚起步,随着对其神经修复机制的深入研究和基因工程技术等的迅猛发展,必将在中枢神经系统修复领域取得更大的进步,为更多患者带来福音。

参 考 文 献

- [1] Huard JM, Youngentob SL, Goldstein BJ, et al. Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. *J Comp Neurol*, 1998, 400(4):469-486.
- [2] Murrell W, Feron F, Wetzig A, et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 2005, 233(2):496-515.
- [3] Feron F, Perry C, Girard SD, et al. Isolation of adult stem cells from the human olfactory mucosa. *Methods in molecular biology* (Clifton, N. J.), 2013, 1059:107-114.
- [4] Winstead W, Marshall CT, Lu CL, et al. Endoscopic biopsy of human olfactory epithelium as a source of progenitor cells. *American journal of rhinology*, 2005, 19(1):83-90.
- [5] Goldstein BJ, Hare JM, Lieberman S, et al. Adult human nasal mesenchymal stem cells have an unexpected broad anatomic distribution. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2013, 3(7):550-555.
- [6] Tome M, Lindsay SL, Riddell JS, et al. Identification of nonepithelial multipotent cells in the embryonic olfactory mucosa. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 2009, 27(9):2196-2208.
- [7] Girard SD, Deveze A, Nivet E, et al. Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. *J Vis Exp*, 2011, Aug 22, (54). pii:2762.
- [8] Lindsay SL, Johnstone SA, Mountford JC, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from olfactory biopsies but not bone enhance CNS myelination in vitro. *Glia*, 2013, 61(3):368-382.
- [9] Roisen FJ, Klueber KM, Lu CL, et al. Adult human olfactory stem cells. *Brain Res*, 2001, 890(1):11-22.
- [10] Matsumoto M, Nakagawa T, Higashi T, et al. Innervation of stem cell-derived neurons into auditory epithelia of mice. *Neuroreport*, 2005, 16(8):787-790.
- [11] Doyle KL, Kazda A, Hort Y, et al. Differentiation of adult mouse olfactory precursor cells into hair cells in vitro. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 2007, 25(3):621-627.
- [12] Pandit SR, Sullivan JM, Egger V, et al. Functional effects of adult human olfactory stem cells on early-onset sensorineural hearing loss. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 2011, 29(4):670-677.
- [13] Murrell W, Wetzig A, Donnellan M, et al. Olfactory mucosa is a potential source for autologous stem cell therapy for Parkinson's disease. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 2008, 26(8):2183-2192.
- [14] Nivet E, Vignes M, Girard SD, et al. Engraftment of human nasal olfactory stem cells restores neuroplasticity in mice with hippocampal lesions. *J Clin Invest*, 2011, 121(7):2808-2820.
- [15] Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, et al. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J Spinal Cord Med*, 2006, 29(3):191-203.
- [16] Lima C, Escada P, Pratas-Vital J, et al. Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair*, 2010, 24(1):10-22.
- [17] Centenaro LA, da CJM, Ilha J, et al. Implications of olfactory lamina propria transplantation on hyperreflexia and myelinated fiber regeneration in rats with complete spinal cord transection. *Neurochem Res*, 2013, 38(2):371-381.

- [18] Toft A , Tome M , Barnett SC , et al. A comparative study of glial and non-neural cell properties for transplant-mediated repair of the injured spinal cord. *Glia* ,2013 ,61 (4) :513-528.
- [19] Liu Y , Teng X , Yang X , et al. Shotgun proteomics and network analysis between plasma membrane and extracellular matrix proteins from rat olfactory ensheathing cells. *Cell Transplant* ,2010 ,19 (2) :133-146.
- [20] Woodhall E , West AK , Chuah MI. Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor , brain-derived neurotrophic factor , glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain research. Molecular brain research* , 2001 ,88 (1-2) :203-213.
- [21] 曾瑜 , 卢明. 神经干细胞与嗅鞘细胞联合移植的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志* ,2009 ,36 (4) :379-382.
- [22] Zeng Y , Rong M , Liu Y , et al. Electrophysiological characterisation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells induced by olfactory ensheathing cell-conditioned medium. *Neurochem Res* ,2013 ,38 (12) :2483-2489.
- [23] Forostyak S , Jendelova P , Sykova E. The role of mesenchymal stromal cells in spinal cord injury , regenerative medicine and possible clinical applications. *Biochimie* , 2013 ,95 (12) :2257-2270.
- [24] 孙佳佳 , 张梅娟 , 徐运. 人脐带间充质干细胞在神经系统疾病治疗中的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志* ,2011 ,38 (2) :157-161.
- [25] Curtis MA , Kam M , Nannmark U , et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* ,2007 ,315 (5816) :1243-1249.
- [26] Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* ,2007 ,8 (6) :481-488.
- [27] Schwob JE. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec* ,2002 ,269 (1) :33-49.
- [28] Shafiee A , Kabiri M , Ahmadbeigi N , et al. Nasal septum-derived multipotent progenitors : a potent source for stem cell-based regenerative medicine. *Stem Cells Dev* ,2011 ,20 (12) :2077-2091.

常压高浓度氧对创伤性颅脑损伤神经保护作用的研究进展

冯康¹ , 文斌¹ 综述 问肃生^{2*} 审校

1. 天水市第一人民医院神经外科 , 甘肃 天水 741000
2. 天水市第一人民医院心内科 , 甘肃 天水 741000

摘 要: 常压高浓度氧通过升高动脉血氧分压 , 使脑组织氧分压升高 , 改善脑组织氧供 , 恢复线粒体功能 , 改善脑细胞代谢 , 减轻血脑屏障破坏及减轻脑细胞水肿 , 降低颅内压 , 增加受损区脑血流量 , 改善脑电活动 , 无论是肺泡还是脑组织未见氧化应激反应增加。相对于高压氧容易实施 , 非侵入性 , 值得深入研究 , 临床推广。

关键词: 创伤性颅脑损伤 ; 常压高浓度氧 ; 神经保护

随着社会经济的发展 , 交通事故伤、坠落伤、打击伤等导致的颅脑损伤日益增多 , 创伤性脑损伤 (Traumatic Brain Injury , TBI) 后脑组织缺氧导致的原发和继发事件在神经细胞死亡中扮演重要角色 , 改善 TBI 后脑组织缺氧 , 成为治疗 TBI 和预防继发性脑损伤的重要策略之一。

常压高浓度氧 (Normobaric Hyperoxia , NHO) 是指正常大气压下增加吸入氧浓度到 40% ~ 100% ,

使血液中的氧分压升高 , 提高脑组织供氧。是一种潜在的神经保护措施。近年来的研究表明 NHO 增加脑血流量 , 升高脑组织氧分压 (PbtO₂) , 减轻脑水肿 , 改善脑代谢及神经细胞电活动 , 间接保护受损神经细胞免于程序性死亡 , 未见明显氧化应激反应 , 从而受到关注。由于其容易实施 , 非侵入性 , 管理方便 , 风险小于高压氧 , 值得深入研究 , 以便临床推广。

收稿日期:2013-10-17; 修回日期:2014-01-14

作者简介:冯康(1963-) 男, 学士, 主任医师。研究方向:脑肿瘤、颅脑创伤。

通讯作者:问肃生* (1961-) 男, 学士, 主任医师。研究方向:心脑血管疾病的介入治疗。