

综述

干细胞治疗脊髓损伤研究进展*

陈刚^{1,2} 吴骏² 祝贺² 于天飞^{1**}

(1 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院 齐齐哈尔 161006)

(2 中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室 北京 100101)

摘要 脊髓损伤后的常规治疗手段是在有效时间内进行手术缓减外力压迫,防止脊髓神经进一步受损。细胞替代治疗理论上可治愈脊髓损伤,不同类型细胞可从各角度产生治疗作用,包括损伤后的脊髓轴突再生、神经元重建和轴突髓鞘化等,进而促进功能恢复。对近年来干细胞治疗脊髓损伤研究中的最新结果进行了概述,以期能为干细胞治疗脊髓损伤的研究提供参考。

关键词 脊髓损伤 干细胞 细胞移植 细胞治疗

中图分类号 R394.2

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是指在强烈外力作用下脊柱遭到破坏,进而导致脊髓神经及相关组织受到损伤。目前SCI治疗方法主要有药物治疗、外科手术及康复治疗,但都只能对症治疗,SCI及其并发症仍会给患者带来终身性伤害。

利用细胞分化为受损的细胞进行替代治疗,理论上可以使SCI完全治愈。细胞治疗是指通过生物工程技术获得细胞,再经过分离、培养、药物处理等加工后,采用注射等方式移植,促进组织器官修复和再生,最终达到治疗疾病的目的。干细胞(stem cells)是一类具有自我更新,并在一定条件下分化出多种组织细胞的多潜能细胞,是细胞治疗中理想的种子细胞来源。

1 胚胎干细胞

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)具有分化为体内所有类型细胞的潜能。首例ESCs移植实验^[1]中,研究人员将小鼠ESCs注射至挫伤SCI大鼠脊髓中(细胞量为 1×10^6),发现存活的ESCs两周后在体内可分化为神经元($8\% \pm 5\%$)、星形胶质细胞($19\% \pm 4\%$)和少突胶质细胞($43\% \pm 6\%$)。虽然分化获得神

经元的比例很低,无法确认剩余ESCs(约30%)是否分化,但结果显示接受移植的SCI模型大鼠BBB平均分从8提升至10。随后在脊髓脱髓鞘模型大鼠以及无致密髓鞘的髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein)基因敲除Shiverer小鼠的脊髓中移植ESCs的实验中,能够分化获得具有髓鞘化功能的少突胶质细胞是ESCs发挥SCI治疗作用的主要原因,但ESCs可以促进轴突再生却无法髓鞘化。ESCs脊髓移植是否具有致瘤性一直存在争议,虽然上述研究都声称没有肿瘤生成,但仍需长时间甚至终生观察才能得出科学的结论。另外,有限的胚胎资源直接制约着ESCs细胞建系,导致目前临床研究面临ESCs细胞系稀缺的困境。最后,在很多国家直接利用ESCs进行移植尚存在很大伦理问题。

2 神经干细胞

中枢神经干细胞(neural stem cells, NSCs)主要存在于侧脑室下层(subventricular zone)和海马齿状回(dentate gyrus)等部位,具有进一步分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力。除了从脑组织分离获取外,NSCs也可以通过诱导分化ESCs或诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)获得。在早期啮齿类动物实验中,移植NSCs治疗SCI大鼠并促进功能恢复是因为NSCs使继发性损伤时组织损失

收稿日期:2016-07-05 修回日期:2016-11-27

* 国家“973”计划资助项目(2015CB964800)

**通讯作者,电子邮箱:yutianfei2001@163.com

和形成的疤痕减少,并能使新生皮质脊髓束穿透疤痕组织。近期有报道从比胚状体(embryoid bodies)更安全的克隆神经球分化获得 dNSCs(definitive NSCs),再移植到 SCI 模型小鼠中,发现 NSCs 大量分化成少突胶质细胞($64.4\% \pm 6.7\%$),并可阻止伤后脊髓萎缩,改善运动功能(BMS 评分),但更重要的是分化的细胞可以表达髓鞘碱性蛋白,并与主体轴突交联并产生髓鞘化^[2]。用丙戊酸(VPA)处理后的 NSCs 可以更多地分化为神经元而非胶质细胞,这些分化的神经元与宿主神经元交互反应形成突触,促进了功能恢复。其它研究也证明了 NSCs 治疗 SCI 具有良好的效果^[3]。

在灵长类动物实验中,挫伤 SCI 狨猴^[4]也能通过 NSCs 移植得到恢复。伤后 14 天将培养的胚胎干细胞来源神经干/祖细胞(ESC-NS/PCs)注射到病灶,最终检测到移植细胞分化为神经元($39.0\% \pm 7.3\%$)、少突胶质细胞($32.1\% \pm 5.1\%$)、星形胶质细胞($24.3\% \pm 4.2\%$)和少量少突胶质祖细胞($5.8\% \pm 0.4\%$),进一步研究发现移植减少了脊髓萎缩和炎症反应并有血管再生,促进轴突再生并与宿主相互作用,从而产生了功能恢复。该实验结果与作者早期使用诱导多能干细胞来源的神经干/祖细胞(iPSC-NS/PCs)的研究结果一致。用恒河猴进行移植实验^[5]也发现有细胞存活和功能恢复,但并未对细胞的命运和功能恢复机制进行研究。

与 ESCs 类似,NSCs 也有潜在的致癌性,虽然以上实验均未发现 NSCs 移植后在体内形成肿瘤,但临床使用需要进一步验证其安全性。

3 间充质干细胞

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)最早在骨髓中发现,随后相继从脂肪、肌肉、胎盘、肺、肝等组织以及脐带、羊水等分离获得。MSCs 来源广泛,免疫源性低,但同时也存在异质性、制备质量不可控等问题。早期尝试实验使用 MSCs 移植治疗 SCI 仅发现移植处的细胞存活并少量分化为不成熟神经元或胶质细胞。

MSCs 移植可改善神经性疼痛^[6],移植后产生神经性疼痛的促分裂原活化蛋白激酶家族(mitogen-activated protein kinase, MAPK),如 p-p38 MAPK, p-ERK1/2 和 p-JNK,和胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)与小胶质细胞等均被抑制,同时 SCI 引起的血液-脊髓屏障破坏被修复。另有

研究发现移植的 MSCs 在体内可以存活,鼻腔内移植(intranasal)和鞘内注射(intrathecal)效果无显著差异^[7]。不同移植方案会导致移植细胞的不同命运,研究发现急性期移植治疗效果最好,而多次移植比单次移植效果更好。这些研究不仅证明 MSCs 的有效性,还探索了移植 MSCs 的方法和时期,为临床研究奠定了基础。

一项临床手术通过静脉注射自体骨髓有核细胞和多次鞘内注射 MSCs,使一个失去胸椎第 2 节段(T2)以下所有感觉的 15 岁女孩在两年后感觉功能恢复至腰椎 L3-4 节段,磁共振成像检查发现脊髓损伤组织有部分再生。但也有研究认为这种混合移植方案并不比单一移植方法更好^[8]。

MSCs 还可以调节免疫反应和修复髓鞘,因此很多临床研究采用移植 MSCs 治疗 SCI(表 1)。

4 少突胶质祖细胞

少突胶质祖细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OPCs)起源于胚胎发育的神经上皮细胞,是中枢神经系统(central nervous system, CNS)中可分化为星形胶质细胞和少突胶质细胞的胶质细胞。SCI 导致的细胞凋亡等会产生一系列脱髓鞘反应,最终导致运动和感觉功能障碍,而 CNS 的轴突髓鞘化包被都由少突胶质细胞完成,因此移植可髓鞘再生的 OPCs 成为研究的热点。不修改基因直接分化人胚胎干细胞(hESCs)到少突胶质及其祖细胞,再注射到 shiverer 小鼠胸椎 T9 处,6 周后发现移植细胞能在体内分化并与宿主细胞整合,有髓鞘形成,但该实验并未对功能恢复进行评价^[9]。通过异位表达 OCT4 可以将体细胞诱导重编程为功能性的 OPCs,这解决了传统分化效率低和来源少的问题,而后在挫伤 SCI 模型大鼠中,发现移植的细胞产生了形态和功能恢复^[10]。

人类 SCI 大多发生在颈椎,颈椎 C5 挫伤 SCI 模型大鼠的 OPCs 移植实验发现移植细胞可以减少白质区空穴大小,损伤后灰质和运动神经元残存也更多,而神经营养因子、细胞凋亡、炎症反应和神经细胞标记物的显著变化可能也是组织学和功能恢复的原因^[11]。此外,无动物源性且成分明确的分化体系为将来 OPCs 的临床应用奠定了基础^[12]。

世界首例 hESCs 治疗 SCI 的临床试验选用 hESCs 来源的少突胶质祖细胞(OPCs)进行移植,但由于病人选择、试验设计及科学原理阐释方面饱受争议,该试验最终于 2011 年宣布停止。其后另有一个长达 15 年的

表 1 MSCs 治疗 SCI 的临床研究
Table 1 Clinical trials of treatment about MSCs to SCI

注册号	细胞类型	细胞量	治疗方法	临床阶段(期)	时间	国家地区
NCT02482194	BMMSCs *	-	自体移植	1	2013.6 - 2015.8	巴基斯坦
NCT01694927	MSCs	-	自体病灶移植	2	2012.1 - 2014.6	智利
NCT01676441	BMMSCs	$1.6 \times 10^7 \sim 3.2 \times 10^7$	鞘内注射	2,3	2008.8 - 2016.5	韩国
NCT01446640	BMMSCs	$10^6/\text{kg}$	静脉、鞘内注射	1,2	2011.10 - 2014.6	中国
NCT02481440	UCMSCs *	$10^6/\text{kg}$	鞘内注射	3	2014.1 - 2018.12	中国
NCT02574585	MSCs	-	经皮注射	2	2015.4 - 2017.12	巴西
NCT02574572	MSCs	-	自体病灶注射	1	2015.4 - 2016.12	巴西
NCT02152657	MSCs	-	经皮注射	1	2014.5 - 2015.12	巴西
NCT02688049	MSCs/NSCs	10^7	支架结合移植	1,2	2016.1 - 2017.12	中国
NCT01162915	BMMSCs	-	鞘内输注	1	2010.7 - 2014.5	美国
NCT01274975	ADMSCs *	4×10^8	静脉输注	1	2009.7 - 2014.3	韩国
NCT01624779	ADMSCs	9×10^7	自体鞘内移植	1	2012.4 - 2014.5	韩国
NCT02570932	BMMSCs	3×10^8	鞘内注射	2	2015.7 - 2017.5	西班牙
NCT01325103	BMMSCs	10^7	病灶移植	1	2010.7 - 2012.12	巴西
NCT01769872	ADMSCs	2×10^8	静脉注射	1,2	2013.1 - 2014.12	韩国
		5×10^7	鞘内注射			
		2×10^7	脊髓注射			
NCT02237547	UCMSCs	-	静脉、鞘内注射	1,2	2014.9 - 2016.9	巴拿马
NCT01909154	BMMSCs	10^8	鞘内注射	1	2013.3 - 2014.4	西班牙
NCT01393977	UCMSCs	4×10^7	蛛网膜下腔移植	2	2011.1 - 2012.5	中国
NCT01873547	UCMSCs	-	蛛网膜下腔移植	3	2012.6 - 2014.12	中国
NCT02352077	MSCs	-	支架结合移植	1	2015.1 - 2016.6	中国
NCT02165904	BMMSCs	-	蛛网膜下腔移植	1	2014.5 - 2016.5	西班牙

观察治疗试验,结果只能等待时间验证,而基础研究从轴突再生、髓鞘包被、膀胱功能恢复^[13]到组织重建,细胞移植在各种不同领域都有突破并进展良好。

5 干细胞分化细胞

很多干细胞分化得到的功能细胞也被用于治疗 SCI,并取得了积极的治疗效果。

施旺细胞(Schwann cells, SCs)是外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)中的重要功能细胞,其主要作用是包裹轴突,参与髓鞘化,提供物理支撑和神经营养作用。联合使用 PTEN 脂质磷酸酶抑制剂双过氧钒(bispermovanadium, bpV)给药和 SCs 移植^[14]可以使运动功能恢复更多(bpV + SCs > bpV > SCs > Vehicle)。SCs 能极大促进髓鞘固有的轴突恢复再生^[15],与脑保护剂依达拉奉(Edaravone)结合可以改变病灶微环境,进而提高移植细胞的存活率并促进功能

恢复^[16]。

但 SCs 移植具有局限性,即移植的细胞很难向外迁移。在 SCs 中过表达聚唾液酸(PSA)^[17],或移植 SCs 时联合表达神经营养因子(D15A)和软骨素酶 ABC(ChABC)^[18],可以解决该问题,使移植细胞在体内迁移更多。

嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)可使初级嗅觉轴突(primary olfactory axons)髓鞘化,并为神经提供营养作用。OECs 可以刺激病灶处神经产生轴突生长并分泌神经细胞黏附分子^[19],移植 OECs 后产生的轴突具有正常功能。临床实验发现移植 OECs 后 20 个病人有 11 位 ASIA 评分有改善,甚至有 5 位恢复了肠道控制和 1 位恢复膀胱控制^[20],这对以后的临床研究产生了极大的鼓舞。

除以上所述细胞类型外,其他研究还使用了成纤维细胞(fibroblasts)、造血干细胞(hematopoietic stem

cells)和单核细胞(mononuclear cells)等,这些对于脊髓损伤后各方面恢复重建均有一定效果。

6 总结与展望

SCI是世界性的医学难题,并终身性地造成患者的经济负担和精神压力,严重地降低了患者甚至患者家庭成员的生活质量,寻找到一条行之有效的治疗方法显得越来越重要。细胞移植治疗SCI具有巨大的潜力,但同时存在若干亟待解决的问题,如细胞移植的时间如何确定?怎样保持移植细胞不被血液冲洗掉?细胞如何在病灶存活并分化?等等。

基础研究中大多是急性期进行细胞移植,也有部分选择了亚急性期(模型制备后2周)^[21],而临床上不同案例的SCI必须根据具体情况选择移植时间。

生物材料可以为细胞提供支撑、保护和营养作用,因此干细胞结合材料/营养因子,取长补短共同发挥效用才是未来的研究趋势。常用的生物材料有胶原(collagen)、壳聚糖(chitosan)、层连蛋白(laminin)和海藻酸盐(alginate)等,常用的神经营养因子包括脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养蛋白3(NT-3)、表皮生长因子(EGF)及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)等。

如何使SCI损伤组织功能重建,包括轴突再生、髓鞘包被、突触形成与信号交流等,是当前SCI治疗的重点和难点。SCI的病理机制研究越来越清晰,希望研究人员早日找到治愈SCI的方法,为广大患者带来福音。

参考文献

- [1] McDonald J W, Liu X Z, Qu Y, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med*, 1999, 5(12): 1410-1412.
- [2] Salewski R P, Mitchell R A, Shen C, et al. Transplantation of neural stem cells clonally derived from embryonic stem cells promotes recovery after murine spinal cord injury. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(1): 36-50.
- [3] Lu P, Woodruff G, Wang Y, et al. Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury. *Neuron*, 2014, 83(4): 789-796.
- [4] Iwai H, Shimada H, Nishimura S, et al. Allogeneic neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells promote functional recovery after transplantation into injured spinal cord of nonhuman primates. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(7): 708-719.
- [5] Nemati S N, Jabbari R, Hajinasrollah M, et al. Transplantation of adult monkey neural stem cells into a contusion spinal cord injury model in *Rhesus macaque* monkeys. *Cell J*, 2014, 16(2): 117-130.
- [6] Watanabe S, Uchida K, Nakajima H, et al. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity through suppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. *Stem Cells*, 2015, 33(6): 1902-1914.
- [7] Ninomiya K, Iwatsuki K, Ohnishi Y, et al. Intranasal delivery of bone marrow stromal cells to spinal cord lesions. *J Neurosurg Spine*, 2015, 23(1): 111-119.
- [8] Jarocha D, Milczarek O, Wedrychowicz A, et al. Continuous improvement after multiple mesenchymal stem cell transplantations in a patient with complete spinal cord injury. *Cell Transplant*, 2015, 24(4): 661-672.
- [9] Nistor G I, Totoiu M O, Haque N, et al. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia*, 2005, 49(3): 385-396.
- [10] Kim J B, Lee H, Arauzo-Bravo M J, et al. Oct4-induced oligodendrocyte progenitor cells enhance functional recovery in spinal cord injury model. *EMBO J*, 2015, 34(23): 2971-2983.
- [11] Sharp J, Frame J, Siegenthaler M, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after cervical spinal cord injury. *Stem Cells*, 2010, 28(1): 152-163.
- [12] Li Y, Gautam A, Yang J, et al. Differentiation of oligodendrocyte progenitor cells from human embryonic stem cells on vitronectin-derived synthetic peptide acrylate surface. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(10): 1497-1505.
- [13] Chew D J, Zhu L, Delivopoulos E, et al. A microchannel neuroprosthesis for bladder control after spinal cord injury in rat. *Sci Transl Med*, 2013, 5(210): 155.
- [14] Walker C L, Wang X, Bullis C, et al. Biphasic bisperoxovanadium administration and Schwann cell transplantation for repair after cervical contusive spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2015, 264:163-172.
- [15] Deng L X, Walker C, Xu X M. Schwann cell transplantation and descending propriospinal regeneration after spinal cord injury. *Brain Res*, 2015, 1619:104-114.
- [16] Zhang S Q, Wu M F, Piao Z, et al. Edaravone combined with Schwann cell transplantation may repair spinal cord injury in rats. *Neural Regen Res*, 2015, 10(2): 230-236.
- [17] Ghosh M, Tuesta L M, Puentes R, et al. Extensive cell migration, axon regeneration, and improved function with polysialic acid-modified Schwann cells after spinal cord injury.

- Glia, 2012, 60(6): 979-992.
- [18] Kanno H, Pressman Y, Moody A, et al. Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci*, 2014, 34(5): 1838-1855.
- [19] Witheford M, Westendorf K, Roskams A J. Olfactory ensheathing cells promote corticospinal axonal outgrowth by a LI CAM-dependent mechanism. *Glia*, 2013, 61(11): 1873-1889.
- [20] 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.
- [21] Kadoya K, Lu P, Nguyen K, et al. Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. *Nat Med*, 2016, 22(5): 479-487.

Progress of Stem Cell Therapy in Spinal Cord Injury

CHEN Gang^{1,2} WU Jun² ZHU He² YU Tian-fei¹

(1 College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

(2 State Key Laboratory of Stem Cells and Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The conventional treatment of spinal cord injury (SCI) is decompressive laminectomy within a given time after SCI to prevent the secondary damage. Theoretically, cell replacement therapy can cure SCI, different types of cells can exert therapeutic effects from various aspects including injured spinal cord axon regeneration, neuron reconstruction and remyelination, and finally promote the functional recovery. The published literatures in recent years which focusing on stem cell therapy in spinal cord injury were reviewed.

Key words Spinal cord injury Stem cell Cell transplantation Cell therapy