

神经干细胞移植治疗周围神经损伤的研究进展^{*}

贺菊芳, 余资江^{**}

(贵州医科大学 人体解剖学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[关键词] 神经干细胞; 周围神经; 神经损伤; 细胞移植; 综述

[中图分类号] R651.3; R322.81 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2016)10-1117-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.10.001

周围神经是由脑和脊髓发出的神经根、神经丛、神经干及神经末梢组成的混合神经,包括运动、交感及感觉3种纤维,周围神经损伤后会引发不同程度的神经感觉、运动及交感功能障碍。近年来,周围神经损伤的比率逐年增高,约占创伤患者的2.8%,50%以上的患者在治疗后,运动和感觉功能未恢复到正常^[1-2]。因此不断摸索一种更理想的治疗方法以促进创伤后受损的周围神经的修复和再生具有重要意义。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)一类可分化为神经元细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞的干细胞,它具有高度的自我更新能力、多潜能分化、迁徙及良好的组织融合性等特性,NSCs在周围神经损伤后的修复重建和功能恢复方面显示出良好的治疗效果,这为周围神经损伤的治疗带来了新的希望。本文就近几年国内外运用NSCs移植治疗周围神经损伤的研究现状进行综述。

1 NSCs的生物特性

1992年Reynolds^[3]和Richards^[4]从成鼠纹状体和海马中分离出NSCs,1997年Mckay^[5]在Science上发表的文章表明NSCs是一类可分化为神经元细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞的干细胞,它具有高度的自我更新能力、多潜能分化、迁徙及良好的组织融合性等特性。

到目前为止,研究者们发现NSCs与其它的干细胞一样也具备以下特征:(1)来源于神经组织且能分化成神经组织,有研究发现,在哺乳动物中,大

多数NSCs分布于中枢神经系统,脑室下区是NSCs主要分布区,对神经细胞的生长和死亡起着调控作用,同时维持脑组织的动态平衡^[6],在微环境影响下,NSCs可分化成大脑内所有主要类型的细胞^[7];(2)具有自我更新能力,经体外培养的NSCs,在营养物质充足的情况下,可在短期内更新出大量的NSCs;(3)可进行对称分裂和非对称分裂,通过对称分裂对自身进行复制以增加细胞数量,同时通过非对称分裂除产生一个与自己相同的细胞外还产生一个与自身不同的神经细胞(神经元、胶质细胞及神经前体细胞等);(4)对损伤的反应能力,NSCs向损伤部位迁徙并修复损伤部位的神经功能。NSCs本身的状态和所处环境的营养因子对其具有调控作用,决定自身是否处于静息、休眠状态,或是进行分化、成熟,并向何种细胞进行分化^[7]。大量研究证实NSCs能通过替代损伤细胞、分泌营养因子和免疫调节等功能,在一定程度上恢复神经的传导和支配功能^[9-11]。

2 周围神经修复与再生机制

因受到过度牵拉、挤压或锐器切割的外力作用可引起周围神经损伤,并造成神经的结构受损或功能缺失。然而神经再生的速度缓慢,瘢痕的过度增生、再生神经与周围组织粘连、肌肉萎缩及运动终板退化变性等多种因素均会导致神经的受损部位或其所支配的区域出现一系列的功能障碍。本质上周围神经损伤归属于细胞损伤的范畴^[12]。周围神经通过神经元轴突进行信息传递并与中枢神经

^{*}[基金项目]国家自然科学基金(81060108);贵州省科技厅2012年社会发展攻关项目[黔科合SY字(2012)3153号]

^{**}通信作者 E-mail: yzj0112@126.com

网络出版时间:2016-10-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20161017.1445.022.html>

系统相联系,雪旺细胞是周围神经系统主要的胶质细胞,雪旺细胞参与形成的髓鞘对神经轴突的包裹具有绝缘和保护作用。正常的神经功能有赖于轴突的双向轴浆转运:顺行转运的神经介质和神经营养因子可刺激神经末梢保持所支配的效应器的活力与功能;逆行转运的神经营养因子及神经诱导因子则促进神经元、雪旺细胞及神经纤维的再生和趋化及定向生长^[13]。1850 年 Waller^[14] 提出 Waller 变性这一概念,当神经被切断后就开始了 Waller 变性,大量的巨噬细胞聚集,吞噬变性轴突、崩解髓鞘碎片和死亡的血旺细胞,形成空的神经内膜管,以便再生轴芽沿神经内膜管到达靶器官,同时,该区域的巨噬细胞还会释放生长因子,刺激雪旺细胞和成纤维细胞增生。雪旺细胞沿着远端神经干的基膜神经鞘迁徙纵向填补神经内膜管形成 Bungner 带,为轴突的成功再生提供环境。在周围神经中断后,受损神经轴突的远端也可发生 Waller 变性,运动终板乙酰胆碱酯酶的活性降低,进一步造成轴突超微结构的显著改变^[15],其近端同时也发生溃变。神经轴突顺行和逆行运输中断,使效应器得不到由神经元分泌的营养因子滋养而发生萎缩;脊髓中相应节段的神经元也失去了效应器分泌的营养因子的供给而部分死亡。因此,恢复神经轴突的连续性、促进轴突再生、防止其所支配的效应器萎缩及保护神经元是周围神经损伤修复的关键。

分子机制上,周围神经损伤的修复与细胞因子、炎症因子和黏附分子等有密切的关系。周围神经损伤涉及了多种因子的相互调节作用,细胞因子除作为免疫调节因子外,还直接参与神经的病理生理调控,在神经损伤修复与再生过程中,各种细胞因子在周围神经损伤部位和神经元的表达存在差异,这对于筛选合适的神经生长因子来促进受伤神经的修复和再生有着重要意义^[16-18]。姚登兵等^[19]的研究中,通过建立的大鼠坐骨神经 Wallerian 溃变模型,发现在 Wallerian 溃变过程中共有 93 个差异表达蛋白,基于 GO 数据库,这些上调(下调)的蛋白在 Wallerian 溃变过程中发挥着重要的作用。其他研究者也发现,细胞因子在阻止神经元程序性死亡和促进轴突再生中起到决定性的作用^[20-22]。部分神经元和神经胶质细胞分泌的炎症因子具有参与炎症反应、调节免疫应答、刺激细胞增殖、促进其他细胞因子分泌及调节代谢等多种功能,在周围神经损伤修复与再生过程中起到了非常重要的保护作用^[23-24]。在神经系统生长发育过程

中,细胞黏附分子介导了细胞与细胞、细胞与细胞外基质之间相互识别、黏附和信号传导^[25-26]。氧化型 galetin-1 可刺激雪旺细胞由近端向远处残端迁移,辅助桥接细胞,促进轴突向损伤神经末梢长入^[27]。

3 NSCs 移植方式

目前在基础研究中主要以维持神经元活性及神经元数量、恢复神经轴突的连续性、促进轴突再生来修复周围神经损伤。外源性的 NSCs 作为理想的种子细胞,主要通过蛛网膜下腔、局部或静脉注射的方式移植到动物体内。蛛网膜下腔注射经腰椎穿刺将 NSCs 注射到蛛网膜下腔,随着脑脊液循环途径流遍整个大脑和脊髓,部分 NSCs 可迁徙到神经元受损部位进行增殖和分化,以替代受损和死亡的神经元和胶质细胞,进而修复部分神经元的功能^[28];但由于脑脊液与细胞培养的环境差异较大,仅少量的 NSCs 能存活并分化。局部注射移植是目前采用较多的移植方法,该法应用生物导管桥接神经两端,向导管内移植 NSCs 细胞^[29-30]。该法不仅可利用 NSCs 的桥接生物特性在神经两端发挥作用,还可起到神经减压和防止新生的神经与周围组织粘连的作用,有利于周围神经的功能恢复,但手术会造成神经的二次损伤。静脉注射是将体外分离培养的细胞随着血液循环,穿过血-脊髓屏障到达神经损伤部位发挥治疗的作用^[31-32]。在坐骨神经慢性压迫性动物模型中,造模 7 d 后给予模型动物尾静脉移植注射 NSCs,可明显抑制动物热敏痛和触诱发痛、降低神经元激活,有髓鞘的轴突总数明显增加^[33]。该移植方法操作简单方便,创伤小,但因 NSCs 细胞在血液循环中迁徙需要较长的时间,仅少量 NSCs 细胞到达神经损伤部位,因此需要进行多次细胞移植方可达到治疗效果^[34]。

4 NSCs 移植治疗周围神经损伤的现状

临床一般根据 Sunderland^[35] 对周围神经损伤的分级,选择不同的治疗手段。随着对 NSCs 的深入研究,研究者们发现 NSCs 具有很强的自我增殖和多向分化潜能,易与宿主整合和低免疫源性,是修复神经组织损伤的理想种子细胞。NSCs 可对缺失的神经元和胶质细胞有补充作用,NSCs 受到局

部微环境的影响后可多向分化,替代损伤和死亡的神经元或胶质细胞。NSCs 还可产生多种细胞基质,为轴突的再生提供支持物^[36]。NSCs 分泌的多种神经生长因子,也为轴突生长提供相对理想的局部微环境^[37-38],为变性的神经纤维和新生的神经纤维形成新的髓鞘,维持神经纤维功能的完整性^[39]。以上的研究发现打破了传统神经细胞受损不可再生的观念,同样也为神经修复提供了理论基础。目前,移植方式主要有单一的 NSCs 移植、NSCs 联合移植及基因工程化的 NSCs 移植。

4.1 单一的 NSCs 移植

近几年对单一的 NSCs 移植治疗研究较多,相对于手术治疗,细胞移植的治疗效果更加理想。Gu 等^[40]研究中,将胚胎 NSCs 移植到神经损伤部位,经检测发现部分 NSCs 分化成高活性神经元;逆行性追踪和电子肌动扫描结果表明移植的 NSCs 与靶组织之间存在稳定的功能性通路。Xu 等^[30]的实验中,同样将细胞移植到神经损伤部位,8 周之后进行相关指标检测,NSCs 组和 NGF 组中的神经营养因子(BDNF 与 HGF)表达较高,神经功能的恢复也相对较好;而 NSCs 组与 NGF 组相比较,NSCs 组再生轴突的髓鞘化更加显著。同时,大量研究证实,NSCs 移植到体内可分化为神经元样和雪旺细胞样细胞。雪旺细胞是周围神经主要的胶质细胞,NSCs 向雪旺细胞的分化可加速髓鞘形成,这为轴突再生提供了有利条件。然而单一的 NSCs 移植不一定能达到理想的治疗效果。外源性的 NSCs 对体内微环境敏感,仅少部分细胞能存活,向目的细胞的分化比率则更小。此外,尽管 NSCs 能分泌多种神经营养因子,但对神经损伤修复的影响还达不到质的改变。

4.2 NSCs 联合移植

虽然单一的 NSCs 在移植治疗周围神经损伤中取得了一定的疗效,但仍未达到医者和患者的期望效果。因此,NSCs 联合其他类型细胞移植为周围神经损伤的治疗开辟了一条新的途径。有研究表明 NSCs 的联合治疗效果优于单一的 NSCs 移植治疗。雪旺细胞与 NSCs 的联合移植,两者可相互作用。雪旺细胞可以为 NSCs 提供保护、支持及营养等作用,并促进 NSCs 向神经元样细胞方向分化;NSCs 在微环境影响下分化成雪旺细胞。李晓涛等^[41]将雪旺细胞和 NSCs 共同移植到臂丛神经根性撕脱伤大鼠模型上,通过对患肢功能恢复状况、神经电生理检测及相应脊髓损伤节段脊髓前角

运动神经元存活率的检测,共同移植组大鼠屈肘功能明显改善,神经元存活率较高,得出神经根回植术联合细胞移植可以加强神经元的保护作用;在大鼠体内,移植的雪旺细胞可以存活并持续为 NSCs 提供保护、支持及营养等作用,还能够促进 NSCs 向神经元样细胞方向分化。目前,对于利用 NSCs 与雪旺细胞共同移植治疗周围神经损伤的研究在国内外均较少,共同作用的机制尚不明确,可能与共同移植治疗可修复损伤脊髓的解剖结构,使受损的神经通路再通;同时,植入到相应脊髓节段的 NSCs 存活后,其与受损区神经组织相互作用,可能产生某些细胞因子促进受损神经组织功能的恢复,同时促使植入的 NSCs 发生增殖并适度迁徙;其次雪旺细胞在对 NSCs 保护的同时,还持续地为 NSCs 提供其生长所必需的多种神经营养因子,创造稳定的微环境,促使 NSCs 向功能神经元方向分化^[41]。

4.3 基因工程化的 NSCs 移植

基因工程靶向细胞疗法的飞速发展,给坐骨神经损伤的修复与再生带来了新的曙光。该技术主要利用 DNA 重组方法,利用 NSCs 具有免疫原性低、易于外源基因的稳定表达等特点,在体外对 NSCs 用基因重组技术导入或删除了某一或某些基因,从而达到改变细胞表型的目的。Fu 等^[42]利用基因工程化的 NSCs 移植方法发现转染组的髓鞘化程度高于未转染组,证实了基因修饰 NSCs 可能具有促进神经再生和功能恢复的应用潜力。同时有研究发现,经腺病毒转染 hBDNF 的 NSCs 移植治疗视神经损伤,移植 8 周后可见 NSCs 向视网膜深层迁徙,部分细胞分化成神经元与胶质细胞,至少在 8 周内持续表达 BDNF 蛋白,进一步证实了在坐骨神经损伤的修复实验中,通过基因转染技术的方法可以充分利用 NSCs 的桥梁作用、自我更行和多向分化、迁徙特性并在局部有效表达基因产物,以促进神经结构和功能的恢复。由于目前基因治疗仍然处于实验阶段,应用于临床还需解决大量问题,例如目的基因多样性选择、目的基因在宿主体内稳定表达、多基因联合治疗以及伦理问题等^[43]。

5 问题与展望

目前,周围神经损伤的治疗仍然是临床和基础研究面临的一大难题,NSCs 移植的研究在动物模型治疗中取得较好的治疗效果,从相关基因工程化

NSCs 的移植实验研究结果也提示 NSCs 有望成为一类理想的治疗周围神经损伤的种子细胞,但仍然存在许多问题:(1) NSCs 移植后的定向分化诱导机制等问题;(2) 微环境中神经营养因子的调控及内源性 NSCs 活化、增殖、迁移分化的因素及其分子作用机制问题;(3) NSCs 移植后的存活率及分化成神经元和雪旺细胞比率低等问题;(4) 腺病毒转染 NSCs 移植后的安全性及过表达是否会致瘤及功能恢复的评价标准问题;(5) 实验结果的可靠性问题,目前的研究结果主要是通过动物实验取得,动物与人类的周围神经损伤的病理机制及损伤后的修复机制是否存在着差异。相信随着对 NSCs 与基因工程靶向细胞技术研究的不断深入,上述问题会一一解决,NSCs 移植治疗周围神经损伤将会有一个新的突破。

6 参考文献

- [1] Scholz T, Sumarto A, Krichevsky A, et al. Neuronal differentiation of human adipose tissue-derived stem cells for peripheral nerve regeneration in vivo [J]. Arch Surg, 2011(146):666-674.
- [2] Grinsell D, Keating CP. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies[J]. Biomed Res Int, 2014 (2014):698256.
- [3] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cell of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992 (5052): 1707-1710.
- [4] Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992 (18):8591-8595.
- [5] McKay R. Stem cells in the central nervous system[J]. Science, 1997 (5309): 66-71.
- [6] Aurlie G, Aurore GP, Loubna A, et al. Evidence for a subventricular zone neural stem cell phagocytic activity stimulated by the vitamin K-dependent factor protein S [J]. Stem Cells, 2015(33):515-525.
- [7] Fuentealba LC, Rompani SB, Parraguez JI, et al. Embryonic origin of postnatal neural stem cells [J]. Cell, 2015(7): 1644-1655.
- [8] Pauline S, Jun L, Andrea HB. Nutrient control of neural stem cells [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2011 (23):1-6.
- [9] Sakata H, Narasimhan P, Niizuma K, et al. Interleukin 6-preconditioned neural stem cells reduce ischemic injury in stroke mice[J]. Brain, 2012 (11):3298-3310.
- [10] Shetty AK. Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection[J]. Epilepsy Behav, 2014(38):117-124.
- [11] Mine Y, Tatarishvili J, Oki K, et al. Grafted human neural stem cells enhance several steps of endogenous neurogenesis and improve behavioral recovery after middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Neurobiol Dis, 2013(52):191-203.
- [12] Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair [J]. J Am Acad Orthop Surg, 2000 (4):243-252.
- [13] Mendell LM. Neurotrophins and sensory neurons: role in development, maintenance and injury [J]. Biol Sci, 1996(351):463-467.
- [14] Waller AV. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres[J]. Phil Trans Roy Soc, 1856 (5):924-925.
- [15] 刘学谦, 薛黔. 坐骨神经损伤修复机制及其治疗的研究进展[J]. 四川解剖学杂志, 2012 (2):62-65.
- [16] Verburg-van Kemenade BM, Van der Aa LM, Chadzinska M. Neuroendocrine-immune interaction: regulation of inflammation via G-protein coupled receptors[J]. Gen Comp Endocrinol, 2013(188):94-101.
- [17] Hamby ME, Coppola G, Ao Y, et al. Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and Calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors [J]. J Neurosci, 2012 (42): 14489-14510.
- [18] Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, et al. c-Jun reprograms schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration [J]. Neuron, 2012 (4):633-647.
- [19] 姚登兵, 王勇军, 顾晓松. 大鼠坐骨神经 Wallerian 溃变的分子机制研究[J]. 交通医学, 2013 (6):580-584.
- [20] Zong HB, Zhao HX, Zhao YL, et al. Nanoparticles carrying neurotrophin-3-modified Schwann cells promote repair of sciatic nerve defects[J]. 中国神经再生研究: 英文版, 2013 (14):1262-1268.
- [21] Karagyaur M, Dyikanov D, Makarevich P, et al. Non-viral transfer of BDNF and uPA stimulates peripheral nerve regeneration[J]. Biomed Pharmacother, 2015 (74):63-70.
- [22] Uchida H, Matsushita Y, Ueda H. Epigenetic regulation of BDNF expression in the primary sensory neurons after peripheral nerve injury: implications in the development

- of neuropathic pain [J]. *Neuroscience*, 2013 (240): 147 – 154.
- [23] Shin JA, Park EM, Choi JS, et al. Ischemic preconditioning-induced neuroprotection is associated with differential expression of IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist in the ischemic cortex [J]. *J Neuroimmunol*, 2009 (217): 14 – 19.
- [24] Yang P, Wen H, Ou S, et al. IL-6 promotes regeneration and functional recovery after cortical spinal tract injury by reactivating intrinsic growth program of neurons and enhancing synapse formation [J]. *Exp Neurol*, 2012 (236): 19 – 27.
- [25] Gardiner NJ, Fernyhough P, Tomlinson DR, et al. Alpha7 integrin mediates neurite outgrowth of distinct populations of adult sensory neurons [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2005 (2): 229 – 240.
- [26] Nodari A, Previtali SC, Dati G, et al. Alpha6beta4 integrin and dystroglycan cooperate to stabilize the myelin sheath [J]. *J Neurosci*, 2008 (26): 6714 – 6719.
- [27] 刘志雄, 张伯勋. 周围神经外科学 [M]. 北京, 北京科技出版社, 2004: 16 – 17.
- [28] 武玉江, 侯英诺, 张子檀, 等. 早期运动训练联合神经干细胞移植对脊髓损伤模型大鼠后肢运动功能的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2016 (6): 876 – 882.
- [29] Ni HC, Tseng TC, Chen JR, et al. Fabrication of bioactive conduits containing the fibroblast growth factor 1 and neural stem cells for peripheral nerve regeneration across a 15 mm critical gap [J]. *Biofabrication*, 2013 (3): 035010.
- [30] Xu L, Zhou S, Feng GY, et al. Neural stem cells enhance nerve regeneration after sciatic nerve injury in rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2012 (2): 265 – 274.
- [31] Jeong SW, Chu K, Jung KH, et al. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage [J]. *Stroke*, 2003 (9): 2258 – 2263.
- [32] 陈珊珊, 金华. 动脉移植 BMSCs 对脊髓缺血再灌注损伤大鼠脊髓细胞凋亡和 caspase-9 基因的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2015 (7): 900 – 905.
- [33] Silvia F, Anna EV, Elisa B, et al. Corrigendum to “Intravenous neural stem cells abolish nociceptive hypersensitivity and trigger nerve regeneration in experimental neuropathy” [J]. *Pain*, 2012 (4): 850 – 861.
- [34] Osaka M, Honmou O, Kocsis JD, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome [J]. *Brain Res*, 2010 (1343): 226 – 235.
- [35] Sunderland S. *Nerve and nerve injury* [M]. New York: Churchill Livingstone, 1987: 173 – 176.
- [36] Ostenfeld T, Caldwell MA, Prowse KR, et al. Human neural precursor cells express low levels of telomerase in vitro and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation [J]. *Exp Neurol*, 2000 (1): 215 – 226.
- [37] Kerr DA, Llado J, Shambloot MJ, et al. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury [J]. *J Neurosci*, 2003 (12): 5131 – 5140.
- [38] Teng YD, Lavik EB, Qu X, et al. Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002 (5): 3024 – 3029.
- [39] Cusimano M, Bizziato D, Pluchino S, et al. Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord [J]. *Brain*, 2012 (2): 447 – 460.
- [40] Gu S, Shen Y, Xu W, et al. Application of fetal neural stem cells transplantation indelaying denervated muscle atrophy in rats with peripheral nerve injury [J]. *Microsurgery*, 2010 (30): 266 – 274.
- [41] 李晓涛, 李长德, 解云川, 等. 神经干细胞与雪旺细胞共同移植对大鼠臂丛神经根性撕脱伤的疗效 [J]. *中国老年学杂志*, 2014 (4): 974 – 975.
- [42] Fu KY, Dai LG, Chiu IM, et al. Sciatic nerve regeneration by microporous nerve conduits seeded with glial cell line-derived neurotrophic factor or brain-derived neurotrophic factor gene transfected neural stem cells [J]. *Artif Organs*, 2011 (4): 363 – 372.
- [43] 张耀丹, 王晓明, 黄更珍. 周围神经损伤修复技术的研究进展 [J]. *中华损伤与修复杂志: 电子版*, 2013 (2): 210 – 213.

(2016-07-05 收稿, 2016-09-21 修回)

编辑: 吴昌学