

· 综述 ·

神经前体细胞与缺血性脑损伤

杨云凤 吴碧华

缺血性脑损伤如缺血性卒中等在临床上非常常见,它具有高发病率、高致死率、高致残率,目前已成为威胁人类健康的主要疾病之一。缺血性脑损伤过程中,神经元以坏死和凋亡为主。已有研究显示:缺血性脑损伤后可以刺激脑内神经前体细胞(neural precursor cell, NPC)的增殖、迁移、分化,并诱导 NPC 朝着梗死区域迁移。一定程度上促进损伤后神经功能的恢复。

一、NPC 的生物学特性和分布

NPC 是一类既能通过分裂增殖进行自我更新,又能迁移并分化为各种神经元和神经胶质细胞的多潜能细胞。研究发现,哺乳动物无论在胚胎发育期还是在成年,其中枢神经系统内都存在具有自我增殖和多向分化潜能的 NPC。NPC 涵盖了神经干细胞(neural stem cell)和神经祖细胞(neural progenitor cell)两个发育阶段。现已发现 NPC 不仅存在于哺乳动物胚胎期,也存在于成年动物侧脑室室管膜下区(Subventricular zone, SVZ)和海马齿状回颗粒下层(Subgranular zone, SGZ)^[1],也少量存在于大脑皮质、视网膜、纹状体和脊髓等处^[2]。在正常啮齿动物的大脑,SVZ 的细胞与沿着局部血管延伸的基膜相互作用,新生细胞通过 RMS(rostral migratory stream)链式迁移路径到达嗅球,并开始放射状的向颗粒细胞层和球旁细胞层迁移^[3],经历形态和功能演变的新生神经元形成功能性 GABA 受体并最终整合为颗粒神经元和球旁神经元。而分布于齿状回颗粒下层的 NPC 主要迁移至颗粒细胞层分化成新的颗粒细胞。

二、缺血性脑损伤后神经前体细胞的活动

正常情况下,成年哺乳动物的神经发生主要位于 SVZ 和 SGZ,表现为:SVZ 的新生神经细胞沿着 RMS 路径向嗅球定向迁移,以及 SGZ 的新生神经细胞短距离向齿状回颗粒细胞层的迁移。Iwai 等^[4]研究结果表明,大脑短暂缺血后神经的再生分为 3 个步骤:增殖、迁移、分化。

1. 缺血性脑损伤后 NPC 的增殖:缺血性脑损伤后神经细胞以坏死和凋亡为主,脑梗死后 NPC(neural precursor cells, NPCs)不断增殖是修复坏死和凋亡神经细胞的主要细胞来源。NPCs 的增殖除受细胞内基因的调控外也受外源性因素的调节,体内外研究结果显示:碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、 α -转化生长因子(TGF- α)、表皮生长因子(EGF)等具有促进 NPCs 增殖的作用。bFGF 能明显促进脑损伤后伤侧皮质、海马及室下区 NPC 增殖,并且将脑损伤后 NPC 增殖高峰由伤后 3 d 延至伤后 7 d。这表明 bFGF 具有促进 NPC 分裂增殖,延长其增殖周期的功能。Yoshimura 等^[5]在正常成年大鼠脑室内灌注 bFGF 6 d 后发现,bFGF 对相对静止 NPC 和不断增殖分裂的 NPC 均起作用,可见 bFGF 无论在正常情况下还是在损伤情况下均促进 NPC 增殖,而且 bFGF 是脑损伤后 NPCs 增殖的一个重要有效调控因子。刘俊华等^[6]对老年和成年大鼠 SVZ 神经干细胞的增殖进行了比较研究,结果显示,两年龄组大鼠在短暂性局灶性缺血后,虽然 SVZ 细胞增殖变化的时间进程是一致的,但老年大鼠 SVZ 的 BrdU 阳性细胞数明显低于成年大鼠。提示脑老化后微环境的变化可能对相关脑区神经干细胞的数量或其增殖活性有影响,证实了脑缺血后大鼠 SVZ 的神经细胞的增殖能力呈年龄相关性降低,同时新生细胞的存活、迁移、分化也有可能受到这些因素的影响。虽然已明确证实缺血性脑损伤能促进海马齿状回 NPCs 的增殖,但是具体机制还不是很明显。最近研究发现在短暂前脑缺血,早期激活的小胶质细胞可促进海马齿状回的 NPC 增殖^[7]。

2. 缺血性脑损伤后 NPC 的迁移和分化:谭新杰等^[8]研究显示成年大鼠大脑中动脉栓塞缺血再灌注可激活 NPC 的生,并诱导 NPCs 朝着梗死区域迁移,表明脑损伤可以刺激成年脑的神经发生,并且在某些情况下可以诱导新生的神经元偏离正常的迁移路线而朝着病灶区定向迁移。NPC 能够迁移是个复杂的过程,研究发现 NPC 迁移是和细胞本身、细胞微环境、一系列可扩散的化学趋化物、局部引导分子、排斥因子等因素有关。因而 NPC 迁移应具备以下条件:(1) NPC 本身具有游走能力;(2)细胞外基质有利于细胞的迁移;(3)目的脑区具有趋向性;(4)神经导向因子的参与。

NPC 是胚胎期原始细胞,在神经发育期,这些细胞在室管膜层增殖,沿放射状胶质细胞迁入目的脑区分化为神经细胞,因此成年脑 SVZ 的 NPC 具有游走的潜能。研究表明细胞外基质中黏素(tenascin, TN)、硫酸软骨素及唾液酸-神经黏附因子(poly-sialylated-neural cell adhesion molecule, PSA-NCAM)与细胞迁移密切相关。同样,趋化因子(chemokines)在定向迁移中起重要的趋化作用,SDF-1 和其受体 CXCR4 是参与其中的重要分子。而目前发现涉及导向机制的导向因子主要有 netrins、Slit2、Sema-phorins 和 Ephrins。其中 Slit 是近两年研究的热点,Slit 是第一个被发现对神经元有排斥作用的导向因子。Slit 蛋白是一种分泌性蛋白质,在果蝇、线虫、大鼠和人类等均发现 slit 基因的存在。Slit 蛋白在神经细胞迁移中的导向作用是通过跨膜受体 Roundabout(robo)实现的。而缺血性脑损伤后,NPC 的迁移是否有 Slit 因子的参与,报道的较少。Hagino 等^[9]用原位杂交

研究 Slit mRNA 是否在冷凝损伤脑表达,结果发现所有的 Slit mRNA 在病灶区均有表达,其中,Slit2 mRNA 在坏死区周围的胶质细胞表达最强烈。双标研究显示,Slit2 mRNAs 主要在胶质纤维酸性蛋白(GFAP)阳性星型胶质细胞表达。glypican-1 作为 Slit2 的高亲和受体在反应性胶质细胞内与 Slit2 共表达,因而认为它能促进 Slit2 与 Robo 的结合,并认为 Slit2 可能防止再生的轴突进入病灶中央。Fang 等^[10]通过对颞叶癫痫患者及颞叶癫痫大鼠的脑组织研究显示,颞叶癫痫患者及大鼠脑内均有 Slit2 的高表达,表达高峰在癫痫发生的 30~60 d,主要表达在神经元及星形胶质细胞,结果表明癫痫脑损伤后 Slit2 对于颞叶癫痫的发病机理及神经修复起着重要的作用,而缺血性脑损伤后脑内是否有 Slit2 的参与,及 Slit2 是否对缺血性脑损伤的神经修复有促进作用,还有待于进一步研究。谭新杰等^[8]研究成年大鼠大脑中动脉栓塞缺血再灌注后梗死灶周 NPC 的迁移特征,结果发现各个时相点的梗死灶周均可见 NPC,而梗死灶中央均未有 NPC 的存在。可能与梗死灶内的微环境不适合 NPC 的存在有关,由此可认为,缺血性脑损伤后微环境中可能出现了 Slit2 等导向因子参与而导致了 NPC 的定向迁移,但不能到达梗死区中央而最终达到梗死区细胞的完全替代。

啮齿类动物局灶性或全脑缺血均可导致 SVZ 和 SGZ 的神经再生,运用 DiI 标记室管膜、室下区细胞,采用累积式的 BrdU 标记方法标记新生细胞并通过双重免疫荧光染色确定细胞分化,发现局灶性脑缺血后,室管膜、室下区神经细胞迁移到梗死区周围并分化成神经元和星形胶质细胞,脑缺血后 SVZ 附近神经元一氧化氮合成酶(nNOS)的减少可能是促进神经细胞再生的机制之一^[11]。而缺血性脑损伤后再生神经细胞分化为神经元和星形胶质细胞,星形胶质细胞在脑缺血后异常活跃,呈反应性增生,具有修复损伤的神经元、促进轴突再生及诱导再生神经元的迁移等作用。有研究表明脑缺血后星形胶质细胞的增生具有“双刃剑”的作用^[12],既有营养神经及修复损伤神经的作用,也有神经毒性作用,因此,对于 NPC 的分化,不能忽视对星形胶质细胞活动的研究,因其利于神经的再生。

三、NPC 在缺血性脑损伤中的应用

1. NPC 在缺血性脑损伤中的移植:脑缺血是人类致死、致残最主要的征候群之一,治疗的目的在于减少神经元凋亡,促进神经元功能恢复,但这些都不能真正解决大量神经元丢失的问题。随着 NPCs 的发现和研究的深入,以其作替代疗法已经成为治疗脑缺血的新希望。缺氧缺血后 CNS 坏死的神经组织自身不可能自然恢复,内源性 NPC 虽能启动自发修复反应,但很有限,外源性 NPCs 移植可促进缺氧缺血性脑损伤后脑功能修复。体外分离和培养的大鼠大脑皮质 NPCs,在含 EGF、bFGF 和 GDNF 的神经干细胞培养基中培养,具有增殖分化的能力,为 NPC 在体外获得提供大量资源,有望应用于神经系统疾病的细胞移植治疗。有实验发现,在体外由 NPC 分化来的神经元之间可以形成有功能的突触联系,调节缺血性脑损伤中枢神经系统修复^[13-14]。将 NPCs 移植至大鼠的海马,由移植 NPCs 分化来的神经元和宿主神经元之间亦可形成功能性突触联系^[15]。因此,移植入脑内的 NPC 分化为神经元,替代海马损伤或坏死的神经细胞而重建神经通路,可能是其发挥治疗作用的机制之一,另外,海马损伤后,微环境发生变化,可能导致一些神经营养因子的表达上调。这些神经营养因子可能有助于移植的 NPC 分化和宿主细胞的整合,从而使神经再生。当然移植细胞的迁移分化、整合亦与受损的脑组织所释放的各种生物信使因子密切相关。

啮齿类动物胚胎干细胞移植至大鼠缺血区能增殖、分化和促进神经功能恢复^[16]。取自鼠海马的 NPC 移植到缺血的纹状体,也能促进神经功能的恢复^[17],来源猴胚胎干细胞的 NPC 移植到鼠缺血纹状体,能表达特异性神经标记物,可与丘脑和黑质的神经元形成突触联系^[18]。近年有研究将表达 β III-tubulin 的人 NPCs 植入鼠缺血病灶周围的大脑皮质,可定向迁移到大鼠缺血区^[19]。另一项研究显示人的 NPCs 植入沙鼠脑梗死区,可见梗死面积缩小,并改善沙鼠肢体功能障碍^[20]。这些研究说明,不同来源的 NPCs 被移植到不同部位的缺血区,在一定程度上均可促进损伤区的神经功能恢复。也进一步证实 NPCs 移植后不仅在正常发育脑组织且在缺氧缺血性脑损伤病理状态下能存活、移行、与宿主整合、分化为神经细胞并促进脑功能修复,为临床应用奠定了理论及实践基础。

2. 以 NPC 为载体基因治疗缺氧缺血性脑病:基因工程化的 NPCs 作为一种理想的移植体,不仅能够提供外源性的治疗基因产物,其特有的迁移性还能使 NPCs 靶向性地整合到宿主 CNS 病变区域的细胞结构和神经环路,从而修复脑损伤。NPCs 在移植入缺血性脑损伤区,能够是否存活,以及存活的数量,是移植成功的一个关键因素,大量实验表明,缺血性脑损伤后 bcl-2 基因家族的表达改变了迟发性神经元的死亡。Doepfner 等^[21]研究显示:利用 TAT-Bcl-x(L)转染的 NPC 植入大鼠缺血性脑损伤区,较不带有 TAT-Bcl-x(L)转染的 NPC 植入大鼠缺血性脑损伤区,可以明显促进脑功能的恢复。也有研究表明以 rAAV1-VEGF 治疗载体治疗大鼠脑梗死能减少脑梗死面积,促进神经功能恢复,能促进 SVZ 神经形成,同时促进 NPCs 定向迁移到病灶区^[22]。若将 NPC 与 rAAV1-VEGF 治疗载体同时植入坏死区周围,效果是否更好,还有待进一步研究。而值得注意的是, NPCs 移植治疗脑卒中和脑缺血有移植的时间窗问题,一般认为,在脑缺血后 3~7 d,因随着大脑缺血再灌注时间的延长,梗死灶周的 NPC 逐渐增多,并于第 7 天时达到高峰^[7],可能原因是 3~7 d 时脑损伤区释放出的生物信使因子最有利于吸引 NPCs 发生迁移和重建丢失的神经细胞,如果移植的 NPCs 在体外基因工程化而表达某种或多种营养因子、细胞因子或其他治疗性因子,就可使移植的 NPCs 不断增殖、朝需要的细胞类型分化,并和宿主神经细胞发生联系,达到完全替代坏死神经细胞的可能。

3. 重复经颅磁刺激(rTMS)通过促进 NPC 增殖治疗缺血性脑损伤:rTMS 是一种非侵入性的刺激大脑中 NPC 的方法。有研究发现运用 rTMS 治疗缺血性脑卒中患者可以明显改善患者的运动功能、语言表达能力等^[23]。尹清等^[24]研究发现 rTMS 促进脑缺血海马内源性 NPC 增殖和分化,促进神经功能的恢复,而具体机制尚不明确,而 Gao 等^[25]研究指出 rTMS 治疗缺血性

脑损伤可增加脑组织葡萄糖的代谢,抑制缺血半球的细胞凋亡。

四、问题与展望

目前 NPC 在缺血性脑损伤中应用的研究还存在以下几方面的问题:(1)在体外培养的 NPCs 在移植至人缺血性脑损伤区后如何与宿主细胞的整合;(2)NPCs 移植中的免疫排斥反应;(3)缺血损伤组织释放的各种因子有些是促进神经再生的,有些却对神经再生起到抑制作用,而这些因子之间的相互作用机制还不明确。尽管如此,诸多实验均证实 NPC 移植后可以存活、移行、分化为神经细胞,并表达神经细胞特异性表面标记物,且移植后动物神经功能有明显改善。而脑缺血灶神经元能在局部存活多长时间,并在多大程度上整合入局部的神经网络,修复作用是否与 NPC 迁移的距离有关,最重要的是绝大部分实验是通过动物来完成,至于移植至人体的 NPC 的增殖、迁移、整合及分化,还需要进一步的观察研究。以 NPC 为载体的基因治疗较单纯的 NPC 移植治疗有明显的优势,在于既可以转染外源性的营养因子促进神经 NPC 的存活、增殖、分化为神经系统的不同类型细胞,并促进与宿主细胞的整合,同时又可以转染抗凋亡基因如 bcl-2 等抑制脑细胞的凋亡,减轻神经系统的损伤及凋亡。这样其再与 NPC 多向分化潜能相结合,通过导入促生长因子基因、抗凋亡基因等目的基因,将细胞治疗和基因治疗相结合,对缺氧缺血性脑性损伤的治疗将具有更广泛的前景。对于 rTMS 治疗缺血性脑损伤是一种无创并简单的方法,其可促进缺血性脑损伤后海马内源性 NPC 的增殖,但是是否可促进内源性 NPC 定向迁移到梗死灶周围目前还没明确的报道,而在此迁移过程中是否有神经导向因子 Slit2 的参与及迁移机制也尚不明确,都有待于进一步研究。因此,只有上述问题的逐步解决,才能为治疗缺血性脑损伤疾病带来崭新途径。

参 考 文 献

- [1] Peterson DA. Stem cell therapy for neurological disease and injury. *Panminerva Med*, 2004, 46:75-80.
- [2] Kim HT, Kim IS, Lim SE. Gene and cell replacement via neural stem cells. *Yonsei Med J*, 2004, 45:32-40.
- [3] Lledo PM, Saqhatlyan A. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci*, 2005, 28:248-254.
- [4] Iwai M, Sato K, Omori N, et al. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22:411-419.
- [5] Yoshimura S, Teramoto T, Whalen MJ, et al. FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. *J Clin Invest*, 2003, 112:1202-1210.
- [6] 刘俊华, 晋光荣, 向红兵, 等. 成年和老年大鼠局灶性脑缺血后室管膜下区细胞增殖比较的研究. *东南大学学报: 医学版*, 2004, 23: 221-224.
- [7] Kim DH, Kim JM, Park SJ, et al. Early-activated microglia play a role in transient forebrain ischemia-induced neural precursor proliferation in the dentate gyrus of mice. *Neurosci Lett*, 2010, 475:74-79.
- [8] 谭新杰, 胡长林, 蔡文琴, 等. 成年大鼠局灶性脑梗死后 NPC 的迁移研究. *第三军医大学学报*, 2005, 27:2242-2244.
- [9] Hagino S, Iseki K, Zhang Y, et al. Slit and Glypican-1 mRNAs are coexpressed in the reactive astrocytes of the injured adult brain. *Glia*, 2003, 42: 130-138.
- [10] Fang M, Liu GW, Pan YW, et al. Abnormal expression and spatiotemporal change of Slit2 in neurons and astrocytes in temporal lobe epileptic foci: A study of epileptic patients and experimental animals. *Brain Res*, 2010, 1324:14-23.
- [11] Zhang PB, Liu Y, Li J, et al. Ependymal/subventricular zone cells migrate to the peri-infarct region and differentiate into neurons and astrocytes after focal cerebral ischemia in adult rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005, 25:1201-1206.
- [12] 景玉宏, 宋焱峰, 王子仁. 星形细胞在脑损伤中的双向作用. *国外医学: 脑血管疾病分册*, 2004, 12:771-773.
- [13] Cao J, Coggeshall RE, Chung JM, et al. Functional motoneurons develop from human neural stem cell transplants in adult rats. *Neuroreport*, 2007, 18:565-569.
- [14] Hou SW, Wang YQ, Xu M, et al. Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain. *Stroke*, 2008, 39:2837-2844.
- [15] Leibau S, Vaida B, Storch A, et al. Maturation of synaptic contacts in differentiating neural stem cells. *Stem Cells*, 2007, 25:1720-1729.
- [16] Wei L, Cui L, Snider BJ, et al. Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*, 2005, 19:183-193.
- [17] Zhu W, Mao Y, Zhao Y, et al. Transplantation of vascular endothelial growth factor-transfected neural stem cells into the rat brain provides neuroprotection after transient focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*, 2005, 57:325-333.
- [18] Hayashi J, Takagi Y, Fukuda H, et al. Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26:906-914.
- [19] Kelly S, Bliss TM, Shah AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:11839-11844.
- [20] Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, et al. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *J Neurosci Res*, 2004, 78:215-223.
- [21] Doeppner TR, El Aanbouri M, Dietz GP, et al. Transplantation of TAT-Bcl-x(L)-transduced neural precursor cells: Long-term neuroprotection after stroke. *Neurobiol Dis*, 2010, 40:265-276.

- [22] Li SF, Sun YB, Meng QH, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 1-vascular endothelial growth factor promotes neurogenesis and neuromigration in the subventricular zone and rescues neuronal function in ischemic rats. *Neurosurgery*, 2009, 65:771-779.
- [23] Machado AG, Baker KB, Schuster D, et al. Chronic electrical stimulation of the contralesional lateral cerebellar nucleus enhances recovery of motor function after cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 2009, 1280:107-116.
- [24] 尹清, 刘宏亮, 汪琴, 等. rTMS 促进大鼠局灶性脑缺血海马内源性神经干细胞分化的研究. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2010, 9:49-53.
- [25] Gao F, Wang S, Guo Y, et al. Protective effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a rat model of transient cerebral ischaemia: a micro PET study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010, 37:954-961.

(收稿日期:2011-02-22)

(本文编辑:戚红丹)

杨云凤, 吴碧华. 神经前体细胞与缺血性脑损伤[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(8):2339-2342.