

· 综述 ·

内源性神经干细胞与脑缺血后干细胞治疗

王学颖 余丹

脑血管疾病是当今人类死亡原因之一,其中缺血性脑血管病的发病率约占全部脑血管病的80%左右^[1]。脑血管病因其发病率、致残率及死亡率之高而成为严重的社会问题。因此如何预防和早期开展积极有效的治疗,降低缺血性脑血管病的死亡率、致残率、提高患者生活质量,成为当前一项艰巨的任务。研究发现,在人类及其他成年的哺乳动物脑内海马齿状回及室管膜下区等部位广泛存在神经干细胞^[2-3]。神经干细胞在生理状态下长期存在,具有自我更新和多向分化潜能。在脑组织损伤后,海马齿状回及室管膜下区区域的神经干细胞即会出现增殖、向损伤区域迁徙并且分化为成熟神经细胞,最终修复损伤部位^[4-5]。尽管脑缺血损伤可以促进内源性神经干细胞的增生,但缺血对神经干细胞的刺激有限,细胞的再生能力不足以满足临床需要。近年来随着对干细胞研究的深入,应用外源性神经干细胞移植治疗脑损伤的尝试取得了较大的进展,但因细胞移植治疗面临伦理的拷问、干细胞资源匮乏以及移植后的免疫排斥反应等问题而受到诸多限制。因此,如何最大程度地激发内源性神经干细胞的增生、分化,是促进脑缺血后神经功能恢复的有效途径。

一、神经干细胞概述

1. 神经干细胞的定义:1998年 Eriksson 等^[6]发现成年人脑内存在神经再生现象,由此打破了神经细胞为不可再生细胞的理论。1992年 Reynold 等^[7]和 Richards 等^[8]先后从成鼠海马中分离出神经干细胞,并将神经干细胞定义为:中枢神经系统内具有自我更新能力、可分化成神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞的多潜能细胞。

2. 神经干细胞中枢定位:研究显示胚胎脑的许多部位如大脑皮质、纹状体、小脑及海马等部位存在着神经干细胞。传统的观念认为成年人的脑内没有干细胞,神经细胞为不可再生细胞,神经细胞的损失只能由神经胶质细胞增殖来填补。但越来越多的研究发现,成年哺乳动物的脑内同样存在具有自我增生并能分化为神经元及神经胶质细胞的多能干细胞。大多数研究认为成年哺乳动物脑内的神经干细胞主要存在于两个部位即:室管膜下区与海马齿状回的颗粒下区^[2-3]。另外,有研究发现成年哺乳动物的大脑皮层、脊髓等部位也同样存在可以分化为神经元及胶质细胞的神经干细胞^[9-10]。对于脑内神经干细胞的来源问题一直存在争论, Johansson 等^[11]及 Chiasson 等^[12]的研究支持室管膜下区的神经干细胞才是神经干细胞的在脑内的真正来源。成年哺乳动物脑内的神经干细胞不仅可以通过持续的增殖、分化以补充大脑正常生理条件下因死亡而丧失的细胞,而且在中枢神经系统受到各种损伤时内源性神经干细胞可以及时的增殖、分化并迁移到损伤部位以修复损伤^[4-5],提示神经干细胞在

出生后脑的损伤修复中起着非常重要的作用。

二、脑缺血性损伤对内源性神经干细胞的影响及机制

1. 脑缺血后内源性神经再生:脑缺血性疾病一直以来威胁着人类的健康与生命,如何预防脑缺血性疾病的发生以及将其所带来的损伤最小化已成为当前研究的焦点与难点。脑缺血后的内源性神经再生的事实为脑缺血性疾病的康复治疗带来了新的希望。Sharp 等^[13]利用全脑缺血再灌注模型发现海马齿状回区的 Brdu 阳性细胞数于脑缺血再灌注后明显增加。Jin 等^[14]通过对大鼠局灶性脑缺血模型的研究也同样发现双侧大脑的海马齿状回区及脑室下区有神经干细胞的增殖,且缺血侧的脑组织神经再生明显。

2. 脑缺血损伤激活内源性神经干细胞的机制:脑缺血损伤后内源性神经干细胞的增殖、分化是一个非常复杂的过程,至今仍未清楚。研究表明细胞因子、多种神经递质及微环境等均对神经干细胞的增殖、分化起到非常重要的作用。

(1) 生长因子:研究显示生长因子参与神经干细胞的增殖、分化过程,对中枢神经系统的发育及调控起着至关重要的作用。碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)与表皮细胞生长因子(EGF)是目前研究较多的生长因子。bFGF、EGF作为一种有丝分裂原在中枢神经系统发育期和成年脑的神经发生区持续表达,它们通过细胞受体信号途径发挥着促增殖分化的作用^[15]。Galli 等^[16]研究表明白血病抑制因子(LIF)与血小板源性生长因子(PDGF)参与神经干细胞向神经元分化过程的调节。研究证实诸多生长因子如血管内皮生长因子、脑源性神经营养因子、胰岛素样生长因子等均在神经再生、分化过程中具有促进作用^[17]。

(2) 神经递质:神经递质作为一种信号分子,不仅介导神经元间及神经元与效应器间的信号传递,而且作为细胞外环境的参与者也同样参与了神经干细胞的增殖分化的调节。谷氨酸与 γ -氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统中研究较多的神经递质,研究表明两者均在神经前体细胞的增殖分化过程中起着一定的作用。Bernabeu 等^[18]研究发现谷氨酸受体拮抗剂可以使沙鼠海马齿状回颗粒下层 Brdu 阳性细胞数增加30%~90%,提示抑制兴奋性氨基酸活性可激发内源性神经干细胞的增殖。Nacher 等^[19]也发现腹腔注射谷氨酸受体拮抗剂2~7 d后,可以观察到海马齿状回颗粒下层增殖的细胞数明显增多。

(3) 炎症与细胞凋亡:脑缺血后引发一系列的炎症反应,包括白细胞的激活、黏附分子及多种细胞因子的表达增多等。炎症反应对能缺血后的神经再生也有一定的影响。Kumihashi 等^[20]研究发现,应用抗炎药物乙酰水杨酸可以减少脑缺血后海马区 Brdu 阳性细胞数的表达,说明干细胞活化可能与炎症因子COX-2及前列腺素的表达水平有一定关系。有研究应用 caspase 途径抑制剂可以降低海马齿状回区神经细胞的凋亡,促进该区神经细胞的增殖^[21]。

(4) 微环境:神经干细胞的微环境指影响神经干细胞增殖分化的周围环境,包括比邻细胞、细胞外基质等成分^[22]。其中细胞外基质成分的改变对干细胞增殖分化的影响至关重要。细胞

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.11.054

作者单位:570208 海口,中南大学湘雅医学院附属海口医院神经内科

通讯作者:余丹,Email:yudanyuyue@163.com

外基质中除含有各种糖蛋白、黏蛋白外,还包含各种生长因子、细胞因子、神经递质等。细胞外微环境对于细胞的生长分化起着决定性作用,因此有学者设想对神经干细胞的生存环境加以利用与改变将为促进内源性神经干细胞的增殖、分化及促进移植的神经细胞的存活提供新的策略。已有研究表明在体外培养的神经干细胞培养基中人为的添加或去除细胞外基质中的某些营养因子、细胞因子等,神经干细胞的增殖、分化发生了很大的改变,但细胞的微环境作为一个整体,各种因素是如何作用于神经干细胞并如何发挥作用的尚不是十分明了。

(5)基因调控:神经干细胞的增殖分化除了受到上述因素的影响外,其自身的基因调节也有着不可忽视的作用。有研究显示神经干细胞的增殖分化与其表达的多种转录因子有关,不同的转录因子对干细胞的影响也不同。神经干细胞的基因调控包括正负双向调控。负向调节因子如 HES 可以促进神经干细胞增殖抑制细胞分化,正向调控因子则促进神经干细胞的增殖而抑制其分化,其中包括 bHLH、Mash1、NeuroD、Neurogenins、Math 家族等。神经干细胞增殖分化的过程中受到不同转录因子的作用使得干细胞在分化为特定细胞之前首先被划分为不同的前体细胞区,当神经干细胞发育开始后前体细胞进一步增殖分化为特定的成熟细胞。神经干细胞的基因调节是一个非常复杂的过程,不同的信号分子、时间、空间作用于细胞将决定着细胞是增殖还是分化以及向哪类细胞分化。截止到目前,具体的基因调控机制有待进一步研究。

三、脑缺血后神经干细胞的治疗策略

神经干细胞作为一类干细胞具有自我更新及多能分化的潜能,参与脑损伤后损失神经元的再生,最终修复神经功能缺损。正是由于神经干细胞的这些特性才使得很多专注于临床工作以及基础研究的学者对干细胞治疗产生了浓厚的兴趣。目前神经干细胞用于治疗脑缺血性疾病主要有体外干细胞移植与激活自体神经干细胞增殖分化两种方法。激发自身神经干细胞的活化最终达到自身修复的目的是一种相对简便、安全的治疗方法。神经干细胞的体外移植目前各方面技术尚不完善、不成熟,仍面临着很多问题。

1. 干细胞移植治疗脑缺血性疾病的可行性及所面临的挑战:干细胞移植包括自体移植与异体移植两种途径。自体移植可以最大程度地避免免疫排斥问题,但由于自体神经干细胞数量有限,因而成为目前自体干细胞移植的最大瓶颈。异体移植来源包括胎脑干细胞、骨髓间充质细胞等。近年我国学者成功地从人类尿液中获取了神经干细胞^[23],这将为临床患者提供了一条新的干细胞移植途径。Wei 等^[24]研究发现骨髓间充质细胞移植可以促进大鼠脑缺血后血管再生及神经形成。Sakata 等^[25]应用米诺环素预处理的神经干细胞治疗脑缺血,结果显示梗死面积显著减少、神经系统功能明显改善。Chen 等^[26]通过不同途径将骨髓间充质细胞注入脑缺血模型大鼠体内,发现骨髓间充质细胞可以迁移到缺血区并分化为神经元及神经胶质细胞,并改善了神经功能。Toda 等^[27]将神经干细胞植入脑缺血模型的小鼠海马区,结果显示植入的神经干细胞存活并分化为神经元,并且改善了小鼠的认知功能。

尽管动物实验干细胞移植治疗脑缺血性疾病取得了可喜的成果,但将外源性干细胞植入人类脑内仍面临着许多现实问题:(1)脑组织移植目前仍面临着伦理道德及法律问题,因此脑缺血性疾病的干细胞治疗受到了很大的限制;(2)移植后的免疫排斥反应,异体移植的干细胞作为外来物质必然受到机体免疫系统

的攻击,这不仅给患者带来更大更多的经济及躯体负担而且还影响移植干细胞的存活,将极大地妨碍移植治疗的效果;(3)移植细胞增殖的可控性,干细胞植入后其增殖是否受机体内环境的调控^[28],是否无限制的增殖最终会不会引起肿瘤尚未得出准确的答案,但动物实验有过相关报道,Reubinoff 等^[29]将未分化的胚胎干细胞移植受试动物体内产生了恶性畸胎瘤;(4)成活率与干细胞干性的维持,脑缺血后脑内的微环境的改变及应激后产生的各种炎症因子、自由基、钙超载等不良刺激均会影响移植后干细胞的存活,即使部分干细胞存活下来,但其自我增殖与多向分化的潜能能否长期维持仍是未知;(5)靶向问题,只有移植后的干细胞能够向病灶部位迁移并分化为相应缺损的神经元才能达到预期的治疗目的;(6)移植方法与部位,目前干细胞移植的主要途径有局部注射、经脑脊液注射、经血液循环注射等。三种途径各有利弊,选择哪一种方法都会遇到一系列的问题^[30]。经脑局部注射迅速直接,但受局部微环境的影响往往移植干细胞成活率低且不利于干细胞的增殖。经脑脊液注射器缺点是干细胞分布广泛,致使干细胞定位可控性较差,疗效也相对较差。血管内注射干细胞往往会面临干细胞难于通过血脑屏障、诱发血栓等问题。

2. 脑缺血后内源性神经干细胞的激活与增殖研究:内源性神经干细胞具有来源稳定、无免疫原性、无致瘤性、可避免内环境的紊乱及治疗操作简便等特点^[31],而成为治疗脑缺血性疾病的研究热点。国内外许多学者尝试应用各种理化方法来促进脑缺血后内源性神经干细胞的增殖分化,并取得了可喜的成果。有研究应用促红细胞生成素、丙戊酸等药物治疗动物脑缺血损伤,结果显示上述药物可以促进脑缺血后神经再生及改善神经功能^[32-33]。脑缺血后的康复治疗对神经再生、重建及神经功能恢复具有积极作用,Leasure 等^[34]通过比较运动与非运动治疗对脑卒中后大鼠海马区 Brdu 阳性细胞数的影响,结果提示运动可以促进梗死侧海马区 Brdu 阳性细胞的表达、促进神经功能恢复。高压氧作为一种应用广泛的治疗脑缺血性疾病的方法,证实具有降低脑组织细胞死亡、减轻梗死体积、促进神经功能恢复等功能,其机制可能与其促进内源性神经干细胞的活化、再生有关^[35-36]。亚低温作为一种有效的神经保护方法已经得到广泛的认可,应用亚低温治疗脑缺血性疾病的研究国内外并不少见,Xiong 等^[37]研究发现亚低温治疗脑缺血大鼠可以促进大脑室管膜下区的 Brdu 阳性细胞数表达。

四、展望

脑缺血性损伤促进内源性神经干细胞的活化增殖,并促使迁移到损伤部位的神经干细胞分化为相应的神经细胞,最终修复损伤实现神经功能的恢复。尽管脑缺血可以促进内源性神经干细胞的活化,但实际上脑缺血对于干细胞再生的刺激能力有限,单靠脑缺血激活神经干细胞达到临床神经功能修复的可能性很小。那么,如何最大化的促进内源性神经干细胞的活化、增殖,维持其长期处于再生状态、并诱导其向损伤区域迁移分化成为特定功能的神经细胞等一系列问题尚需进一步的研究探讨。总之,积极寻找促进内源性神经干细胞活化增殖的治疗方法是脑缺血性疾病治疗的必然趋势及有效方法。

参 考 文 献

- [1] Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke*, 2009, 4:461-470.
- [2] Kaplan MS, Bell DH. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci*, 1984, 4:1429-1441.

- [3] Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of post-natal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*, 1965, 124: 319-335.
- [4] Rice AC, Khaldi A, Harvey HB, et al. Proliferation and neuronal differentiation of mitotically active cells following traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 2003, 183: 406-417.
- [5] Dietrich J, Kempermann G. Role of endogenous neural stem cells in neurological disease and brain repair. *Adv Exp Med Biol*, 2006, 557: 191-220.
- [6] Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 1998, 4: 1313-1317.
- [7] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, 255: 1707-1710.
- [8] Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 8591-8595.
- [9] Mehler MF, Gokhan S. Postnatal cerebral cortical multipotent progenitors: regulatory mechanisms and potential role in the development of novel neural regenerative strategies. *Brain Pathol*, 1999, 9: 515-526.
- [10] Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, et al. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, 2000, 20: 8727-8735.
- [11] Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 1999, 96: 25-34.
- [12] Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, et al. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci*, 1999, 19: 4462-4471.
- [13] Sharp FR, Liu J, Bernabeu R. Neurogenesis following brain ischemia. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, 134: 23-30.
- [14] Jin K, Minami M, Lan JQ, et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 4710-4715.
- [15] Leker RR, Soldner F, Velasco I, et al. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke*, 2007, 38: 153-161.
- [16] Galli R, Pagano SF, Critti A, et al. Regulation of neuronal differentiation in human CNS stem cell progeny by leukemia inhibitory factor. *Dev Neurosci*, 2000, 22: 86-95.
- [17] Ramasamy S, Narayanan G, Sankaran S, et al. Neural stem cell survival factors. *Arch Biochem Biophys*, 2013.
- [18] Bernabeu R, Sharp FR. NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 1669-1680.
- [19] Nacher J, Rosell DR, Alonso-Llosa G, et al. NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 2001, 13: 512-520.
- [20] Kumihashi K, Uchida K, Miyazaki H, et al. Acetylsalicylic acid reduces ischemia-induced proliferation of dentate cells in gerbils. *Neuroreport*, 2001, 12: 915-917.
- [21] Ekdahl CT, Mohapel P, Elmer E, et al. Caspase inhibitors increase short-term survival of progenitor-cell progeny in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus. *Eur J Neurosci*, 2001, 14: 937-945.
- [22] Ninkovic J, Gotz M. Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol*, 2007, 17: 338-344.
- [23] Wang L, Wang L, Huang W, et al. Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nat Methods*, 2012, 10: 84-89.
- [24] Wei L, Fraser JL, Lu ZY, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiol Dis*, 2012, 46: 635-645.
- [25] Sakata H, Niizuma K, Yoshioka H, et al. Minocycline-preconditioned neural stem cells enhance neuroprotection after ischemic stroke in rats. *J Neurosci*, 2012, 32: 3462-3473.
- [26] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2001, 32: 1005-1011.
- [27] Toda H, Takahashi J, Iwakami N, et al. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neurosci Lett*, 2001, 316: 9-12.
- [28] Boucherie C, Hermans E. Adult stem cell therapies for neurological disorders: benefits beyond neuronal replacement? *J Neurosci Res*, 2009, 87: 1509-1521.
- [29] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 399-404.
- [30] 陈涛, 田增民, 杜亚楠. 神经干细胞移植途径的理论研究进展. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13: 7947-7950.
- [31] Muraoka K, Shingo T, Yasuhara T, et al. The high integration and differentiation potential of autologous neural stem cell transplantation compared with allogeneic transplantation in adult rat hippocampus. *Exp Neurol*, 2006, 199: 311-327.
- [32] Gonzalez FF, Larphaveesarp A, Mcquillen P, et al. Erythropoietin increases neurogenesis and oligodendroglial cells of subventricular zone precursor cells after neonatal stroke. *Stroke*, 2013, 44: 753-758.
- [33] Liu XS, Chopp M, Kassis H, et al. Valproic acid increases white matter repair and neurogenesis after stroke. *Neuroscience*, 2012, 220: 313-321.
- [34] Leasure JL, Grider M. The effect of mild post-stroke exercise on reactive neurogenesis and recovery of somatosensation in aged rats. *Exp Neurol*, 2010, 226: 58-67.
- [35] Yang JT, Chang CN, Lee TH, et al. Hyperbaric oxygen treatment decreases post-ischemic neurotrophin-3 mRNA down-regulation in the rat hippocampus. *Neuroreport*, 2001, 12: 3589-3592.
- [36] Lee YS, Chio CC, Chang CP, et al. Long course hyperbaric oxygen stimulates neurogenesis and attenuates inflammation after ischemic stroke. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 512978.
- [37] Xiong M, Cheng GQ, Ma SM, et al. Post-ischemic hypothermia promotes generation of neural cells and reduces apoptosis by Bcl-2 in the striatum of neonatal rat brain. *Neurochem Int*, 2011, 58: 625-633.

(收稿日期: 2013-04-09)

(本文编辑: 戚红丹)