

文章编号:1004-0374(2005)01-0030-04

骨髓基质细胞与神经损伤和神经退行性疾病

赵玉勤^{1*}, 胡军祥²

(1 嘉兴学院医学院, 嘉兴 314000; 2 浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

摘要:骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)又名成纤维细胞样克隆形成单位(fibroblast colony-forming units, CFU-F)、间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)、间质祖细胞(mesenchymal progenitor cells, MPCs)。本文统一用BMSCs这一概念,对其生物学特性及其神经损伤修复作用进行综述。

关键词:骨髓基质细胞; 基因治疗; 神经损伤; 神经退行性疾病

中图分类号: R742; Q25 **文献标识码:** A

Bone marrow stromal cells and neural injury and neurodegenerative disease

ZHAO Yu-Qin^{1*}, HU Jun-Xiang²

(1 Medical College of Jiaxing University, Jiaxing 314000, China;
2 College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Bone marrow stromal cells(BMSCs) which are the important components to the differentiation and proliferation of blood stem cells are also called fibroblast colony-forming units(CFU-F), mesenchymal stem cells (MSCs) and mesenchymal progenitor cells(MPCs). This review focuses on the biological characteristic and the effect of BMSCs on the repairing of injured nerve function.

Key words: BMSCs; gene therapy; neural injury; neurodegenerative disease

1 BMSCs的生物学特性

BMSCs是骨髓内的非造血干细胞,属于造血干细胞分化增殖微环境的重要组成部分。自1976年Freidenstein等^[1]发现在塑料培养基上BMSCs能分化为骨和软骨以来,Prockop等^[2-3]又研究发现体外培养的BMSCs能克隆扩增并具有广泛的分化潜能。BMSCs具有与其他干细胞一样的特性:具有自我更新的能力和双向分化潜能,处在不同的微环境中能分化成多个细胞系,形成多种间充质细胞,包括成骨细胞、纤维细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞及内皮细胞等,并在多种因子的诱导下能够分化为神经细胞^[4-5]。BMSCs还具有易于获得、培养、增殖,多次传代后仍保持干细胞特性并能定向

分化为所需的神经细胞或胶质细胞,移植入体内能长期存活,诱发的免疫反应较弱等特点;具有促进胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和神经干细胞(neural stem cell, NSC)增殖、分化的作用,在神经损伤修复、基因治疗、造血重建等实验和临床研究中皆具有良好的应用前景。

1.1 BMSCs促进ESC和NSC分化为神经细胞的研究 BMSCs作为饲养层能诱导ESC大量分化为神经元, Kawasaki等^[6]研究发现从头骨BMSCs来的PA6细胞,在与小鼠ESC共培养时,90%的ESC分化为NSC,其中52%可分化为神经元, BMSCs还能定向诱导ESC分化为多巴胺能神经元^[7]。此外, BMSCs还能直接诱导NSC分化为神经元, 姜淑杰

收稿日期:2004-05-08

基金项目:浙江省自然科学基金(397045)资助

作者简介:赵玉勤(1977—),男,硕士研究生,*通讯作者;胡军祥(1956—),男,副教授。

等^[8]采用细胞共培养方式和免疫化学染色方法,发现体外培养的中脑NSC在与成年大鼠BMSCs共培养7d后,在NSC后代中神经元的比例明显高于自然分化组(38.6% ± 10.8% 20%),提示BMSCs提供的微环境可明显促进NSC分化为神经元。BMSCs提高NSC后代中神经元的比例不仅是由于促进NSC的分化,而且还能增加分化后神经元的存活率,这是BMSCs分泌可溶性因子作用于NSC所致,细胞表面分子并没有参与BMSCs对NSC的分化作用^[9],但也有人提出,BMSCs与NSC的直接接触也有利于NSC的分化。

1.2 BMSCs分化为神经细胞的研究 BMSCs在体内外均可诱导分化为神经细胞,这无疑是对其特征认识并将其应用于临床的一个重要方面。BMSCs被移植入鼠脑后能分化为神经元、星型细胞和少突胶质细胞。1999年,Kopen等^[10]将BMSCs输入新生小鼠脑内后,发现BMSCs能迁移到整个前脑和小脑,分化为星型胶质细胞和神经元。BMSCs在成年小鼠的脑内也能被诱导分化成星型胶质细胞、小胶质细胞和大胶质细胞^[11]。在患PD的小鼠或大鼠纹状体内移植BMSCs^[12-13],结果表明BMSCs在脑内可存活较长时间,随着时间的延长,迁移范围扩大并在脑内表达神经丝蛋白(neurofilament,NF-M)、神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase,NSE)、胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein,GFAP)以及多巴胺能蛋白酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase,TH),PD大鼠或小鼠的异常行为均有所缓解,说明BMSCs是治疗PD的种子细胞。将BMSCs移植到局部缺血的大鼠脑内,同样发现损伤神经的修复和部分功能的恢复^[14]。2002年,姜晓辉等^[15]的实验也证实了这一点,即在脑缺血的情况下,采用静脉移植人BMSCs能治疗缺血性脑梗塞,这与单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)利于BMSCs迁入局部缺血的脑组织微环境有一定的关系^[16]。

把BMSCs在体外事先诱导分化为神经细胞,然后进行移植,是BMSCs促进损伤神经的结构和功能恢复的又一重要途径。研究者在如何提高BMSCs分化为神经元的比例等方面进行了研究。2000年,Woodbury等^[4]将BMSCs充分分离后,经过体外诱导,发现有典型的神经元胞体和轴突长出,并表达NSE、神经元特异性核蛋白(NeuN)、NF-M和tau蛋白等,证明BMSCs在体外能转变为神经元。

Sanchez-Ramos等^[5]将BMSCs在含维甲酸(RA)、脑源性神经生长因子(BDNF)的培养基内诱导7~14d后,发现有0.5%和1%的细胞表达NeuN和GFAP。戴宜武等^[17]采用bFGF、EGF作为增殖因子,成功地使BMSCs在体外得以扩增,并应用RA、BDNF、胶质源性神经生长因子(GDNF)等作为促进BMSCs向神经细胞方向分化的诱导因子,成功地使BMSCs在体外转化为NSC和成熟的神经细胞,从而提高了BMSCs分化为神经元的比例。黄芩甙(Baicalin)对成年大鼠BMSCs具有诱导分化的作用^[18],但主要是诱导其向神经细胞方向分化,而不是神经胶质细胞。

BMSCs除移植入中枢神经系统以增加组织再生和功能恢复外,对外周神经系统的神经损伤也有恢复作用。Cuevas等^[19]对大鼠进行单根坐骨神经横断,然后用BMSCs移植,其结果与对照组相比,功能恢复的程度至少增加36%(18d)和78%(33d),并且没有出现任何的脚趾自割、感染以及浮肿现象,因而提出可能的机制是BMSCs通过产生神经营养因子及其他相关分子促进神经组织损伤后的组织修复和功能恢复。

2 BMSCs对神经损伤修复的临床应用研究

神经性疾病,如儿童常见的颅脑外伤、新生儿缺氧缺血性脑病、脑损伤及脑性瘫痪,老年人常见的中风(偏瘫)、帕金森病(Parkinson's disease,PD)、老年性痴呆症(Alzheimer's disease,AD)等,目前尚无有效的治愈方案。近年来通过细胞移植疗法,如NSC、ESC移植,已经证实对这些神经性疾病有一定的治疗效果;但是由于脑组织来源有限,并且ESC和NSC的活化增殖和分化活动等又受到诸多因素的调控,移植时所出现的免疫不相容及在宿主内的存活和伦理道德等问题,限制了脑组织移植技术的临床应用。若能从BMSCs衍生获得NSC系或直接获得神经细胞,将克服脑组织移植治疗神经性疾病中细胞来源的有限性。近年来研究表明,通过BMSCs移植可在患者自身体内分化增殖,并通过体外扩增,使患者自身能够成为神经细胞的捐献者,从而弥补NSC和ESC移植存在的细胞来源及免疫排斥等局限性,并取得了较好的治疗效果。BMSCs是细胞和基因治疗的理想靶细胞^[20],其作用的可能机制包括结构上的修复和通过分泌一些细胞因子促进神经功能的恢复。

2.1 BMSCs移植治疗 BMSCs移植疗法近年来已成

为治疗多种神经性疾病的新策略,其目的是替代、修复或加强受损的神经组织或器官的生物学功能。该疗法主要是通过激活内源性NSC使其增殖、分化并成熟,进行自我修复;或通过体外扩增、在多种因子的诱导下分化为神经细胞后移植,替代丢失、缺损的神经组织细胞;或通过移植后产生的一系列生长因子(如BDNF、NGF、HGF、VEGF、bFGF)起到神经保护或促进血管发生作用^[21],如Zhang等^[22]对体外局部缺血的海马模型进行研究,发现BMSCs能促进神经突从海马上长出并减少细胞破损,这种神经保护作用可能是通过分泌神经营养因子介导的。BMSCs移植疗法主要用于治疗病变比较局限的神经退行性疾病,如PD、Huntington舞蹈症等。

2.2 BMSCs 基因治疗 BMSCs作为基因治疗的靶细胞在国内外相关领域日益受到重视。基因治疗的途径主要有两种:活体直接转移(*in vivo*)和在体转移(*ex vivo*)。在体转移途径,即将目的基因通过载体导入靶细胞,进行基因修饰和培养,筛选出有目的基因转入并表达的细胞,再输入病人体内,已有人用NSC和雪旺细胞(Schwann's Cell, SC)作为转基因的靶细胞进行实验,证实这种方法的可行性。Akerud等^[23]将表达转基因GDNF的NSC移植到纹状体,可以持续分泌GDNF达4个月之久,NSC整合到宿主神经系统,并分化产生神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。Sayers等^[24]利用BDNF、NF-3的逆转录病毒载体转染SC,再利用SC移植治疗脊髓损伤,结果发现,大量分泌BDNF、NF-3的SC可促进运动和感觉神经纤维的再生。

目前用BMSCs进行基因治疗神经性疾病主要是在体转移途径,体内移植BMSCs对Fabry病、甘露糖贮积病、Krabbe病、糖原贮积病型等都有一定程度的治疗作用,这与BMSCs移植后能改变体内相应酶的含量有关。基于BMSCs体内移植后能改变与某些神经性疾病相关的限速酶含量,人们在基因水平上做了一些研究,提出将相应的基因(如神经营养因子、凋亡抑制因子、某些代谢酶等的基因)转入BMSCs,然后移植这些细胞到脑内,使其在脑内表达,发展BMSCs-基因治疗,这是一种可行的治疗神经性疾病的方法,它主要用于治疗病变比较弥散的神经变性病或以中枢神经系统为主要病变部位的遗传性代谢疾患。

BMSCs易于外源基因的转染和表达,如逆转

录病毒、腺病毒可介导多种外源目的基因整合到BMSCs基因组中,能长期表达,移植到体内后免疫原性较弱,BMSCs和ESC均表达组织相容性复合物,而缺乏组织相容性复合物^[25-26],并能定位于相应的组织。Schwarz等^[27]应用逆转录病毒作为载体将酪氨酸羟化酶(TH)和鸟苷三磷酸环化水解酶(GTPCH)基因联合转入BMSCs,并将其移植入PD模型的大鼠纹状体内,能检测到左旋多巴及代谢产物,大鼠的旋转行为得到改善。PD病人,除了多巴胺能神经元受损外,DA受体的功能也有一定程度的缺陷,尤其到了晚期,纹状体区多巴胺D2受体(DAD2R)的水平明显下降。因此,除了TH、GTPCH外,DAD2R、多巴脱羧酶(AADC)、BDNF和GDNF都是基因治疗PD的目的基因。对于脑缺血疾病的治疗,除了用BMSCs进行细胞移植疗法外,还研究了多种基因治疗方法,包括使用生长因子、抗程序性死亡分子和增加神经递质,如导入能表达神经元程序性死亡抑制蛋白(NAIP)的基因,能降低大鼠海马缺血的程度。

体外筛选能够稳定表达治疗基因的BMSCs,扩增鉴定后进行移植,既可以克服基因治疗中随机插入可能引起的基因突变等副作用,又保证了目的基因在BMSCs中表达的持久性和稳定性,可以达到保护和修复宿主神经通路以及重建新的神经功能目的,代表着这一研究领域的一个新的发展方向,是临床治疗神经性疾病的一条新途径。

3 问题和展望

研究BMSCs的分离纯化和生物学特性以及应用BMSCs进行神经性疾病治疗是目前该研究领域的热点之一。BMSCs治疗神经变性疾病具有诸多的优点:取材、移植方便,易于被外源基因转染,可进行自体移植减少免疫排斥反应等,而且BMSCs移植治疗PD等神经变性疾病已经在动物实验和初期临床实验中取得良好的结果,但是要将BMSCs真正应用于临床治疗并取得稳定的疗效还有很多问题有待解决:(1)关于BMSCs分化各阶段细胞的标志物还有待进一步的研究,而且如何提高BMSCs分化为神经细胞的比例也还缺少有效的方法。(2)采用BMSCs进行基因治疗还涉及到靶向性、转染效率、转染后能否持续表达以及基因表达的可控性等问题。(3)尽管研究者从不同层面对BMSCs的生物学特性进行了大量的研究,但对BMSCs的生物学表型起重要作用的基因和蛋白质以及鉴别诱导其分化为特定细胞类

型的分子信号的研究还处于刚开始阶段。(4)关于BMSCs与NSC的相互作用及调控机制也待于进一步研究。

总之,目前BMSCs治疗神经性疾病取得了很大的进展,尽管也存在一些理论和应用上的问题,但综合BMSCs的诸多特点以及细胞治疗和基因治疗的优势,利用BMSCs进行神经性疾病治疗是以后临床研究的一个趋势。

【参 考 文 献】

- [1] Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 1976, 4: 267-274
- [2] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276: 71-74
- [3] Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy*, 2001, 3(5): 393-396
- [4] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cell differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000, 61: 364-370
- [5] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, 2000, 164(2): 247-256
- [6] Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, 2000, 28: 31-40
- [7] Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, et al. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(3): 1580-1585
- [8] 娄淑杰, 顾平, 李怡, 等. 骨髓基质细胞对神经干细胞分化为神经元的影响. *中国神经科学杂志*, 2002, 18: 490-494
- [9] Lou S J, Gu P, Chen F, et al. The effect of bone marrow stromal cell on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats. *Brain Res*, 2003, 968: 114-121
- [10] Kopen G C, Prockop DJ, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(19): 10711-10716
- [11] Li Y, Chopp M, Chen J, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 1311-1319
- [12] Li Y, Chen J L, Wang L, et al. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2001, 315: 67-70
- [13] Hou L L, Zheng M, Wang D M, et al. Migration and differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in the rat brain. *Acta Physiologica Sinica*, 2003, 55(2): 153-159
- [14] Chen J L, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurosci*, 2001, 189: 49-57
- [15] 娄晓辉, 张亚卓, 孙梅珍, 等. 应用人骨髓基质细胞治疗大鼠缺血性脑梗塞的实验研究. *中华神经外科杂志*, 2002, 18: 302-305
- [16] Wang L, Li Y, Chen J L, et al. Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol*, 2002, 30: 831-836
- [17] 戴宜武, 徐如祥, 姜晓丹, 等. 体外诱导骨髓基质细胞向神经干细胞和成熟神经细胞分化的实验研究. *解放军医学杂志*, 2002, 27: 704-705
- [18] 贾延劫, 杨于嘉, 宋元宗, 黄芩武体外诱导大鼠骨髓基质细胞成为神经细胞. *中国病理生理杂志*, 2002, 18: 247-249
- [19] Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res*, 2002, 24: 634-638
- [20] Van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, et al. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2002, 2(2): 195-209
- [21] Chen X G, Katakowski M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J Neurosci Res*, 2002, 69: 687-691
- [22] Zhong C, Qin Z, Zhong C J, et al. Neuroprotective effects of bone marrow stromal cells on rat organotypic hippocampal slice culture model of cerebral ischemia. *Neurosci Letters*, 2003, 342: 93-96
- [23] Akerud P, Canals J M, Snyder E Y, et al. Neuroprotection through delivery of glial cell line derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2001, 21: 8108-8118
- [24] Sayers S T, Khan N, Ahmed Y, et al. Preparation of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3-secreting Schwann cells by infection with a retroviral vector. *J Mol Neurosci*, 1998, 10: 143-160
- [25] Saito T, Kuang J Q, Bittira B, et al. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74: 19-24
- [26] Frandrich F, Lin X, Chai G X, et al. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med*, 2002, 8: 171-178
- [27] Schwarz E J, Alexander G M, Prockop DJ, et al. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther*, 1999, 10: 2539-2549