

文章编号: 1004-0374(2009)05-0706-04

神经干细胞移植的临床研究进展

朱剑虹^{1,2,3*}, 王 璞^{1,2,3}, 沈亦雯^{1,2,3}, 陈露萍^{1,2,3}

(1 复旦大学附属华山医院神经外科, 医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200040;
2 复旦大学脑科学研究院, 上海 200032; 3 复旦大学上海医学院, 上海 200032)

摘要: 神经系统损伤会导致脑内神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的扩增以实现自我修复功能, 而通过外源细胞移植的方式来加速这一进程, 可能是一种更有效的治疗手段。当前, 神经干细胞临床研究所面临的主要问题是评价细胞在移植后的行为和功能。该文综述了近几年使用神经干细胞移植治疗几种主要神经系统疾病的临床研究成果, 并着重关注了干细胞移植后的示踪研究。

关键词: 干细胞; 神经干细胞; 移植; 干细胞示踪

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Advances of transplantation of neural stem cells

ZHU Jian-hong^{1,2,3*}, WANG Pu^{1,2,3}, SHEN Yi-wen^{1,2,3}, CHEN Lu-ping^{1,2,3}

(1 State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Department of Neurosurgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 2 Institutes of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032;
3 Shanghai Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Injuries to nervous system induce neural stem/progenitor cell proliferation in adult brain which might be an endogenous attempt to self-repair. Transplantation of stem cells into the injured brain may be a future therapeutic option to replace the lost neurons. A major challenge to the development of this strategy is to evaluate the fate of exogenous cells after transplantation. This review will focus on the progress of neural stem cell-based cell therapies for neurological diseases and pay great attention to the tracking study of implanted neural stem cells.

Key words: stem cell; neural stem cell; transplantation; clinical trial; stem cell tracking

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是继造血干细胞之后研究比较全面的另一重要系统干细胞。NSCs具有低免疫原性,能在体外大量增殖,移植后可在宿主体内长期存活并分化整合进中枢神经系统结构中,从而在解剖学和功能上修复神经系统。同时,NSCs在体外容易进行基因诱导,具有向病灶部位迁移的潜能,为治疗脑内代谢障碍引起的广泛细胞损伤提供了理论基础。目前,NSCs移植已在功能神经外科疾病、神经系统损伤、退行性疾病、肿瘤等领域开展了相关治疗研究。

1 供移植用神经干细胞的来源

用于移植的神经干细胞之所以能够对病变或受损伤的脑组织起到修复作用,主要源于它们的自我更新能力以及向多种类型神经细胞分化的潜能。按照来源的不同,目前有望用于临床移植的神经干

胞主要分为三类:胎儿/成体神经干细胞、胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)分化成的神经干细胞以及由诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)转变成的神经干细胞。

永生化细胞系NT2N(human ntera 2 neurons, 也被称为hNT细胞或LBS神经元)是临床上使用最多的人神经干细胞。它是Andrew等^[1]从人畸胎瘤中分离出来的一种胚胎癌细胞,在经过视黄醛酸处理后,可分化成类似神经元样细胞。Borlongan等^[2]将NT2N细胞移植到缺血再灌注损伤模型小鼠的脑内,发现脑功能得到显著恢复。而Hara等^[3]在移植细胞后进行了长达6个月的追踪观察,临床I期、

收稿日期: 2009-08-31

*通讯作者 E-mail: jzhu@fudan.edu.cn

II期试验结果均证明该种神经干细胞用于治疗脑部病变具有安全性。

现有研究表明,当ES细胞被暴露在含有促生长因子的合适环境中,就可以分化为神经系统的三种主要细胞——神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞^[4-6]。使用不同的信号分子和基质,就会有不同的分化结果^[7]。比较经典的是Brüstle等^[4]在诱导ES细胞分化为星形胶质细胞和少突胶质细胞时所采用的组合,主要包括了成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor 2,FGF2)、表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)和血小板源生长因子(platelet derived growth factor,PDGF)等。

iPS细胞具有和胚胎干细胞类似的功能,却绕开了胚胎干细胞研究一直面临的伦理和法律等诸多障碍,其应用前景更被看好。2008年4月,Wernig等^[8]在体外将iPS细胞高效诱导为神经前体细胞,后者经移植进入胎鼠脑组织不同区域后,可分化成胶质细胞和神经元。在此基础上,美国加州大学洛杉矶分校的科学家于2009年又首次将iPS细胞诱导分化成为了电活跃运动神经细胞(electrically active motor neurons)^[9]。上述两项研究结果展示了利用多能干细胞分化的神经细胞及其祖细胞取代疾病患者受损或死亡神经细胞的可行性。

2 神经干细胞治疗神经系统疾病

神经系统疾病涉及脑、脊髓、颅神经、周围神经、神经根、自主神经系统、神经肌肉接头和肌肉等器官组织的异常病变。研究显示,一旦疾病发生,病灶附件的神经干细胞将会迅速扩增并迁移以实现自我修复^[10]。针对这一特点,人们开始尝试从外部去促进或启动该进程。干细胞移植即是近年来兴起的一种通过外部手段扭转脑卒中或其他神经系统疾病的治疗方式。到目前为止,人们已先后在动物及人身上开展了多项有关该方法治疗神经系统疾病的研究。

2.1 神经干细胞治疗脑卒中 在全球范围内,脑卒中都是致死和致残的主因之一。尽管人们已对其进行了长达40余年的调查和研究,但直到现在也还没有一种真正有效的疗法可对抗由脑卒中引起的脑损伤和神经功能障碍。正因为如此,人们较早地就将细胞疗法运用于脑卒中患者。Kondziolka等^[11]对12位缺血性脑卒中患者进行NT2N细胞移植的临床I期试验,未发现有任何副作用。紧接着,该课题组又开展临床II期试验,在一组包含18位脑卒中患者的试验中,研究者再次证实了细胞移植的安全性,

但患者在接受细胞移植后其神经功能的恢复程度不够显著^[12]。不过,另外两个从事类似研究的课题组却相继报道了正面的消息,他们通过长达4年的随访,不仅发现接受过细胞移植的患者神经功能随时间呈现逐步恢复的趋势,还证明异体干细胞也可用于修复受损神经^[13,14]。基于上述结果,“干细胞移植是安全的”这一观点开始被人们所接受。

2.2 神经干细胞治疗帕金森病(Parkinson's disease, PD) 早期开展的帕金森病临床移植治疗主要采用与病变有直接关联的正常神经组织来作为移植物,包括腹侧中脑组织^[15]、黑质^[16]、纹状体^[17]等。然而,这类组织多来源于胚胎,存在严重的道德和宗教问题,且移植的胎儿脑组织细胞在患者脑内的存活率非常低^[18],故研究者逐渐将目光转向了成分更清楚的干细胞。2006年,Yasuhara等^[19]应用立体定向技术将带有GFP标记的人永生神经干细胞系HB1.F3移植进帕金森大鼠模型受损纹状体中,结果表明,移植的干细胞可通过对抗多巴胺能的耗竭起到保护神经的作用。2007年,Redmond等^[20]将人神经干细胞移植到猴子脑内,发现一小部分干细胞分化为了酪氨酸羟化酶(TH)和(或)多巴胺转运蛋白(DAT)阳性细胞,而这两种物质被认为与多巴胺的生物合成密切相关,这表明外源细胞可与宿主发生交互作用,并促进受损脑组织的功能恢复。

到目前为止,在所有的干细胞移植临床试验中,针对帕金森病的治疗被证明是最“有效”的。Tian等^[21]曾应用神经干细胞移植治疗50例PD患者,术后随访8—30个月(平均24个月),有效率为92%,未见明显的免疫排斥反应。在充分进行过动物实验后开展临床治疗研究被认为是可行且具有一定效果的。

2.3 神经干细胞治疗癫痫 癫痫的电生理本质是脑部神经元阵发性异常放电^[22]。目前有许多科学家投身于癫痫研究,这缘于癫痫的发病机理涉及了遗传、生化、基因、免疫以及小分子物质等多方面因素,对它的深入研究有助于我们从更深层面认识神经系统疾病,也为细胞疗法运用于疾病治疗打开新的“入口”。

2002年,Kim等^[23]将胎儿神经干细胞在体外培养成多巴胺神经前体组织后植入6-羟基多巴胺受损小鼠的纹状体中,发现外源细胞不仅表现出了与内源细胞相似的电生理特征,还可在局部改善多巴胺能神经元功能。这是国际上首例神经干细胞治疗癫痫的动物实验。2005年,Ruschenschmidt等^[24]将表达绿色荧光蛋白(GFP⁺)的神经祖细胞从大脑两侧

移植进癫痫模型小鼠的海马区内, 13 — 34 d 后, 细胞在移植处形成集群并广泛侵入宿主大脑。电生理检测发现, 超过 80% 的移植细胞接收到了来自于周围细胞的突触传入 (synaptic input) 信号, 这表示原受损部位在接受干细胞移植后, 其活力和功能得到了一定程度的恢复。2009 年, Maisano 等^[25]将神经祖细胞移植进颞叶癫痫 (temporal lobe epilepsy, TLE) 模型小鼠大脑的不同区域, 通过对在存活、迁移和整合等事件中细胞形态和特征因子表达情况的检测, 寻找出了诸如 γ -氨基丁酸 (GABA) 等抗惊厥相关小分子。这标志着人们可以在了解了疾病发生机理的基础上开始有针对性进行细胞治疗。

2.4 神经干细胞治疗颅脑创伤 到目前为止, 医学界对于严重颅脑损伤所致的永久性神经功能障碍尚无有效的治疗手段。本课题组一方面从开放性脑外伤破碎的脑组织中分离出神经干细胞, 在体外培养扩增至满足移植所需数量, 为神经干细胞提供新的来源; 另一方面通过对猴动物模型的临床前期研究发现, 颅脑创伤后 25 — 45 d 移植的神经干细胞在损伤区存活的几率最大, 据此提出神经干细胞移植的时间窗理论, 为临床神经干细胞移植提供治疗时机的选择。为研究成人神经干细胞移植后新产生的神经元是否具有电生理功能, 我们使用 GFP 基因标记成人神经干细胞, 在移植体内 4 个月后进行移植区脑片的膜片钳检测, 从而记录到 GFP 阳性神经细胞的动作电位和 Na^+ 、 K^+ 电流, 并利用免疫电镜观察到外源神经干细胞和宿主细胞间形成突触的情况。

采用自体移植可以避免由免疫系统引起的排斥反应, 且移植的细胞来源于同一个体, 细胞相容性好、存活时间长, 且更易迁徙并产生细胞间联系。因此, 我们在严格的伦理监督下, 经过完善的体内外安全性观察后, 对开放性颅脑创伤患者进行了自体神经干细胞移植治疗, 同时以损伤情况相似的患者作为对照, 设置了对照研究。在 2 年的随访过程中, 我们通过正电子发射 CT (PET)、功能磁共振 (fMRI)、运动诱发电位 (MEP) 等客观方法评价, 发现自体移植神经干细胞可促进患者损伤区代谢和功能恢复^[25]。

3 干细胞移植后的示踪研究

干细胞应用于临床须确保安全、可靠、有效, 这就要求将干细胞用于临床移植治疗时, 最好能够无创性示踪移植细胞在体内的行为和功能。为了体内示踪干细胞, 在动物实验可通过体外标记的荧光染料, 胸腺嘧啶类似物 (BrdU)、转基因 (如 *LacZ* 基

因、*Luc* 基因、绿色荧光蛋白 GFP) 或免疫组织化学等方法来评估干细胞在动物体内的命运, 但这些方法显然无法使用在临床活体研究中。

近年来, 纳米材料技术和分子影像技术的发展为在体内观察干细胞的行为提供了可能, 通过磁微粒、放射性核素、量子点等非侵袭性分子成像技术观察干细胞在体内的生存、迁移、分化和功能已先后被人们所研究和应用^[27, 28]。本课题组率先开展了纳米磁粒子标记神经干细胞脑内移植后的临床示踪研究。MRI 检测结果说明, 实体观察神经干细胞在人脑内的迁徙运动是可能的^[29]。这是首次实现干细胞临床移植后的无创性观察, 为开展移植后疗效评价提供了依据。美国麻省理工学院 Langer 教授评价说, Zhu 等^[29]报道的纳米超顺磁氧化铁粒子 (SPIO) 标记干细胞治疗神经性疾病的临床研究, 也可用来评价干细胞治疗, 诸如心肌梗塞等其他疾病的效果^[30]。此外, 磁共振分子影像标记示踪研究的一个关键问题就是要找到一种具高度弛豫的且对磁共振信号有很大影响的 MRI 对比剂。我们使用的 SPIOs 是超顺磁性的, 并可在比自身大得多的范围内改变磁场的均匀性^[31], 故能获得良好的示踪结果。我们发现, 利用磁性纳米粒子标记人神经干细胞并不影响细胞本身的生存、迁移和分化能力或改变神经元电生理特征, 移植的人神经干细胞对周围环境信号有响应, 并会按部位特异性进行定向分化。我们还研究了局部注射和静脉系统给予等不同移植途径对干细胞组织功能重建的影响^[32]。简言之, 无创性干细胞示踪技术的应用将指引今后临床干细胞移植策略。

4 小结和展望

近年来, 神经干细胞相关领域的研究迅速发展, 其主要成果有: (1) 明确了与胚胎干细胞相关联的神经干细胞的演化特性; (2) 了解了成体神经干细胞静息与激活的机制; (3) 了解了脑、脊髓损伤、神经退行性疾病中神经干细胞的自身调节机制; (4) 验证了使用神经干细胞干预措施的临床效果; (5) 证明了实体示踪观察神经干细胞在人脑内迁徙运动的可能性。

因不同的干细胞体内移植途径和技术可显著改变其在体内的功能和生物学行为, 故对干细胞体内移植和识别关键技术的研究将有力推动干细胞的应用步伐。观察干细胞移植后在人体内的分布以及疾病时的变化, 追踪干细胞移植于人体后细胞命运的转化、在体内修复进程中的迁徙和功能整合, 这些技术将构建起未来再生医学技术平台的重要组成部分。

分, 并推动形成再生医学一个新的分支学科——临床干细胞移植示踪学。虽然神经干细胞的临床研究还处于婴儿期, 但其研究和应用已经为人脑再生医学开辟了新的路径, 这些研究的深入将推动临床干细胞应用科学的进一步发展。

[参 考 文 献]

- [1] Andrew M, Wertkin R, Scott T, et al. Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular β -amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 9513-7
- [2] Borlongan CV, Tajima Y, Trojanowski JQ, et al. Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp Neurol*, 1998, 149: 310-21
- [3] Hara K, Yasuhara T, Maki M, et al. Neural progenitor NT2N cell lines from teratocarcinoma for transplantation therapy in stroke. *Prog Neurobiol*, 2008, 85: 318-34
- [4] Brüstle O, Jones KN, Learish RD, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, 1999, 285: 754-6
- [5] Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, et al. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci*, 1995, 108: 3181-8
- [6] Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 1134-40
- [7] Goetz AK, Scheffier B, Chen HX, et al. Temporally restricted substrate interactions direct fate and specification of neural precursors derived from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11063-8
- [8] Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 5856-61
- [9] Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells*, 2009, 27: 806-11
- [10] Park DH, Eve DJ, Musso J, et al. Inflammation and stem cell migration to the injured brain in higher organisms. *Stem Cells Dev*, 2009, 18: 693-702
- [11] Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology*, 2000, 55: 565-9
- [12] Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L, et al. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg*, 2005, 103: 38-45
- [13] Savitz SI, Dinsmore J, Wu J, et al. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc Dis*, 2005, 20: 101-7
- [14] Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*, 2005, 57: 874-82
- [15] Lindvall O, Brundin P, Widner H, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science*, 1990, 247: 574-7
- [16] Olanow CW, Kordower J, Freeman T. Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 1996, 19: 102-9
- [17] Dunnett SB, Carter RJ, Watts C, et al. Striatal transplantation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Exp Neurol*, 1998, 154: 31-40
- [18] Hagell P, Schrag A, Piccini P, et al. Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain*, 1999, 122: 1121-32
- [19] Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, et al. Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2006, 26: 12497-511
- [20] Redmond DE Jr, Bjugstad KB, Teng YD, et al. Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12175-80
- [21] Tian ZM, Liu S, Li SY, et al. Clinical transplantation of human neural stem cells in treatment of Parkinson disease. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2003, 24: 957-9
- [22] Mathern GW, Pretorius JK, Babb TL. Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures. *J Neurosurg*, 1995, 82: 220-7
- [23] Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 2002, 418: 50-6
- [24] Ruschenschmidt C, Koch PG, Brüstle O, et al. Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats. *Epilepsia*, 2005, 46: 174-83
- [25] Maisano X, Carpentino J, Becker S, et al. Embryonic stem cell-derived neural precursor grafts for treatment of temporal lobe epilepsy. *Neurotherapeutics*, 2009, 6: 263-77
- [26] Zhu J, Wu X, Zhang HL. Adult neural stem cell therapy: expansion *in vitro*, tracking *in vivo* and clinical transplantation. *Curr Drug Targets*, 2005, 6: 97-110
- [27] Choi J, Costa ML, Mermelstein CS, et al. MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 7988-92
- [28] Chang CF, Chen CY, Chang FH, et al. Cell tracking and detection of molecular expression in live cells using lipid-enclosed CdSe quantum dots as contrast agents for epifluorescence microscopy. *Optics Express*, 2008, 16: 9534-49
- [29] Zhu J, Zhou L, Xing Wu, et al. Tracking neural stem cells in patients with brain trauma. *N Engl J Med*, 2006, 355: 2376-8
- [30] Ferreira L, Karp JM, Langer R, et al. New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, 3: 136-46
- [31] Guzman R, Uchida N, Bliss TM, et al. Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10211-6
- [32] Wu X, Hu J, Zhu J, et al. *In vivo* tracking of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-labeled mesenchymal stem cell tropism to malignant glioma using magnetic resonance imaging. *J Neurosurg*, 2008, 108(2): 320-32