

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.009.html>

◇综述 ◇

诱导多能干细胞治疗颈节段脊髓损伤的研究进展

杨超 综述 申才良 审校

摘要 目前脊髓损伤患者中以颈节段脊髓损伤为主。急救医学的发展使脊髓损伤患者生存率增加,但呼吸和运动功能恢复较差使患者生活质量没有明显提高,因此迫切需要的治疗方法旨在改善症状和恢复功能。目前治疗脊髓损伤方法包括增加机体再生能力、增强免疫调节因子、促进机体轴突再生及经椎管内移植干细胞。诱导多能干细胞来源于体细胞重编程,具有多能性且可以克服其他细胞的缺点,如间充质干细胞、胚胎干细胞等。本文将对诱导多能干细胞治疗颈部脊髓损伤最新进展进行综述。

关键词 脊髓损伤; 诱导多能干细胞; 间充质干细胞; 胚胎干细胞

中图分类号 R 681.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)02-0323-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.036

脊髓损伤是一种严重危害人类健康的疾病。原发创伤导致脉管系统的破坏、呼吸困难、神经性休克、炎症及离子和神经递质水平的改变,随后导致机体进入继发性损伤期^[1]。临幊上颈部脊髓损伤患者占脊髓损伤的大部分比例,但80%脊髓损伤实验均选择胸正中节段损伤模型进行研究^[2]。虽然两者在病理生理学水平上很相似,但治疗方法和功能恢复则不尽相同。在解剖学方面,颈节段损伤的特征是白质中上行和下行轴突束的离断以及灰质中实质细胞的丢失;而在胸节段中损伤仅涉及白质。这表明胸、颈节段损伤引起的运动功能障碍不完全相同。van Hedel et al^[3]报道C5/C6损伤患者经修复可以明显改善运动功能,而单一胸节段损伤修复可能达不到上述良好效果。有研究^[4]表明胸节段损伤模型不能完全替代颈节段损伤模型。因此颈部脊髓损伤研究和治疗有其特殊性。

脊髓损伤传统的治疗包括激素治疗和手术治疗。激素治疗中的甲强龙最初应用于临床^[5],但之

2017-11-14 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472088)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院骨科, 合肥 230022

作者简介: 杨超, 男, 硕士研究生;

申才良, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: shencailiang1616@163.com

后又有许多学者对其效果产生争论^[6]。手术治疗虽可以减轻脊髓损伤的早期压迫,有效防止继发性损伤,但治疗效果有限^[7]。现在生物治疗逐步发展,在一些动物实验和临床实验中,经细胞移植治疗脊髓损伤法可以改善损伤微环境、提升再生能力及阻止病变进一步恶化^[8]。近十年来,移植神经元和神经胶质细胞的治疗方法取得了巨大进展并且一些已应用于临床。最近,诱导多能干细胞成为国内外研究的热点,该文将综述诱导多能干细胞治疗颈节段脊髓损伤的最新进展。

1 干细胞移植治疗

1.1 背景 干细胞是一类具有自我复制能力的多潜能细胞,在特定的生理条件下可以分化成特定的细胞系谱。胚胎干细胞是从早期胚胎或原始性腺中分离出来的一类细胞,具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特征。间充质干细胞主要来自于骨髓、脂肪组织、脐带组织及臼齿等部位,具有多向分化潜能。诱导多能干细胞是体细胞经重编程得到的类似胚胎干细胞的细胞,具有多能性。各自优缺点见表1。

1.2 MSCs 和 ESCs 移植治疗的研究现状 MSCs 和 ESCs 在脊髓损伤动物模型中疗效显著,临床治疗效果尚在探索。MSCs 表达 CD73、CD90 和 CD105, 缺乏表达 CD14/CD11b、CD79、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR 表面标记,具有多分化潜能。体外实验和动物实验表明 MSCs 可以降低谷氨酸兴奋毒性、炎细胞因子以及相关蛋白水平,从而保护神经元^[9]。抑制嗜中性粒细胞黏附和浸润,分泌神经营养因子,增强少突胶质细胞和髓鞘的再生。目前 MSCs 移植已用于临床实验,在神经、心血管及免疫疾病研究中安全性得到了证实^[10]。在颈部脊髓损伤中,移植的 MSCs 多数取自于髂骨骨髓。在颈部和胸部脊髓损伤模型中, MSCs 的移植治疗会改善炎症、细胞凋亡、瘢痕形成,增加轴突再生、血管生成^[11]。临床胸部脊髓损伤的研究中,自体骨髓经静脉或动脉移植的安全性得到肯定,但运动和感觉功

表1 几种干细胞移植的优缺点

类别	优点	缺点
间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)	多能性, 分泌营养因子, 改善微环境, 诱导其他细胞分化, 桥接损伤处轴突, 自体移植克服伦理问题	增殖分化调控困难, 外源移植具有免疫源性, 本身修复能力有限
胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)	全能性, 具有形成三胚层衍生物的能力, 可高度未分化增殖	受道德约束, 有致瘤风险
诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)	多能性, 克服伦理问题, 良好生存能力, 无致瘤性	效率低下, 保留表观遗传记忆, 难以施于临床

能的改善是否由于移植导致的尚没有定论。值得注意的是人类脐带血是丰富的成体干细胞来源,这种干细胞来源也引起中风、创伤性脑损伤和脊髓损伤研究者的关注。临上有研究^[12]显示1例脊髓损伤患者用取自于脐带血的MSCs在病损处进行移植,最后患者腰部知觉和运动功能得到了改善。

ESCs取自于囊胚,且具有发育全能性和能发育成三胚层衍生的能力。颈部脊髓损伤模型中,从大脑和脊髓组织取出的整个胚胎脊髓或脊髓神经祖细胞作为移植物,移植细胞可存活并分化成神经元细胞,使脊髓损伤模型的运动功能得到明显改善^[13]。值得注意的是胸脊髓损伤和肌萎缩性侧索硬化症模型中此移植方法效果良好;临上有把来自胚胎组织的神经干细胞移植到颈胸部脊髓损伤部位,结果显示安全性和有效性显著^[14]。除了移植胚胎组织,部分研究者把ESCs衍生的不同系谱移植入颈脊髓损伤部位。Sharp et al^[15]把人ESCs衍生的少突胶质祖细胞移植到颈脊髓中线严重挫伤的大鼠模型中。移植使损伤部位缩小、白质和灰质得到补充、运动神经元得到保护,前肢功能得到改善。Sun et al^[16]使用人ESCs派生的少突胶质祖细胞进行治疗4个月后辐照颈节段损伤鼠模型,发现髓鞘脱失减少和前肢运动功能改善。此外移植细胞可以分化成为成熟表达髓磷脂碱性蛋白的少突细胞表型。

1.3 MSCs 和 ESCs 移植治疗的潜在缺点

MSCs 可取自成人体细胞,体外培养快且基因稳定。它们有独特的免疫调节和生长因子分泌功能。MSCs 的增殖分化需要一定的条件控制,目前研究者对其控制还十分困难。临床允许自体移植,因此可以避免使用免疫抑制剂,但它们不能完全替代脊髓损伤丢

失的细胞。MSCs 可塑性较 ESCs 差,有证据表明移植后 MSCs 整合到病损部位效果差,机体功能恢复仅是稍有改善^[17]。

ESCs 取自于胚泡或胎儿组织受到社会道德约束,因此临床运用会受到限制。虽然可以用 ESCs 更多的成熟细胞类型来抑制部分不良的移植后果,但移植未分化细胞群仍会有潜在形成肿瘤的风险。有研究^[18]表明,细胞分化产生的细胞核型异常和基因扩增会导致肿瘤形成。因此使分化规范化并创建明确的细胞群有助于减少肿瘤形成的风险。

理想的细胞类型应该结合 MSCs 和 ESCs 的优点而避免缺点。

2 iPSCs 疗法

2.1 iPSCs 优点及缺点

诱导多能干细胞由成人体细胞重编程而形成。后来证明诱导多能干细胞可以用小鼠成纤维细胞(后来使用成人成纤维细胞)诱导得到,其过程用病毒载体将4个转录因子(Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc)的组合转入分化的体细胞中,但过程仍有许多风险,如插入诱变、转基因复活、不完整切片和克隆变异。

有研究^[19]表明 iPSCs 和 ESCs 转录不同是由于特定的启动子与重组因子关系和不同的遗传背景导致。相同之处则在于 ESCs 和 iPSCs 在分子和功能上等价,因为它们存在相同的形态、基因标记、表达、线粒体属性和致瘤性^[20]。

从成人体细胞创建多能干细胞规避了使用 ESCs 和 MSCs 的道德障碍,同时细胞可以直接取自患者,从而避免使用免疫抑制剂;此外美国和日本大力推进建立全球捐赠者体细胞 iPSC 谱,这些体细胞纯合子几个基因位点与患者个体 HLA 类型匹配,从而使移植无需使用免疫抑制剂;虽然 iPSCs 有许多优点,但目前使用仍存在许多问题,在临床脊髓损伤患者中,最理想的移植时间是伤后2~4周,但 iPSCs 形成神经系谱却至少需要4~6个月^[21]。目前仍有关于 iPSCs 是干细胞的争论,有研究^[22]显示其保留组织来源的“记忆”,从而影响分化和最后表型。iPSCs 技术正处于起始阶段,许多问题亟待解决。

2.2 诱导多能干细胞的分化模式

目前研究的热点是 iPSCs 生成功能神经元和神经胶质细胞的规律以及神经元和神经元网络在健康和受损部位的差异。在第一种模式中,人类 iPSCs 通过外源模式分子向神经上皮系分化。有丝分裂原促进形成星形胶质祖细胞,此后无功能的星形胶质祖细胞通过纤毛

神经营养因子分化成有功能的星形胶质细胞^[23]。在第二种模式中,通过表达 Sox10、Olig2 和 zfb536 使小鼠和大鼠成纤维细胞直接重编程为少突胶质细胞前体^[24]。有研究^[25]报道当移植诱导多能干细胞进入小鼠大脑创建神经元时,神经元素 2 快速表达并且有效地把诱导多能干细胞转化成神经元,而这些神经元则自发形成突触网络。另有研究^[26]报道成人成纤维细胞通过 miR-124, BRN2 和 MYT1L 可以直接被重组成功能性神经元并形成突触。也有其他研究^[27]表明 iPSCs 可以衍生具有谷氨酸能、GABA 能和视网膜神经细胞表型。上述研究提供了新的移植治疗理论和治疗神经病理疾病方法。

目前已经有动物实验研究将 iPSCs 技术和分化策略使用于体内和体外疾病模型。

2.3 使用 iPSCs 技术治疗颈节段脊髓损伤 急性损伤模型与慢性脊髓损伤患者状况存在差异。 Nutt et al^[28] 使用大鼠建立了早期慢性损伤模型,C4 脊髓节段挫伤 4 周后,在大鼠损伤脊髓内移植 iPSCs 诱导的神经祖细胞和神经母细胞。移植 8 周后,标记的 NeuN/FOX-3 显示部分移植的细胞分化成成熟的神经元,大鼠抓持和负重功能得到改善。

Li et al^[29] 在脊髓损伤模型中移植了由 iPSCs 形成的星形胶质细胞,并对呼吸功能的变化进行了评估,此研究中大鼠和小鼠都接受了 C4 脊髓挫伤处理,使动物慢性功能紊乱和膈肌运动神经元发生退化,并且损伤后立即在损伤部位进行移植。损伤移植后 2 d、2 周和 4 周分别检测移植细胞存活和分化成的星形胶质细胞(GFAP 阳性),没有发现任何致瘤组织且增生低于 10%。过度表达 GLT1 的星形胶质细胞移植后,病变面积和总损伤体积减少并保护了膈膜神经接点的分布。通过分析自发 EMG 活动说明 GLT1 过度表达的星形胶质细胞可以显著增加背部膈肌肌电图振幅,表明移植对腹式呼吸功能存在保护作用。

Lu et al^[30] 在 C5 节段半切的大鼠模型中检测 iPSCs 生成神经干细胞(neural stem cells, NSCs) 的移植效果,移植 3 个月后检测发现移植细胞存活并分布在整个损伤区域,多数移植细胞表达 NeuN(神经特定核标记),成熟神经元标志物 MAP2 和 Tuj1 和成熟星形细胞标志物 GFAP 同时表达,这表明细胞已分化成神经元和星形胶质细胞。此研究中也有部分证据说明移植细胞表达 ChAT 和 Ki67(移植细胞的增殖效应),同时也显示了虽然宿主轴突延伸到病变部位,但行为功能恢复不明显。

Kobayashi et al^[31] 以非人类灵长类动物颈脊髓损伤为模型,对 iPSCs 形成的神经干细胞移植的安全性和有效性进行检测。成年女性狨猴 C5 水平受到轻微挫伤 9 d 后经椎管给猴损伤中心注入 iPSCs 形成的神经元。移植 12 周后,经伊红染色显示移植细胞存活并且分化成 3 个神经亚型(NeuN、GFAP、Olig1);在移植动物身上未发现任何致瘤性。在移植组和对照组损伤部位周围有严重的脱髓鞘病变,而在对照组 12 周后有更高程度的髓鞘脱失。常规 MRI 和髓鞘成像发现移植组存在更多生发髓鞘,而对照组髓内病变处则存在高强度信号区域。此实验中发现两组血管生成量增加;参与脊髓疼痛机制的降钙素生成纤维在移植组和对照组没有差异;移植组中 C5 水平损伤导致的四肢瘫痪逐渐改善。此外移植后 8 周两组间四肢运动功能恢复差异有统计学意义。

从目前动物颈节段脊髓损伤模型中发现 iPSCs 的治疗效果肯定,但缺乏临床案例,仍需进一步探索。

3 存在的问题与展望

现代医学逐步发展使脊髓损伤患者生存率增加,但治疗后呼吸和运动功能恢复较差导致患者生活质量没有明显提高。目前治疗的主要目的是恢复功能让患者可以生活自理。细胞移植治疗主要通过供体分泌的营养和免疫因子来提高细胞再生能力,替代丢失的神经细胞和神经胶质细胞。MSCs 和 ESCs 移植对脊髓损伤修复疗效肯定,但是这些细胞由于各种原因导致难以应用于商业和临床。MSCs 修复能力有限,ESCs 受道德约束且携带核型异常有致瘤风险,而 iPSCs 克服了以上细胞的缺点,但诱导方法也有其缺点,如效率低下、难以实施于临床、可能保留一个表观遗传记忆。此外 iPSCs 主要形成的是神经祖细胞,这类细胞有良好生存能力,但它们移植时通常是混合群,一旦移植,分化和表型都超出了实验者的控制,因此这限制了该细胞移植的临床实施。iPSCs 技术包括了疾病建模、再生医学、发展生物学的观点。目前研究模型主要是大鼠,仅 1 例以非人类灵长动物为模型。研究均表明移植细胞可存活、能分化为成熟神经元、减少损伤面积和体积、增加血管生成、无致瘤性等特点。由于 iPSCs 技术在颈脊髓损伤应用的案例较少,所以很难预测哪些因素能提高移植疗效。在评价功能恢复时,选择合适的动物模型、移植时机、移植细胞类型并使用行为评

估十分重要。随着研究者对 iPSCs 认识及在移植调控方面研究的不断深入,iPSCs 在脊髓损伤修复中的应用前景将十分广阔。

参考文献

- [1] 杜宁陈志申才良等. 神经干细胞静脉移植对大鼠脊髓损伤的修复作用[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(11): 1688-90.
- [2] Tetzlaff W ,Okon E B ,Karimi-Abdolrezaee S ,et al. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma* 2011 ,28(8): 1611-82.
- [3] van Hedel H J ,Curt A. Fighting for each segment: Estimating the clinical value of cervical and thoracic segments in SCI[J]. *J Neurotrauma* 2006 ,23(11): 1621-31.
- [4] Friedli L ,Rosenzweig E S ,Barraud Q ,et al. Pronounced species divergence in corticospinal tract reorganization and functional recovery after lateralized spinal cord injury favors primates[J]. *Sci Transl Med* 2015 ,7(302): 302ra134.
- [5] Cheng H ,Cao Y ,Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* ,1996 ,273 (5274): 510-3.
- [6] Coleman W P ,Benzel D ,Cahill D W ,et al. A critical appraisal of the reporting of the National Acute Spinal Cord Injury Studies(II and III) of methylprednisolone in acute spinal cord injury [J]. *J Spinal Disord* ,2000 ,13(3): 185-99.
- [7] Fehlings M G ,Perrin R G. The timing of surgical intervention in the treatment of spinal cord injury: a systematic review of recent clinical evidence[J]. *Spine* ,2006 ,31(11 Suppl): S28-35; discussion S36.
- [8] Donnelly D J ,Phillip G P. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol* ,2008 ,209(209): 378-88.
- [9] Lu P ,Hong Y ,Jones L ,et al. Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. [J]. *Neurosci* 2004 ,24(28): 6402-9.
- [10] Parekkadan B ,Jack M M. Mesenchymal stem cells as therapeutics [J]. *Annu Rev Biomed Eng* 2010 ,12(1): 87-117.
- [11] White S V ,Czisch C E ,Han M H ,et al. Intravenous transplantation of mesenchymal progenitors distribute solely to the lungs and improve outcomes in cervical spinal cord injury [J]. *Stem Cell* ,2016 ,34(7): 1812-25.
- [12] Kang K ,Kim S W ,Oh Y H ,et al. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: A case study[J]. *Cytotherapy* 2005 ,7(4): 368-73.
- [13] Ruff C A ,Wilcox J T ,Fehlings M G. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury [J]. *Exp Neurol* ,2012 ,235(235): 78-90.
- [14] Giusto E ,Donegù M ,Cossetti C ,et al. Neuro-immune interactions of neural stem cell transplants: From animal disease models to human trials[J]. *Exp Neurol* ,2014 ,260(5): 19-32.
- [15] Sharp J ,Frame J ,Siegenthaler M ,et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after cervical spinal cord injury [J]. *Stem Cells* ,2010 ,28 (1): 152-63.
- [16] Sun Y ,Xu C C ,Li J ,et al. Transplantation of oligodendrocyte precursor cells improves locomotion deficits in rats with spinal cord irradiation injury [J]. *PLoS One* ,2013 ,8(2): e57534.
- [17] Sandner B ,Ciatipis M ,Motsch M ,et al. Limited functional effects of subacute syngeneic bone marrow stromal cell transplantation after rat spinal cord contusion injury [J]. *Cell Transplant* 2016 ,25 (1): 125-39.
- [18] Mayshar Y ,Ofra Y ,Nissim B. Teratogen screening using transcriptome profiling of differentiating human embryonic stem cells[J]. *J Cell Mol Med* 2011 ,15(6): 1393-401.
- [19] Choi J ,Lee S ,Mallard W ,et al. A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs[J]. *Nat Biotechnol* 2015 ,33(11): 1173-81.
- [20] Chen K G ,Mallon B S ,McKay R ,et al. Human pluripotent stem cell culture: Considerations for maintenance, expansion, and therapeutics[J]. *Cell Stem Cell* ,2014 ,14(1): 13-26.
- [21] Okano H ,Shinya Y. iPS cell technologies: Significance and applications to CNS regeneration and disease [J]. *Mol Brain* ,2014 ,7 (1): 12.
- [22] Polo J M ,Liu S ,Figueroa M E ,et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells[J]. *Nat Biotechnol* 2010 ,28(8): 848-55.
- [23] Krencik R ,Su-Chun Z. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells[J]. *Nature Protocols* 2011 ,6(11): 1710-7.
- [24] Yang N ,Zuchero J B ,Ahlenius H ,et al. Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion [J]. *Nat Biotechnol* ,2013 ,31(5): 434-9.
- [25] Zhang Y ,Pak C ,Han Y ,et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells[J]. *Neuron* ,2013 ,78(5): 785-98.
- [26] Ambasudhan R ,Talantova M ,Coleman R ,et al. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions[J]. *Cell Stem Cell* ,2011 ,9(2): 113-8.
- [27] Hodgetts S I ,Michael E ,Harvey A R. The state of play with iPSCs and spinal cord injury models [J]. *Clinical Medicine* ,2015 ,4 (1): 193-203.
- [28] Nutt S E ,Chang E A ,Suhr S T ,et al. Caudalized human iPSC-derived neural progenitor cells produce neurons and glia but fail to restore function in an early chronic spinal cord injury model [J]. *Exp Neurol* 2013 ,248(5): 491-503.
- [29] Li K ,Javed E ,Scura D ,et al. Human iPS cell-derived astrocyte transplants preserve respiratory function after spinal cord injury [J]. *Exp Neurol* ,2015 ,271: 479-92.
- [30] Lu P ,Woodruff G ,Wang Y ,et al. Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury [J]. *Neuron* ,2014 ,83(4): 789-96.
- [31] Kobayashi Y ,Okada Y ,takura G ,et al. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity [J]. *PLoS One* ,2012 ,7(12): e52787.