

· 综 述 ·

组织工程脊髓损伤修复的种子细胞选择*

蒋涛综述,任先军[△]审校

(第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

关键词:组织工程;脊髓损伤;干细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.036

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)07-0705-03

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗面临着巨大挑战,目前仍无理想的治疗方法。SCI的治疗必须克服损伤脊髓局部神经元数量匮乏、轴突再生能力弱、神经营养因子不足、各种轴突再生抑制因素以及胶质瘢痕、空洞形成等障碍。随着对SCI研究的不断深入,应用组织工程学方法通过组织水平的脊髓重构治疗SCI取得了长足进步,成为最受瞩目的方法之一。种子细胞作为脊髓组织工程研究的基本要素,学者进行了广泛而深入的研究。理想的种子细胞应具备易于制备、扩增及保存,植入后存活时间长,与宿主组织相容性好的特点。在治疗脊髓损伤时,需要种子细胞促进轴突再生或提供新的神经元,形成新的神经环路和传导通路,并分泌营养因子,改善局部微环境条件,修复损伤脊髓。已有多项干细胞(stem cells, SC)及非SC用于脊髓损伤修复的种子细胞研究。

1 SC

SC意为原始细胞,常指未分化或低分化细胞,具有高度增殖和多向分化的潜能,即SC既保持着旺盛的增殖能力,分裂繁殖产生其完全相同的后代(未分化),亦可在不同环境下进行不同程度的分化,诱导产生祖细胞[progenitor cell(低分化)]或成熟细胞[mature cell(高分化)],被认为是最有希望的种子细胞来源。从其来源SC可分成胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)与成体干细胞;而从其分化潜能而言,SC可分成全能干细胞(totipotent stem cell)、多能干细胞(pluripotent stem cell)和专能干细胞(unipotent stem cell)^[1]。

1.1 ESCs ESCs是从哺乳动物的囊胚内细胞群(inner cell mass, ICM)和原始生殖细胞经体外分化、抑制培养并分离克隆出来的具有发育全能性且可在未分化状态下无限增殖的细胞,可以作为种子细胞的无限资源^[2]。实验证实,ESCs可分化成三胚层的各种不同细胞,包括神经细胞^[3]。ESCs治疗SCI的机制是发挥中继作用恢复受损的神经细胞,并使其轴突形成完整的神经环路。

Deshpande等^[4]将ESCs来源的运动神经元移植入下肢瘫痪大鼠的损伤脊髓处,术后发现轴索长入肌肉,形成有效的神经肌接头结合,大鼠的瘫痪也得到了一定程度的恢复。Hataami等^[5]采用复合人ESCs源性神经前体细胞的胶原支架移植治疗脊髓损伤大鼠,结果发现移植细胞在体内可向神经元分化,并有效促进大鼠后肢运动功能恢复。目前,ESCs的临床应用存在许多障碍,ESCs的增殖分化机制有待研究,未分化的ESCs具有潜在的致癌风险,采用ESCs进行临床治疗时必须取材于人类胚胎,有限的来源和取材过程中难以回避的伦理学和法律学问题都成为阻碍其广泛应用的瓶颈。

1.2 神经干细胞(neural stem cells, NSCs) NSCs是中枢神经系统中多潜能的、能自我更新以及分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的更为特化的SC,存在于发育中的哺乳动物胚胎(大脑皮质、侧脑室、室管膜下层、海马、纹状体、中脑及脊髓)和成年动物的中枢神经系统(大脑皮质、室管膜下区、侧脑室壁、海马齿状回和嗅回及脊髓中央管室管膜区内)。NSCs植入到受损脊髓后可以在病变区沿轴突走行,互相联结形成一整体,部分分化成为神经元形成突触连接,部分分化成星形或少突胶质细胞,同时可以分泌神经生长因子,促进新生轴突髓鞘的形成^[6-7]。

Nakamura等^[8]将NSCs移植到猕猴脊髓损伤处,发现NSCs可以存活、迁移、分化,并促进髓鞘结构再生和修复,使肢体的运动功能得到明显的改善。但由于NSCs在体内分化存在不确定性^[9],故而NSCs的定向诱导分化研究是临床治疗SCI的关键所在。对于移植的NSCs在体内的迁移、分化机制,以及NSCs移植后宿主神经系统的变化和应答机制,仍需进一步研究。另外,NSCs取材来源有限,获取材料时手术具有侵袭性,难以获得患者的认同,也限制了NSCs直接应用于临床。

1.3 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) MSCs是中胚层来源的具有多向分化能力的SC,主要存在于全身结缔组织和器官间质中,以骨髓组织中含量最为丰富。骨髓MSCs也可称为骨髓基质干细胞(bone marrow stromal stem cells, BMSCs),在适当条件下能分化成间质起源的任意组织,包括神经元样细胞、软骨、脂肪、造血基质及骨等^[10],同时能分泌神经营养因子、细胞因子和其他生物活性因子。

Satake等^[11]研究表明,移植的BMSCs能够促进轴突生长,由BMSCs长出的轴突也多沿脊髓的纵轴方向生长,提示BMSCs在脊髓损伤部位的轴突重建中发挥重要作用。Khalatbary和Tiraihi^[12]经静脉为重物打击脊髓损伤大鼠注入标记的BMSCs,发现BMSCs在脊髓损伤出血部位的数量和密度最高,随着位置的远离,它的数量和密度依次降低,表明BMSCs具有趋向性。BMSCs取材方便,易于体外培养、扩增、诱导和分化,可自体移植,无免疫排斥反应,自体移植时不涉及伦理道德问题,具有广阔的应用前景。由于BMSCs作用机制尚不明确;定向诱导技术尚未成熟;尽管BMSCs能向神经细胞分化,但几乎没有实验能够证明这些具有神经细胞抗原标记的跨胚层分化细胞的确是有特定功能的神经细胞,因而对BMSCs仍需深入研究。

1.4 脐血干细胞(umbilical blood stem cells, UBSCs) UB-

* 基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(30872600);重庆市自然科学基金重点资助项目(CSTC, 2008BA5007)。△ 通讯作者,

SCs 是指人脐带血中含有的一类具有与骨髓干细胞相同的多向分化潜能的原始祖细胞。UBSCs 具有很强的增殖、分化及形成集落的能力,受到刺激进入细胞周期的速度及对各种造血刺激因子的反应能力均高于骨髓和外周血细胞,并且寿命更长。UBSCs 具有向包括神经细胞在内的各胚层细胞分化的潜能^[13-14],其修复脊髓的机制不仅是分化、替代损伤的神经元,还可能通过分泌神经营养因子和调节自体免疫过程来实现神经保护功能。人 UBSCs 移植入大鼠损伤脊髓,后肢运动功能明显改善^[15],其具体作用机制有待进一步研究。

1.5 诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)

2006 年, Takahashi 和 Yamanaka^[16]通过逆转录病毒载体将 4 个与多能性有关的转录因子基因 Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 导入小鼠成纤维细胞后,重新诱导成为一个多能干细胞,具有类似 ESCs 的所有特征,将其命名为 iPS。iPS 的出现终结了 SC 领域旷日持久的伦理之争,它不仅为人们体细胞重编程提供了一次全新认识,而且在实际应用方面也取得了重要进展。Wernig 等^[17]发现,从小鼠成纤维细胞诱导的 iPS 可以成功整合到胎鼠脑部的不同皮质,并分化为胶质细胞和神经元,包括谷氨酸能、 γ -氨基丁酸能、乙酰胆碱能神经元,也可以诱导为多巴胺能神经元,进一步可以改善帕金森病模型鼠的症状。尽管 iPS 研究已经取得了迅猛的发展,但这项技术用于疾病的 SC 治疗还有相当长的路要走,如成熟体细胞转化为类 ESCs 的效率还很低,重编程的分子机制还不清楚,所用的转染病毒随机整合到细胞的基因组中具有诱发细胞恶性转变的风险等。

2 非干细胞类细胞

2.1 施万细胞(Schwann cells, SCs)

SCs 是周围神经系统神经元轴突的髓鞘细胞,包绕神经纤维轴突形成髓鞘和神经膜,具有增生、迁移、引导、包裹的特性,能分泌神经营养因子、细胞外基质和细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM),营养并支持神经细胞^[18]。在神经纤维的再生修复中具有诱导、营养以及促进轴突生长和成熟的作用,并有很强的神经保护和髓鞘化的能力,是脊髓损伤治疗研究中运用最早和最多的种子细胞之一。Schaal 等^[19]将 SCs 移植入成年大鼠的颈段脊髓挫伤处,发现神经元特异性核蛋白(neuronal nuclei, NeuN)阳性细胞的数量增高 2 倍,促进了网状脊髓束轴突的再生,并增强了前肢运动功能的恢复。Papastefanaki 等^[20]发现 SCs 能够促进髓磷脂形成,帮助脊髓损伤后的功能恢复。SCs 最大的优点在于它的高效促神经轴突髓鞘再生作用,而且能从宿主的周围神经获得,并可在体外大量培养,易于自体移植,因此就避免了免疫排斥反应的发生。但它同时有较大的缺点在于移植的 SCs 在局部的存活率不高,存活期较短和迁移距离有限。因此,如何保持 SCs 移植入 SCI 部位后的生物活性并增加其迁移范围是今后研究的重点之一。

2.2 嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)

OECs 是起源于嗅球基底膜的一种特殊类型的胶质细胞,广泛分布于嗅黏膜、嗅神经和嗅球的第 1、2 层,并伴随嗅束进入中枢神经系统。OECs 存在并迁徙于周围神经和中枢神经之间,是一种具有星形胶质细胞和 SCs 双重特性的成鞘细胞,能分泌多种细胞因子,主要包括脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养因子-3 和神经营养因子-4/5 以及 CAM 等^[21]。和 SCs 相比, OECs 能和星形胶质细胞很好地整合,不引起星形胶质细胞的肥大和表达硫酸软骨素蛋白多糖的上调,减少星形胶质细胞反应性增生和蛋白多糖的表达,促进运动刺激电位恢复的能力更强。此外, OECs 具有在中枢神经

系统内长距离迁移、促进神经轴突穿越移植物-宿主界面重新进入中枢神经系统的能力。1997 年, Li 等^[22]在 Science 杂志上发表了 OECs 移植诱导成鼠皮质脊髓束再生的研究报告,这是 OECs 移植治疗脊髓损伤的最早报道。随后, Ramón-Cueto 等^[23]采用 OECs 移植治疗大鼠脊髓完全横断模型,术后 3~7 个月观察到动物的运动功能和感觉反射都有所恢复。Au 等^[24]发现 OECs 能够刺激 SCs 的促进轴突生长功能,从而加速损伤功能的恢复。OECs 移植治疗 SCI 是近些年来热点研究问题,但 OECs 在活体上只能从嗅黏膜上获取,而且数量少,成熟动物的 OECs 增殖能力也有限,因此今后对 OECs 的研究重点势必放在怎样增强 OECs 的特性和怎样让移植细胞在脊髓内最大程度地存活方面。

2.3 少突胶质细胞(oligodendrocyte)

少突胶质细胞是中枢神经系统髓鞘形成细胞。由于轴突脱髓鞘改变是脊髓损伤的重要病理变化,严重影响了损伤脊髓内残留神经纤维生理功能的发挥,而少突胶质细胞死亡是导致轴突脱髓鞘改变的主要原因。因而少突胶质细胞作为脊髓损伤治疗的种子细胞有其理论基础。Blakemore 等^[25]报道少突胶质细胞对髓鞘有良好的再生作用,并能迁移再生 6 mm。需要注意的是,少突胶质细胞与周围神经系统的 SCs 生物学特性有很大不同:一个少突胶质细胞要包裹多个轴突,一旦少突胶质细胞及轴突受损,则轴突再生便无迹可寻;轴突断裂修复时,少突胶质细胞前体向靶区的生长晚于轴突,轴突先向前迁移,少突胶质细胞再迁移并进行包裹,因而对再生轴突无诱导作用;少突胶质细胞产生抑制因子,抑制轴突生长,因而少突胶质细胞对脊髓损伤的修复作用仍需进一步研究。

3 总结与展望

种子细胞选择是脊髓组织工程研究的核心内容之一。以种子细胞为基因载体,将基因治疗融入组织工程技术之中已成为 SCI 治疗的必然趋势。此外,两种或以上的种子细胞联合应用治疗 SCI 也逐步受到学者重视,并取得良好效果。但由于 SCI 的修复过程是一个非常复杂的病理生理过程,SCI 的治疗必须考虑到多种因素的影响,对种子细胞的研究中仍有许多问题未彻底解决。今后的研究方向将主要集中在以下几个方面:(1)加快各类 SC 定向诱导,分化及增殖的研究;(2)单一细胞移植效果各有利弊,考虑联合移植几种细胞,或将细胞移植与其他方法联合应用;(3)设计良好的组织工程支架材料,使之更有利于移植细胞的搭载和缓释各种生长因子综合治疗脊髓损伤,为脊髓损伤的治疗探索一条更为光明的道路。

参考文献:

- [1] 陈强,杨在亮,孙士锦,等.成体干细胞研究进展[J].重庆医学,2009,38(12):1531-1532.
- [2] Chatzi C, Scott RH, Pu J, et al. Derivation of homogeneous GABAergic neurons from mouse embryonic stem cells [J]. *Exp Neurol*, 2009, 217(2):407-416.
- [3] Schwarz SC, Schwarz J. Translation of stem cell therapy for neurological diseases [J]. *Transl Res*, 2010, 156(3):155-160.
- [4] Deshpande DM, Kim YS, Martinez T, et al. Recovery from paralysis in adult rats using embryonic stem cells [J]. *Ann Neurol*, 2006, 60(1):32-44.
- [5] Hatami M, Mehrjardi NZ, Kiani S, et al. Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants in colla-

- gen scaffolds promote recovery in injured rat spinal cord [J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(5): 618-630.
- [6] Lee SH, Chung YN, Kim YH, et al. Effects of human neural stem cell transplantation in canine spinal cord hemisection[J]. *Neurol Res*, 2009, 31(9): 996-1002.
- [7] Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, et al. Human neural stem cell differentiation following transplantation into spinal cord injured mice; association with recovery of locomotor function[J]. *Neurol Res*, 2006, 28(5): 474-481.
- [8] Nakamura M, Toyama Y, Okano H. Transplantation of neural stem cells for spinal cord injury [J]. *Rinsho Shinkeigaku*, 2005, 45(11): 874-876.
- [9] Yan J, Xu L, Welsh AM, et al. Extensive neuronal differentiation of human neural stem cell grafts in adult rat spinal cord[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(2): e39.
- [10] Sung JH, Yang HM, Park JB, et al. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(8): 2649-2654.
- [11] Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injury spinal cord tissue[J]. *Spine*, 2004, 29(18): 1971-1979.
- [12] Khalatbary AR, Tiraihi T. Localization of bone marrow stromal cells in injured spinal cord treated by intravenous route depends on the hemorrhagic lesions in traumatized spinal tissues[J]. *Neurol Res*, 2007, 29(1): 21-26.
- [13] Seo MS, Jeong YH, Park JR, et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells[J]. *J Vet Sci*, 2009, 10(3): 181-187.
- [14] Dasari VR, Veeravalli KK, Tsung AJ, et al. Neuronal apoptosis is inhibited by cord blood stem cells after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(11): 2057-2069.
- [15] 尹文化, 金大地, 鲁凯伍, 等. 人脐血干细胞移植修复大鼠脊髓损伤的功能评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(43): 8418-8421.
- [16] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [17] 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[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(15): 5856-5861.
- [18] Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(12): 1995-1999.
- [19] Schaal SM, Kitay BM, Cho KS, et al. Schwann cell transplantation improves reticulospinal axon growth and forelimb strength after severe cervical spinal cord contusion [J]. *Cell Transplant*, 2007, 16(3): 207-228.
- [20] Papastefanaki F, Chen J, Lavdas AA, et al. Grafts of schwann cells engineered to express PSA-NCAM promote functional recovery after spinal cord injury [J]. *Brain*, 2007, 130(Pt 8): 2159-2174.
- [21] Radtke C, Sasaki M, Lankford KL, et al. Potential of olfactory ensheathing cells for cell-based therapy in spinal cord injury[J]. *J Rehabil Res Dev*, 2008, 45(1): 141-151.
- [22] Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rats corticospinal tract transplants of olfactory ensheathing cells[J]. *Science*, 1997, 277(5334): 2000-2002.
- [23] Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, et al. Long distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord in promoted by olfactory ensheathing glia transplant[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(10): 3803-3815.
- [24] Au E, Richter MW, Vincent AJ, et al. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair [J]. *J Neurosci*, 2007, 27(27): 7208-7221.
- [25] Blakemore WF, Gilson JM, Crang AJ. Transplanted glial cells migrate over a greater distance and remyelinate demyelinated lesions more rapidly than endogenous remyelinating cells[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(3): 288-294.

(收稿日期: 2010-03-29 修回日期: 2010-09-22)

· 综 述 ·

附睾蛋白酶抑制蛋白及其在免疫避孕中应用的研究进展*

陈正琼^{1,2}综述, 梁志清¹审校

(1. 第三军医大学西南医院妇产科, 重庆 400038; 2. 第三军医大学新桥医院妇产科, 重庆 400037)

关键词: 避孕, 免疫学; 蛋白酶抑制蛋白质类, 分泌; 疫苗

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.037

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)07-0707-03

针对精子特异性抗原的免疫避孕, 为控制生育展示了诱人的前景。Eppin 是其中的研究热点。Eppin 的基因和结构特点决定了其对精子功能的重要作用, 也是其作为免疫避孕有效靶点的基础。本文就 Eppin 的基因与蛋白结构特点及其对应的

功能、Eppin 作为免疫避孕靶点的研究进展作一综述。

1 Eppin 基因

Eppin 基因 2001 年首先在人类发现, 人类基因组中只含有一个 Eppin 基因拷贝。Eppin 含 Kunitz 和 WAP 型基因结

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(30901607)。