

· 综述 ·

干细胞移植治疗帕金森病的应用研究*

牟 亮¹

干细胞具有自我更新能力, 可以通过不对称分裂产生分化方向更加明确的子代细胞, 从而产生特定的机体组织, 由于其来自于胚囊的内层, 所以又称为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)。ES 能够在体外培养条件下不断增殖并保持产生各谱系体细胞的能力; 而分化方向更加局限的干/前体细胞, 则可以在发育过程中不同阶段的组织乃至成年动物或人类体内分离得到。近年, 干细胞基础研究的不断进展, 加快了 ES 的体内移植研究的步伐。

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种进行性加重的神经退行性病变, 病变主要累及中脑黑质致密部, 以大量多巴胺能(dopaminergic, DA)神经元变性、缺失为主要病理特征。当黑质致密部(A9 区)的 DA 神经元大量变性导致与纹状体胆碱能神经元之间的递质回路平衡被打破, 就可能引起 PD 发病。目前应用于临床的各种神经营养和保护疗法不能阻止这种渐进的神经元变性过程, 而以细胞替代为出发点的干细胞移植疗法为治疗 PD 提供了一个新策略。自 20 世纪 70 年代后期, 首次对 PD 模型动物脑内移植胚胎来源 DA 神经元之后, 细胞移植治疗 PD 的探索性临床试验于 90 年代陆续开展^[1-3], 其中一部分患者的症状显著改善, 有的患者保持这种良好的治疗效果达 14 年之久^[1,4]。Riaz 等^[5]在综述细胞移植治疗 PD 的作用和意义的的基础上, 提出如果可以获得相当数量、能够长期存活的具有自我复制, 以及多分化潜能的神干细胞, 将可以应用细胞移植治疗 PD 等神经系统退行性疾病。

1 干细胞移植对 PD 模型动物的应用基础研究

干细胞移植对 PD 模型动物基础研究的主要供体细胞是 ES, 以及 ES 经诱导分化而制备的神经干/前体细胞。随着对干细胞定向分化所需条件的认识不断积累^[6-7], 从 ES 获得神经干/前体细胞(neural stem/progenitor cell, NSC/NPC)已经成为现实^[8-9], 这些神经前体细胞仍然可以经过诱导后向 DA 神经元方向分化^[10-11], 而经过基因工程改造后的 TH-间充质干细胞也同样可以作为移植的备选细胞取得良好实验结果^[12]。移植前的预先诱导可能提高了供体细胞对局部微环境的适应性, 提高了细胞对黑质纹状体环路中神经递质刺激的反应性, 更易于功能恢复, 从而取得疗效。

近三年来的几个移植实验结果已经显示出胚胎干细胞的潜在应用价值。Bjorklund 等^[13]将 ES 以低浓度的单细胞悬液形式移植进入 PD 模型动物纹状体后, 观察到供体细胞能够分化成为类似中脑 DA 神经元的形态, 并改善模型动物的运动失衡症状, 然而这个实验也并未完全成功, 供体细胞在 24% 的模型动物脑内未能成活, 20% 的动物出现畸胎瘤并最终死亡。由于 ES 具有的全分化潜能, 在移植后, 尽管部分细胞能够分化成为酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 阳性细胞, 但细胞群体中仍存在更多未能分化的细胞, 而这些

细胞可能是导致移植后脑内形成畸胎瘤的主要因素。Kim 等^[14]为了使供体细胞最大程度的显示 DA 神经元表型, 将核受体相关-1(nuclear receptor related-1, nrr-1)基因转染进入供体干细胞, 并模拟体内神经细胞分化条件, 促使供体细胞定向分化成为有功能的 DA 神经元。这些细胞能够在体外释放多巴胺, 表达多种 DA 神经元关键性标志蛋白(TH, Nrr-1, DAT), 并且能够整合进入动物纹状体, 在行为学实验中显示出良好的症状改善效果。

2005 年, Takagi 等^[14]的实验则将 ES 移植治疗 PD 的研究向前推进了一大步, 实验中他们使用猕猴(cynomolgus monkey)胚胎干细胞作为供体细胞来源, 并在移植前进行了充分的定向诱导分化, 应用间质细胞共培养诱导方法, 并与黑质细胞表面特异表达的 FGF20 与 FGF2 协同诱导, 成功制备了极为接近于真正 DA 神经元的供体细胞, 在移植后经正电子反射扫描(PET)检测, 存活的供体细胞能够行使 DA 神经元的功能, 同时显著改善 1-甲基-4-苯基四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的模型猴子 PD 症状。这个实验的重要性不仅在于它取得的良好治疗效果, 更在于 MPTP 诱导产生的 PD 模型非常接近人类 PD, 因此实验中获得的结果对干细胞移植临床应用的疗效具有高度的预测性^[15]。此外, Harrower 等^[16]最新的实验还观察到猪胚胎来源的神经干细胞能够与 PD 模型大鼠脑内神经元形成新的突触联系, 并且有证据显示局部有新生血管生成以及髓鞘发生, 为不同种属间移植取材提供了可以借鉴的方案。

移植的干细胞除了对变性的神经元进行替代之外, 还可以在经过基因工程改造后作为具有神经营养或保护功能因子基因的载体, 通过这些因子的释放, 对受损部位起到保护作用。在众多备选分子中, 对黑质致密部 DA 神经元具有明确保护作用的胶质细胞源性神经营养因子 (glial-line derived neurotrophic factor, GDNF)^[17-18]成为首选, 不论在体外或是在体实验中, 高表达 GDNF 的 NSC 都显示出明显的促进神经再生的能力^[19-20]。Ostenfeld^[21]利用慢病毒载体将人类 GDNF 基因转染进入 SD 大鼠 NSC 中, 体外实验显示 GDNF-NSC 显著提高与之共培养的 DA 神经元的神经突生长。Akerud 等^[19]开展了体内实验, 将大鼠 GDNF 基因转染进入小鼠 c17.2 系 NSC 后, 对小鼠纹状体多个区域进行移植, 并在随后的 6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine)损伤中, 观察到供体 GDNF-c17.2

* 基金项目: 北京市自然科学基金重点项目(5041002); 国家自然科学基金(30471773)

审校: 左萍萍(中国医学科学院基础医学研究所药理学研究室, 北京市东单三条 5 号, 100005); 蔡哲(中日友好医院临床医学研究所免疫学研究室, 100029)

1 中国医学科学院基础医学研究所药理学研究室, 北京市东单三条 5 号, 100005

作者简介: 牟亮, 男, 硕士在读

收稿日期: 2006-03-28

NSC 能够有效的防止纹状体 DA 神经元轴突逆行性变性以及黑质 DA 神经元的坏死。尽管如此, 在两个实验中却都没有观察到供体细胞与宿主神经元之间明显的整合, 并且在移植 6 周后, 已经不能检测到存活的供体细胞^[20], 因此, 推论移植干细胞可能是通过为病变的神经元提供营养支持, 起到一种细胞伙伴的效应而发挥治疗作用的^[21-22]。

不论是着眼于神经细胞替代还是生长因子的保护作用, 干细胞移植的副作用都不可忽视。一些临床试验/动物实验已经发现多巴胺能神经元移植后部分患者/实验动物会出现运动障碍^[23], 而 Maries 等^[11, 24]在 DA 前体细胞移植实验中又观察到了一种被他们称为面部-前肢刻板 (facial-forelimb stereotypy) 的运动障碍新表现。产生这种严重副作用的原因可能与干细胞进入纹状体后, 不能恢复正常的递质环路, 导致 DA 释放不能受到有效调控有关; Maries 则认为供体细胞是局部纹状体的神经支配得到恢复, 使侧纹状体 (lateral striatum) 部位 FosB/ Δ FosB 转录因子表达水平升高, 是导致这种副作用的原因^[24]。值得一提的是在前面提到的三个应用 ES 进行的实验中, 均未观察到动物出现运动障碍的副作用, 但作者也并未提供证据说明以上的实验动物是否在左旋多巴给药后能够出现运动障碍^[15]; 而且运动障碍这种副作用一般出现在人类患者用药一年之后, 因此, 对于干细胞移植的安全性与功能改善的效果需要通过周期更长的实验观察才能得到可靠的结论。还有一个值得考虑的问题是在相同的疾病条件下, 诱导人类胚胎干细胞定向分化为成熟多巴胺能神经元的细胞环境与信号很有可能与实验中使用的动物所要求的条件不同, 在这方面必须作进一步探索。此外, 由于中脑 A9 黑质致密部与 A10 腹侧背盖区 (ventral tegmental area, VTA) 的 DA 神经元在功能上存在很大差异, 而在移植中使用的 DA 神经前体细胞并不能区分这两种类型细胞, 当这些移植的前体细胞分化成为非 A9 区 DA 神经元, 发出的轴突未与纹状体构成适当神经回路, 则移植的疗效也会受到很大影响^[25-26]。

2 干细胞移植的治疗机制

目前关于干细胞移植疗效的机制存在两种观点: 第一种观点比较传统, 认为移植的干细胞取代原有的病变细胞而产生疗效; 另一种观点则认为移植的干细胞除替代功能外, 更为重要的是起到一种“细胞伙伴”的作用——提供神经保护, 促进病变组织自我修复。

2.1 移植干细胞分化成为 DA 神经元而行使正常细胞功能

在发育过程中, 外胚层神经上皮细胞不断迁移, 分化能力逐渐受到限制, 当中胚层和内胚层的抑制信号不再存在时, ES 就会转变为最为原始的 NSC, 并最终分化成为神经元以及胶质细胞。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 和活化素是抑制 ES 向 NSC 分化的两个主要的调控因子^[27], 事实上, ES 自身也能够分泌 BMP 对本身的分化进行调控^[28]。当尚未分化完全的 DA 神经前体细胞迁移进入中脑部位时, 这些前体细胞开始发出轴突与同样正处在发育过程中的纹状体和皮层神经元前体细胞形成功能回路。移植的干细胞是否也能够遵循这样一条发育途径, 在移植部位接受信号刺激, 分化成为 DA 神经元呢? 最新的动物实验证实这条途径不

仅能够在 ES 体外培养中得到重复, 而且在接受低密度单细胞悬液 ES 移植的模型动物脑内也同样可以得到重复^[16, 29]。这种低浓度 ES 移植后自主的定向分化可能是由于细胞间接触减少, 导致抑制信号的影响降低而出现的^[13]。另外, 在 ES 分化成为 DA 神经元的同时, 也能够形成数量不小的 5-羟色胺能 (5-HT) 神经元。而 5-HT 能够提高 DA 神经元在纹状体处突触 DA 的释放量^[30-31], 因此, 5-HT 能神经元的存在也可能是模型 ES 移植疗效的一个解释^[13]。

2.2 DA 神经元保护及营养作用

在不断积累的实验证据的基础上, 一些学者认识到对病变脑组织的神经保护作用是移植干/前体细胞的普遍的特性。这些移植进入脑内的干细胞能够分泌神经营养因子, 对病变的神经细胞产生保护作用和营养作用, 使这些细胞重新恢复功能。Ouredinik 在实验中发现移植进入动物脑内的永生化干细胞系 (c17.2) 的子代细胞能够表达对 DA 神经元具有明确保护作用的内源性营养因子 GDNF^[18, 32-33]。移植 2 周后, 损伤部位下调的 TH 表达恢复至正常水平, 而检测到的 TH 阳性细胞绝大部分为宿主自身神经元^[34-35]。Rafuse 等^[35-36]也发现, 神经前体细胞可以在体外与胚胎腹侧中脑 (ventral mesencephalon) 细胞共培养条件下释放 SHH (sonic hedgehog) 蛋白, 对 DA 神经元具有保护作用。移植的干细胞之所以能够起到治疗效果, 原因在这些未分化的细胞创造一个适于细胞存活的环境, 使这个微环境具有利于病变组织细胞存活的神经营养因子和/或神经生长因子, 从而对病变的细胞实施救援。这就要求移入的细胞不仅需要在脑内存活, 而且需要最大限度的恢复脑内生理状态下的微环境。那么, 将干细胞移植方法与基因工程手段相结合, 使供体细胞能够稳定表达对细胞微环境进行调整的生长/营养因子的设想十分值得深入探讨。

2.3 促进内源性多巴胺能神经发生

脑损伤后海马神经发生的代偿性作用增强, 在大鼠和短尾猴 PD 模型, 与未受损侧相比, 多巴胺衰竭的大脑半球有更多新分化的神经元。对动物和人 PD 患者大脑黑质的研究显示, PD 病程中存在神经的重建, 因此促进黑质神经元的再生可以为 PD 的治疗开辟一条新的途径。Shan 等^[37]利用 PD 模型小鼠研究黑质处 DA 神经元的再生情况, 发现正常黑质和 MPTP 损坏的黑质部位均有神经发生现象, 但是模型小鼠黑质区不仅 NSC 数量显著增加, 而且新生成的 DA 神经元也明显增加, 认为 NSC 可以增强黑质的神经发生和 DA 神经发生, 在 PD 治疗中具有重要意义。

3 展望

由于几个独立的研究小组的试验结果同时显示在对 PD 模型动物实施干细胞移植后, 模型动物的症状有显著改善, 但移植进入神经系统的细胞并未在移植部位分化为神经元或胶质细胞并整合进入该部位的神经组织; 不仅如此, 还有其他证据显示在模型动物脑内移植其他非干细胞供体, 如羊膜上皮细胞以及转染了血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的幼仓鼠肾细胞 (baby hamster kidney, BHK) 细胞, 由于可以分泌多种神经营养因子和生长因子^[38-39], 也可以获得同样的显著症状改善效果, 而这些细胞也未能与移植部位

神经细胞建立神经系统特异的细胞间联系^[40]。这些证据支持干细胞移植的神经保护作用大于替代作用。基于此种假设,进一步的研究对于供体细胞的“剂量”以及在保证安全性的基础上对干细胞进行基因工程改造,使之携带特异性的营养因子、生长因子进入脑内特定区域以促进自身神经发生和挽救病变细胞将是重要的研究方向。

由于 ES 的无限增殖能力,成为干细胞移植治疗 PD 的首选供体细胞,而移植的干细胞不仅仅是通过直接替代受损神经元和胶质细胞而起到对 PD 的治疗作用,更主要的是对病变的 DA 神经元起到保护作用,改善病变组织局部微环境,促进神经元自我修复,增强神经发生能力,从而产生疗效。

参考文献

- [1] Piccini P. Dyskinesias after transplantation in Parkinson's disease [J]. *Lancet Neurol*, 2002, 1(8):472.
- [2] Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(10):710—719.
- [3] Isacson O, Bjorklund L, Pernaute RS. Parkinson's disease: interpretations of transplantation study are erroneous [J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4(6):553.
- [4] Piccini P, Brooks DJ, Bjorklund A, et al. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient [J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(12):1137—1140.
- [5] Riaz SS, Bradford HF. Factors involved in the determination of the neurotransmitter phenotype of developing neurons of the CNS: applications in cell replacement treatment for Parkinson's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 76(4):257—278.
- [6] Bain G, Kitchens D, Yao M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro [J]. *Dev Biol*, 1995, 168(2):342—357.
- [7] Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, et al. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro [J]. *Mech Dev*, 1996, 59(1):89—102.
- [8] Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19(12):1129—1133.
- [9] Yan Y, Yang D, Zarnowska ED, et al. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(6):781—790.
- [10] Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease [J]. *Nature*, 2002, 418(6893):50—56.
- [11] Lee SH, Lumelsky N, Studer L, et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(6):675—679.
- [12] Lu L, Zhao C, Liu Y, et al. Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease [J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2005, 15(1):46—51.
- [13] Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4):2344—2349.
- [14] Takagi Y, Takahashi J, Saiki H, et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1):102—109.
- [15] Langston JW. The promise of stem cells in Parkinson disease [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1):23—25.
- [16] Harrower TP, Tyers P, Hooks Y, et al. Long-term survival and integration of porcine expanded neural precursor cell grafts in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Exp Neurol*, 2006, 197(1):56—69.
- [17] Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, et al. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF [J]. *Nature*, 1996, 380(6571):252—255.
- [18] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science*, 1993, 260(5111):1130—1132.
- [19] Akerud P, Canals JM, Snyder EY, 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]. *J Neurosci*, 2001, 21(20):8108—8118.
- [20] Behrstock S, Ebert A, McHugh J, et al. Human neural progenitors deliver glial cell line-derived neurotrophic factor to parkinsonian rodents and aged primates [J]. *Gene Ther*, 2006, 13(5):379—388.
- [21] Ostenfeld T, Tai YT, Martin P, et al. Neurospheres modified to produce glial cell line-derived neurotrophic factor increase the survival of transplanted dopamine neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69(6):955—965.
- [22] Tai YT, Svendsen CN. Stem cells as a potential treatment of neurological disorders [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4(1):98—104.
- [23] Winkler C, Kirik D, Bjorklund A. Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work [J]? *Trends Neurosci*, 2005, 28(2):86—92.
- [24] Maries E, Kordower JH, Chu Y, et al. Focal not widespread grafts induce novel dyskinetic behavior in parkinsonian rats [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 21(1):165—180.
- [25] Chung CY, Seo H, Sonntag KC, et al. Cell type-specific gene expression of midbrain dopaminergic neurons reveals molecules involved in their vulnerability and protection [J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(13):1709—1725.
- [26] Thompson L, Barraud P, Andersson E, et al. Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(27):6467—6477.
- [27] Munoz-Sanjuan I, Brivanlou AH. Neural induction, the default model and embryonic stem cells [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3(4):271—280.
- [28] Hynes M, Rosenthal A. Embryonic stem cells go dopaminergic [J]. *Neuron*, 2000, 28(1):11—14.
- [29] Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, et al. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation [J]. *Exp Neurol*, 1998, 149(1):28—41.
- [30] Blandina P, Goldfarb J, Craddock-Royal B, et al. Release of endogenous dopamine by stimulation of 5-hydroxytryptamine₃ receptors in rat striatum [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, 251(3):803—809.
- [31] De Deurwaerdere P, Bonhomme N, Lucas G, et al. Serotonin enhances striatal dopamine outflow in vivo through dopamine uptake sites [J]. *J Neurochem*, 1996, 66(1):210—215.
- [32] Beck KD, Valverde J, Alexi T, et al. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain [J]. *Nature*, 1995, 373(6512):339—341.
- [33] Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, et al. Early transplantation of an encapsulated GDNF-producing cell demonstrating strong neuroprotective effects in a rat model of PD [J]. *J Neurosurg*, 2005, 102(1):80—89.
- [34] Ourednik J, Ourednik V, Lynch WP, et al. Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(11):1103—1110.
- [35] Rafuse VF, Soundararajan P, Leopold C, et al. Neuroprotective properties of cultured neural progenitor cells are associated with the production of sonic hedgehog [J]. *Neuroscience*, 2005, 131(4):899—916.
- [36] Torres EM, Monville C, Lowenstein PR, et al. Delivery of sonic hedgehog or glial derived neurotrophic factor to dopamine-rich grafts in a rat model of Parkinson's disease using adenoviral vectors Increased yield of dopamine cells is dependent on embryonic donor age [J]. *Brain Res Bull*, 2005, 68(1-2):31—41.
- [37] Shan X, Chi L, Bishop M, et al. Enhanced de novo neurogenesis and dopaminergic neurogenesis in the substantia nigra of MPTP-induced Parkinson's disease-like mice [J]. *Stem Cells*, 2006.
- [38] Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, et al. Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease [J]. *Brain Res*, 2005, 1053(1-2):10—18.
- [39] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 62(4):585—590.
- [40] Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, et al. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy [J]. *Exp Neurol*, 2000, 165(1):27—34.