·综述·

干细胞移植治疗创伤性脑外伤的研究进展*

乔雪松¹ 刘素娟² 牛燕媚^{3,4}

创伤性脑外伤(traumatic brain injury, TBI)是临床上常发生的一种因头部被撞击、突然加速或者突然减速等机械力造成的脑部损伤疾病。TBI主要表现为平衡能力和协调能力差,此外TBI患者多出现学习认知能力、记忆能力和情感障碍。近年来,神经外科学的飞速发展极大地提高了颅脑损伤患者术后成活率。但是大部分脑损伤幸存者都会存在严重的功能障碍,失去生活自理能力,生存质量显著降低。庞大的患病人群及不断攀升的发病率使政府、社会及家庭付出巨大的代价^[1]。

细胞疗法指用神经源或非神经源细胞代替、修复或改善受损神经系统功能的一种疗法,常通过细胞移植至机体体内实现。随着基因工程学科快速发展,与基因治疗结合和改良的细胞移植又被称为基因疗法。传统观念认为中枢神经系统受损修复和再生困难^[2],主要因为:①神经元等神经细胞是高度分化的终末细胞,因此其本身的再生能力较小;②神经营养因子分泌不足,局部微环境不利于受损神经系统修复;③损伤后,炎症因子和多种细胞因子的分泌增加,抑制突触再生并加重缺血缺氧发生;④神经再生障碍的最主要原因是损伤部位疤痕的形成,对神经再生具有物理和化学屏障作用,增加了神经突触延伸生长的困难。因此,中枢神经系统受损修复和再生涉及了神经营养因子的供给、轴突的再生、突触的可塑性及微环境等多个生理过程,机制非常复杂。而干细胞移植疗法正是因具备解决上述神经修复再生困难的能力而被广泛用于中枢神经疾病的治疗中。移植的细胞除了可以分泌具有疗效的物质外,还可以与宿主建立联系,激活内源性干细胞的增殖和改善损伤局部微环境,从而代替、修复或优化受损组织或器官的神经功能。本文通过总结近年来国内外关于干细胞移植治疗TBI的研究进展,增加对其认识,以期后续的基础及临床研究提供理论依据。

1 创伤性脑外伤的病理生理学及治疗现状

TBI发生发展过程是复杂的,包括原发性损伤和继发性损伤。原发性损伤发生在大脑被机械力损伤的时刻,产生局

部和弥漫性伤害。继发性损伤开始于原发性损伤后的数分钟、数小时或数天后,可引起大脑损伤区的生物分子及生理学变化,包括神经炎症诱导的细胞因子和兴奋性细胞毒性物质释放、脑水肿、颅内压增高、大脑缺血及细胞凋亡^[3]。继发性损伤程度与TBI治疗效果和后期康复效果密切相关,因此临床更注重对其的治疗。主要通过使用具有神经保护药物减少细胞毒性死亡和细胞毒性脑水肿的发生,从而减轻继发性损伤的危害。然而由于其病理学机制不详,所以并未得到理想治疗结果。

目前临床对TBI治疗手段很多,如药物治疗、运动疗法、低温治疗及细胞疗法^[4-5]。治疗TBI主要原则是促进损伤区大脑皮质神经元细胞增殖或抑制其凋亡和死亡。因此所选药物多为具有神经保护作用的药物,如左乙拉西坦、尼莫地平、谷氨酸盐抑制剂、镁硫酸盐和竞争性N-甲基-D-天门冬氨酸受体拮抗剂,但效果均不理想^[6]。有研究发现大强度耐力运动可以增加大脑神经营养因子分泌,提高神经系统可塑性;且运动可以促进神经干细胞的增殖分化能力,抑制病理性细胞凋亡,对TBI的康复治疗有重要作用。但TBI常伴有严重的运动能力丧失,因此,运动疗法在临床实践中常不能顺利开展。低温具有神经保护作用,其治疗TBI的理论依据是:机体处于低于正常体温状态时,脑内代谢水平显著降低,且脑血管收缩引起脑内血流量明显减少,从而起到神经保护作用。但是人为降低体温可导致肺部不适和凝结物形成。且需使用升压药物避免低温诱导的血压过低,而升压药物使体温恢复的同时可致颅内压增高,也带来一定副作用。虽然在治疗的同时可考虑高渗疗法或给予多巴妥类的药物来减少不适,但是需要评估它们对患者的潜在风险^[7]。尽管目前先进设备和各种疗法改善和促进了对TBI的治疗,但其病理机制复杂,临床上只能采取保护和修复损伤神经细胞,减少炎症反应导致的细胞凋亡等被动措施。而死亡神经元细胞的功能已永远丧失,所以每年仍有很多人因脑外伤死亡或者留有严重残疾后遗症,寻找安全有效的治疗方法显得任重道远。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2019.03.025

*基金项目:国家自然科学基金项目(81501071,31671237)

1 天津城建大学,天津市,300384; 2 天津医科大学人体解剖与组织胚胎学系; 3 天津医科大学康复医学系; 4 通讯作者
作者简介:乔雪松,男,讲师; 收稿日期:2018-09-05

2 神经干细胞移植治疗 TBI

神经干细胞 (neural stem cells, NSCs)是指源于神经系统或可变为神经细胞,并可通过不对称分裂持续自我更新和靶向分化其他组织和细胞的一种细胞。近十年来,很多学者开始关注 NSCs 移植治疗 TBI 的研究。NSCs 移植 TBI 大鼠后可在其体内存活并分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞等多种神经系统细胞^[6]。研究者在大脑损伤区进行细胞移植,发现移植3个月后 NSCs 仍可存活并迁移至海马伞;同时还伴随着纤连蛋白和中间丝状蛋白表达的增加,提示细胞存活和迁徙能力可能得益于这些蛋白模拟了一个胚胎期微环境^[7]。且移植 NSCs 可在皮质丘脑区和对侧海马之间建立联系,表达活性蛋白,并可以和相邻细胞之间进行良性突触兴奋和抑制传递活动^[8]。然而,也有研究报道将人源 NSCs 移植到免疫缺陷的 TBI 大鼠后,虽能观察到移植的细胞能存活约5个月之久,但并未观察到显著的行为学功能改善^[9]。这些实验结果的不同,提示了 NSCs 移植到体内存活时间和产生的效果可能与其损伤程度有关。有报道也证实了这一点,与重度 TBI 比较,中度 TBI 中移植细胞体内存活率更高^[10]。为了促进以 NSCs 为基础的细胞疗法在 TBI 的神经损伤修复和功能恢复中的应用,目前多项临床及基础研究报道了 NSCs 联合药物,医学分子材料和神经活性分子等多种方法在 TBI 中的应用^[11-14]。孕酮与 NSCs 联合移植比单独给予孕酮或 NSCs 可更好促进 NSCs 细胞的迁移、存活及分化,从而改善 TBI 大鼠神经功能^[11],而给予孕酮拮抗剂后,上述有益表现均被逆转^[12]。将医用海绵与 NSCs 联合应用于 TBI,水迷宫结果显示这种联合方式能更好的促进 TBI 大鼠学习和记忆功能的恢复。且在 NSCs 移植两周后发现,这种联合方式能更好的促进 NSCs 细胞靶向神经元的分化,增加神经细胞之间的突触,并持续激活细胞外调节蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases/mitogen-activated protein kinase, ERK/MAPK)信号通路^[13]。在 TBI 动物模型中发现共同移植 NSCs 和纤维连接蛋白可显著增加损伤大脑中 NSCs 的存活和迁移能力。此外,为了避免神经系统免疫排斥反应,一些研究者从 TBI 患者脑组织提取 NSCs,在体外大量培养再移植患者脑损伤区,发现损伤区脑水肿及细胞凋亡显著减少^[14]。

NSCs 移植治疗 TBI 的分子机制尚不清楚,推测可能与 NSCs 在体内发挥的抗炎和抗细胞凋亡机制有关。研究发现在大鼠脑出血急性期,NSCs 移植可降低神经系统退化,抑制脑水肿发生,减少炎症浸润反应及细胞凋亡发生^[16]。Lee 等人发现移植 NSCs 抑制白介素 6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤抑制因子(tumor necrosis factor alpha, TNF- α)和转录因子 NF- κ B 的活性^[17]。而我们也发现 NSCs 移植可逆转 TBI 诱导的神经元凋亡和神经功能受损,而炎症因子 IL-6 和促凋亡因

子 Bad 基因表达显著减少是其潜在机制^[18]。也有研究发现,心室内移植 NSCs 细胞可显著降低胼胝体星形胶质细胞增生,同时激活小胶质细胞和巨噬细胞,进而减轻损伤区域的炎症反应^[19]。另外,无论是在体还是离体实验均发现高压氧治疗可显著增加损伤区 NSCs 的增殖,并通过激活血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)/ERK 信号和增加细胞周期相关蛋白的表达在 TBI 治疗过程中发挥神经保护作用,然而使用 VEGFR2 抑制剂干预可显著抑制此效果^[20]。

3 骨髓间充质干细胞移植治疗 TBI

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是源于胚胎中胚层和外胚层的具有高度自我复制能力和多向分化潜能的一类细胞。BMSCs 可分化成骨、软骨、肌肉、脂肪和造血支持细胞,并且可被诱导靶向分化为神经元和星形胶质细胞等神经系统细胞。与胚胎干细胞和 NSCs 比较, BMSCs 是临床上最佳选择。BMSCs 可以从患者自身骨髓中获得,不仅对患者损害轻微,而且避免了伦理,免疫排斥和致瘤性等问题。近年来, BMSCs 在很多疾病中都表现出了较好的治疗效果,包括帕金森, TBI 和脑卒中等神经系统疾病。

BMSCs 在 2001 年首次用于 TBI 治疗。有研究者将全部骨髓移植于脑皮质损伤区域周围,1 个月后发现,有些细胞可存活并迁移至损伤区,表达为成熟神经元和胶质细胞样细胞,甚至机体运动能力也提高了。此外运动可进一步提高 BMSCs 移植的治疗效果^[21]。与此同时,又尝试经静脉和动脉路径移植 BMSCs 至 TBI 大鼠,两种方法都证实细胞可在宿主体内存活,迁移到损伤区并分化为神经系统样细胞,且促进大脑皮层的神经细胞再生^[22-23]。这提示尽管 BMSCs 移植路径不同,但均具有改善 TBI 的效果。且静脉移植方法可显著降低 TBI 诱导的运动能力和神经功能损伤^[22];动脉移植尽管可引起细胞栓形成和降低机体血流速度,但较静脉移植可以更好的将 BMSCs 分布至宿主病灶^[23]。也有研究发现在 TBI 7 天后移植 BMSCs,移植的细胞可在宿主脑内存活 3 个月,并持续改善机体神经功能^[24]。在一项对人类的研究中发现,将 BMSCs 移植到 10 位 TBI 患者体内,经 GCS 量表评估显示其中 7 位患者的神经功能得到显著改善,且所有患者在移植治疗后均未出现副作用^[25]。以上结果揭示无论在动物还在人类的研究中, BMSCs 的移植在治疗 TBI 过程中均起到了重要作用。尽管 BMSCs 移植促进 TBI 神经功能的改善,然而其中的分子机制尚不清楚。有研究显示在脑损伤区移植 BMSCs 可通过增加脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和 VEGF 及突触蛋白(synuclein, SYN) 的表达改善神经功能^[26]。此外,采用 TBI 小鼠模型发

现, BMSCs 移植的第3天到第28天小鼠神经功能和脑水肿得到明显改善, 在此过程中伴随着脑损伤区域的巨噬细胞、嗜中性粒细胞、CD3淋巴细胞和凋亡细胞数量的显著减少及促炎细胞因子表达水平的降低^[27]。另一个值得关注的问题是 BMSCs 具有抑制淋巴细胞的能力, 在离体和在体的研究中均发现 BMSCs 可显著降低淋巴细胞的增殖反应, 这可能会对减少 TBI 的继发性损伤有关^[28]。目前出现改良版 BMSCs 移植方法以增加其对 TBI 的治疗效果, 包括转染外源基因于 BMSCs, 选用药物或神经营养因子和 BMSCs 联合移植, 使用明胶海绵等生物材料联合 BMSCs 移植等。有研究显示在 TBI 小鼠模型中注射过表达超氧化物歧化酶 2(Superoxide Dismutase2, SOD2) 的 BMSCs 能够保护及避免由过氧化氢诱导的细胞凋亡、炎症反应及对血脑屏障的破坏, 最终促进神经功能恢复^[29]。此外, 较单独移植, BMSCs 与明胶海绵的联合移植能更好的促进皮质脊髓束的轴突再生, 且显著改善 TBI 小鼠的运动和认知功能^[14]。

4 造血干细胞移植治疗 TBI

造血干细胞(hemopoietic stem cells, HSCs)指骨髓中、外周血和脐带血中存在的尚未发育成熟干细胞, 具有自我更新和多向分化潜能的多功能细胞, 是免疫细胞和造血细胞的始祖细胞。体外和体内实验均证实 HSCs 可以分化为神经细胞^[30]。可能的原因是: ①HSCs 作为骨髓的主要成分, 可以分化为神经元或神经前体细胞; ②HSCs 可能分化为其他具有分化潜能的干细胞, 而这些干细胞恰好可分化为神经元; ③当骨髓或 HSCs 移植后, 移植细胞与神经系统细胞或成熟髓鞘细胞发生融合时就会启动转化分化现象。因此, HSCs 可改善和促进神经功能损伤修复, 从而被广泛用于治疗脑缺血和创伤性中枢神经系统疾病^[30]。

目前关于外周血源 HSCs 在神经系统疾病的应用并不多见, 而多集中在对骨髓源 HSCs (BM-HSCs) 和脐带血源 HSCs (umbilical cord blood, UCB-HSCs) 的研究。研究发现 CD34⁺ 细胞 (CD34 是 HSCs 的生物学特异标记物) 在缺血性中风、心肌梗塞和 TBI 发生时可快速进入外周血中, 最后迁移至损伤组织周围启动血管生成, 从而发挥保护应答机制^[31]。鉴于此, 2008 年, 临床第一例非胚胎源干细胞移植获批, 取 TBI 儿童自身骨髓进行移植, 随后评估其安全性和疗效^[17]。人源 UCB-HSCs 移植到新生鼠脑室下区, 1 个月后发现约 20% 细胞表达 GFAP 和经典微管蛋白, 表明移植细胞分化为星形胶质细胞和神经元细胞, 且有效地促进组织损伤的修复^[32]。在慢性 TBI 动物模型中发现, UCB-HSCs 通过减少炎症反应和脑组织损失, 促神经生成及营救学习记忆等神经功能发挥神经保护作用^[33]。在 4 例 UCB-HSCs 移植患者中使用 Fugl-Meyer 评估 (FMA) 和功能独立测量 (FIM) 进行评估

发现 TBI 导致的运动能力和神经功能损伤得到了改善。因此, UCB-HSCs 移植可能是治疗 TBI 后遗症患者的一种潜在治疗方法^[34]。动物实验研究发现 UCB-HSCs 联合粒细胞集落刺激因子 (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) 比它们单独给予更可显著促进阿尔兹海默、脑卒中及 TBI 等中枢神经疾病的功能恢复, 并更显著降低神经系统内的炎症反应^[35]。

5 展望

目前干细胞移植面临多个困难: 移植细胞与宿主之间免疫排斥反应大; 在宿主体内存活能力差, 尤其在损伤程度严重时, 其存活率更低; 伦理学挑战; 伴随致瘤性, 呼吸系统不适性和血管内细胞栓塞等副作用而缺乏安全性和可靠性; 干细胞移植在疾病发生病程中介入的时间、介入的方式 (局部定向注入, 动/静脉注入, 枕大池穿刺和腰大池注入) 尚需要进一步研究。

针对干细胞疗法的困难, 研究者也积极地提出解决方案, 比如: 采用生物材料辅助细胞移植增加细胞体内存活率; 干细胞和支持细胞联合移植增加干细胞存活和分化能力; 神经营养因子和细胞移植联合治疗改善损伤处微环境; 使用自体细胞移植和免疫抑制剂减少宿主去移植细胞的排斥, 以及利用基因克隆技术修饰移植细胞或使外源基因稳定转染并长期表达。

参考文献

- [1] 周静, 杨磊, 赵瑞, 等. 双重任务在脑外伤康复中应用的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32 (11):95—98.
- [2] 郑磊, 朱建国, 袁栋才. 脑卒中后内源性神经修复的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 29 (1):95—98.
- [3] Algattas H, Huang JH. Traumatic Brain Injury pathophysiology and treatments: early, intermediate, and late phases post-injury[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(1):309—341.
- [4] Bengtson JF, Phenix RA, Bernett A, et al. Neurobehavioral Effects of Levetiracetam in Patients with Traumatic Brain Injury[J]. Front Neurol, 2013, 4:195.
- [5] Andrews PJ, Sinclair HL, Rodriguez A, et al. Therapeutic hypothermia to reduce intracranial pressure after traumatic brain injury: the Eurotherm3235 RCT[J]. Health Technol Assess, 2018, 22(45):1—134.
- [6] Fu XM, Liu SJ, Dan QQ, et al. Combined Bone Mesenchymal Stem Cells and Olfactory Ensheathing Cells Transplantation Promote Neural Repair Associated with CNTF Expression in Traumatic Brain-Injured Rats[J]. Cell Transplant, 2015, 24(8):1533—44.
- [7] Shear DA, Tate MC, Archer DR, et al. Neural progenitor cell transplants promote long-term functional recovery after traumatic brain injury[J]. Brain Res, 2004, 1026:11—22.
- [8] Englund U, Bjorklund A, Wictorin K, et al. Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and in-

- tegrate into host cortical circuitry[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:17089—17094.
- [9] Haus DL, López-Velázquez L, Gold EM, et al. Transplantation of human neural stem cells restores cognition in an immunodeficient rodent model of traumatic brain injury[J]. Exp Neurol, 2016, 281:1—16.
- [10] Becker A, Peleg K, Olsha O, et al. Analysis of incidence of traumatic brain injury in blunt trauma patients with Glasgow Coma Scale of 12 or less[J]. Chin J Traumatol, 2018, 21(3):152—155.
- [11] Nudi ET, Jacqmain J, DubbsK, et al. Combining enriched environment, progesterone, and embryonic neural stem cell-therapy improves recovery after brain injury[J]. J Neurotrauma, 2015, 32:1117—1129.
- [12] Yu P, Li S, Zhang Z, et al. Progesterone-mediated angiogenic activity of endothelial progenitor cell and angiogenesis in traumatic brain injury rats were antagonized by progesterone receptor antagonists[J]. Cell Prolif, 2017, 50(5):doi:10.1111/cpr.12362.
- [13] Duan H, Li X, Wang C, et al. Functional hyaluronate collagen scaffolds induce NSCs differentiation into functional neurons in repairing the traumatic brain injury [J]. Acta Biomater, 2016, 45:182—195.
- [14] Weston NM, Sun D. The Potential of Stem Cells in Treatment of Traumatic Brain Injury[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2018, 18(1):1.doi:10.1007/S11910-018-0812-2
- [15] Zhu J, Zhou L, XingWu F. Tracking neural stem cells in patients with brain trauma [J]. N Engl J Med, 2006, 355:2376—2378.
- [16] Jeong CH, Kim SM, Lim JY, et al. Mesenchymal stem cells expressing brain-derived neurotrophic factor enhance endogenous neurogenesis in an ischemic stroke model[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(4):129145.
- [17] Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke[J]. Brain, 2008, 131 (Pt 3):616—629.
- [18] Liu SJ, Zou Y, Belegu V, et al. Co-grafting of neural stem cells with olfactory ensheathing cells promotes neuronal restoration in traumatic brain injury with an anti-inflammatory mechanism[J]. J Neuroinflamm, 2014, 11(1):66.
- [19] Sullivan GM, Armstrong RC. Transplanted Adult Neural Stem Cells Express Sonic Hedgehog In Vivo and Suppress White Matter Neuroinflammation after Experimental Traumatic Brain Injury[J]. Stem Cells Int, 2017, 2017:9342534.
- [20] Yang Y, Wei H, Zhou X, et al. Hyperbaric oxygen promotes neural stem cell proliferation by activating vascular endothelial growth factor/extracellular signal-regulated kinase signaling after traumatic brain injury[J]. Neuroreport, 2017, 28(18):1232—1238.
- [21] Shin MS, Park HK, Kim TW, et al. Neuroprotective effects of bone marrow stromal cell transplantation in combination with treadmill exercise following traumatic brain injury[J]. Int Neurol J, 2016, 20(Suppl 1):S49—56.
- [22] Anbari F, Khalili MA, Bahrami AR, et al. Intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells promotes neural regeneration after traumatic brain injury [J]. Neural Regen Res, 2014, 9(9):919—23.
- [23] Freyman T, Polin G, Osman H, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2006, 27(9):1114—1122.
- [24] Shen Q, Yin Y, Xia QJ, et al. Bone Marrow Stromal Cells Promote Neuronal Restoration in Rats with Traumatic Brain Injury: Involvement of GDNF Regulating BAD and BAX Signaling[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(2):748—62.
- [25] Zhang R, Liu Y, Yan K, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cell transplantation in experimental traumatic brain injury[J]. J Neuroinflamm, 2013, 10:106.doi:10.1186/1742-2094-10-106
- [26] Feng Y, Ju Y, Cui J, et al. Bone marrow stromal cells promote neuromotor functional recovery, via upregulation of neurotrophic factors and synapse proteins following traumatic brain injury in rats[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(1):654—660.
- [27] Reis C, Gospodarev V, Reis H, et al. Traumatic brain injury and stem cell: pathophysiology and update on recent treatment modalities. stem cells int, 2017;2017:6392592. doi:10.1155/2017/6392592.
- [28] Hasan A, Deeb G, Rahal R, et al. Mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic brain injury[J]. Front Neurol, 2017, 8:28.doi:10.3389/fneur.
- [29] Shi X, Bai Y, Zhang G, et al. Effects of over-expression of SOD2 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells on traumatic brain injury[J]. Cell Tissue Res, 2018, 372(1):67—75.
- [30] de Munter JP, Wolters E. 70th Birthday symposium of Prof. Dr. Riederer: autologous adult stem cells in ischemic and traumatic CNS disorders[J]. J Neural Transm, 2013, 120(1):91—102.
- [31] Guo X, Liu L, Zhang M, et al. Correlation of CD34⁺ cells with tissue angiogenesis after traumatic brain injury in a rat model[J]. J Neurotrauma, 2009, 26(8):1337—1344.
- [32] Ghanjati F, Santourlidis S. Effect on multipotency and phenotypic transition of unrestricted somatic stem cells from human umbilical cord blood after treatment with epigenetic agents[J]. Stem Cells Int, 2016, 2016:7643218.
- [33] Tajiri N, Acosta S, Glover LE, et al. Intravenous grafts of amniotic fluid-derived stem cells induce endogenous cell proliferation and attenuate behavioral deficits in ischemic stroke rats[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e43779.
- [34] Wang S, Cheng H, Dai G, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury[J]. Brain Res, 2013, 26:76—84.
- [35] Zibara K, Ballout N, Mondello S, et al. Combination of drug and stem cells neurotherapy: Potential interventions in neurotrauma and traumatic brain injury[J]. Neuropharmacology, 2018; pii: S0028-3908(18):30694-4.