

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.10.026

[http://www.crter.org]

曲艺, 孙正巍, 杨东波, 蒋传路. 神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(10):1876-1883.

神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤*

曲艺^{1,2}, 孙正巍¹, 杨东波¹, 蒋传路¹

1 哈尔滨医科大学附属第二临床医学院神经外科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

2 齐齐哈尔市第一医院脑外分院, 黑龙江省齐齐哈尔市 161005

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 成年哺乳动物的大脑皮质、海马、嗅球、脊髓等部位存在具有多向分化潜能的细胞球, 通过机械分离法和胰酶消化法可以将神经干细胞分离出来, 研究发现侧脑室的脑室下区和海马齿状回的颗粒下层是神经干细胞的聚集区域。

2 文章增加的新信息: ①神经干细胞体外培养多采用无血清的培养基, 添加一些生长因子如表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子以及 B27 等, 可促进细胞长期分裂增殖。②神经干细胞移植的途径分为脑内移植、血液移植和脑脊液内移植。③神经干细胞移植的时间窗应选择在实验动物脑缺血两三周后, 该时间段在梗死区周围皮质促进神经元生长的基因上调, 并且可以诱导内源性神经干细胞迁移, 在脑缺血损伤早期和晚期其微环境均不适合细胞的存活。

3 临床应用的意义: 缺血性脑卒中的神经干细胞移植治疗还处于实验阶段, 存在一些问题需要解决, 临床应用还需要进一步研究来实现。

关键词:

干细胞; 干细胞综述; 神经干细胞; 干细胞移植; 缺血性脑损伤; 细胞培养; 机械分离法; 胰酶消化法; 巢蛋白; 波形蛋白 1; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷; 神经元特异性烯醇化酶; 脑内移植; 立体定向移植

摘要

背景: 近年来, 神经干细胞移植已成为治疗神经退行性疾病和中枢神经系统损伤的研究热点。

目的: 探讨神经干细胞的定向分化调控机制和神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤的研究进展。

方法: 以“neural stem cells, stem cell transplantation, ischemic brain injury”为检索词, 检索 Pubmed 数据库 1990 至 2012 年相关文献; 以“神经干细胞, 干细胞移植, 缺血性脑损伤”为检索词, 检索 CNKI 数据库 2005 至 2012 年相关文献。分析神经干细胞的定向分化调控机制和神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤的内容, 排除重复研究。

结果与结论: ①体外分离培养的神经干细胞有胚胎来源、脐血来源和成体来源, 主要采用机械分离法和胰酶消化法进行分离。②目前体外培养的神经干细胞分离鉴定的标记物有巢蛋白、波形蛋白 1、5-溴脱氧尿嘧啶核苷、神经元特异性烯醇化酶等。③神经干细胞的分化调节是通过正负双重作用实现的, 负性调节是通过对称性的分裂来增加神经干细胞数量, 包括 Notch 信号途径和一些生长因子等。正性调节诱导神经干细胞分化, 包括参与细胞合成的骨形态发生蛋白信号途径等。④神经干细胞移植的时间窗选择在实验动物脑缺血两三周后, 时间过早和过晚均不适合细胞的存活。神经干细胞通过脑立体定位仪直接进行脑内移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤, 移植后可见细胞在局灶性脑缺血大鼠脑室内和梗死中心均可长期存活, 并可广泛迁移, 移植神经干细胞后观察到其运动行为学评分有明显提高。缺血性脑卒中的神经干细胞移植治疗还存在一些问题需要解决, 未来的临床应用前景广阔, 是缺血性脑卒中患者的新希望。

Neural stem cell transplantation for treatment of focal cerebral ischemia injury in rats

Qu Yi^{1,2}, Sun Zheng-wei¹, Yang Dong-bo¹, Jiang Chuan-lu¹

1 Department of Neurosurgery, Second Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

曲艺★, 1980年生, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 汉族, 哈尔滨医科大学在读硕士, 主治医师, 主要从事神经外科研究。

qili99310@yahoo.com.cn

通讯作者: 杨东波, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 哈尔滨医科大学附属第二临床医学院神经外科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

Ydb2112053@yahoo.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2013)10-01876-08

收稿日期: 2012-11-06

修回日期: 2013-02-02

(20121012005/LYL·C)

Qu Yi★, Studying for master's degree, Attending physician, Department of Neurosurgery, Second Clinical Medical College of Harbin Medical University, Haerbin 150086, Heilongjiang Province, China
qili99310@yahoo.com.cn

Corresponding author: Yang Dong-bo, Doctor, Associate chief physician, Associate professor, Master's supervisor, Department of Neurosurgery, Second Clinical Medical College of Harbin Medical University, Haerbin 150086, Heilongjiang Province, China
Ydb2112053@yahoo.com

Received: 2012-11-06
Accepted: 2013-02-02

2 Branch Hospital of Brain Surgery, the First Hospital of Qiqihar City, Harbin 161005, Heilongjiang Province, China

Abstract

BACKGROUND: In recent years, neural stem cell transplantation for the treatment of neurodegenerative diseases and central nervous system injury has become the research focus.

OBJECTIVE: To investigate the research progress of directed differentiation regulation mechanism of neural stem cells and neural stem cell transplantation for the treatment of focal cerebral ischemia injury.

METHODS: The PubMed database and CNKI database were searched for the related articles from 2005 to 2012 with the key words "neural stem cells, stem cell transplantation, ischemic brain injury" in English and Chinese. The articles on the directed differentiation regulation mechanism of neural stem cells and neural stem cell transplantation for the treatment of focal cerebral ischemia injury were selected, and the repetitive articles were eliminated.

RESULTS AND CONCLUSION: The *in vitro* isolated and cultured neural stem cells included embryo-derived stem cells, umbilical cord blood-derived stem cells and adult-derived stem cells, and the stem cells were mainly isolated with mechanical separation and trypsin digestion methods. At present, the makers used to identify the *in vitro* cultured neural stem cells included nestin, vimentin 1, 5-bromodeoxyuridine and neuron-specific enolase. The differentiation of the neural stem cells could be achieved through the positive and negative regulation, and the negative regulation could increase the number of neural stem cells through symmetry splitting, including the Notch signaling pathway and other growth factors, while the positive regulation could induce the differentiation of neural stem cells, such as the bone morphogenetic protein signaling pathways involved in cell synthesis. The best time to neural stem cell transplantation was 2-3 weeks after brain ischemia, and it was not suitable for cell survival when transplanted too early and too late. Neural stem cell transplantation through brain stereotaxic instrument had positive effect on the treatment of focal cerebral ischemia injury. The neural stem cells could long-term survive in the ventricle and infarct center of rats with focal cerebral ischemia and the cells could migrate widely. Motion behavior scores were significantly increased after neural stem cell transplantation. The neural stem cell transplantation for the treatment of ischemic stroke still need to be searched, but the neural stem cell transplantation had wide clinical application prospects in the future which is considered as the new hope for the patients with ischemic stroke.

Key Words: stem cells; stem cell review; neural stem cells, stem cell transplantation; ischemic brain injury; cell culture; mechanical separation; trypsin digestion; nestin; vimentin; 5-bromodeoxyuridine; neuron-specific enolase; intracerebral transplantation; stereotaxis transplantation

Qu Y, Sun ZW, Yang DB, Jiang CL. Neural stem cell transplantation for treatment of focal cerebral ischemia injury in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(10):1876-1883.

0 引言

神经干细胞是指中枢神经系统中, 具有自我更新能力和多向分化潜能的多能性干细胞, 可定向诱导分化为成熟的脑细胞, 神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞, 是修复神经系统损伤的理想种子细胞, 为治疗神经系统疾病提供新的研究方向。1992年, Reynolds等^[1]研究成年小鼠的纹状体发现从中可以分离出具有多向分化潜能, 而且会有不断增殖的细胞球, 建立的神经干细胞球样克隆扩增, 打破了中枢神经系统不存在神经干细胞的理论, 此后的研究发现神经干细胞存在于大脑皮质、海马、嗅球、脊髓等部位^[2-4], 成年哺乳动物侧脑室的脑室下区和海马齿状回的颗粒下层是神经干细胞的聚集区域^[5-7]。神经干细胞通过自我更新来维持稳定的细胞数量, 主要通过以下两种方式实现^[8], 一是通过对称分裂的形式产生2个子代的干细胞, 另一种方式是通过不对称的分裂产生1个干细胞和1个分化的细胞, 此分化的细胞还能进一步分化成为成熟的神经细胞。体外培养的神经干细胞可以连续传代3年, 同时可以始终保持未分化的状态, 在体内可以持续保持自我更新的特性。神经干细胞能够分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞, 同时分化的过程还与局部组织的微环境相关^[9]。

神经干细胞最重要的特征是具有自我更新和多向分化潜能, 此外, 神经干细胞还具有以下几个方面特征。①神经干细胞可以对损伤的部位具有反应能力。产生新生的神经细胞, 对神经组织修复具有再生功能。②神经干细胞具有迁移作用以及良好的组织相容性。正常的神经发育过程中, 神经干细胞是沿着发育索进行迁移的, 当神经损伤发生后, 内源性神经干细胞可以从脑室向神经损伤区域方向迁移。此外, 用于移植的外源性神经干细胞也具有迁移的作用, 经静脉或动脉移植的神经干细胞也可以优先迁移到脑损伤部位, 达到神经修复的目的^[10]。③神经干细胞具有较低的免疫原性。神经干细胞是未分化的细胞, 不会表达成熟细胞的抗原, 免疫原性低, 在移植后很少会引起排斥反应, 使移植的神经干细胞有利于存活^[11]。

神经干细胞作为移植细胞或载体, 神经干细胞还具有许多治疗优点: ①神经干细胞能够建立不同的干细胞株系。②神经干细胞可以分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞, 与宿主组织细胞结合后无免疫反应。③神经干细胞能够远距离迁移和扩散, 移植后无肿瘤细胞的形成。④移植后的神经干细胞在宿主的中枢神经系统无任何损害, 不干扰正常的脑功能。⑤神经干细胞基因表达稳定, 并且能够维持的时间较长。⑥神经干细胞同时还具有可调控性。⑦在治疗中枢神经系统疾病过程中, 移植神经干细胞不会受到血脑屏障的限制, 能直接运送基因产物或者直接替换损伤神经细胞的功能。神经干细胞由于具有以上特性和优点, 使其成为目前生物医学领域研究的热点。文章对神经干细胞的定向分化调控机制和神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤作一综述。

1 资料和方法

1.1 资料来源 由第一作者在2013年1月进行检索。检索PubMed数据库和CNKI数据库。英文检索时间范围为1990至2012年, 中文检索时间范围为2005至2012年。英文检索词“neural stem cells, stem cell transplantation, ischemic brain injury”; 中文检索词“神经干细胞, 干细胞移植, 缺血性脑损伤”。

1.2 入选标准

纳入标准: ①研究原著类文献, 论点论据可靠的文章。②研究观点明确, 分析客观全面的文章。

排除标准: 与文章研究目的无关, 重复性研究。

1.3 质量评估 计算机初检得到1 768篇文献, 中文612篇, 英文1 156篇。阅读标题和摘要进行初筛, 排除研究目的无关的文献, 共保留45篇与神经干细胞的定向分化调控机制和神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤研究相关文献。

2 结果

2.1 神经干细胞定向分化调控机制研究

2.1.1 神经干细胞的培养分离 体外分离培养的神经干细胞有胚胎、脐血和成体来源, 人神经干细胞系是最有希望用来移植治疗缺血性脑卒中的外源性干细胞, 目前研究较多是来自人畸胎瘤细胞系。

分离神经干细胞的方法主要有机械分离法和胰酶消化法。机械分离法是将组织块剪碎, 对神经球用吸管等反复吹打, 使之分散。胰蛋白酶法是将神经球细胞分离成单个细胞, 通过过滤和离心制成单细胞悬液。神经干细胞常用3种方法进行分离纯化。①反复传代法: 在无血清的培养基中培养神经干细胞, 同时培养基中含多种具有神经营养作用的因子, 使神经干细胞在体外培养中可以稳定并有效的扩增。经过长期反复的传代培养, 可以使神经干细胞得到纯化。②流式细胞分选法^[12]: 用一些特异性表面标记物对神经干细胞进行荧光染色, 使荧光抗体与细胞表面标记结合, 应用流式细胞仪对细胞悬液中的神经干细胞分选。③免疫磁珠法^[13]: 是将特异性的抗体包裹在磁珠的表面, 与神经干细胞表面的抗原分子结合, 使抗原和抗体发生免疫反应, 神经干细胞表面结合的磁珠, 在磁场作用下阴性细胞被洗脱掉, 结合有磁珠的神经干细胞被分离出来, 在脱离磁场作用后洗脱下来的细胞即是分离纯化的神经干细胞。

神经干细胞的体外培养条件与一般细胞培养有所不同, 目前, 国内外较多采用无血清培养基来进行神经干细胞培养^[14], 并在体外培养的同时添加一些生长因子, 如表皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子以及B27等。由于血清的成分复杂, 还含有很多营养物质, 如维生素、贴壁因子、矿物质等, 以及一些抗体、补体等成分, 这些都是普通细胞培养的常用成分, 对细胞的生长具有积极的促进作用。但是, 血清中的

一些物质对细胞培养也起到干扰作用, 不利于维持神经干细胞的未分化培养。因此, 在进行神经干细胞培养时, 常采用不含血清的DMEM/F12培养基来完成神经干细胞体外培养, 进行诱导分化使用^[15]。生长因子在神经干细胞的培养和增殖分化中起到重要作用, 碱性成纤维细胞生长因子是体外培养神经干细胞最常用的促分裂增殖因子, 在无血清培养基中可促进神经干细胞的分裂增殖, 抑制神经干细胞的分化, 在神经干细胞的培养中主要是对神经元前体细胞增殖起作用。培养基中的辅助因子如B27等, 在体外培养神经干细胞过程中, 还起到长期分裂增殖的作用。

体外培养神经干细胞的过程中要注意以下2个方面。首先, 在细胞培养过程中如果出现死细胞、细胞碎片及细胞分解产物等要及时清理, 由于这些细胞具有细胞毒性, 会影响到神经干细胞的增殖以及使细胞特性降低。另外, 对神经干细胞的生长密度有一定要求^[16], 即神经干细胞生长的密度依赖性, 如细胞生长密度过低, 细胞间会缺乏有效的连接, 导致细胞增殖的停止和分化障碍, 如果细胞生长密度过高, 会导致细胞的聚集成分, 这样会抑制细胞的生长繁殖。

2.1.2 神经干细胞的标记物 为了对体外培养的神经干细胞进行分离鉴定, 对神经干细胞细胞表面标记物进行研究, 目前研究的标记物有巢蛋白、波形蛋白1、5-溴脱氧尿嘧啶核苷、神经元特异性烯醇化酶等。

巢蛋白属于VI型中间丝纤维蛋白, 是未分化状态多能干细胞的抗原标记物, 是主要细胞骨架蛋白, 存在于神经上皮的干细胞, 巢蛋白在分裂增殖能力旺盛的神经前体细胞中高表达^[17], 调节其增殖分化成熟, 在胚胎发育早期发挥作用^[18]。巢蛋白在神经细胞形成期开始高表达, 在神经细胞迁移和分化后逐渐消失, 向终末细胞神经元、星形和少突胶质细胞分化为低表达, 并逐渐减弱^[19], 因此, 巢蛋白是神经干细胞特征性的生物学标记物, 是原始神经细胞的标记物之一。

波形蛋白1是属于III类中间丝蛋白, 紧跟着巢蛋白在神经前体细胞表达, 当细胞分化完成后低表达, 并逐渐下降, 是神经干细胞的一种表面标记物^[20]。

5-溴脱氧尿嘧啶核苷是胸腺嘧啶的衍生物, 在正常动物体内不存在, 经腹腔注射, 可以代替胸腺嘧啶

在DNA合成期活体注射或细胞培养加入, 并可于细胞核内DNA相结合, 主要是用来标记分裂期的神经细胞, 利用抗5-溴脱氧尿嘧啶核苷单克隆抗体来显示细胞的增殖^[21]。5-溴脱氧尿嘧啶核苷的标记是用于分析培养神经细胞的分裂周期以及展示中枢神经系统细胞增殖^[22]。近期的研究中发现, 5-溴脱氧尿嘧啶核苷主要用于干细胞的鉴定, 当干细胞增殖缓慢鉴定有利于在分裂过程中和细胞DNA进行整合^[23-26]。

神经元特异性烯醇化酶是神经元特有的一种酸性蛋白酶, 是神经元特异性标志蛋白, 在神经细胞能量代谢过程中参与糖酵解过程的关键酶, 主要存在于中枢神经系统的神经元和神经内分泌细胞内, 通过反转录聚合酶链式反应半定量检测确定神经元的数目, 进而判断神经干细胞是否向神经元细胞分化。胶质纤维酸性蛋白是星形胶质细胞的标志蛋白。髓磷脂碱性蛋白是单链的灵活多肽, 位于致密的髓鞘与髓核中, 用于少突胶质细胞的鉴定。

通过流式细胞技术可以对神经干细胞表面分子标记, 神经干细胞表达不同分化抗原分子, 如CD133⁺、CD34⁻、CD45⁻等。

2.1.3 神经干细胞的分化调节机制 神经组织在损伤后, 可以通过内源性干细胞或前体细胞进行自我修复, 这一过程就需要通过神经干细胞的自身调节机制来完成。神经干细胞的调节作用是由正负双重作用来实现的。负性调节是使神经干细胞不分化, 对称性分裂来增加神经干细胞数量, 主要通过Notch信号途径和一些生长因子来完成^[27], Notch信号途径是一种抑制性的信号传导通路, 可以抑制正在分化的神经干细胞及其周围的细胞不向神经元分化, 而发育成上皮细胞, 使神经细胞从原来的单层细胞中分离。Notch信号其跨膜受体和配体的结合而激活。Notch受体是整合型膜蛋白, 其胞外区含数量不等的表皮生长因子样重复序列, 该序列与果蝇Notch配体DSL或线虫Notch配体Lag2或脊椎动物Notch配体Jagged相结合, 从而使Notch受体胞内部分脱落并移入胞核, 结合并激活靶基因CSL, 该基因也被称作CBF-1, 无毛抑制子或LAG-1, 直接或间接刺激转录。

诱导神经干细胞分化的正性调节, 包括参与细胞合成的gp130/JAK/Stat3和骨形态发生蛋白信号途径

等。骨形态发生蛋白信号途径通过瞬时复合体 Stat3/CBP/Smad 的介导诱使神经干细胞向星形细胞分化^[28]。神经干细胞向神经元分化是由神经元碱性螺旋-环-螺旋转录因子包括 Mash1、Ngn1、Ngn2 和 Math 家族来正性调控^[29-30]，骨形态发生蛋白信号可被 Hes1 和 Hes5 抑制^[31]。Mash1 突变鼠嗅球 Notch 信号途径不能被激活，不能产生感觉神经元前体细胞；Ngn1 突变鼠可产生感觉神经元前体细胞，但该细胞缺乏必要调节分子的表达，因此分化受阻^[32]。此外 Ngn1 可使 CBP-Smad1 转录复合体与星形细胞分化基因隔离，并抑制向胶质细胞分化所必须的 STAT 转录因子活性因而抑制神经干细胞向胶质细胞分化^[33]。

2.2 神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤 神经干细胞移植治疗脑缺血理想的目标是将缺血区受损的神经元能被同型神经元所替代，诱导局部血管再生使移植的神经干细胞长期存活。移植神经元能与周围细胞建立突触联系。胶质细胞辅助移植神经元形成髓鞘。

2.2.1 神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤的方法^[34]

神经干细胞培养：取胎龄 8-10 d 的 Wistar 胎鼠，切开脑组织，去除硬脑膜，机械剪切吹打后经 80 目滤网过滤成单细胞悬液，Hanks 液冲洗 3 次，1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清。神经干细胞培养液重悬细胞，以体积比 20:1 加入 B27，青霉素 100 mg/L，链霉素 100 mg/L，碱性成纤维细胞生长因子 20 $\mu\text{g/L}$ ，表皮生长因子 20 $\mu\text{g/L}$ ，细胞计数后以 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$ 种植于 25 mL 培养瓶中，置于含有 5% 二氧化碳培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 常规培养，三四天换液 1 次，7-10 d 传代 1 次。

动物模型制备：健康成年雄性 Wistar 大鼠，体质量 (280 \pm 20) g，10% 水合氯醛 0.4 g/kg 腹腔注射麻醉，Longa 线栓法制作右侧大脑中动脉局灶性脑缺血模型。

免疫细胞化学染色：细胞传至第 5 代时将细胞移植于经多聚赖氨酸处理的培养板中，培养液为含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12，培养六七天后用丙酮固定，0.1% Triton X-100 处理，相应一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，PBS 冲洗后与生物化二抗在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h，DAB 染色，苏木精复染后封固。

细胞标记和神经干细胞移植：细胞传至第 5 代 3 d 后，更换培养液，在神经干细胞培养液中加入 5-溴脱氧尿嘧啶核苷至终浓度 10 mg/L，待神经球再次形成时，收集并吹打使之分离，离心后弃上清待用。将模型大鼠固定于脑立体定向仪上，双侧耳棒刻度精确相同，齿棒在水平线下方 2 mm，头部正中切开头皮，暴露前囟，侧脑室注射点为前囟向尾侧 0.8 mm，中线偏外侧 0.2 mm，注入深度 3.0 mm，用微量注射器 10 min 注完神经干细胞，结束后留针 5 min，骨蜡封闭骨窗。

2.2.2 神经干细胞移植的途径及部位 目前神经干细胞移植主要包括 3 种途径，即脑内移植、血液移植和脑脊液内移植。

脑内移植需将大鼠固定于脑立体定位仪，移植点可选损伤中心、损伤边缘、纹状体、海马等^[35-36]。作者曾采用经枕大池及立体定向脑内移植神经干细胞对大鼠脑损伤进行修复，方法是将动物麻醉后，俯卧，消毒颈部并使之拱起，以枕外粗隆和颈椎最高点之间的中点为穿刺点，以 1 mL 注射器进行穿刺，方向为两耳连线的中点，当针尖穿破环枕筋膜有突破感时，回抽有少量脑脊液，穿刺成功。穿刺有突破感后进针不宜超过 2 mm。立体定向移植接受细胞悬液注入^[37]。脑内直接移植是将神经干细胞注入到脑损伤部位，这样可以避开血脑屏障的阻碍，使移植细胞的存活率提高，定位比较集中，是目前神经干细胞移植首选的治疗方法之一^[38]。与其他移植途径相比具有减少细胞迁移的作用，同时局部的微环境不利于移植细胞诱导分化，减少移植细胞在脑外器官损失。但脑内移植的缺点是移植的同时会对脑部造成新的损伤，而且移植的干细胞数量有限。

血液内移植包括静脉移植和动脉移植^[39-40]。静脉移植是通过注射细胞到股静脉和尾静脉进行移植，细胞注射到静脉内进入血液循环，迁移到脑内^[41]。静脉移植主要考虑的是移植的细胞是否会通过血脑屏障，是否会顺利到达脑损伤部位，并迁移和定居。有学者研究发现在对大脑中动脉永久性闭塞大鼠进行神经干细胞移植治疗，使用股静脉和纹状体内移植的方法，研究发现通过股静脉移植大鼠的神经功能恢复比纹状体内移植大鼠的神经恢复较好^[42]。可见静脉内移植神经干细胞在长时间的功能恢复方面，较纹状体内移植效果更好。Chen 等^[43]研究静脉移植细胞可能会

被内脏器官所俘获,真正能够迁移到脑内的细胞数量很少,研究发现大鼠大脑中动脉闭塞模型通过静脉途径注入人的脐血细胞后,仅有1%数量的细胞到达脑内。动脉移植省去静脉移植后细胞长距离迁移及器官的吸收过滤作用^[44],可以将移植的大量神经干细胞很快的带到脑损伤部位,治疗效果优于静脉内移植,但动脉移植操作相对复杂,危险性较高,广泛开展较难。

脑脊液内移植包括脑室移植和蛛网膜下腔内移植。蛛网膜下腔内移植具有创伤小,操作相对简单的特点,是治疗脊髓损伤中常选用的方法,在动物脑损伤模型的治疗中也可以发挥一定的功效,但由于实验操作的要求较高,还有可能引起脑水肿,因此临床推广也很难^[45]。

2.2.3 神经干细胞移植时间窗 干细胞移植时间的选择具有双面性,研究表明移植神经干细胞可以向神经元分化,只是允许成功移植的时间窗非常短暂,在损伤后24 h为急性炎症期,大量炎症因子如白细胞介素1,白细胞介素6和肿瘤坏死因子 α 等都有神经毒性和促胶质细胞分化特性,因此该期的微环境不适于移植的神经干细胞向神经元分化,而在损伤晚期由于囊腔扩大和胶质瘢痕生成而抑制神经轴突生长,因此也不是适当的移植期。

干细胞移植研究目的主要是修复缺血梗死的神经细胞,时间窗的选择应考虑多在实验动物脑缺血两三周后。该时间段在梗死区周围皮质促进神经元生长的基因上调,进而可促进骨架蛋白的形成,轴突的锥性生长,并诱导内源性神经干细胞迁移。此时外源性干细胞的介入会起到协同作用^[46-47]。当研究目的是卒中急性期的神经保护时,干细胞移植时间多在缺血后24 h,该时期脑源性生长因子、血管内皮生长因子、胶质细胞源性生长因子等有益于移植干细胞存活,同时白细胞介素6等炎症因子对移植细胞有损害作用。

2.3 神经干细胞移植治疗大鼠神经功能检测 神经干细胞移植治疗缺血性脑损伤不仅要达到移植细胞可长期存活的目的,更重要的是移植细胞可以与宿主健存的细胞发生突触联系而达到功能恢复。有学者采用爬行计分法^[48],将长2.0 m,宽2.5 cm的木杆,一端抬高45°,术前3 d训练大鼠由低向高处爬,直到熟练爬完全程。将木杆分为4段,每段6分,共24分,4段

得分相加,即其最后得分。计分标准:6分,不能爬、滚落或趴于患侧;5分,患侧肢体拖行;4分,摔下或滑倒>3次;3分,无滑落,但对侧后爪不触及木条侧面;2分,单侧跛行(肌力下降);1分,四肢支撑变宽,位于木条下;0分,正常,无明显缺陷。在脑出血造模后1, 2, 4, 10, 14 d分别进行行为学测试,各组都于14 d在行为测试后全部处死。大鼠模型组神经缺损症状轻微,各移植组和模型组大鼠均出现活动迟缓,易激惹,左侧肢体偏瘫,立行欲倒,侧旋转爬行或拖步行走,前爪抓力减弱等。各组大鼠爬行计分在2 d时最高,4 d时开始逐渐下降;10, 14 d神经干细胞移植的4组大鼠与模型组比较差异有显著性意义($P < 0.01$),而2 d移植组疗效最佳,与1 d移植组、3 d移植组、4 d移植组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)^[49]。

3 总结

缺血性脑卒中是由于脑血管血流中断而导致的脑组织缺血和坏死的一种严重危害人类健康的疾病,尽管近年来使用的溶栓治疗取得很大进展,但由于受到3 h溶栓治疗窗的严格限制,仍是导致患者残疾和死亡的重要原因。神经干细胞移植治疗缺血性脑卒中的基础研究已经取得很大突破,许多具有神经营养作用的因子起到辅助修复神经损伤的作用,主要的神经营养因子有30余种^[50-53],大致可分为以下几类。①神经营养素家族,如神经生长因子、脑源性神经营养因子、神经营养蛋白3等。②细胞因子类生长因子,如白血病抑制因子、血小板源性生长因子、睫状神经营养因子等。③成纤维细胞生长因子,如成纤维细胞生长因子1和成纤维细胞生长因子2。④胰岛素样生长因子,如胰岛素样生长因子1和胰岛素样生长因子2。⑤转化生长因子 β 超家族,如胶质细胞源性神经营养因子和骨形成蛋白等。⑥表皮生长因子家族,如表皮生长因子、转化生长因子、神经调节素等。

神经干细胞在临床应用研究方面要集中在神经干细胞的替代疗法上,从脑组织分离出来的神经干细胞能够成功灌注入到大鼠脑内,神经细胞能够存活、迁移,并与宿主大脑组织连为一体,产生神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,然而这些移植的细胞是否会真正替代神经缺血性损伤的神经元。神经干细胞在充当基因治疗的载体时,自身内源性神经干细胞无法调节达到神经修复作用,除了神经干细胞数量不足

外, 损伤局部的微环境会抑制神经细胞再生, 在此情况下, 单纯移植神经干细胞数量也不会起到修复作用, 可以通过转基因技术将编码神经营养因子等的基因片段导入神经干细胞中, 使神经干细胞在移植部位表达, 改善损伤局部的微环境, 来维持细胞的生存和增殖。在移植的过程中, 要达到治疗目的, 还需要对移植的神经干细胞进行基因修饰, 使其能够在损伤局部产生特殊蛋白质。

国内外的学者们已经应用神经干细胞移植治疗脑缺血、脑出血、中枢神经创伤、退变性脑病以及中枢神经系统肿瘤等, 实验动物治疗已经开展, 部分临床试验取得一定成果^[54-56], 但长期临床应用效果还需要基础实验的支持和临床长期观察, 未来有广阔的应用前景。

目前, 神经干细胞移植治疗脑缺血性损伤还存在一些问题需要解决, 如神经干细胞来源局限, 分离提纯方法复杂, 干细胞来源的伦理学问题, 神经干细胞移植途径造成的损伤以及移植后细胞的修复重建神经环路问题等, 都需要进一步研究来实现, 相信神经干细胞移植是一种有广阔前景的治疗方法, 能为缺血性脑病患者带来新的希望。

作者贡献: 第一作者构思并设计此综述, 第一作者解析相关数据, 所有作者共同起草, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

[1] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*.1992;255(5052):1707-1710.

[2] Panizzo RA, Kyrtatos PG, Price AN, et al. In vivo magnetic resonance imaging of endogenous neuroblasts labelled with a ferumoxide-polycation complex. *Neuroimage*.2009;44(4):1239-1246.

[3] Cacci E, Villa A, Parmar M, et al. Generation of human cortical neurons from a new immortal fetal neural stem cell line. *Exp Cell Res*.2007;313(3):588-601.

[4] Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*.2006;24(4):975-985.

[5] Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*.1997;17(13):5046-5061.

[6] Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*.2000;287(5460):2032-2036.

[7] Weiss S, Dunne C, Hewson J, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci*.1996;16(23):7599-7609.

[8] Egger B, Gold KS, Brand AH. Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the Drosophila optic lobe. *Development*.2010;137(18):2981-2987.

[9] Moyses E, Segura S, Liard O, et al. Microenvironmental determinants of adult neural stem cell proliferation and lineage commitment in the healthy and injured central nervous system. *Curr Stem Cell Res Ther*.2008;3(3):163-184.

[10] Park KI, Liu S, Flax JD, et al. Transplantation of neural progenitor and stem cells: developmental insights may suggest new therapies for spinal cord and other CNS dysfunction. *J Neurotrauma*.1999;16(8):675-687.

[11] Odeberg J, Piao JH, Samuelsson EB, et al. Low immunogenicity of in vitro-expanded human neural cells despite high MHC expression. *J Neuroimmunol*.2005; 161(1-2):1-11.

[12] Morrison SJ, White PM, Zock C, et al. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell*.1999;96(5):737-749.

[13] Miltenyi S, Müller W, Weichel W, et al. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*.1990; 11(2):231-238.

[14] Brannen CL, Sugaya K. In vitro differentiation of multipotent human neural progenitors in serum-free medium. *Neuroreport*.2000;11(5):1123-1128.

[15] Ali H, Jurga M, Kurgonaitė K, et al. Defined serum-free culturing conditions for neural tissue engineering of human cord blood stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*.2009; 69(1):12-23.

[16] Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*.2000;287(5457):1427-1430.

[17] Bertelli E, Regoli M, Fonzi L, et al. Nestin expression in adult and developing human kidney. *J Histochem Cytochem*.2007; 55(4):411-421.

[18] 胡波, 李爱华, 安育林, 等. 不同胎龄人胎脑皮质枕叶神经干细胞的发育特征[J]. *实用儿科临床杂志*, 2007, 22(14):1085-1086.

[19] Maslov AY, Barone TA, Plunkett RJ, et al. Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci*.2004;24(7):1726-1733.

[20] Poliseti N, Chaitanya VG, Babu PP, et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *Neurol India*.2010;58(2):201-208.

[21] Feng SW, Yao XL, Li Z, et al. In vitro bromodeoxyuridine labeling of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*.2005;25(2):184-186.

- [22] Miller MW, Nowakowski RS. Use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to examine the proliferation, migration and time of origin of cells in the central nervous system. *Brain Res.* 1988;457(1):44-52.
- [23] Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 1990;61(7):1329-1337.
- [24] Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425(6960):836-841.
- [25] Tumber T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 2004;303(5656):359-363.
- [26] Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomès D, et al. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol.* 2006;8(7):677-687.
- [27] Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, et al. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev.* 2002;16(7):846-858.
- [28] Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, et al. Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science.* 1999;284(5413):479-482.
- [29] Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, et al. Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J Biol Chem.* 2001;276(48):45031-45040.
- [30] Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, et al. Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron.* 2001;31(5):757-771.
- [31] Ito H, Nakajima A, Nomoto H, et al. Neurotrophins facilitate neuronal differentiation of cultured neural stem cells via induction of mRNA expression of basic helix-loop-helix transcription factors Mash1 and Math1. *J Neurosci Res.* 2003;71(5):648-658.
- [32] Cau E, Casarosa S, Guillemot F. Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development.* 2002;129(8):1871-1880.
- [33] Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, et al. Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell.* 2001;104(3):365-376.
- [34] 杨东波, 叶伟, 李永利, 等. 立体定向移植神经干细胞治疗局灶性大鼠脑缺血损伤的研究[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2006, 19(5):282-285.
- [35] Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology.* 2000;39(5):711-716.
- [36] Zhao LR, Duan WM, Reyes M, et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002;174(1):11-20.
- [37] 杨海城, 康军, 叶伟, 等. 大鼠脑损伤后经枕大池及立体定向脑内移植神经干细胞的对比研究[J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2005, 18(4):201-203.
- [38] Chen JR, Cheng GY, Sheu CC, et al. Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke. *J Anat.* 2008;213(3):249-258.
- [39] Hauger O, Frost EE, van Heeswijk R, et al. MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy. *Radiology.* 2006;238(1):200-210.
- [40] Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40(7):609-619.
- [41] Chu K, Kim M, Park KI, et al. Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Res.* 2004;1016(2):145-153.
- [42] van der Meulen AA, Biber K, Lukovac S, et al. The role of CXC chemokine ligand (CXCL)12-CXC chemokine receptor (CXCR)4 signalling in the migration of neural stem cells towards a brain tumour. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009;35(6):579-591.
- [43] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke.* 2001;32(11):2682-2688.
- [44] Walczak P, Zhang J, Gilad AA, et al. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke.* 2008;39(5):1569-1574.
- [45] Zhang Z, Jiang Q, Jiang F, et al. In vivo magnetic resonance imaging tracks adult neural progenitor cell targeting of brain tumor. *Neuroimage.* 2004;23(1):281-287.
- [46] Carmichael ST. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol.* 2006;59(5):735-742.
- [47] Zhang C, Li Y, Chen J, et al. Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience.* 2006;141(2):687-695.
- [48] Brailowsky S, Knight RT, Blood K, et al. gamma-Aminobutyric acid-induced potentiation of cortical hemiplegia. *Brain Res.* 1986;362(2):322-330.
- [49] 罗文芳, 黎杏群, 罗杰坤, 等. 神经干细胞移植治疗脑出血大鼠模型时间窗的研究[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(7):625-628.
- [50] Schwartz ED, Chin CL, Shumsky JS, et al. Apparent diffusion coefficients in spinal cord transplants and surrounding white matter correlate with degree of axonal dieback after injury in rats. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005;26(1):7-18.
- [51] Lee TH, Kato H, Chen ST, et al. Expression disparity of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in ischemic hippocampal neurons. *Neuroreport.* 2002;13(17):2271-2275.
- [52] Song BW, Vinters HV, Wu D, et al. Enhanced neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor in regional brain ischemia after conjugation to a blood-brain barrier delivery vector. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301(2):605-610.
- [53] Martinez G, Di Giacomo C, Sorrenti V, et al. Fibroblast growth factor-2 and transforming growth factor-beta1 immunostaining in rat brain after cerebral postischemic reperfusion. *J Neurosci Res.* 2001;63(2):136-142.
- [54] 杨清成, 梁长春, 李敏霞, 等. 神经干细胞移植治疗脑卒中后遗症59例[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(20):4033-4035.
- [55] 张怡然, 郭振荣, 陈维亮, 等. 神经干细胞移植治疗大面积脑梗死1例[J]. 实用医学杂志, 2006, 23(8):984.
- [56] 张儒有, 郑永目, 胡韶山, 等. 神经干细胞移植治疗脑卒中后遗症50例临床效果分析[J]. 中国临床康复, 2006, 10(9):138-139.