

干细胞结合生物材料治疗脊髓损伤的研究进展

陈刚^{1,2} 吴骏² 于天飞^{1*}

(1 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院 161006; 2 中国科学院动物研究所干细胞与生殖生物学国家重点实验室 北京 100101)

摘要 脊髓损伤对患者和家庭造成沉重的负担。利用干细胞或其分化细胞移植对受损细胞进行替代治疗,理论上可以治愈脊髓损伤。细胞疗法结合生物材料,可以使移植的细胞克服病灶处缺氧缺血环境而存活下来,并分化为可促进功能恢复的细胞类型,产生较好的治疗效果。干细胞结合生物材料治疗脊髓损伤是当前的研究热点,本文对近年来该领域研究的进展进行综述。

关键词 脊髓损伤 干细胞 生物材料 治疗

脊髓属于中枢神经系统,在脑的调控下控制大部分运动功能传导和简单反射。脊髓损伤(spinal cord injure, SCI)是指外力破坏脊柱造成的组织损伤,一般会导致患者瘫痪,给家庭带来沉重的负担。

1 脊髓损伤概述

SCI分为原发性损伤和继发性损伤。而根据不同的时间又可以分为5个不同阶段:①即刻期(immediate phase):伤后0~2h;②早急性期(early acute phase):伤后2~48h;③亚急性期(subacute phase):伤后2d到2周;④中间期(intermediate phase):伤后2周到6个月;⑤慢性期(chronic phase):伤后6个月以上^[1]。但是,临床上一般将受伤后的前4~5周称为急性期。

整个SCI过程也可以简略概括为前、中、后3期:

①前期:伤处脊髓组织受损,神经元坏死,缺血缺氧诱发神经元凋亡;②中期:急慢性炎症反应,运动神经元、髓鞘包被轴突大量减少;③后期:脊髓萎缩产生囊泡空穴,星形胶质细胞增殖,并浸润损伤的白质和灰质区域形成疤痕组织^[1]。

目前,常规的SCI处理办法有药物治疗,外科手术和康复治疗,但没有可以治愈的方法。

2 干细胞结合生物材料治疗脊髓损伤

当前基础研究的热点是干细胞移植治疗SCI。干细胞(stem cells)是一类具有自我更新、并在一定条件下可分化为多种组织细胞的多潜能细胞,理论上可以在体内分化并替代病变丢失或死亡的细胞类型,从而达到治病的目的。为了使更多的细胞滞留在病灶,研究者通常会采用生物材料作为细胞移植的支架,提供支撑和营养作用。

选择材料时应考虑以下因素:①生物相容性:包括无毒、无免疫原性等;②物理性质:包括材料的机械强度、孔隙大小和内部通道等;③化学性质:包括可降解性、消毒方式和表面分子构造对细胞的影响等;④均一性:包括可规模化制造,无批次个体差异及可商品化等。

目前,干细胞结合生物材料治疗脊髓损伤所用材料很多,其中主要种类及其特点和研究进展叙述如下:

2.1 胶原 胶原(collagen)是细胞外基质中含量最多的蛋白,是细胞支架的主要组成部分。胶原有可降解、无毒副作用等特性,可以与干细胞分化再生优势互补,是SCI细胞移植治疗的良好载体。

中国科学院遗传与发育生物学研究所戴建武研究组对利用胶原材料治疗SCI进行了10多年的研究,在

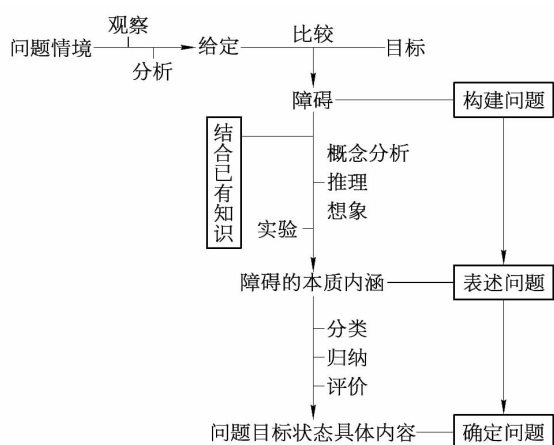


图1 “提出问题”的逻辑

基于已有知识利用“提出问题”的逻辑提出“科学问题”。由于课时限制,学生很难做到逐一经历探究历

程,故可运用案例教学法,将科学探究的逻辑融于案例中,这不仅对教师的专业成长具有促进作用,也利于在学生体验科学探究逻辑的互动中实现有效教学。

(基金项目:福建师范大学“生物科学探究技能案例库”建设项目, No. 0202125; * 通讯作者)

主要参考文献

[1] 应向东. 2006. “科学探究”教学的哲学思考. 课程·教材·教法, 26(5): 64~69
 [2] 杨耀坤. 1994. 科学发现论. 成都: 四川科学技术出版社. 65~67
 [3] 李田. 2011. 科学争论中的逻辑推理——量子革命中的爱因斯坦·玻尔论战. 自然辩证法研究, 27(12): 34~39
 [4] 王荣江. 2005. 牛顿科学的“推理规则”与科学发现的逻辑. 自然辩证法研究, 21(7): 24~28
 [5] 樊琪. 2005. 科学探究技能的内隐与外显学习的比较研究. 心理科学, 28(6): 1375~1378

大鼠和比格犬上取得了一系列令人振奋的成果。他们发现,胶原材料可作为神经祖细胞(neural progenitor cells, NPCs)的支架,并促使其在体内向运动神经元分化^[2]。

Zaminy 等^[3]诱导大鼠骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)分化获得施旺细胞(Schwann cells, SCs),然后将其接种至胶原材料上进行移植。移植后进行的免疫组化染色和行为学评价均表明,材料结合细胞的疗效优于单独材料组和对照组。

Yuan 等^[4]将新鲜猪肌腱切碎、纯化,再分别在 -25℃ 和 -80℃ 冻干获得内外孔径不同的双层胶原膜支架(double-layer collagen membranes scaffold)。该材料内部孔道直径为 100 μm,可为神经干细胞生长、分化提供良好的环境;外部孔道直径小于 10 μm,可通过各种营养因子,同时可防止外周细胞入侵。

2.2 壳聚糖 壳聚糖(chitosan)是甲壳素脱 N-乙酰基的衍生物,是一种无毒、可降解的高分子多糖。

Jian 等^[5]设计并合成了壳聚糖、细胞外基质与 SB216763 的混合材料,该材料可以提高神经干细胞(neural stem cells, NSCs)体外分化为神经元、少突胶质细胞和星形胶质细胞的效率。在半切 SCI 模型大鼠移植实验中,材料组的电生理和运动功能评分(Basso, Beattie, Bresnahan Locomotor Rating Scale, BBB Scale)显著优于对照组。

研究表明,三维壳聚糖支架可以使脑损伤模型小鼠神经功能恢复^[6],壳聚糖混合聚乳酸合成新型三维材料支架(PLA/CS)也能促进干细胞体外诱导分化^[7]。另有研究报道,单独的壳聚糖缓释神经营养因子或者仅材料就能促进 SCI 后组织重建和功能恢复,但更多的是使用壳聚糖结合各种类型细胞和(或)神经营养因子治疗 SCI^[8]。

2.3 层连蛋白 层连蛋白(laminin)是细胞外基质中一种黏附性糖蛋白,可调节细胞生长和分化,是实验室经常使用的一种细胞培养基质胶。

Menezes 等^[9]利用人脂肪来源的基质细胞对 SCI 模型大鼠进行细胞移植治疗,发现移植的细胞极大地促进了组织保留、轴突再生和功能恢复,进一步的机制研究显示移植处有大量的层连蛋白沉积,有利于该蛋白提供较强的神经营养保护作用。层连蛋白还可使血管再生和抗细胞凋亡,在体内外促进神经分化、微管聚合和神经再生。

Amr 等^[10]利用层连蛋白处理壳聚糖作为类神经干细胞的支架,对慢性 SCI 患者进行材料细胞移植治疗,并根据美国脊髓损伤协会评分标准(The ASIA impairment scale, A-E 逐渐恢复)对患者运动能力、肌肉

活动和感觉功能的恢复进行检测,结果显示运动评分最少改善两个等级,感觉评分最少改善三个等级。上述研究表明层连蛋白不论是基础科研还是临床应用都有极强的价值。

2.4 海藻酸盐 海藻酸盐(alginate)是褐藻细胞壁中的一种酸性多糖,通常被加工成海藻酸钠作为黏合剂、稳定剂使用。

浙江大学城市学院的史晨悦等^[11]用固态、液态高压灭菌方法制备了不同浓度的海藻酸钠,发现 10% 固态高压灭菌海藻酸钠培养原代小鼠(BMSCs)时细胞活性最高,同时其在体内可显著促进脊髓损伤后神经丝生长和运动能力恢复。藻酸钙可减少损伤引起的脱髓鞘反应和纤维化疤痕,缓释神经营养因子或再结合细胞可以引导轴突方向性生长并在病灶整合,促进运动功能恢复。

Erdogan 等^[12]用藻酸胶包被分离获得大鼠脐带血细胞后移植到 SCI 模型大鼠 T8-T9 半切损伤处,术后 21 d 改良 Tarlov 评分(1~5,分数越高恢复越好)结果显示移植组恢复至 4.2 分,相应对照组仅 1.2 分。免疫组化染色发现移植组的脊髓损伤处死亡细胞少,轴突生长多。

兰州综合医院的汪大彬等^[13]用冻干法得到壳聚糖-藻酸盐支架材料,接种 BMSCs 后移植治疗急性 SCI 模型大鼠,术后 6 周 BBB 评分结果显示,材料细胞组(14.40 ± 1.43)显著高于单独细胞组(8.40 ± 1.07)、单独材料组(10.20 ± 0.92)和对照组(6.40 ± 0.97)。这些研究说明藻酸盐材料对脊髓损伤后的运动功能恢复有很大的促进作用。

2.5 其他 材料除了作为支架,还有其他作用。例如改善病灶微环境,减少炎症反应和促进神经生长、血管再生等。在支架材料上联合多种成分变得越来越流行,包括多种营养因子、不同种类细胞结合等,这些方法也用积极的实验数据证明其对 SCI 的潜在治疗价值,包括轴突再生、疤痕组织减少和运动功能恢复等。

Qiu 等^[14]使用三维海绵胶(gelatin sponge)接种过表达原肌球蛋白受体激酶 C(trkC)或神经营养蛋白 3(NT-3)的间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)对 T10 横断模型大鼠进行移植治疗,后期进行了详细的检验,在电生理、组织切片、免疫荧光染色、行为学等多个方面均显示,海绵胶结合细胞的治疗效果十分优异。Li 等^[15]的研究验证了 NT-3 和海绵胶联合使用对 SCI 治疗的促进作用,这些实验都表明神经营养因子结合材料对 SCI 的微环境产生了积极的影响,证明材料加因子治疗 SCI 很有前景。其他研究表明纤连蛋白(fibronectin)^[16]、结冷胶(gellam gum)^[17]和

琼脂糖(agarose)^[18]也是良好的细胞支架材料。

3 总结与展望

脊髓具有独特而又复杂的微环境,使功能重建变得非常困难。单纯的细胞移植治疗 SCI 存在很多不足,包括无法克服病灶的神经抑制微环境、无法支持移植细胞存活、无法刺激轴突再生和重新髓鞘化等。因此,细胞结合材料或营养因子,可以取长补短协同作用,是未来 SCI 的治疗研究趋势。生物材料加工处理也十分重要,包括材料亲疏水性、制备时控制空隙大小、材料表面粗糙程度等。根据结合因子或细胞的特性,需要将工艺优化。戴建武等^[19]对胶原材料特殊设计加工,导入脑源性神经营养因子(brain - derived neurotrophic factor ,BDNF) 结合位点,保证 BDNF 能特异性结合到材料上而不被迅速释放或清除。生物材料移植到体内后,根据自身特性会在一定时间内降解。例如 Yang 等^[20]实验中所用的壳聚糖移植到大鼠体内约 30 d 就会降解消失。除了本文中的天然生物材料,大量的聚合物材料也被用于研究。这些材料与生物材料相比各有优缺点,临床可根据不同案例进行选择。

(基金项目:国家重点基础研究发展计划“干细胞衰老的细胞分子机理及转化应用研究”, No. 2015CB964800; * 通讯作者)

主要参考文献

- [1] Rowland JW ,Hawryluk GW ,Kwon B ,et al. 2008. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical Focus* 25(5) : E2
- [2] Li X ,Xiao Z ,Han J ,et al. 2013. Promotion of neuronal differentiation of neural progenitor cells by using EGFR antibody functionalized collagen scaffolds for spinal cord injury repair. *Biomaterials* ,34(21) : 5107 ~ 5116
- [3] Zaminy A ,Shokrgozar MA ,Sadeghi Y ,et al. 2013. Mesenchymal stem cells as an alternative for Schwann cells in rat spinal cord injury. *Iranian Biomedical Journal* ,17(3) : 113 ~ 122
- [4] Yuan N ,Tian W ,Sun L ,et al. 2014. Neural stem cell transplantation in a double - layer collagen membrane with unequal pore sizes for spinal cord injury repair. *Neural Regeneration Research* ,9(10) : 1014 ~ 1019
- [5] Jian R ,Yixu Y ,Sheyu L ,et al. 2015. Repair of spinal cord injury by chitosan scaffold with glioma ECM and SB216763 implantation in adult rats. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* ,103(10) : 3259 ~ 3272
- [6] Gao S ,Zhao P ,Lin C ,et al. 2014. Differentiation of human adipose - derived stem cells into neuron - like cells which are compatible with photocurable three - dimensional scaffolds. *Tissue Engineering Part A* 20(7 8) : 1271 ~ 1284
- [7] Ebrahimi - Barough S ,Hoveizi E ,Norouzi Javidan A ,et al. 2015. Investigating the neuroglial differentiation effect of neuroblastoma conditioned medium in human endometrial stem cells cultured on 3D nanofibrous scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* ,103(8) : 2621 ~ 2627
- [8] Li H ,Ham TR ,Neill N ,et al. 2016. A hydrogel bridge incorporating immobilized growth factors and neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury. *Advanced Healthcare Materials* 5(7) : 802 ~ 812
- [9] Menezes K ,Nascimento MA ,Goncalves JP ,et al. 2014. Human mesenchymal cells from adipose tissue deposit laminin and promote regeneration of injured spinal cord in rats. *PLoS One* 9(5) : e96020
- [10] Amr SM ,Gouda A ,Koptan WT ,et al. 2014. Bridging defects in chronic spinal cord injury using peripheral nerve grafts combined with a chitosan - laminin scaffold and enhancing regeneration through them by co - transplantation with bone - marrow - derived mesenchymal stem cells: case series of 14 patients. *Journal of Spinal Cord Medicine* 37(1) : 54 ~ 71
- [11] Shi CY ,Ruan LQ ,Feng YH ,et al. 2011. Marrow mesenchymal stem cell transplantation with sodium alginate gel for repair of spinal cord injury in mice. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* ,40(4) : 354 ~ 359
- [12] Erdogan B ,Bavbek M ,Sahin IF ,et al. 2010. Fetal allogeneic umbilical cord cell transplantation improves motor function in spinal cord - injured rats. *Turkish Neurosurgery* 20(3) : 286 ~ 294
- [13] Wang D ,Wen Y ,Lan X ,et al. 2010. Experimental study on bone marrow mesenchymal stem cells seeded in chitosan - alginate scaffolds for repairing spinal cord injury. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 24(2) : 190 ~ 196
- [14] Qiu XC ,Jin H ,Zhang RY ,et al. 2015. Donor mesenchymal stem cell - derived neural - like cells transdifferentiate into myelin - forming cells and promote axon regeneration in rat spinal cord transection. *Stem Cell Research & Therapy* 6(1) : 105
- [15] Li G ,Che MT ,Zhang K ,et al. 2016. Graft of the NT - 3 persistent delivery gelatin sponge scaffold promotes axon regeneration , attenuates inflammation , and induces cell migration in rat and canine with spinal cord injury. *Biomaterials* 83(83) : 233 ~ 248
- [16] Miyamoto S ,Katz BZ ,Lafrenie RM ,et al. 1998. Fibronectin and integrins in cell adhesion , signaling , and morphogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 857(857) : 119 ~ 129
- [17] Oliveira AL ,Sousa EC ,Silva NA ,et al. 2012. Peripheral mineralization of a 3D biodegradable tubular construct as a way to enhance guidance stabilization in spinal cord injury regeneration. *Journal of Materials Science - materials in Medicine* 23(11) : 2821 ~ 2830
- [18] Zhang B ,Wang Y ,Gao M ,et al. 2012. Tris(hydroxymethyl) aminomethane - functionalized agarose particles: parameters affecting the binding of bovine serum albumin. *Journal of Separation Science* 35(12) : 1406 ~ 1410
- [19] Han Q ,Jin W ,Xiao Z ,et al. 2010. The promotion of neural regeneration in an extreme rat spinal cord injury model using a collagen scaffold containing a collagen binding neuroprotective protein and an EGFR neutralizing antibody. *Biomaterials* 31(35) : 9212 ~ 9220
- [20] Yang Z ,Zhang A ,Duan H ,et al. 2015. NT3 - chitosan elicits robust endogenous neurogenesis to enable functional recovery after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ,112(43) : 13354 ~ 13359