

嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展

Advancement in the treatment of spinal cord injury by olfactory ensheathing cells transplantation

王 飞, 陈 智, 魏显招, 李 明

(上海市长海医院骨科 200433)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.10.17

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-10-0943-04

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗一直是医学界的难题, 现今临床上仍无确实有效的治疗方法。目前, SCI 修复的研究策略主要有以下几方面: 药物治疗、细胞移植治疗、组织移植治疗、基因治疗以及联合治疗等。近年来细胞移植治疗被广泛研究, 包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)、雪旺氏细胞(Schwann cells, SCs)、嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)、神经干细胞(neural stem cells, NSCs)、骨髓间充质干细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)、脐血细胞(umbilical cord blood cells, UCBCs)等, 其中 OECs 以独特的生物学特性和功能引起医学界广泛关注。笔者就 OECs 移植治疗 SCI 的研究进展综述如下。

1 OECs 的取材

OECs 存在于外周的鼻腔嗅黏膜、嗅神经和中枢的嗅球^[1]。基础研究和临床应用的 OECs 主要取材于嗅球, 目前, 对其功能结构已有深入认识, 临床试验成果也取得了一定的进展, 但还存在 OECs 取材困难、移植后遗留严重并发症以及伦理学的束缚; 异体移植存在免疫排斥等缺点。通过嗅黏膜体外培养自体 OECs 成为解决上述问题的最佳途径。Savchenko 等^[2]首次成功将 hOECs 从人类嗅黏膜组织分离并培养。Richtre 等^[3]报道了不同来源 OECs 促进 SCI 修复能力有差别, 嗅黏膜来源的 OECs 修复能力高于嗅球来源的 OECs。Gorrie 等^[4]报道了人鼻黏膜提取 OECs 移植到 T10 水平脊髓挫伤后 7d 的大鼠中, 6 周后观察到后肢运动功能有明显改善, BBB 评分和横向步行测试都有明显提高。Salehi 等^[5]提出了嗅黏膜 OECs 移植治疗 SCI 的优点: ①嗅黏膜 OECs 自体移植避免了免疫排斥反应引起的移植细胞有效性的降低; ②嗅黏膜 OECs 取材术后只需常规抗生素治疗, 无局部炎症或感染发生; ③自体嗅黏膜取材损伤小、恢复快, 不影响嗅觉功能; ④避开了伦

理问题。当然嗅黏膜 OECs 的自体移植也存在局限性, 就是能够培养的 OECs 数量较少、易污染、纯化后活性低等, 这也是目前临床研究中亟待解决的一个瓶颈问题。近年来, Forni 等^[6]报道了 OECs 来源于神经嵴细胞(neural crest cells), 属于胚胎干细胞, 而成人皮肤和毛囊中均含神经嵴细胞, 这为 OECs 的大规模培养提供了可能性。Lim 等^[7]报道利用死亡后 12h 内的遗体捐献者的嗅球和嗅黏膜提取并成功培养 OECs。这些对研究 OECs 的取材又多了新的途径, 不过具体的有效性还有待于进一步的研究证实。

2 OECs 的培养和纯化

2.1 OECs 的培养

目前国内外的培养方法主要是原代培养法。Windus 等^[8]取嗅黏膜上皮, 在水温 37℃ 的条件下, 用分散酶对嗅上皮浸泡 5min, Hanks 液冲洗 2 遍, 0.25% 胰酶消化 15min, 离心去除上清液(1200r/min, 5min, 室温), 加含 13% FBS/DF12 培养基调整细胞浓度至 10^6 个细胞/ml, 种植于无多聚赖氨酸包被处理的 25cm² 培养瓶内, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内进行培养, 3d 后半量换液, 再培养 2d 后换成 10% FCS 的培养基, 1~2d 后进行纯化。关于培养时间尚无统一认识。Rubio 等^[9]取猴的 OECs 进行 3 周的短期培养, 可以为急性损伤期的自体移植提供足够的细胞, 经过 2.5 个月的细胞培养, OECs 数量可增至 20 亿个, 而且可将 OECs 冻存。但是, Radtke 等^[10]报道培养 1 周的 OECs 比培养 2 周的 OECs 能够促进更多髓鞘的再生, 培养 4~6 周后的 OECs 已无促进髓鞘再生的能力。

2.2 OECs 的纯化

目前 OECs 纯化方法有差速贴壁法^[11]、阿糖胞苷抑制法^[12]、免疫亲和吸附法和化学药物法等^[13]。差速贴壁法^[11]实验步骤简单, 所需要的试剂少、经济, 而且能最大限度保持 OECs 的生物学特性, 缺点是最后获得的 OECs 中有一定比例的杂细胞。阿糖胞苷抑制法^[12]操作简便、价格低廉, 但其致命弱点是作为细胞有丝分裂的抑制剂, 它对 OECs 也存在抑制增殖的作用, 且经阿糖胞苷作用过的细胞在 1~2 周后都不同程度出现了细胞坏死或失去增殖能力。免疫亲

第一作者简介: 男(1982-), 主治医师, 硕士研究生, 研究方向: 脊柱外科

电话: (021)81873396 E-mail: wangfei821016@126.com

通讯作者: 李明 Email: limingch@21cn.com

和吸附法是使用单克隆抗体进行纯化,在这些方法中效果最佳,纯度可达 95% 以上^[13],但步骤繁琐,抗体的费用较昂贵,而且细胞经过反复清洗,活性往往会下降,给进一步培养带来了一定的困难,同时膜受体的抗体可能改变膜受体的构象,激活或封闭膜受体,影响细胞内正常的信号通路,可能对实验也产生一定的影响。因此,目前多采用上述方法的两种或多种方法来纯化 OECs,以利用各种方法的特点,扬长避短,获得高纯度的 OECs。

3 OECs 的生物学特性

OECs 具有雪旺氏细胞和星形胶质细胞的双重性质,包绕嗅神经轴突由周围神经系统进入中枢神经系统,是目前所知的唯一能穿过外周神经与中枢神经屏障并在成熟阶段具有再生能力的神经胶质细胞^[14]。OECs 呈双极或梭形、多突起形、扁圆形或油煎蛋形,具有终生分裂和再生的能力,嗅神经的轴突每 30~60d 就可以穿越周围神经系统与中枢神经系统的交界区,重新长出嗅鞘并建立起突触联系,且这样的过程能不断重复^[15]。OECs 能表达多种多样的因子,主要表达神经生长因子(neuronal growth factor,NGF)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophin factor,GDNF)、神经营养因子-4/5(NT-4/5)、外源性神经营养因子-3(neurotrophic-3,NT-3)等,并表达 P75 蛋白,同时表达层粘连蛋白、纤维结合蛋白、S-100 蛋白、神经胶质源性连接蛋白及神经细胞黏附因子等,这些成分可能对嗅神经元轴突的生长有重要作用^[16,17]。

4 OECs 移植治疗 SCI 的基础研究

4.1 OECs 移植治疗 SCI 的机制研究

目前,OECs 移植治疗 SCI 的确切机制尚不十分明确,但经过学者们的不断努力,关于 OECs 治疗 SCI 的机制仍取得较大的进展。主要焦点集中在:(1)促进轴突的发芽和再生。Ramon-Cueto 等^[18]首次用 OECs 移植到完全横断的大鼠 T10 脊髓后根处,3 周后大量的后根轴突再生。Takeoka 等^[19]也报道了 OECs 移植治疗大鼠完全性脊髓横断伤的模型,移植 OECs 后的大鼠后肢运动功能明显改善,利用电生理学的实验证据证明 OECs 能促进轴突的再生并跨过横断面生长。Simón 等^[14]报道了 OECs 表达的纤溶酶原激活抑制剂-1 促进轴突的再生,他们的发现支持了凝血酶系统在调控 OECs 促进轴突再生中发挥了重要的作用。(2)促进髓鞘的再生。Imaizumi 等^[20]报道在神经脱髓鞘的情况下 OECs 能帮助神经髓鞘化和加速神经电生理传导速度。Sasaki 等^[21]研究发现 OECs 能够有方向性地长距离(8mm)穿越脊髓离断部位并形成髓鞘,同时研究证实了 OECs 能够促进郎氏氏结节的形成、生长并使脱髓鞘的轴突恢复功能。Radtko 等^[10]报道了 OECs 移植治疗成年大鼠 SCI 的模型,显示 OECs 能促进受损髓鞘的再生,但随着移植时间的延长,受损髓鞘再生的能力会减弱,与

P75NTR 逐渐表达减少有关。(3)OECs 分泌多种因子发挥保护神经的作用。OECs 会分泌出许多因子,其中包括神经营养因子和血管源性因子等^[22]。通过分泌多种保护因子,既防止了受损脊髓的再次损伤,又有利于受损处神经的再生。Pellitteri 等^[23]在 OECs 与海马神经元共同培养中发现 OECs 促进神经元的活性和在轴突生长等方面与其分泌的营养因子有关。Pastrana 等^[24]研究发现 OECs 产生的 BDNF 刺激成熟中枢神经元再生,OECs 还分泌多种细胞黏附分子和神经营养因子,使脱髓鞘的轴突再髓鞘化,为轴突再生提供一个良好的微环境。

但也有不少研究者在研究 OECs 移植到受损的脊髓后发现,OECs 并不能促进轴突和髓鞘的再生。Guest 等^[25]将从灵长类动物的嗅球提取出的 OECs 移植入大鼠损伤的脊髓处,在移植后大鼠运动功能有所恢复,损伤的轴突发生发芽,但没有发现轴突的再生。国外最新研究表明,OECs 不是直接支持神经轴突的生长,也并不参与髓鞘的形成,而是间接分泌一种称为 secreted protein acidic rich in cysteine (SPARC) 的蛋白刺激内在的自身雪旺细胞,真正参与髓鞘形成的则是这些自身雪旺细胞^[26]。Lu 等^[27]将表达绿色荧光基因的 OECs 注入到 C4 SCI 的大鼠距离损伤节段部位头部 1mm 以及尾端 1mm 脊髓白质处,发现细胞注射 1h 内即出现由注射压力造成的 OECs 向损伤部位“被动延伸”,在形态学方面形成“桥接”等,因此分析所谓的 OECs 自动迁移形成髓鞘样包绕可能是由于操作手法造成的。Sorensen 等^[28]通过 3 种细胞对胚胎鼠脊髓成髓的体外研究表明,星形胶质细胞的髓鞘形成明显优于 OECs 与雪旺细胞。

4.2 OECs 移植时机的选择

Lopez-Vales 等^[29]建立大鼠 T8 脊髓完全横断损伤模型,分别对 SCI 30min 和 1 周后的两组大鼠进行 OECs 移植治疗,9 个月后两组大鼠移植的 OECs 均能促进轴突的再生和部分功能恢复,但早期移植效果稍好,可能是因为早期移植的 OECs 阻止了部分星形胶质细胞的增生和相关抑制分子的表达。后来他们又在完全性胸脊髓横断伤后 45d 的大鼠中移植 OECs,发现大鼠后肢运动有中等程度恢复^[30]。Andrews 等^[31]比较了 SCI 后 1 周移植 OECs 和伤后即刻移植的区别,在不完全 SCI 模型中,伤后 1 周移植和伤后即刻移植的 OECs 都促进了轴突的再生和功能的部分恢复,相比较而言,伤后即行移植效果略佳。有学者^[32]认为 SCI 区微环境处于急性炎症期(24h 内)时,许多炎症细胞因子如白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等具有神经细胞毒性因子的增加,这些有害因子会阻碍移植细胞的存活和轴突的再生;而在损伤后 2~4 周,损伤部位周围的微环境已处于修复和重建阶段,局部会表达一些生长和营养因子,同时微血管的再生将更有利于移植细胞在受损部位的成活,故认为此期 OECs 移植较好。因此,移植时机的选择还存在一定的分歧,有待进一步研究。

5 OECs 移植治疗 SCI 的临床研究

通过大量的基础研究,特别是动物模型实验,研究者们已掌握了一定的方法来进行临床研究。Mackay-Sim 等^[33]报道了应用嗅粘膜 OECs 治疗 SCI 的临床试验,将来自人鼻黏膜纯化培养的 OECs 移植到 6 例外伤性胸脊髓损伤后 6 个月~3 年患者的脊髓受损部位,通过为期 3 年的临床研究,对自体 OECs 移植治疗截瘫患者进行了评估,应用了包括医学、社会心理学、影像学、神经病学的临床评估、神经和功能缺陷专门测试(美国脊髓损伤协会的标准)以及损伤平面以下感觉和运动的神经生理试验,36 个月后 6 例患者的浅触觉和刺痛敏感性有所提高,但还没有明显的运动功能和神经性疼痛,第 3 年神经系统 MRI 与第 1、2 年比较没有改变,未发现有诱发的肿瘤、继发性脊髓空洞症及异常影像学改变。Feron 等^[34]在一期临床试验中,对 3 例男性截瘫患者(损伤时间为 6~32 个月)进行 OECs 移植,细胞来自成年健康志愿者,通过嗅黏膜组织活检,并经体外纯化培养,植入 1 年后未出现手术并发症及脊髓的进一步损害和囊肿、肿瘤、痿管的形成,故认为同种异体的 OECs 移植是安全可行的。Lima 等^[35]对 7 例 SCI 患者(损伤时间为 6 个月~6.5 年)进行自体嗅黏膜组织移植,术后患者的神经功能有不同程度的恢复,证实嗅黏膜自体移植安全可行,有潜在的修复作用,但需进一步长期检测一些滞后的副作用和远期疗效。Dobkin 等^[36]认为 OECs 移植治疗 SCI 的手术还不健全,且患者在手术后功能无改善,还存在一系列的并发症,故暂时不主张患者进行此手术。目前,临床研究的任务十分艰巨,临床治疗的病例数少、随访时间短,只能是一个初步的结果,要考虑到各种可能的不良后果,有待今后进一步的研究探索。

6 基因修饰和联合移植

OECs 的基因修饰和联合移植是近年来的研究热点。Ma 等^[12]通过逆转录体系将大鼠 NT-3 转染到 OECs 后再植入损伤脊髓,结果显示基因修饰的 OECs 在体内存活并分泌 NT-3,大鼠 BBB 评分显著提高,且显著促进损伤后脊髓的轴突再生。Yui 等^[13]的研究表明,OECs 与成纤维细胞共培养可促进 OECs 的增殖,其可能机制一方面是成纤维细胞来源因素如成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor 2,FGF2)促进了 OECs 的增殖,另一方面是在 OECs 培养中成纤维细胞为 OECs 增殖起到了生物支架作用,使其更加容易和快速增殖。Wang 等^[37]报道了胚胎神经干细胞有分化成神经元细胞和胶质细胞的潜能,而 OECs 有助于神经元轴突穿越胶质瘢痕、促进神经元功能恢复,用胚胎神经干细胞和 OECs 共移植,可修复损伤的脊髓,二者对 SCI 的修复有协同作用,且效果优于单纯 OECs 的移植修复。基因修饰和联合移植是目前研究 OECs 治疗 SCI 的新途径,已取得一定的研究成果,但还有许多问题有待解决。

7 前景与展望

OECs 移植是目前 SCI 治疗方面的研究热点,被认为是最具前景的策略之一。尽管目前 OECs 移植治疗 SCI 的疗效已被大量基础实验所证实,并且已经开始了初步的临床试验,但仍有很多问题亟待解决:(1)OECs 移植治疗 SCI 的机制进一步明确;(2)完善 OECs 培养纯化方法,以提高细胞产量;(3)选择最佳的 OECs 移植时机及移植途径。今后还需进一步研究以更好应用于临床治疗。

8 参考文献

1. Windus LC, Lineburg KE, Scott SE, et al. Lamellipodia mediate the heterogeneity of central olfactory ensheathing cell interactions[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(10): 1735-1750.
2. Savchenko EA, Andreeva NA, Dmitrieva TB. Culturing of specialized glial cells(olfactory ensheathing cells) of human olfactory epithelium[J]. Bull Exp Biol Med, 2005, 139(4): 510-513.
3. Richter MW, Fletcher PA, Liu J, et al. Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord[J]. Neurosci, 2005, 25(46): 10700-10711.
4. Gorrie CA, Hayward I, Cameron N, et al. Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury[J]. Brain Res, 2010, 1337: 8-20.
5. Salehi M, Pasbakhsh P, Soleimani M, et al. Repair of spinal cord injury by co-transplantation of embryonic stem cell-derived motor neuron and olfactory ensheathing cell [J]. Iran Biomed, 2009, 13(3): 125-135.
6. Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin VS, et al. Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells[J]. Neurosci, 2011, 31(18): 6915-6927.
7. Lim F, Martín-Bermejo MJ, García-Escudero V, et al. Reversibly immortalized human olfactory ensheathing glia from an elderly donor maintain neuroregenerative capacity[J]. Glia, 2010, 58(5): 546-558.
8. Windus LC, Chehrehasa F, Lineburg KE, et al. Stimulation of olfactory ensheathing cell motility enhances olfactory axon growth[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(19): 3233-3247.
9. Rubio MP, Munoz-Quiles C, Ramon-Cueto A. Adult olfactory bulbs from primates provide reliable ensheathing glia for cell therapy[J]. Glia, 2008, 56(5): 539-551.
10. Radtke C, Lankford KL, Wewetzer K, et al. Impaired spinal cord remyelination by long-term cultured adult porcine olfactory ensheathing cells correlates with altered in vitro phenotypic properties[J]. Xenotransplantation, 2010, 17(1): 71-80.
11. Simón D, Martín-Bermejo MJ, Gallego-Hernández MT, et al. Expression of plasminogen activator inhibitor-1 by olfactory ensheathing glia promotes axonal regeneration[J]. Glia, 2011,

- 59(10): 1458–1471.
12. Ma YH, Zhang Y, Cao L, et al. Effect of neurotrophin-3 genetically modified olfactory ensheathing cells transplantation on spinal cord injury[J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(2): 167–177.
13. Yui S, Ito D, Fujita N, et al. Effects of fibroblasts derived from the olfactory bulb and nasal olfactory mucosa on proliferation of olfactory ensheathing cells harvested from the olfactory bulb[J]. *Vet Med Sci*, 2011, 73(1): 133–137.
14. Ekberg JA, Amaya D, Mackay-Sim A, et al. The migration of olfactory ensheathing cells during development and regeneration[J]. *Neurosignals*, 2012, 20(3): 147–158.
15. Chen X, Fang H, Schwob JE. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium [J]. *Comp Neurol*, 2004, 469(4): 457–474.
16. Kalincik T, Choi EA, Feron F, et al. Olfactory ensheathing cells reduce duration of autonomic dysreflexia in rats with high spinal cord injury [J]. *Auton Neurosci*, 2010, 154(1): 20–29.
17. Kocsis JD, Lankford KL, Sasaki M, et al. Unique in vivo properties of olfactory ensheathing cells that may contribute to neural repair and protection following spinal cord injury [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 456(3): 137–142.
18. Ramon-Cueto A, Nieto-Sampedro M. Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants[J]. *Exp Neurol*, 1994, 127(2): 232–244.
19. Takeoka A, Jindrich DL, Muñoz-Quiles C., et al. Axon regeneration can facilitate or suppress hindlimb function after olfactory ensheathing glia transplantation[J]. *Neurosci*, 2011, 31(11): 4298–4310.
20. Imaizumi T, Lankford KL, Waxman SG. Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord[J]. *Neurosci*, 1998, 18(16): 6176–6185.
21. Sasaki M, Black JA, Lankford KL, et al. Molecular reconstruction of nodes of Ranvier after remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells in the demyelinated spinal cord[J]. *Neurosci*, 2006, 26(6): 1803–1812.
22. Barnett SC, Riddell JS. Olfactory ensheathing cell transplantation as a strategy for spinal cord repair: what can it achieve[J]. *Nat Clin Pract Neurol*, 2007, 3(3): 152–161.
23. Pellitteri R, Spatuzza M, Russao A, et al. Olfactory ensheathing cells represent an optimal substrate for hippocampal neurons: an in vitro study[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 27(5): 453–458.
24. Pastrana E, Moreno-Flores MT, Avila J, et al. BDNF production by olfactory ensheathing cells contributes to axonal regeneration of cultured adult CNS neurons [J]. *Neurochem*, 2007, 50(3): 491–498.
25. Guest JD, Herrera L, Margitich I, et al. Xenografts of expanded primate olfactory ensheathing glia support transient behavioral recovery that is independent of serotonergic or corticospinal axonal regeneration in nude rats following spinal cord transection[J]. *Exp Neurol*, 2008, 212(2): 261–274.
26. 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]. *Neurosci*, 2007, 27(27): 7208–7221.
27. Lu P, Yang H, Culbertson M, et al. Olfactory ensheathing cells do not exhibit unique migratory or axonal growth-promoting properties after spinal cord injury [J]. *Neurosci*, 2006, 26(43): 11120–11130.
28. Sorensen A, Moffat K, Thomson C, et al. Astrocytes, but not olfactory ensheathing cells or Schwann cells, promote myelination of CNS axons in vitro[J]. *Glia*, 2008, 56(7): 750–763.
29. Lopez-Vales R, Fores J, Verdu E, et al. Acute and delayed transplantation of olfactory ensheathing cells promote partial recovery after complete transection of the spinal cord [J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 21(1): 57–68.
30. López-Vales R, Forés J, Navarro X, et al. Chronic transplantation of olfactory ensheathing cells promotes partial recovery after complete spinal cord transection in the rat [J]. *Glia*, 2007, 55(3): 303–311.
31. Andrews MR, Stelzner DJ. Modification of regenerative response of dorsal column axons by olfactory ensheathing cells or peripheral axotomy in adult rat[J]. *Exp Neurol*, 2004, 190(2): 311–327.
32. Lu J, Feron F, Mackay-Sim A, et al. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord[J]. *Brain*, 2002, 125(1): 14–21.
33. Mackay-Sim A, Feron F, Cochrane J, et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial[J]. *Brain*, 2008, 131(9): 2376–2386.
34. Feron F, Perry C, Cochrane J, et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury [J]. *Brain*, 2005, 128(12): 2951–2960.
35. Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, et al. Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study [J]. *Spinal Cord Med*, 2006, 29(3): 191–203.
36. Dobkin BH, Curt A, Guest J. Cellular transplants in china: observational study from the largest human experiment in chronic spinal cord injury [J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2006, 20(1): 5–13.
37. Wang G, Ao Q, Gong K, et al. Synergistic effect of neural stem cells and olfactory ensheathing cells on repair of adult rat spinal cord injury [J]. *Cell Transplant*, 2010, 19(10): 1325–1337.

(收稿日期:2012-03-03 修回日期:2012-06-01)

(本文编辑 李伟霞)