

细胞移植治疗脊髓损伤的相关问题探讨

【编者按】自本刊就嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤发表了几篇观点不同的文章以来,有关细胞移植在脊髓损伤治疗中的作用问题又一次引起了大家的关注。本期编辑部邀请了在该领域做了较多工作和进行过较多研究的几位专家,就该热点问题进行讨论。他们从不同角度阐述了这一治疗方法,介绍了细胞移植的种类及各自的优势和存在的问题,并就临床研究方案的设计、适应证选择、疗效评估标准等提出了自己的观点。他们对这一方法的认可程度不同,对有些问题的看法也不尽相同,但他们都提出了证明各自观点的令人信服的依据。希望各位同道阅读他们的文章后,能结合自己的经验对该治疗方法做出自己的判断或提出自己的见解,以推动脊髓损伤研究的发展。

中图分类号:R683.2,Q813 文献标识码:C 文章编号:1004-406X(2007)-09-0647-10

细胞移植:脊髓损伤临床研究中应关注的问题

关 骅(中国康复研究中心脊柱脊髓外科 100068 北京市)

脊髓损伤是可造成患者终生残疾的严重损伤。根据 WHO“健康功能国际分类(ICF)”标准,脊髓损伤可造成患者器官水平的神经功能障碍(impairment),患者整体水平的各种功能障碍(disability)及社会水平的参与障碍(limited participation)。这些不同层次的障碍给患者、家庭及社会带来沉重负担。20 世纪中期以后,临床医学及康复医学的进展使脊髓损伤的严重并发症得到有效控制,脊髓损伤患者的平均寿命接近正常平均寿命,患者的生活自理能力得到显著提高。但是,脊髓损伤特别是完全性脊髓损伤仍无有效治疗方法,如何修复或重建脊髓神经结构的连续性及恢复脊髓神经功能仍是医学界正在努力解决的难题。

细胞移植治疗神经系统疾患在动物实验研究方面取得了一定进展,并在某些疾患中(如帕金森病、老年性痴呆等)开始了严格的初期临床试验研究。近年来,细胞移植(干细胞、嗅鞘细胞、雪旺细胞及基因修饰的神经干细胞移植)在脊髓损伤动物实验中取得了一定进展,提示存在修复损伤脊髓结构的连续性及恢复脊髓神经功能的可能性^[1,2]。细胞疗法包括以下几个发展方向:(1)作为支持脊髓神经元功能的神经生长因子的来源;(2)移植干细胞可能分化为少突胶质细胞,包裹再生轴突形成髓鞘;(3)移植干细胞可能分化为有功能的脊髓神经元,并直接替代受损神经元;(4)移植的细胞可作为基质支持轴突生长^[3]。但是,开展细胞移植的临床试验研究不仅需要更充分可靠的动物实验依据,而且必须遵守相应的临床试验指导方针,并严格实施相应的科学评价标准。将仍处于动物实验阶段或临床试验研究尚无确定结论的治疗方案作为基本肯定的临床治疗方案是不负责任的。美国《神经康复及神经修复》杂志 2006 年第 20 卷第 1 期发表的署名文章^[4]及“中国医学论坛报”2005 年 2 月发表的《新英格兰医学杂志》总编的署名文章^[5]对目前我国某些医院开展的应用细胞移植治疗脊髓损伤或疾患的临床工作提出了质疑,并强调临床研究应遵循的科学规则。毫无疑问,关注脊髓损伤临床研究中存在的有关问题并展开深入讨论,对正在或准备开展的细胞移植治疗脊髓损伤的临床研究工作是有重要意义的,对身患残疾而渴望治疗的患者也是负责的。但必须强调,遵循循证医学(evidence-based medicine,EBM)的基本原则和医学伦理学标准是临床研究取得经得起检验的科学成果的基础。

依据目前脊髓损伤各种细胞移植的动物实验取得的进展,开展细胞移植临床试验研究的时机是否成熟尚值得商榷。如开展严格设计的、谨慎实施的临床研究,仍应注意相关试验的安全性及试验结果评估的科学性。依据循证医学的基本原则,结合脊髓损伤病理及临床特点,在细胞移植临床研究中,应关注以下问题。

1 明确限定临床研究入选病例及排除病例的标准

除患者年龄、性别、致伤因素等一般资料外,伤后时间、治疗历史、损伤程度及损伤水平应予限定。脊髓损伤后自然病程(natural history)显示,在早期常规治疗后脊髓损伤患者(特别是不完全性损伤患者)伤后 2

年内可能观察到不同程度的神经功能恢复。因此,对细胞移植的效果评价应考虑伤后时间因素的限定,以排除自然恢复的影响。因为动物实验结果显示损伤脊髓局部的微环境是影响移植的神经干细胞或内源性神经干细胞命运的主要因素,而损伤脊髓局部微环境随伤后时间而变化。在脊髓损伤后,损伤脊髓内具有神经毒性因子(IL-1、IL-6 等)的水平在伤后 24h 内明显变化而不适宜移植细胞的存活及分化。在脊髓损伤晚期,由于缺乏诱导因子及损伤局部形成囊腔或胶质瘢痕而不适宜进行治疗性细胞移植。动物实验结果提示脊髓损伤后存在一个狭窄的治疗时间窗,利于成功的细胞移植^[6]。因此,无论从临床结果的科学评价还是从治疗时机选择角度,入选病例的伤后时间应予适当限定,并应开展对照研究。由于细胞移植是重建脊髓神经结构的连续性及恢复神经功能,因此选择完全性损伤患者利于证实其有效性。统计资料显示,完全性脊髓损伤患者仍有 3%~9%可逆转为不完全性损伤,因此应进行对照研究。此外,对入选患者脊髓损伤的水平应有明确限定,因为颈髓损伤患者根性恢复的存在,可在脊髓损伤程度无改变的情况下使 ASIA 的运动评分有不同程度的增加。另一方面,实验研究中如加重了脊髓损伤在颈髓部分可明显影响神经功能。因此,有学者建议相关研究选用胸段脊髓损伤水平患者较为合理。因此,在临床试验研究中,入选标准还应限定脊髓损伤的程度与水平,并应有足够长的随访时间。

2 明确移植细胞的来源、类型及植入方法

移植细胞是临床研究的关键因素,无论何种细胞,其来源、类型、生物学性质、纯度等均应明确说明。如果取自胚胎,应说明胎龄,取材相关步骤等因素。这还可能涉及医学伦理学问题。未来重建脊髓功能的细胞移植或许是“鸡尾酒”式的多种细胞移植^[7],如移植的细胞是“混合物”,则应说明其细胞类型的组成及比例,否则难以分析各种细胞的生物学功能。同时,植入细胞的方法应该是规范的,包括术中如何准确定位实施植入及确定观察植入后的指标^[8]。

3 建立客观有效的评估标准,科学评估临床试验治疗的有效性

证明某种新的治疗方法有效性不仅应基于科学严谨的临床试验设计,还应有客观可靠的临床评估方法。

ASIA 标准尽管经过多次反复修改制定,仍是一个半定量(semi-quantitative)的评价工具,该标准并不能直接客观反映脊髓损伤后及恢复过程中神经结构的情况,而是通过神经功能的变化间接对神经结构损害情况进行评估。因此需要探索更客观的评价指标。同时由于 ASIA 标准是由临床医师应用评定的,因此要求医师经过严格培训及对应用该标准的信度进行测评^[9]。尤其强调的是,国内某些临床研究中细胞移植者及患者功能评价者是同一组人员进行的,而非独立的另外一组专业医师,这就难以排除主观因素的影响,从而影响临床研究有效性评估的科学性。在无对照组的病案回顾性研究中,应开展独立的回顾性研究(I/R),否则作为分析方法,其研究结果的有效性值得验证。

在正确认识 ASIA 标准的基础上,我们应探讨应用 SEP、MEP、功能性 MRI 及肌电图等更客观的指标在脊髓损伤诊断及评定中的价值^[10]。欧洲学者已开始了此方面的研究,并在探讨制定脊髓损伤诊断及治疗后结果评估的标准方案。日常生活能力(ADL)及脊髓损伤功能性评定(SCIM)、脊髓损伤步行指数(WISCI)等各项评定主要反映的是康复训练后的功能改变。在损伤脊髓结构无改变的情况下,经过康复训练上述指数均可以改变,这在脊髓损伤细胞移植治疗方法科学评估中是应注意的。

4 开展多中心研究

脊髓损伤的临床特点(如自然恢复、功能代偿及难于取得临床病理结果),使得细胞移植疗法更有必要开展随机对照研究(RCT)。但临床实际工作中开展 RCT 研究存在一定困难。因此,国际脊髓损伤所致截瘫治疗研讨会(ICCP)上决定成立工作组以制定详细的指导方针,而严格设计统一方案的多中心研究,有利于增加研究结果的科学性。

5 参考文献

1. Garbossa D, Fontanella M, Fronda C, et al. New strategies for repairing the injured spinal cord; the role of stem cells[J]. Neurol Res, 2006, 28(5): 500-504.

2. Okano H, Okada S, Nakamura M, et al. Neural stem cells and regeneration of injured spinal cord[J]. Kidney Int, 2005, 68(5): 1927-1931.
3. Adams M, Carlstedt T, Cavanagh J, et al. International spinal research trust research strategy(Ⅲ): a discussion document[J]. Spinal Cord, 2007, 45(1): 2-14.
4. 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.
5. Drazen J. 创造性工作与严格公正的评价[N]. 中国医学论坛报, 2005-02-03(4).
6. Curt A, Schwab ME, Dietz V. Providing the clinical basis for new interventional therapies: refined diagnosis and assessment of recovery after spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2004, 42(1): 1-6.
7. Sykova E, Jendelova P, Urdzikova L, et al. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels: two strategies for spinal cord injury repair[J]. Cell Mol Neurobiol, 2006, 26(7-8): 1113-1129.
8. 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.
9. 洪毅, 李想, 张军卫, 等. 国内应用脊髓损伤 ASIA 标准现状初步分析[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(3): 227-228.
10. Thomas SL, Gorassini MA. Increases in corticospinal tract function by treadmill training after incomplete spinal cord injury[J]. J Neurophysiol, 2005, 94(4): 2844-2855.

对规范开展细胞移植治疗脊髓损伤临床试验的几点认识

史亚民, 陈秉耀(解放军总医院第一附属医院骨科 全军骨科研究所 100037 北京市)

20 世纪 80 年代初至今, 脊髓损伤后再生修复研究取得了一系列有价值的成果。目前, 除继续致力于基础研究之外, 一些研究者开始进行一些新的干预策略的临床试验, 而细胞移植是其中较为活跃的方向。在此方面, 国内部分研究者或医疗机构做了大量的工作, 单纯从接受治疗的病例数量上看, 可以说走到了国际的前列。但由于涉及到严格临床试验的某些原则, 加之作为一种复杂疾患及非药物临床试验的特殊性, 对这些工作目前也存在一些争议。毋庸置疑, 由于国内医疗环境的特殊性, 国内研究者更可能在短期内完成大量病例的观察。但正因为此, 如何尽可能规范地开展相关临床试验, 从而获得更加令人信服的结论, 应引起我们足够的重视。就此谈几点自己的认识, 希望能引起相关研究者的思考及讨论。

1 临床试验方案的设计

目前, 关于临床试验的基本过程及原则已无争议。一个完整的临床试验分 4 期: I 期为安全性评价; II 期为临床疗效初步验证; III 期为临床疗效的进一步确认; IV 期为一定范围内的临床扩大应用, 此期除疗效的进一步观察外, 还包括副作用的进一步观察。在临床试验的不同阶段, 由于目的不同, 需要选择的病例数量、病例纳入/排除标准、观测因素及评价方法都有可能不同。

随机对照及双盲设计是临床试验的金标准, 但与经典的药物临床试验相比, 细胞移植治疗脊髓损伤具有特殊性。例如由于涉及手术操作, 对研究者无法做到“盲法”, 但至少应尽量做到对患者的“盲法”, 以消除受试者主观或心理对结果的影响。有人认为, 为消除研究者非盲设计可能带来的偏差, 研究的结果最好交给独立的第三方机构做评价。关于对照的设立, 虽然对安慰剂及假手术组的设立是否合适尚存争议^[1,2], 但不设安慰剂或假手术组并不意味着可以不设对照组。因为在医学研究中, 阴性对照并不是唯一的对照形式, 比如我们可以用目前常规的治疗方式作为对照。又比如, 为了排除手术减压因素的影响, 我们一开始可以只选择按目前的治疗原则需要进行手术减压的病例, 随机分为两组, 一组接受手术减压同时进行细胞移植, 另一组减压的同时脊髓局部注射细胞培养液或相应悬浮细胞的液体, 这样就可以有一个初步的确定性的结论。为了减少传统手术移植方式的创伤及可能的减压因素, 我们还可以考虑通过椎板间隙行脊髓内穿刺来移植细胞, 如此则可以很方便地设立空白或其他细胞类型的对照。总之, 我们应尽量通过严格的病例纳入标准和适当的对照研究来获得确定性的结果。那种进行了数百例的大规模临床研究仍无法获得令人信服的结论, 总是一件令人遗憾的事情。

这里还想指出一点, 有的研究者认为设立空白对照是违反伦理道德的, 因为空白对照没有治疗意义, 同时还可能增加创伤^[3]。应该说, 出发点是好的, 但却忽视了另一个重要的前提, 在临床试验中, 欲试验的治疗手

段是否有疗效是不确定的,而且同样可能给患者增加创伤。应该说以此作为反对设立对照甚至为自己试验设计的缺陷辩护是站不住脚的。

2 疗效的评价

由于脊髓损伤病理生理及其修复过程的复杂性,在细胞移植治疗脊髓损伤中,对单一病例评价时,有时候很难确定是细胞本身的作用、自发恢复的结果还是行细胞移植时其它因素(如手术减压)的作用。因此,我们强调设立对照的重要性。而在对结果作出判定时,必须保证本组所有病例数据的完整性,如果有个别病例的失访,可以通过统计学方法对结果作出修正,但如果失访病例过多,则无法进行统计学处理从而得到确定的结论。对脊髓损伤患者来说,由于观察周期的漫长和相关费用的昂贵,很容易出现患者的失访。此时,我们切不可只根据随访到的资料轻易下结论,尤其不能把患者的复诊作为唯一的随访手段,因为那些取得良好治疗效果的患者更可能复诊。这里想强调的是,宁可减少纳入观察的病例数,从而尽量保证全部病例都可以获得全程随访。

说到这个问题,再简单谈谈前一段时间围绕国内某研究者所进行的嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)移植治疗脊髓损伤所引起的争论。Dobkin 等人分析了接受治疗的 7 例患者,认为该工作不符合无论是安全性还是疗效检验的临床试验的国际标准,因此不推荐患者接受该治疗^[3]。但研究者本人认为 Dobkin 文中引用的数据是不真实的^[4],这其实不是问题的关键。Dobkin 等如果真的仅根据 7 例患者的资料便完全否定一项可能涉及数百例病例的研究,恰恰反映了作者的傲慢、偏见和基本科学素养的缺乏,对此可以不用一驳。而另一篇被认为是支持该研究者的文章呢?这是一篇个案报道^[5],在医学研究中,个案报道是最不具说服力的。该文报道的患者在接受细胞移植治疗后 48h 内左肘屈肌及右腕伸肌运动功能改善,4d 内感觉平面下降,如果该文报道的这例患者的情况属实,鉴于该患者在接受细胞移植后出现功能恢复的时间如此之短,这种恢复是否为移植细胞本身的作用,倒是值得探讨的。

3 关注基础研究的新进展

由于脊髓损伤后病理生理变化、修复过程及无法再生原因的复杂性,目前认为,单一手段(包括单一细胞的移植)能引起的成功再生的轴突数量及功能恢复的程度非常有限,甚至同一实验手段在不同实验室得出的结果也不尽相同。以 OECs 为例,最初,一系列的研究结果可以用激动人心来形容,在这些研究中,无论是新鲜损伤还是陈旧损伤,无论是不完全损伤还是完全损伤, OECs 均可明显地促进神经再生,同时可有显著的运动功能改善,甚至呼吸功能改善^[5-9]。根据这些研究, OECs 不仅可促进切断的轴突再生过损伤区,还可形成髓鞘包裹再生及脱髓鞘轴突,并减少脊髓损伤后脊髓实质的减少及空洞的形成。一时间很多人对 OECs 寄予很高的期望并表现出空前的乐观^[10,11],但近年来一些研究的结论似乎更加谨慎^[12,13]。值得关注的是,有人对 OECs 在脊髓损伤中的作用表示怀疑。最近,一项来自美国加利福尼亚大学神经科学系的研究认为 OECs 在脊髓内移植后并不会出现长距离的迁移,所谓的迁移只是由于注射压力作用下的被动扩散,因为这种迁移在移植后 1h 就可以观察到。此外,与骨髓基质细胞及成纤维细胞相比, OECs 移植在促进突起生长方面亦无不同,而且,在大鼠脊髓背束损伤后, OECs 并不能成功桥接皮质脊髓束纤维长过损伤区^[14]。虽然尚无明确的结论,但正反两方面的证据充分说明一个新的科学命题的复杂性,作为相关基础或临床研究的参与者,我们应密切关注相关领域的进展并保持客观冷静的态度。

4 细胞移植途径

根据动物实验的结果,细胞移植治疗脊髓损伤的理想途径及方式是行损伤区及头尾端多点分层微注射,为此必须行椎板切除手术暴露受伤节段脊髓。在临床试验中,单纯只是为了细胞移植(其有无疗效及疗效的大小尚不确定)是否应采用这样的有创手术操作?从人道和伦理的角度确实难以抉择。我们曾尝试在 C 型臂 X 线机引导下经后正中椎板间隙穿刺行脊髓内骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)注射移植,从技术上来说是完全可行的。该方法不仅创伤小,而且避免了手术减压对结果判定可能的影响。因此,我们建议对无需手术减压或固定治疗的患者可以考虑通过此途径进行细胞移植,但对那些已行椎板植骨融合的患者经椎板间隙穿刺可能存在困难。对某些特殊类型的细胞,还可以考虑其他移植途径。如 MSCs 因对损

伤脊髓具有趋向性,可以经血移植。但我们推测,这种趋向性可能具有一定的时间窗。我们通过大鼠的移植实验证实,在损伤 4~5 周内经尾静脉移植 MSCs,移植细胞可向脊髓损伤区域迁移聚集,但 6 周以后移植则无明显的聚集现象。对 MSCs,还有人尝试通过腰穿行蛛网膜下腔移植^[15]。

5 收费问题

免费甚至给予受试者适当的经济补偿是一切临床试验的基本前提。在通常的药物临床试验中,开发者会提供相应的费用,但在细胞移植治疗脊髓损伤的临床试验中,没有类似的开发者提供试验费用,只能通过获得专门的研究经费来进行。但在国内,如此高昂的研究经费往往是很难筹措的,有时候,在患者自愿的基础上收取治疗成本费用可以说是一种权宜之计或无奈之举。但远远超过试验成本的收费行为则令人担忧,如以盈利为目的,在病例的选择上可能会放宽标准,而在结果的判定上,则有可能有意无意地带有倾向性。而有些医疗机构把试验性的治疗手段作为自己的“医疗常规”,短期内收治大量患者,每个患者收费数万甚至十数万,这样的行为确实有背离临床试验初衷的嫌疑,其结果的客观性也难免令人生疑。

6 参考文献

1. 黄红云.对《中国的细胞移植:对最大的人类慢性脊髓损伤临床试验的观察研究》一文的质疑[J].中国脊柱脊髓杂志,2007,17(1):5-8.
2. Lammertse D, Tuszynski MH, Steeves JD, et al. Guidelines for the conduct of clinical trials for spinal cord injury as developed by the ICCP panel: clinical trial design[J]. Spinal Cord, 2007, 45(3):232-242.
3. 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.
4. Guest J, Herrera LP, Qian T. Rapid recovery of segmental neurological function in a tetraplegic patient following transplantation of fetal olfactory bulb-derived cells[J]. Spinal Cord, 2006, 44(3):135-142.
5. Ramón-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, et al. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia[J]. Neuron, 2000, 25(2):425-435.
6. Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, et al. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants[J]. J Neurosci, 1998, 18(10):3803-3815.
7. Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells[J]. Science, 1997, 277(5334):2000-2002.
8. Lu J, Féron F, Mackay-Sim A, et al. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord[J]. Brain, 2002, 125(Pt 1):14-21.
9. Li Y, Decherchi P, Raisman G. Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing[J]. J Neurosci, 2003, 23(3):727-731.
10. Franklin RJ, Barnett SC. Olfactory ensheathing cells and CNS regeneration: the sweet smell of success[J]? Neuron, 2000, 28(1):15-18.
11. Raisman G. Olfactory ensheathing cells: another miracle cure for spinal cord injury[J]? Nat Rev Neurosci, 2001, 2(5):369-375.
12. Riddell JS, Enriquez-Denton M, Toft A, et al. Olfactory ensheathing cell grafts have minimal influence on regeneration at the dorsal root entry zone following rhizotomy[J]. Glia, 2004, 47(2):150-167.
13. Ramer LM, Richter MW, Roskams AJ, et al. Peripherally-derived olfactory ensheathing cells do not promote primary afferent regeneration following dorsal root injury[J]. Glia, 2004, 47(2):189-206.
14. 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]. J Neurosci, 2006, 26(43):11120-11130.
15. Callera F, do Nascimento RX. Delivery of autologous bone marrow precursor cells into the spinal cord via lumbar puncture technique in patient with spinal cord injury: a preliminary safety study[J]. Exp Hematol, 2006, 34(2):130-131.

以进化论的观点评价细胞移植治疗脊髓损伤

孙天胜(北京军区总医院骨科 100700 北京市)

21 世纪伊始,干细胞移植治疗帕金森病的初步成功使一些学者认为利用干细胞移植可以治疗神经疾病的其他疾病,脊髓损伤也在其中^[1,2]。这种想法看似顺理成章,但恰恰忽略了这样一个根本而且重要的事实:帕金森病的病理基础是原始的成神经节细胞病变,而其他疾病如脊髓损伤所涉及的是高级的高度发育的运动

神经元如贝茨细胞。成熟的神经细胞与成神经节细胞在进化谱系中相隔数百万年,完全不可同日而语。早在 20 世纪 70 年代,著名的生物学家特奥多修斯·多布然斯基(Theodosius Dobzhansky)就一针见血地指出:如果不以进化理论为根据,生物学的一切将毫无意义^[3]。脊髓损伤后的修复也应遵循进化论的原则,功能的恢复也是严格按照进化论的规律进行的,即进化低的结构修复能力大于进化高的结构。脊髓中有连接大脑和周围神经系统的所有结构,因此它涵盖了神经系统从最低级原始结构(网状结构)到最高级发达的神经元(贝茨细胞)以及其传导束(锥体束)的广阔范围。按其原则脊髓被修复的一般先后顺序是网状结构、小脑联接、脊髓丘脑联接、大脑皮质脊髓联接。

移植细胞在脊髓损伤中可以桥接损伤断裂的神经轴突、支持轴突的再生、分泌生长因子促进神经的再生、替代损伤的神经元等作用,可以说基本涵盖了脊髓损伤修复的各个环节。干细胞的应用基础是其可塑性,细胞成熟度越低,修复能力越强,但发生恶变的危险也越大。这些细胞的应用究竟有多高的成功机会呢?根据进化的原则,这需要很多的研究才能完全了解原始细胞(干细胞)如何能安全达到目的细胞,其研究过程将是漫长的,绝非一蹴而就。如果说原始细胞应用于脊髓损伤修复还很遥远,那目前有其它较成熟细胞可用于修复脊髓损伤,较成熟的细胞在人类中枢神经系统中是进化中最原始的结构,包括嗅觉系统、边缘系统和网状结构^[4],这三个系统在结构上和功能上密切相关。而近来的研究表明,嗅觉系统比边缘系统和网状结构具备更好的修复能力。嗅觉系统从鼻粘膜上皮组织到侧脑室的深层结构有很多位置可作为细胞取材来源,单纯从生物学角度看,位置越深的细胞修复能力越强。另外还需提及的是嗅觉系统包括的细胞范围很广,远远不止目前试验所用的嗅鞘细胞(OEG),侧脑室周围的深层结构不仅含有嗅觉神经元,还有各种胶质细胞,它们相互作用促进神经元再生,从而修复损伤^[5]。Ramon-Cueto 等于 2000 年发表的一篇文献^[6]显示了 OEG 用于中枢神经修复的治疗作用,引起了世界的广泛兴趣。该文献报道将 OEG 移植入脊髓完全横断的大鼠体内,促进了皮质脊髓束、去甲肾上腺素能以及 5-羟色胺能神经纤维的长距离再生,并通过损伤区域进入脊髓远端,同时还观察到明显的功能恢复,表现出主动的后肢运动,可以支撑身体,后肢对皮肤轻触和本体感受刺激有反应。至今不同的实验室使用不同的细胞采集、扩增、纯化和移植方法,在伤后不同的时间点移植入不同的动物模型中,大部分文献的结果令人振奋^[7]。我们进行的 OEG 移植促进脊髓损伤修复的长期实验研究,也得到了相同的结果^[8]。为了增强 OEG 促进轴突生长的作用,我们还进行了 NT-3 基因修饰 OEG 移植治疗大鼠脊髓损伤的实验研究,实验结果表明基因修饰的 OEG 可以大量分泌具有生物活性的 NT-3,大鼠 BBB 评分有进一步提高^[9]。由此可见,OEG 可以修复大鼠脊髓中进化高的运动功能,当然也有进化低的其他功能如感觉和植物神经、肌张力等功能恢复,但这些功能在大鼠中不易测定。

与此同时,全世界有多位学者开始从事细胞移植治疗人类脊髓损伤的临床研究,目前全世界接受 OEG 移植的脊髓损伤患者超过 400 例^[10],接受移植的大多数病例表现为脊髓中进化低的结构修复,如脊髓损伤平面以下皮肤的温度和颜色、膀胱功能和肠道功能的改善(植物神经功能),肌张力的下降(脊髓小脑的联结),这些功能的恢复在临床中不易测定或常常被忽略,部分患者还表现为感觉功能(触觉和痛觉)有明显的恢复,感觉平面下降 3~10 个脊髓节段,使感觉评分明显增加。极少数病例出现了脊髓损伤平面的运动恢复,表现为损伤平面的关键肌肌力的增加,而损伤平面以下的运动功能无任何恢复,使运动评分增加不明显。其中有一例 18 岁 C3 损伤完全性四肢瘫的患者,细胞移植术后 48h 出现左肘屈曲的 1 级的改善,并出现右腕伸直功能,4d 出现感觉平面下降,到文献报道时已成为 C5 运动和 C4 感觉的完全性四肢瘫^[11]。临床上我们对 11 例脊髓损伤患者行 OEG 移植治疗,得到了相似的结果^[8]。

脊髓损伤动物接受 OEG 移植后可以获得包括运动在内的较满意的功能恢复,而脊髓损伤患者接受嗅鞘细胞移植后仅可获得轻度至中等程度的功能改善,功能恢复程度和可能性由高到低为:皮肤营养状况、痉挛、膀胱和肠道功能、浅感觉(最长达 10 个节段)、运动。这与进化论是完全吻合的。由此我们不能轻率否定嗅鞘细胞移植对脊髓损伤的修复作用,只是离我们的期望值还有很长的距离。脊髓以及脊髓损伤的复杂性决定了任何单一的治疗干预都不可能解决所有问题。因此,尽管细胞具备桥接、支持、分泌生长因子、替代等作用,在脊髓损伤修复中发挥的作用是多方面的,可以说基本涵盖了脊髓损伤修复的各个环节,可还是越来越多的学者强调包括细胞移植在内的多种治疗方法的综合干预。

综上所述,包括细胞移植在内的脊髓损伤的治疗研究还有很长的路,有很多的工作需要做。我们应该鼓励更多更深入的研究,但所有的实验都应基于进化理论并严格遵循科学方法学的原理。

参考文献

1. Björklund 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.
2. 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.
3. Dobzhansky T. Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution[M]. American Biology Teacher, 1973. 125-129.
4. Patestas MA, Gartner LP. A Textbook of Neuroanatomy[M]. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2006. 454.
5. Kalb RB, Strittmatter SM. Neurobiology of Spinal Cord Injury[M]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000. 284.
6. Ramon-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FF, et al. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia[J]. Neuron, 2000, 25(2): 425-435.
7. Barnett SC, Riddell JS. Olfactory ensheathing cells (OECs) and the treatment of CNS injury: advantages and possible caveats[J]. J Anat, 2004, 204(1): 57-67.
8. 孙天胜, 任继鑫, 吴军. 嗅鞘细胞移植促进脊髓损伤修复的长期实验和临床观察[J]. 中国临床康复, 2005, 9(2): 122-124.
9. 吴军, 孙天胜, 王献章, 等. 神经营养素-3 基因修饰嗅鞘细胞移植对急性脊髓损伤作用的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(2): 147-151.
10. Steeves J, Fawcett J, Tuszynski M. Report of international clinical trials workshop on spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2004, 42(10): 591-597.
11. Guest J, Herrera LP, Qian T. Rapid recovery of segmental neurological function in a tetraplegic patient following transplantation of fetal olfactory bulb-derived cells[J]. Spinal Cord, 2006, 44(3): 135-142.

细胞移植治疗脊髓损伤的研究现状与展望

郝定均(西安市红十字会医院脊柱科 710054)

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)治疗的移植物包括组织移植和营养支持细胞移植。组织移植可作为支架桥接损伤间隙,使新生和损伤的轴突沿适当的方向生长,并可刺激有助于轴突生长的蛋白质释放。细胞移植可在脊髓损伤的多个方面起作用,如替代受损细胞如神经元和少突胶质细胞,分泌促进再生的神经营养因子,保护神经元,减轻继发损伤,在脊髓损伤空洞区形成桥接引导神经再生,酶解胶质瘢痕,去除细胞碎片,调节免疫反应,修复脊髓中的非神经组织如血管等。目前可供选择的细胞类型有胚胎干细胞(ES)、神经干细胞(NSC)、嗅鞘细胞(OEC)、雪旺细胞(Schwann cell)、成纤维细胞(Fibroblast)、骨髓间充质干细胞(BMSCs)、巨噬细胞(Macrophage)等。移植方法包括细胞悬浮液立体定向注射法、胶原基质包埋法、生物材料吸附移植法、静脉内或脑室内细胞悬液输入法及组织工程神经脊髓构建等。

1 干细胞移植

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)有多向分化能力,可与宿主神经组织建立功能性突触联系,在中枢神经系统内形成轴突的髓鞘。目前基因转染胚胎干细胞移植是研究的热点,已有细胞粘附分子 11^[1]、MASH1 基因转染^[2] ESCs 治疗 SCI 的研究报道。通过体细胞核转移技术,将来有可能培养出带有患者自身染色体的 ESCs,解决目前存在的 ESCs 来源和免疫排斥反应等问题。

神经干细胞(nerve stem cells, NSCs)具有自我复制、多分化潜能以及分泌多种神经营养因子等生物学特性。放射状胶质细胞(radial glial cells, RGCs)是在胚胎发育中枢神经系统发现的神经干细胞。Hasegawa 等^[3]从鼠神经球分离出克隆 RGCs,其可使轴突生长抑制因子积聚减少,神经丝数量增多,与损伤部位形成细胞内桥接结构,抑制继发损害发生,具有神经保护作用。神经干细胞移植后,睫状神经营养因子的中和作用减少,可减少星形胶质细胞的产生,促进脊髓损伤后皮质脊髓束的再生^[4]。

目前对干细胞的体外或体内定向诱导分化尚未得到很好解决,不能保证植入的 NSCs 按预想途径分化,同时脊髓功能的恢复还需要移植的 NSCs 存活较长时间。因此,未来 NSCs 的研究一方面需要解决移植应用的问题,促进自发的干细胞再生及运动治疗,恢复脊髓功能^[5];另一方面迫切需要探讨 NSCs 发育和分化中基因表达变化和信号的传导与调节,如不同来源 NSCs 的特异性标志,调控 NSCs 多能性、自我更新和分化的机制等。

2 雪旺细胞(Schwann cells, SCs)移植

SCs 是周围神经系统的重要组成部分,移植 SCs 可限制损伤诱导的组织损失,促进轴突再生和髓鞘化^[6]。在脊髓损伤部位移植 SCs 后,大量 CNS 轴突可以沿 SCs 形成的引导管道再生,引导轴突通过移植细胞并且长入远端脊髓中,脊髓的传导速度加快。SCs 能自体取材和大量扩增,能够使髓鞘再生,但是它和星形胶质细胞的相互作用阻碍了其在脊髓损伤修复中的作用。到达星形胶质细胞的边界后 SCs 停止生长和迁移,能够引导轴突长入,但是不能使轴突穿越移植细胞到达远端脊髓^[7,8]。SCs 最有希望的用途可能是它能为再生的轴突提供一个适宜的、支持性的环境,联合应用其他一些治疗措施能够诱导轴突在宿主内有较长距离的再生,移植基因修饰产生神经营养因子 BDNF 和 NT-3 的 SCs 时,其再生效果更为明显。如何保持 SCs 移入中枢部位后的生物活性并增加其迁移范围是今后应着力研究的课题。

3 嗅神经鞘细胞(Olfactory ensheathing cells, OECs)移植

OECs 是一种特殊类型的胶质细胞,具有 SCs 和星形胶质细胞的双重性质,可伴随嗅神经轴突由周围神经系统进入中枢神经系统。嗅觉上皮里的嗅感受神经元终生具有更新能力,同时其轴突也可以再生长入中枢部位的嗅球,这是 OECs 作用的结果。体外培养的 OECs 分泌 NGF、BDNF、NT 3/4、GDNF 等多种促进神经细胞生长、分化和神经纤维再生的神经营养因子。将 OECs 植入脊髓损伤部位,该细胞能分裂增殖,并可抑制胶质瘢痕的形成,拮抗 Nogo 等神经再生抑制性因子的活性,包绕再生轴突形成髓鞘。国内外进行了大量的临床及基础研究^[9,10],证实 OECs 移植治疗 SCI 已显示出良好的应用前景^[11]。除单纯 OECs 移植外,基因修饰及组织工程支架移植治疗 CNS 损伤,将进一步拓宽 OECs 的应用范围和提高 OECs 的治疗效果^[12]。但也有人认为脊髓损伤后 OECs 移植不能表现独特的迁移或促进轴突生长特性^[13]。

4 骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)移植

MSCs 是一种成体干细胞,能诱导成为神经元和胶质细胞,能分泌神经营养因子、细胞因子和其他生物活性因子^[14,15]。由于其具有多向分化潜能,加之取材方便且对机体无害,尤其是可做自体移植,在国内已有 MSCs 移植治疗脊髓损伤成功的报道^[16]。初步研究表明,大鼠脊髓半切损伤后在损伤部位移植未经基因修饰的人 BMSCs,移植细胞可长期存活并良好整合入脊髓组织中,而且可见轴突在移植细胞中生长^[17]。由于 MSCs 分化的可塑性,存在着逆转化现象^[18],目前应进一步研究其分化的具体机制及调控措施,以期促进脊髓损伤的修复治疗。

5 其他细胞移植

基因修饰的纤维原细胞、脐血 CD34+干细胞(umbilical cord blood cells, UCBCs)^[19,20]、羊膜上皮细胞^[21]、激活的巨噬细胞、体外转基因成肌细胞、转化为功能性神经细胞的脂肪组织细胞等,可做为 SCI 自体同源或异体同源移植的新细胞源。作为细胞移植的细胞来源,脂肪组织不仅取之不尽,而且也不会像其他干细胞来源那样会引起伦理学或政治问题。

6 目前存在的问题和对策

目前髓内细胞移植治疗 SCI 仍处于起步阶段,必须进一步进行深入的基础和临床研究,弄清 SCI 后神经细胞之间的信号传递和基因调控机制。在细胞移植治疗方面还需要研究:胚胎干细胞和神经干细胞移植前的定向分化调控;对多种细胞移植的效果进行比较,挑选疗效最佳的细胞类型及联合细胞移植^[22,23];移植的时机和途径的选择;是否能将胶质细胞和神经元按比例共同移植以提高疗效等等。SCI 再生修复研究大多是在啮齿类小动物如大鼠身上进行的,尽管取得了一定的疗效,但需要进一步在较为高等的大动物如犬、猪、羊等动物身上得以验证,从实验到临床、从动物到人的应用还有相当长的一段路要走。

另外,细胞移植的效果还比较局限,已经有部分细胞移植在进行临床试验,由于考虑安全性和可行性的问题,多选择单种细胞的自体移植。现在嗅鞘细胞移植治疗 SCI 已经在西班牙、澳大利亚和我国进行临床试验,在以色列进行巨噬细胞移植的临床试验,据报道都取得了一定的效果,这些都给脊髓损伤的治疗带来了曙光。将来还需要综合其他多种治疗方法取得更好的效果,如抑制继发损伤、中和抑制性分子、电刺激和功能

锻炼等。

此外,神经组织工程技术的兴起将在 SCI 修复中发挥重要作用,通过运用基因转染等技术培养理想的种子细胞替代坏死的神经元;利用合适的生物工程支架引导和支持轴突定向生长;添加神经生长所需的营养物质来创造适合神经生长的微环境,三者结合综合治疗,相信在不远的将来,髓内细胞移植、基因治疗结合神经组织工程技术有可能成为攻克治疗 SCI 这一难题的有力武器。

7 参考文献

1. Chen J, Bernreuther C, Dihne M, et al. Cell adhesion molecule 11-transfected embryonic stem cells with enhanced survival support regrowth of corticospinal tract axons in mice after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(8):896-906.
2. Hamada M, Yoshikawa H, Ueda Y, et al. Introduction of the MASH1 gene into mouse embryonic stem cells leads to differentiation of motoneuron precursors lacking Nogo receptor expression that can be applicable for transplantation to spinal cord injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2006, 22(3):509-522.
3. Hasegawa K, Chang YW, Li H, et al. Embryonic radial glia bridge spinal cord lesions and promote functional recovery following spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2005, 193(2):394-410.
4. Ishii K, Nakamura M, Dai H, et al. Neutralization of ciliary neurotrophic factor reduces astrocyte production from transplanted neural stem cells and promotes regeneration of corticospinal tract fibers in spinal cord injury[J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(8):1669-1681.
5. Belegu V, Oudega M, Gary DS, et al. Restoring function after spinal cord injury: promoting spontaneous regeneration with stem cells and activity-based therapies[J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2007, 18(1):143-168.
6. Oudega M, Moon LD, de Almeida RJ, et al. Schwann cells for spinal cord repair [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2005, 38(6):825-835.
7. Firouzi M, Moshayedi P, Saberi H, et al. Transplantation of Schwann cells to subarachnoid space induces repair in contused rat spinal cord[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 402(1-2):66-70.
8. Vroemen M, Caioni M, Bogdahn U, et al. Failure of Schwann cells as supporting cells for adult neural progenitor cell grafts in the acutely injured spinal cord[J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 327(1):1-13.
9. 黄红云, 王洪美, 陈琳, 等. 嗅鞘细胞移植治疗晚期脊髓损伤临床试验初步报告[J]. *立体定向和功能性神经外科杂志*, 2004, 17(6):348-250.
10. Feron F, Perry C, Cochrane J, et al. Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury[J]. *Brain*, 2005, 128(Pt 12):2951-2960.
11. 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.
12. Wang B, Zhao Y, Lin H, et al. Phenotypical analysis of adult rat olfactory ensheathing cells on 3-D collagen scaffolds[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 401(1-2):65-70.
13. 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]. *J Neurosci*, 2006, 26(43):11120-11130.
14. Yano S, Kuroda S, Shichinohe H, et al. Bone marrow stromal cell transplantation preserves gamma-aminobutyric acid receptor function in the injured spinal cord[J]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(11):1682-1692.
15. Deng YB, Liu XG, Liu ZG, et al. Implantation of BM mesenchymal stem cells into injured spinal cord elicits de novo neurogenesis and functional recovery: evidence from a study in rhesus monkeys[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(3):210-214.
16. 赵廷宝, 卢兆桐, 赵凌云, 等. 骨髓间充质干细胞与嗅鞘细胞联合移植治疗脊髓损伤的早期观察[J]. *中国矫形外科杂志*, 2006, 14(5):346-348.
17. Lee KH, Suh-Kim H, Choi JS, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats[J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2007, 67(1):13-22.
18. 姚晓黎, 张成, 冯善伟, 等. 成人骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的逆转化现象[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(5):513-516.
19. 李洪钧, 刘海英, 赵宗茂, 等. 人脐血干细胞移植促进大鼠脊髓损伤神经恢复[J]. *中国医学科学院学报*, 2004, 26(1):38-42.
20. Nishio Y, Koda M, Kamada T, et al. The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats[J]. *J Neurosurg Spine*, 2006, 5(5):424-433.
21. Wu ZY, Hui GZ, Lu Y, et al. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2006, 119(24):2101-2107.
22. Ziv Y, Avidan H, Pluchino S, et al. Synergy between immune cells and adult neural stem/progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(35):13174-13179.
23. Guo JS, Zeng YS, Li HB, et al. Cotransplant of neural stem cells and NT-3 gene modified Schwann cells promote the recovery of transected spinal cord injury[J]. *Spinal Cord*, 2007, 45(1):15-24.

(收稿日期:2007-07-26)

(本文编辑 卢庆霞)