

## 热点评析

# 人羊膜细胞临床前研究: 在治疗神经损伤研究方面的进展

郭礼和

在本刊上一期(中国细胞生物学学报 2011, 33(4): 451-4)介绍了人羊膜上皮细胞具有胚胎干细胞和移植免疫耐受等优良特性, 说明它能满足干细胞用于临床治疗的以下六个基本条件: 1)不会致癌(包括良性瘤、肉瘤和癌); 2)不会引起炎症、过敏和免疫反应; 3)移植配型要求低; 4)分化能力要强(移植的细胞分化后在形态结构和生理机能方面要能基本取代损伤的细胞, 也就是分化要彻底); 5)干细胞制备工艺简单, 能够拿到足够数量的细胞, 满足临床治疗的要求; 6)每批生产出的细胞制剂要稳定, 质量完全可控。

目前, 羊膜细胞在临床前已开展了多方面的研究, 主要包括以下几个领域: 神经损伤及退行性疾病、糖尿病、肌肉疾病、血管性疾病、心肌疾病、肺和肝的纤维化疾病、提高造血干细胞移植存活以及在组织工程方面的应用等。本篇首先介绍人羊膜上皮细胞在神经损伤性疾病方面的临床前研究进展, 其他方面的进展将后续在本刊分别介绍。

人羊膜上皮细胞是由胚胎发育到第8天内细胞团开始演化为上胚层(epiblast)分化而来的, 是胚胎最早分化出来的组织, 它的功能可能与胚胎的营养、呼吸、排泄和免疫耐受有关, 分泌的羊水为胎儿发育提供生理、生化、和物理的稳态环境(包括胎儿防震)。

羊膜上皮细胞具有神经细胞生物化学方面的特性, 能合成和分泌多巴胺(DA), 细胞膜上表达多巴胺的受体D1和D2, 质膜上也有多巴胺转运蛋白(dopamine neurotransmitter transporter, DAT)表达。此外, 羊膜上皮细胞能分泌神经营养因子(例如: BDNF、NT-3、NGF等)和其他神经递质和调质(例如: 儿茶酚胺、乙酰胆碱、去甲肾上腺素、组胺、五羟色胺、尿紧张素、神经紧张素和生长激素抑制素等)。从

上述结果可以看出羊膜上皮细胞在生化特性方面非常像神经细胞。

胚胎发育成三个胚层之后, 外胚层与羊水直接接触。由外胚层最早分化出神经组织, 然后启动三个胚层向不同方向分化。神经分化可以看作是胚胎分化的火车头。由于羊膜上皮细胞与神经细胞在生化特性上太相似了, 自然使我联想到它与早期胚胎神经分化是否有关? 这个问题至今还没有人去探索, 但我相信以后会有人去研究和探索!

羊膜上皮细胞具有胚胎干细胞特性, 这一点在前一期“热点评析”栏目中已作了阐述, 也谈了它具有神经细胞生化方面的特性。基于这两点, 人们必然会想到羊膜上皮细胞应该具有向神经干细胞和神经组织分化的潜能, 而且要比其它来源方便的成体干细胞(例如: 间充质干细胞)分化能力要强。早在1996年Sakuragawa就提出: 人的羊膜上皮细胞可以作为神经元和胶质细胞的祖细胞, 因为它能表达这两类细胞的分子标志物。目前, 已有越来越多的研究表明, 人羊膜上皮细胞在体外很容易诱导分化为神经细胞, 也可不经体外诱导, 直接移植到体内治疗神经损伤及退行性疾病。

神经损伤包括外周神经损伤和中枢神经损伤, 本文仅限于中枢神经损伤方面的讨论, 这里包括脊髓损伤、创伤性脑损伤、脑中风等。

## 1 脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)

脊髓损伤产生神经细胞进程性死亡, 轴突退化和多种运动、感觉和自主神经功能丧失。印度科学家Sankar等的实验室将戴帽猴(bonnet monkey)脊髓切断后移植了人羊膜上皮细胞, 可以看到移植的细胞整合到脊髓, 能够长期生存, 并能阻止疤痕形成(Role of human amniotic epithelial cell transplanta-

tion in spinal cord injury repair research. *Neuroscience* 2003; 118: 11-7)。我们与苏州大学第一附属医院惠国楨、李向东教授合作用恒河猴作了上述同样实验, 不仅能证实上述现象, 而且恒河猴的后肢运动能力完全能够恢复(*中华神经外科杂志* 2007; 23(2): 149-52)。我们与无锡第三人民医院合作, 在苏州大学第一附属医院神经外科专家惠国楨教授指导下, 于2007年3月16日用人羊膜上皮细胞对一位C5-C7高位截瘫100天后的65岁老人进行治疗, 一个月后能够自主控制大小便, 四肢感觉及运动功能已有恢复, 能独立翻身、坐立, 在搀扶帮助下可站立, 治疗40天后就出院了。从这一病例可以看出: 人羊膜上皮细胞对单纯性的脊髓损伤治疗有明显的效果。

下面是无锡市第三人民医院神经外科提供的病例报告:

患者因“颈部扭伤四肢麻木无力2月”, 于2007年2月9日以“C5-7椎体硬脊膜外血肿, 高位截瘫”收入无锡市第三人民医院神经外科住院治疗。入院前2月(2006.12.7)晨练拉单杠时突感左侧肢麻木, 走回家后麻木加重, 并感左侧肢体无力, 到无锡市二院就诊, 诊断为“脑中风”住院治疗, 具体治疗不详, 病情不见好转, 逐渐加重, 四肢无力, 以下肢为著, 颈根平面以下麻木, MRI检查示C5-7椎硬脊膜外异常信号病灶, 考虑“硬脊膜外恶性病变”, 请无锡四院有关专科会诊, 意见仍为“硬脊膜外恶性病变”, 又到苏州大学附属第一医院门诊, 考虑“C5-7椎体硬脊膜外血肿, 高位截瘫”, 发病2月到无锡三院就诊收入院治疗。入院时查体: T: 36.5℃, R: 16次/分, P: 96次/分, BP: 127/63 mmHg, 神清, 病痛面容, 无呼吸困难, 感觉: 胸乳头平面(T4)以下皮肤痛、温、触觉减退。运动: 左上肢近端肌力III级, 远端肌力II级, 右上肢近端肌力II级, 远端肌力0级; 左下肢近端肌力III级, 远端肌力II级, 右下肢近端肌力0级, 远端肌力0级。肌张力: 四肢肌张力降低。腱反射: 肱二头肌、肱三头肌、膝反射减弱, 腹壁、提睾反射、球海面体肌、肛门反射消失, 大小便失控。病理反射: Babinski征阴性。C5-7棘突轻压痛。MRI检查示C5-7椎硬脊膜外梭形异常信号, 提示急性硬脊膜外血肿。诊断: C5-7椎体硬脊膜外血肿, 高位截瘫。于2007年3月16日在全麻下行C5-7椎板减压, 植入羊膜细胞 $1.5 \times 10^7 \times 1$  ml+明胶海面, 植入Ommaya管, 术后次日感双上肢左下肢活动明显改善。因植入Ommaya管处切口CSF漏, 于2007年3月24日在局麻下拔除Ommaya管。2007年3月28日复查脊髓功能: 左肋下平面(T7)、右腹股沟平面以下皮肤痛觉减退、温、触觉存在, 左上肢近、远端肌力V级, 右上肢近端肌力III+级, 远端肌力II级, 皮肤痛、温、触觉存在,

左下肢远端肌力IV, 右下肢肌力近端III级, 远端II级(跖伸、跖曲), 皮肤痛、温、触觉存在, 四肢肌张力略低, 右肱二头肌腱反射活跃, 双膝反射对称, 腹壁、提睾反射、球海面体肌、肛门反射消失, 大小便有便意, 不能控制, 但能排出, 无明显尿潴留。分别于2007年3月28日, 2007年4月12日在局麻下行L3-4间隙腰大池穿刺, 置硬膜外麻醉留置管近T1-2椎平面, 注射羊膜细胞 $7 \times 10^6 \times 1$  ml和 $1.5 \times 10^7 \times 1$  ml。2007年4月13日复查脊髓功能: 左脐平面(T10)、右腹股沟平面以下皮肤痛觉减退, 温、触觉存在, 左上肢远端肌力V级, 右上肢近端肌力IV+级, 远端肌力III级, 皮肤痛、温、触觉存在, 右上肢自发疼痛, 左下肢远、近端肌力V, 右近端III级, 远端II级(趾伸、跖曲), 皮肤痛、温、触觉存在, 四肢肌张力无明显增高, 右肱二头肌腱反射相对活跃, 双膝反射对称, 腹壁、提睾反射、球海面体肌、肛门反射消失, 大小便有便意, 控制能力差, 但能自行排出大小便, 无明显尿潴留, C5-T1皮肤切口一期愈合。2007年4月28日复查脊髓功能: 左脐平面下3 cm(T11)、右腹股沟平面(L1)以下皮肤痛觉减退, 温、触觉存在, 左上肢远端肌力V级, 右上肢近端肌力V级, 远端肌力III级, 皮肤痛、温、触觉存在, 右上肢自发疼痛减轻, 左下肢远、近端肌力V, 右下肢近端III级(膝关节屈曲离床面15 cm), 远端II级(跖伸、跖曲), 皮肤痛、温、触觉存在, 四肢肌张力无明显增高, 右肱二头肌腱反射相对活跃, 双膝反射对称, 腹壁、提睾反射、球海面体肌、肛门反射消失, 大小便有意, 控制能力差, 但能自行排出大小便, 无明显尿潴留。能独立翻身、坐立, 在搀扶帮助下可站立。

记录者: 无锡市第三人民医院神经外科副主任医师 陈革

2007.04.28

用人羊膜上皮细胞治疗这位老年病人出院回家5个月后, 我们作了一次回访, 看到他在家人搀扶下能够行走, 病情有了进一步改善。

我们在研究人羊膜上皮细胞治疗动物脊髓损伤时, 注意到因神经损伤造成的小便失禁治疗。根据神经损伤的部位不同, 神经源性膀胱的病患可分为两大类, 一种是痉挛性神经源性膀胱, 是因为比较高位(腰椎以上)的中枢神经受到损伤, 这样病患会有不自主排尿的症状, 由于膀胱是处于一种痉挛性收缩的状态, 所以膀胱的容量常常是小于300 ml, 而膀胱内的压力也会比较高。另一种是松弛性神经源性膀胱, 是因为损伤部位比较低, 使得膀胱肌肉失去收缩力, 整个膀胱胀得很大, 积了很多尿液后才会有部分尿液由尿道溢流出来。

神经源性膀胱至今尚无很理想的治疗方法, 其

治疗原则是保护上尿路功能,有效控制感染,避免尿失禁发生,提高患者生活质量。我们用人羊膜上皮细胞治疗动物脊髓损伤时,首先观察到动物下身的毛发由潮湿渐渐变干,这表明动物因脊髓损伤造成的小便失禁,因人羊膜上皮细胞治疗首先恢复的是对小便自主的控制,说明人羊膜上皮细胞能有效治疗神经源性膀胱功能失调,尤其是改善痉挛性神经源性膀胱功能失调,进而改善和恢复膀胱对小便自主控制的生理功能(专利申请号:200810043857.6)。

## 2 创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)

创伤性脑损伤及其并发症影响病人的生存质量,严重的最终会造成植物人或死亡。由于传统治疗方法难以取得良好的疗效,因此干细胞移植就有可能成为治疗创伤性脑损伤主要的方案。由于人羊膜上皮细胞不但能表达神经元和胶质细胞的标记,还能合成释放神经营养因子,移植后也无排斥反应,利用它来治疗创伤性脑损伤应该是一个理想的临床方案。可惜至今还未见其他实验室发表过这方面的研究论文。我们用大鼠制作损伤性脑损伤模型,用羊膜上皮细胞治疗后可以明显改善大鼠运动功能(中华神经外科杂志2006; 22(3): 170-3)。在苏州大学第一附属医院惠国桢教授指导下,我们与无锡市第三人民医院神经外科合作,对一位因交通事故造成创伤性脑损伤而呈植物生存状态100天后的病人,用人羊膜上皮细胞进行治疗。治疗40天后病人有微笑反应,顺目反射,左手有吩咐握手动作,据陪伴病人的家属口述,病人左手能自行摸床边小孩头。

下面为无锡市第三人民医院神经外科提供的病例报告:

患者双额叶、右颞叶脑挫裂伤,右额颞顶急性硬膜下血肿,右半球脑肿胀,弥漫性轴突损伤,左中颅底骨折,脑疝晚期,左项头皮挫伤。

病史:因车祸致颅脑伤1.5小时于2007年2月26日11:30时急诊入院,入院前1.5小时(2007年2月26日10:00时)骑自行车被面包车撞倒,昏迷,左耳出血,呕吐,既往有慢支炎病史。就诊时:去脑强直,GOS平分4分,左耳活动性出血,右瞳孔散大,做完CT后左瞳孔散大,急诊右额颞顶开颅血肿清除,去骨瓣减压,气管切开,术后散大瞳孔回缩,四肢定位反应,腰穿及常规治疗,术后2周气道痰多,肺部金葡萄菌、鲍曼不动杆菌感染,术后前3周CT复查脑室无明显扩大,脑积水不明显,偶

有自发睁眼,握手吩咐动作反应微弱,伤后4-6周逐渐出现四肢屈曲,肌张力增高,无自发睁眼,无握手吩咐动作反应,CT复查示脑皮质变薄,脑室扩大,脑积水,呈植物生存状态。

经减压皮瓣右侧脑室穿刺羊膜细胞移植治疗:鉴于常规治疗近3月,意识、神经功能无改善,去皮植物生存状态,采用羊膜细胞脑室移植治疗,分别于2007年5月17日16:00第1次注射治疗,剂量:  $10 \times 10^7/\text{ml} \times 1.5 \text{ ml}$ ; 2007年5月31日15:30第2次注射治疗,剂量:  $10 \times 10^7/\text{ml} \times 1.5 \text{ ml}$ ; 2007年6月14日14:00第3次腰椎3-4间隙穿刺羊膜细胞注射治疗,剂量:  $10 \times 10^7/\text{ml} \times 1.5 \text{ ml}$ 。第1次注射后9天(07年5月26日):发现减压皮瓣张力降低,有皱眉表情。刺痛(打针时)肢体回缩,四肢肌张力有降低。复查CT脑室周边水肿减轻。实施治疗第40天(2007年6月25日9:00)左手有吩咐屈指动作,有微笑反应,顺目反射。皮瓣张力平皮缘。第41天(2007年6月26日16:20)查体:左手有吩咐握手动作,微笑反应较前反应灵敏,据陪伴病人左手自行摸床边小孩头;临出院前(2007年7月10日):胃管饲,口喂流质食能吞咽,呛入气道;二便反射性排出。

功能障碍评分(DRS):治疗前20分,治疗后第54天15分。3次穿刺羊膜细胞注射治疗无畏寒、发热、颈强、呕吐等任何不良反应。

记录者:无锡市第三人民医院神经外科副主任医师:陈革

2007.07.11

## 3 脑中风(stroke)

脑中风也称脑卒中或脑血管意外,是一种脑血管突发性的血流循环障碍性疾病。可分成缺血性、出血性和混合性(同时存在缺血和出血)。病因很多,例如高血压、血栓、血管瘤、血管梗塞、心脏病等。不管何种病因引起,都会造成短期急性神经元死亡和长期神经元调亡,从而引起功能障碍和肢体瘫痪。目前还没有有效的药物治疗。人们正在期待干细胞的治疗。

正如前面所说,人羊膜上皮细胞具有神经细胞生化特性,有望成为脑中风治疗的重要手段。Okawa及其同事最早用羊膜上皮细胞治疗成年沙鼠(gerbils)脑缺血,观测到羊膜上皮细胞迁移到海马CA1锥体层,存活下来,并转化成神经元样细胞和神经干细胞(Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. Neuroreport 2001; 12: 4003-7)。我们实验室用人羊膜上皮细胞移植到脑缺血大鼠脑内,能够明显改善大鼠行为和运动,而且也能缩小脑梗死体积。若羊膜细胞再转入GDNF,

治疗效果更为稳定和明显(Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. Shock 2008; 29: 603-11)。后来, 我们用人羊膜上皮细胞直接注射到侧脑室, 避开对脑实质的二次损伤, 治疗能够也能够达到同样效果。

人羊膜上皮细胞治疗脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)效果也很明显(Treatment of intracerebral haemorrhage in rats with intraventricular transplantation of human amniotic epithelial cells. Cell Biol Int 2010; 34(6): 573-7)。通过给脑出血大鼠的侧脑室注射人羊膜细胞, 对脑出血后脑脊液内多巴胺浓度升高具有强烈抑制作用, 表明这种治疗很有临床价值。在脑损伤的急性初期, 脑内会分泌大量多巴

胺, 从而引起兴奋性神经递质谷氨酸大量释放, 与受体NMDA结合, 激发大量钙流入, 促进自由基生成, 引发神经兴奋毒, 造成神经细胞伤害和调亡, 扩大脑的进一步损伤。这种现象不仅为脑出血所特有, 脑缺血、脑缺氧、创伤性脑损伤、低血糖等都会引发神经兴奋毒, 尽管脑损伤诱因不同, 但它们都存在同样的损伤机制。及早控制多巴胺水平升高, 应是治疗脑损伤早期共同采取的手段。

从图1中可以看出, 大鼠脑出血初期人羊膜细胞可以明显抑制多巴胺水平的升高。出血后期(28天), 由于出血造成多巴胺能神经元的损伤, 非羊膜细胞治疗组(ICH)的多巴胺分泌远低于无脑出血的正常对照组(N), 而治疗组(CURE)接近正常对照组(N), 高于出血的非治疗组(ICH)。

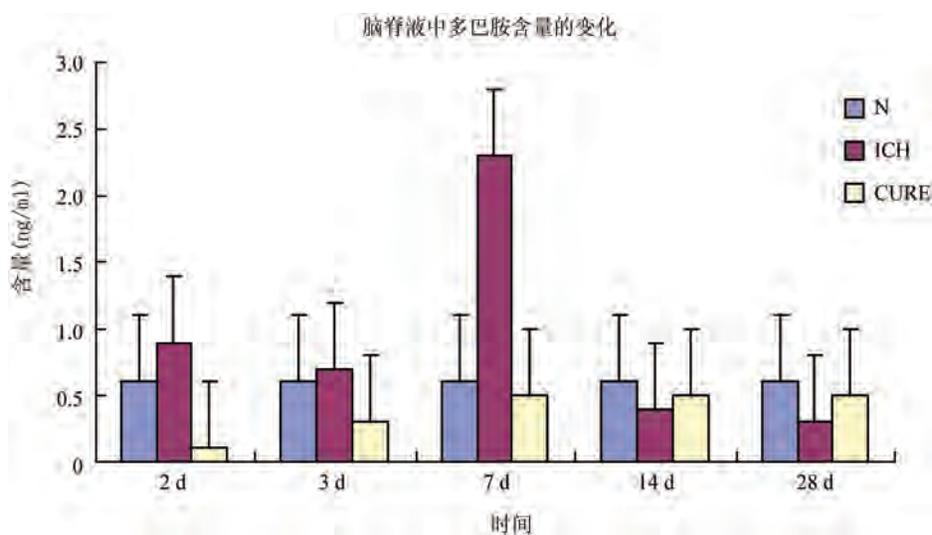


图1 人羊膜上皮细胞对大鼠脑出血引发多巴胺释放的抑制作用

N: 正常对照组(无脑出血); ICH: 出血实验组(无羊膜细胞治疗); CURE: 代表有脑出血的人羊膜上皮细胞治疗组。