

热点评析

人羊膜细胞临床前研究: 治疗神经退行性疾病方面的研究进展

郭礼和 赵刚 刘天津

本刊(中国细胞生物学学报 2011; 33(5):)介绍了人羊膜细胞在治疗神经损伤方面的研究进展,说明人羊膜上皮细胞具有神经细胞生物化学方面的特性,例如:合成和分泌多巴胺(DA)、表达多巴胺受体D1和D2、表达多巴胺转运蛋白(dopamine neurotransmitter transporter, DAT)等。此外,羊膜上皮细胞能分泌神经营养因子(BDNF、NT-3、NGF等)和其他神经递质及调质(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),可以看出人羊膜上皮细胞在生化特性方面与神经细胞有许多相似之处。

人羊膜上皮细胞移植到脑内很容易分化成神经类细胞,不需要体外诱导分化,只需直接移植到需要部位或注入侧脑室。它也具有神经干细胞那样向神经损伤部位迁移、边迁移边分化的特性,尤其在神经纤维束上表现更为明显。(图1~图5, 本文所有

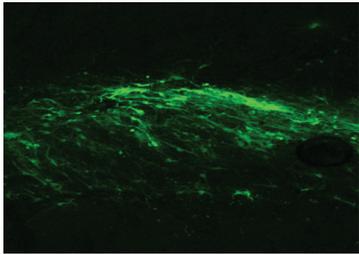


图1 人羊膜上皮细胞(GFP基因绿色荧光体外标记)注入大鼠大脑皮层向四周迁移和分化,形成神经网络状结构。

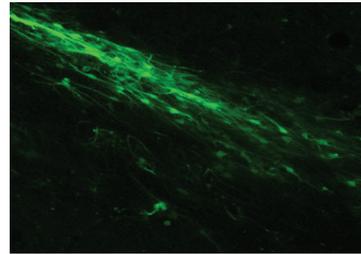


图2 人羊膜上皮细胞(GFP体外标记)注入大鼠大脑胼胝体(注入点位于图的右上角),沿着神经纤维束向一侧方向迁移和分化,许多细胞已分化成类似两极或多极神经元。

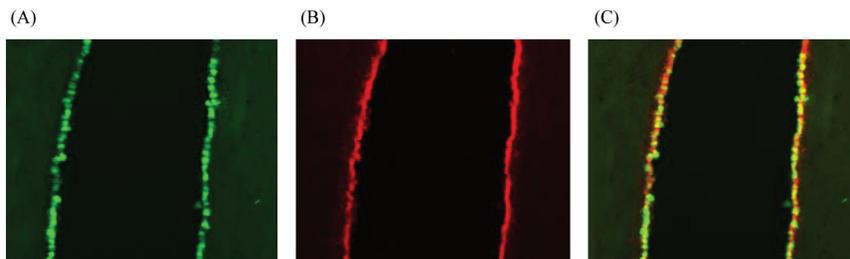


图3 人羊膜上皮细胞(GFP体外标记)注入大鼠侧脑室,然后迁移到第三脑室,并嵌入室管壁形成一层柱状上皮样细胞。A: 人羊膜上皮细胞嵌入第三脑室两侧的室管壁内; B: 第三脑室vimentin(室管膜上皮细胞的分子标志物)的免疫组化; C: (A)(B)两图的重叠,显示羊膜细胞分化为室管膜细胞(黄色代表分化的细胞)。

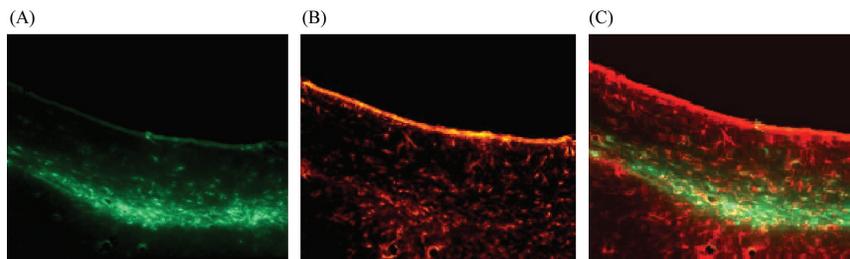


图4 GFP标记的人羊膜细胞在侧脑室贴壁生长后,会迁移到室管膜下区(SVZ),并分化成放射状胶质细胞。A: 荧光标记的人羊膜上皮细胞从室管膜迁入室管膜下区; B: 侧脑室和室管膜下区的胶质细胞特有的分子标志物GFAP免疫组化切片; C: (A)(B)两图的重叠,黄色为人羊膜上皮细胞分化的神经胶质细胞。

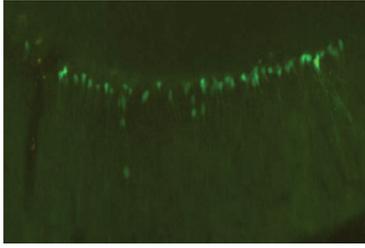


图5 GFP标记的人羊膜上皮细胞注入大鼠海马伞后, 大多数荧光标记的细胞迁到海马齿回, 沿着沟回排成单层, 形成单极神经样细胞。

图片来源于本实验室)

上述实验结果可以看出, 人羊膜上皮细胞在脑内很像神经干细胞, 容易发生迁移和分化。分化的神经细胞类型取决于羊膜细胞所处的微环境。人羊膜上皮细胞具有神经细胞的生化特性, 其在脑内的细胞学行为为神经损伤和退行性疾病的治疗奠定了坚实基础。本文将重点介绍本实验室开展的中枢神经退行性疾病临床前治疗方面的研究工作, 主要包括: 帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)、老年性痴呆(Alzheimer disease, AD)和多发性硬化(Multiple sclerosis, MS)。

1 帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)

帕金森氏病(PD)是以中脑黑质多巴胺能神经元进行性调亡为特征的神经退行性疾病, 生化变化表现为其位于纹状体的神经末梢分泌的多巴胺明显减少, 造成纹状体内多巴胺和乙酰胆碱平衡失调。临床上表现为震颤、肌强直、运动减少等。

上世纪90年代以前, 干细胞临床前治疗研究还未问世, 人们用天然分泌多巴胺的细胞(如: 肾上腺髓质嗜铬细胞)或转酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)基因的细胞注入大脑纹状体来治疗帕金森氏病, 能够取得一些疗效。但是, 如果使用细胞株则容易致癌, 不安全; 若使用原代细胞则容易被排斥, 疗效期很短。故而, 这些治疗方案被后来的干细胞治疗所代替。目前, 在临床上使用的多为间充质细胞。由于羊膜上皮细胞能够分泌多巴胺和神经营养因子(GNF、NT3、BDNF等), 并且在脑内容易分化成神经样细胞, 理论上, 人羊膜上皮细胞治疗帕金森氏病要比间充质细胞效果好, 但需要临床研究数据证明。

研究帕金森氏病治疗的动物模型, 一般是用6-羟多巴胺损毁老鼠纹状体一侧, 以减少多巴胺分泌, 与未损毁一侧造成分泌不平衡。用阿扑吗啡刺激后, 老鼠会向一侧打转。治疗帕金森氏病的有效药物或细胞, 会使老鼠打转数下降, 下降数越多疗效越好。

图6显示用人羊膜上皮细胞(HAEC)直接注入模型鼠的纹状体, 观察老鼠的打转数下降情况, 以此来评价治疗帕金森氏病的疗效。结果显示: 单纯人羊膜上皮细胞治疗(HAEC组)和转BDNF基因的人羊膜上皮细胞组(BDNF组)的疗效基本相同。

直接将细胞注入纹状体会造成脑实质的二次损伤。从临床上考虑将细胞注入到侧脑室应该更为安全。我们的实验证明同样可以达到治疗效果。同时, 羊膜细胞治疗后纹状体和脑脊液的多巴胺含量有明显增加(图7)。

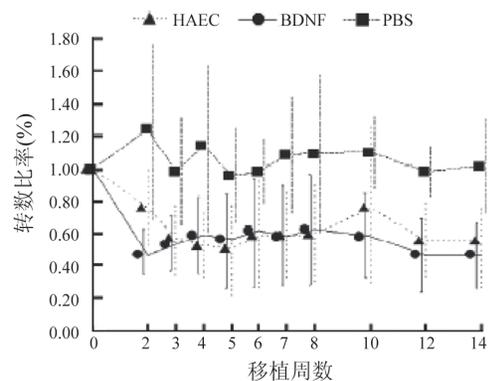


图6 人羊膜上皮细胞(HAEC)和转BDNF基因的人羊膜上皮细胞(BDNF)治疗帕金森氏病模型鼠的疗效比较。

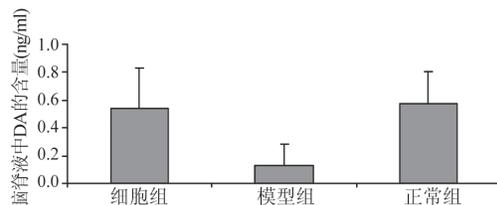


图7 人羊膜上皮细胞注射侧脑室治疗帕金森氏病, 增加脑脊液多巴胺含量。细胞组为羊膜上皮细胞治疗组; 模型组为非治疗组; 正常组为未患帕金森氏病的正常小鼠。

2 阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)

阿尔茨海默病(AD)是与年龄相关的进行性记忆丧失和高级认知功能减退的神经系统退行性疾病, 其特征性病理改变为细胞外聚集的 β 淀粉样蛋白(A β)沉积形成老年斑, 细胞内高度磷酸化的tau蛋白所致的神经原纤维缠结(NET)以及前脑基底胆碱能神经元的显著丢失。AD发病率占65岁以上人群的8%~10%, 且以每5年1倍的速度递增。病因和发病机制不完全清楚, 多数学者认为主要是脑内胆碱能系统受到损害, 并提出了“胆碱能假说”: 前脑基底胆碱能神经元的退变及大脑皮质和其他区域胆碱能递质的缺失是AD患者认知失常的主要病因。传统的治疗方法是口服乙酰胆碱酯酶抑制剂, 可以改善

认知功能,但无法从根本上治愈。

近来研究表明干细胞移植可以治疗神经变性疾病,可供移植的细胞包括胚胎干细胞、骨髓间充质细胞等。有人将神经干细胞(NSC)体外扩增,然后移植到老年鼠的侧脑室。4周后这些细胞非常有序地迁移到大脑的许多部位,包括大脑皮层和海马,并分化为神经细胞和星形胶质细胞,部分细胞长出树突、轴突并和宿主建立突触联系。用Morris水迷宫评价动物的认知功能,发现由衰老引起的记忆损伤大鼠在NSC移植后认知功能显著改善,对正常成年鼠和记忆未损伤老年鼠的认知功能未有明显影响。大量动物实验证实:骨髓间充质干细胞经上述各种途径移植后均可到达病损部位,并分化成神经干细胞、成熟神经元和胶质细胞,能安全、有效地改善中枢神经损伤后的功能恢复。在AD模型上进行脑室灌注神经生长因子(NGF)、脑内移植NGF基因修饰的成纤维细胞或神经元祖细胞均能明显保护基底前脑受损的胆碱能神经元。

虽然,上述干细胞治疗老年痴呆已有报道,但用羊膜上皮细胞治疗AD还未见报道。本实验室在这方面已经做了一些探索。我们用国际公认的转基因鼠(APPswe/PS1小鼠)作为AD模型研究对象,侧脑室注射人羊膜上皮细胞,观察对阿尔茨海默病的治疗作用(图8)。

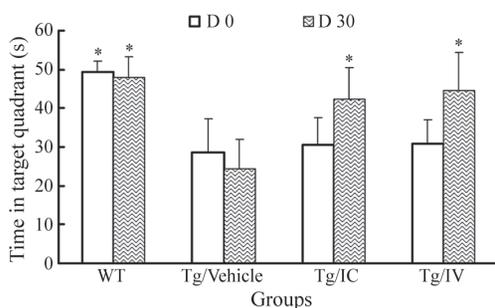


图8 人羊膜上皮细胞治疗AD疗效,用模型动物行为学(目标象限停留时间)来评价。WT:正常老年小鼠(未患AD);Tg/Vehicle:转基因鼠(APPswe/PS1小鼠,患有AD,非细胞治疗);Tg/IC:转基因鼠的侧脑室注射人羊膜上皮细胞治疗组;Tg/IV:转基因鼠的尾静脉注射人羊膜上皮细胞治疗组。图中的D0表示实验鼠注射羊膜细胞前的水迷宫检测目标象限停留时间;D30表示细胞治疗30天后目标象限停留时间。* $P < 0.05$,与Tg/Vehicle组比较。

从图8可以看出,正常鼠(WT组)因不患AD,它们的行为学在实验前(D0)和实验后(D30)不应有变化,也就是目标象限停留时间前后没有大的变化。转基因鼠因患有AD,但没有用细胞治疗(Tg/Vehicle),其行为学也不应有太大的变化,若有变化,其目标象限停留时间会少一些,因为AD是一种进程性疾

病,一个月后病情会严重一些。羊膜上皮细胞治疗组无论是侧脑室给细胞(IC)还是静脉给细胞(IV),病情都会有缓解,也就是治疗前后的行为学有变化,目标象限停留时间延长了。

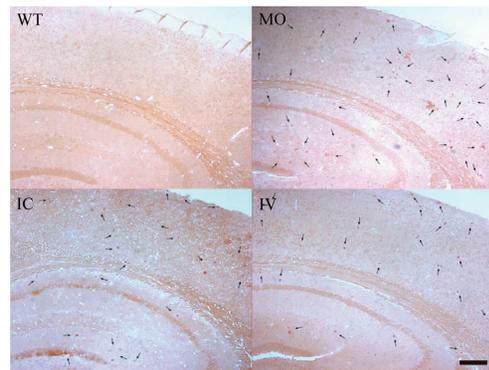


图9 羊膜上皮细胞对AD模型动物大脑皮层/海马老年斑影响。WT:正常老年小鼠30 d后皮层/海马老年斑变化情况;MO:转基因痴呆模型鼠(APPswe/PS1)30 d后皮层/海马老年斑变化情况;IC:MO小鼠侧脑室注射羊膜上皮细胞30 d后皮层/海马老年斑变化情况;IV:MO小鼠尾静脉注射羊膜上皮细胞30 d后皮层/海马老年斑变化情况(刚果红染色;scale bar=200 μm)。箭头为老年斑,呈桔红色。

从图9可以看出正常鼠(WT)大脑皮层/海马区没有老年斑的变化;AD病理模型鼠(MO)在治疗前已有老年斑形成,未经细胞治疗,30天后老年斑或保持原样或加重;经过人羊膜上皮细胞治疗,无论是侧脑室(IC)注入还是尾静脉注射(IV),30 d后大脑皮层/海马区的老年斑比未治疗鼠(MO)有明显减少。

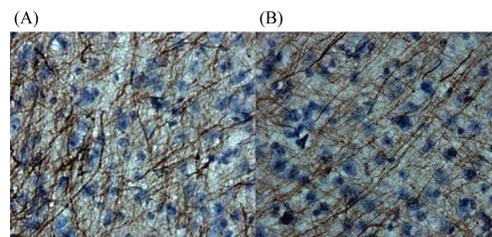


图10 AD病理模型鼠大脑神经纤维缠结变化。A:未经细胞治疗的神经纤维缠结情况;B:人羊膜上皮细胞治疗30 d后神经纤维缠结情况。

从图10可以看出人羊膜上皮细胞治疗AD病理模型鼠30 d后大脑神经纤维纹理纹路和走向比未治疗鼠要清晰,神经纤维缠结情况有明显改善,从而学习和记忆能力得到提高。

上述研究结果表明人羊膜上皮细胞在临床上治疗老年痴呆症有应用前景,可作深入临床研究。

3 多发性硬化(Multiple sclerosis, MS)

多发性硬化是一种中枢神经系统炎症性脱髓

鞘性疾病, 主要是由于损伤了中枢神经系统的白质, 造成神经信号传递发生错乱。该疾病呈世界性分布。MS病因及发病机制迄今未明, 可能是细胞免疫与体液免疫共同参与疾病的发生, 也可能同病毒感染、遗传等因素有关。临床分型有四种: (1)复发缓解型(relapsing remitting Multiple Sclerosis, RRMS): 病情表现为复发缓解交替发生; (2)原发进展型(primary progressive Multiple Sclerosis, PPMS): 即起病后病情不断恶化; (3)继发进展型(secondary progressive Multiple Sclerosis, SPMS): 以复发缓解型起病, 继而病情不断恶化; (4)进展复发型(progressive relapsing Multiple Sclerosis, PRMS): 发病后病情逐渐严重, 并伴有随时复发。

多发性硬化临床症状依受损神经纤维部位和严重程度而定。一般来说, 常见器官受累的有运动、感觉和视觉; 若脑干及小脑系统的神经纤维受损可发生复视、吞咽困难、步履不稳、晕眩等症状。若脊髓发炎会发生运动、感觉、排泄等功能障碍。少数患者还会发生癫痫及智能障碍。

目前治疗药物主要有: 糖皮质激素、干扰素(interferon, INF)、醋酸格拉默(Glatiramer acetate, GA)、米托蒽醌(mitoxantrone)、免疫球蛋白、那他珠单抗等。其他药物还有: 氨甲蝶呤、环孢菌素A、环磷酰胺、克拉屈滨(cladribine)等。

Fassas等(Bone Marrow Transplant 1997; 20(8): 631-8)对15例进展型MS病人进行了自体外周血干细胞移植, 移植后病情虽有改善, 但后来都复发了, 原因并不清楚。很可能是自身外周血基因型或病毒感染所致。干细胞移植虽然是治疗MS的一种新方法, 但目前研究报道还很少, 需要进一步探索。

为了探索人羊膜上皮细胞治疗MS, 我们制作了实验性变应性脑脊髓炎(experimental allergic encephalomyelitis, EAE)动物模型, 这是国际上通用的动物MS病理模型。它是用疫苗(MOG)免疫小鼠, 造成中枢神经脱髓鞘。一般在免疫20 d后, 动物已经表现出明显的MS病理行为。此时, 对病理模型动物进行人羊膜上皮细胞侧脑室和尾静脉注射, 观察两种不同给药方式对动物的行为学变化的影响(图11)。一般造模动物于免疫后第10 d开始出现行为异常, 如寒战、身体蜷缩、少动、走路不稳等, 第10 d后动物行为学评分逐渐升高, 于第20 d左右达到高峰, 而只给佐剂不给疫苗(MOG)的动物行为没有太大变化, 行为学评分一直接近0分(未患病的鼠为正常对照)。在MOG免疫20 d后, 模型动物按评分情况分成模型组和两个细胞治疗组。其中模型组一部

分动物侧脑室注射PBS, 另一部分动物尾静脉注射PBS。这两个亚组行为学数据因无明显差异, 故合并为一组作统计学处理。细胞治疗组: 一组在侧脑室注射人羊膜细胞 1×10^6 ; 另一组在尾静脉注射人羊膜细胞 2×10^6 , 经一个月治疗观察, 治疗组较模型组动物行为学明显改善(图11)。

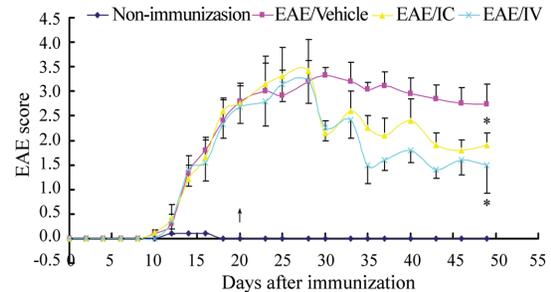


图11 人羊膜上皮细胞(IC)和(IV)对MS模型小鼠的行为学影响。Non-immunization代表正常组(即非免疫组或佐剂组); EAE/IC代表侧脑室注射细胞治疗组; EAE/IV代表尾静脉注射细胞治疗组; EAE/Vehicle代表非细胞(PBS)治疗组。MOG免疫造模后20 d注射细胞, 箭头为注射细胞治疗日期。

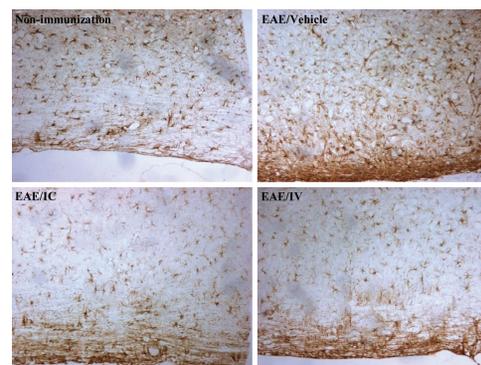


图12 星形胶质细胞特异性分子标志物GFAP抗体染色的免疫组织化学($\times 200$ 倍, 腰膨大纵切面), 观察人羊膜上皮细胞治疗MS对星形胶质细胞增生的影响。Non-immunization为非免疫的正常鼠; EAE/Vehicle为非细胞治疗的PBS病理模型组; EAE/IC为侧脑室细胞注射组; EAE/IV为尾静脉细胞注射组。

从图12可看出: 非免疫的正常鼠脊髓前索外层神经组织胶质细胞(non-immunization)未发生增生; MS病理模型组脊髓前索星形胶质细胞(EAE/Vehicle)明显增生; 细胞治疗组, 无论EAE/IC组或EAE/IV组, 几乎看不到星形胶质细胞增生。

MOG免疫的MS病理模型动物有着明显的行为学异常和组织形态学改变。组织学的异常包括: 白质区炎症细胞增生、神经纤维结构缺失、结构紊乱; 白质区星形胶质细胞增生, 但神经细胞体数目变化不大。人羊膜上皮细胞注射(IC和IV), 对MS动物行为学有改善作用, 并对上述异常病理形态有一定程度的缓解和改善, 表明人羊膜上皮细胞经侧脑室和静脉注射, 具有显著的治疗MS作用。