

## 人神经干细胞移植治疗小脑萎缩

田增民\*, 李志超, 尹 丰, 李士月, 刘 爽 (海军总医院全军神经外科中心, 北京 100037)

[摘要] 目的: 探索人神经干细胞(neural stem cell, NSC)移植治疗小脑萎缩(cerebellar atrophy, CA)的有效性。方法: 8~10周龄人胚胎的小脑细胞在体外稳定扩增后, 借助立体定向技术将其植入经MRI证实的21例CA患者的小脑齿状核内, 将NSC( $3 \times 10^7/0.3\text{ ml}$ )缓慢注入小脑齿状核(此前注入地塞米松 $0.5\text{ mg}/0.1\text{ ml}$ )。本组男8例, 女13例, 年龄19~71岁(平均46岁)。结果: 人胚胎小脑神经细胞可以在体外扩增, 扩增的细胞可达 $1 \times 10^7$ 倍。移植病例未见明显的移植排斥反应。CA患者移植术后3个月临床症状改善的有效率为61.9%, 术后6个月有效率为85.7%; 随访12~28个月(平均18个月), 有效率达90.4%。结论: 应用体外扩增的人NSC可以治疗CA, 而且临床安全、有效。

[关键词] 小脑萎缩; 神经干细胞; 细胞移植

[中图分类号] R 742.82 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2004)09-0933-03

### Clinical transplantation of human neural stem cells in treatment of cerebellar atrophy

TIAN Zeng-min\*, LI Zhi-Chao, YIN Feng, LI Shi-Yue, LIU Shuang (Neurosurgery Center of PLA, Navy General Hospital, Beijing 100037, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the clinical feasibility of transplanting human neural stem cells in treatment of cerebellar atrophy (CA). **Methods:** The cells from human fetal cerebellum (8-10 weeks gestation) were expanded *in vitro* and were allowed to differentiate into neurospheres, the latter were then implanted into CA dentate nuclei with stereotactic operation in 21 CA patients (8 male and 13 female with age ranging 19-71, mean 46) from Feb. 2000 to Aug. 2003. **Results:** The cells of fetal cerebellum were expanded by  $10^7$  folds in undifferentiated state. The effective rates were 61.9% 3 months after transplantation, 85.7% 6 months after transplantation, and 90.4% during a follow-up of 12-28 months (mean 18 months). **Conclusion:** It is feasible and effective to implant the neural stem cells expanded *in vitro* for treatment of CA, but the long-term effectiveness should be further observed.

[KEY WORDS] cerebellar atrophy; neural stem cells; cell transplantation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(9): 933-935]

\* 神经干细胞(neural stem cell, NSC)是具有自我分裂增殖能力和多方向分化潜能的细胞。近年研究<sup>[1,2]</sup>表明, NSC可能成为移植治疗神经退行性疾病(如帕金森病等)的有效手段。本研究利用体外连续扩增的方法, 得到具有分化潜能的干细胞作为移植体, 采用立体定向技术移植治疗小脑萎缩(cerebellar atrophy, CA)患者21例, 并取得了较好的临床疗效。

### 1 资料和方法

1.1 一般资料 本组21例CA患者为本院2000年2月至2003年8月收治的住院患者, 男8例, 女13例; 年龄19~71岁(平均46岁), 其中30岁以下3例, 31~59岁15例, 60岁以上3例。病程3~19年(平均6年)。既往病史: 家族遗传性共济失调家族史者4例, 脑炎2例, 颅脑外伤2例, 出生窒息1例, 病因不详者12例。所有患者小脑萎缩症状和体征明显: 进行性行走不稳、肢体共济失调、构音障碍、咽反射减弱、轮替细动作差。伴随症状: 饮水呛咳12例,

帕金森病样症状(肢体震颤、僵直)4例, 眼球运动障碍4例, 视物模糊者1例, 肢体痉挛发作伴舞蹈样动作1例。

所有病例均经MRI证实, 其中单纯小脑萎缩9例, 小脑萎缩合并脑干萎缩者12例; 脑电图检查正常者13例, 异常者8例。手术中病理检查6例, 病理表现为颗粒细胞层变薄, 蒲肯野细胞(Purkinje cell)萎缩、减少, 伴胶质增生。

1.2 人胚胎组织的分离和培养 健康孕妇8~10周孕龄自然流产的胎儿, 无菌条件下分离胚胎小脑组织, 制备成细胞悬液后接种于含有碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)和B27因子的无血清培养液中, 接种密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 。生长为神经球后, 每隔7~10d传代1次, 接种密度为

\* [基金项目] 国家高新技术发展规划("863"计划)课题(2003AA205070-02)。

[作者简介] 田增民(1951-), 男(汉族), 教授, 主任医师, 硕士生导师

\* Corresponding author. E-mail: tianzengmin@sina.com.cn

(7.5~10) × 10<sup>4</sup>/ml; 再次长为神经球的细胞用于移植手术<sup>[2]</sup>。

1.3 手术方法 采用立体定向技术移植用上述方法培养的NSC。应用MRI扫描定位,机器人辅助无框架脑立体定向手术。选取小脑齿状核作为移植靶点,在局麻状态下,颅骨钻孔,插入穿刺针。应用微量泵,将事先制备的NSC(3 × 10<sup>7</sup>/0.3 ml)缓慢注入靶点。植入NSC前,先往靶点注入地塞米松0.5 mg/0.1 ml,提供流产胎儿的志愿者和接受治疗的CA患者均填写知情同意书,并报经医院伦理委员会批准。按照立体定向手术常规,应用新菌必治1.5 g/d静滴2~4 d,地塞米松5 mg/d静滴5~7 d。

1.4 评定标准 主要依据原有临床症状的改善。显效:共济失调基本恢复,语言流利,饮食呛咳消失,自主神经功能基本恢复。有效:共济失调缓解,语言基本流利,饮食呛咳好转,自主神经功能改善。无效:临床症状无明显变化。随访时间为术后3个月,此后至少每6个月1次。

### 2 结果

本组21例CA患者手术过程顺利,无严重出血、颅内感染及颅神经损伤等严重并发症的发生。1例穿刺道出血,经CT证实(3 ml),给予止血敏750 mg/d静滴及对症治疗1周后痊愈,无后遗症。4例术后2~4 d出现低热(<38℃),给予对症治疗后缓解。平均术后出院时间为3.5 d。

手术后临床症状改善的疗效:术后3个月,显效3例(14.3%),有效10例(47.6%),无效8例(38.1%);术后6个月,显效8例(38.1%),有效10例(47.6%),无效3例(14.3%)。随访12~28个月(平均18个月),有效率90.4%。部分患者CT或MRI随访,影像显示萎缩小脑在形态上较原病灶有明显饱满改变(图1)。

本组随访显示,NSC移植术后6个月的症状缓解率高于术后3个月,单纯小脑萎缩的疗效好于合并有脑干萎缩的疗效,有家族史的患者较其他原因的患者疗效差。

### 3 讨论

小脑萎缩是一组以共济失调为主要表现的中枢神经系统疾病,病理主要表现为小脑蒲肯野细胞的丧失,颗粒层变薄,齿状核神经元脱失伴胶质变性。迄今,其发病原因尚不清楚,亦无有效的治疗措施。现已发现移植孕13~15 d小鼠的小脑细胞悬液,能够改善受体小鼠的平衡运动功能障碍<sup>[3]</sup>。临床上应

用胚胎小脑组织悬液移植治疗小脑萎缩可取得一定疗效,但由于供体细胞来源困难,限制了其在临床的广泛应用<sup>[4]</sup>。

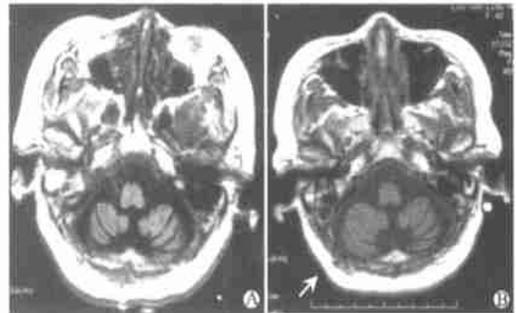


图1 小脑萎缩患者NSC移植治疗后MRI随访  
Fig 1 MRI results after neural stem cell implantation in patients with cerebellar atrophy

A: MR showing obvious cerebellar atrophy before implantation;  
B: MR showing right cerebellar mass (arrow) 13 months after implantation

近年来研究<sup>[5,6]</sup>证实中枢神经系统存在着具有多分化潜能和自我更新能力的神经干细胞,它们在一定的条件下能够进行增殖,并可以向特定的方向进行诱导分化,这使得中枢神经系统损伤和神经退行性疾病的NSC的替代治疗成为可能。本实验中,NSC在体外进行分裂增殖,被移植入神经缺损部位,在局部微环境的影响下分化成相应的受损细胞,重建神经环路,产生神经营养因子或神经保护因子,从而抑制神经变性或促进神经的再生<sup>[7]</sup>。本研究中心的前期工作<sup>[2]</sup>证实,从11周龄以前的胚胎中分离的神经干细胞,在EGF、bFGF存在的条件下可以在体外稳定的扩增(时间达1年以上),并且具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力。

移植小脑的NSC能否分化为蒲肯野细胞,其关键还在于NSC分化调控的机制和影响因素。我们在用含有EGF、bFGF的培养基培养NSC时发现,所培养的NSC能够保持其生物学特性,而且可以得到足够数量的细胞用于移植,数量可以达到1 × 10<sup>7</sup>/0.1 ml,从而为临床治疗奠定了基础。

小脑组织移植治疗小脑萎缩是否有移植排斥反应是困扰临床应用的另一个问题。多数作者认为,血脑屏障的存在和脑内淋巴系统的缺乏对保护移植物的存活中起到了十分重要的作用。移植的神经祖细胞缺乏免疫原性也不易被破坏<sup>[8]</sup>。本组21例CA患者在移植治疗后无排斥反应的发生,佐证了上述结论,有理由相信NSC可能是一种理想的移植治疗物,可用其移植治疗神经退行性疾病。

目前应用体外扩增的NSC治疗神经退行性疾

病还处在临床探索阶段<sup>[9]</sup>。本组 21 例 CA 患者采用立体定向移植治疗无明显并发症的发生,术后无病情加重者。临床治疗有效率有随时间延长而上升的趋势,说明此治疗方法是安全和有效的。本组多数患者在移植术后 1 周内即有自觉症状的改善,可能与植入的 NSC 分泌某些因子,启动了宿主 NSC 的修复有关。尽管人们认为消失的神经环路的精确重建和突触的形成是整体功能恢复的必要条件,但移植细胞神经递质的释放也具有促进神经功能恢复的作用。这些结果说明,NSC 在局部微环境的作用下,有可能形成特定神经网络结构,而功能重建则是局限于一定范围的。

### [参考文献]

- [1] Larsson LC, Corbascio M, Pearson TC, *et al* Induction of operational tolerance to discordant dopaminergic porcine xenografts[J]. *Transplantation*, 2003, 75(9): 1448-1454
- [2] 田增民,刘爽,李士月,等 人神经干细胞临床移植治疗帕金森病[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(9): 957-959
- [3] Gage FH. Mammalian neural stem cell[J]. *Science*, 2000, 287

(5457): 1433-1438

- [4] Kondzalka D, Wechsler L, Goldstein S, *et al* Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke[J]. *Neurology*, 2000, 55(4): 565-569
- [5] Björklund A, Lindvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders[J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3(6): 537-544
- [6] White PM, Morrison SJ, Orimoto K, *et al* Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals[J]. *Neuron*, 2001, 29(1): 57-71
- [7] Hitoshi S, Alexon T, Tropepe V, *et al* Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation of mammalian neural stem cells[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(7): 846-858
- [8] Lindvall O. Parkinson disease. Stem cell transplantation[J]. *Lancet*, 2001, 358(Supp 1): S48
- [9] Hori J, Ng TF, Shatos M, Klassen H, *et al* Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts[J]. *Stem Cells*, 2003, 21(4): 405-416

[收稿日期] 2004-06-07

[修回日期] 2004-07-14

[本文编辑] 尹茶

(上接第 932 页)

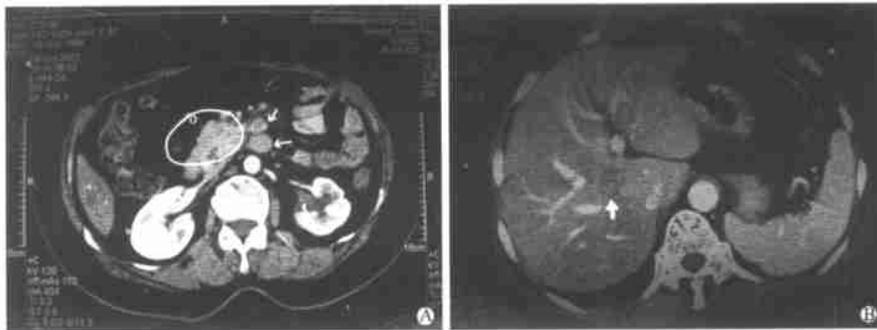


图 1 胰腺颈体部肿瘤组织及邻近脏器的不明来源结节

A: 胰腺肿瘤和增大的肠系膜淋巴结; B: 肝内低密度结节样影为胰岛素瘤肝转移

胰岛素及 C 肽分泌水平仍然较高,且胰岛素/血糖水平 > 0.3,同时影像学提示胰腺肿瘤,符合胰岛素瘤的诊断<sup>[1]</sup>。术后病理及免疫组化提示送检组织为神经内分泌来源,有分泌胰岛素功能,且发生肝脏及肠系膜转移,明确诊断为恶性胰岛素瘤<sup>[2]</sup>。胰岛素瘤的良性与恶性单从细胞形态学上有时难以区分,主要依靠肿瘤有无转移、血管侵犯、局部浸润等生物学行为来判断,免疫组化中具有上皮来源物质的表达也对其良恶性判断有辅助作用。因此,对于影像学上发现邻近器官不明来源结节的时候,应高度怀疑为恶性胰岛素瘤转移可能。本例为恶性多发胰岛细胞瘤,临床上尚属罕见。

胰岛素瘤外科切除后效果较好,70%~90%的病例切除后不再有低血糖发作,而且在恶性胰岛素瘤的系列报道中,1/3 仍可考虑行根治性手术。所以对于恶性胰岛素瘤患者,若全身情况许可,尽可能切除原发及转移灶。当肿瘤不能完

全切除时,减量肿瘤切除可有助于缓解低血糖症状,提高生存质量和延长生存时间,胰岛素瘤姑息切除的平均生存时间可达到 4 年。不能切除的胰岛素瘤预后较差,有报道<sup>[3]</sup>平均生存时间仅为 11 个月。

### [参考文献]

- [1] 史轶蘩 主编 协和内分泌和代谢学[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 1299-1230
- [2] 高根五,夏志平,姚榛祥 主编 临床普通外科学[M]. 沈阳: 沈阳出版社, 2001. 779-780
- [3] 汪建平,王磊,王吉甫,等 胰岛素瘤 41 例的定位诊断和外科治疗分析[J]. 中华普通外科杂志, 2000, 15(5): 264-266

[收稿日期] 2004-01-05

[修回日期] 2004-05-08

[本文编辑] 曹静