

· 综述 ·

神经干细胞移植治疗肠无神经节细胞症的研究进展

朱倩仪 综述 詹江华 审校

先天性巨结肠 (Hirschsprung's disease, HSCR) 也称结肠无神经节细胞症, 其在欧洲、亚洲以及北美洲的发病率在 1/5 000 左右, 而在具有相应同种基因背景的人群中可能会有更高的发病率^[1]。HSCR 的主要发病机制是远端结肠神经节细胞缺失或减少, 造成病变肠段蠕动功能障碍, 处于痉挛狭窄的状态, 而痉挛肠管的近端由于长期粪便淤积逐渐扩张、肥厚而形成巨结肠。80% 左右的病例中无神经节细胞肠段位于直肠和乙状结肠远端, 个别病例波及全结肠末端回肠或仅在直肠末端。目前主要治疗方法是手术, 但手术治疗存在一定的局限性与缺点。随着神经干细胞移植治疗中枢和周围神经系统疾病的成功, 人们看到了利用神经干细胞移植这一新途径治疗肠神经节细胞缺乏疾病的前景。现就神经干细胞在先天性巨结肠的现状以及前景作一综述。

一、先天性巨结肠的病因学研究

肠道的运动由肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 控制, 其解剖基础是肠道壁内具有神经元的神经丛。ENS 的所有神经元和神经胶质细胞起源于神经嵴细胞, 其通过迷走神经迁移入肠道发育形成。各种原因引起的神经嵴细胞迁移和分化异常, 均会造成肠神经元解剖和功能异常, 最终导致 HSCR。

HSCR 患儿生后不久, 即可出现远端肠道梗阻的相应症状和体征。术中可见看似正常的远端肠管以及明显扩张的近端结肠。而看似正常的远端肠管缺乏神经节细胞是该病发生的主要原因。Bodian 认为先天性巨结肠症的肠壁内神经节细胞缺如是一种壁内神经发育停顿致使外胚层神经纤维无法参与正常的壁内神经丛发育^[2]。1954 年 Yntema 和 Hammond 在胚胎研究发现消化道的内在神经丛是由中枢神经嵴衍生而来, 其神经母细胞沿已发育的迷走神经干迁移至整个消化道壁内, 由头端之食管直至尾端之直肠此即单相发育学说^[3]。而 Tam 等则提

出神经节细胞系由口和肛门向中心发育, 此即双相发育学说^[4]。

1967 年 Okamoto 研究发现肌间神经丛系由神经嵴的神经母细胞形成。这些神经母细胞于胚胎第 5 周开始沿迷走神经干由头侧向尾侧迁移, 于第 12 周达到消化道远端^[5]。但此时, 直肠末端即内括约肌神经母细胞尚未进入。在胚胎发育后期, 肠壁内神经母细胞作为神经元, 逐渐发育成为神经节细胞。如果由于各种原因导致神经母细胞移行时中途停顿, 即可造成肠壁无神经节细胞症。停顿的时间越早, 导致结肠远端无神经节细胞肠管越长。由于直肠、乙状结肠是在消化道的最远端, 所以受累的机会最多。累及乙状结肠的短段型巨结肠最为常见, 长段型为病变范围超出此区域, 甚至累及全部结肠, 更罕见的是累及小肠或表现为超短段型^[6]。

在基因分子生物学方面, 目前已有研究证实有多种基因与先天性巨结肠的发病存在密切联系, 其中包括 *RET*、*GDNF*、*NRTN*、*EDNRB*、*EDN3*、*ECE1*、*PHOX2b*、*SOX10*、*PAX3*、*SMAD1P1* 等^[7,8]。现已证实 *RET* 基因突变是引起先天性巨结肠的主要基因, 50% 的家族性先天性巨结肠、7.3%~20% 的散发性先天性巨结肠与 *RET* 基因突变有关。胶质细胞源性神经营养因子 (glia cells derived neurotrophic factor, GDNF) 基因突变可能引起先天性巨结肠, 也可能使 *RET* 突变基因所致疾病的表型不同^[9]。现有研究表明, 在 ENS 发育过程中, *RET*、*GDNF*、*GFRα1* 分别在前肠迷走神经嵴细胞以及肠间质表达^[10]。小鼠中内皮素-3 (Endothelin-3, ET-3) 信号通路, *RET* 信号通路对于 ENS 发育具有一定的调控作用^[11]。

近年来发现细胞外基质蛋白、免疫因素、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 及神经生长因子受体 (nerve growth factor receptor, NGFR) 等肠壁内微环境改变与先天性巨结肠发病有关。细胞外基质蛋白是胚胎早期神经嵴源细胞移行通路中的重要物质, 其中纤维连接蛋白和透明质酸, 为神经嵴细胞向肠内移行提供通路; 层连接蛋白和 IV 型胶原, 促进肠

内神经嵴细胞的轴突生长及神经元分化,因而推测是胚胎早期细胞外基质蛋白的改变,导致神经嵴源细胞向肠内移行终止,引起先天性巨结肠。NGF 能促进神经元的轴突生长和数目增多,但它需要与细胞膜上受体(NGFR)结合而发挥作用^[12]。

二、神经干细胞分类

目前报道的神经干细胞主要有:①胚胎干细胞,由胚胎原基细胞定向诱导分化而来;②神经组织直接来源:包括来源于中枢神经的神经干细胞(CNS-neural stem cells, CNS-NSCs)、来源于周围神经及神经管的神经嵴细胞和直接取自肠道的肠神经干细胞(enteric neural stem cells, ENSCs)或称肠神经嵴干细胞(gut neural crest stem cells, GNCSCs);③其他类型干细胞的横向分化而来:主要为间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)来源^[16]。各种不同来源的神经干细胞有各种不尽相同的生物学和免疫学特性,当其移植入消化道用于治疗 HD 时,也会有不同的效果。移植的神经干细胞必须适应局部环境,才能存活,并增殖、分化为所需要的神经元,移植的神经干细胞产生的神经元必须合成所在肠神经系统对应的神经递质,且形成精确的突触连接,才会产生治疗效应。国内有实验研究骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cell, MSCs)移植治疗肠神经缺乏症^[17]。实验性巨结肠模型鼠结肠移植 MSCs 可部分恢复结肠神经调节作用改善结肠上皮离子转运能力,减轻大鼠腹胀、便秘等症状,减少结肠自发性收缩频率和幅度。

干细胞是具有自我更新、高度增殖和特异或多向分化潜能的细胞群体^[18]。即这些细胞既可通过细胞分裂维持自身细胞群的大小,又可进一步分化成为各种不同的组织细胞,从而构成机体各种复杂的组织器官。也就是说,理论上讲干细胞具有无穷的供应能力。那么,如果能够将干细胞定位并提取出来,就可以将其应用在神经节细胞缺失症上,来补充缺失的神经节细胞。而现今已有实验可以定位并提取 NSC^[19]。在肠无神经节细胞症胚胎鼠离体肠管培养的肠神经干细胞(Enteric neural stem cells, ENSCs)移植研究中,显示干细胞可以定植并能分化为神经元和胶质细胞^[20]。

三、干细胞技术在无神经节细胞症中的应用

鉴于神经干细胞的多向分化潜能,在大脑、脊髓损伤修复的研究中具有令人鼓舞的发现,自体造血干细胞等分化成为神经干细胞的可能性的提出,以及神经干细胞被认为是一种更优于成纤维细胞基因

治疗的载体细胞。神经干细胞移植可以恢复脊髓及受损伤的大脑,对于 HSCR 是否可以恢复神经支配呢?细胞移植虽然被认为是修复神经组织的有效治疗方法,但其细胞来源有限,并存在异体排斥反应。

骨髓间充质干细胞在特定条件下能分化为神经样细胞后,体外研究证实 MSCs 经诱导可变为神经样细胞,并分别表达神经干细胞标志物 nestin、成熟神经细胞标志物 NSE、NF、Tubulin 及胶质细胞特异性标志物 GFAP^[21]。大量体内研究表明,骨髓 MSCs 体外培养后脑内移植可存活并改善损伤动物的神经功能,但存在骨髓取材困难,供体有限,随年龄增长骨髓 MSCs 增殖能力、多向分化能力下降,且有病毒污染的可能,这些限制了骨髓 MSCs 的临床应用^[22]。有研究发现, MSCs 不仅存在于骨髓,也少量存在于外周血和胚胎实体器官组织内,这在骨髓以外组织培养扩增 MSCs 提供了理论依据^[23]。提示脐血体外培养扩增的贴壁细胞表达间充质细胞特异性抗原标志,而不表达造血干细胞和内皮细胞特异性标志,这与骨髓、脐血、胎肺等其他组织来源的 MSCs 流式检测结果一致。脐血作为分娩废弃物,来源广泛,取材方便,不受任何伦理及法理的限制,而脐血 MSCs 与骨髓 MSCs 扩增和两神经元样缀膳的定向诱导有同源性,这说明可以选用脐血 MSCs 作为干细胞的来源。现今各种类型的神经干细胞在治疗消化道疾病,特别是消化道神经节细胞缺失以及有关消化道动力方面的疾病的研究日益兴盛起来。W. LIU 等应用神经上皮干细胞(neuroepithelial stem cells, NESCs)移植入去神经支配肠道内,可以存活并在体内分化成为神经元及角质细胞,可以证明 NESCs 可以作为修补 ENS 的神经干细胞候选^[24]。

间充质干细胞是来源于发育早期中胚层和外胚层的一类多能干细胞,因其在组织工程、造血干细胞移植以及基因治疗领域的潜在应用,成为干细胞研究的热点^[25]。目前 MSC 的主要来源为成人骨髓,但成人骨髓源 MSC 细胞数量及增殖分化潜能随年龄的增大而下降。病毒感染率较高,且供者 MSC 的采集须行骨髓穿刺术,来源受到限制。操作简单易行,可从 90% 脐带标本中分离出丰富的 MSCs。脐带 MSCs 体外易扩增,增殖能力强,免疫表型与骨髓来源 MSCs 相似。体外具多向分化功能,细胞因子分泌丰富,具有长期造血支持功能,是骨髓 MSCs 的理想替代来源。

在临床和实验工作中我们看到干细胞移植近年

来已成为治疗多种疾病的新策略;在替代、修复或加强受损组织或器官的生物学功能方面具有重大作用。神经干细胞是一种终身具有自我更新能力的细胞,其子细胞能分化产生神经系统的各类细胞,干细胞通过不对称分裂产生一个祖细胞和另外一个干细胞,祖细胞具有有限的自我更新能力,并自发分化产生神经元细胞和成胶质细胞等,从而生成神经元及神经胶质细胞。已有研究表明神经干细胞具有潜在多向分化能力,在一定条件下,具有较强的增殖能力,移植入成体神经组织后易于存活,目前神经干细胞在损伤神经组织,细胞的修复方面已显示良好的应用前景^[26]。

肠道的运动由肠神经系统控制,其解剖基础是肠道壁内具有神经元的神经丛。ENS 的所有神经元和神经胶质细胞起源于神经嵴细胞,其通过迷走神经迁移入肠道发育形成。各种原因引起的神经嵴细胞迁移和分化异常,均会造成肠神经元解剖和功能异常,最终可导致 HSCR。在我们以往的研究中证实 HSCR 肠壁内缺乏神经节细胞和神经胶质细胞以及 Cajal 细胞。那么对于这种异常的神经支配通过神经干细胞移植是否可以修复?答案是肯定的,已有实验证实正常鼠的神经嵴细胞可在体外修复培养中的 RET 突变鼠病变肠段神经支配,且前瞻性指出神经嵴细胞移植可望成为 HSCR 今后治疗的手段。

四、存在问题、发展趋势

我们已经看到了手术治疗儿童 HSCR 存在明显的缺陷,先进的生物学治疗优势指引我们将目光投向具有潜力的人类肠道^[27],希望可以将干细胞用于自体克隆无神经节肠段,以此作为初步治疗或辅助治疗^[28]。然而,应用于干细胞治疗还应谨慎对待。首先,分离和培养脐带 MSCs 需要稳定且具有可重复性。近年来的研究中许多学者都提出不同方法来提取和培养脐带 MSCs。第二,能够得到足够数量的脐带 MSCs。初步数据证明,在小儿出生时取得的标本可以分离并培养出足够数量的脐带 MSCs。而进一步的证据表明这些数量的脐带 MSCs 可以进行移植、迁移、分化,与 ICC 及胃肠肌肉相互作用,允许自我功能修复。有实验证实 CNS 衍生干细胞移植入成年鼠幽门处可以见到移植物产生 NO。人类脐带 MSCs 移植入小鼠无神经节细胞结肠内可见迁移、增殖,可分化为特异表型的肠神经元及神经胶质细胞,并且可表达肠神经肽,如 NO 合酶等。另外,可见突触传递电子,证明该细胞有能力形成新组织;不过,还是存在一些问题,如移植入更为成熟的人类

新生儿肠道中,在相似环境下脐带 MSCs 是否都有所为,这一点需进一步实验研究以得出结果。尽管前景乐观,但是还是存在一些问题,提示我们要谨慎对待临床应用。例如如何移植干细胞?需要克隆多少细胞?如果移植成功,这些细胞可以长期保持活性吗?是否存在干细胞瘤的可能?如何选择它的分化方向?怎样制定治疗适应证?以及在临床应用方面最为重要的安全性问题,需要进一步实验研究。

总之,随着干细胞研究的深入,探索通过脐血 MSCs 转化为神经干细胞恢复先天性巨结肠正常神经支配的方法具有重要的现实性及可能性。脐血 MSCs 定向分化,并将其移植到 HSCR 肠壁内对于小儿 HSCR 的治疗具有重大意义。探索脐血 MSCs,神经干细胞的克隆、定向分化、移植对于发育生物学可以积累宝贵资料,并且神经干细胞移植重建 HSCR 病变肠壁内的正常神经支配方法研究成功,将使 HSCR 患儿免于手术,使 HSCR 的治疗发生根本性改观。

参考文献

- 1 Parisi MA, Kapur RP. Genetics of Hirschsprung disease [J]. Curr Opin Pediatr 2000, 12(6):610-617.
- 2 Bodian M, Carter CO, Ward BCH. Hirschsprung's disease [J]. Lancet, 1951, 10(6650):302-309.
- 3 Yntema CL, Hammond WS. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo [J]. J Comp Neurol, 1954, Oct, 101(2):515-541.
- 4 Tam PK. An immunohistochemical study with neuron-specific enolase and substance P of human enteric innervation-the normal developmental pattern and abnormal deviations in Hirschsprung's disease and pyloric stenosis [J]. J Pediatr Surg, 1986, Mar, 21(3):227-232.
- 5 Okamoto E. Recent problems in the surgery of Hirschsprung's disease [J]. Shujutsu. 1967, Nov, 21(11):1086-1091.
- 6 Kessmann J. Hirschsprung's Disease: Diagnosis and Management [J]. Am Fam Physician, 2006, Oct, 15, 74(8):1319-1322.
- 7 Stewart DR, von Allmen D. The genetics of Hirschsprung disease [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2003, Sep, 32(3):819-837.
- 8 Garipey CE. Developmental disorders of the enteric nervous system: genetic and molecular bases [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2004, 39(1):5-11.
- 9 张丽琴,詹江华,谷继卿. 先天性巨结肠 GDNF/RET 信号传输途径研究进展 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2004, 7

- (1):78-80.
- 10 詹江华,牛军,胡博,戴春娟,尹娟,胡晓丽,谷继卿,汪帕. 应用 DHPLC 筛查先天性巨结肠 GFR α -1 基因突变研究[J]. 中华小儿外科杂志,2006,11(27):567-569.
 - 11 詹江华,房志勤. 先天性巨结肠与 Endothelin 基因关系的研究[J]. 中华小儿外科杂志 1999,20(2):36-38.
 - 12 Burzynski G, Shepherd IT, Enomoto H. Genetic model system studies of the development of the enteric nervous system, gut motility and Hirschsprung's disease[J]. Neurogastroenterol Motil, 2009,21(2), 113-127.
 - 13 Coran AG, Teitelbaum DH. Recent advances in the management of Hirschsprung's disease[J]. Am J Surg, 2000, 180(5):382-387.
 - 14 Hadidi A. Transanal endorectal pull-through for Hirschsprung's disease: experience with 68 patients[J]. J Pediatr Surg, 2003,38(9):1337-1340.
 - 15 Langer JC, Durrant AC, de la Torre L, et al. One-stage transanal Soave pullthrough for Hirschsprung disease: a multicenter experience with 141 children [J]. Adv Exp Med Biol,2006, 589, 206-212.
 - 17 Wallace AS, Burns AJ. Development of the enteric nervous system, smooth muscle and interstitial cells of Cajal in the human gastrointestinal tract[J]. Cell Tissue Res, 2005, Mar,319(3):367-382.
 - 18 Shostak S. (Re)defining stem cells[J]. Bioessays,2006,28(3):301-308.
 - 19 Marco Metzger, Clatre Caldwell, Amanda J, et al. Enteric Nervous System Stem Cells Derived From Human Gut Mucosa for the Treatment of Aganglionic Gut Disorders [J]. Gastroenterology,2009, 136(7):2214-2225.
 - 20 Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung disease: advances in genetic and stem cell studies[J]. Nat Rev Neurosci, 2007, Jun,8(6): 466-479.
 - 21 金先庆,徐纪荣,陈小章. 骨髓间充质干细胞移植治疗巨结肠的实验研究[J]. 中华小儿外科杂志,2007,28(9): 16-18.
 - 22 Sensebé L, Bourin P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes [J]. Transplantation. 2009,15,87(9 Suppl):S49-53.
 - 23 Maria Adelaide Micci, Pankaj Jay Pasricha. Neural Stem Cells for the Treatment of Disorders of the Enteric Nervous System; Strategies and Challenges [J]. 2007, Dev Dyn, Jan,236(1):33-43.
 - 24 W Liu, RD Wu, YL Dong, et al. Neuroepithelial stem cells differentiate into neuronal phenotypes and improve intestinal motility recovery after transplantation in the aganglionic colon of the rat [J]. Neurogastroenterol Motil, 2007, 19(12):1001-1009.
 - 25 U Rauch, C Hagl, S Holland-Cunz, et al. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis[J]. Int J Colorectal Dis,2006,21(6):554-559.
 - 26 Burns AJ, Pachnis V. Development of the enteric nervous system: bringing together cells, signals and genes [J]. Neurogastroenterol Motil,2009, 21(2):100-102.
 - 27 KH Schafer, MA Micci, PJ Pasricha. Neural stem cell transplantation in the enteric nervous system: roadmaps and roadblocks [J]. Neurogastroenterol Motil, 2009,21(2): 103-112.
 - 28 Sasselli V, Micca MA, Pasricha PJ. Induction of enteric neurons from embryonic stem cells in vitro and in vivo[J]. Gastroenterology, 2006, 130, (4 Suppl 2):A-538.

• 消息 •

《中华临床医师杂志(电子版)》2012 年征稿征订

《中华临床医师杂志(电子版)》是中国科技核心期刊,半月刊,全年出刊 24 期,定价 672 元,国内刊号 CN 11-9147/R,邮发代号 80-728,被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

2012 年度重点栏目征稿及 2012 年优惠征订详情,请见中华临床医师杂志官方网站 www.clinicmed.net 的期刊动态。

欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志,欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文。

投稿信箱:北京市 100035-50 信箱编辑部收,邮编:100035

投稿电子邮箱:Lcdoctor@163.com & Lcyszz@163.com

电话:010-62219211;传真:010-62222508;网址:www.clinicmed.net