

间充质干细胞旁分泌作用治疗阿尔茨海默病的临床前研究进展

冯培培^{1#} 陈宇^{1#} 陈语湛¹ 韩舒宁¹ 蒋悦¹ 冯佳婷¹ 鲁承皓¹ 侯瑞霞¹ 竺亚斌^{1,2*}

(¹宁波大学医学院, 宁波 315211; ²宁波大学医学院附属医院, 宁波 315040)

摘要 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的神经退行性疾病之一, 严重损害患者的记忆和认知能力。研究者经过多年探索仍无法找到治愈AD的有效药物。源于间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)旁分泌的生长因子、细胞因子、趋化因子等生物因子及外泌体具有抗炎、清除 β -淀粉样蛋白(β -amyloid peptide, A β)、促进神经生长以及抑制细胞凋亡等作用, MSCs的旁分泌作用被认为是治疗AD最有前途的临床疗法之一。该文首先总结了AD的发病机制, 然后根据MSCs所具有的特征和优势, 综述了利用MSCs的旁分泌作用治疗AD的临床前研究, 期望为将来临床上治疗AD提供有价值的信息。

关键词 阿尔茨海默病; 间充质干细胞; 旁分泌因子; 外泌体; 临床前研究

Preclinical Research Progress of Paracrine Effect of Mesenchymal Stem Cells in Treatment of Alzheimer's Disease

FENG Peipei^{1#}, CHEN Yu^{1#}, CHEN Yuzhan¹, HAN Shuning¹, JIANG Yue¹, FENG Jiating¹,
LU Chenghao¹, HOU Ruixia¹, ZHU Yabin^{1,2*}

(¹Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China;

²Affiliated Hospital of Medical School of Ningbo University, Ningbo 315040, China)

Abstract AD (Alzheimer's disease), one of common neurodegenerative diseases, severely impairs the memory and cognitive ability of patients. There are no effective drugs to cure AD, though researchers have explored for years. Paracrine growth factors, cytokines, chemokines and exosomes produced by MSCs (mesenchymal stem cells) possess the capabilities of anti-inflammatory, A β (β -amyloid peptide) clearance, promotion of synaptic remodeling, and antioxidant effects. They are considered to be one of the most promising clinical therapies for AD. This article firstly summarizes the pathogenesis of AD, and then reviews the preclinical studies of paracrine effect of MSC on the treatment of AD based on the characteristics and advantages of MSCs and exosomes. This review will provide valuable information for clinical treatment of AD in future.

Keywords Alzheimer's disease; mesenchymal stem cells; paracrine factor; exosomes; preclinical research

收稿日期: 2020-02-23

接受日期: 2020-05-05

浙江省自然科学基金(批准号: LY20C100001)、宁波市科技创新2025重大专项(批准号: 2018B10052)和宁波市自然科学基金(批准号: 2019A610199)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0574-87609592, E-mail: zhuyabin@nbu.edu.cn

Received: February 23, 2020

Accepted: May 5, 2020

This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No. LY20C100001), Ningbo Science and Technology Innovation 2025 Major Projects (Grant No. 2018B10052) and Ningbo Natural Science Foundation (Grant No. 2019A610199)

*These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-574-87609592, E-mail: zhuyabin@nbu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5317>

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)亦被称为老年痴呆症,是一种由多种因素导致的神经系统退行性疾病,表现为进行性记忆减退、认知障碍等全面性痴呆症状。《世界老年痴呆症报告》发布声明,预计到2030年,全世界会有7 500万老年痴呆患者,到2050年,患者人数会达到1.31亿^[1],这将会成为影响全球的重大公共健康问题。临床上采用美金刚、非甾体抗炎药等药物治疗AD,但这些药物已被证实只对早期AD患者具有一定的疗效。由于AD发病的隐匿性,临床上发现明显症状时,患者往往已处于AD中晚期,上述这些传统的药物几乎已不能起到治疗作用。

干细胞是一类拥有自我更新能力的多潜能细胞,在适宜的条件下,能够分化成多种功能细胞。其中间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多向分化潜能、低免疫原性、损伤趋化作用、免疫调节、来源丰富易得等诸多优点。早在1991年,CAPLAN^[2]将成纤维细胞集落形成单位命名为间充质干细胞,强调其可以分化成中胚层细胞迁移到损伤部位参与再生修复。随着对其研究的深入,CAPLAN^[3]提议将间充质干细胞命名为药物信号细胞,他认为此类细胞发挥治疗效果更大程度上是通过细胞的旁分泌作用,也即由间充质干细胞分泌的生长因子、趋化因子、细胞因子和细胞外囊泡等物质。此后,研究人员把间充质干细胞的旁分泌成分分为两种形式,尝试用于治疗神经退行性疾病,如AD。一种是直接移植间充质干细胞到体内,间充质干细胞会分泌多种生物活性物质发挥作用,如:(1)分泌神经营养因子、神经生长因子等细胞因子发挥神经营养作用,促进神经发生;(2)调节促炎细胞因子和抗炎细胞因子的表达,发挥免疫调节作用;(3)调节A β 降解酶的表达,减少A β 寡聚体聚集;(4)调节促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的表达,抑制细胞凋亡。另一种是从间充质干细胞获得以外泌体为代表的细胞外囊泡,并将其移植入体内,这类囊泡尺寸为30~100 nm,容易透过血脑屏障,发挥与亲本细胞相似的作用。本文将从AD发病机制以及发挥间充质干细胞旁分泌功能的生物成分等方面对AD疾病的潜在治疗作用的临床前研究作一综述。

1 AD的发病机制

目前对AD的发病机制不是十分清楚,虽有一些

文献报导,但针对不同人群及不同的发病阶段,其病理也不十分明确。比较被大家接受的假说主要包括Tau蛋白过度磷酸化、 β 淀粉样蛋白产生、线粒体功能障碍、神经元存在炎症因子,下面将作一一介绍。

1.1 Tau蛋白过度磷酸化

Tau蛋白是微管相关蛋白(microtubule-associated protein, MAP),主要位于中枢神经系统的细胞轴突中,对微管起稳定作用。Tau蛋白是一种磷酸化蛋白,正常人细胞中每摩尔Tau蛋白包含1~3 mol的磷酸,而在AD病人的细胞中,Tau蛋白磷酸化水平比正常人高出3~4倍。AD患者中过度磷酸化的Tau会在相邻的大脑区域中连续且有组织地扩散,降低患者认知能力。Tau蛋白过度磷酸化时,其与微管蛋白的结合能力下降,失去了稳定微管的功能,微管结构容易发生破坏,引起轴突转运障碍。Tau蛋白过度磷酸化后会团聚形成神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)^[4]。

引起Tau蛋白过度磷酸化的因素有如下几个。(1)胰岛素受体底物1(insulin receptor substrate 1, IRS1)的异常丝氨酸磷酸化^[5]。研究发现,异常IRS1-pSer616与神经元以及营养不良性神经突中的Tau病变频繁共表达^[6]。(2)在机体衰老过程中,人体细胞内的天冬酰胺内肽酶(asparaginyl endopeptidase, AEP)被激活,引起Tau蛋白水解,抑制微管相关蛋白组装微管的能力,从而诱导NFT的产生^[7]。(3)平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)。GLODZIK等^[8]发现,纵向血压下降,p-Tau181会增加,而p-Tau181的增加通常会导致情节记忆能力下降和中海马体积减少。(4)端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)。SPILSBURY等^[9]研究显示,TERT可能是大脑中的保护因子,能改善线粒体功能并保护海马神经元免受病理性Tau诱导的氧化应激。因此,端粒酶激活剂有望用于预防治疗神经退行性疾病。(5)内源性AMP激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是一种Tau激酶,内源性的AMPK能活化诱导多个位点的Tau磷酸化,可能是AD病理学发展中极其重要的参与者^[10]。(6)糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)是引起Tau蛋白过度磷酸化的关键激酶。最近研究发现,核糖基化的晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)通过活化GSK-3 β 诱发大鼠海马中Tau蛋白的过度磷酸化^[11]。(7)蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase type 2A, PP2A)

是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶。Tyr307磷酸化和Leu309甲基化对PP2A活性的抑制诱导Tau蛋白过度磷酸化^[12]。(8)内质网(endoplasmic reticulum, ER)膜中的硒蛋白S(selenoprotein S, SelS)。RUELI等^[13]发现, SelS与Tau磷酸化水平呈负相关, 增强SelS的表达可以减少ER应激诱导的Tau磷酸化。

1.2 β 淀粉样蛋白

超灵敏测定法检测结果显示, AD患者脑脊液中, 有毒性的 $A\beta$ 寡聚体的摩尔水平比健康人约高30倍^[14]。 $A\beta$ 自组装形成的致密斑块是AD的病理标志。淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的淀粉途径分解形成 $A\beta$ 。APP主要有2种分解途径, 即非淀粉途径和淀粉途径。在非淀粉途径中, APP先被 α -分泌酶分解成sAPP α 和C-端片段 α -CTF(C83), 之后再被 γ -分泌酶分解成APP胞内结构域(APP intracellular domain, AICD)和约3 kDa的无神经毒性多肽片段(P3)。在淀粉途径中, APP先被 β -分泌酶分解成可溶性片段sAPP β 和C-端片段 β -CTF(C99), 而后C99再被 γ -分泌酶分解成AICD和各种长度的 $A\beta$ 肽, 其中 $A\beta$ 40最为普遍, $A\beta$ 42更容易积聚于脑中, 且 $A\beta$ 42的毒性大于 $A\beta$ 40。 $A\beta$ 的形成与一些突变基因例如早老蛋白增强因子-2(presenilin enhancer-2, *Pen-2*)有关。*Pen-2*的突变会影响APP的正常切割^[15]。载脂蛋白E(apolipoprotein E, ApoE)也可加快具有神经毒性的 $A\beta$ 寡聚体的产生^[5]。 $A\beta$ 的可溶性寡聚体

是大脑中最具神经毒性的物质, 会影响神经细胞增殖、诱导神经炎症。 $A\beta$ 能够激活Wnt/ β -catenin信号通路中的GSK-3 β , 这会阻断 β -catenin的形成, 影响细胞的增殖, 并且还能减弱Wnt/ β -catenin的转录促使 β -catenin过度磷酸化, 抑制神经细胞增殖, 造成患者认知功能障碍。当 $A\beta$ 结合到Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/CD14复合物时, 会促使核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)与NF- κ B抑制蛋白(inhibitor of NF- κ B, I κ B)解离, 进入细胞核并启动下游的炎症基因的转录, 增强炎症因子的表达。把 $A\beta$ 的沉积认定为AD发病的起始因素, 这被称为“淀粉样蛋白假说(amyloid hypothesis)”^[16-18](图1)。

“淀粉样蛋白假说”曾被诸多研究人员接受, 并被用来解释AD的发病机理, 但近年来随着对AD更加深入的研究, 这一假说遭到质疑, 因为 $A\beta$ 与AD之间真正的关联性并未确定, 如, (1) $A\beta$ 积聚与神经元损伤、认知功能下降是否直接相关? 研究表明, 大脑中存在 $A\beta$ 积聚不一定会导致认知功能障碍^[19]。有些正常人的皮质中也存在 $A\beta$ 积聚的现象^[20]。相反, 可溶性 $A\beta$ 寡聚体、单体、原纤维等都是主要的神经毒性物质, 但它们并不是淀粉样沉积物。在这种情况下, 仅靶向淀粉样沉积物质, 就不是一种非常有效的方法。(2) $A\beta$ 与AD之间真正的关联性并未确定, 如, (1) $A\beta$ 积聚与神经元损伤、认知功能下降是否直接相关? 研究表明, 大脑中存在 $A\beta$ 积聚不一定会导致认知功能障碍^[19]。有些正常人的皮质中也存在 $A\beta$ 积聚的现象^[20]。相反, 可溶性 $A\beta$ 寡聚体、单体、原纤维等都是主要的神经毒性物质, 但它们并不是淀粉样沉积物。在这种情况下, 仅靶向淀粉样沉积物质, 就不是一种非常有效的方法。(2) $A\beta$ 与AD之间真正的关联性并未确定, 如, (1) $A\beta$ 积聚与神经元损伤、认知功能下降是否直接相关? 研究表明, 大脑中存在 $A\beta$ 积聚不一定会导致认知功能障碍^[19]。有些正常人的皮质中也存在 $A\beta$ 积聚的现象^[20]。相反, 可溶性 $A\beta$ 寡聚体、单体、原纤维等都是主要的神经毒性物质, 但它们并不是淀粉样沉积物。在这种情况下, 仅靶向淀粉样沉积物质, 就不是一种非常有效的方法。

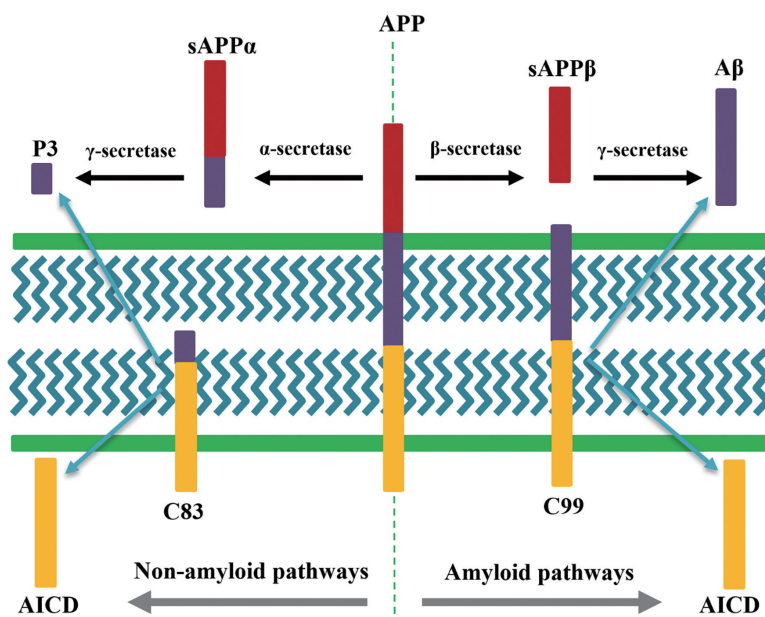


图1 APP降解过程中的非淀粉样和淀粉样途径(根据参考文献[18]修改)

Fig.1 Non-amyloid and amyloid pathways during APP degradation(modified from reference [18])

可溶性A β 驱动了Tau过度磷酸化的发生, A β 相当于“触发器”, 而Tau蛋白则是“子弹”, 这与淀粉样蛋白级联假说相符。但是, AD患者中NFT和A β 的出现时间和分布区域并没有相关性, NFT也会先于A β 斑块出现^[22], NFT才是发生AD的直接原因。这种现象可能是因为研究者所采用的转基因AD模型小鼠并不是合适的研究对象, 因为转基因啮齿动物只能模拟家族性阿尔茨海默病(familial Alzheimer's disease, FAD)患者, 并不能模拟散发性阿尔茨海默病(sporadic Alzheimer's disease, SAD)患者^[23]。

1.3 线粒体功能障碍

线粒体功能障碍是神经退行性疾病的关键发病机制。研究人员在比较年龄和性别相匹配的AD患者和健康人死后海马组织中神经元线粒体的形态后发现, 与健康对照相比, AD样品中的海马神经元中的线粒体出现尺寸减小和损伤现象^[24]。线粒体损伤与AD病理因素之间存在复杂的联系。(1)线粒体是调节细胞钙离子稳态的重要离子缓冲器。当线粒体功能障碍时会导致钙离子浓度过高、钙反应异常运行、ATP消耗、自由基产生, 引起细胞凋亡。(2)线粒体功能障碍时会释放细胞色素c(cytochrome c, cyt c), 其与凋亡蛋白酶活性因子-1(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)结合, 诱使含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-9(cysteiny aspartate proteinase-9, caspase-9)进行自我催化, 被激活的caspase-9再活化下游的caspase, 介导细胞凋亡。线粒体释放cyt-c依赖于由B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族成员或该家族成员与线粒体外膜的其他蛋白相互作用组成的特异性通道。Bcl-2家族主要分两类——抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白。抗凋亡蛋白具有抑制cyt c从线粒体中释放的功能, 能抑制细胞凋亡, 而促凋亡蛋白的作用则相反。(3)线粒体是活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的主要来源, 当线粒体功能障碍时, ROS增加, 导致DNA、蛋白质和脂类物质氧化变质, 这会损伤脑内神经元的结构和功能^[25]。(4)线粒体为氧化磷酸化反应提供ATP, 当作为细胞内的能量工厂的线粒体的功能发生故障时, 会导致脑中能量代谢障碍, 神经元难以维持功能和可塑性^[26]。越来越多的研究表明, 在AD的发病过程中, 患者和转基因AD小鼠的线粒体功能受损。MANCZAK等^[27]研究发现, 线粒体裂变蛋白动力蛋白相关蛋白1(dynamamin-related protein 1, Drp1)与

AD小鼠中磷酸化的Tau相互作用, 导致线粒体轴突运输受损, 最终导致神经元损伤和认知能力下降。

1.4 炎症因子

神经炎症是AD大脑中核心的神经病理学特征。研究表明, AD患者大脑的病理损伤区域几种促炎细胞因子或炎症标志物表达增加, 这一现象与不溶性A β 寡聚体的生成相关^[28]。A β 寡聚体通过Toll样受体或晚期糖基化终末产物受体(receptors for advanced glycation end production, RAGE)诱导神经胶质细胞释放促炎细胞因子, 促使神经元凋亡, 这些促炎细胞因子又会反过来激活神经胶质细胞, 进一步损伤神经元和突触。小胶质细胞激活包括M1和M2两种状态。M2状态下的小胶质细胞能够释放抗炎因子吞噬细胞碎片, 加快组织修复, 但过度激活的小胶质细胞会从M2状态转变为M1状态, 而M1状态下的小胶质细胞会分泌大量炎症因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、ROS、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等, 这会对神经细胞产生细胞毒性。(1)细胞因子, 即促炎因子, 如IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等。(2)趋化因子在AD中可以调节小胶质细胞向神经炎症区域迁移, 增强局部炎症。(3)半胱天冬酶是细胞凋亡和炎症的关键介质, 缺乏含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(cysteinal aspartate specific proteinase-1, caspase-1)的双转基因APP/PSI小鼠可诱导小胶质细胞从促炎性M1型向神经保护性的M2型转变^[29], 抑制炎症反应。(4)前列腺素类和神经保护素D1(neuroprotectin D1, NPD1)。环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸合成前列腺素过程中的关键酶。研究表明, 选择性COX-1抑制剂可以减轻三重转基因3 \times Tg-AD小鼠的神经炎症、A β 沉积和Tau异常磷酸化^[30]。ZHAO等^[31]发现, NPD1能够下调 β -分泌酶以及激活 α -分泌酶整合素金属蛋白酶10(a disintegrin and metalloprotease 10, ADAM10)和上调sAPP α , 将sAPP β 全酶的裂解从淀粉途径转变为非淀粉途径, 从而抑制具有神经毒性的A β 42的产生。(5)诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)会促进高浓度的NO生成, 产生神经毒性, 引起神经元损伤和死亡^[32]。如AD模型小鼠无法合成iNOS, 则其寿命比能合成iNOS的小鼠更长, 脑中A β 水平更低, 过度磷酸化的Tau蛋白的积聚也更少, 证明了iNOS与神经系统的损伤相关。(6)补体系统被激活, 引发级联反应, 产生毒性物质,

加剧炎症反应。

2 间充质干细胞应用于AD的临床前研究

对于AD,目前的MSCs疗法主要是基于MSCs的旁分泌作用,作用成分主要包括:(1)生长因子、细胞因子、趋化因子等旁分泌因子;(2)以外泌体为代表的细胞外囊泡。细胞外囊泡在很长的时间内并没有引起关注,但之后越来越多的专家学者发现,从MSCs来源的外泌体免疫原性低且具有类似于MSCs的功能。MSCs的旁分泌作用能够促进神经重塑、髓鞘再生、减少A β 寡聚体的沉积、影响小胶质细胞的活性,进而促使患者恢复认知能力,改善患者的空间学习和记忆功能。下面就不同来源的MSCs的旁分泌作用应用于AD的临床前研究作一介绍。

2.1 脐带间充质干细胞

脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs)来源于新生儿脐带组织。研究者发现,此类干细胞分泌的旁分泌因子和外泌体在神经退行性疾病中具有促进神经再生、减轻A β 寡聚体沉积和抗炎的作用。

2.1.1 UC-MSCs的旁分泌因子 许多研究证实,UC-MSCs可促进神经再生、增强海马神经突触可塑性。体外实验发现,人脐带血间充质干细胞(human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells, hUCB-MSCs)可分泌血小板反应素-1(thrombospondin-1, TSP-1),减弱A β 42诱导的突触功能障碍,将hUCB-MSCs的外泌体与A β 42处理的小鼠海马神经元共培养,可显著增加突触密度标记物突触素(synaptophysin, SYP)和突触后密度蛋白-95(post-synaptic density protein-95, PSD-95)的表达,这为早期AD提供潜在的替代治疗选择^[33]。PARK等^[34]也发现,脐带华通胶间充质干细胞(umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs)和hUCB-MSCs共培养物中分泌的激活素A在体外能诱导神经元发育和神经突生长。激活素A属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族成员,在中枢神经系统的神经生长中起重要作用。体内研究方面,CUI等^[35]观察到hUC-MSCs移植后,Tg2576小鼠的海马中存活的神经元增加,hUC-MSCs的移植促进Tg2576小鼠海马中的神经发生。除此之外,hUCB-MSCs还可分泌生长分化因子-15(growth differentiation factor-15, GDF-15),促进

内源性成年海马神经发生并增加突触活动。GDF-15是TGF- β 超家族中的一员,是一种神经营养因子,具有调制神经元离子通道的表达,影响突触传递功能的作用^[36]。

A β 寡聚体沉积会形成细胞外老年斑和细胞内神经纤维缠结加速病情。hUCB-MSCs旁分泌的GDF-15还具有提高小胶质细胞的A β 清除能力。GDF-15可以通过II型TGF- β 受体特异性增加小胶质细胞中胰岛素降解酶(insulin-degrading enzyme, IDE)的表达来清除A β 。KIM等^[37]将外源重组GDF-15加入到A β 处理过的BV2细胞后,培养基中的A β 水平降低。此外,在5XFAD小鼠的脑实质中注射GDF-15后,也发现了A β 斑块减少的现象。

神经炎症是AD的诱因之一。WJ-MSCs可发挥免疫调节作用,调节促炎因子、抗炎因子的表达,减轻炎症。XIE等^[38]发现,尾静脉注射WJ-MSCs能显著增加抗炎细胞因子白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的表达,抑制促炎细胞因子IL-1 β 、TNF- α 的表达,减少炎症反应并促进神经修复。

移植到体内的hUC-MSCs存在的弊端之一是很少细胞能够迁移到目标部位^[39]。为解决这一问题,HOOR等^[1]研究人员采用了称为磁性靶向细胞递送(magnetic targeted cell delivery, MTCDD)的技术。静脉注射用葡聚糖包被的超顺磁性氧化铁纳米颗粒标记的WJ-MSCs可靶向AD大鼠大脑内的海马区,发挥作用。hUC-MSCs要发挥治疗效果,除了提高对目标部位的靶向性,还需提高干细胞的活性。白藜芦醇是沉默信息调节因子2相关酶1(sirtuin 1, SIRT1)的激活剂,SIRT1可调节各种与细胞增殖、凋亡有关的基因和蛋白质。先前有研究显示,白藜芦醇可增强小鼠MSC治疗自身免疫性脑脊髓炎的疗效^[40]。WANG等^[41]将白藜芦醇和hUC-MSCs联合使用,提高其抑制促炎细胞因子TNF- α 和抗炎细胞因子IL-10表达的作用。

由于UCB-MSCs在对AD动物模型进行的临床前研究中显示出令人鼓舞的结果,因而被批准招募AD患者进行临床试验。2015年,首次对9名轻度至中度AD患者进行了一项立体定向注射hUCB-MSCs的I期临床试验。在24个月的随访期间,没有患者出现严重的不良事件。由此可见,UCB-MSCs治疗AD的可行性和安全性,但还需要进行进一步试验以测试疗效^[42]。

2.1.2 UC-MSCs的外泌体 研究发现, UC-MSCs的外泌体经尾静脉注射到小鼠体内后,可减少A β 沉积并减轻神经炎症,这为AD治疗提供了新方法。研究证实,人UC-MSCs的外泌体能够促进A β 降解酶胰岛素降解酶(insulin degrading enzyme, IDE)和脑啡肽酶(neprilysin, NEP)的分泌,减少A β 聚集。除此之外,UC-MSCs的外泌体还能够促进抗炎细胞因子IL-10和TGF- β 的表达,抑制促炎细胞因子IL-1 β 和TNF- α 的表达,减轻脑部炎症。DING等^[43]研究结果也证实,小鼠尾静脉注入UC-MSCs的外泌体可以调节炎症性细胞因子的分泌。

2.2 骨髓间充质干细胞

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是目前研究以及应用最多的一种MSCs。在AD疾病治疗中, BMSCs也体现出了潜力和优势。

2.2.1 BMSCs的旁分泌因子 BMSCs可发挥减少A β 斑块、抑制细胞凋亡等作用。NAALDIJK等^[44]通过尾静脉向APP/PS1小鼠中注射10⁶个BMSCs后观察到pE3-A β 淀粉样斑块的数量减少。为了优化AD模型中移植BMSCs的性能,研究人员在移植前进行化学和药理预处理。ESMAEILZADE等^[45]使用脯氨酸羟化酶抑制剂二甲草酰甘氨酸(dimethylallylglycine, DMOG)预处理BMSCs,提高了旁分泌作用。DMOG可以稳定低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)的表达,从而降低线粒体cyt c的释放并减少BMSCs的凋亡,增强基于干细胞的疗法在神经退行性疾病中的疗效。

2.2.2 BMSCs的外泌体 近年来一些研究证实,从BMSCs中分离出的外泌体可减轻神经炎症,是AD的有前途的无细胞治疗方法。NI等^[46]进行眼眶后注射BMSCs的外泌体,下调了iNOS的表达,在体内促进M1表型胶质细胞向M2表型的转变,抑制促炎细胞因子的表达,缓解早期神经炎症。另外, BMSCs的外泌体在经缺氧预处理后,其抗炎作用可得到增强。缺氧预处理可增加AD小鼠大脑中的miR-21水平,从而调控涉及NF- κ B途径的炎症因子的水平,阻止AD小鼠大脑中NF- κ B p65的核易位,下调促炎细胞因子(TNF- α 和IL-1 β)的表达,上调AD小鼠的抗炎细胞因子(IL-10)表达,抑制炎症反应^[47]。

2.3 脂肪间充质干细胞

脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchy-

mal stem cells, ADMSCs)具有与BMSCs相类似的生物学特性,而且具有来源丰富、取材容易、易于分离等优点。已有临床报道, ADMSCs及其外泌体可改善AD患者的病症。

2.3.1 ADMSCs的旁分泌因子 ADMSCs可分泌许多神经营养因子和抗炎因子,其低氧条件培养基可以改变AD大鼠模型中的Toll样受体TLR2和TLR4的表达,抑制小胶质细胞通过Toll样受体(TLR2、TLR4)与A β 结合,减少促炎细胞因子和趋化因子产生,从而改善神经炎症。在I期临床试验中, MSCs条件培养基(MSCs-conditioned medium, MSCs-CM)已被用于神经退行性疾病肌萎缩侧索硬化症患者,几乎未观察到不良反应^[48]。MSCs-CM副作用较小,使用更安全,未来或许可以代替MSCs被应用于AD患者^[49]。

2.3.2 ADMSCs的外泌体 ADMSCs的外泌体可抑制AD转基因小鼠模型的炎症因子表达和神经细胞的凋亡。FENG等^[50]发现, ADMSCs的外泌体可以通过抑制NF- κ B信号通路下调促炎细胞因子的表达,保护神经细胞免受炎症因子的伤害。LEE等^[51]研究显示, ADMSCs的外泌体能够下调促凋亡蛋白Bax的表达,上调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,进而抑制细胞凋亡,增强神经干细胞的神经突向外生长。另外, ADMSCs的外泌体在减少A β 沉积方面也表现出显著的功效, ADMSCs的外泌体处理过的AD小鼠大脑的神经干细胞,其A β 42水平、A β 40水平和A β 42/40比例降低^[51]。

2.4 其他间充质干细胞

MSCs还可从骨髓、血液等组织中分离得到,不同来源的MSCs在AD的临床前研究中发挥了不同的作用。

从骨髓中分离出的MSCs也被称为骨髓间充质干细胞(postnatal human dental pulp stem cells, DPSCs),起源于颅神经嵴,是神经和骨髓组织的前体。与其他类型MSCs相比,他们更适用于神经退行性疾病。在研究神经退行性疾病帕金森病时发现, DPSCs产生的旁分泌因子可以保护多巴胺神经元,在体外用于对抗6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine hydrobromide, 6-OHDA)神经毒素诱导的氧化应激引起的细胞凋亡^[52]。由此可看出,这种干细胞具有应用于AD的潜质。

人月经血源性干细胞(menstrual blood-derived stromal cells, MenSCs)具有较高的增殖率、易于获

取, 并且没有伦理上的顾虑。ZHAO等^[53]将MenSCs立体定向脑注射到APP/PS1小鼠中。蛋白质印迹分析表明, MenSCs移植显著提高了APP/PS1小鼠大脑中A β 降解酶IDE和NEP的水平, 减少了A β 沉积, 并且还提高了APP/PS1小鼠海马和皮质的磷酸化GSK-3 β (Ser9)水平, 进而抑制Tau过度磷酸化。

3 总结与展望

对于神经退行性疾病, 目前的MSCs疗法主要是通过MSCs的旁分泌因子以及以外泌体为代表的细胞外囊泡发挥作用。MSCs直接移植到体内后发挥旁分泌作用的研究已有较大进展, 但仍存在一些问题, 首先, 对不同的研究对象, 移植MSCs的剂量、位点及移植方法等不尽相同, 如何使移植的MSCs整合融入宿主的神经系统循环, 如何评价MSCs的长期疗效、潜在副作用及安全性等问题也仍然需要通过不断的研究去一一解答。其次, 长时间培养的MSCs存在向肿瘤细胞转化的风险。最后, 移植到体内的MSCs因宿主微环境导致其在体内不能维持其活力, 出现增殖能力差和存活率低等问题, 这也制约了干细胞的治疗效果。

外泌体被认为是一种有希望的新型无细胞治疗策略, 尤其在神经退行性疾病的治疗中, 相比细胞直接移植发挥旁分泌作用, 直接使用外泌体具有诸多优势。(1)外泌体可作为产品低温保存, 在需要时可以解冻后使用, 不存在移植细胞存活率低的困扰。(2)外泌体可以被修饰, 可以将有利于组织修复的miRNA等小分子加载到外泌体中, 再传递到靶细胞中, 以促进组织修复。(3)外泌体比细胞小, 更易通过血脑屏障。(4)外泌体具有成为靶向药物载体的优势。外泌体分子结构小、生物相容性良好, 且具有天然分子转运特性。除此之外, 其既能够保持药物的活性又不会引起机体的免疫反应。但外泌体的动态生物分布研究显示, 外泌体大量积累在脾脏和肝脏中, 在大脑中检测到的外泌体信号非常有限。为促进大量的外泌体到大脑中发挥作用, 研究人员可通过将靶向表位插入到野生型蛋白质中的方法提高其对脑部的靶向性, 例如使用中枢神经系统特定的狂犬病毒糖蛋白肽靶向乙酰胆碱受体^[54], 大大提高了MSCs来源的外泌体减轻神经炎症的作用。

虽然外泌体具有比干细胞更多的优势, 但目前对外泌体的研究还不是很完善, 还有很多问题尚不

清楚, 例如, (1)外泌体所含各种生物活性物质发生生物学效应的机制不清楚; (2)如何促使培养中的干细胞产生大量的外泌体。正常培养下的外泌体含量较少, 尚不足以达到可以使用的量级; (3)在制备过程中, 如何保证不同批次不同场所的外泌体的一致性和稳定性; (4)外泌体使用的安全性需要进一步证实。

上述这些问题需要进行大量实验研究。但不管怎样, MSCs旁分泌作用的临床前研究确实体现了其对AD病症的潜在治疗作用。期待在不久的将来, MSCs能够真正地被应用于临床, 治疗甚至治愈AD, 造福人类。

参考文献 (References)

- [1] HOUR F Q, MOGHADAM A J, SHAKERI-ZADEH A, et al. Magnetic targeted delivery of the SPIONs-labeled mesenchymal stem cells derived from human Wharton's jelly in Alzheimer's rat models [J]. *J Control Release*, 2020, 321: 430-41.
- [2] CAPLAN A I. Mesenchymal stem cells [J]. *J Orth Res*, 1991, 9(5): 641-50.
- [3] CAPLAN A I. What's in a name [J]? *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(8): 2415-7.
- [4] JAN A, ADOLFSSON O, ALLAMAN I, et al. Abeta42 neurotoxicity is mediated by ongoing nucleated polymerization process rather than by discrete Abeta42 species [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(10): 8585-96.
- [5] YAMAZAKI Y, ZHAO N, CAULFIELD T R, et al. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(9): 501-18.
- [6] YARCHOAN M, TOLEDO J B, LEE E B, et al. Abnormal serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 is associated with tau pathology in Alzheimer's disease and tauopathies [J]. *Acta Neuropathol*, 2014, 128(5): 679-89.
- [7] ZHANG Z, SONG M, LIU X, et al. Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease [J]. *Nat Med*, 2014, 20(11): 1254-62.
- [8] GLODZIK L, RUSINEK H, PIRRAGLIA E, et al. Blood pressure decrease correlates with tau pathology and memory decline in hypertensive elderly [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(1): 64-71.
- [9] SPILSBURY A, MIWA S, ATTEMS J, et al. The role of telomerase protein TERT in Alzheimer's disease and in tau-related pathology *in vitro* [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(4): 1659-74.
- [10] DOMISE M, DIDIER S, MARINANGELI C, et al. AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology *in vivo* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 26758.
- [11] WU B, WANG Y, SHI C, et al. Ribosylation-derived advanced glycation end products induce tau hyperphosphorylation through brain-derived neurotrophic factor reduction [J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 71(1): 291-305.
- [12] ZHANG Y, MA R H, LI X C, et al. Silencing I2PP2A rescues tau pathologies and memory deficits through rescuing PP2A and

- inhibiting GSK-3 β signaling in human tau transgenic mice [J]. *Front Aging Neurosci*, 2014, 6: 123.
- [13] RUELI R H, TORRES D J, DEWING A S T, et al. Seleno-protein s reduces endoplasmic reticulum stress-induced phosphorylation of tau: potential role in selenate mitigation of tau pathology [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 55(2): 749-62.
- [14] PENKE B, SZUCS M, BOGÁR F. Oligomerization and conformational change turn monomeric β -amyloid and tau proteins toxic: their role in Alzheimer's pathogenesis [J]. *Molecules (Basel)*, 2020, 25(7): 1659.
- [15] DE STROOPER B, SAFTIG P, CRAESSAERTS K, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein [J]. *Nature*, 1998, 391(6665): 387-90.
- [16] BEKRIS L M, YU C E, BIRD T D, et al. Genetics of Alzheimer disease [J]. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 2010, 23(4): 213-27.
- [17] HARDY J A, HIGGINS G A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis [J]. *Science*, 1992, 256(5054): 184-5.
- [18] CHEN X Q, MOBLEY W C. Alzheimer disease pathogenesis: insights from molecular and cellular biology studies of oligomeric A β and tau species [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 659.
- [19] HERRUP K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis [J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(6): 794-9.
- [20] HARDY J, SELKOE D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-6.
- [21] BLOOM G S. Amyloid- β and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis [J]. *JAMA Neurol*, 2014, 71(4): 505-8.
- [22] SCHÖNHEIT B, ZARSKI R, OHM T G. Spatial and temporal relationships between plaques and tangles in Alzheimer-pathology [J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25(6): 697-711.
- [23] DRUMMOND E, WISNIEWSKI T. Alzheimer's disease: experimental models and reality [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(2): 155-75.
- [24] FANG E F, HOU Y, PALIKARAS K, et al. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(3): 401-12.
- [25] WU Y, CHEN M, JIANG J. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling [J]. *Mitochondrion*, 2019, 49: 35-45.
- [26] KHACHO M, SLACK R S. Mitochondrial dynamics in the regulation of neurogenesis: from development to the adult brain [J]. *Dev Dyn*, 2018, 247(1): 47-53.
- [27] MANCZAK M, REDDY P H. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(11): 2538-47.
- [28] QAMRE A, MOHAMMAD ZUBAIR A, GOHAR M, et al. Inflammatory process in Alzheimer's and Parkinson's diseases: central role of cytokines [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(5): 541-8.
- [29] HENEKA M T, KUMMER M P, STUTZ A, et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice [J]. *Nature*, 2013, 493(7434): 674-8.
- [30] CHOI S H, AID S, CARACCILO L, et al. Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 2013, 124(1): 59-68.
- [31] ZHAO Y, CALON F, JULIEN C, et al. Docosahexaenoic acid derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPAR γ -mediated mechanisms in Alzheimer's disease models [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15816.
- [32] PICÓN-PAGÈS P, GARCIA-BUENDIA J, MUÑOZ F J. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(8): 1949-67.
- [33] KIM D H, LIM H, LEE D, et al. Thrombospondin-1 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells rescues neurons from synaptic dysfunction in Alzheimer's disease model [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 354.
- [34] PARK S E, LEE J, CHANG E H, et al. Activin A secreted by human mesenchymal stem cells induces neuronal development and neurite outgrowth in an *in vitro* model of Alzheimer's disease: neurogenesis induced by MSCs via activin A [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(8): 1171-9.
- [35] CUI Y, MA S, ZHANG C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer's disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 320: 291-301.
- [36] KIM D H, LEE D, CHANG E H, et al. GDF-15 secreted from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells delivered through the cerebrospinal fluid promotes hippocampal neurogenesis and synaptic activity in an Alzheimer's disease model [J]. *Stem Cells Dev*, 2015, 24(20): 2378-90.
- [37] KIM D H, LEE D, LIM H, et al. Effect of growth differentiation factor-15 secreted by human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on amyloid beta levels in *in vitro* and *in vivo* models of Alzheimer's disease [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(4): 933-40.
- [38] XIE Z H, LIU Z, ZHANG X R, et al. Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells alleviate memory deficits and reduce amyloid- β deposition in an APP/PS1 transgenic mouse model [J]. *Clin Exp Med*, 2016, 16(1): 89-98.
- [39] DE BECKER A, RIET I V. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: how to improve the efficacy of cell therapy [J]? *World J Stem Cells*, 2016, 8(3): 73-87.
- [40] WANG D, LI S P, FU J S, et al. Resveratrol augments therapeutic efficiency of mouse bone marrow mesenchymal stem cell-based therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2016, 49(1): 60-6.
- [41] WANG X, MA S, YANG B, et al. Resveratrol promotes hUC-MSCs engraftment and neural repair in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 339: 297-304.
- [42] KIM H J, SEO S W, CHANG J W, et al. Stereotactic brain injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: A phase 1 clinical trial [J]. *Alzheimers Dement (N Y)*, 2015, 1(2): 95-102.
- [43] DING M, SHEN Y, WANG P, et al. Exosomes isolated from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate neuroinflammation and reduce amyloid-beta deposition by modulating microglial activation in Alzheimer's disease [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(11): 2165-77.
- [44] NAALDIJK Y, JÄGER C, FABIAN C, et al. Effect of systemic

- transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on neuropathology markers in APP/PS1 Alzheimer mice [J]. *Neuropathol Appl neurobiol*, 2017, 43(4): 299-314.
- [45] ESMAEILZADE B, ARTIMANI T, AMIRI I, et al. Dimethyl-oxalyglycine preconditioning enhances protective effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in A β -induced Alzheimer disease [J]. *Physiol Behav*, 2019, 199: 265-72.
- [46] NI H, YANG S, SIAW-DEBRAH F, et al. Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells ameliorate early inflammatory responses following traumatic brain injury [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 14.
- [47] CUI G H, WU J, MOU F F, et al. Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice [J]. *FASEB J*, 2018, 32(2): 654-68.
- [48] MAZZINI L, FERRERO I, LUPARELLO V, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I clinical trial [J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(1): 229-37.
- [49] MEHRABADI S, MOTEVASELI E, SADR S S, et al. Hypoxic-conditioned medium from adipose tissue mesenchymal stem cells improved neuroinflammation through alternation of toll like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in model of Alzheimer's disease rats [J]. *Behav Brain Res*, 2020, 379: 112362.
- [50] FENG N, JIA Y, HUANG X. Exosomes from adipose-derived stem cells alleviate neural injury caused by microglia activation via suppressing NF- κ B and MAPK pathway [J]. *J Neuroimmunol*, 2019, 334: 576996.
- [51] LEE M, BAN J J, YANG S, et al. The exosome of adipose-derived stem cells reduces beta-amyloid pathology and apoptosis of neuronal cells derived from the transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Brain Res*, 2018, 1691: 87-93.
- [52] JARMALAVICIUTE A, TUNAITIS V, PIVORAITE U, et al. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis [J]. *Cytotherapy*, 2015, 17(7): 932-9.
- [53] ZHAO Y, CHEN X, WU Y, et al. Transplantation of human menstrual blood-derived mesenchymal stem cells alleviates Alzheimer's disease-like pathology in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 140.
- [54] CUI G H, GUO H D, LI H, et al. RVG-modified exosomes derived from mesenchymal stem cells rescue memory deficits by regulating inflammatory responses in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Immun Ageing*, 2019, 16(1): 10.