

# The Latest Application Progress of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells (hUC-MSCs) in Neurological Diseases

Deshuang Zhang, Juan Chen\*

Department of Neonatology, West China Second University Hospital, Chengdu  
Email: \*chenjuan2000@163.com

Received: Jun. 25th, 2012; revised: Jul. 5th, 2012; accepted: Jul. 12th, 2012

**Abstract:** The mesenchymal stem cell is rich in human umbilical cord, compared with MSCs of other sources, hUC-MSCs have major advantages such as richer source, easier collection freedom, shorter doubling time, lower immunogenicity, longer-term survival after transplantation, no ethical implications and so on. In recent years, the investigation of hUC-MSCs has been growing. In appropriate circumstances, hUC-MSCs can differentiate into neuron-like cells, when transplanted into different animal models of neurological diseases can promote the recovery of neural function. Now, we will review the latest application progress of hUC-MSCs in Neurological Diseases.

**Keywords:** Human; Umbilical Cord; Mesenchymal Stem Cells; Transplantation; Nervous System Diseases

## 人脐带间充质干细胞移植在神经系统疾病中的新进展

张德双, 陈娟\*

四川大学华西第二医院新生儿科, 成都  
Email: \*chenjuan2000@163.com

收稿日期: 2012年6月25日; 修回日期: 2012年7月5日; 录用日期: 2012年7月12日

**摘要:** 人脐带组织富含间充质干细胞(MSCs), 与其他来源的 MSCs 相比, 具有来源丰富、容易提取、倍增时间短、免疫原性低、移植后长期存活、不涉及伦理问题等多种优点, 近年来对其研究越来越多。在适宜的环境下, 人脐带间充质干细胞(hUC-MSCs)可以分化为神经样细胞, 移植于多种神经系统疾病动物模型后均可促进其神经功能恢复, 现就此方面的最新研究及应用进展予以综述。

**关键词:** 人; 脐带; 间充质干细胞; 移植; 神经系统疾病

### 1. 引言

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是一类具有高度自我更新和多向分化潜能的多能干细胞, 主要来源于骨髓、脂肪、脐带、脐血等, 其中人脐带间充质干细胞(human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, hUC-MSCs)分离成功率高、体外能够大量扩增, 越来越受到关注。很多中枢神经系统疾

病表现为认知与运动功能渐进性恶化最终导致长期劳动力丧失, 为长期困扰医学界的难题。自 2003 年 Mitchell 等<sup>[1]</sup>首次从脐带中成功分离出基质细胞并证实其能向神经样细胞分化后, hUC-MSCs 移植在神经系统疾病中的应用逐渐成为医学界研究的焦点。

### 2. hUC-MSCs 的来源及分离方法

#### 2.1. hUC-MSCs 的来源

脐带为孕期胎儿与母亲之间的索状连接组织, 外

\*通讯作者。

被羊膜, 内由两条脐动脉与一条脐静脉构成, 血管周围被粘蛋白样组织即 Wharton's 胶所包裹。脐带胶、脐静脉血管内皮下及脐血管周围均富含 MSCs。

## 2.2. hUC-MSCs 的分离培养

目前, hUC-MSCs 的分离培养尚未有标准方法。常用方法有组织块贴壁法<sup>[1]</sup>、酶消化法<sup>[2-4]</sup>以及两种方法的结合<sup>[5]</sup>。在无菌条件下, 将手术台上采集的脐带浸入含青霉素(100 U/ml)和链霉素(100 ug/ml)的 PBS 缓冲液中, 4℃ 保存, 48 h 内处理。剔除血管、洗净残血, 于平皿中, 用解剖刀将脐带分割成 1.5 cm 长的小段, 然后用剪刀剪碎成为 1~2 mm<sup>3</sup> 的组织块, 先后经胶原酶 IV(1 g/L)和胰酶(2.5 g/L)消化处理, 细胞筛过滤、离心、PBS 洗涤。将洗涤后的细胞接种于 90 mm 细胞培养皿上, 加入 10 ml 培养液(DMEM/F12 + 10% 胎牛血清), 置于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中培养, 每 3~4 天半量换液, 去掉未贴壁细胞, 直到细胞汇合度达 70% 左右进行传代。传代消化时, 用 0.05% 胰酶/EDTA 处理, 收集细胞, 离心后以 1 × 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 的密度进行传代。传代培养过程中, 每 3 天全量换液, 直至贴壁细胞达到 90% 汇合度。

## 3. hUC-MSCs 的生物学特性

根据国际细胞治疗协会制定的最低标准, MSCs 需具备以下条件: 1) MSCs 在标准培养条件下呈贴壁生长; 2) MSCs 表达 CD105、CD73 和 CD90, 不表达 CD45、CD34、CD14 或 CD11b、CD19 或 CD79a 及 HLA-DR 表面分子; 3) MSCs 在体外至少能向成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞分化。hUC-MSCs 是介于胚胎干细胞与成体干细胞之间的一类多潜能干细胞, 高表达整合素及粘附分子 CD29、CD44、CD90、CD95 以及常用的 MSCs 标志物 CD73、CD105; hUC-MSCs 还表达具有抑制免疫作用的 HLA-ABC 和 HLA-G, 以及胚胎干细胞标志物 Tra-1-60、Tra-1-81、SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1)、SSEA-4、Oct-4、碱性磷酸酶 ALP 和 MSCs 骨架标志物平滑肌肌动蛋白及波形蛋白。hUC-MSCs 不表达造血细胞标志物 CD34、CD45、CD14、HLA-DR 和 CD133 及内皮细胞标志物 CD31、vWF, 也不表达或低表达移植免疫排斥相关标志物 CD80、CD86、CD40。hUC-MSCs 在混合淋巴细胞检测中呈免疫抑制状态, 并抑制 T 细

胞的增殖, 异体移植该细胞可产生免疫耐受性, 因此异基因移植不会发生免疫排斥反应。

## 4. hUC-MSCs 向神经细胞的分化潜能

hUC-MSCs 在特定培养条件下可被诱导分化为神经样细胞。多种诱导方案均可成功地将 hUC-MSCs 诱导分化为神经元及胶质细胞。Mitchell 等<sup>[1]</sup>首先将脐带胶基质细胞以碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)预处理过夜, 再通过 2% 二甲亚砜、200 μM 丁基羟基茴香醚与 2% 胎牛血清进行诱导, 5 h 后再经 25 mM 氯化钾、2 mM 丙戊酸、10 μM 毛喉菇、1 μM 的氢化可的松及 5 μg/ml 胰岛素进行诱导, 结果发现大部分细胞高水平表达神经元标志物 β-III 型微管蛋白和神经微丝。Ma 等<sup>[6]</sup>将从脐带胶分离出的 MSCs 先以 bFGF 预处理 24 h 后, 然后再以丹参或 β-巯基乙醇进行诱导, 最后以 4% 多聚甲醛固定处理, 经以上不同方法诱导处理 1~5 h 后, 细胞形态发生明显变化, 细胞萎缩、变小并形成突起, 细胞逐渐变成球形、星状或长条形; 并表达巢蛋白、β-III 型微管蛋白、神经微丝和胶质纤维酸性蛋白。Fu 等<sup>[7]</sup>通过神经元条件培养基(neuronal conditioned medium, NCM)对 hUC-MSCs 进行诱导, 第 3 天时可见细胞发生形态学改变并表达神经元抗核抗体和神经微丝。Kadam 等<sup>[8]</sup>同样以 NCM 进行诱导培养后的细胞可使其表达神经元特异性核蛋白 NeuN 及微管相关蛋白 Map2。

hUC-MSCs 除能分化为神经元及胶质细胞以外, 还可向特定的神经元细胞分化。Fu 等<sup>[9]</sup>通过神经元条件培养基、音猬蛋白和成纤维细胞生长因子-8, 成功地将 hUC-MSCs 诱导分化为表达酪氨酸羟化酶并分泌多巴胺的多巴胺能神经元。Weiss 等<sup>[10]</sup>将 hUC-MSCs 移植治疗帕金森病大鼠模型时发现, hUC-MSCs 除能分化为酪氨酸羟化酶阳性的多巴胺能神经元, 尚可表达酪氨酸羟化酶阳性的胆碱能神经元。

## 5. hUC-MSCs 的治疗流程

- 1) 脐带采集:  
签署知情同意书, 取健康足月新生儿脐带约 10 cm;
- 2) hUC-MSCs 的分离培养、纯化;
- 3) hUC-MSCs 扩增及鉴定:  
根据 hUC-MSCs 的免疫表型, 运用流式细胞术对

分离、扩增细胞进行鉴定；

#### 4) hUC-MSCs 移植治疗神经系统疾病：

hUC-MSCs 可于体外诱导分化为神经干细胞或直接移植治疗神经系统疾病动物模型或患者，通过减少凋亡、抑制炎症、血管重建、细胞替代等作用发挥形态与功能修复。

## 6. hUC-MSCs 移植在神经系统疾病中的应用

人们对 hUC-MSCs 的认识较其他来源的 MSCs 相对较晚，hUC-MSCs 移植在神经系统疾病中的应用目前主要处于不同疾病动物模型的实验研究阶段。

### 6.1. 帕金森氏病

帕金森氏病是以纹状体多巴胺功能渐进性丧失为特征的一种神经退行性疾病，目前尚无根治性治疗措施。然而，hUC-MSCs 移植疗法为其带来了新希望。Fu 等<sup>[9]</sup>将 hUC-MSCs 移植到 6-羟基多巴胺诱发的帕金森病大鼠模型的纹状体内，发现表达人特异性核抗原的酪氨酸羟化酶阳性细胞可在移植部位至少存活 4 个月，并能向移植部位的头、尾两侧迁移约 1.4 mm，苯丙胺诱发的大鼠转圈行为也得到了显著改善。Weiss 等<sup>[10]</sup>发现，细胞移植后帕金森病大鼠的黑质和腹侧被盖区内酪氨酸阳性细胞数目与大鼠的行为学改善呈正相关，并推测移植细胞产生的胶质细胞源性神经营养因子 GDNF 和纤维母细胞生长因子 FGF 对多巴胺能神经元的营养作用可能是其促进神经功能恢复的主要机制。

邱云等<sup>[11]</sup>采用脐带 MSCs 移植治疗了 8 例帕金森病患者，植入 1 月后发现，患者的震颤、强直有了明显改善，但是运动迟缓、姿势不稳等临床症状无明显改善，8 例患者均未出现移植物抗宿主病。结果提示脐带间充质干细胞移植可以一定程度地改善帕金森病患者的临床症状，提高患者生活质量。

### 6.2. 脊髓损伤

脊髓损伤是基于轴索变性、神经元与胶质细胞丢失与周围病变部位脱髓鞘的一种疾病，最终将导致白质纤维束永久性中断造成瘫痪。作为治疗脊髓损伤的理想供体细胞应具有易于获取、倍增时间短、能够在脊髓环境中长期存活、易于转染并长期表达外源性基

因等优点，hUC-MSCs 因具有上述优点，可作为治疗脊髓损伤理想的细胞来源。Yang 等<sup>[12]</sup>将 hUC-MSCs 移植到完全性横贯性脊髓损伤大鼠模型的损伤部位后，大鼠的运动功能得到显著改善，病变周围皮质脊髓束再生轴突和神经微丝的数目显著增加。Wang 等<sup>[13]</sup>将 hUC-MSCs 移植到脊髓半切小鼠模型中，结果发现小鼠的行为学随移植后时间的迁移而得到逐渐改善。

### 6.3. 脑缺血

缺血性脑卒中是由突然发生的脑组织局部供血血流减少或完全中断所致，若得不到及时诊断与治疗，容易导致永久性的神经损伤、神经系统并发症甚至死亡。研究表明<sup>[14]</sup>，神经干细胞、骨髓 MSCs、脂肪组织细胞、脐带血细胞、外周血细胞均可在动物缺血性脑卒中模型中发挥一定的治疗作用，由于获取困难、伦理约束、倍增时间长等原因，限制了其在该领域的广泛应用。而 hUC-MSCs 恰恰克服了这些缺点。Lin 等<sup>[15]</sup>将 hUC-MSCs 移植到大脑中动脉栓塞模型大鼠的脑皮质，移植组大鼠出现脑梗死体积减少、萎缩程度逐渐减弱，运动功能及皮质神经元的代谢活动得到显著改善，并发现移植大鼠皮质表面有广泛的新生血管形成、梗死区域血管密度显著增加。Koh 等<sup>[16]</sup>也发现，植入 hUC-MSCs 的脑卒中模型大鼠神经行为学改善、梗死面积减少，海马区域内源性巢蛋白阳性细胞数增加，而相对较少数量的植入细胞表达神经元标志物。因此推测，植入 hUC-MSCs 的脑卒中大鼠神经行为学的改善可能与 hUC-MSCs 的神经保护作用所致的内源性神经形成增加、梗死面积减少有关，而并非是在自体神经元与植入细胞之间形成了新的血管、神经网络。

### 6.4. 脑出血

脑出血是由颅内血管自发性破裂所引起，属于脑卒中的一种，具有较高的发病率及死亡率，存活者常遗留永久性神经功能障碍。Liao 等<sup>[17]</sup>将 hUC-MSCs 移植入脑出血模型大鼠脑内，结果发现移植组大鼠神经功能缺陷得到了明显改善、脑出血面积减少，脑出血周围白细胞浸润减轻、小胶质细胞活性降低、胞内活性氧水平及基质金属蛋白酶的产生明显较少，血管密度明显增加。推测其可能的发病机制为抑制炎症与促进血管重建。

## 6.5. 脑创伤

创伤性脑外伤是年轻人群致残、致死的首要原因。Zhang 等<sup>[18]</sup>将脑源性神经营养因子(BDNF)修饰的 hUC-MSCs 移植入液压敲击裸鼠脑损伤模型的病变周围, 结果发现基因转导的 hUC-MSCs 可以改善损伤大鼠的神经功能, 并增加神经元特异性酯酶的阳性细胞数, 减少 GFAP 阳性细胞数及细胞凋亡。由此说明, hUC-MSCs 在脑外伤治疗中具有潜在的应用价值。

## 6.6. 视网膜病

光感受器退行性变是发达国家致盲的主要原因之一, 研究表明, 细胞移植疗法可能会为该病的治疗带来新希望。Lund 等<sup>[19]</sup>分别将脐带组织细胞、胎盘细胞、骨髓 MSCs、皮肤成纤维细胞移植入视网膜退行性变大鼠的视网膜下间隙, 结果发现胎盘组织细胞及骨髓 MSCs 均能显著改善视网膜退行性变的程度, 其中前者较后者具有更显著的修复作用。由于植入细胞未分化为神经元, 推测其作用的原因可能与其分泌神经营养因子如脑源性神经营养因子 BDNF、白介素-6 等有关。这进一步为视网膜退行性变的治疗带来了新思路。

## 7. 总结与展望

近 10 年来, 干细胞移植疗法有了重大突破, 并为神经系统疾病的治疗带来了新的契机。尽管神经干细胞、胚胎干细胞、骨髓 MSCs 等仍为目前细胞移植领域研究的热点, 但与其相比, hUC-MSCs 具有更多的优点: 1) 作为妊娠分娩废弃物, 其获取不受伦理、道德等方面的约束; 2) 与骨髓 MSCs 相比, 其增殖、分化能力不会随着年龄的增长而下降, 短时间内即可获取大量细胞, 为其短期内的实验与临床移植应用提供了可能; 3) 与脐血 MSCs 相比, 其分离成功率高, 几乎可达 100%, 而脐血 MSCs 的分离成功率仅为 0%~60%<sup>[20]</sup>; 4) 采集过程为非侵袭性操作, 对母亲或胎儿不会造成任何痛苦或不利影响; 5) 胎盘的屏障作用, 使其细菌、病毒感染风险较其他组织源性 MSCs 低; 6) 生物性能稳定, 多次传代后仍保持旺盛功能; 7) 可长年低温储藏, 便于实验研究与临床应用; 8) 免疫原性低, 不表达 MHC II 类分子, 低表达 MHC I 类分子, 可作为同种异体细胞移植的来源; 9) 其分化

潜能介于胚胎干细胞与成体干细胞之间, 因此, 不会无限增殖形成畸胎瘤, 于适宜环境下可被成功诱导分化为三个不同胚层来源的多种成熟细胞; 10) 在适宜的体内外环境下, 可被诱导分化为多种神经元及各类胶质细胞, 并分泌大量的生长因子、细胞因子及生物活性因子, 通过减少凋亡、调节免疫、抑制炎症、细胞替代等多重机制参与各种神经系统疾病动物模型的神经功能修复; 11) 转染率高, 能稳定表达外源性基因, 可作为基因治疗的载体。鉴于 hUC-MSCs 的诸多优点, 其作为神经系统疾病治疗的细胞来源具有广泛的应用前景。若能有效利用妊娠分娩废弃物, 对神经系统疾病患者进行早期 hUC-MSCs 移植治疗降低其死亡率及神经系统后遗症的发生, 进而提高患者的生存质量将具有深远的社会意义。

难治性神经系统疾病, 系指用传统药物疗法或手术治疗后症状控制每况愈下, 毒副作用严重, 很难阻止病情进展的神经系统疾病。此类患者生活质量极低, 给家庭和社会带来了极大负担。而 hUC-MSCs 可以在一定条件下分化为神经类细胞, 并定位于损伤部位进行形态与功能修复, 为难治性神经系统疾病患者带来了曙光。目前, 动物实验及临床试验表明, 与神经系统疾病传统疗法相比, hUC-MSCs 治疗的优势在于, 治疗时间短, 可以增强机体免疫力、提高生活质量, 尚未有急性或长期不良反应报道。尽管 hUC-MSCs 具有诸多优点, 但在其正规、广泛应用于临床治疗神经系统疾病之前, 尚有较多问题以待解决, 比如移植的最佳时间窗及途径、临界细胞剂量、长期传代培养后有无恶变倾向及标识、移植后有无长期不良效应等。其中, hUC-MSCs 治疗是否具有长期安全性, 为其临床限制使用的主要原因。因此, hUC-MSCs 在神经系统中的应用尚需多中心、大规模、前瞻性的实验进行研究探讨, 以最简单、最经济、最安全的方法实现其最佳疗效, 从而为 hUC-MSCs 的临床应用提供坚实的实验依据。

## 8. 致谢

衷心感谢我的导师陈娟教授一直以来在学习、工作和生活中对我的悉心教导和无微不至的关怀, 使我顺利完成了本文的撰写。她严谨的治学态度、渊博的学识、精益求精的工作作风、诲人不倦的高尚师德、

平易近人的人格魅力将使我终身受益，并将激励着我在今后的学习和工作之中不断努力与进取。

## 参考文献 (References)

- [1] K. E. Mitchell, M. L. Weiss, B. M. Mitchell, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 50-60.
- [2] Y. A. Romanov, V. A. Svintsitskaya and V. N. Smirnov. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 105-110.
- [3] R. Sarugaser, J. Ennis, W. L. Stanford, et al. Isolation, propagation, and characterization of human umbilical cord perivascular cells (HUCPVCs). *Methods in Molecular Biology*, 2009, 482: 269-279.
- [4] K. Seshareddy, D. Troyer and M. L. Weiss. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. *Methods in Cell Biology*, 2008, 86: 101-119.
- [5] H. S. Wang, S. C. Hung, S. T. Peng, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 2004, 22(7): 1330-1337.
- [6] L. Ma, X. Y. Feng, B. L. Cui, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chinese Medical Journal*, 2005, 118(23): 1987-1993.
- [7] Y. S. Fu, Y. T. Shih, Y. C. Cheng, et al. Transformation of human umbilical mesenchymal cells into neurons *in vitro*. *Journal of Biomedical Science*, 2004, 11(5): 652-660.
- [8] S. S. Kadam, S. Tiwari and R. R. Bhonde. Simultaneous isolation of vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord. *In Vitro Cell & Development Biology Animal*, 2009, 45(1-2): 23-27.
- [9] Y. S. Fu, Y. C. Cheng, M. Y. Lin, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons *in vitro*: Potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 115-124.
- [10] M. L. Weiss, S. Medicetty, A. R. Bledsoe, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: Preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 781-792.
- [11] 邱云, 汪铮, 路红社. 脐带间充质干细胞移植治疗帕金森病 8 例. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(36): 6833-6836.
- [12] C. C. Yang, Y. H. Shih, M. H. Ko, et al. Transplantation of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly after complete transection of the rat spinal cord. *PLoS One*, 2008, 3(10): e3336.
- [13] G. S. Wang, Q. Z. Zhang and Z. C. Han. Evaluation of neurological function recovery following human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation to injured spinal cord in rats. *Chinese Journal of Neurosurgery*, 2006, 22(1): 18-21.
- [14] T. Bliss, R. Guzman, M. Daadi, et al. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke*, 2007, 38(Suppl. 2): 817-826.
- [15] Y. C. Lin, T. L. Ko, Y. H. Shih, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke. *Stroke*, 2011, 42(7): 2045-2053.
- [16] S. H. Koh, K. S. Kim, M. R. Choi, et al. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Research*, 2008, 10(1229): 233-248.
- [17] W. Liao, J. Zhong, J. Yu, et al. Therapeutic benefit of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rat: Implications of anti-inflammation and angiogenesis. *Cell Physiology and Biochemistry*, 2009, 24(3-4): 307-316.
- [18] S. Zhang, X. Z. Liu, Z. L. Liu, et al. Stem cells modified by brain-derived neurotrophic factor to promote stem cells differentiation into neurons and enhance neuromotor function after brain injury. *Chinese Journal of Traumatology*, 2009, 12(4): 195-199.
- [19] R. D. Lund, S. Wang, B. Lu, et al. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells*, 2007, 25(3): 602-611.
- [20] E. N. Momin, A. Mohyeldin, H. A. Zaidi, et al. Mesenchymal stem cells: New approaches for the treatment of neurological diseases. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2010, 5(4): 326-344.