

# 人脐血间充质干细胞通过 TERT 与脑缺血相关的研究进展

黄晓慧 张双立 向文强 付国娇 王晓鹤 马学玲

【中图分类号】 R743.3    【文献标识码】 A    【文章编号】 1007-0478(2018)05-0601-04  
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2018.05.029

人脐血间充质干细胞由于其独特的生物学特性,已经成为脑缺血的潜在治疗方法。TERT 是基因编码逆转录酶活性的蛋白质。它的主要功能是构建端粒酶活性,保持染色体的完整性及防止 DNA 损伤。近年来研究发现,TERT 主要通过抗凋亡、血管生成、神经元存活和神经发生等方面在缺血性脑损伤后发挥神经保护作用。缺血性脑血管病是人类致残甚至死亡的主要疾病之一,由于短暂或持续的脑血流减少而造成脑细胞损伤,因此恢复脑血流、促进血管再生对脑功能恢复至关重要。人脐血间充质干细胞及 TERT 对血管机能及神经发生方面的作用为进一步研究及了解其在血管生成及神经保护方面中的机制提供重要依据,也为缺血性脑血管病的治疗提供新的发展方向。

脑卒中是全球疾病的第三大发病原因,更是全球疾病的第二大死亡原因,全球每年的脑卒中患者有1 500万人,其中500万脑卒中患者死亡,另有500万左右的患者造成永久性残疾,缺血性脑卒中的发病率占有所有脑卒中的70%~80%,由于有效治疗方案的限制,使得它是导致严重长期残疾的主要原因,更是公共卫生的重大挑战及负担<sup>[1-4]</sup>。缺血性脑卒中是一种局灶性脑损伤,常常导致严重影响生活质量的许多不良神经系统并发症。也是全球疾病中运动、感觉、认知功能障碍及死亡的主要原因之一<sup>[5]</sup>。

迄今为止,尽管对急性缺血性脑卒中机制的了解有所进展,但 FDA 所批准的治疗仍然是静脉注射重组组织纤溶酶原激活物,但许多缺血性脑卒中的患者不能从这种干预中受益<sup>[6-7]</sup>。不幸的是,除了需要短时间的溶栓治疗窗外,还没有证据证明可以有效地促进神经元功能恢复的治疗,因为脑缺血后神经元损伤可能涉及的机制是多方面的<sup>[5,8]</sup>。干细胞是治疗脑卒中的潜在策略。在最近的几十年里干细胞的疗法已经成为了恢复脑卒中功能的潜在途径<sup>[9]</sup>。在脑卒中的临床试验中使用干细胞主要是针对脑卒中的亚急性和慢性阶段的研究<sup>[10]</sup>。有相关临床前和临床的研道表明,干细胞在临床中的治疗有可能改善脑卒中患者的疗效。移植干细胞的治疗不仅为脑卒中提供了一个新的有希望的治疗策略,更是实际修复受伤大脑,防止其持续损伤的常规的重点治疗方法<sup>[6]</sup>。

基金项目:哈医大四院基金面上项目(HYDSYJQ201506) 横向课题资助(ET170602002)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四医院[黄晓慧 向文强 付国娇 王晓鹤 马学玲(通信作者)];齐齐哈尔第一医院肿瘤科(张双立)

## 1 人脐血间充质干细胞(hUCB-MSCs)的介绍

目前提出的神经保护策略有许多,但是对于这种疾病的进展这些策略却绝对不能有效地抑制或逆转<sup>[11]</sup>。在寻求更有效的治疗方法时作为候选治疗剂的干细胞是从各种组织中研发出来的。已经成为替代性干细胞的细胞来源的是骨髓和人脐血干细胞<sup>[6]</sup>。其中,人脐血间充质干细胞(hUCB-MSCs)具有的优点是优于其他类型干细胞(包括衍生自骨髓的干细胞)<sup>[12]</sup>。鉴于伦理考虑,人脐血间充质干细胞(hUCB-MSCs)是细胞治疗的最佳选择。

## 2 hUCB-MSCs 的生物学特性

人脐血间充质干细胞(hUCB-MSCs)来源特点是一种无伦理争议、独特的、无痛的获得并且可以表达丰富,表达低水平的人白细胞抗原-1,并且具有高免疫耐受性及干性潜能<sup>[13]</sup>;它也具有自我更新、扩张潜力、降低移植物抗宿主病发病率以及造血祖细胞具有丰富的增殖扩增率,抑制外周血单核细胞增殖作用等特点。随着与胚胎干细胞密切的遗传关系,它的增殖速度快于成人的 MSCs,并且 hUCB-MSCs 具有免疫特异性<sup>[14]</sup>。2013 年 Liu R 等<sup>[15]</sup>证实,脑脊髓炎小鼠的行为功能和组织病理学损伤是由 hUCB-MSCs 通过调节髓鞘再生和免疫炎症来改善自身免疫性;其还可以通过 TGF- $\beta$  调节外周免疫来实现神经保护作用。Liu 等<sup>[16]</sup>提出,除了调节同种异体免疫系统的能力外,由于可以低水平地表达多能胚胎干细胞标记因子(如 POU1F1, NANOG, SOX2 和 LIN28),hUCB-MSCs 形成畸胎瘤的可能性很小。Hsieh 等<sup>[17]</sup>经实验证实,hUCB-MSCs 可以通过分泌因子在缺血性脑卒中的动物模型中促进神经保护,增强神经发生和血管生成。2012 年 Petrova 等<sup>[18]</sup>发现,其旁分泌机制可以分化血管内皮细胞,增加 VEGF 的表达。Aronin 等<sup>[19]</sup>经研究发现,其间接旁分泌机制可以分泌神经营养因子和抗凋亡因子,具有抗炎、诱导神经和血管发生的能力,更有加速神经恢复和神经行为改善的能力。hUCB-MSCs 移植导致新生细胞、血管生成和组织修复因子的增多,减少半暗带炎症事件的发生。

2012 年 Kim 等提出,hUCB-MSCs 衍生的 MSCs 在缺血性脑卒中模型中介导血运的重建。它的干细胞与神经营养因子的移植促使神经功能的恢复。2011 年 Lin 等研究发现 hUCB-MSCs 由血管生成素(Ang)/ Tie 介导的脑卒中治疗会增加血管生成和血管稳定。2015 年 Zhao 等<sup>[20]</sup>经实验证

实,其诱导 Ang1 和 Tie2 表达增加 Ang1 和 Ang2 有助于缺血性脑卒中的血管重塑,在脑卒中后的功能恢复中起重要作用。2012 年 Lees 等<sup>[21]</sup>体内研究中发现,hUCB-MSCs 的植入能够改善受损大脑的内部环境,减少缺血性脑卒中大鼠的梗死体积,进而改善了神经行为功能。已有实验证实 hUCB-MSCs 增强可塑性是通过分化为神经元和星形胶质细胞来显著减轻 MCAO 模型的缺血性损伤来实现的。综上所述,hUCB-MSCs 对脑缺血性疾病具有有益作用,特别是通过血管生成、神经发生、神经元分化、神经修复和保护等方面,因此可用作治疗神经系统疾病如脑缺血的治疗剂。

### 3 TERT 的介绍

端粒是位于真核染色体末端的保护结构,缩短每个细胞分裂间期。它具有保护染色体末端 DNA-蛋白复合物的作用。端粒酶是一种逆转录酶,在 DNA 复制过程中维持端粒长度并防止细胞衰老是通过催化加入短端粒重复序列(TTAGGG)来完成的。端粒酶是由催化亚单位 TERT 和 RNA 模板组分(TERC 或 TR)组成的核糖核蛋白复合物,这两者都是维持端粒长度所必需的<sup>[22]</sup>。TERT 在大脑中广泛表达于胚胎期和出生后早期。端粒酶逆转录酶(TERT)是基因编码逆转录酶活性的蛋白质,也是端粒酶活性的关键调节因子和速率限制因素。TERT 发挥重要作用是保持端粒长度方面,进而防止基因组不稳定性事件的发生。TERT 参与了机体很多缺血性损伤的病理学过程及激活机制,其在缺血性脑损伤发挥保护作用。

### 4 TERT 的生物学特性

构建端粒酶活性是 TERT 的原始功能,进而在细胞分裂过程中维持端粒长度。保持染色体的完整性是 TERT 的主要功能,可抑制端粒短路引起的细胞凋亡。因此,TERT 的抗凋亡作用是通过维持染色体完整性和防止 DNA 损伤来实现的<sup>[23]</sup>。它的经典作用是通过防止端粒的缩短来稳定染色体 DNA。对预防神经元凋亡至关重要是其维持端粒完整性的逆转录酶活性。TERT 可改善线粒体功能,有利于细胞存活而非应激诱导的细胞死亡。2001 年 Lu 等提出在中枢神经系统中 TERT 保护神经元免受 DNA 损伤诱导的细胞凋亡。2013 年 Li J<sup>[23]</sup>研究发现,TERT 活化抑制线粒体凋亡途径可以在线粒体改变和半胱天冬酶活化之前完成。2006 年 Massard 等发现这种作用是通过与 Bcl-2 家族的相互作用有关,通过激活 Bax,Bcl-2 家族的促凋亡因子,TERT 抑制线粒体凋亡。2014 年 Kovalenko 等<sup>[24]</sup>经实验证实,TERT 通过与 mtDNA 结合来保护线粒体 DNA(mtDNA)免受损伤,与复合物-I 相互作用减少细胞活性氧(ROS)产生,增加线粒体膜电位改善线粒体耦合,进而直接保护线粒体功能,从而减少凋亡。2012 年 Zhao 等证实 TERT 通过抑制胱天蛋白酶-3 的活化来作为抗凋亡蛋白,其机制需进一步研究。Lee 等<sup>[25]</sup>提出,TERT 可以抑制缺血后小鼠脑中培养神经元的线粒体的凋亡途径。因此,TERT 抑制线粒体凋亡作用也可以作用于缺血性脑损伤中。

血管生成在缺血缺氧损伤后脑修复中起重要作用。Li J 等体内研究证实,TERT 可以诱导缺血组织中血管生成和新生毛细血管,也是 VEGF-依赖性血管生成和血流量增加所必需的<sup>[23]</sup>。2005 年 Zaccagnini 等提出其潜在的机制涉及促进内皮细胞血管生成、增殖和分化,保护内皮细胞免于细胞凋亡的特性,在缺血性损伤后的血管生成中发挥关键作用是其作为 VEGF 信号的下游效应。2007 年 Bermudez 等研究发现,VEGF 通过 NO,ERK 1/2 和 PI3K/AKT 途径及部分转录水平诱导 TERT 表达。2009 年 Zhou 等证实 TERT 是潜在的 VEGF 增强子,是由于 hTERT 以非依赖端粒酶方式在转录水平诱导 VEGF 表达。总之,2013 年 Ding 等<sup>[26]</sup>提出,TERT 和 VEGF 之间可能存在一个积极的调节反馈回路,调节彼此的转录表达并有助于血管生成。2014 年 Zhao 等<sup>[27]</sup>发现 TERT 通过增强缺血后血管生成起到神经保护作用。

神经元存活和神经发生是缺血性损伤后脑修复的主要事件。2001 年 Klapper 等提出,在大脑发育过程中 TERT 参与神经元分化和存活。随后 Mattson 等研究发现,TERT 可以促进神经元的存活,其被抑制可显著减少体外神经元的存活。2004 年 Kang 等发现,HI 引起的神经元凋亡可由 TERT 上调改善。2010 年 Duan 经实验证实,在 HI 损伤后用 TERT 转染的星形胶质细胞的培养基中发现培养神经元的存活率显著升高,并提出其在培养星形胶质细胞中是上调作用以应对缺血治疗。2011 年 Qu<sup>[28]</sup>研究发现,TERT 上调减弱星形胶质细胞增殖并促进 HI 后神经元存活,与星形胶质细胞中 p15 和 NT-3 表达增强有关,因为 NT-3 在脑缺血中发挥神经保护功能,NT-3 表达的延长可能有助于 TERT 对 HI 损伤的神经保护作用。TERT 介导神经元存活的潜在机制可能归因于其增强不同信号通路的激活能力。2013 年 Pikula 等<sup>[29]</sup>提出,神经营养因子家族的成员中 BDNF 具有促进神经元分化及存活、神经可塑性和神经发生的作用。Zhao 等<sup>[30]</sup>发现 BDNF 的自我保护反应表现在缺氧缺血后培养的神经元和脑中的表达增加。已有实验证实 PI3 和 p24/p44 MAP 激酶途径促进了 TERT 的上调和 BDNF 的存活。Pikula 等<sup>[29]</sup>临床研究表明血清 BDNF 浓度较低导致脑卒中/TIA 的发生率增加,表明 BDNF 是脑卒中/TIA 的风险标志。2007 年 Schabitz 等研究发现 BDNF 神经元在脑卒中可获得有益效果。BDNF 可以增加发育中神经元 TERT 的表达水平<sup>[23]</sup>。TERT 和 BDNF 修饰的 hUCB-MSCs 可能具有长期增强和维持神经分化的作用,hUCB-MSCs 将 TERT 和 BDNF 两个神经保护因子带入受伤区域,从而促进缺血缺氧性脑损伤后神经功能的恢复<sup>[27]</sup>。所以,TERT 可以在 HI 脑损伤后发挥神经保护作用。

### 5 小结与展望

缺血性脑卒中主要以神经细胞、神经胶质细胞、少突胶质细胞发生坏死和突触结构破坏为特征。脑缺血后发生一系列损伤级联反应引起脑组织缺血性损伤,而体内神经保护机制也同时启动,其作用机制涉及细胞因子、离子平衡、能量代谢、一氧化氮(NO)等多个环节,通过增强内源性神经保护

作用,抑制缺血损伤反应,从而减轻脑细胞损伤<sup>[31]</sup>。2009 年 Deepti Navaratna 等人提出促进大脑缺血病灶的血管新生可能是提高脑卒中康复结果的唯一机会,并进行包括生长因子、粘附分子及祖细胞等的研究,认为这些因素可作为刺激大脑血管再生的潜在机制。

而近年来 hUCB-MSCs 在缺血性脑血管病的作用成为了研究热点。2006 年 Newcomb 经研究证实 hUCB-MSCs 在缺血性损伤治疗 48 h 后仍然有效,表明 hUCB-MSCs 可延长治疗时间窗。hUCB-MSCs 移植显著改善了缺血性脑损伤患者后遗症的神经功能,其有益效果与其迁移到受损脑区域并分化为神经元的能力有关<sup>[32]</sup>。缺血性损伤后大脑修复的基础是血管生成。Lin 等证实 hUCB-MSCs 植入缺血性脑卒中大鼠受损的大脑半球后可诱导血管发生,促进脑卒中后功能恢复。因此,hUCB-MSCs 可能对缺血性脑血管病具有有益作用,可用作缺血性脑血管病的治疗剂,这为研究其在血管再生、改善神经等方面的作用,进而为应用于治疗缺血性脑血管病提供了重要参考。

神经元中 TERT 的上调改善了 HI 诱导的神经元死亡。TERT 在 HI 脑损伤中的神经保护机制可能与减少兴奋性毒性、促进血管生成、促进神经元存活和神经发生以及抗细胞凋亡作用有关。2010 年 Lee 等<sup>[33]</sup>提出 TERT 在维持脑功能和行为方面也起着重要作用;其潜在神经保护机制不是完全独立的,而是相互重叠的<sup>[23]</sup>。2015 年 Bressler 等<sup>[34]</sup>证实 TERT 作为心血管疾病风险的决定因素还应用于社区动脉粥样硬化风险(ARIC)研究中。总而言之,对 hUCB-MSCs 及 TERT 的研究和了解证实其在血管机能及神经保护方面具有重要调节作用,目前研究尚处于起步阶段,但这些研究已提供了新的视角,有望在临床相关诊断、治疗及预后评估方面得到发展,可以展望将来基因治疗会成为缺血性脑血管病治疗的一种新兴手段。

## 参 考 文 献

- [1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2015, 131(4): e29-322.
- [2] Kim AS, Johnston SC. Temporal and geographic trends in the global stroke epidemic[J]. *Stroke: a journal of cerebral circulation*, 2013, 44(1): 123-125.
- [3] Cheng Q, Zhang Z, Zhang S, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against ischemic brain injury in mouse by regulating peripheral immunoinflammation[J]. *Brain Res*, 2015, 1594(1): 293-304.
- [4] Banerjee S, Williamson D, Habib N, et al. Human stem cell therapy in ischaemic stroke: a review[J]. *Age Ageing*, 2011, 40(1): 7-13.
- [5] Li Y, Hu G, Cheng Q. Implantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells for ischemic stroke: perspectives and challenges[J]. *Frontiers of medicine*, 2015, 9(1): 20-29.
- [6] Chelluboina B, Klopstein JD, Pinson DM, et al. Stem cell treatment after cerebral ischemia regulates the gene expression of apoptotic molecules[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(8): 1511-1521.
- [7] Park HW, Moon HE, Kim H, et al. Human umbilical cord Blood-Derived mesenchymal stem cells improve functional recovery through thrombospondin1, pantraxin3, and vascular endothelial growth factor in the ischemic rat brain[J]. *J Neurosci Res*, 2015, 93(12): 1814-1825.
- [8] Turner RC, Dodson SC, Rosen CL, et al. The science of cerebral ischemia and the quest for neuroprotection: navigating past failure to future success A review[J]. *J Neurosurg*, 2013, 118(5): 1072-1085.
- [9] Zhang L, Li Y, Zhang CL, et al. Delayed administration of human umbilical Tissue-Derived cells improved neurological functional recovery in a rodent model of focal ischemia[J]. *Stroke*, 2011, 42(5): 1437-1444.
- [10] Sinden JD, Vishnubhatla I, Muir KW. Chapter 8-prospects for stem cell-derived therapy in stroke[J]. *Prog Brain Res*, 2012, 201(201): 119-167.
- [11] Buonocore G, Turrise G, Kramer BW, et al. New pharmacological approaches in infants with Hypoxic-Ischemic encephalopathy[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(21): 3086-3100.
- [12] Veeravalli KK, Dasari VR, Fassett D, et al. Human umbilical cord Blood-Derived mesenchymal stem cells upregulate myelin basic protein in shiverer mice[J]. *Stem Cells Dev*, 2011, 20(5): 881-891.
- [13] Chao YH, Wu HP, Chan CK, et al. Umbilical Cord-Derived mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell transplantation[J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2015, 2012(3): 759503.
- [14] Dehua, Changhui, Wang, et al. Human amnion tissue injected with human umbilical cord mesenchymal stem cells repairs damaged sciatic nerves in rats[J]. *Neural Regeneration Research*, 2012, 7(23): 1771-1778.
- [15] Liu R, Zhang Z, Lu ZJ, et al. Human umbilical cord stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating immunoinflammation and remyelination[J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(7): 1053-1062.
- [16] Liu GY, Xu Y, Li Y, et al. Secreted galectin-3 as a possible biomarker for the immunomodulatory potential of human umbilical cord mesenchymal stromal cells[J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(10): 1208.
- [17] Hsieh JY, Wang HW, Chang SJ, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord Express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72604.
- [18] Petrova ES. The use of stem cells to stimulate regeneration of damaged nerve[J]. *Tsitologiya*, 2012, 54(7): 525.
- [19] Aronin CP, Tuan RS. Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells[J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010, 90(1): 67-74.
- [20] Zhao QC, Hu JX, Xiang J, et al. Intranasal administration of human umbilical cord mesenchymal stem cells-conditioned medium enhances vascular remodeling after stroke[J]. *Brain Res*, 2015, 1624(8): 489-496.
- [21] Lees JS, Sena ES, Egan KJ, et al. Stem cell-based therapy for experimental stroke: A systematic review and meta-analysis [J]. *International Journal of Stroke*, 2012, 7(7): 582-588.

---

(上接第 603 页)

- [22] Singhapol C, Pal D, Czapiewski R, et al. Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e52989.
- [23] Li J, Tang B, Yi Q, et al. Telomerase reverse transcriptase: A novel neuroprotective mechanism involved in neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2011, 29(8): 867.
- [24] Kovalenko OA, Caron MJ, Ulema PA, et al. A mutant telomerase defective in nuclear-cytoplasmic shuttling fails to immortalize cells and is associated with mitochondrial dysfunction[J]. *Aging Cell*, 2010, 9(2): 203-219.
- [25] Lee J, Sung YH, Cheong C, et al. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity[J]. *Oncogene*, 2008, 27(26): 3754-3760.
- [26] Ding D, Zhou J, Wang M, et al. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer[J]. *FEBS J*, 2013, 280(14): 3205-3211.
- [27] Zhao FY, Qu Y, Liu HT, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells co-modified by TERT and BDNF: A novel neuroprotective therapy for neonatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2014, 38(2014): 147-154.
- [28] Qu Y, Duan ZJ, Zhao FY, et al. Telomerase reverse transcriptase upregulation attenuates astrocyte proliferation and promotes neuronal survival in the Hypoxic-Ischemic rat brain [J]. *Stroke*, 2011, 42(12): U325-3542.
- [29] Pikula A, Beiser AS, Chen TC, et al. Serum Brain-Derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury framingham study[J]. *Stroke*, 2013, 44(10): 2768-2775.
- [30] Jianxin, Zhao, Huazhou, et al. Effect of electroacupuncture on brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in mouse hippocampus following cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 33(2): 253-257.
- [31] Amantea D, Miceli G, Tassorelli C, et al. Rational modulation of the innate immune system for neuroprotection in ischemic stroke[J]. *Front Neurosci*, 2015, 9(9): 147.
- [32] Wang S, Cheng HB, Dai GH, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury [J]. *Brain Res*, 2013, 1532(1): 76-84.
- [33] Lee J, Jo YS, Sung YH, et al. Telomerase deficiency affects normal brain functions in mice[J]. *Neurochem Res*, 2010, 35(2): 211-218.
- [34] Bressler J, Franceschini N, Demerath EW, et al. Sequence variation in telomerase reverse transcriptase (TERT) as a determinant of risk of cardiovascular disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study[J]. *BMC Med Genet*, 2015, 16(1): 1-10.

(2018-01-08 收稿)