

# 干细胞移植治疗缺血性卒中的研究进展及临床相关问题

邵蓓 王柳清 江文静 程一帆 金坤林

【关键词】 脑缺血； 干细胞移植； 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1672-6731.2011.02.011

脑血管病与心脏病、恶性肿瘤构成人类的三大致死性疾病。其中,脑卒中是指由于急性脑循环障碍所致的局限性或全面性神经功能缺损综合征,也称急性脑血管事件。脑卒中发病率、病死率和病残率逐年升高,生存者中 50%~70% 遗留严重残疾,给社会和家庭带来沉重负担。现有的治疗措施尚未显示出明显的临床治疗效果<sup>[1]</sup>,而干细胞移植治疗在动物实验和临床研究中取得的初步成果及其对脑组织的可塑性,使其成为治疗脑卒中较具前景的方法。由于干细胞移植成功率和手术后神经功能恢复受脑组织解剖结构、治疗时间窗、血供、干细胞移植部位,以及参与临床试验受试者疾病类型等诸多因素的影响,因此,相对于神经退行性疾病,脑卒中患者的干细胞移植治疗更为棘手。此外,神经退行性疾病仅损害同质神经元群,而脑卒中则影响各种不同类型的神经元,换言之,脑组织缺血后梗死既可能发生在丘脑亦可能发生在海马或纹状体等组织,不仅影响神经元功能,同时也损害少突胶质细胞、星形胶质细胞、内皮细胞等的正常功能。由于神经元、神经胶质细胞、内皮细胞之间存在着广泛而复杂的内在联系,移植细胞必须保持未分化状态,方能分化为适应缺血区的神经元、神经胶质细胞或内皮细胞。在干细胞移植治疗过程中,轴突须穿透脑梗死形成的瘢痕组织,如果脑卒中后瘢痕组

织持续存在,可能影响移植细胞与宿主神经元轴突产生功能性联系。鉴于此,采用干细胞移植治疗以修复受损的神经功能尚面临诸多挑战,需谨慎行之。由于绝大多数脑卒中为缺血性卒中,因此,笔者拟就干细胞移植治疗缺血性卒中的研究进展及临床研究设计等相关影响因素作一简要综述。

## 一、干细胞移植治疗缺血性卒中的实验研究

对于任何一项细胞移植技术而言,适宜的细胞类型至关重要。用于实验研究和临床治疗的移植细胞必须具有体内增殖活性,并可在组织结构和神经功能上整合入实验动物的脑内。目前用于脑血管病的干细胞种类有多种,但研究更为广泛的细胞类型主要为神经干细胞(NSCs)、骨髓间充质干细胞(BMSCs)、脐带血干细胞(UCBSCs)等。

1. 神经干细胞 1992 年,Reynolds 和 Weiss<sup>[2]</sup> 从成年小鼠的纹状体分离获得能在体外不断分裂增殖并具有多向分化潜能的细胞,首次提出了“神经干细胞”的概念。如今,利用神经干细胞移植治疗中枢神经系统疾病已成为普遍关注的焦点研究之一。其优点是:能够建立不同的干细胞株品系;可以分化为神经元和神经胶质细胞,从结构上易与宿主固有组织整合而不诱发免疫反应;可在脑组织内远距离播散;对宿主中枢神经系统无任何损害且不干扰其正常神经功能;基因表达稳定,维持时间较长,具有可调控性;在中枢神经系统中不受血-脑脊液屏障的限制,可通过直接定向方式输送基因产物或替换无效神经元。神经干细胞的移植方法包括经静脉注射、经椎管注射、脑室内注射或经介入直接将细胞引入受损部位等。其中,经静脉移植外源性神经干细胞是最为简单并有效的方法<sup>[3]</sup>。经研究发现,无论采用何种移植方法或途径,神经干细胞

基金项目:美国国立卫生研究院基金资助项目(项目编号:2R01AG021980);美国国立卫生研究院基金资助项目(项目编号:5R01NS057186)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院脑血管科(邵蓓,王柳清,江文静,程一帆);美国加利福尼亚州诺瓦托 Buck 老年研究院(金坤林)

通信作者:金坤林(Email:kjin@buckinstitute.org)

进入脑组织后均能自行迁移并集中于受损部位及其邻近组织,促进肢体功能恢复<sup>[4-6]</sup>。神经干细胞移植后,可通过自身释放的或外源性神经营养因子加强其神经保护作用<sup>[7]</sup>,因此外源性神经干细胞移植治疗缺血性卒中可重建已受损的神经环路。对短暂性脑缺血发作(TIA)大鼠模型的观察显示,缺血性卒中发病2周后于纹状体内移植神经干细胞可减轻大鼠肢体运动障碍,但对其空间学习能力无改善作用;经静脉移植神经干细胞于侧脑室能够促进大鼠空间学习能力而对其肢体运动障碍无改善,其他移植方法未产生类似效果<sup>[8-9]</sup>。提示:移植方法和移植部位能对实验动物的肢体功能恢复产生影响。我们曾采用以神经干细胞为基础的组织工程方法成功重建了缺血后形成的空洞,并显著减轻了缺血性卒中大鼠的肢体运动障碍<sup>[10]</sup>。尽管上述实验表明神经干细胞移植治疗缺血性卒中具有可行性,但遗憾的是,迄今尚无令人信服的证据证明神经干细胞治疗人类缺血性卒中较传统治疗方法更优越<sup>[11]</sup>。

2. 骨髓间充质干细胞 骨髓间充质干细胞为骨髓基质干细胞,不仅对造血干细胞(HSCs)起支持作用,还能分泌IL-6、IL-11,以及白血病抑制因子(LIF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、干细胞因子(SCF)等多种生长因子以促进造血。2000年,Woodbury等<sup>[8]</sup>首次证实,人外周血骨髓间充质干细胞可于成年大鼠体内分化为神经元。我们的研究发现,虽然骨髓间充质干细胞于体外表达成熟的神经元特异性蛋白,但是应用细胞膜片钳技术并未发现其具备成熟神经元特有的电生理学特征(待发表)。骨髓间充质干细胞在缺血性卒中的细胞治疗领域中所表现出的重要应用价值,是因其具有以下优点:(1)细胞采集方便、安全、创伤小,容易扩增。(2)供体来源广泛,若选择自体移植可避免胚胎引起的伦理问题,具有广阔应用前景。(3)具有增殖、迁移、分化能力。人骨髓间充质干细胞暴露于表皮生长因子(EGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)等条件时,可分化为含神经干细胞标志物的细胞<sup>[8,12-13]</sup>。(4)不表达人白细胞抗原2I(HLA2I)、分泌可溶性物质抑制T淋巴细胞的增殖反应,免疫原性弱、安全性良好<sup>[8]</sup>。理论上,利用自身骨髓间充质干细胞可以完全避免发生排斥反应,但是由于目前对骨髓间充质干细胞的分化机制尚不甚明了,故不能完全肯定移植后绝对不发生排斥反应<sup>[9]</sup>。而且,骨髓间充质干细胞是否具有可塑性、是否可以分化产生完整的

突触连接网、所分泌的细胞数目是否足以重建神经功能等问题仍悬而未解,尚需大量研究加以验证。随着骨髓间充质干细胞的分离、培养、纯化、传代、建立细胞系及体外定向诱导分化等实验技术的日臻成熟,有关骨髓间充质干细胞移植治疗缺血性卒中的研究也取得了一些进展。Chen等<sup>[14]</sup>发现,大鼠短暂性大脑中动脉闭塞1或7d时,经静脉移植大鼠骨髓间充质干细胞可以显著改善其神经功能;利用5-溴-2-脱氧尿嘧啶(BrdU)标记可见移植细胞更容易聚集于缺血侧大脑半球。骨髓间充质干细胞亦是目前临床试验应用最多的干细胞<sup>[15]</sup>。晚近研究显示,对人骨髓基质干细胞进行基因改造使其过表达营养因子,即可使干细胞的营养作用倍增<sup>[16]</sup>。然而,由于骨髓间充质干细胞的功能会随着年龄而下降,治疗效果亦随之下降,而年轻供体的骨髓间充质干细胞可引起老年患者发生免疫排斥反应,在一定程度上增加了治疗难度,影响了治疗效果<sup>[1]</sup>。

3. 脐带血干细胞 脐带血中含有丰富的未分化干细胞和祖细胞(progenitor cells),这些细胞可在体内转变为各种类型的细胞,包括神经元等<sup>[17]</sup>,因此又被称为脐带血干细胞。人脐带血干细胞也含有能够分化为神经细胞系的细胞,当加入神经生长因子、视黄醛(RA)后,其子代细胞可表达神经元和神经胶质细胞标志物<sup>[18]</sup>。其采集方法为:新生儿出生后取婴儿端脐带3~8cm,止血钳结扎、断脐,于贴近母亲端止血钳处消毒并将针头插入脐静脉,采集脐带血、分离获得干细胞。脐带血采集不同于传统的骨髓采集方法,无需进行麻醉,既无疼痛亦无不良反应及伦理问题。由于人脐带血干细胞取自人体,故移植后的免疫排斥反应相对较小,因此降低了移植过程中经常发生的急性移植物抗宿主反应的风险<sup>[1]</sup>。尽管之前有文献报道,相对于脐带血,骨髓才是提取干细胞的可靠来源<sup>[19]</sup>,但脐带血干细胞因其独特的优势仍然是关注的焦点。有研究发现,缺血性卒中大鼠注射人脐带血干细胞后有助于促进其神经功能迅速修复,经静脉注射人脐带血14~35d后,可于鼠脑内观察到人脐带血干细胞,并且缺血侧大脑半球中的人脐带血干细胞远多于对侧大脑半球<sup>[17]</sup>。大多数研究业已证实,缺血性卒中后移植脐带血干细胞可在一定程度上改善神经功能,且无明显不良反应;但亦有研究显示,脐带血干细胞移植治疗对动物神经功能的恢复无益<sup>[20]</sup>。值得注意的是,动物实验表明,若经静脉移植人脐带血干细

胞,虽然在脑内不能观察到由远隔组织迁移而来的移植细胞<sup>[21-22]</sup>,但却可以产生明显的神经功能修复效果<sup>[23]</sup>。目前,人脐带血干细胞已成功用于治疗某些血液疾病,如青少年白血病、Fanconi 贫血(FA)等,同时对儿科疾病的治疗也取得了一定疗效。目前,美国政府已经批准人脐带血干细胞用于治疗小儿颅脑创伤,成为首例干细胞移植治疗神经系统疾病的临床试验(<http://www.clinicaltrials.gov>,注册号:NCT00254722)<sup>[20]</sup>。

4. 其他类型的干细胞 (1)猪胚胎干细胞:人胚胎干细胞涉及一系列的伦理问题,所以近年来科学家将注意力转移到异种移植上来。由于猪并非濒危物种且一胎多产,因此常将猪作为胚胎干细胞的实验供体。自猪胚胎旧纹状体提取的胚胎干细胞称为外侧基底核原基(LGE),将其植入缺血性卒中模型鼠脑组织,存活率可达 80%,并能够明显改善模型鼠的神经功能<sup>[24]</sup>。但同样的人体试验则发生受试者移植排斥、变异等不良反应,据报道,猪胚胎干细胞可释放猪源性逆转录病毒(PERV),对人体细胞有不利影响,是异种移植的主要障碍之一<sup>[25]</sup>。因此实验前设计周密的操作步骤和相应的治疗策略至关重要。(2)永生神经前体细胞系:采用逆转录病毒标记中枢神经系统神经前体细胞中的癌基因,使细胞停留于细胞分化的某一时期,不能进行终末分化,即可获得永生神经前体细胞系<sup>[26]</sup>。此类细胞系具有单个细胞即可培养出无数相同细胞,通过基因技术可提高神经递质产量,对各种细胞实行优质筛选和分类,鉴别出某些感染性疾病,优化手术程序等优点。向局灶性脑缺血模型小鼠的对侧纹状体植入永生神经前体细胞系 MHP36,可以发现约 1/3 的 MHP36 细胞经纹状体向缺血侧大脑半球迁移<sup>[27]</sup>。(3)自发生成的神经元细胞系/类神经元细胞:来源于人类精源性肿瘤的 NT2N 细胞系,为纪念 Layton 生物科学研究所亦称为 LBS 神经元。NT2N 细胞为类神经元细胞,具有与神经元相似的形态,拥有较大的轴突和较长的树突<sup>[28]</sup>。NT2N 细胞具有功能性谷氨酸受体、钙离子通道,可分泌多种神经递质并具备突触新生的功能;可冷藏保存,作为动物实验和临床试验的原材料倍具吸引力,目前初步进行的临床试验效果斐然<sup>[29-30]</sup>。

#### 二、干细胞移植治疗缺血性卒中的临床试验

2005 年, Bang 等<sup>[31]</sup>报告了一项骨髓间充质干细胞治疗缺血性卒中的临床试验结果。在该项试验

中共纳入 30 例受试者,年龄 30~75 岁,其中 5 例患者接受骨髓间充质干细胞移植(治疗组),分两次进行,每次移植的细胞数为  $50 \times 10^6$  个,所有受试者均符合以下条件:(1)发病后经 7 d 的治疗观察。(2)扩散加权成像(DWI)分析显示,大脑中动脉供血区存在一系列损害表现。(3)为期 7 d 的治疗观察显示,受试者均表现有严重且持续的神经功能缺损[改良美国国立卫生研究院(NIH)评分  $\geq 7$ 分]。(4)排除造血系统疾病或骨髓抑制性疾病。移植术后对患者进行为期 1 年的 MRI 随访,观察其神经功能恢复情况,结果显示治疗组疗效明显优于对照组。之后, Lee 等<sup>[32]</sup>又于 2010 年报告了类似的临床试验,共入组 52 例患者,其中 16 例接受骨髓间充质干细胞移植(治疗组),其余 36 例未接受移植治疗者为对照组;手术后随访 5 年,治疗组死亡 4 例(25.00%),对照组死亡 21 例,病死率 58.33%。这两次临床试验结果均说明,骨髓间充质干细胞移植治疗对促进缺血性卒中患者的神经功能康复、延长生存时间有益。2009 年, Suárez-Monteagudo 等<sup>[33]</sup>采用骨髓间充质干细胞治疗 5 例缺血性卒中患者,在其后的 1 年随访观察中部分患者神经功能恢复,且无明显的移植相关不良反应。

美国 Diacrin 试验采用猪胚胎原始纹状体细胞(LGE 细胞)作为实验供体,进行异种移植临床试验,所纳入的 12 例患者均为中等面积慢性稳定性基底节梗死,病程 1~10 年,其中 5 例接受 LGE 细胞移植治疗;由于所移植的 LGE 细胞均经主要组织相容性抗体 I 处理,故移植后无需行免疫抑制治疗。在为期 4 年的随访过程中,治疗组 2 例患者肢体功能显著改善,1 例发生移植相关性皮质静脉栓塞<sup>[34]</sup>。然而遗憾的是,由于美国食品与药品管理局(FDA)的介入使试验中断。另外, NT2N 细胞系是最常用于治疗缺血性卒中的移植细胞,在 I 期临床试验中有 12 例慢性基底节梗死患者(年龄 44~74 岁)接受了细胞移植治疗,这些患者在移植前均至少经历过 1 次脑卒中事件,病程 6~54 个月,遗留肢体运动障碍<sup>[35]</sup>;移植术后 5 年未发生任何移植相关不良反应。这些患者手术后仅接受 8 周的免疫抑制治疗,但其中 1 例尸体解剖资料表明细胞移植术后 27 个月仍可在其脑组织内发现 hNT 细胞,提示长期免疫抑制治疗并非移植植物生存的必要条件。与临床试验结果相反,啮齿类动物若无持续性免疫抑制治疗,其移植于脑内的细胞即会死亡。移植术后 6 周

对患者进行 PET 扫描,发现靶区移植细胞代谢活性增强<sup>[36]</sup>,表明移植植物有存活迹象,但不能排除为炎性反应所致。根据欧洲卒中量表(ESS),这 12 例患者中 6 例神经功能康复,与 PET 显示的荧光脱氧核糖活性相符。Ⅱ期临床试验共纳入 18 例患者,他们于移植术前均经历过缺血性卒中事件,病程 1~6 年并遗留肢体功能障碍,其中 14 例随机接受细胞移植治疗(治疗组),其余 4 例则作为对照组未做特殊处理<sup>[37]</sup>。治疗组患者均接受 8 周的强制性免疫抑制治疗,移植术后 1 个月 1 例发生 1 次癫痫,1 例出现硬膜下血肿,但并未发现细胞移植直接相关的不良反应;与移植术前相比,患者肢体功能恢复指数增加。虽然与对照组相比,治疗组患者疗效并不十分显著,但是毫无疑问,这两次临床试验为后续的临床试验及治疗提供了宝贵的借鉴。

### 三、干细胞促进神经功能康复的可能机制

虽然相继有文献报道,无论是经颅还是经静脉于脑实质内移植人骨髓干细胞、脐带血干细胞、外周血前体细胞或脂肪间充质干细胞等,都可增强神经功能的恢复。然而,无论是人脐带血干细胞或是骨髓干细胞均是由多种细胞组成的,如造血干细胞、CD34<sup>+</sup>上皮干细胞、间质细胞、未成熟淋巴细胞、单核细胞等,这些细胞群都具有促进神经功能恢复的作用,因此目前并不清楚究竟何种细胞对脑卒中后神经功能恢复更为重要。神经干细胞、骨髓干细胞和脐带血干细胞经颅或经静脉到达体内后均聚集于缺血区,其中仅少数表达神经元标志物、分化为新的神经元并取代受损组织,移植细胞分泌营养因子促进脑组织损伤修复,此为目前业已肯定的理论。虽然在脑组织内发现的移植细胞数目极少,但却能够改善神经功能,提示这些移植细胞所分泌的某种物质可于细胞死亡前对大脑产生持久影响。由此可见,了解干细胞如何整合入脑并在其内发挥修复作用,对后期临床试验具有重要指导意义。以下学说可能是细胞发挥作用的机制之一,亦可能是多种机制的共同作用。

1. 整合入宿主神经环路 神经干细胞之所以吸引研究者的注意,就是它能够取代受损神经环路而促进神经功能恢复,但是,这方面的证据十分匮乏。对大鼠模型的研究证实,移植细胞可表达突触蛋白<sup>[38]</sup>,表明移植细胞具有分化为成熟神经元的功能。电子显微镜观察亦证实,人神经干细胞可与缺血组织中的受损神经环路形成新的突触连接<sup>[15]</sup>。

这就要求在细胞移植过程中尽可能提高移植细胞存活率,从而提高整合效能,促进神经功能恢复。

2. 移植细胞可减少宿主细胞死亡数目 经研究发现,缺血性卒中发病后尽早移植外源性干细胞可显著减轻缺血半暗带区细胞凋亡,以缩小脑损伤面积。产生这种效应的细胞所具备的共同特点即分泌神经营养因子,例如血管内皮生长因子(VEGF)、纤维母细胞生长因子(FBGf)、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、脑源性神经营养因子等,这些营养因子都具有神经保护作用,降低神经元死亡<sup>[38-39]</sup>。

3. 增强宿主神经元可塑性 缺血性卒中后神经元可利用其可塑性实现自发性神经功能康复<sup>[40-41]</sup>。这种可塑性需在缺血侧和对侧大脑半球实现传入神经和传出神经之间的联系,通过突触再生激发突触活性,而移植细胞可增强此种内源性脑修复机制。有研究显示,人脐带血干细胞具有增强脑卒中后缺血区神经纤维再生的作用,使缺血侧大脑半球与对侧大脑半球重建神经纤维联系<sup>[42]</sup>。

4. 促进血管新生 缺血性卒中若干天后即可出现血管新生,与神经功能恢复息息相关,而且亦是细胞质量的潜在目标<sup>[43]</sup>。人骨髓间充质干细胞通过增加血管内皮生长因子表达水平而加强内源性血管新生<sup>[44]</sup>,此外神经干细胞和脐带血干细胞亦具有促进血管新生的作用<sup>[45-46]</sup>。

5. 减轻炎症反应 此亦为移植细胞促进脑结构修复和功能恢复的可能机制。经静脉途径移植人脐带血干细胞可减少渗入脑内的白细胞数目,但目前尚不清楚是细胞移植的直接效应还是间接结果。尽管有研究提示,干细胞可直接抑制 T 细胞激活<sup>[47]</sup>,若以此推论,异种移植能够减轻免疫反应,然而明显与事实相悖。

6. 募集内源性干细胞/前体细胞 动物实验证实,缺血性事件可加强内源性神经再生<sup>[48]</sup>,干细胞移植很可能即是通过激活内源性干细胞/前体细胞而增强内源性神经再生,脐带血干细胞和骨髓干细胞亦具有同样功能<sup>[46,49]</sup>。移植的神经干细胞亦可促进缺血区内源性神经干细胞增生,从其他组织中募集不同的干细胞/前体细胞,使这些细胞融合进入神经环路,从而促进血管新生。

### 四、移植效果评价

选择有效的方法评价预后是临床试验设计的关键,不同评价指标可以得出不同的临床试验结论。临床试验的最终目的是改善患者生存质量,因

此应从患者的角度来评价细胞移植治疗缺血性卒中的效果。目前主要通过各种量表来评价细胞移植后患者的生存质量(QOL)。其中为脑卒中患者设计的生存质量评价量表,包括 Frenchay 活动指数(FAI)、脑卒中生存质量量表(SSQOL)和脑卒中影响量表(SIS)等。生存质量评价主要依据患者的自我感觉,故对伴认知功能障碍和失语的脑卒中患者不适用。为此设计了代理人量表,主要由患者的照顾者、家属进行回答,作为患者生存质量的间接评价方法,例如脑卒中影响量表和脑卒中生存质量量表均有此版本。Cramer 等<sup>[50]</sup>提出的特殊行为评价方法不仅可以评价康复治疗患者感觉运动功能的恢复情况,而且能够观察患者语言、记忆及精神症状等。虽然患者生存质量对其生存意义重大,但易受主观因素的影响而难以准确评价。日常生活活动能力(ADL)评价更为客观且对患者意义较大,大多数脑卒中临床试验都将其作为主要疗效评价指标。常用量表有 Barthel 指数(BI)、改良 Rankin 量表(mRS)和功能独立性评价(FIM),其中 Barthel 指数简单易行,真实可靠,是评价患者日常生活活动能力的最佳量表。

与心脏疾病的临床试验不同,对缺血性卒中康复性治疗的评价不能选择左室射血分数、左室舒张末期容积等容易测量的指标。因此,在康复过程中常以患者功能改变为主要评价指标,需参照上述功能评价量表。由于缺血性卒中需考虑梗死灶大小、部位及梗死后的功能修复情况,故于试验早期亦可采用影像学检查技术来评价脑卒中后的恢复情况。例如:通过扩散张量成像(DTI)评价白质纤维束功能及其恢复情况<sup>[51-52]</sup>;fMRI 评价皮质功能恢复情况以筛查病情改善显著的患者<sup>[53]</sup>;磁共振波谱(MRS)检测细胞移植或神经营养因子治疗后的内源性神经再生情况<sup>[54]</sup>;以超顺磁性氧化铁(SPIO)标记细胞,MRI 跟踪监测经静脉移植的细胞在脑或其他器官的生长和迁移情况<sup>[55-57]</sup>,获得移植细胞的定位和迁移信息;利用 PET 评价细胞移植区的代谢活动,但需注意,不能描述移植细胞的确切位置和迁移情况。对细胞移植的最终疗效评价应综合 PET、缺血-再灌注成像(监测血管新生能力)、fMRI 及 DTI 等多项检查的测量结果。另外,经 MRI 检查发现,发病 1 周后的急性期或亚急性期患者病情并不稳定,但缺血性卒中恢复期(脑卒中后 3~6 个月)患者的病情却可以较为稳定地维持于基线水平。这一

特点有利于筛选参加临床试验的患者,在临床卒中中康复性试验中具有优势。

## 五、细胞移植研究设计的注意事项

1. 临床前研究 临床前研究需考虑的因素包括物种类型、脑卒中模型类型、监测指标与治疗方案、细胞追踪的显像,以及宿主细胞反应等,避免卒中中动物模型与人类脑卒中差异对临床试验的干扰。评价神经功能恢复的首选物种是大鼠,但在临床前研究中应纳入多个品系不同年龄、不同性别的啮齿类动物,经过多次实验的验证,并能于第 2 个物种中获得证实(例如:小鼠)。大型灵长类动物虽然是理想的脑卒中模型动物,但由于物种稀缺及安全性问题,不适宜用于评价细胞移植治疗。用于研究细胞移植治疗的缺血性卒中模型主要为局灶性脑缺血模型,如大脑皮质缺血及皮质和(或)基底节缺血,可通过不同类型的手术方法制备缺血性卒中模型。但无论应用何种手术方法,造成脑卒中的结果更为重要,每一种手术导致的脑卒中病理生理学表现应尽可能模仿人类疾病状态。尽管目前所收集的细胞移植治疗试验结果均与缺血性卒中高度相关,但仅可用作出血性卒中临床前研究的指导。为了评价缺血性卒中治疗后神经功能的恢复情况,应进行行为学测验,而且所选择的行为学测验项目应与缺血模型相一致。一套严谨的行为学测验项目应包括对运动能力、躯体感觉及认知功能的检测,若学习和记忆能力受损还需进行相应项目的评价。与动物模型病理生理学表现需接近人类疾病一样,相关行为学测验项目亦应尽量模拟人类疾病,康复治疗过程对动物行为学的观察还应持续至少 1 个月。另外,实验设计内容中应包括:(1)确定所需细胞数目,不仅包括最佳干细胞治疗数目,同时还应考虑最大细胞耐受数目。(2)移植途径,如脑内立体定向输注或全身注射等,用以调整所选择的细胞疗法并制定其临床应用方案。(3)还需检测重复给药方案的可行性,以达到最佳预后效果。卒中治疗时间窗是决定移植细胞剂量的重要因素,而且因细胞来源不同而选择不同的治疗方案。尽管每种类型细胞均有其独特性,但在实验过程中都需要相应的细胞表面标志物,而且所有实验室均可重复该实验。细胞移植后还应观察这些移植细胞在脑和其他器官的分布及行为学表现(生存、迁移、分化),以确定细胞发挥作用的机制和细胞移植治疗的安全性。除了上述实验控制因素,选择并制定适

宜的对照组对评价细胞移植治疗亦十分有意义。

2. 从动物实验向临床试验转化 从脑缺血动物模型过渡到细胞移植治疗临床试验需考虑许多因素。除了细胞种类、脑卒中类型、评价方法、治疗方案等因素,还应注意动物与人类的物种差异、如何在宿主体内跟踪移植细胞、减少移植后的致瘤性风险等。唯有全面而综合考虑各种影响因素,方能制定出最佳临床试验方案并取得理想疗效。(1)最佳移植时机:目前尚无确实的证据显示缺血性卒中后进行细胞移植的适宜时间。脑卒中急性期,缺血半暗带区释放兴奋性毒性神经递质、活性氧、促炎性反应介质等,可影响新生组织的形成;发病后数周,缺血半暗带区内的细胞即发生凋亡,炎症反应激活小胶质细胞,抑制内源性神经再生,从而阻碍移植细胞的生长和存活<sup>[58]</sup>。另一方面,在疾病的急性期局部组织修复尚处于激活状态,包括细胞自身固有的神经营养因子的释放,以及宿主在移植早期为适应移植细胞生长、存活、分化和整合而释放的各种神经营养因子等;同时,缺血环境亦可促进脑室周围和皮质神经元的再生<sup>[59]</sup>。如果于脑卒中后数周方进行细胞移植,可能会由于瘢痕组织形成而阻碍移植细胞发挥作用。但是,有许多神经病学专家倾向于延迟施行移植治疗,认为待患者病情稳定后再行治疗疗效可能更佳。业已完成的两项慢性缺血性卒中临床试验所纳入的研究对象均为脑卒中后至少 6 个月的患者<sup>[32-34]</sup>。但是,目前尚无相适应的慢性缺血性卒中动物模型,因为动物发病后 6 个月已经完全康复,因此动物实验与临床试验存在较大差距,不能完全参照实行。细胞移植治疗和其他康复治疗的优势之一,是存在潜在的较长治疗时间窗。神经保护性治疗可能需要早期进行,但基于细胞的治疗则可延迟至损伤后数天、数周甚至数月,这在临床上是十分有意义的。细胞移植的最佳时机依赖于细胞类型及其作用机制,如果细胞移植侧重于神经保护作用则应在发病超早期进行;如果移植细胞能够促进内源性修复机制(如可塑性、血管新生及神经再生等),或该细胞在脑内存活和整合的必要条件是内源性修复,则必须早期通过不同移植途径输送至脑组织,因为内源性修复机制在发病后 2~3 周最为活跃<sup>[40,60]</sup>;若要提高移植细胞的存活率,则以脑卒中后期待炎症反应消退后为最佳时机。由于星形胶质细胞在神经干细胞的再生过程中发挥重要作用<sup>[61-63]</sup>,明确缺血对骨形态发生蛋白

(BMP)抑制剂(Wnt、Noggin)等星形胶质细胞源性因子表达水平的影响机制,将有助于推进成年人内源性神经再生的研究。对移植时机的系统性研究及移植时机对神经功能恢复的影响,目前仍不甚清楚。许多研究结果显示,卒中-移植时间窗很宽,缺血后 3 d 进行细胞移植治疗可促进肢体功能的恢复。但是,也有文献报道,脑卒中后 1 个月再行细胞移植治疗同样能促进肢体功能的康复<sup>[63-65]</sup>。鉴于此,目前尚无临床最佳移植治疗时间窗的研究结果。目前存在多种介入治疗时间窗,若经血管途径移植细胞(细胞由导管直接移植入大脑中动脉或经静脉移植)则应于缺血性损伤发生早期,最好于发病后 24 h 内完成细胞移植治疗获益最大;经静脉途径移植细胞,则需对损伤组织进行定位,并准确地将细胞带入靶组织。发生缺血性卒中后,损伤脑区将表达基质细胞衍生因子-1(SDF-1)等特异性干细胞归巢,使移植细胞能够表达趋化因子受体(CXCR)4 和 7(可与骨髓基质细胞衍生因子-1 相结合),并分泌至受损脑组织<sup>[66-68]</sup>。对啮齿类动物的观察显示,发生缺血性损伤后骨髓基质细胞衍生因子-1 可持续表达 30 d,但在人脑中的表达则不甚清楚。如果直接经颅移植细胞,治疗时间窗则可以延迟,需待移植细胞分化为神经元系或星形胶质细胞系后再行细胞移植治疗。经颅细胞移植治疗可将外源性细胞直接移植至损伤部位且不诱发炎症反应,较其他移植途径相对有效;但是,移植后期当坏死组织形成空洞时需采用含神经干细胞的生物降解支架以巩固治疗效果<sup>[69]</sup>。(2)移植途径:细胞移植途径包括经颅、经脑室、经静脉。虽然经这 3 种途径移植细胞均可到达指定位置,但经观察发现:以经颅途径到达靶部位的细胞浓度最高,经脑室其次,经静脉效果最差<sup>[70]</sup>。经颅向缺血侧大脑半球输送细胞,较对侧脑组织更多地聚集于缺血侧,使损伤部位的移植细胞高度聚集。如此便带来一系列问题<sup>[7]</sup>:经静脉途径虽具有创伤小的优势,但也存在负面问题,例如经静脉移植细胞后细胞在其他器官中的数目有可能高于靶部位<sup>[71]</sup>,导致异位组织增生或血栓形成等不良后果。移植途径对神经功能的恢复亦具有一定影响,经颅移植 MHP36 细胞仅促进感觉运动康复,而经脑室移植则仅影响学习和记忆能力<sup>[70]</sup>。因此,选择细胞移植途径时需综合考虑移植细胞的类型和细胞作用机制。

3. 移植部位的选择 慢性缺血性卒中后,可将

细胞移植至梗死腔,促进移植细胞迁移,但是梗死腔有时不易定位,而且梗死腔内的液体可使移植细胞密度稀释,从而影响治疗效果。更重要的是,移植入梗死腔的细胞难以存活,除非提供细胞支架。于缺血急性期将外源性干细胞注入缺血半暗带区虽然可行,但存在诸多不良反应,例如:释放较多的抑制性和兴奋性神经递质,可能损害移植细胞<sup>[58]</sup>。将胎儿皮质细胞移植于缺血区,可观察到其在缺血半暗带区内存活,但梗死灶中心区却无移植细胞<sup>[58]</sup>;另外,慢性缺血区瘢痕形成也会阻碍移植细胞向缺血半暗带区的迁移。若采用脑立体定向注射,则可利用坐标仪对缺血区进行精确定位,移植细胞可通过分泌神经营养因子在梗死灶周围区域发挥最佳效应,或替代原有的无效细胞发挥特定的神经功能。经颈内静脉途径移植细胞为创伤最小的移植方法<sup>[3,70]</sup>,动物研究支持经颈内静脉途径高选择性地将外源性干细胞移植至梗死区,有些细胞类型如脐带血干细胞经静脉注射比直接经颅注射更能获益。为了使静脉给药途径发挥更大的治疗作用,移植细胞在到达损伤区域时可能需要归巢信号,它可通过趋化因子介导而将移植细胞引导至缺血区。但是经静脉途径亦存在一些潜在的危害性:(1)移植细胞在到达缺血区的同时亦可迁移到其他器官的周围血管。因此,为了排除经静脉途径可能导致移植细胞异常增殖或影响其他器官分泌蛋白质的风险,应在临床前进行多脏器毒性研究。(2)移植细胞可能相互聚集形成血栓。鉴于此,无论哪一种细胞类型均须认真检查灌注套管的兼容性、最大细胞密度或限制灌注量等影响因素,如果移植细胞必须经旁路到达病变部位,则很难保证缺血区的细胞聚集。在某些情况下,移植细胞可通过外周途径促进康复甚至不进入大脑。血管内药物灌注通常是由介入科医师操作,比经颅直接植入更适合患者。

4. 移植细胞数目 I 期临床试验所选择的移植细胞数目主要来自临床前研究的统计数据。目前,无论是啮齿类动物实验还是临床试验,移植细胞数目都是根据脑体积和质量计算所得。但是,啮齿类动物实验所用的细胞数目是否同样适用于临床试验,仍是未知数。啮齿类动物对药源性物质的代谢速度比人类更为迅速,目前对啮齿类动物和人类细胞的更新过程有何区别,尚不十分清楚。经静脉移植细胞可以重复注射,在临床干细胞移植治疗中更为方便,而且“增加剂量(enhanced dose)”可能会加

强临床治疗效果。

5. 缺血性卒中干细胞移植治疗的适应证 并非所有类型的缺血性卒中都适宜进行细胞移植治疗。大多数临床前期研究都是关于纹状体和皮质梗死的细胞移植,涉及白质病变的研究困难重重。皮质内移植干细胞有时并不能修复潜在的轴突损伤,对于单纯表现为白质梗死的患者需慎重考虑是否适用细胞移植治疗,可能更需要一项完全不同于细胞移植的治疗策略。缺血性卒中患者的梗死范围主要与动脉供血有关,因此对治疗方式的选择尤为重要,对于广泛缺血患者,用于促进功能恢复的移植细胞数目亦需相应增加。

6. 手术安全性 细胞移植治疗的安全性问题主要与移植途径和细胞类型有关。经静脉途径移植干细胞时,由于细胞可能阻塞肺静脉,故需尽量减少急性期灌注毒性反应;而经动脉移植干细胞则有可能造成脑血管阻塞,从而诱发癫痫发作等并发症,因此手术过程务必慎重。为了降低手术后急性期灌注毒性反应,需每天监测患者肝、肾功能,24 h 监测动脉血氧饱和度和其他肺功能参数。无论干细胞来源于自体还是异体,无论所选择的移植方法和细胞种类如何,均需行免疫反应检查,监测整合入受体的细胞耐受性。长期以来,干细胞移植治疗的主要风险是移植细胞过度增殖形成肿瘤。其中,细胞类型的选择与肿瘤形成关系最为密切,经颅途径仅有形成脑肿瘤的危险,但是经静脉途径则可将移植细胞带到全身各个器官或组织,有可能造成多脏器肿瘤,因此需要增加监测项目。对施行细胞移植治疗的患者进行适当的肿瘤评价和筛选检查,十分必要,对有恶性疾病既往史的患者更需谨慎。过去 5 年曾罹患恶性疾病的患者一般为细胞移植治疗的禁忌证。由于对恶性肿瘤进行全面筛查不切实际,但在接受干细胞移植治疗前至少应行胸部 X 线检查。为了监控脑肿瘤的进展情况,试验设计还应包括:定期进行头部 MRI 和(或)PET 或 CT 随访。缺血性卒中干细胞移植治疗的早期临床试验均对已登记的患者进行长期随访,有效地获得其病理和尸体解剖资料,对干细胞移植治疗具有重要指导作用,同时亦可监测移植后的肿瘤形成。

## 六、结论

神经干细胞的发现对人类健康具有重要意义,随着对神经干细胞的深入了解,必将解开大脑修复机制之迷。骨髓间充质干细胞因其独特的优势,正

在越来越多地应用于动物实验和临床研究;人脐带血干细胞易于获得、免疫排斥反应少,亦具有广阔的应用前景。目前,研究干细胞移植治疗的重点是如何选择最佳移植时机、所需有效细胞数目、移植途径<sup>[65]</sup>,以及如何确定细胞移植后的长期安全性等。虽然目前干细胞移植治疗技术尚不十分成熟,需通过更多的临床前期试验和临床试验加以验证和修正,但相信随着对干细胞特性、分化、移植、作用机制等研究的日益深入,干细胞在缺血性卒中的治疗中将占有越来越重要的地位。

#### 参 考 文 献

- [1] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ, et al. Current concepts in adult stem cell therapy for stroke. *Curr Med Chem*, 2006, 13:3565-3574.
- [2] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992, 255:1707-1710.
- [3] Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders: how to make it work. *Nat Med*, 2004, 10 Suppl:42-50.
- [4] Chu K, Kim M, Park KI, et al. Human neural stem cells improve sensorimotor deficits in the adult rat brain with experimental focal ischemia. *Brain Res*, 2004, 1016:145-153.
- [5] Chu K, Kim M, Jeong SW, et al. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*, 2003, 343:129-133.
- [6] Pollock K, Stroemer P, Patel S, et al. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol*, 2006, 199:143-155.
- [7] Modo M, Stroemer RP, Tang E, et al. Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke*, 2002, 33:2270-2278.
- [8] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*, 2000, 61:364-370.
- [9] Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, et al. Marrow Stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells*, 2006, 24:2483-2492.
- [10] Jin K, Mao X, Xie L, et al. Transplantation of human neural precursor cells in Matrigel scaffolding improves outcome from focal cerebral ischemia after delayed postischemic treatment in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30:534-544.
- [11] Zhang RL, Chopp M, Gregg SR, et al. Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29:1240-1250.
- [12] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, 2000, 164:247-256.
- [13] Sanchez - Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res*, 2002, 69:880-893.
- [14] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2001, 32:1005-1011.
- [15] Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, et al. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *J Neurosci Res*, 2004, 78:215-223.
- [16] Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, et al. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther*, 2005, 11:96-104.
- [17] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*, 2001, 32:2682-2688.
- [18] Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol*, 2001, 171:109-115.
- [19] Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*, 2003, 121:368-374.
- [20] Taupin P. HuCNS-SC (StemCells). *Curr Opin Mol Ther*, 2006, 8: 156-163.
- [21] Nystedt J, Mäkinen S, Laine J, et al. Human cord blood CD34+ cells and behavioral recovery following focal cerebral ischemia in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2006, 66:293-300.
- [22] Copeland N, Harris D, Gaballa MA. Human umbilical cord blood stem cells, myocardial infarction and stroke. *Clin Med*, 2009, 9:342-345.
- [23] Willing AE, Lixian J, Milliken M, et al. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res*, 2003, 73:296-307.
- [24] Brevig T, Holgersson J, Widner H. Xenotransplantation for CNS repair: immunological barriers and strategies to overcome them. *Trends Neurosci*, 2000, 23:337-344.
- [25] Edge AS, Gosse ME, Dinsmore J. Xenogeneic cell therapy: current progress and future development in porcine cell transplantation. *Cell Transplant*, 1998, 7:525-539.
- [26] Magnuson DS, Morassutti DJ, Staines WA, et al. In vivo electrophysiological maturation of neurons derived from a multipotent precursor (embryonal carcinoma) cell line. *Brain Res Dev Brain Res*, 1995, 84:131-141.
- [27] Veizovic T, Beech JS, Stroemer RP, et al. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke*, 2001, 32:1012-1019.
- [28] Pleasure SJ, Lee VM. NTera2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neural progenitor cell. *J Neurosci Res*, 1993, 35:585-602.
- [29] Guillemain I, Alonso G, Patey G, et al. Human NT2 neurons express a large variety of neurotransmission phenotypes in vitro. *J Comp Neurol*, 2000, 422:385-395.
- [30] Hartley RS, Margulis M, Fishman PS, et al. Functional synapses are formed between human NTera2 (NT2N, hNT) neurons grown on astrocytes. *J Comp Neurol*, 1999, 407:1-10.
- [31] Bang OY, Lee JS, Lee PH, et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol*, 2005, 57: 874-882.
- [32] Lee JS, Hong JM, Moon GJ, et al. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells*, 2010, 28:1099-1106.
- [33] Suárez-Monteagudo C, Hernández-Ramírez P, Alvarez-González L, et al. Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients: an open study. *Restor Neurol Neurosci*, 2009, 27:151-161.

- [34] Savitz SI, Dinsmore J, Wu J, et al. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc Dis*, 2005, 20:101-107.
- [35] Kondziolka D, Wechsler L, Achim C. Neural transplantation for stroke. *J Clin Neuroscience*, 2002, 9:225-230.
- [36] Meltzer CC, Kondziolka D, Villemagne VL, et al. Serial [18F] flourodeoxyglucose positron emission tomography after human neuronal implantation for stroke. *Neurosurgery*, 2001, 49:586-592.
- [37] Kondziolka D, Wechsler L, Tyler-Kabara E, et al. The role of cell therapy for stroke. *Neurosurg Focus*, 2002, 13:E1.
- [38] Johnston RE, Dillon-Carter O, Freed WJ, et al. Trophic factor secreting kidney cell lines: in vitro characterization and functional effects following transplantation in ischemic rats. *Brain Res*, 2001, 900:268-276.
- [39] Lladó J, Haeggeli C, Maragakis NJ, et al. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27:322-331.
- [40] Carmichael ST. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol*, 2006, 59:735-742.
- [41] Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke*, 1995, 26:2135-2144.
- [42] Xiao J, Nan Z, Motooka Y, et al. Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. *Stem Cells Dev*, 2005, 14:722-733.
- [43] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res*, 2002, 90:284-288.
- [44] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience*, 2006, 137:393-399.
- [45] Jiang Q, Zhang ZG, Ding GL, et al. Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI. *Neuroimage*, 2005, 28:698-707.
- [46] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*, 2004, 114:330-338.
- [47] Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, et al. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. *Nature*, 2005, 436:266-271.
- [48] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*, 2002, 8:963-970.
- [49] Chen J, Li Y, Katakowski M, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res*, 2003, 73:778-786.
- [50] Cramer SC, Koroshetz WJ, Finklestein SP. The case for modality-specific outcome measures in clinical trials of stroke recovery-promoting agents. *Stroke*, 2007, 38:1393-1395.
- [51] Stinear CM, Barber PA, Smale PR, et al. Functional potential in chronic stroke patients depends on corticospinal tract integrity. *Brain*, 2007, 130(Pt 1):170-180.
- [52] Lindberg PG, Skejō PH, Rounis E, et al. Wallerian degeneration of the corticofugal tracts in chronic stroke: a pilot study relating diffusion tensor imaging, transcranial magnetic stimulation, and hand function. *Neurorehabil Neural Repair*, 2007, 21:551-560.
- [53] Cramer SC, Parrish TB, Levy RM, et al. Predicting functional gains in a stroke trial. *Stroke*, 2007, 38:2108-2114.
- [54] Manganas LN, Zhang X, Li Y, et al. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science*, 2007, 318:980-985.
- [55] Chemaly ER, Yoneyama R, Frangioni JV, et al. Tracking stem cells in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med*, 2005, 15:297-302.
- [56] Neri M, Maderna C, Cavazzin C, et al. Efficient in vitro labeling of human neural precursor cells with superparamagnetic iron oxide particles: relevance for in vivo cell tracking. *Stem Cells*, 2008, 26:505-516.
- [57] Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, et al. Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann Neurol*, 2003, 53:259-263.
- [58] Nishino H, Borlongan CV. Restoration of function by neural transplantation in the ischemic brain. *Prog Brain Res*, 2000, 127:461-476.
- [59] Abe K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20:1393-1408.
- [60] Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, et al. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23:166-180.
- [61] Jagasia R, Song H, Gage FH, et al. New regulators in adult neurogenesis and their potential role for repair. *Trends Mol Med*, 2006, 12:400-405.
- [62] Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 2005, 437:1370-1375.
- [63] Ma DK, Ming GL, Song H. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 2005, 15:514-520.
- [64] Borlongan CV, Tajima Y, Trojanowski JQ, et al. Cerebral ischemia and CNS transplantation: differential effects of grafted fetal rat striatal cells and human neurons derived from a clonal cell line. *Neuroreport*, 1998, 9:3703-3709.
- [65] Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR. Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats: a quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neuroscience*, 1999, 91:519-525.
- [66] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27:6-13.
- [67] Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, et al. SDF-1 (CXCL 12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63:84-96.
- [68] Imitola J, Raddassi K, Park KI, et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ /CXCL chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:18117-18122.
- [69] Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol*, 2002, 20:1111-1117.
- [70] Jin K, Sun Y, Xie L, et al. Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiol Dis*, 2005, 18:366-374.
- [71] Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, et al. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke*, 2004, 35:2385-2389.