

DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2024.06.006

· 干细胞研究 ·

# 间充质干细胞治疗缺血性脑卒中的临床前研究进展

张君, 姜夕锋, 张帆, 田书娟, 李全海, 闫宝勇

**【摘要】** 缺血性脑卒中是一种临床发病率较高的脑血管疾病, 是世界上导致死亡和永久性残疾的主要原因之一。目前其急性期溶栓治疗及神经保护措施常受到狭窄治疗时间窗的限制, 加之出血并发症, 使大多数患者错失最佳溶栓治疗时机, 预后较差, 缺乏理想治疗手段。间充质干细胞移植疗法是一种治疗缺血性脑卒中的新模式, 由于其具有来源丰富、多向分化潜能、免疫原性低、旁分泌作用等优点而备受关注。已在动物实验中证实, 间充质干细胞移植可以缓解神经系统缺陷, 发挥神经损伤修复再生的作用, 且安全可行, 为缺血性脑卒中的治疗带来希望。然而, 间充质干细胞移植的时间和最佳剂量是其临床应用的主要挑战。本文对间充质干细胞的生物学活性, 间充质干细胞移植治疗缺血性脑卒中动物模型的给药途径、时间窗、剂量、有效性、分子机制及安全性等临床前研究进行综述, 并讨论了间充质干细胞移植治疗在临床前研究的局限性, 以期为间充质干细胞移植的临床转化研究提供理论依据。

**【关键词】** 间充质干细胞; 脑梗死; 干细胞移植; 临床前研究; 再生医学

**【Abstract】** Ischemic stroke is a cerebrovascular disease with high clinical incidence rate, making it one of the main causes of death and permanent disability worldwide. Currently, acute phase thrombolytic therapy and neuroprotective measures are often limited by narrow treatment time windows and bleeding complications, leading to many patients missing the optimal opportunity for thrombolytic therapy and resulting in poor prognosis and a lack of ideal treatment methods. Mesenchymal stem cell transplantation therapy is a new approach for treating ischemic stroke that has garnered significant attention due to its advantages, such as abundant sources, multi-directional differentiation potential, low immunogenicity, and paracrine effects. Animal experiments have confirmed that mesenchymal stem cell transplantation can alleviate neurological defects, promote nerve damage repair and regeneration, and is safe and feasible, offering hope for the treatment of ischemic stroke. However, determining the optimal timing and dosage of mesenchymal stem cell transplantation remains a major challenge for its clinical application. This article provides a review of preclinical studies on the biological activity of mesenchymal stem cells, as well as the administration routes, time windows, doses, efficacy, molecular mechanisms, and safety of mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of ischemic stroke in animal models. In addition, the limitations of preclinical studies on mesenchymal stem cell transplantation therapy are discussed with the aim of providing a theoretical basis for the clinical translational research of mesenchymal stem cell transplantation.

**【Key words】** mesenchymal stem cell; ischemic stroke; stem cell transplantation; preclinical study; regenerative medicine

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS), 又称脑梗死、缺血性脑中风, 是指因脑部血液循环障碍、缺血、缺氧所致的局限性脑组织缺血性坏死或者软化, 在脑部引起血栓和栓塞。IS 占脑卒中患者的 85%, 是脑血管病中最常见的一种类型<sup>[1]</sup>。2020 年美国心脏协会关于脑卒中统计的报告估计: 2016 年美国脑卒中的患病率为 2.5%, 相当于 700 万美国人发生脑卒中, 约 15 万人因此死亡。根据世界卫生组织的数据, 缺血性卒中是最普遍的卒中亚类, 影响着全球近 1500 万人。脑卒中的发病率随着年龄的增长而增加, 在 55 岁后翻倍, 且发展中国家的患病率最高。IS 是各原因引发的局部脑组织血液循环障碍缺血、缺氧, 首先会出现可逆的组织

功能丧失, 但随缺血时间的延长, 将会出现伴随神经元和支持结构丧失的梗死灶。可用的药物治疗方案对卒中患者的身体恢复有限或无效, 手术干预只能帮助将血栓形成的风险降至最低<sup>[2]</sup>。因此, 需要一种有效的治疗策略来预防急性卒中

**基金项目:** 河北省重点研发计划生物医药创新专项 (21372409D)

**作者单位:** 050000 石家庄, 河北医科大学第一医院干细胞再生医学临床研究中心 (张君、张帆), 神经内科 (田书娟); 050090 石家庄, 河北贝特赛奥生物科技有限公司 (姜夕锋); 050017 石家庄, 河北医科大学医学与健康研究院 (李全海), 第一临床医学院 (闫宝勇)

**通信作者:** 闫宝勇, Email: yby7001@hebmh.edu.cn

**收稿日期:** 2024-03-08

的发作，并控制与神经缺血相关的慢性症状。

间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 由于其易获得、高效分离和培养、高免疫耐受性和较少并发症等特点，近十年在治疗 IS 中取得了令人鼓舞的结果。已证明 MSCs 具有细胞迁移、血管生成、免疫调节、神经保护和神经回路重建的治疗功效。MSCs 的旁分泌作用也可以发挥神经营养作用，促进功能恢复。临床前试验的初步研究数据也表明了基于 MSCs 治疗的有效性、耐受性和安全性<sup>[3]</sup>。然而，MSCs 的有效剂量和适当的递送时间是干细胞治疗临床转化的主要挑战。因此，精心设计的未来研究计划是随机临床应用试验评估其功能性临床结果的先决条件。

## 1 间充质干细胞的生物学特征

1970 年, Friedenstein 及其同事<sup>[4]</sup>首次鉴定出一种具有自我复制和多向分化功能的细胞; 并于 1991 年由 Caplan 命名为 MSCs<sup>[5]</sup>。随后, MSCs 在文献中有许多不同的名称, 包括间充质基质细胞、多能基质细胞、骨髓基质细胞、中胚层干细胞, 甚至药物信号细胞<sup>[6]</sup>。

### 1.1 MSCs 的种类

据报道, MSCs 可以从多种组织中分离出来, 如肺、肝、肾、胎盘、输卵管、子宫内膜息肉、脂肪组织、牙髓、唾液腺、下鼻甲、脐带血、经血等组织。不同来源的 MSCs 的表面标记物、质量和分离数量有差异。在缺血性卒中的动物模型以及神经退行性疾病模型中进行的测试<sup>[7-8]</sup>表明, 移植 MSCs 治疗 IS 的临床试验中最常使用的 MSCs 来源于骨髓、脂肪组织和脐带。

### 1.2 MSCs 的表面标记物及生物学特性

MSCs 具有高增殖能力、多谱系分化潜力、体外易于操作、免疫调节和不形成畸胎瘤等生物学特性, 使其成为再生医学和细胞分化体外或体内研究的较为合适候选者。为了准确定义人来源的 MSCs, 国际细胞治疗学会 (International Society for Cellular Therapy, ISCT) 提出了其最基本的判定标准。首先, 人来源 MSCs 应在标准培养条件下贴壁生长;

其次, 人来源 MSCs 必须表达 CD73、CD90 和 CD105 细胞表面标志物, 但不能表达或低表达造血标志物 CD14、CD34、CD45、CD11b、CD79 $\alpha$  或组织相容性复合体分子 HLA-DR; 最后, 人来源 MSCs 应在体外诱导成软骨细胞、成骨细胞和脂肪细胞<sup>[8]</sup>。

MSCs 具有多向分化潜能和自我更新能力, 它们可以在适当的条件下分化为多种细胞、组织和器官。此外, MSCs 还显示出低免疫原性、归巢效应和免疫调节等生物学特性。近年来, 大量研究表明, MSCs 在治疗神经系统疾病方面取得了新的突破。MSCs 的免疫调节机制主要由细胞与免疫细胞的直接接触和旁分泌活性介导<sup>[9]</sup>, 当免疫反应过度激活或激活不足时, 可以维持免疫稳态。MSCs 还分泌细胞因子、趋化因子、信号分子和生长因子等, 从而通过旁分泌作用有效地调节免疫和炎症反应。MSCs 的免疫调节作用也可以通过细胞与微环境因子和免疫细胞的直接接触来实现。

## 2 移植 MSCs 治疗 IS 动物模型的给药途径、时间窗和剂量

MSCs 有几种递送方法, 包括脑内注射 (intracerebral injection, IC)、脑室内注射 (intracisternal/ cerebroventricular injection, ICV)、鼻内递送 (intranasal delivery, IN) 和血管内递送途径, 如静脉注射 (intravenous injection, IV) 或动脉内输注 (intra-arterial infusion, IA)。IV 和 IC 是动物和临床研究中使用的最广泛的给药途径。尽管静脉注射是一种操作简单, 而且对大面积梗死比 IC 更好, 但很少有细胞能真正到达靶区。另一方面, IC 可以将药物直接输送到损伤部位, 但注射一定量的液体可能会导致颅内高压升高, 针头可能直接导致神经损伤和功能损伤<sup>[10]</sup>。IN 是近些年新兴的一种给药方式, 具有无损伤、易操作等优势<sup>[11]</sup>。越来越多的临床前研究表明, MSCs 疗法是治疗 IS 脑损伤和减少其长期影响最具希望的候选药物。表 1 总结了最近移植 MSCs 治疗 IS 动物模型的一些临床前研究。

表 1 移植 MSCs 治疗 IS 动物模型的临床前研究

动物模型	MSCs 来源	回输时间窗	回输途径	回输剂量	回输次数	回输体积	疗效	参考文献
MCAO 大鼠模型	人胎盘	MCAO 后第 3 天和第 7 天	尾静脉	$1 \times 10^6$ 个/次	2	200 $\mu$ l PBS	MSCs 通过抑制缺血诱导的小胶质细胞活化从而增强 IS 后的修复	[12]
	人颅骨	MCAO 后第 3 小时和 24 小时	尾静脉	$1 \times 10^6$ 个/次	2	300 $\mu$ l PBS	MSCs 在 IS 早期可以通过神经营养因子的强表达发挥神经保护作用, 从而改善其功能恢复	[13]
	人骨髓	MCAO 后第 1 天	立体定向脑内注射 (右侧纹状体)	$4 \times 10^5$ 个	1	5 $\mu$ l DMEM	通过上调 BDNF 和 VEGF 促进脑缺血后的内源性神经发生和血管生成	[14]
	人脐带	MCAO 后 1 周	①脑内注射 ②尾静脉	$1 \times 10^6$ 个	1	①8 $\mu$ l 生理盐水 (脑内) ②500 $\mu$ l 生理盐水 (静脉)	在 IS 亚急性期, 在改善模型行为缺陷、减少梗死面积和神经胶质瘢痕的形成方面, 脑内移植优于静脉移植	[15]

续表 1

动物模型	MSCs 来源	回输时间窗	回输途径	回输剂量	回输次数	回输体积	疗效	参考文献
	人脐带	MCAO 后第 1、4 天	尾静脉	$1 \times 10^6$ 个	2	0.5 ml PBS	过表达 CCL2 的人脐带 MSCs 通过促进大脑中 CCL2 水平的持续升高、增强血管生成和神经发生以及减少神经炎症, 有效地恢复了 IS 模型的功能缺陷	[16]
	人胚胎间充质干细胞的条 件培养基	MCAO 后 1 h 或 MCAO 后 1、24 和 48 h	脑内注射(侧 脑室)	5 $\mu$ l 条件培 养基	1 或 3	5 $\mu$ l 条件培 养基	MSCs 通过旁分泌作用改善 IS 后脑内神 经发生和血管生成, 从而加速脑缺血损 伤的恢复	[17]
	大鼠骨髓	缺血/再灌注 后 1 h	脑内注射(右 侧胼胝体)	$1 \times 10^6$ 个	1	10 $\mu$ l 生理盐水	MSCs 向脑内脉络丛迁移, 并相互作用产 生的分泌因子促进 IS 后大脑功能恢复	[18]
	hiPSCs 大鼠 骨髓	MCAO 后	尾静脉	$1 \times 10^6$ 个	1	1 ml PBS	诱导多能干细胞衍生的间充质干细胞和骨 髓间充质干细胞的移植抑制了小胶质细 胞的激活和促炎细胞因子的表达, 并抑 制了缺血边界区大脑皮层的氧化应激和 神经元细胞死亡。两种 MSCs 效果无 差异	[19]
	大鼠骨髓	MCAO 后 7 d	左股静脉	$1 \times 10^6$ 个	1	1 ml DMEM	静脉输注 MSCs 可能通过增加局部脑血 流和恢复微血管来提高脑缺血再灌注治 疗的疗效	[20]
	自体大鼠骨髓	MCAO 后 4 周	立体定向脑内 注射(梗死 区周围)	$1 \times 10^6$ 个 $2.5 \times 10^6$ 个 $5 \times 10^6$ 个	1	15 $\mu$ l 生理盐 水/脑	自体 MSCs 脑内移植改善慢性 IS 大鼠 模型的功能恢复	[21]
	大鼠骨髓	MCAO 后	立体定向脑内 注射(内 囊)	$4 \times 10^5$ 个	1	4 $\mu$ l 生理盐水	MSC-神经营养因子改善 IS 梗死区的局 部微环境和其他存活细胞的功能, 从而 提高 IS 病变的分子、细胞和神经电生 理和功能评分等各项指标	[22]
	大鼠骨髓	MCAO 后 3 h	眼眶后窦静脉 注射	$5 \times 10^6$ 个/kg	1	未提及	在梗死面积减小和小胶质细胞活化的抑制 方面, 干扰素- $\gamma$ 活化的 MSC 比单纯 MSC 效果更显著	[23]
	大鼠骨髓	MCAO 后 6 h	颈内动脉	$1 \times 10^5$ 个	1	0.5 ml PBS	MSCs 通过蛋白激酶 C $\delta$ 介导的 AQP4 调节, 可通过减轻 IS 后血脑屏障损伤 和局灶性血管源性水肿来提供神经保护	[24]
MCAO 小鼠模型	人脐带	MCAO 后 4 h	尾静脉	$5 \times 10^5$ 个	1	未提及	过表达血红素加氧酶-1 的人脐带 MSCs 减少神经元损伤, 促进小胶质细胞向 M2 型的极化, 对 IS 后小鼠运动功能 显著改善	[25]
	人骨髓	MCAO 后 2 h	内眼角眶静脉 移植	$2 \times 10^6$ 个	1	100 $\mu$ l PBS	通过释放含皮敌菌素的融合酶体来促进肺 巨噬细胞的细菌吞噬作用, 预防 IS 后 肺炎	[26]
	人羊膜	MCAO 后 24 h	颈动脉注射	$4 \times 10^6$ 个/kg $2 \times 10^6$ 个/kg	1	100 $\mu$ l PBS 50 $\mu$ l PBS	人羊膜间充质干细胞通过抑制促炎细胞因 子和小胶质细胞 M2 型向 M1 型转 变来减少血脑屏障的破坏和梗死周围区 域的细胞凋亡, 从而改善模型神经功能 损伤	[27]
	小鼠骨髓	MCAO 后 3 h	患侧侧脑室内 注射或鼻内 给药	MSC-sEV 1 $\mu$ g/5 $\mu$ g	1	1 $\mu$ l PBS	MSC 衍生的外泌体通过对小胶质细胞的 调节显著减少 IS 后 72 h 的损伤体 积; 证明了鼻内给药 MSC 衍生的外 泌体治疗策略的可行性	[11]

注: MCAO: 大脑中动脉闭塞; BDNF: 脑源神经营养因子; VEGF: 血管内皮生长因子; CCL2: C-C 基序趋化因子配体-2。

### 3 移植 MSCs 治疗 IS 动物模型的有效性及其分子机制

Sharp<sup>[28]</sup>首先报道了胎儿新皮质移植在缺血成年大鼠皮层中的存活，干细胞治疗卒中的研究取得了相当大的进展。最初用作缺失或受损细胞的替代疗法，目前公认的是，MSCs 可以分泌多种治疗物质通过免疫调节作用干扰许多致病级联反应，并促进移植细胞的存活、迁移、分化和功能整合到脑回路中<sup>[29]</sup>。

#### 3.1 MSCs 在 IS 动物模型不同分期的治疗作用

IS 分为三个阶段，即急性期、亚急性期和慢性期。研究表明，一系列分子事件在 IS 发作后立即启动，如氧化应激、细胞内钙水平升高、兴奋性毒性和炎症，导致神经元细胞凋亡或坏死<sup>[30]</sup>。

小胶质细胞占人脑胶质细胞总数的 15%，是脑缺血损伤后炎症的主要原因。活化的小胶质细胞有助于炎症级联反应，并在初始缺血区域之外进一步传播细胞死亡信号。在大鼠 IS 模型的急性期，MSCs 抑制神经元凋亡，通过保护线粒体功能、抑制神经元凋亡和焦亡以及减少梗死周围区域的小胶质细胞活化，增加了神经元的可塑性和功能恢复<sup>[31]</sup>。此外，大鼠大脑中动脉闭塞模型的超急性期（缺血后 24 h 内），抑制小胶质细胞迁移可显著减少大鼠梗死面积、改善其神经系统行为及远期疗效<sup>[32]</sup>。

在亚急性期 IS 啮齿动物模型中，给予脑内注射 GMP 级人脐带间充质干细胞（human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells, hUC-MSCs）可有效改善动物模型的行为缺陷，减少脑内梗死面积和神经胶质瘢痕形成，并促进缺血性脑区血管生成<sup>[15]</sup>。已报道，在 IS 亚急性期小鼠模型给予颈静脉人羊膜间充质干细胞（human amniotic mesenchymal stem cells, hAMSCs）干预后，hAMSCs 通过抑制促炎细胞因子和小胶质细胞 M2 抗炎型向 M1 促炎

型转变，从而降低了梗死周围区域血脑屏障的破坏和细胞凋亡，长期改善模型的神经功能缺损<sup>[27]</sup>。此外在 IS 亚急性期，人脂肪间充质干细胞（human adipose-derived stem cells, hADSCs）通过调节小鼠梗死灶中 CD11b<sup>+</sup>CD163<sup>+</sup> 巨噬细胞介导的急性免疫反应来改善脑梗死后发生的神经行为缺陷<sup>[33]</sup>。

在 IS 慢性期，MCAO 后 14 d 将 hUC-MSCs 移植到模型大鼠的右大脑皮层中，结果在第 56 天发现 hUC-MSCs 存在于大鼠的大脑皮层中，可能通过释放细胞因子、减少炎症并增加血管生成来改善 IS 慢性期动物模型的神经功能<sup>[34]</sup>。还有研究发现，在慢性 IS 大鼠模型中，hUC-MSCs 移植维持了血脑屏障的完整性，减轻了行为缺陷，并促进了神经发生和血管生成<sup>[35]</sup>。在 IS 慢性期，很少有移植的 MSCs 分化为成熟细胞<sup>[36]</sup>，大部分 MSCs 是由它们在暴露于缺血性脑提取物时能够产生的广泛的神经保护因子介导的，如神经生长因子（NGF）、脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor, BDNF）、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）或趋化因子如 CXCL12<sup>[7]</sup>。然而，最近研究认为自体 MSCs 可能比自体 MSCs 受到 IS 动物模型较大的免疫排斥，且自体骨髓 MSCs 取自 IS 慢性期大鼠骨髓，可能较自体 MSCs 更容易分泌一些自身细胞因子和（或）生长因子到病灶环境中。目前 IS 大鼠模型上研究结果表明脑内自体 MSCs 治疗可能会使慢性梗死和长期功能障碍的患者获得额外的康复<sup>[21]</sup>。

这些研究表明，MSCs 治疗大鼠急性、亚急性期和慢性 IS 是可行和有效的。

#### 3.2 移植 MSCs 治疗 IS 动物模型的潜在机制

动物模型研究表明，移植 MSCs 治疗 IS 动物模型的潜在机制主要包括旁分泌、血管生成、免疫调节、神经保护和神经回路重建等，如图 1 所示。

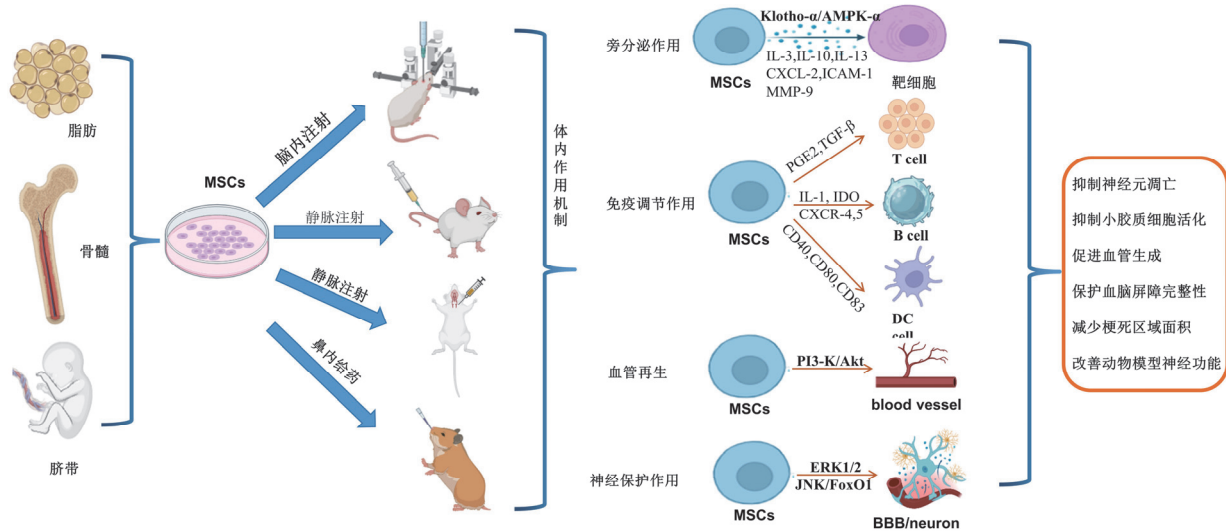


图 1 移植 MSCs 治疗 IS 动物模型的有效性及其潜在机制（MSC 大部分停留在肺和脾脏，到达梗死区域的细胞较少，因此需要大量 MSC 回输，却又容易因细胞积聚而存在肺栓塞或血栓形成的风险<sup>[37]</sup>。与静脉移植相比，动脉内移植有利于 MSC 直接沉积到 IS 梗死病灶区，病变部位 MSC 数量显著多于静脉移植方式，且模型脑中梗死面积减少更显著、功能恢复更好<sup>[38]</sup>）

3.2.1 旁分泌作用 在缺血性脑损伤的情况下, MSCs 分泌细胞因子或外泌体可能是激活神经元存活信号通路的主要原因。MSCs 已被证明可以释放多种生长因子和细胞因子的组合, MCAO 大鼠接受从人羊膜间充质干细胞中获得的条件培养基干预后, 可显著缩小梗死面积, 增加 FoxO1、Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活性, 恢复内源性抗氧化系统, 抑制凋亡细胞死亡<sup>[39]</sup>。脂肪来源的 MSCs 于脑缺血后 2 h 移植到双血管闭塞大鼠模型体内, 可能通过激活 Klotho- $\alpha$ /AMPK- $\alpha$  信号转导抑制 IL-6 和 TNF- $\alpha$  促炎因子分泌, 减少大鼠模型海马的凋亡, 从而改善 IS 产生的神经损伤和记忆缺陷<sup>[40]</sup>。上述研究推测, MSCs 可能通过一个或多个信号通路抑制炎症反应、神经元凋亡等来减少神经损伤, 在临床常规中可被视为最易接受的潜在治疗策略。

3.2.2 血管生成 研究表明, MSCs 有助于 PI3 激酶的上调, 刺激神经元中 PI3K/Akt 和 MAPK 存活信号通路的激活和磷酸化, 在缺血病灶中产生促进血管生成和抗凋亡作用<sup>[41]</sup>。IL-8 具有促血管生成特性。与单独在体内治疗人骨髓源性 MSC (human bone marrow-derived MSC, hBMSCs) 相比, IL-8 处理的 hBMSCs 可增加梗死边界区的血管生成并减少梗死面积<sup>[42]</sup>。此外, 在小鼠 IS 发生 3 h 后经动脉给予 IL-1 $\alpha$  预处理的 MSCs, 移植后 72 h 可减少约 67% 脑梗死面积并增加了 32% 的动脉血流量, 与未处理 MSCs 相比更具有神经保护特性<sup>[43]</sup>。

3.2.3 免疫调节 体外培养的 MSCs 可以释放多种趋化因子, 如: C-C 基序配体 2 (C-C motif chemokine ligand 2, CCL2)、CCL3、CCL4、C-X-C-基序配体 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1)、CXCL2、CXCL5 等, 趋化因子/趋化因子受体轴是 MSCs 迁移和免疫调节功能不可缺少的, 也是促进 MSCs 释放趋化因子的重要因素。在许多细胞类型中, c-Jun 氮末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 的激活通过炎症和凋亡导致细胞死亡, 且研究发现 JNK 通路的激活是局灶性和全身缺血引发神经元凋亡的主要因素。移植 MSCs 干预治疗短暂性 MCAO 大鼠可抑制 JNK 信号通路, 使得梗死区域的神经元凋亡和星形胶质细胞活性降低<sup>[30]</sup>。

MSCs 可分泌多种细胞因子, 例如: 起抗炎作用的 IL-10、IL-13, 起促炎作用的 IL-8、IL-1 $\alpha$ 、IL-12 和多效性细胞因子 IL-6、IL-11、IL-16、IL-1 $\beta$  来调节 IS 后的免疫功能<sup>[16]</sup>。IL-1 引发的 MSCs 的分泌组也能够显著减小小鼠卒中 MCAO 模型中的梗死面积。在体外巨噬细胞中, UCMSCs 通过 PI3K/Akt 信号通路增加脂多糖刺激的 IL-10 和 IL-37 表达水平, 发挥抗炎作用<sup>[44]</sup>。研究发现, 在体内移植过表达 IL-10 的 MSCs (MSCs-IL-10) 可显著增加自噬、线粒体自噬和细胞存活标志物的表达, 同时减少细胞死亡和神经炎症的标志物<sup>[45]</sup>。

3.2.4 神经保护和神经回路重建 最近研究发现, 给予 IS 小鼠移植低表达 p38 MAPK 的 MSCs 后, 与对照组相比 IS 小鼠梗死面积显著减少、神经功能和轴突重塑显著改

善<sup>[46]</sup>。在大鼠脑卒中 3 d 后移植过表达 ERK1/2 修饰的 MSCs, 与 MSCs 移植 IS 大鼠相比显示出更好的功能恢复, 显著增加了脑室内下区 (SVZ) 及附近 MAP2/巢蛋白双标记细胞的增殖, 显著抑制了小胶质细胞的活化, 神经胶质细胞表达 TNF- $\alpha$  水平升高<sup>[47]</sup>。

## 4 MSCs 的体内分布及动力学

MSC 在机体内部的运动和分布既和体液循环、细胞表面特征有关, 还具有一定的生物靶向性质。当机体缺血、缺氧、损伤时, MSC 具有向损伤部位优势分布的特质。MSC 进入体内能够被检测到, 主要通过侵入式和非侵入式两大类检测手段。非侵入式检测应用活体成像技术对于人或动物损伤小, 可以进行动态追踪, 常用的标记物包括荧光、转基因、同位素和磁性离子等<sup>[34, 48]</sup>。而侵入式检测可定量测定体内 MSC 数量, 通过 qPCR 方法检测血液、组织样品中 DNA 含量, 实现对 MSC 的定量分析。研究发现, MSC 进入体内之后, 在最初的时间里, 主要分布在血液和淋巴循环丰富的组织器官中。通过静脉注射 MSC 后 2 h, MSC 先聚集在小鼠的肺部, 然后是肝脏和脾脏, 肾脏也有少量 MSC<sup>[38]</sup>。

由于 MSC 具有归巢、旁分泌的生物学活性, 在疾病状态下分布的改变则更加明显, 且不同给药方式都会影响 MSC 的分布, 进而影响药效。对于 IS 而言, 脑内移植限制了可移植的 MSC 数量, 而全身移植则没有。静脉给药是一种有效且侵入性较小的给药途径, 但是 MSC 在体内存活周期到底是多长, 不同文献中的结论差异较大。有文献报道, 静脉注射后的 MSC 在体内的存活时间不超过 1 d<sup>[49]</sup>。有研究在移植第 42 天, 发现大鼠的大脑皮层中存在 hUMSCs, 并有迁移的迹象<sup>[34]</sup>。另有文献报道, MSC 在体内的生存周期很长, 在免疫缺陷的小鼠上可以长达 17 个月<sup>[50]</sup>。

## 5 MSCs 的安全性评价

在多项临床前研究中, 对 MSCs 进行了安全性评价, 未见明显的毒性反应和致瘤性, 具有良好的耐受性<sup>[51]</sup>。一项以食蟹猴为研究对象进行人 MSCs 的临床前安全性评价, 经静脉注射直径约 450  $\mu$ m MSCs 球体或 MSCs 细胞悬液, 注射后第 21 天或第 60 天为检测点, CT 扫描显示所有组动物的主要器官均无异常, 红细胞数和血红蛋白水平在正常范围内, 白细胞计数未观察到异常<sup>[52]</sup>。

## 6 临床前研究的局限性

虽然应用人源化小鼠模型进行的 MSC 临床前评价已经成为验证干细胞疗法的黄金标准, 也获得监管部门的批准, 但是动物和人类之间的物种差异决定了动物模型评价人源 MSC 的局限性。由于物种的差异, 当移植人源 MSC 进入动物模型体内, 会存在异种移植抗宿主反应、特异性靶点物种差异性识别错误等现象, 这将无法完全模拟出患者移

植 MSC 后, MSC 的迁移、归巢以及与病灶靶细胞之间的相互作用, 这导致其无法充分揭示人体组织中 MSC 的功能和作用。因此, 在选择动物模型时, 需要根据 MSC 特殊生物学活性的具体需求和目的进行综合评估。

## 7 展望

IS 引起的神经损伤一直被认为难以治疗。目前, MSCs 因其具有神经再生的潜力, 在 IS 治疗中产生神经元修复和功能恢复能力而成为新的治疗热点。本文回顾了移植 MSCs 治疗 IS 动物模型的给药途径、移植的时间窗和剂量, 以及潜在治疗靶点。大量的临床前研究支持 MSCs 移植的安全性。然而, 由于每个 IS 患者都有不同的生理状况, 因此在临床应用之前必须解决许多关键问题, 例如最佳细胞来源、完全符合 GMP 的 MSCs 制备、剂量、移植时间窗口和途径以及不良事件监测和管理。此外, 还需要深入探索 MSCs 的旁分泌作用、各种可溶性细胞因子之间的相互作用以及分子途径, 这可能是 MSCs 治疗 IS 潜力的关键。总之, MSC 治疗 IS 临床前研究为患者的神经康复提供了一种新的治疗靶点和研究方向。

## 参考文献

- [1] Feske SK. Ischemic stroke. *Am J Med*, 2021, 134(12):1457-1464.
- [2] de Havenon A, Sheth K, Johnston KC, et al. Acute ischemic stroke interventions in the united states and racial, socioeconomic, and geographic disparities. *Neurology*, 2021, 97(23):e2292-e2303.
- [3] Alessandrini M, Preynat-Seauve O, De Bruin K, et al. Stem cell therapy for neurological disorders. *South African Med J*, 2019, 109(8b):70-77.
- [4] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 1970, 3(4):393-403.
- [5] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1991, 9(5):641-650.
- [6] Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem Cells Transl Med*, 2017, 6(5):1445-1451.
- [7] Surugiu R, Oлару A, Hermann DM, et al. Recent advances in mono- and combined stem cell therapies of stroke in animal models and humans. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:6029.
- [8] Derakhshankhah H, Sajadimajd S, Jafari S, et al. Novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease: Implications from cell-based therapy and nanotherapy. *Nanomedicine*, 2020, 24:102149.
- [9] Huang Y, Wu Q, Tam PKH. Immunomodulatory mechanisms of mesenchymal stem cells and their potential clinical applications. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17):10023.
- [10] Mangin G, Kubis N. Cell therapy for ischemic stroke: how to turn a promising preclinical research into a successful clinical story. *Stem Cell Rev Rep*, 2019, 15(2):176-193.
- [11] Pathipati P, Lecuyer M, Faustino J, et al. Mesenchymal stem cell (MSC)-derived extracellular vesicles protect from neonatal stroke by interacting with microglial cells. *Neurotherapeutics*, 2021, 18(3):1939-1952.
- [12] Li Y, Dong Y, Ran Y, et al. Three-dimensional cultured mesenchymal stem cells enhance repair of ischemic stroke through inhibition of microglia. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1):358.
- [13] Oshita J, Okazaki T, Mitsuahara T, et al. Early transplantation of human cranial bone-derived mesenchymal stem cells enhances functional recovery in ischemic stroke model rats. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2020, 60(2):83-93.
- [14] Yabuno S, Yasuhara T, Nagase T, et al. Synergistic therapeutic effects of intracerebral transplantation of human modified bone marrow-derived stromal cells (SB623) and voluntary exercise with running wheel in a rat model of ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1):10.
- [15] Noh JE, Oh SH, Park IH, et al. Intracerebral transplants of GMP-grade human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells effectively treat subacute-phase ischemic stroke in a rodent model. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14:546659.
- [16] Lee S, Kim OJ, Lee KO, et al. Enhancing the therapeutic potential of CCL 2-overexpressing mesenchymal stem cells in acute stroke. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20):7795.
- [17] Asgari Taei A, Nasoohi S, Hassanzadeh G, et al. Enhancement of angiogenesis and neurogenesis by intracerebroventricular injection of secretome from human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in ischemic stroke model. *Biomed Pharm*, 2021, 140:111709.
- [18] Wu MR, Lee CH, Hsiao JK. Bidirectional enhancement of cell proliferation between iron oxide nanoparticle-labeled mesenchymal stem cells and choroid plexus in a cell-based therapy model of ischemic stroke. *Inter J Nanomedicine*, 2020, 15:9181-9195.
- [19] Arakawa M, Sakamoto Y, Miyagawa Y, et al. iPSC-derived mesenchymal stem cells attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammatory signaling and oxidative stress. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2023, 30:333-349.
- [20] Kiyose R, Sasaki M, Kataoka-Sasaki Y, et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances therapeutic efficacy of reperfusion therapy in cerebral ischemia. *World Neurosurg*, 2021, 149:e160-e169.
- [21] Myers MI, Hines KJ, Gray A, et al. Intracerebral transplantation of autologous mesenchymal stem cells improves functional recovery in a rat model of chronic ischemic stroke. *Transl Stroke Res*, 2023. Online ahead of print.
- [22] Jiang F, Zhou H, Cheng Y, et al. Various detailed characteristics of a new enhanced neurotrophic factor secreting rat derived bone marrow mesenchymal stem cells and its preliminary application in rat models of ischemic stroke. *Exp Cell Res*, 2022, 416(1):113140.
- [23] Tobin MK, Stephen TKL, Lopez KL, et al. Activated mesenchymal stem cells induce recovery following stroke via regulation of inflammation and oligodendrogenesis. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(7):e013583.
- [24] Datta A, Sarmah D, Kaur H, et al. Post-stroke impairment of the blood-brain barrier and perifocal vasogenic edema is alleviated by endovascular mesenchymal stem cell administration: Modulation of the PKC $\delta$ /MMP9/AQP4-Mediated Pathway. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(5):2758-2775.
- [25] Yang Y, Liu Q, Deng S, et al. Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells overexpressing HO-1 attenuate neural injury and enhance functional recovery by inhibiting inflammation in stroke mice. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(2):e14412.
- [26] Li T, Su X, Lu P, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived dermcidin-containing migrasomes enhance I $\kappa$ B-associated phagocytosis of pulmonary macrophages and protect against post-stroke pneumonia. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(22):e2206432.

- [27] Yoshida Y, Takagi T, Kuramoto Y, et al. Intravenous administration of human amniotic mesenchymal stem cells in the subacute phase of cerebral infarction in a mouse model ameliorates neurological disturbance by suppressing blood brain barrier disruption and apoptosis via immunomodulation. *Cell Transplant*, 2021, 30: 9636897211024183.
- [28] Sharp FR. Transplants for stroke patients? *Ann Neurol*, 1993, 34(3): 322-323.
- [29] Borlongan CV. Concise review: Stem cell therapy for stroke patients: Are we there yet? *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(9):983-988.
- [30] Vahidinia Z, Azami Tameh A, Nejati M, et al. The protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of ischemic stroke via reducing the C-Jun N-terminal kinase expression. *Pathol Res Pract*, 2019, 215(9):152519.
- [31] Li Z, Ye H, Cai X, et al. Bone marrow-mesenchymal stem cells modulate microglial activation in the peri-infarct area in rats during the acute phase of stroke. *Brain Res Bull*, 2019, 153:324-333.
- [32] Liang ZH, Gu JJ, Yu WX, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation downregulates plasma level and the microglia expression of transforming growth factor  $\beta$ 1 in the acute phase of cerebral cortex ischemia. *Chronic Dis Transl Med*, 2020, 6(4):270-280.
- [33] Tatebayashi K, Takagi T, Fujita M, et al. Adipose-derived stem cell therapy inhibits the deterioration of cerebral infarction by altering macrophage kinetics. *Brain Res*, 2019, 1712:139-150.
- [34] Fu YS, Yeh CC, Chu PM, et al. Xenograft of human umbilical mesenchymal stem cells promotes recovery from chronic ischemic stroke in rats. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6):3149.
- [35] Namioka T, Namioka A, Sasaki M, et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of chronic cerebral infarction. *J Neurosurg*, 2018, 131(4):1289-1296.
- [36] Torres Crigna A, Daniele C, Gamez C, et al. Stem/stromal cells for treatment of kidney injuries with focus on preclinical models. *Front Med (Lausanne)*, 2018, 5:179.
- [37] De Meyer J, De Pryck J, Hachimi-Idrissi S. Stem cell therapy for ischemic stroke: From bench to bedside. *Int J Crit Care Emerg Med*, 2018, 4:058.
- [38] Brooks B, Ebedes D, Usmani A, et al. Mesenchymal stromal cells in ischemic brain injury. *Cells*, 2022, 11(6):1013.
- [39] Nazarinia D, Sharifi M, Dolatshahi M, et al. FoxO1 and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway: Molecular targets of human amniotic mesenchymal stem cells-derived conditioned medium (hAMSC-CM) in protection against cerebral ischemia/reperfusion injury. *J Chem Neuroanat*, 2021, 112:101918.
- [40] Ranjbaran M, Vali R, Yaghoobi Z, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells reduced transient cerebral ischemia injury by modulation of inflammatory factors and AMPK signaling. *Behav Brain Res*, 2022, 433:114001.
- [41] Yang H, Tian S, Xie L, et al. Intranasal administration of cytoglobin modifies human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and improves hypoxic-ischemia brain damage in neonatal rats by modulating p38 MAPK signaling-mediated apoptosis. *Mol Med Rep*, 2020, 22(4):3493-3503.
- [42] Cho KH, Choi JI, Kim JO, et al. Therapeutic mechanism of cord blood mononuclear cells via the IL-8-mediated angiogenic pathway in neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Sci Rep*, 2020, 10(1):4446.
- [43] Wong R, Smith CJ, Allan SM, et al. Preconditioning with interleukin-1 alpha is required for the neuroprotective properties of mesenchymal stem cells after ischemic stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2023, 43(12):2040-2048.
- [44] Zhou T, Sun Y, Wang Y, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells enhance lipopolysaccharide-induced IL-10 and IL-37 production in THP-1 cells. *Inflammation*, 2019, 42(3):987-993.
- [45] Maiti P, Peruzzaro S, Kollu N, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 induces autophagy response and promotes neuroprotection in a rat model of TBI. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8):5211-5224.
- [46] Bai Y, Wang L, Xu R, et al. Mesenchymal stem cells with p38 mitogen-activated protein kinase interference ameliorate mouse ischemic stroke. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248(23):2481-2491.
- [47] Gao X, Wu D, Dou L, et al. Protective effects of mesenchymal stem cells overexpressing extracellular regulating kinase 1/2 against stroke in rats. *Brain Res Bull*, 2019, 149:42-52.
- [48] Zhao N, Niu RZ, Zhu YH, et al. MRI tracking/detection of bone marrow mesenchymal stromal cells transplantation for treatment of ischemic cerebral infarction. *Ibrain*, 2021, 7(1):12-20.
- [49] Elman JS, Murray RM, Wang F, et al. Pharmacokinetics of natural and engineered secreted factors delivered by mesenchymal stromal cells. *PLoS One*, 2014, 9(2):e89882.
- [50] López-Iglesias P, Blázquez-Martínez A, Fernández-Delgado J, et al. Short and long term fate of human AMSC subcutaneously injected in mice. *World J Stem Cells*, 2011, 3(6):53-62.
- [51] Thâte C, Woischwill C, Brandenburg G, et al. Non-clinical assessment of safety, biodistribution and tumorigenicity of human mesenchymal stromal cells. *Toxicol Rep*, 2021, 8:1960-1969.
- [52] Yeung CK, Yan Y, Yan L, et al. Preclinical safety evaluation and tracing of human mesenchymal stromal cell spheroids following intravenous injection into cynomolgus monkeys. *Biomaterials*, 2022, 289:121759.