

•综述•

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2017.06.06

间充质干细胞治疗肌萎缩性脊髓侧索硬化症: 治疗潜能及机制

王亚君, 李一佳*

(云南舜喜再生医学工程有限公司, 昆明 650000)

摘要 肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种影响神经肌肉系统的神经退行性疾病,主要临床表现为运动神经元功能紊乱、进行性瘫痪和死亡。尽管已经使用了一些方法治疗ALS,但是很少成功。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)长期以来被认为是再生细胞治疗的有效工具,很容易从健康捐赠者和患者组织中获得,并且不存在伦理学争议。MSC具有分化为多种细胞类型的能力,并具有免疫调节、组织修复、释放营养因子、分泌外泌体和有效的归巢等潜能,能够成为克服治疗难题的有前途的工具。本文将就MSCs在ALS患者中的治疗潜能及作用机制进行综述。

关键词 肌萎缩性脊髓侧索硬化症; 间充质干细胞; 细胞治疗

中图分类号 Q291

Mesenchymal Stem Cells Treatment for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Therapeutic Potential and Mechanisms

WANG Ya-Jun, LI Yi-Jia*

(Yunnan Suns Regenerative Medicine Engineering Co., Ltd, Kunming 650000, China)

Abstract Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that affects the neuromuscular system. The main clinical manifestations are motor neuron dysfunction, progressive paralysis and death. Although some treatments have been used to treat ALS, they have rarely been successful. Mesenchymal stem cell has long been considered to be an effective tool for regenerative cell therapy. It is easy to obtain from healthy donors and patient organizations and there is no ethical controversy. MSCs has the ability to differentiate into various cell types, and the potential of immunomodulation, tissue repair, release of neurotrophic factor, secretion of exosomes and effective homing, and can be a promising tool to overcome the difficult problem of treatment. In this review we will discuss the therapeutic potential of MSCs in ALS patients and its mechanism.

Key words amyotrophic lateral sclerosis; mesenchymal stem cell; cell therapy

神经变性疾病是一类以神经元变性或凋亡为特征的慢性进行性神经系统疑难病,包括肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)等。ALS是运动神经元病的典型代表。运动神经元病是指病变选择性侵犯脊髓前角细胞、脑干颅神经运动核、大脑运动皮质锥体细胞,以及锥体束受损的一组进行性神经系统变性疾病。ALS是发展迅速的致死性神经变性疾病,其病理累及上、下运动神经元,临床表现为进行性肌无力、肌萎缩、肌跳,最终导致瘫痪,并且在临床发病后的3~5年由于呼吸衰竭死亡^[1]。因为在ALS

中,运动神经元变性的机制尚未明了,故这种疾病无明确已知病因及有效治疗方法,是目前公认的世界性疑难病。谷氨酸释放抑制剂利鲁唑可减缓疾病的进展,是目前唯一通过美国食品及药物管理局(FDA)认证并在全球广泛使用的药物^[2]。但该药疗效不明显,并不能治愈ALS,不能改善症状或逆转

收稿日期: 2016-12-01; 修回日期: 2016-12-23; 接受日期: 2016-12-30

* 通讯作者 Tel: 0871-63583888, E-mail: yijia.tsinghua@gmail.com

Received: December 1, 2016; Revised: December 23, 2016;

Accepted: December 30, 2016

* Corresponding author Tel: 0871-63583888,

E-mail: yijia.tsinghua@gmail.com

进行性恶化的趋势,而且有些患者会产生很大的副反应。近年来干细胞治疗(stem cells therapy)引起人们广泛关注,被认为是治疗神经退行性疾病的潜在策略。

1 肌萎缩性脊髓侧索硬化症

ALS 是上、下运动神经元快速退化的神经变性疾病,主要影响脊髓、脑干和皮层运动区的运动神经元,导致手臂、腿、躯干和延髓区肌肉虚弱或损耗。临床主要症状包括失去平衡以及手和手臂的功能,说话、吞咽和呼吸困难。吸入性肺炎和呼吸功能障碍是该病常见的终端症状。ALS 的患病率达 7.4/100 000。大约 90% 的 ALS 病例为散发性 ALS(sporadic ALS, SALS),其余为家族性 ALS(familial ALS, FALS)。ALS 是一类异质性疾病,疾病的病理学还没有被完全理解。然而,已经被描述为多因素过程,可能的发病机制包括氧化性损伤、细胞内聚合物积累、线粒体功能障碍、轴突运输缺陷、生长因子营养支持缺陷、胶质细胞功能改变、RNA 代谢异常以及谷氨酸盐兴奋性中毒。大约 70% ~ 80% 的 FALS 是 Cn^{2+}/Zn^{2+} 超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1)、TDP43、FUS、或 C9ORF72 基因突变所致^[3]。已经提出的 SALS 的发病机制,包括氧化应激和谷氨酸盐毒性诱导有毒的细胞和脊髓环境,神经丝聚集和轴突转运缺陷,导致线粒体功能障碍和影响神经营养因子的逆运输^[4-6]。最近的研究证据表明,蛋白质积累和 RNA 损伤也会导致 ALS^[7-8]。目前,尚无有效方法治愈 ALS,仅为康复、对症、辅助呼吸等治疗方案。利鲁唑是抗兴奋性氨基酸毒性的药物,唯一 FDA 批准的治疗 ALS 的临床药物,但是其药效非常有限,与安慰剂组相比,存活期仅仅增加 2 ~ 3 个月^[9]。由于 ALS 疾病的残酷性,很多治疗方法正在尝试,但尚未见成效^[10-11]。

随着干细胞技术的进步,干细胞治疗为神经系统疾病的患者带来了希望。现代细胞治疗是利用多种类型干细胞改变疾病的病理学,通过释放神经营养因子支持神经元和周围细胞或直接进行细胞替代。目前,干细胞治疗可能是一种能彻底治愈 ALS 的方法,已经引起人们极大的兴趣。以干细胞移植作为细胞替代的候选,或作为载体进行靶向给药,以及利用它们的神经营养因子和免疫调节作用,防止运动神经元损耗^[12-15]。

2 间充质干细胞治疗肌萎缩性脊髓侧索硬化症

近年来,干细胞的研究为神经的修复和再生开辟了一条新的道路,是治疗 ALS 等中枢神经系统变性疾病有效方法之一。在神经退行性疾病中,干细胞疗法的主要目标是细胞替代和神经保护。多种干细胞和祖细胞类型可能直接替换运动神经元和病变胶质细胞,或提供支持减慢其退化。由此,上述细胞包括多能细胞,如胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS)。由于其来源、免疫排斥及道德伦理问题,ESC 移植的临床应用受到很大限制。并且,iPS 的潜能还存在质疑,此外,上述细胞具有形成畸胎瘤的风险^[16]。因此,需要寻找更有效的替代细胞类型。

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)是一类具有多向分化潜能,低免疫原性细胞,且具有很强免疫调节的功能,参与自然免疫和获得性的免疫过程^[17-20]。因此,MSC 的临床移植成为药物治疗、手术治疗之后的又一种治疗新技术,并在国际范围内开展临床试验和应用。人 MSC 治疗疾病临床试验有的已经达到 I 期和 II 期,包括移植抗宿主病、心脏病和一些神经退行性疾病^[21-23]。在这些疾病治疗中,MSC 的作用不仅仅是细胞替代功能,而且通过释放支持因子以及调节免疫反应,对宿主需要作出反应。MSC 免疫调节能力、效能、稳定性和容易获取与扩增的能力,使得它们成为 ALS 细胞疗法极具吸引力的候选细胞。意大利 Mazzini 等^[24]研究 ALS 患者脊髓内移植自体 MSC 的安全性和可行性,结果发现,患者未见明显的不良反应如呼吸衰竭或死亡。因此,该研究证明体外扩增 MSC 并移植入骨髓是安全可耐受的。Deda 等^[25]将自体骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)移植到 13 例 ALS 患者的 C1 ~ C2 区域。在 1 年随访期内,9 例患者症状缓解,1 例患者病情稳定,3 例患者死于肺部感染和心肌梗死。该研究证明,MSC 移植治疗 ALS 是安全有效的。Martinez 等^[26]研究向 ALS 病人移植自体 MSC,结果发现,移植 6 个月后锥体束表现出各向异性改善,证明自体 MSC 移植治疗 ALS 的安全性和可行性。Petrou 等^[27]对 1/2 和 2a 期临床研究发现,移植 MSC 的 12 个 1/2 期试验和 14 个 2a 期试验的 ALS 患者,均没有表现出严重的副作

用,并且症状均有改善。证明 MSC 移植治疗 ALS 是安全的,并提供了临床适应症优势。MSC 移植治疗 ALS,显示出特殊的治疗优势和临床价值,是一种安全有效的治疗手段,具有巨大的临床应用潜力。

3 间充质干细胞对肌萎缩性脊髓侧索硬化症的治疗机制

尽管一些研究已经发现, MSC 移植可以改善疾病,但是其机制仍未被完全理解。MSC 在治疗 ALS 中的作用是多方面的,通过释放生长因子、免疫调节、抗炎作用、有效的归巢以及外泌体分泌等的共同

作用(见 Fig. 1)^[28,29]。

3.1 细胞替换

对于 ALS,细胞替代治疗有两个潜在目标,分别是(1)用新的功能性的运动神经元直接替代退化的运动神经元;(2)提供支持胶质细胞以保护和支运动神经元。细胞替代提供可以存活并归巢到疾病损伤区域的细胞源,分化为预期的细胞类型,并且与神经回路周围的环境融为一体^[23]。如果成功实现功能性运动神经元的替代,将有效恢复功能并缓解临床症状。然而,运动神经元细胞的替代较为困难,星形胶质细胞或少突细胞的替代可能是更切实可行的目标。

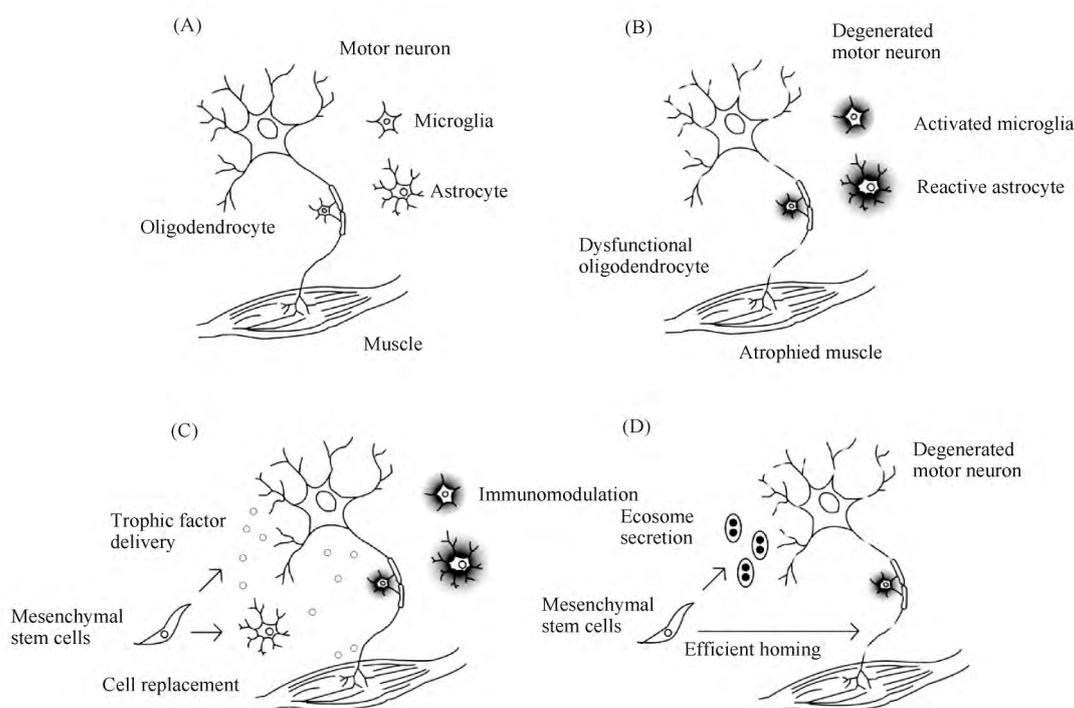


Fig. 1 Mechanisms of mesenchymal stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis (A) In the healthy person, motor neuron viability is maintained when supported by healthy astrocytes and oligodendrocytes. (B) In familial ALS, intrinsic and extrinsic factors contribute to the degeneration of motor neurons. These factors are not well understood and remain under investigation. (C) Mesenchymal stem cells are well suited to treat this complex disease because of their wide range of potential therapeutic responses, including direct cell replacement, trophic factor delivery, and immunomodulation. (D) Mesenchymal stem cells can repair injured motor neurons by releasing exosome and efficient homing

目前已知的 ALS 中运动神经元死亡的机制包括谷氨酸盐兴奋性中毒和氧化应激,可能影响移植和内源性神经元存活^[30]。同时应考虑多种功能细胞共同发挥作用以及与疾病过程之间的关系^[31]。在人体环境中,如果在症状期进行细胞移植,ALS 发展时间内的归巢过程、轴突延长和功能性突触的形成还没有完成,因此,归巢到脊髓中 MSC 是否可

以形成功能性神经元仍不清楚。

尽管某些研究已经报道移植的 MSC 分化为神经元表型的可能性,但是它们的治疗有效性尚未确定^[32,33]。最近,体内研究发现,诱导过表达神经素 1 (neurogenin 1, Ngn1) 的 MSC,在起始向神经分化中发挥重要作用。并且在 SOD1 小鼠中移植过表达 Ngn1 的 MSC 提高了运动神经元的存活,然而,

移植未加工的 MSC 却无此疗效^[34]。尽管没有证据证明过表达 *Ngn1* 的 MSC 可以分化为神经细胞,但是这个研究表明,与未修饰的 MSC 相比,过表达 *Ngn1* 的 MSC 向脊髓迁移的能力增加。为了神经保护作用而进行胶质细胞递送可能是更可行的目标。尽管 ALS 的标志主要是运动神经元丢失,然而,大量证据表明,胶质细胞功能障碍在疾病过程中也发挥作用。最近的研究发现,来自 FALS 和 SALS 患者的星形胶质细胞选择性地对运动神经元有毒性^[35],并且另一项研究也发现,健康的野生型啮齿动物中,*SOD1* 突变的星形胶质细胞促进神经退行性病变^[36]。在 *SOD1* 突变的小鼠中,少突胶质细胞也表现出变性模式和细胞替代的异常^[37]。在该研究中,从小鼠模型中选择性去除 *SOD1* 基因突变,获得的少突胶质细胞会延缓疾病的开始,并增加存活率。这些研究表明,用来自 MSC 的健康的、野生型星形胶质细胞或少突胶质细胞进行细胞替代可延缓疾病的恶化。这种神经保护性细胞替代可能在功能和病理学上更可行。

3.2 营养因子递送

MSCs 能改善 ALS 的症状,部分原因是由于它们能分泌在正常神经元和神经修复中发挥多种作用的神经营养因子。营养/生长因子是对神经细胞维持、工作、分化和增殖所必须的蛋白质。补充生长因子,如胶质细胞来源的神经营养因子(glia cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、毛状神经营养因子(hairy neurotrophic factor)和胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor-1, IGF1)对治疗 ALS 是有益的。在过表达 *SOD1* 小鼠中,运用病毒递送生长因子已经表现出减少运动神经元的易损性,促进细胞存活,改善临床症状的功效^[38-40]。

与病毒载体相似, MSC 可以作为有效的稳定的递送工具。他们表达或被稳定转染,以提供过表达营养因子。MSC 可以向损伤部移动,与病毒载体相比, MSCs 在治疗递送中更具灵活性^[41, 42]。营养因子的部分修复机制,可能包括内源性修复或再生过程,如诱导内源性神经再生、胶质细胞再生和突触形成^[43, 44]。神经保护作为减少凋亡、脱髓鞘或增加星形胶质细胞存活的结果,是表达神经营养因子的 MSC 的另一作用机制^[45, 46]。

实验研究已经检测了 MSC 递送营养因子对 ALS 的疾病过程、临床症状和病理学的影响。

Suzuki 等^[47]研究了 MSC 转基因稳定过表达生长因子,如 GDNF 和 VEGF 的有益作用。肌肉移植过表达 *GDNF* 的 MSC 显著减少神经肌肉节点的去神经,然而未经修饰的 MSC 没有这一作用。过表达 *GDNF* 的 MSC 也保护腹角中大的胆碱能运动神经元并增加 *SOD1* 大鼠的存活率。Krakora 等^[48]研究发现 *GDNF* 和 *VEGF* 的联合递送与单独递送相比显著减慢疾病的过程,减少终板去神经并且提高运动神经元的存活。这些研究结果表明,表达一种或多种生长因子,可以通过保护运动神经元和维持运动神经元终板改善 MSC 的治疗结果。

3.3 免疫调节

炎症和免疫反应在 ALS 疾病过程中发挥重要作用^[49]。在症状开始前和疾病的整个过程中,均在中枢神经系统内外观察到免疫细胞形态、数量和作用的改变^[50]。中枢神经细胞小胶质细胞在 ALS 中可能发挥保护和毒性作用。胶质细胞在疾病的不同阶段,其活化和作用机制不清楚。MSC 表现出多种免疫调节作用,因此,与复杂的炎症模式相匹配^[51]。MSC 降低 B 细胞、T 细胞和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的增殖,并且减慢树突细胞(dendritic cell, DC)的成熟。MSC 也通过减少 B 细胞产生抗体,减少或抑制 DC 和 T 细胞活化,抑制 NK 分泌细胞因子调节免疫细胞的功能^[52]。在 CNS 中, MSC 显示出向炎症区域移动,并减少炎症反应^[53]。最近,在 ALS 实验模型中,应用 MSC 的研究表明,小胶质细胞活化减弱、反应性星形胶质细胞减少,这是 MSC 改善临床结果的潜在机制^[54-56]。基于这些原因, MSC 的免疫调节作用可能是细胞治疗使用 MSC 的额外优势。

3.4 有效归巢

在体内,追踪 MSC 的归巢存在一些问题,包括缺乏识别标记和血液中 MSC 浓度低^[57]。已有研究表明, MSC 可以渗透到不同的损伤组织,如缺血性脑损伤^[58]、心肌梗塞^[59]和急性肾衰竭^[60]。尽管已经观察到, MSC 表达一些趋化因子受体,包括 CCR1 (chemokine receptor)、CCR4、CCR7、CCR9、CCR10、CXCR1、CXCR3、CXCR4、CXCR5 和 CX3CR1^[61, 62],但是, MSC 归巢中主要的趋化因子还没有被确定。负责白细胞归巢的趋化因子中,基质衍生因子 1 (stroma-derived factor 1, SDF-1) 已经被精确研究^[63]。在心肌梗塞小鼠模型中显示, SDF-1 是基质细胞向受伤组织移动的主要介质^[64]。Zohlnhöfer

等^[65]研究发现,继心肌梗塞后,在缺血性肌肉中 SDF-1 过表达,提高内皮祖细胞的移动。

MSC 的有效归巢受 3 种分子的控制,包括趋化因子(尤其是 CXCR4, CXCL12, CCR2)、黏附分子(如整合素)和基质金属蛋白酶(尤其 matrix metalloproteinase 2, MMP-2)^[66,67]。向心肌梗塞小鼠模型中,移植 CXCR4 转染的 MSC 能有效改善症状^[68]。而且体内和体外分析 MSC 表明, P 选择素、血管细胞黏附蛋白-1 (vascular cell adhesion protein 1, VCAM-1) 和极迟蛋白-4 (very late protein 4, VLA-4) 是 MSC 与内皮细胞相互作用的重要因子^[69]。惊奇的是,向炎症性肠病小鼠中注射 VCAM-1 转染的 MSC,与 MSC 相比,促进 MSC 向炎症部位的归巢^[70]。该研究表明了归巢分子调控的可能性,促进 MSC 的归巢能力,将导致好的治疗效果。而且,有效的归巢可以受 MSC 和细胞的起源影响,例如,静脉注射调控的 MSC 主要滞留在肺部,并少量迁移至中枢神经系统^[71]。Eliopoulos 等^[72]研究表明,异体 MSC 也可被调控,而没有宿主免疫系统的免疫识别和排斥。

细胞融合度和代数是 MSC 培养的两个重要因素。已经有研究表明,在培养 MSC 时增加细胞融合度导致分泌抑制复合物 TIMP-3 (一种天然的 MMP 抑制剂),并且在注射后跨内皮迁移失调。然而,体外扩增 MSC 和新分离 MSC 相比,不表达归巢决定性受体,尤其 CXCR4。这种丢失可以由培养基中的混合细胞活素所补偿^[73]。Choi 等^[74]研究表明,大约 10 代后, MSC 的神经保护、免疫调节和分化能力显著减低,因此,必须优先考虑使用新分离的 MSC。

3.5 外泌体分泌

治疗神经退行性疾病,新的治疗方法应以提高和延长老年人生活质量为前提。目前的治疗方法是对症的,不能停止或减缓神经退行性变性过程。过去 10 年以来,干细胞治疗神经性疾病引起广泛的兴趣。但是,临床有效的治疗还不能应用于大部分患者^[31]。主要原因是缺乏对移植过程,以及后续将移植的细胞整合到靶向脑回路的理解。移植干细胞产生的治疗因子,将比传统移植具有优势。首先,不需要直接使用细胞,避免细胞移植的局限性和危险。第二,这种方法允许在细胞产品制备期间,对整个过程更精确的控制,适合大规模临床制造。外泌体(exosome)通过在细胞间转运膜受体、蛋白质、脂质、RNA 和 microRNA,在细胞通讯中发挥重要

作用。

大量的证据表明,慢性神经炎症在神经退行性疾病中,具有因果作用。最近,已经有研究报道,在中枢神经系统中,外泌体具有抗神经炎症的能力^[75],MSC 具有高分泌外泌体的能力。Kourembanas 等^[76]研究发现,脂肪间充质干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cell, ADSC)的神经保护和神经再生作用,是通过释放外泌体而发挥旁分泌作用。向外伤脑损伤小鼠移植 MSC,结果发现, MSC 通过内源性血管再生和神经再生,减少炎症过程进行功能性修复和神经血管重建^[77]。Nakamura 等研究发现, MSC 来源的外泌体通过 miRNA,如 miR-494 可以增强肌细胞和血管细胞生成并诱导肌肉再生。Bonafede 等^[78]利用外泌体体外研究非细胞治疗方法的有效性,首次发现脂肪间充质干细胞来源的外泌体在体外 ALS 模型中发挥了主要的神经保护作用。

综上研究证明, MSC 来源的外泌体是治疗 ALS 有前途的方法之一。外泌体代表了无细胞治疗方法,可以克服移植干细胞的障碍和危险,如免疫排斥和恶性转化。因此, MSC 来源的外泌体可以被用于多种神经疾病的无细胞治疗工具^[79]。

4 问题与展望

MSCs 由于可以保护运动神经元,分化为多种神经细胞,调节免疫细胞作用和减少中枢神经系统炎症反应而引人注目。MSCs 在临床前 ALS 模型中,成功延迟疾病的起始、提高运动功能并增加存活率,因此多个临床试验用 MSCs 治疗 ALS。这些研究已经确定,对于中枢神经系统应用 MSCs 递送的安全性,为更大的晚期临床试验打开了大门,以更好的理解 MSCs 治疗的有效性。因此,进一步的工作是需要将 MSCs 治疗 ALS 的潜力最大化,必须建立最有效的技术向患者递送 MSCs。

进一步研究检测 MSCs 过表达生长因子,减缓运动神经元退化和改善临床症状,将有助于最大化细胞治疗的积极作用。尤其过表达抗炎因子,或防止蛋白质错误折叠和聚集的因子,是值得研究的,使得研究者利用 MSCs 治疗具有可塑性。并且 MSCs 递送后所有潜在的修缮作用应该被考虑并进行合并,以最大化 MSCs 治疗 ALS 的有效性。但是,使用干细胞治疗 ALS,必须解决所面临的重大挑战,包括选择移植时间、以最大量吸引干细胞到损伤运动神

经元、选择最佳注射技术以提高干细胞存活和增殖、以及选择最佳参数的患者。

参考文献(References)

- [1] Chiò A, Mora G, Calvo A, *et al.* Epidemiology of ALS in Italy: a 10-year prospective population-based study [J]. *Neurology*, 2009, **72**(8): 725-731
- [2] 吴芳, 杨佳勇, 张敏, 等. 脐带间充质干细胞移植对脑性瘫痪儿童神经系统功能的影响: 20 例分析 [J]. *中国组织工程研究与临床康复* (Wu F, Yang JY, Zhang M, *et al.* Effect of umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation on neurological function in children with cerebral palsy: analysis of 20 cases. *Chin J Histoeng Clin Rehabil*), 2008, **12**(16): 3198-3200
- [3] Turner MR, Hardiman O, Benatar M, *et al.* Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Lancet Neurol*, 2013, **12**(3): 310-322
- [4] Gordon PH. Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2013 clinical features, pathophysiology, management and therapeutic trials [J]. *Aging Dis*, 2013, **4**(5): 295-310
- [5] Cozzolino M, Pesaresi MG, Gerbino V, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis: new insights into underlying molecular mechanisms and opportunities for therapeutic intervention [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, **17**(9): 1277-1330
- [6] Pizzuti A, Petrucci S. Mitochondrial dysfunction as a cause of ALS [J]. *Arch Ital Biol*, 2011, **149**(1): 113-119
- [7] Polymenidou M, Lagier-Tourenne C, Hutt KR, *et al.* Misregulated RNA processing in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Brain Res*, 2012, **1462**: 3-15
- [8] Ticozzi N, Ratti A, Silani V. Protein aggregation and defective RNA metabolism as mechanisms for motor neuron damage [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, **9**(3): 285-296
- [9] Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group [J]. *N Engl J Med*, 1994, **330**(9): 585-591
- [10] Sorenson EJ, Windbank AJ, Mandrekar JN, *et al.* Subcutaneous IGF-1 is not beneficial in 2-year ALS trial [J]. *Neurology*, 2008, **71**(22): 1770-1775
- [11] Miller RG, Moore DH 2nd, Gelinas DF, *et al.* Phase III randomized trial of gabapentin in patients with amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurology*, 2001, **56**(7): 843-848
- [12] Silani V, Cova L, Corbo M, *et al.* Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Lancet*, 2004, **364**(9429): 200-202
- [13] Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, *et al.* Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study [J]. *Cytotherapy*, 2012, **14**(1): 56-60
- [14] Cova L, Silani V. Amyotrophic lateral sclerosis: applications of stem cells - an update [J]. *Stem Cells Cloning*, 2010, **3**: 145-56
- [15] Meamar R, Nasr-Esfahani MH, Mousavi SA, *et al.* Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Clin Neurosci*, 2013, **20**(12): 1659-1663
- [16] Hu BY, Weick JP, Yu J, *et al.* Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, **107**(9): 4335-4340
- [17] Kim HY, Paek J, Park HK, *et al.* Efficacy and safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell treatment in patients with amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Korean Neurol Assoc*, 2009, **27**: 163-169
- [18] Brooks BR, Miller RG, Swash M, *et al.* El Escorial revisited: Revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2000, **1**(5): 293-299
- [19] Ioannidis JP, Evans SJ, Gøtzsche PC, *et al.* Better reporting of harms in randomized trials: An extension of the CONSORT statement [J]. *Ann Intern Med*, 2004, **141**(10): 781-788
- [20] Trotti A, Colevas AD, Setser A, *et al.* CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment [J]. *Semin Radiat Oncol*, 2003, **13**(3): 176-181
- [21] Gnecci M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease [J]. *Vascul Pharmacol*, 2012, **57**(1): 48-55
- [22] Kebriaei P, Robinson S. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of acute and chronic graft versus host disease [J]. *Front Oncol*, 2011, **1**: 16
- [23] Kan I, Melamed E, Offen D. Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2007, (180): 219-242
- [24] Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, *et al.* Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans [J]. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2003, **4**(3): 158-161
- [25] Deda H, Inci MC, Kürekçi AE, *et al.* Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up [J]. *Cytotherapy*, 2009, **11**(1): 18-25
- [26] Martínez HR, González-Garza MT, Moreno-Cuevas J, *et al.* Long-term survival in amyotrophic lateral sclerosis after stem cell transplantation into the frontal motor cortex [J]. *Cytotherapy*, 2016, **18**(6): 806-808
- [27] Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, *et al.* Safety and clinical effects of mesenchymal stem cells secreting neurotrophic factor transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis results of phase 1/2 and 2a clinical trials [J]. *JAMA Neurol*, 2016, **73**(3): 337-344
- [28] Ren G, Chen X, Dong F, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2012, **1**(1): 51-58
- [29] Phinney DG, Isakova I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, **11**(10): 1255-1265
- [30] Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond [J]. *J Cell Biol*, 2009, **187**(6): 761-772
- [31] Lindvall O, Barker RA, Brustle O, *et al.* Clinical translation of stem cells in neurodegenerative disorders [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, **10**(2): 151-155
- [32] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, *et al.* Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation [J]. *J Clin Invest*, 2004, **113**(12): 1701-1710
- [33] Jiang J, Lv Z, Gu Y, *et al.* Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuroregulatory molecules in vitro [J]. *Neurosci Res*, 2010, **66**(1): 46-52
- [34] Chan-Hi C, Young-Don L, Heejaung K, *et al.* Neural induction with neurogenin 1 enhances the therapeutic potential of mesenchymal stem cells in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model [J]. *Cell Transplant*, 2013, **22**(5): 855-870
- [35] Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, *et al.* Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, **29**(9): 824-828
- [36] Papadeas ST, Kraig SE, O'Banion C, *et al.* Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wildtype motor neuron degeneration in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, **108**(43): 17803-17808
- [37] Kang SH, Li Y, Fukaya M, *et al.* Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Nat Neurosci*, 2013, **16**(5): 571-579
- [38] Dodge JC, Treleaven CM, Fidler JA, *et al.* AAV4-mediated expression of IGF-1 and VEGF within cellular components of the ventricular system improves survival outcome in familial ALS mice [J]. *Mol Ther*, 2010, **18**(12): 2075-2084
- [39] Acsadi G, Anguelov RA, Yang H, *et al.* Increased survival and

- function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, **13**(9): 1047-1059
- [40] Pun S, Santos AF, Saxena S, *et al.* Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF [J]. *Nat Neurosci*, 2006, **9**(3): 408-419
- [41] Ji JF, He BP, Dheen ST, *et al.* Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury [J]. *Stem Cells*, 2004, **22**(3): 415-427
- [42] Greco SJ, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells in drug/gene delivery: implications for cell therapy [J]. *Ther Deliv*, 2012, **3**(8): 997-1004
- [43] 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]. *J Neurosci Res*, 2003, **73**(6): 778-786
- [44] Gutierrez-Fernandez M, Fuentes B, Rodriguez-Frutos B, *et al.* Trophic factors and cell therapy to stimulate brain repair after ischaemic stroke [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, **16**(10): 2280-2290
- [45] Dharmasaroja P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke [J]. *J Clin Neurosci*, 2009, **16**(1): 12-20
- [46] Kassiss I, Vaknin-Dembinsky A, Karussis D. Bone marrow mesenchymal stem cells: agents of immunomodulation and neuroprotection [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2011, **6**(1): 63-68
- [47] Suzuki M, McHugh J, Tork C, *et al.* Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS [J]. *Mol Ther*, 2008, **16**(12): 2002-2010
- [48] Krakora D, Mulcrone P, Meyer M, *et al.* Synergistic effects of GDNF and VEGF on lifespan and disease progression in a familial ALS rat model [J]. *Mol Ther*, 2013, **21**(8): 1602-1610
- [49] Philips T, Robberecht W. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease [J]. *Lancet Neurol*, 2011, **10**(3): 253-263
- [50] Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME. Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS [J]. *Glia*, 1998, **23**(3): 249-256
- [51] De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, *et al.* Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications [J]. *Curr Mol Med*, 2012, **12**(5): 574-591
- [52] Mundra V, Gerling IC, Mahato RI. Mesenchymal stem cell-based therapy [J]. *Mol Pharm*, 2013, **10**(1): 77-89
- [53] Kassiss I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, *et al.* Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Arch Neurol*, 2008, **65**(6): 753-761
- [54] Boucherie C, Schafer S, Lavand'homme P, *et al.* Chimerization of astroglial population in the lumbar spinal cord after mesenchymal stem cell transplantation prolongs survival in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neurosci Res*, 2009, **87**(9): 2034-2046
- [55] Vercelli A, Mereuta OM, Garbossa D, *et al.* Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurobiol Dis*, 2008, **31**(3): 395-405
- [56] Zhou C, Zhang C, Zhao R, *et al.* Human marrow stromal cells reduce microglial activation to protect motor neurons in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2013, **10**: 52
- [57] Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(3): 206-216
- [58] 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 [J]. *Stem Cells*, 2010, **28**(6): 1099-1106
- [59] Wu Y, Zhao RC. The role of chemokines in mesenchymal stem cell homing to myocardium [J]. *Stem Cell Rev*, 2012, **8**(1): 243-250
- [60] Wise AF, Williams TM, Kiewiet MB, *et al.* Human mesenchymal stem cells alter macrophage phenotype and promote regeneration via homing to the kidney following ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol-Renal Physiol*, 2014, **306**(10): F1222-F1235
- [61] Ringe J, Strassburg S, Neumann K, *et al.* Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2 [J]. *J Cell Biochem*, 2007, **101**(1): 135-146
- [62] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. *Stem Cells*, 2007, **25**(11): 2739-2749
- [63] Lau TT, Wang DA. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2011, **11**(2): 189-197
- [64] Yu J, Li M, Qu Z, *et al.* SDF-1/CXCR4-mediated migration of ransplanted bone marrow stromal cells toward areas of heart myocardial infarction through activation of PI3K/Akt [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, **55**(5): 496-505
- [65] Zohlnhöfer D, Ott I, Mehilli J, *et al.* Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial [J]. *JAMA*, 2006, **295**(9): 1003-1010
- [66] Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, *et al.* A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow [J]. *Blood*, 2004, **104**(9): 2643-2645
- [67] Belema-Bedada F, Uchida S, Martire A, *et al.* Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2 [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, **2**(6): 566-575
- [68] Cheng Z, Ou L, Zhou X, *et al.* Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance [J]. *Mol Ther*, 2008, **16**(3): 571-579
- [69] Ruster B, Göttig S, Ludwig RJ, *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells [J]. *Blood*, 2006, **108**(12): 3938-3944
- [70] Ko IK, Kim B G, Awadallah A, *et al.* Targeting improves MSC treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Mol Ther*, 2010, **18**(7): 1365-1372
- [71] Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, *et al.* Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect [J]. *Stem Cells Dev*, 2009, **18**(5): 683-692
- [72] Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, *et al.* Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice [J]. *Blood*, 2005, **106**(13): 4057-4065
- [73] Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, **4**(3): 206-216
- [74] Choi MR, Kim HY, Park JY, *et al.* Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurosci Lett*, 2010, **472**(2): 94-98
- [75] Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, *et al.* Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain [J]. *Mol Ther*, 2011, **19**(10): 1769-1779
- [76] Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy [J]. *Annu Rev Physiol*,

- 2015 ,**77**: 13-27
- [77] Amarnath S ,Foley JE ,Farthing DE ,*et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells harness purinergic signaling to tolerize human Th1 cells in vivo [J]. *Stem Cells* , 2015 , **33** (4) : 1200-1212
- [78] Bonafede R ,Scambi I ,Peroni D ,*et al.* Exosome derived from murine adipose-derived stromal cells: Neuroprotective effect on in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Exp Cell Res* , 2016 ,**340**(1) : 150-158
- [79] Zhang Y ,Chopp M ,Meng Y ,*et al.* Effect of exosomes derived from multipotential mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury [J]. *J Neurosurg* , 2015 ,**122**(4) : 856-867