

脊髓损伤修复的实验研究现状

董锋,林建华

[关键词] 脊髓损伤;修复;基础研究;综述

中图分类号:R651.2 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)05-0401-02

[本文著录格式] 董锋,林建华.脊髓损伤修复的实验研究现状[J].中国康复理论与实践,2006,12(5):401-402.

脊髓损伤(SCI)后的中枢神经再生是生物医学界研究的前沿课题。脊髓损伤的修复主要面临两大难点:①如何预防脊髓损伤引起的脊髓细胞死亡,以及如何替代已死亡的脊髓细胞;②如何抑制损伤局部疤痕形成,创造适合神经再生的微环境,促进诱导神经生长^[1]。近年来,研究者试图通过药物、神经营养因子、组织细胞移植以及转基因细胞移植等方法达到治疗脊髓损伤的目的。以下就目前国内外对脊髓损伤修复的研究现状作一简要概述。

1 神经营养因子的应用

神经营养因子(NTFs)是一个大的蛋白家族,包括神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养素3/4/5(NT3/4/5)、睫状神经营养因子(CNTF)等。它们不仅能促进神经细胞的生长发育,而且对损伤的神经元亦有保护、预防退变和促进再生的作用。在NTFs中,NGF和BDNF是重要的成员。在动物实验中已观察到,BDNF、NGF可减轻损伤脊髓的炎症,保护损伤的神经细胞,减少细胞的凋亡数量,促进轴突大量再生^[2-3]。NGF主要促进发育中的交感和感觉神经细胞分化和成熟,维持神经元正常功能,促进该神经元突起的长出,并决定突起的生长方向。目前研究表明,中枢神经系统损伤后,原已封闭的NTFs受体纷纷重新暴露,说明损伤神经元的再生确实需要NTFs的救护^[4]。Cao等在大白鼠脊髓损伤局部注入NGF,发现NGF能够减少损伤神经细胞的凋亡^[3]。而BDNF除了具有诱导神经突起定向生长,决定感觉和交感神经纤维生长方向等NTFs所具有的效应外,还具有运动神经营养活性,能保护脊髓运动神经元在脊髓损伤后免于死亡^[6]。值得注意的是,不同的神经营养因子对不同类型的神经元作用有特异性,故应根据损伤神经元的类型选择对其敏感的神经营养因子^[7]。神经生长因子均为蛋白质,在正常情况下不能通过血脑屏障及脊髓屏障,限制了其在临床的实际应用。

2 拮抗轴突生长抑制因子

Schwab等发现,神经元轴突生长抑制因子与少突胶质细胞和中枢(非外周)轴突表面髓鞘的髓磷脂有关^[8]。现已鉴定了两种蛋白质因子,分别称之为NF-35和NF-250,它们能阻断培养的神经突生长。这些抑制因子的效应可被其单克隆抗体IN-1所阻断。若在脊髓损伤后立即中和生长抑制因子的作用,则轴突的再生会先于胶质疤痕出现^[9]。在成年鼠脊髓损伤的动物模型中,应用IN-1可促进皮质脊髓束从远端向受损区生长5~18mm,而未经治疗的对照组仅生长1mm;虽然生长的轴突数量不多,但这些抗体的应用可刺激运动功能的恢复;若在此基础上联合应用生长因子,则可极大地增强损伤纤维的出芽能力^[10]。

3 细胞及组织移植

作者单位:福建医科大学附属第一医院骨科,福建福州市350005。
作者简介:董锋(1979-),男,福建福州市人,硕士研究生(骨外科),医师,主要研究方向:脊髓损伤修复。

这是目前脊髓再生领域研究得最多,也是最有可能应用于临床治疗的手段。细胞移植可以避免再生轴突接触周围的抑制环境,另外某些细胞还可以产生部分神经营养物质,从而促进并引导轴突再生。目前可供选择的细胞类型有神经干细胞(NSC)、嗅鞘细胞(OEC)、施旺细胞(SC)、成纤维细胞(Fibroblast)、骨髓间充质干细胞(BMSC)等。

3.1 神经干细胞 成体动物脊髓内存在神经干(前体)细胞,而且在损伤后可以激活和增殖,但是不足以完成修复过程,需要补充外源性神经干细胞。NSC移植后主要分化成为胶质细胞,引导髓鞘形成,部分分化成为神经元,形成突触连接;有少部分分化为少突胶质细胞,形成髓鞘,主要是外周型髓鞘,集中在损伤部位。在和正常区域交接的部位,新生的髓鞘终止延长,所以不会干扰正常的轴突功能。2000年,Okano等从生后14d的大鼠脊髓获取NSC,经Neurosphere法培养增生后,移植到成年颈髓损伤大鼠损伤部位,移植后第5周,上肢深部感觉功能开始好转,同时发现移植部位出现新生神经元^[11]。Galin等把人类NSC植入脊髓损伤动物模型后细胞成活并使运动功能得到部分恢复^[12]。这一研究成果引起人们对神经干细胞移植治疗脊髓损伤的广泛兴趣。

3.2 施旺细胞 SC是周围神经系统(PNS)特有的胶质细胞,其促进周围神经再生的作用已被证实。SC能够分泌NTFs,包括NGF、BDNF、成纤维细胞生长因子(FGF)等,并能够产生细胞外基质(ECM)和细胞黏附分子(CAM)。ECM能包绕轴突形成基底膜,产生轴突髓鞘的管状结构,为再生轴突的延伸和生长提供隧道。SC移植至脊髓损伤部位可诱导感觉和运动轴突发芽,增生的SC可以引导再生的轴突达到靶组织,从而减小胶质疤痕,缩小损伤腔。1940年,Sugar等最早报道在大鼠胸段脊髓横断处移植溃变的坐骨神经,获得部分功能恢复。对老鼠和灵长类实验发现,移植外周神经后轴突生长最大的问题是延伸距离的限制^[13]。在外周神经向中枢神经移行时,会受到“中枢-外周神经过渡区”的限制,外周神经细胞在这里与星形胶质细胞接触而停止生长。早期的研究就证实,一旦外周神经或SCs桥里的神经纤维长入中枢神经系统,它们的延伸功能马上停止^[14]。这使SC在脊髓损伤中的应用受到了限制。近来人们将目光转移到了嗅鞘细胞上。

3.3 嗅鞘细胞 嗅鞘细胞起源于嗅基底膜,分布在嗅球、嗅神经,并可伴随嗅束迁徙入脑。它不同于星形细胞和施旺细胞,但同时具有这两种细胞的特性。嗅鞘细胞能分泌大量不同种类的神经营养和支持因子如NGF、BDNF、胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)等^[15];在其膜上表达出很多与细胞黏合和轴突生长相关的分子和促进神经生长因素分子,如PSA-N-CAM、N-CAM、Jaminin、Fibronectin。嗅鞘细胞可以自体取材移植,当嗅鞘细胞被移植入成年鼠的脊髓损伤区内,它们能与宿主神经实体组织结合为一体,抑制疤痕和空洞的形成,帮助再生神经轴突穿过抑制屏障如胶质组织,并随再生神经轴突迁徙到特殊靶点。在神经脱髓鞘的情况下,嗅鞘细胞能帮助神经髓

鞘化和加速神经电生理传导速度^[16]。Lu 等从成年 SD 大鼠嗅粘膜固有层分离培养嗅鞘细胞,并用 P75^{NTR} 抗体经免疫组化方法确认后植入到胸髓全横断损伤大鼠,术后 10 周大鼠后肢运动功能得到恢复,重新发现脊髓反射,逆行示踪显示,运动轴突重新穿过损伤区,恢复良好^[17]。2002 年 6 月,研究者在澳大利亚实施了首例脊髓损伤后用嗅粘膜固有层来源的嗅鞘细胞自体移植修复神经传导通路能力的临床试验^[18],不过对其功能恢复的评估要在 3 年以后进行,现在还不得而知,但嗅鞘细胞移植治疗却给瘫痪患者带来了新的希望。

3.4 骨髓间充质干细胞 BMSC 是一种成体干细胞,能诱导分化成神经元和胶质细胞,能分泌神经营养因子,细胞因子和其他生物活性因子。实验发现,BMSC 能分泌 BDNF 和 NGF,移植到脊髓后能减轻细胞凋亡,减少脊髓空洞,促进运动功能的恢复^[19-20]。BMSC 注射到脱髓鞘的脊髓损伤模型中,能促进髓鞘形成,主要为表现为周围型髓鞘,但有少部分(3%)形成的髓鞘和少突胶质细胞类似。Chopp 等首先成功建立大鼠脊髓损伤的动物模型,1 周后植入 MSCs,用 BBB(Basso Beattie Bresnahan)评分进行结果观察^[21]。Lu 等应用 MSCs 移植治疗大鼠脑损伤模型,移植后神经功能较对照明显改善,在移植后第 14 天处死动物,经图像分析发现,损伤体积较对照组明显缩小^[22]。日本东京大学的研究者观察了 MSCs 移植对脊髓神经细胞的作用和对脊髓损伤后再生的影响,受试动物显示了显著的肢体功能重建^[23]。

4 基因治疗

基因工程的问世使人们已开始研究联合应用基因转移技术治疗脊髓损伤。如人们将转基因技术和目前研究较多的组织细胞移植等结合起来,让局部释放的 NTFs 不断刺激和引导宿主纤维与移植物的整合与联系,从而促进脊髓损伤的修复;也可利用基因工程技术克隆抑制脊髓再生的蛋白的基因,导入其反义核苷酸,抑制这些蛋白的表达,从而达到促进脊髓再生的目的。1994 年,Tuszynski 等将 NGF 基因修饰原代成纤维细胞后再植入无损伤鼠脊髓中,1 年后,植入的成纤维细胞仍然成活,并促使大量的脊髓轴突再生。Menci 等通过携带人 BDNF 基因的逆转录病毒载体转染 SC,使其分泌 BDNF,促进大鼠脊髓横断区轴突生长。Tobias 等用相似的方法修饰成纤维细胞,并移植到大鼠的脊髓半横断区,通过示踪技术观察到它能明显促进红核脊髓束轴突的再生,肢体运动功能也有明显改善^[24]。国内陈礼刚等还将 21.5 kDa 的髓鞘碱性蛋白基因修饰 SC,然后移植入大鼠的脊髓半横断损伤模型,发现移植经修饰的 SC 组的功能恢复要比单纯 SC 组好得多^[25]。基因修饰细胞对促进脊髓再生有着十分诱人的前景。

5 展望

虽然在过去的二十多年中,脊髓再生研究已取得巨大的进展,但同时有很多不利因素和治疗技术难关还需要攻克。下一步的研究重点可以放在以下几个方面:①细胞移植与组织工程结合,利用良好的载体或支架来填充脊髓缺损,并为移植细胞的生长分化提供场所;②细胞移植与基因工程结合,通过转基因使细胞具有更多的功能,通过基因敲除、基因沉默等技术去除细胞上对于移植治疗脊髓损伤的不利因素;③结合多细胞因子的联合移植,创造脊髓修复所需的微环境。随着对脊髓再生的复杂性及对联合应用多种治疗手段的必要性的进一步理解,在不久的将来,一定会有有效的治疗方法应用于临床。

[参考文献]

- [1] Whittenore SR. Neuronal replacement strategies for spinal cord injury[J]. Neurotrauma, 1999, 6(8): 667 - 673.
- [2] Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. BDNF-expressing marrow stromal

cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2005, 191(2): 344 - 360.

- [3] Arthur B, Mary JR, Lynne CW. NGF message and protein distribution in the injured rat spinal cord[J]. Exp Neurol, 2004, 188(1): 115 - 127.
- [4] Qiao L, Vizzard MA. Up-regulation of tyrosine kinase (Trka, Trkb) receptor expression and phosphorylation in lumbosacral dorsal root ganglia after chronic spinal cord (T₈ - T₁₀) injury[J]. Comp Neurol, 2002, 449(3): 217 - 230.
- [5] Cao X, Tang C, Luo Y. Effect of nerve growth factor on neuronal apoptosis after spinal cord injury in rats[J]. Neurotrauma, 2002, 5(3): 131 - 135.
- [6] Kim DH, Jahng TA. Continuous brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion after methylprednisolone treatment in severe spinal cord injury[J]. Korean Med Sci, 2004, 19(1): 113 - 122.
- [7] Novikova LN, Kellerth JO. Differential effects of neurotrophins on neuronal survival and axonal regeneration after spinal cord injury in adult rats[J]. Comp Neurol, 2002, 452(3): 255 - 263.
- [8] Tatagiba M, Brosamle C, Schwab ME. Regeneration of injured axons in the adult mammalian central nervous system[J]. Neurosurg, 1997, 40(3): 541 - 547.
- [9] Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. Nature, 2000, 403(29): 434 - 439.
- [10] Schnell L, Schwab ME. Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibition[J]. Neuron, 1990, 343: 269.
- [11] Okano H, Momma S, Blaise D, et al. Transplantation of in vitro expanded neural stem cells results in neurogenesis and recovery of motor function after spinal cord contusion injury in rats[J]. Soc Neurosci, 2000, 26(4): 863.
- [12] Galvin KA, Jones DG. Adult human neural stem cells for cell-replacement therapies in the central nervous system[J]. Med Aust, 2002, 177(6): 316 - 318.
- [13] Levi AD, Dancausse H, Li X, et al. Peripheral nerve grafts promoting central nervous system regeneration after spinal cord injury in the primate[J]. Neurosurg, 2002, 96(2 Suppl): 197 - 205.
- [14] Franklin RJ. Remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells[J]. Anat Rec, 2003, 271(1): 71 - 76.
- [15] Richard F, Susan CB. Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair[J]. Biochem Cell Biol, 2005, 37(4): 693 - 699.
- [16] Kato T, Honmou O, Uede T, et al. Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord[J]. Glia, 2000, 30(3): 209 - 218.
- [17] Lu J, Féron F, Ho SM, et al. Transplantation of nasal olfactory tissue promotes partial recovery in paraplegic adult rat[J]. Brain Research, 2001, 889(1-2): 344 - 357.
- [18] Kathryn Senior. Olfactory ensheathing cells to be used in spinal cord repair trial[J]. Lancet Neurol, 2002, 1(5): 269.
- [19] Chen X, Katakowski M, Li Y, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production[J]. Neurosci Res, 2002, 69(5): 687 - 691.
- [20] Harvey RL, Chopp M. The therapeutic effects of cellular therapy for functional recovery after brain injury[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2003, 14(1 Suppl): 143 - 151.
- [21] Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation[J]. Neuroreport, 2000, 11(13): 3001 - 3005.
- [22] Lu D, Li Y, Mahmood A, et al. Neural and marrow-derived stromal cell sphere transplantation in a rat model of traumatic brain injury[J]. Neurosurg, 2002, 97(4): 935 - 940.
- [23] Wu S, Suzuki Y, Noda T, et al. Bone marrow stromal cells enhance differentiation of cocultured neurosphere cells and promote regeneration of injured spinal cord[J]. Neurosci Res, 2003, 72(3): 343 - 351.
- [24] Tobias CA, Shumsky JS, Shibata M, et al. Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration[J]. Exp Neurol, 2003, 184(1): 97 - 113.
- [25] 陈礼刚, 高立达, 卢敏, 等. PSVPo Meat 微基因修饰雪旺细胞移植对脊髓的修护作用[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(1): 53 - 55.

(收稿日期: 2005-12-29)