

脊髓损伤的移植物研究现状

陈晓斌, 孙天胜, 马舟涌

[摘要] 通过移植的方法促进轴突的再生和部分功能的恢复是目前脊髓损伤治疗的重要研究方向, 这些方法在脊髓损伤的动物模型中和一些临床试验中已经取得了一些进展。本文综述目前应用于临床或基础研究的植入物种类及其作用机制。

[关键词] 脊髓损伤; 移植; 治疗; 综述

Advance in Transplants for Spinal Cord Injury (review) CHEN Xiao-bin, SUN Tian-sheng, MA Zhou-yong. The Institute of Orthopaedics of Chinese PLA, Beijing Army General Hospital, Beijing 100700, China

Abstract: Several transplantation strategies have made some advance in promoting axonal regeneration and partial functional recovery in animal models of spinal cord injury and in some clinical trials. This article reviews the transplants used in recent laboratory studies and phase I clinical trials, introduces their application condition and mechanism of action, etc.

Key words: spinal cord injury; transplant; treatment; review

[中图分类号] R651.2 [文献标识码] A [文章编号] 1006-9771(2007)11-1005-03

[本文著录格式] 陈晓斌, 孙天胜, 马舟涌. 脊髓损伤的移植物研究现状[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(11): 1005—1007.

目前, 临床上对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI) 还缺乏有效的治疗, 而要解决这个问题, 关键在于提高 SCI 后神经再生能力。临床工作者和科学家们在神经再生研究的实验上已经取得了一些进步, 如通过一些移植物在动物模型甚至前期临床实验上促进轴突再生和部分功能恢复的一些方法已经或正在形成。这些方法主要是在 SCI 损伤后形成的局部环境中移植具有生长允许特性的基质, 从而使轴突的再生能通过抑制性的损伤部位。目前研究的移植物主要可以分为各种组织、各种细胞、一些生物材料以及这些材料和多种生物分子的联合应用等。在这篇综述中, 我们简要地回顾目前正用于临床或动物模型上的植入物, 包括其作用机制、应用情况等方面的问题。

1 组织移植

1.1 周围神经组织 周围神经组织(peripheral nervous system, PNS)是较早、较常使用的移植材料, 其作用机制为: ①神经束膜内层扁平上皮的基膜构成基膜管, 为新生轴突提供物理性通道; ②PNS 的施万细胞可髓鞘化再生轴突, 并能合成、分泌多种高浓度神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)、细胞外基质和细胞间粘附分子, 有利于神经元存活并促进轴突再生; ③施万细胞可抑制星形胶质细胞过度增殖, 减轻胶质瘢痕形成; ④适度刺激室管膜细胞增殖, 使其有利于脊髓再生^[1]。

Cheng 等应用自体周围神经混合酸性成纤维细胞生长因子, 用 fibrin 胶粘合桥接于雌性大鼠横断脊髓的两断端, 分不同部位将损伤脊髓两断端的传导束、白质和灰质连接起来, 为轴突再生经过 SCI(常常有横断的缺损)后留下的区域提供了桥接作用, 通过术后 6 个月的行为功能和免疫组化实验观察发现, 损伤脊髓的结构和功能得到明显的恢复^[2]。

Cheng 的这项研究对于后期的一些实验产生了巨大的鼓舞, 很多学者期望通过多组独立对照重复 Cheng 的实验, 但均没有完全重复出 Cheng 的结果^[3]。在临床前期的研究中也有一

些报道。Steeves 2004 年将周围神经植入 8 例火器导致完全性 SCI 患者, 随访 5 年后, 接受移植的患者没有感觉或运动功能的恢复^[4]。虽然 Steeves 的试验没有取得成功, 但随后 Cheng 再次报道了 1 例治疗刀戳伤致 T₁₁ 不完全损伤 4 年后的病例, 在此例中他用了 4 段自体腓肠神经植入脊髓缺损部位, 使其横跨脊髓缺损部位两端, 术后 2.5 年, 患者运动和感觉功能均有明显改善^[5]。

1.2 胚胎神经组织 相较 PNS 而言, 胚胎神经组织更适合作为改善 SCI 后局部环境的材料。因为胚胎微环境对轴突生长是允许性的, 这种允许的特性是因为其中缺乏抑制性的髓磷脂及相关的分子, 并且在损伤后保持了一定的可塑性, 当把它移植到损伤的脊髓后, 能对再生的宿主轴突起到桥梁的作用; 另外, 它可能是脊髓内神经元的一个来源, 能对神经传导提供功能性的传递作用。而外周神经移植物则只能作为支持轴突生长的基质来发挥作用。

胄少汀等^[6]总结了胚胎神经组织移植物的作用机制: ①神经救援作用: 通过提供多种神经营养因子, 对损伤的神经元起到救援作用和促进神经功能恢复; ②桥接作用: 为损伤的宿主轴突提供一个连接通道; ③中继作用: 移植的胚胎组织作为一个中间站, 使宿主上、下行传导束在此交换神经元后再传递到宿主远近端; ④向成熟组织分化, 使移植物达到器官样结构。

Thompson^[7]、Falcis^[8]等对人类胚胎神经组织移植治疗 SCI 做了研究。他们将从多个胚胎收集到的胚胎神经组织以液体状植入脊髓损伤后留下的空腔中, 观察空腔是否变小及病情进展情况。随访 2 年后观察发现, 空腔局部有神经组织替代。因为这项研究是在广泛的胚胎神经移植治疗 SCI 的动物模型基础上开展的, 目前受到了较多有关移植杂志的认可。但是, 相对于损伤后遗留的空腔来讲, 可用的组织太少了, 要想完全替代留下的较大空腔似乎不太可能, 且由于胚胎神经组织供体来源受限, 以及社会道德、伦理方面的原因, 使其临床应用研究受到很大限制。

1.3 肌基膜管 骨骼肌纤维被较厚的一层基膜所包绕。将骨骼肌原位破坏, 细胞浆和细胞膜变性而被排除, 其基膜仍保持

作者单位: 北京军区总医院全军骨科研究所, 北京市 100700。作者简介: 陈晓斌(1978-), 男, 宁夏中卫市人, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 脊柱脊髓损伤及修复。

完整,称之为肌基膜管(muscle fiber basallamina siphon, MBS)^[10]。MBS 的排列结构与神经膜管类似,仅在直径上略大于神经膜管,通过向动物脊髓横断处移植 MBS,能提供类似神经膜管样的通道,改变脊髓损伤部位的微环境,从而创造轴突再生的条件。同时应用神经生长因子(nerve growth factor, NGF)提高神经轴突的再生能力,促进损伤的脊髓再生修复,以期达到恢复部分脊髓神经功能的目的。

张红旭等对肌膜管加 NGF 的移植作了实验研究。他们取小鼠脊柱椎旁肌纤维排出肌浆制成肌膜管,将制备好的肌膜管在含有 NGF 的最小必需培养基(minimal essential medium, MEM)中浸泡后,植入脊髓缺损处。观察 12 周后,发现肌基膜管成活,管道数量无改变,再生轴突可以长入肌基膜管,但数量和长度有限,也无神经功能恢复和轴突生长诱导作用^[11]。李培建等以雌性家犬为实验对象,对 NGF 结合 MBS 修复脊髓横断性损伤进行组织学评价。6 个月后,用免疫组化对神经轴突和胶质细胞网格框架结构进行特异染色,并用图像分析方法对脊髓横断处的远、近端横截面神经纤维进行定量研究。结果表明,各组间远端神经纤维数量均有显著性差异, MBS 移植植物中有神经纤维通过,对照组断端为坏死空腔,电镜证实横断远端存在新生神经纤维^[12]。

2 细胞移植

和组织相比,分离的细胞具有损伤小、方便移植的优点,并能更好地控制细胞数量、细胞类型,转导有益于修复的因子、作为基因治疗的载体等。就细胞移植而言,目前最急迫的问题是确定种子细胞。

2.1 施万细胞 施万细胞是一种在 SCI 后移植治疗中研究较多的细胞,它能够支持和引导外周神经轴突的再生,而支持轴突生长是外周神经能够成功再生的主要因素。把施万细胞移植到损伤的脊髓后,大量中枢神经(CNS)轴突可以沿施万细胞形成的引导管道再生^[13]。施万细胞最有希望的用途可能是它能为再生的轴突提供一个允许的、支持性的环境,联合应用其他一些治疗措施能够诱导轴突在宿主内有较长距离的再生,移植基因修饰产生脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和神经营养蛋白-3(neurotrophin 3, NT-3)的施万细胞时,其再生效果更为明显^[14]。

2.2 嗅神经鞘细胞 嗅神经鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)是一种仅位于嗅神经和嗅球第 1、2 层的大胶质细胞,可以终生产生维持神经元存活和轴索延长的 NTFs 和神经突促进因子;在神经轴突发育和再生时,包裹轴突并随延长的轴突一同迁移。有证据显示,该细胞有施万细胞和星型胶质细胞的双重作用^[15], OECs 的这一特性使成熟动物的嗅神经轴索具有移植后比施万细胞更容易整合进中枢神经系统组织的特性。因此,嗅鞘细胞引起人们的广泛的兴趣,目前已经有一些嗅细胞移植治疗各型中枢神经系统疾病的前期临床实验的研究。

目前虽然在一些实验中结果很令人鼓舞,但是在实验室之间,实验结果的重复性并不令人满意。用嗅神经细胞的一个局限就是它本身也含有施万细胞,而用目前的培养方法还不能将其与施万细胞分离开来,因此就无法确定是否移植植物中是只有嗅细胞还是混合有施万细胞。

2.3 少突神经胶质细胞 少突神经胶质细胞前体易于培养,并

且比分化后的少突神经胶质细胞移植后更容易成活,对于脊髓脱髓鞘有修复作用。

McDonald 等进行了猪胚胎少突神经胶质前体细胞治疗 1 年或 1 年以上的 SCI 的研究。猪胚胎少突神经胶质前体细胞被植入损伤的脊髓部位,随访若干年后发现,少突神经胶质前体细胞使少突神经胶质细胞和神经系统髓鞘细胞增多^[16]。这种研究是在轴突还存活的慢性局灶性脱髓鞘的前提下进行的,是借助移植来修复神经的髓鞘细胞的过程。

2.4 多能干细胞 多能干细胞与血源干细胞相似,是具有多潜能性的细胞,其主要特征包括:①自我更新;②可分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞;③通过不对称分裂产生除自身以外的其他细胞。哺乳动物的胚胎和成熟个体体内均存在神经干细胞。神经干细胞存在于哺乳动物脑和脊髓中,不同区域可能有着不同的生物学特性。近来已由哺乳类动物的脊髓和脑室下区中分离出来多能干细胞,以腰骶部脊髓中为最多。

Brustle 等将多能胚胎干细胞移植到脱髓鞘大鼠模型中,发现多能胚胎干细胞可与宿主脑部和脊髓中的神经元相互作用,尤其与有髓轴突的作用明显,提示多能胚胎干细胞可作为种子细胞进行移植^[17]。这一重要发现提示将干细胞用于脊髓损伤的可能性。虽然干细胞移植在多种疾病中取得了一些进展,但实际应用中还存在许多问题需要解决。

3 生物材料的应用

生物工程技术的发展为 SCI 的再生修复治疗带来了新的希望,这些材料被设计成纵形的管道状,允许轴突呈线形生长,有的还设计带有横向的微孔,使内置的生物分子可以不断向外释放,并能使管道周围营养成分进入其中,接受移植的实验动物可以获得不同程度的轴突再生和功能恢复。最近,组织工程化软骨、骨、皮肤、肌腱及部分内脏组织的研究取得明显进展,由此促使神经组织工程研究有了新的进展。神经系统细胞和新型生物支架材料研究的突破使 SCI 后的组织工程化修复成为可能。国内外此类研究虽然刚起步,但均有了良好的进展。

组织工程产品支架在目前的植入研究中是一个重要的方向。明胶(gelatin)是应用比较广泛的一种组织工程材料,它不仅用作三维多孔支架,更为信号分子的控制释放载体,并提供暂时的力学支撑;同时,其孔隙不仅能为细胞提供一个生存的三维空间,有利于细胞获取足够的营养,而且还能排除代谢产物,进行物质交换,使细胞能在预先设计的支架上增殖与分化^[18]。单纯的明胶支架并不能满足大部分组织修复的要求,通常应用的大都为明胶复合材料。

Houweling 等将含有 NT-3 的鼠尾胶原移植到脊髓损伤处,观察到再生的皮质脊髓束神经纤维长入胶原内,动物的运动功能得到部分恢复^[19]。他们认为,胶原可以抑制脊髓横断处移植植物与宿主组织间胶质瘢痕的形成。Weidner 等把施万细胞培养在胶原凝胶上,再移植到脊髓全处,也观察到再生的神经纤维长入移植的胶原凝胶中^[20]。Liu 等用胶原制成导管,植入到脊髓半横断的腔隙中,9 个月后可观察到脊髓损伤处头侧端的神经纤维经胶原导管生长到尾侧端^[21]。陈礼刚等将含 pSV-PoMcat 微基因的施万细胞悬液重悬于一定体积的盐溶液,然后将上述悬液 3 ml 浸透在与宿主脊髓间隙大小一致的可吸收明胶海绵上,并将其植入动物模型中。实验表明,移植 pSV-

Po Mcat 微基因修饰施万细胞能降低组织水肿程度,使受损后脊髓内增高的 Na^+ 、 K^+ 明显降低 ($P < 0.01$),改善细胞内环境;而单独使用明胶移植的对照组中受损伤脊髓内后增高的 Na^+ 、 K^+ 浓度无显著变化^[22]。

4 营养因子和其他因子的使用

多种神经营养因子在促进轴突再生方面有重要作用。目前应用的神经营养因子主要包括 BDNF^[23]、胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)^[24]、NT-3^[25] 等。它们具有支持运动神经元存活、促进感觉和运动神经元轴突生长的作用^[23-25]。传递的方法主要包括局部直接注射、应用病毒载体^[23]和细胞载体^[23]进行传递等。移植到 SCI 区域的基因修饰细胞不仅能在局部提供大量的营养因子,它也可能是支持轴突生长的基质,从而有可能连接损伤的脊髓残端。用于基因修饰和移植的细胞包括成纤维细胞、施万细胞、OGCs 和神经干细胞等。

随着临床前期实验在轴突再生方面取得的一些进步,使得将一些效果特别好的移植物用于临床治疗的期望离我们越来越远。但存在的问题还有很多。首先,因为采用的实验动物、损伤模型、实验方法和结果评定方面存在着巨大差异,我们很难对不同实验小组的实验结果进行客观、综合的评价。所以,加强不同研究组织之间的交流、沟通、学习,并且对实验动物和损伤模型等方面进行规范,便于对各个科研组织的实验结果进行对比分析是目前需要认真考虑的问题。其次,目前 SCI 再生修复研究中很多还只是停留在动物实验阶段,前期的临床试验因为技术方法、伦理等原因还受到很多限制,而我们不可能把从动物身上取得的结果直接应用到临床上来。所以,从实验到临床、从动物到人的应用还有相当长的一段路要走。最后,鉴于脊髓再生的复杂性和困难性,任何单独的治疗手段可能都不足以修复损伤的脊髓。为了能最大程度修复损伤的脊髓,在适当的时间联合使用各种治疗性手段是必要的。而如何设计合理、科学的联合治疗措施将是下一步研究的重点。

[参考文献]

- [1] Zrita M, Vqero J, Oya S. Grafting of neural tissue in chronically injured spinal cord: influence of the donor tissue on regenerative activity[J]. Surg Neurol, 2000, 54(2): 117 - 125.
- [2] Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function[J]. Science, 1996, 273: 510 - 513.
- [3] Onifer SM, Loo KE, Cannon AB, et al. Combining methylprednisolone, peripheral nerves, FGF1, Fibrin, and vertebral wiring for spinal cord repair. Soc Neurosci Abstr, 1999, 25: 492.
- [4] Steeves J, Fawcett J, Tuszynski M. Report of international clinical trials workshop on spinal cord injury February 20 - 21, 2004, Vancouver, Canada[J]. Spinal Cord, 2004, 42: 591 - 597.
- [5] Cheng H, Liao KK, Liao SF, et al. Spinal cord repair with acidic fibroblast growth factor as a treatment for a patient with chronic paraplegia[J]. Spine, 2004, 29: E284 - 288.
- [6] 胥少汀,郭世绂.脊髓损伤基础与临床[M]. 2 版.北京:人民卫生出版社, 2002: 439.
- [7] Thompson FJ, Reier PJ, Uthman B, et al. Neurophysiological assessment of the feasibility and safety of neural tissue transplantation in patients with syringomyelia[J]. J Neurotrauma, 2001, 18: 931 - 945.
- [8] Falci S, Holtz A, Akesson E, et al. Obliteration of a posttraumatic

spinal cord cyst with solid human embryonic spinal cord grafts: first clinical attempt[J]. J Neurotrauma, 1997, 14: 875 - 884.

- [9] Reier PJ, Anderson DK, Young W, et al. Workshop on intraspinal transplantation and clinical application[J]. J Neurotrauma, 1994, 11: 369 - 377.
- [10] Sanes JR, Marshall LM, McMahan UJ. Reinnervation of muscle fiber basallamina after removal of myofibers: differentiation of regeneration axons at original synapticsits[J]. J Cell Biol, 1978, 78: 176 - 182.
- [11] 张红旭,胥少汀,吴霞,等.肌膜管结合神经生长因子修复脊髓缺损的实验研究[J].中华骨科杂志, 1995, 15: 32 - 35.
- [12] 李培建,胥少汀.肌膜管移植及神经生长因子对脊髓横断性损伤的修复作用[J].中国脊柱脊髓杂志, 2000, 10: 220 - 223.
- [13] Takami T, Oudega M, Bates ML, et al. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord[J]. J Neurosci, 2002, 22(15): 6670 - 6681.
- [14] 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.
- [15] Raisman G. Specialized neuroglial arrangement may explain the capacity of vomeronasal axons to reinnervate central neurons[J]. Neurosci, 1985, 14: 237 - 254.
- [16] McDonald JW, Becker D. Spinal cord injury: promising interventions and realistic goals[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2003, 82: S38 - 49.
- [17] Brustle O, Jones KN, Learish RD, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: A source of myelinating transplants[J]. Science, 1999, 285: 754 - 756.
- [18] Huttmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage[J]. Biomaterials, 2000, 21: 2529 - 2543.
- [19] Howeling DA, Lankhorst AJ, Gispens WH, et al. Collagen containing neurotrophin-3 (NT-3) attracts regrowing injured corticospinal axons in the adult rat spinal cord and promotes partial functional recovery[J]. Exp Neurol, 1998, 153(3): 49 - 59.
- [20] Weidner N, Blesch A, Grill RJ, et al. Nerve growth factor 2 hypersecreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L1[J]. J Comp Neurol, 1999, 413(4): 495 - 506.
- [21] Liu S, Said G, Tadie M. Regrowth of the rostral spinal axons into the caudal ventral roots through a collagen tube implanted into hemisectioned adult rat spinal cord[J]. Neurosurg, 2001, 49(1): 143 - 150.
- [22] 陈礼刚,高立达,曾凡俊,等. pSVPoMcat 微基因修饰雪旺细胞脊髓内移植对损伤脊髓细胞的保护作用[J].中华实验外科杂志, 1998, 15(6): 584.
- [23] Koda M, Hashimoto M, Murakami M, et al. Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord[J]. J Neurotrauma, 2004, 21(3): 329 - 337.
- [24] Cao L, Liu L, Chen ZY, et al. Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair[J]. Brain, 2004, 127(Pt3): 535 - 549.
- [25] Tuszynski MH, Grill R, Jones LL, et al. NT-3 gene delivery elicits growth of chronically injured corticospinal axons and modestly improves functional deficits after chronic scar resection[J]. Exp Neurol, 2003, 181(1): 47 - 56.

(收稿日期: 2007-08-13 修回日期: 2007-09-28)