

脊髓损伤修复研究的现状与展望

沈慧勇, 刘 鹤

(中山大学附属第二医院骨科 510120 广州市)

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-10-0785-04

2006年统计数据显示,全世界脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的患病率为(233~755)/百万,年发病率为(10.4~83)/百万^[1]。各国学者多年来尝试多种方法试图攻克这一难题,尽管许多研究在相关基础领域取得了一定的进展,但这些进展并没有获得显著的功能恢复。SCI的治疗仍然是世界性医学难题。这主要是由于脊髓损伤的修复不同于其他组织的修复,不仅要求对神经组织位置和形态上的修复,而且要求功能上的替代和修复。同时因为对神经元发育过程了解有限,导致目前很多研究结果同预期大相径庭,甚至是南辕北辙。因此,有学者提出应该调整脊髓损伤修复研究的思路,也提出了一些新的对策。笔者对此作一综述。

1 损伤轴突或神经元的再生

为使损伤的轴突再生,科学家们尝试去除或中和损伤后产生的抑制轴突再生的因子。1995年Bregman^[2]首次报道应用髓鞘相关神经生长抑制因子抗体(IN-1)可以促进皮质脊髓束纤维的再生。在此项研究的基础上,人们陆续进行了众多针对轴突再生抑制因子的研究。例如有人移植巨噬细胞清除髓鞘相关生长抑制因子等^[3],取得了不同程度的进展,人们对脊髓损伤后髓磷脂中轴突生长抑制因子的认识逐渐深入。脊髓白质中的Nogo-A是最早发现的抑制因子,消除其作用后脊髓组织将退回至未成熟状态^[4]。随后又发现了髓磷脂相关糖蛋白(MAG)及少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(Omgp)。2002年Domeniconi^[5]的研究证明上述三种重要的神经再生抑制因子,通过共同的受体——NgR而起作用。同时GrandPre^[6]发现Nogo-66的受体即NgR的对抗肽可以促进损伤后的轴突再生。随后针对Nogo的研究成为脊髓损伤修复的研究热点。2005年Zheng^[7]采用基因敲除的方法,彻底消除Nogo的抑制作用,但结果并没有出现预期的轴突再生,提示Nogo的作用机制比人们想像的要复杂。而且针对3种主要的轴突生长抑制因子的大部分研究结果只是显示组织学的轴突延长,而且延伸的长度并不大,并没有产生确切的功能恢复。

脊髓损伤后增生的胶质瘢痕也是阻碍轴突再生的成

分。2002年Bradbury等^[8]利用软骨素酶降解神经胶质疤痕中的硫酸软骨素蛋白多糖,以求达到促进轴突再生的目的。也有人报道应用软骨素酶降解硫酸软骨素蛋白多糖后,轴突延长并可以穿过胶质疤痕^[9]。但都因为断裂的轴突本身的再生能力有限,始终都不能达到确切的功能改善。

除尝试消除轴突再生过程中的抑制因素外,还有学者尝试通过神经营养因子的方式促进轴突再生。Grill等^[10]证明神经营养因子-3(NT-3)可以促进皮质脊髓束纤维的再生;Bradbury等^[11]报道NT-3可以改善大鼠脊髓背侧束上行感觉纤维损伤后的再生;Oudega等^[12]证明神经生长因子(NGF)可以促进成年大鼠感觉神经纤维的再生。在Shewan等^[13]发现与成熟神经元再生潜能下降相关的cAMP水平降低后,cAMP也被认为是可以促进轴突再生的因素。Qiu等的研究^[14]证明应用cAmp可以介导损伤后的轴突再生。此类研究得到的结果多数为组织学观察到的数毫米内的优于对照组的不同程度的轴突延长,但不能达到有效的功能恢复。

可见,对SCI的研究目前主要集中于如何突破轴突再生的难题,这一研究的三个主要目标是:(1)诱导并加强轴突的再生和延长;(2)引导再生的轴突与靶器官再连接;(3)重建神经通路。尽管很多实验报道了多种手段可以改善功能的恢复,但是没有一个可以达到以上的三个目标。事实上,只有第一条被深入的研究并且有确定的结果,几乎没有研究结果显示再生的轴突真正形成了有功能的突触后连接^[15]。

2002年Goldberg等^[16]的研究证明中枢神经系统成熟神经元的不可再生不止是外在的因素所致,主要的原因在于内在的原因。哺乳动物在胚胎发育早期,切断的脊髓可以完全再生及功能恢复,但过了某一时间点,切断后则不能再生。制约轴突再生的机制可能远比人们想像的要复杂,那么最直接、最根本的原因是什么呢?目前已经证实胚胎发生阶段神经元发出轴突,在导向因子的作用下向靶器官延伸,在轴突到达靶器官形成突触这一时间点的前后,神经元的功能性结构已经发生了复杂而又深刻的变化。该研究证实在这一个时间点前轴突的延伸方式主要依赖生长锥,而在这一个时间点之后则主要依赖微管的聚合作用^[17]。《Nature》2006年一篇文章在回顾了脊髓损伤的相关研究后指出:哺乳动物体内已经与靶器官形成突触连接的轴突如果发生断裂,它就无法再次特异性地识别、延伸并准确

第一作者简介:男(1962-),教授,博士生导师,研究方向:脊髓损伤

电话:(020)82332553 E-mail:shen999906@sina.com

地接触到靶器官,并与之形成突触连接^[18]。我们可以这样认为,神经元发育成熟的同时,其轴突的延伸能力减弱了,而且丧失了寻找靶器官并与之形成突触的能力^[19]。所以,许多研究所呈现的结果仅仅是轴突的延长(axon extension),而不能视为真正意义上的轴突再生(axon regeneration)。我们现阶段对中枢神经元成熟前后的超微功能结构变化的了解还非常有限,更谈不上能够将其逆转。

2 细胞移植技术

雪旺细胞对周围神经再生的促进作用促使学者们尝试应用雪旺细胞的移植来促进脊髓损伤后的轴突再生。Bunge^[20]应用以胶原支架为载体的雪旺细胞移植,观察其对脊髓损伤后轴突再生的作用,组织学可见轴突向移植支架内的长入,并观察到髓鞘化和无髓鞘的轴突,提示移植的雪旺细胞的确可以促进轴突的再生和髓鞘化。随后雪旺细胞与多种生物工程材料相结合移植治疗脊髓损伤的研究开展了很多,但无论是轴突再生的比例和延伸的长度都远远不如其在周围神经损伤修复领域所取得的成果。

1997 年 Li 等^[21]应用嗅鞘细胞移植于大鼠脊髓横断处,可促进皮质脊髓束的轴突再生,组织学可见断裂的脊髓再生穿过损伤区域,进入损伤尾端的传导束,并观察到了大鼠前肢功能的改善。随后开展了很多应用嗅鞘细胞移植的研究,学者们发现此方法应用在灵长类动物后,取得的效果不如 Li 所报道的在大鼠实验中的明显。分析原因可能是因为大鼠为低等动物,再生潜能强于灵长类动物。同时因伦理学的原因导致嗅鞘细胞来源不足,此类研究受到限制。

干细胞研究成为生命科学领域研究热点后,使人们想到应用干细胞移植的方法来再生损伤的神经纤维进而达到治疗脊髓损伤的目的。事实上近年来干细胞移植治疗脊髓损伤的研究也得到了广泛开展。因为干细胞拥有很大的分化潜能,移植后的干细胞可以分化为多种细胞或组织,如神经元、神经胶质细胞,甚至是瘢痕组织^[22]。其对脊髓损伤修复的机制也复杂多样,有分化为神经元的替代作用^[23]、移植后神经干细胞分泌神经营养因子的促进再生作用^[24],也有使脱髓鞘轴突的再髓鞘化作用^[25]。这些研究均取得了不同程度的成果,可使损伤的神经元和轴突产生一定程度的再生,但是获得明显功能改善的不多。干细胞移植后的分化结果与移植后内环境的诱导因素相关,而脊髓损伤后的内环境对移植的干细胞来说并不是一个好的诱导环境。迄今为止发现的 50 种胚胎时期影响神经系统发育的诱导因子在出生后动物体内虽然表达,但其分布完全改变,所以导致移植后干细胞的分化情况往往事与愿违^[18]。目前干细胞移植治疗脊髓损伤的研究大多集中于如何运用多种干预因素使移植的干细胞更好地存活并按能够有效修复的有序方式进行分化。

干细胞移植修复脊髓损伤迄今尚没有获得人们预期

的满意结果。究其原因,可能包括以下几个方面:(1)理论上讲,这种干预只能对脊髓损伤节段的受损神经元进行“替代”,很难解决上位神经元轴突损伤后导致的传导束中断的问题。而重建损伤平面以下低级中枢与皮质的联络通路对功能恢复具有决定性意义,因为传导束中断是脊髓损伤后功能障碍的主要原因。因此尽管移植后的外源性干细胞存活很好,却不能恢复因传导束中断而丧失的那部分功能,最多只能补偿因损伤处神经元坏死所造成的功能障碍。(2)移植入脊髓的干细胞如何“替代”受损或坏死的神经元,是位置替代还是功能替代?如何清除那些受损丧失功能却没有坏死的神经元?目前尚缺乏确切的解释,而最多的发现只是干细胞在宿主组织内长期“存活”^[22]。(3)无论是脊髓还是大脑,外源性干细胞移植本身就是新的创伤。移植操作可能使本来完好的神经组织受到损伤,出现得不偿失的干预结果;同时,移植操作也破坏了中枢神经系统原有的微环境,影响神经元的分化、迁移与替代。以上诸多原因使外源性干细胞移植治疗脊髓损伤的研究结果不能令人满意,往往是组织学显示移植细胞成活良好,但是功能恢复却极其有限。

3 新的思路及对策

3.1 诱导内源性神经干细胞再生

如果神经系统内存在具有分化潜能的干细胞,那么最理想的是通过某种途径激活这些干细胞,促使它们分化并代替受损的神经元,所发出的轴突沿原通路延伸,直达靶细胞形成突触。传统观点认为发育成熟的大脑海马齿状回以及室下区存在神经细胞再生^[26]。由此有人提出假设,发生在成熟神经系统的神经再生源于内源性干细胞^[27]。随后又有人在中枢神经系统内不同位置发现具有再生和分化潜能的神经干细胞^[28]。1999 年 Gould 等^[29]在 Science 上发表文章,证实成熟灵长类动物新皮质的认知功能区有新生的神经元出现,进而证明这些新生神经元起源于室下区,迁徙而来并发出轴突。这打破了以往认为成熟哺乳动物新皮质不存在神经再生的定论,为脊髓损伤治疗提供了新的希望。因为连接大脑与脊髓的主要传导通路——皮质脊髓束的投射神经元就是位于新皮质的运动功能区,神经冲动由这里产生,经过皮质脊髓束下传至脊髓下运动神经元,进而经周围神经传导至肌肉产生自主运动。以往认为位于新皮质的上运动神经元无法再生,所以研究主要集中于促进已经断裂的轴突再生方面。随着对内源性干细胞研究的不断深入,人们可以用另外的思路,从另外的角度考虑断裂轴突的功能重建,但关键问题是诱导内源性神经干细胞分化需要适宜的诱导信号和局部内环境条件^[30],脊髓损伤并不能激发、诱导内源性干细胞分化。

在非人为干预的条件下,目前只发现中风、脑缺血和某些神经退变性疾病可以有限地激活内源性的神经再生,而包括脊髓损伤在内的大多数中枢神经系统损伤是不能激活再生的^[30]。Macklis 等^[31]在进行外源性干细胞移植的研

究时发现,诱导小鼠的新皮质锥体细胞同步凋亡可以为移植的外源性胚胎干细胞提供有利于迁徙和分化的内环境。那么可以诱导外源性干细胞的手段是否也可以为内源性神经干细胞提供有利的增殖和分化条件呢?有学者以此为基础,对靶向诱导神经元凋亡展开研究,并不断取得进展。2000 年 Magavi 等^[32]在 *Nature* 上的一篇文章报道:在以往被认为不会出现任何神经再生的成熟哺乳动物新皮质,应用靶向神经元凋亡技术可于原位诱导内源性神经干细胞分化为成熟神经元。这个研究结果被学术界视为里程碑式的发现。他们将含有二氢卟吩纳米微球的悬浊液注射在丘脑核团,通过神经元轴突的逆行摄取作用,约 2 周后微球到达神经元胞体,此时于神经元胞体对应的皮质位置,给予 674nm 波长的激发光照射(此激发光对组织无损伤作用),那些逆向摄取了光敏剂的神经元发生了同步凋亡。随后发现内源性神经干细胞原位分化为成熟神经元并替代了凋亡的细胞,新生神经元发出的轴突伸向凋亡的神经元原来分布的区域,证实这些新生的新皮质神经元具有靶向特异性的轴突再生功能。Magavi 等^[33]又于 2004 年报道:将光敏基团注射于颈髓,通过靶向凋亡技术同步凋亡上运动神经元。随后分别用 Doublecortin(Dcx)标记神经干细胞,用溴脱氧尿苷(BrdUrd)标记新生细胞元,证实新生的神经干细胞向上运动神经元坏死区域迁徙并分化为神经元替代原有神经元;最后在脊髓显微注射荧光金(fluorogold, FG)逆向标记神经元,在皮质呈现 BrdUrd 和 FG 双重标记的细胞,进一步证实新生神经元可发出投射纤维沿原通路进入脊髓。因此,激活、诱导内源性神经干细胞的分化与迁移,并加强新生神经元的轴突外伸能力,将为脊髓损伤的修复研究提供新的思路。

3.2 神经电生理领域的替代技术

人们在细胞移植和再生领域尝试修复脊髓损伤的同时,神经电生理领域的科学家们提出借助近年来迅猛发展的微电子技术,通过构建人工的神经电信号传导系统以替代受损的脊髓。

早在 1929 通过对脑电图的记录就发现神经电信号的存在,并为大脑不通过外周神经与外界联系提供了最初的研究基础。到 20 世纪 80 年代出现“脑-机接口”(brain-computer interfaces, BCI)或“脑-机械接口”(brain-machine interface, BMI),其主要目的是获得来自大脑皮层的命令信号,然后将这些命令作为新的功能输出来控制失神经支配的肌肉或者仪器,如计算机或自动机械臂,以解决瘫痪者的运动问题,使其能与外界联系。1999 年 Birbaumer 等^[34]利用体表可接收到的大脑神经电信号变化创造了特殊的拼写器——瘫痪患者学着用正相和负相慢波控制两组文字的选择,选中后经过一个排除过程,显示要保留的文字、词句和符号等,依此来与外界进行交流。之后此类研究逐渐深入,电极也由体表电极发展为更加精确的植入电极。随着对神经电信号编码转化的深入研究,电极结构也日趋复杂,出现了多行多列集合排列的“列阵电极”^[35]。Taylor 等^[36]

的实验将“脑-机接口”技术进一步完善,实验中的猴子大脑通过“脑-机接口”可以控制指针在三维空间捕捉目标。以此为基础,有人针对脊髓损伤提出应用微电子系统替代损伤的脊髓传导神经电信号,以达到治疗截瘫的目的。根据“脑-机接口”的基本原理,王志功等^[37]提出设想:采用一组微电极自受损脊髓神经束近端检测出来自大脑的运动控制信号,送入微电子系统,进行处理后再通过另一组微电极激励远端神经束,实现下行神经信道桥接和运动信号再生。同理再利用两组微电极,一组接远端感觉神经束,另一组接近端感觉神经束,中间接微电子系统,实现上行神经信道桥接即感觉信号再生。四组电极结合两套功能相同的微电子系统,有望实现脊髓神经受阻后所引起的肢体瘫痪患者的康复。他们通过大鼠的实验尝试对脊髓生物电信号的模式进行识别^[38],并取得了一定进展。但要想实现这一设想需要微电子领域、生物工程领域和医学领域的科学家进行跨学科的合作。

4 参考文献

- Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey[J]? *Spinal Cord*, 2006, 44(9): 523-529.
- Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, et al. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors[J]. *Nature*, 1995, 378(6556): 498-501.
- Lazar DA, Ellegala DB, Avellino AM, et al. Modulation of macrophage and microglial responses to axonal injury in the peripheral and central nervous systems[J]. *Neurosurgery*, 1999, 45(3): 593-600.
- Raineteau O, Fouad K, Noth P, et al. Functional switch between motor tracts in the presence of the mAb IN-1 in the adult rat[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12): 6929-6934.
- Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth[J]. *Neuron*, 2002, 35(2): 283-290.
- GrandPre T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration [J]. *Nature*, 2002, 417(6888): 547-551.
- Zheng B, Atwal J, Ho C, et al. Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(4): 1205-1210.
- Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury[J]. *Nature*, 2002, 416(6881): 636-640.
- Yick LW, Cheung PT, So KF, et al. Axonal regeneration of Clarke's neurons beyond the spinal cord injury scar after treatment with chondroitinase ABC [J]. *Exp Neurol*, 2003, 182(1): 160-168.
- Grill R, Murai K, Blesch A, et al. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial

- functional recovery after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 1997, 17(14):5560-5572.
11. Bradbury EJ, Khemani S, Von R, et al. NT-3 promotes growth of lesioned adult rat sensory axons ascending in the dorsal columns of the spinal cord [J]. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(11):3873-3883.
12. Oudega M, Hagg T. Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 1996, 140(2):218-229.
13. Shewan D, Dwivedy A, Anderson R, et al. Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway [J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(10):955-962.
14. Qiu J, Cai D, Dai H, et al. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP [J]. *Neuron*, 2002, 34(6):895-903.
15. Bradbury EJ, McMahon SB. Spinal cord repair strategies: why do they work? [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(8):644-653.
16. Goldberg JL, Klassen MP, Hua Y, et al. Amacrine-signaled loss of intrinsic axon growth ability by retinal ganglion cells [J]. *Science*, 2002, 296(5574):1860-1864.
17. Jones SL, Selzer ME, Gallo G. Developmental regulation of sensory axon regeneration in the absence of growth cones [J]. *J Neurobiol*, 2006, 66(14):1630-1645.
18. Harel NY, Strittmatter SM. Can regenerating axons recapitulate developmental guidance during recovery from spinal cord injury [J]? *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(8):603-616.
19. Blackmore M, Letourneau PC. Changes within maturing neurons limit axonal regeneration in the developing spinal cord [J]. *J Neurobiol*, 2006, 66(4):348-360.
20. Bunge MB. Transplantation of purified populations of Schwann cells into lesioned adult rat spinal cord [J]. *J Neurol*, 1994, 242(1 Suppl 1):S36-39.
21. Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells [J]. *Science*, 1997, 277(5334):2000-2002.
22. Cao Q, Benton RL, Whittemore SR. Stem cell repair of central nervous system injury [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68(5):501-510.
23. Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 69(6):925-933.
24. Blesch A, Lu P, Tuszynski MH. Neurotrophic factors, gene therapy, and neural stem cells for spinal cord repair [J]. *Brain Res Bull*, 2002, 57(6):833-838.
25. Akiyama Y, Honmou O, Kato T, et al. Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord [J]. *Exp Neurol*, 2001, 167(1):27-39.
26. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus [J]. *Nat Med*, 1998, 4(11):1313-1317.
27. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, et al. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system [J]. *Cell*, 1999, 96(1):25-34.
28. Doetsch F, Caille I, Lim DA, et al. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain [J]. *Cell*, 1999, 97(6):703-716.
29. Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, et al. Neurogenesis in the neocortex of adult primates [J]. *Science*, 1999, 286(5439):548-552.
30. Jagasia R, Song H, Gage FH, et al. New regulators in adult neurogenesis and their potential role for repair [J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(9):400-405.
31. Sheen VL, Macklis JD. Targeted neocortical cell death in adult mice guides migration and differentiation of transplanted embryonic neurons [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(12):8378-8392.
32. Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice [J]. *Nature*, 2000, 405(6789):951-955.
33. Chen J, Magavi SS, Macklis JD. Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(46):16357-16362.
34. Birbaumer N, Ghanayim N, Hinterberger T, et al. A spelling device for the paralysed [J]. *Nature*, 1999, 398(6725):297-298.
35. 王余峰, 吕晓迎, 王志功. 神经信号检测和功能激励微电极 [J]. *国外医学(生物医学工程分册)*, 2005, 38(3):129-133.
36. Taylor DM, Tillery SI, Schwartz AB. Direct cortical control of 3D neuroprosthetic devices [J]. *Science*, 2002, 296(5574):1829-1832.
37. 王志功, 顾晓松, 吕晓迎, 等. 微电子嵌入式神经信道桥接与信号再生 [C]. 2007 中国生物医学工程联合学术年会. 西安: 2007.50-53.
38. 陈栋, 吕晓迎, 王志功, 等. 大鼠脊髓自发信号的模式识别研究 [C]. 2007 中国生物医学工程联合学术年会. 西安: 2007.208-212.

(收稿日期: 2007-09-28 修回日期: 2008-01-09)

(本文编辑 卢庆霞)