

综述

细胞外基质应用于脊髓损伤修复的研究进展

Research progress of extracellular matrix on repair and regeneration of spinal cord injury

吴鸿雁, 陆继业, 张嗣晓, 蒋国强

(宁波大学医学院脊柱外科 315211 宁波市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2016.05.14

中图分类号: R683.2, Q813 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2016)-05-0462-04

哺乳动物中枢神经系统再生能力极为有限, 脊髓损伤后往往导致感觉及运动功能的永久缺失。受损脊髓的修复与再生仍是当今医学界的难题, 而组织工程技术的发展为其提供了新的解决方案。再生医学研究策略中, 以生物支架为中心, 辅以细胞及生物活性分子来替代修复结构功能受损组织的方法尤受关注。生物支架不仅能简单地桥接脊髓损伤处两侧残端, 还能作为运送细胞及生物活性分子及药物的载体, 可以说在脊髓损伤修复中起到了极为重要的作用。用于中枢神经系统修复的生物材料通常分为这几类: 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 来源生物材料 (如纤维蛋白、胶原、层粘连蛋白、去细胞组织等), 其他的天然聚合物 (琼脂、甲壳素等), 合成聚合物 (聚羟基酸等)。而 ECM 是由组织固有细胞合成并分泌到胞外、分布在细胞表面或细胞之间的大分子, 与细胞间存在可逆的动态平衡。其中通过去细胞技术获得的 ECM 支架, 不仅具有原器

官组织的空间结构, 并且保留了大量的生长因子, 有助于细胞粘附、增殖、分化, 是理想的生物支架, 拥有很多人工合成材料所无法媲美的优点。笔者就细胞外基质用于脊髓损伤修复及再生的研究进展做一综述, 并探讨其潜在的临床应用价值。

1 脊髓细胞外基质结构及构成

在中枢神经系统中 ECM 存在于神经元与胶质细胞之间, 构成了致密的基底结构。在脑中 ECM 约占 10%~20% 的脑容量^[1]。中枢神经系统中的 ECM 不仅提供了网络支撑结构; 更重要的是它能影响细胞粘附迁移, 在发育过程中指导轴突生长及突触形成, 而成年时在稳定突触及限制异常重构中又发挥了重要的作用。而在中枢神经系统损伤或疾病后, ECM 结构成分的改变反过来亦会对神经修复会产生不利的影响^[2]。

通常情况下, 结构蛋白如弹性蛋白、胶原和层粘连蛋白等是绝大多数系统组织 (如肌肉、软骨等) ECM 的主要组成部分, 而正常成年哺乳动物中枢神经系统中仅保留了少许此类蛋白, 而富含黏多糖及蛋白聚糖^[3]。此外神经元周

第一作者简介: 男 (1988-), 硕士研究生, 研究方向: 脊柱外科
电话: (0574) 87035140 E-mail: wuhongyan110@126.com
通讯作者: 蒋国强 E-mail: jgq6424@hotmail.com

- 22(12): 2695-2701.
25. Quan RF, Ni YM, Zhang L, et al. Short-and long-term effects of vertebroplastic bone cement on cancellous bone [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2014, 35: 102-110.
26. Turner TM, Urban RM, Singh K, et al. Vertebroplasty comparing injectable calcium phosphate cement compared with polymethylmethacrylate in a unique canine vertebral body large defect model[J]. Spine J, 2008, 8(3): 482-487.
27. Gumpert R, Bodo K, Spuller E, et al. Demineralization after balloon kyphoplasty with calcium phosphate cement: a histological evaluation in ten patients[J]. Eur Spine J, 2014, 23(6): 1361-1368.
28. Piazzolla A, De Giorgi G, Solarino G. Vertebral body recollapse without trauma after kyphoplasty with calcium phosphate cement[J]. Musculoskelet Surg, 2011, 95(2): 141-145.
29. Yoshii T, Ueki H, Kato T, et al. Severe kyphotic deformity resulting from collapses of cemented and adjacent vertebrae following percutaneous vertebroplasty using calcium phosphate cement: a case report[J]. Skeletal Radiol, 2014, 43(10): 1477-1480.
30. Aghyarian S, Rodriguez LC, Chari J, et al. Characterization of a new composite PMMA-HA/Brushite bone cement for spinal augmentation[J]. J Biomater Appl, 2014, 29(5): 688-698.
31. Aghyarian S, Hu X, Lieberman IH, et al. Two novel high performing composite PMMA-CaP cements for vertebroplasty: an ex vivo animal study [J]. J Mech Behav Biomed Mater, 2015, 50: 290-298.

(收稿日期: 2015-12-24 修回日期: 2016-02-02)

(本文编辑 彭向峰)

围网络(perineuronal nets, PNNs), 仅存在于成熟中枢神经系统。PNNs 是由包绕神经元的胞体和突起的数层致密的细胞外基质所构成, 它们在突触形成及连接的过程中起到控制和稳定的作用。PNNs 的密度也不是一成不变的, 在脑中大量存在于海马、听觉皮层、视觉皮层及体感皮层; 而在脊髓中, PNNs 包绕了腹角大约 30% 运动神经元, 中间灰质 50% 的中间神经元以及背角 20% 的神经元^[4-5]。其主要构成是透明质酸、连接蛋白和肌腱蛋白 R。普遍认为, 这种结构在中枢神经系统(CNS)再生中起到了至关重要的作用, 并且其形成与神经可塑性的减少呈正相关。

此外 ECM 不仅结合有多种生长因子及细胞因子, 还能调节其活性。如在神经干细胞微环境内, FGF-2 通过与硫酸肝素蛋白多糖结合以维持神经干细胞表型^[6]。

2 ECM 生物支架应用于脊髓损伤

ECM 作为生物支架, 可以分为单纯的 ECM 蛋白(如精制的胶原、纤维粘连蛋白、层粘连蛋白等), ECM 生物活性肽, ECM 与共聚物混合材料, 组织去细胞后获得的细胞外基质支架及其水凝胶。ECM 支架已经在众多领域得到了应用, 如血管、皮肤、骨、软骨、器官、肺、心及周围神经等, 然而将其用于脊髓损伤修复的研究报道相对较少。

2.1 单纯 ECM 蛋白

即使用单纯一种或几种 ECM 蛋白, 如胶原、层粘连蛋白、纤维蛋白、透明质酸等, 作为 ECM 生物支架的替代。这其中尤以胶原支架的相关研究报道较多, Han 等^[7]通过将线性排列的胶原支架与脑源性神经营养因子结合, 移植到脊髓全横断的大鼠中, 组织学分析显示术后损伤面积减少、胶原沉积降低, 促进了轴突再生及再髓鞘化, 术后 38 周实验组感觉及运动功能均获得明显提升。Qian 等^[8]通过使用新鲜大鼠血浆将纤维粘连蛋白、层粘连蛋白及胶凝纤维蛋白原有机结合起来, 构成细胞外基质为基础的生物支架, 不仅具有稳定的三维孔隙结构, 体外培养发现其有助于嗅鞘细胞的粘附、增生及促进突起延伸, 此外有助于神经生长因子、基质金属蛋白酶-3 及基质金属蛋白酶-9 的表达。然而此类纯蛋白支架的缺陷也是明显的, 首先它们无法完美模拟脊髓 ECM 天然三维结构, 并且这类支架往往只包含单一或少数几种 ECM 蛋白成分, 而组织天然 ECM 是由大量结构蛋白与生长因子、细胞因子的有机结合构成的。

2.2 ECM 生物活性肽

另一种更为简化的方式是使用短的生物活性肽序列, 如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸多肽(RGD)、酪氨酸-异亮氨酸-甘氨酸-丝氨酸-精氨酸多肽(YIGSR)和缬氨酸-丙氨酸-缬氨酸-异亮氨酸-赖氨酸多肽(IKVAV)等。这种生物活性肽经过表面修饰或者作为自组装多肽的一部分而被用于神经修复。从活性蛋白中提取合成的多肽片段能够特异性改变细胞行为^[9]。例如, 体外培养发现在一定适宜的 RGD 浓度下细胞神经突起延伸达到最佳程度, 过低或者

过高的浓度都会抑制突起延伸^[10]。此外, 将不同多肽结合可能诱导消极、累加又或者协同作用, 有研究显示在氟化聚合物表面将 YIGSR 和 IKVAV 结合有助于细胞的粘附及突起生长^[11]。

2.3 混合型支架

混合型支架由 ECM 中的结构蛋白成分与人工合成聚合物结合构成, 近来也获得许多关注。Cheng 等^[12]采用氧等离子体处理方案将层粘连蛋白整合到多孔甲壳素支架的内壁表面形成神经导管, 并将其移植入脊髓损伤大鼠中, 发现在不触发炎症反应及细胞凋亡的前提下有助于轴突穿过损伤交界处, 蛋白印迹分析证实其有助于 GAP-43 基因的表达及轴突再生。

2.4 去细胞生物支架

ECM 由组织或者器官上栖息的细胞所分泌, 与周围微环境形成动态平衡^[13]。通过去细胞处理得到的 ECM 支架在其他外周组织及器官中已获得了广泛的研究^[14-16], 而在 CNS 的研究相对较少, 且这些研究方案大多尚处于早期尝试, 因此 ECM 支架的修复及再生潜能有待进一步研究。近 10 年来, 去细胞组织 ECM 支架成为再生医学领域的研究热点。其主要原理是通过物理冻融方法, 结合酶、酸碱溶液、离子型去污剂、非离子型去污剂等将组织或器官中的细胞成分去除, 而最终保留细胞外基质结构。

3 去细胞生物支架用于脊髓再生

3.1 去细胞肌肉支架

近年来去细胞肌肉获得较多研究关注并被广泛用于组织再生, 也有报道将其应用于脊髓损伤修复中。Zhang 等^[16]将去细胞肌肉支架植入到胸段脊髓半横断大鼠中, 发现新生轴突芽生入支架中, 并在支架引导下通过损伤区域, 且在支架移植组中检测到较多的神经元存活。有意思的是, Xue 等将羊膜上皮细胞与去细胞肌肉支架结合, 联合移植至胸段脊髓半横切大鼠中, 术后 4 周, 与单纯支架移植组相比, 观察发现加入羊膜上皮细胞后, 有助于神经纤维的再髓鞘化, 再生轴突在支架中呈有序的线性排列, 及再生五羟色胺神经纤维, 并且延缓了大脑皮层运动诱发电位及皮层体感诱发电位, 促进功能恢复^[17]。

3.2 去细胞周围神经支架

Sondell 等^[18]率先通过使用 Triton X-100 及脱氧胆酸钠处理大鼠坐骨神经, 萃取得到了去细胞坐骨神经支架, 检测证实其髓鞘及施万细胞去除彻底, 而基膜管保留完整。将其移植至同种异体坐骨神经损伤大鼠模型中, 发现能促进轴突的芽生, 并且受体施万细胞迁移至原来空旷的基底膜管而未引起炎症反应。此后也有不少研究, 将去细胞神经支架应用于外周神经损伤的修复, 但迄今尚未见将其用于脊髓的报道。

3.3 去细胞脊髓支架

上述二类去细胞 ECM 支架都是异位组织来源(非脊髓来源), 有学者提出原位组织来源的 ECM 支架移植相对于

异位组织来源对于组织损伤修复的促进作用更为明显。ECM 支架的生化组分,机械属性及超微结构随着相应组织器官来源的不同而改变。从理论上来看,以原位组织或者器官为原材料制备得到的 ECM 是细胞存活、增生、分化以及组织重构的理想基质。最近的研究证实原位组织来源的 ECM 支架相对异位来源的 ECM 支架具有许多潜在优势。前者能优先维持组织特异性细胞表型,促进细胞增生,诱导组织特异性分化,并能促进细胞的趋药性^[19,20]。

而脊髓的去细胞支架的制备及研究开展的相对较晚,2010 年 Guo 等^[21]在 Sondell 等^[18]方案基础上率先成功制备了大鼠去细胞脊髓支架,检测分析显示其髓磷脂及轴突基本消失,在髓鞘染色中,尚观察到少量髓鞘碎片,ECM 支架大部分得到保留。此后多个研究团队也相继发表了去细胞脊髓的相关文章^[22,23],并取得了不错的成果。Jiang 等^[24]用京尼平对脊髓支架进行交联处理,不仅改善了支架的降解率,提升其机械属性,而在与 MSCs 共培养后,证实其具有良好的细胞相容性,更适宜于体内移植。Crapo 等^[25]通过冻融,胰酶消化,化学除垢剂联合应用对包括脑、脊髓、视神经在内的猪中枢神经系统组织去细胞处理,制备得到各自对应的去细胞支架。检测显示其保留有多种生长因子,进一步研究发现相对于膀胱来源的 ECM 支架,中枢神经系统来源的 ECM 支架更能促进神经细胞增殖和分化。Liu 等^[22]首次将脊髓去细胞支架结合 HUCB-MSCs 联合植入到脊髓半横断大鼠中,研究发现实验组神经细胞迁移至支架中,支架中新生髓鞘化的轴突,实验组获得了明显的运动功能恢复。

4 可溶性水凝胶 ECM 生物支架用于中枢神经系统损伤修复

水凝胶化的发展,使通过微创方式将 ECM 支架运输至缺损处成为可能,并进一步发掘了 ECM 支架的治疗潜能。DeQuach 等^[25]对猪脑去细胞处理制备得到的 B-ECM (brain derived ECM,脑细胞外基质)支架富于胶原,黏多糖及层粘连蛋白。随后把 B-ECM 消化酶解成水凝胶,并将其用于细胞培养,与人工基底膜相比,B-ECM 水凝胶能诱导多能干细胞向神经细胞分化。培养 14 天后,在人工基底膜及 B-ECM 上都表现出突触蛋白的表达,但是二者之间无明显区别,而将其注入到小鼠体内,B-ECM 产物能在注射位点形成凝胶,提示这种材料可作为细胞或药物递送载体。Medberry 等^[26]将猪 S-ECM (spinal cord derived-ECM 脊髓细胞外基质)及 B-ECM 处理成水凝胶形式,发现不同组织来源的 ECM 水凝胶具有明显相异的流变性质,其中 S-ECM 水凝胶具有较大的流变模量,间接证实不同部位的组织器官其 ECM 构成不同。B-ECM 及 S-ECM 水凝胶都能促进 N1E-115 细胞系轴突生长。而其中只有 B-ECM 水凝胶显示出了与剂量相关的轴突生长趋势,即随着浓度增长,细胞突起进一步延伸,提示了可能存在的组织特异效果。U-ECM (urinary bladder derived-ECM,膀胱细胞外

基质)已被证实非在中枢神经系统解剖区域有促于组织功能重建,Crapo 等研究显示可溶性 ECM 支架 (U-ECM, B-ECM, S-ECM) 在体外能促进人外周血干细胞增生迁移,尤其是当与 U-ECM 相比时, B-ECM 及 S-ECM 能明显促进人皮质神经上皮干细胞转化为 β -III 微管阳性神经元,这提示中枢神经系统组织特异性 ECM 作用。Fan Wei Meng^[27]等将 B-ECM 水凝胶与 U-ECM 水凝胶分别与巨噬细胞联合培养,研究发现 U-ECM 上调了巨噬细胞 PGE2 的分泌并且抑制了传统促炎因子的释放,这与 M2 型巨噬细胞表现一致,而 B-ECM 组分泌 TNF 及 NO 上调,表现为 M1 型巨噬细胞,这表明不同组织来源的水凝胶 ECM 结构对巨噬细胞的表型功能的影响起到了重要作用。

5 总结与展望

脊髓损伤后轴突再生抑制,患者功能恢复不理想,主要是因为轴突促进因素及轴突抑制因素之间的不平衡所致。生物支架联合细胞移植及生长因子治疗在脊髓再生医学中起到了至关重要的作用,在过去 10 多年,各种不同类型的人工合成支架相继研发出来应用于研究,而 ECM 生物支架相对于其具有极大的优势。天然的 ECM 是蛋白质和多糖类的复合物,在细胞行为如粘附、增生及分化进程中扮演了重要的角色。通过对哺乳动物组织经过去细胞处理获得的 ECM 支架,保留了大量生物活性分子,并且能模拟天然的细胞外微环境,是种理想的生物支架。尽管在基础领域已经取得了一些令人欣慰的研究结果,去细胞支架相对于单纯或者混合 ECM 支架的优越性,还需进一步从临床研究来验证。去细胞 ECM 支架当前尚没有统一的制备方案,重要的是最大化保留支架中生物活性分子,考虑到 ECM 中也存在一些抑制轴突再生的蛋白,如 NOGO、CSPGs、MAG,而当前支架制备方案尚且无法做到选择性去除这些不利因素。最近有学者提出可通过将细胞在合成支架上培养,使细胞分泌的 ECM 蛋白沉积,最终获得理想的 ECM 支架,这不失为一种方案,但需进一步实验验证。总体而言 ECM 支架具有其自身独有的优势,大量实验均支持其有助于组织再生及功能恢复,而在中枢神经系统领域许多研究尚处于探究阶段,尚未应用至临床试验中,我们相信随着研究的进一步深入,其在中枢神经系统修复重建中也会取得令人满意的结果^[28]。

6 参考文献

1. Nicholson C, Sykova E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis[J]. Trends Neurosci, 1998, 21(5): 207-215.
2. Kwok JC, Dick G, Wang D, et al. Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair[J]. Dev Neurobiol, 2011, 71(11): 1073-1089.
3. Duan D, Rong M, Zeng Y, et al. Electrophysiological characterization of NSCs after differentiation induced by OEC

- conditioned medium[J]. *Acta Neurochirurgica*, 2011, 153(10): 2085–2090.
4. Bruckner G, Hartig W, Kacza J, et al. Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter [J]. *J Neurocytol*, 1996, 25(5): 333–346.
 5. Galtrey CM, Kwok JC, Carulli D, et al. Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord[J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 27(6): 1373–1390.
 6. Kerever A, Schnack J, Vellinga D, et al. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(9): 2146–2157.
 7. Han S, Wang B, Jin W, et al. The linear-ordered collagen scaffold –BDNF complex significantly promotes functional recovery after completely transected spinal cord injury in canine[J]. *Biomaterials*, 2015, 41(5): 89–96.
 8. Qian LM, Zhang ZJ, Gong AH, et al. A novel biosynthetic hybrid scaffold seeded with olfactory ensheathing cells for treatment of spinal cord injuries[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(17): 2032–2040.
 9. Barker TH. The role of ECM proteins and protein fragments in guiding cell behavior in regenerative medicine [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(18): 4211–4214.
 10. Schense JC, Bloch J, Aebischer P, et al. Enzymatic incorporation of bioactive peptides into fibrin matrices enhances neurite extension[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 415–419.
 11. Tong YW, Shoichet MS. Enhancing the neuronal interaction on fluoropolymer surfaces with mixed peptides or spacer group linkers[J]. *Biomaterials*, 2001, 22(10): 1029–1034.
 12. Cheng H, Huang YC, Chang PT, et al. Laminin-incorporated nerve conduits made by plasma treatment for repairing spinal cord injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(4): 938–944.
 13. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(25): 3587–3593.
 14. 赵丽娜, 余雅玲, 林刻智, 等. 在体制备大鼠全肾去细胞支架的程序性分析[J]. *解剖学报*, 2014, 45(2): 267–272.
 15. 范雪娇, 田春祥, 傅月荷, 等. 脂肪脱细胞基质的制备和初步评价[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2014, 28(3): 377–383.
 16. Zhang XY, Xue H, Liu JM, et al. Chemically extracted acellular muscle: a new potential scaffold for spinal cord injury repair[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100(3): 578–587.
 17. Xue H, Zhang XY, Liu JM, et al. Development of a chemically extracted acellular muscle scaffold seeded with amniotic epithelial cells to promote spinal cord repair[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(1): 145–156.
 18. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction[J]. *Brain Res*, 1998, 795(1–2): 44–54.
 19. Allen RA, Seltz LM, Jiang H, et al. Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(11): 3363–3374.
 20. Sellaro TL, Ravindra AK, Stolz DB, et al. Maintenance of hepatic sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro using organ-specific extracellular matrix scaffolds [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(9): 2301–2310.
 21. Guo SZ, Ren XJ, Wu B, et al. Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility [J]. *Spinal Cord*, 2010, 48(7): 576–581.
 22. Liu J, Chen J, Liu B, et al. Acellular spinal cord scaffold seeded with mesenchymal stem cells promotes long-distance axon regeneration and functional recovery in spinal cord injured rats[J]. *J Neurol Sci*, 2013, 325(1–2): 127–136.
 23. Crapo PM, Medberry CJ, Reing JE, et al. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(13): 3539–3547.
 24. Jiang T, Ren XJ, Tang JL, et al. Preparation and characterization of genipin-crosslinked rat acellular spinal cord scaffolds[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(6): 3514–3521.
 25. Dequach JA, Yuan SH, Goldstein LS, et al. Decellularized porcine brain matrix for cell culture and tissue engineering scaffolds[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(21–22): 2583–2592.
 26. Medberry CJ, Crapo PM, Siu BF, et al. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(4): 1033–1040.
 27. Meng FW, Slivka PF, Dearth CL, et al. Solubilized extracellular matrix from brain and urinary bladder elicits distinct functional and phenotypic responses in macrophages[J]. *Biomaterials*, 2015, 46: 131–140.
 28. Andrews EM, Richards RJ, Yin FQ, et al. Alterations in chondroitin sulfate proteoglycan expression occur both at and far from the site of spinal contusion injury[J]. *Experimental Neurology*, 2012, 235(1): 174–187.

(收稿日期:2015-12-15 修回日期:2016-03-05)

(本文编辑 彭向峰)