

脊髓损伤修复的方法学进展

赵廷宝^{1*}, 卢兆桐¹, 刘少君²

(1. 济南军区总医院脊髓修复科, 济南 250031; 2. 北京军事医学科学院脊髓损伤与修复研究室, 北京 100085)

[摘要] 传统观念认为, 脊髓损伤后由于神经元不能再生而不能修复。但近年来的基础研究结果证明, 中枢轴突损伤后在一定条件下是可以再生的, 几个里程碑式的研究带来了令人鼓舞的结果。这些研究涉及到器官水平、细胞水平和分子水平的修复。目前神经科学界已经达成广泛共识: 脊髓损伤最终是可以修复的, 但既往研究尚存在实验设计上的缺陷、实验结果不能很好的重复等问题。本文介绍了国内外有关脊髓损伤修复的方法学研究进展, 为今后脊髓损伤修复的研究提供参考。

[关键词] 脊髓损伤; 修复; 神经再生

[中图分类号] R 651.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0929-04

Repair of spinal cord injury: advancement in methods

ZHAO Ting-bao^{1*}, LU Zhao-tong¹, LIU Shao-jun² (1. Department of Spinal Cord Injury, General Hospital, PLA Jinan Military Area Command, Jinan 250031, China; 2. Department of Spinal Cord Injury and Repair, Military Medical Academy, Beijing 100085)

[ABSTRACT] Traditionally, spinal cord injuries are conceived unrepairable because the injured neurons can not regenerate. However, recent studies proved that axons of the central nerves system could regenerate under some specified conditions. Inspiring results had been obtained in several milestone researches at organ, cell and molecule levels. Currently a consensus has been reached in the neurology circle that spinal cord injuries are repairable, but the past studies had shortcomings such as defective experiment designing and unsatisfactory repeatability. This article reviews the advance in the repair methods of spinal cord injury, providing reference for future studies.

[KEY WORDS] spinal cord injuries; repair; nerve regeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9): 929-932]

脊髓损伤造成的截瘫, 是严重影响患者生存质量的疾患, 患者失去自主生活能力, 身心遭受极大痛苦, 同时也给家庭和社会带来巨大的负担。更令人遗憾的是, 目前在临床上国内外仍然没有有效的治疗手段。所幸, 近几年来神经科学学界在脊髓损伤的基础研究领域取得了一系列令人鼓舞的实验结果, 为临床上修复脊髓损伤带来了曙光。

中枢神经结构的特殊性, 使脊髓损伤修复的研究经历了漫长而曲折的过程, 让损伤的脑和脊髓获得再生也因此成为许多神经科学家梦寐以求的目标^[1]。早在 1928 年, 神经解剖学家 Cajal 教授^[2]提出了中枢神经损伤后不能再生的概念。中枢神经损伤后不能再生的主要原因是: (1) 受损伤的神经元死亡。神经元一直被认为是终末分化的细胞, 一经发育成熟即脱离细胞周期, 缺乏再生能力; (2) 即使受损伤的神经元没有死亡, 但其生长及轴突再生能力也大大降低; (3) 宿主自身存在影响再生的微环境; (4) 存在轴突生长相对过慢和胶质瘢痕形成过快、再生促进因子不足和抑制因子存在以及中枢神经胶质

细胞在再生中作用的双向性等矛盾。因此, 在此后的许多年里, 有关中枢神经再生的研究一直没有取得实质性的进展。事隔半个多世纪的 1981 年, Aguayo 及其合作者 David^[3]应用自体离体坐骨神经作为桥接物对延髓和脊髓进行横跨 35 mm 的桥接, 发现来自桥接物两端神经元的轴突沿移植的坐骨神经相向生长了近 30 mm, 由此提示中枢神经轴突在一定条件干预下可以再生, 从而在中枢神经再生的基础研究领域实现了理论上的突破, 同时也点燃了中枢神经再生研究的星星之火。本文拟对脊髓损伤修复的方法学研究结果进行回顾分析, 为今后的研究提供借鉴。

1 组织器官水平修复

我们在此所称的组织器官水平修复, 是指应用神经组织(脊髓或周围神经等)的组织块作为引导物

[作者简介] 赵廷宝, 博士, 主任医师, 硕士生导师。

* Corresponding author. E-mail: doctorzhaotingbao@163.com

移植到脊髓的损伤部位进行修复,以促进中枢轴突再生。本文随后所述的细胞水平修复和分子水平修复与此同义。

1.1 脊髓节段 应用脊髓节段修复脊髓损伤的研究开始于20世纪70年代末,之后的研究报道较多,但最经典的当数Iwashita等^[4]的研究。1994年,Iwashita等将新生大鼠的下胸段脊髓横断后,应用胚胎大鼠的脊髓节段进行同向原位移植修复,用反向原位移植、坐骨神经移植和横断后不进行移植作对照。结果对照组移植物完全吸收并消失,而实验组修复部位移植物和宿主脊髓之间没有明显的胶质瘢痕形成,大体标本观察很难与正常脊髓相区别。将速蓝(Fast Blue)注射到腰膨大部位,在脑、颈髓、上胸髓和移植物内均可见标记细胞,而将麦芽凝集素-辣根过氧化物酶(WGA-HRP)注射到感觉运动皮质,在腰膨大可见皮质脊髓束的投射纤维,证明损伤部位上下脊髓的联系已经建立。在功能上,修复后的实验动物能够像正常状态下行走、奔跑和攀缘。

1.2 神经节段 目前的文献中神经节段移植主要包括坐骨神经^[3]和肋间神经^[5]。如果说坐骨神经可以作为刺激中枢轴突再生的引导物的结论是理论上的突破,那么Cheng等^[5]应用同种异体肋间神经移植修复完全横断脊髓的实验则是脊髓损伤修复研究领域的又一个重要的里程碑,并在当时引起了神经科学界的轰动^[1]。1996年,Cheng等^[5]设计了修复脊髓损伤的新策略。他在成年大鼠T₈节段完全切除脊髓组织5 mm,使横断部位的上下脊髓完全失去联系,取同种异体肋间神经并修剪成适当长度的节段,根据大鼠上下传导通路特殊的解剖关系,用18段肋间神经对脊髓缺损部位进行桥接,从近端脊髓白质连接到远侧灰质以建立下行传导通路,从远侧的白质连接到近端的灰质以建立上行传导通路,用含有酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)的组织胶填充固定肋间神经节段与上下脊髓的连接部位,用钢丝固定棘突预防术后脊柱后凸。术后组织切片可见移植物成活,WGA-HRP追踪证明脊髓缺损部位的上下联系已经建立,术后3周至1年实验动物的运动功能得到不同程度的恢复,后肢能够支撑体重,三大关节可见自主运动。

2 细胞水平修复

20世纪末期,细胞移植修复脊髓损伤的实验研

究取得了令人振奋的结果,其中研究最多的是嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OECs)和神经膜细胞(Schwann cell)^[6~10]。1997年,Li等^[6]将成年大鼠一侧的皮质脊髓束通过电解的方法在C₁和C₂节段之间造成一个溃变灶,然后将体外培养14~17 d的成年大鼠的嗅鞘细胞悬液注射到溃变灶内。通过生物素葡聚糖顺行标记,发现嗅鞘细胞移植6 d即有单根纤细而不分叉的再生突起,到第10天即有可见直而不分叉的平行轴突通过嗅鞘细胞移植区。随着时间的延长,至移植后2~3周,神经膜细胞样嗅鞘细胞(Schwann-like OECs)与单个皮质脊髓束轴突建立了一对一(one-to-one)的周围型髓鞘关系,并且星形嗅鞘细胞(astrocyte-like OECs)围绕有髓轴突形成鞘膜。在功能上,随着移植术后时间延长,实验组动物前肢运动功能有了实质性恢复。像Cheng等的工作一样,该实验结果在神经科学研究领域获得了非常大的影响。

如果说Li等的实验仅仅损伤了单侧皮质脊髓束,在实验设计上存在一定缺陷的话,那么Rumón-Cueto等^[8,9]的实验结果则在其基础上更进了一大步。他们在嗅鞘细胞移植后通过嗅鞘细胞诱导发现中枢轴突能够获得长距离再生^[8]的基础上,于2000年^[9]将成年大鼠的脊髓在T₈水平完全切断后,用体外培养的嗅鞘细胞进行脊髓损伤平面上下节段移植,术后不但形态学有理想的恢复,移植后的3~7个月内,所有实验组动物的运动功能和感觉反射都有明显恢复,表现在下肢能够自主活动且能支撑体重,并能对轻度刺激产生反应。

近年来,作为形成周围神经髓鞘的神经膜细胞在脊髓损伤修复中越来越引起神经科学工作者的重视,并且获得了比较理想的修复结果。Xu等^[7]在成年大鼠T₈水平将T₉~T₁₁段脊髓切除,用特制的材料做成套管连接上下位的脊髓,在套管内注入从坐骨神经培养的神神经膜细胞进行修复,结果提示,套管内的神经膜细胞可以刺激成年大鼠胸段脊髓的深感觉轴突得到实质性的再生。

3 分子水平修复

脊髓损伤分子水平的修复,本文主要是指药物的全身和局部治疗以及基因水平的修复。20世纪80年代神经生长因子(NGF)的发现、开发和临床应

用,为周围神经和中枢神经损伤的临床药物治疗开拓了广阔的前景,近几年来,一些新的促脊髓再生神经营养因子如脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质源性神经营养因子(GDNF)、睫状神经营养因子(CNTF)、神经营养素3(NT-3)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)等,在脊髓损伤的修复研究中得到越来越广泛的应用,并获得了比较满意的效果。

Baffour 等^[11]将 bFGF 和甲泼尼龙(methylprednisolone,MP)联合应用治疗成年大鼠实验性脊髓损伤,在损伤后1h开始治疗,实验组与对照组比较,术后4周,动物的行为学评分有显著性差别,并且bFGF有剂量相关性。NT-3和NGF对发育过程中的损伤的皮质脊髓束有明显的促进再生的作用^[12],该实验同时证明BDNF的作用不如前两者。

由于目前研究和应用的神经营养物质分子量太大,不能穿透血脑屏障进入中枢神经组织,难以发挥其生物活性,因此,近年来的研究发现以往在器官移植手术中用于抗排斥反应的一些小分子化合物具有神经营养功能,并对神经再生有促进作用。这些小分子化合物的代表是FK506。Gold 等^[13]实验发现,横断大鼠轴索后每日皮下注射FK506可以提高再生神经元中的生长相关蛋白(GAP-43)的mRNA水平,而GAP-43是一种与轴突再生过程有关的蛋白质,主要集中在生长锥中,因此具有加速脊髓损伤修复的作用。相关研究发现,FK506还有阻断脑内一氧化氮合酶(NOS)的作用,具有一定的神经保护功能^[14],其作用具有剂量依赖性^[15]。

应用神经生长抑制因子抗体调控,对脊髓损伤后的恢复也有一定的促进作用^[16]。而生长锥蛋白(growth cone protein)能刺激损伤后的中枢神经轴突再生^[17]。

2003年4月,同期发表在Neuron杂志上有关中枢轴突再生抑制蛋白Nogo的3篇文章^[18~20],分别介绍了剔除小鼠中枢神经内的Nogo基因后对中枢轴突再生的影响。其中2篇获得了阳性结果^[18,19],即剔除Nogo基因后能够促进中枢轴突再生,而Zheng 等^[20]发现剔除Nogo基因后对中枢轴突再生没有明显影响。目前,这3个实验室之间正在相互交换实验动物和科研人员进行进一步研究。不管结果如何,这几项研究已在神经科学界产生了

又一次轰动,Pearson在Nature杂志上称此为“in search of a miracle”(研究中的一个里程碑)^[21]。

脊髓损伤的基因治疗是将促脊髓再生的神经营养因子的基因通过载体转染给受体细胞,再植入体内持续表达外源性神经营养因子达到治疗目的。Tuszynski 等^[22]将重组的神经生长因子(NGF)病毒载体转染给成纤维细胞,然后植入鼠脊髓的损伤区而获得了较多的感觉神经元轴突的再生,并持续表达NGF一年之久。目前研究较多的神经营养因子除NGF外主要有BDNF、GDNF、CNTF、NT-3、bFGF和aFGF等,载体主要是腺病毒和腺相关病毒,受体细胞除成纤维细胞外有嗅鞘细胞、神经膜细胞和肌母细胞等。基因治疗仅仅停留在实验阶段,由于病毒的安全性因素,离临床应用还有很长的路要走。

4 存在的问题和展望

综上所述,既往的研究结果令人鼓舞,但还存在着致命的缺陷,主要包括:(1)实验设计不够合理,脊髓损伤模型建立不统一,绝大多数实验没有电生理依据;(2)绝大多数实验结果不能重复,不能重复的实验结果不能服人;(3)基础研究和临床应用脱节;(4)脊髓损伤修复在理论上仍然没有突破。但是,随着观念的转变和科学技术的进步,长期以来一直困扰人类自身的脊髓损伤已经呈现出可以修复的前景,目前神经科学界已经达成广泛共识:脊髓损伤最终是可以修复的。相信不久的将来一定会产生令人信服并能指导临床的实验结果。

[参考文献]

- [1] Young W. Spinal cord regeneration[J]. Science, 1996, 273: 451.
- [2] Cajal SRY. Degeneration and regeneration of the neuronal system[M]. London:Oxford University Press, 1928:3.
- [3] David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats[J]. Science, 1981, 214:931-933.
- [4] Iwashita Y, Kawaguchi S, Murata M. Restoration of function by replacement of spinal cord segment in the rat[J]. Nature, 1994, 367:167-170.
- [5] 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.
- [6] Li Y, Field PM, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal

- tract by transplants of olfactory ensheathing cells[J]. *Science*, 1997, 277:2000-2002.
- [7] Xu XM, Guénard V, Kleitman N, et al. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord[J]. *J Compar Neurol*, 1995, 351: 145-160.
- [8] Rumón-Cueto A, Plant GW, Avila J, et al. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants[J]. *J Neuroscience*, 1998, 18:3803-3815.
- [9] Rumón-Cueto A, Cordero MI, Santos-Benito FS, et al. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia[J]. *Neuron*, 2000, 25:425-435.
- [10] Li Y, Raisman G. Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord[J]. *J Neurosci*, 1994, 14:4050-4063.
- [11] Baffour R, Achanta K, Kaufman J, et al. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and methylprednisolone on neurological function after experimental spinal cord injury[J]. *J Neurosurg*, 1995, 83:105-110.
- [12] Schnell L, Schnelder R, Kolberck R, et al. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion[J]. *Nature*, 1994, 367:170-173.
- [13] Gold BG, Yew JY. The immunosuppressant FK506 increases GAP-43 mRNA levels in axotomized sensory neurons[J]. *Neurosci Lett*, 1998, 241:25-28.
- [14] Gold BG. FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration[J]. *Mol Neurobiol*, 1997, 15:285-306.
- [15] Wang MS, Zeleny-Pooley M, Gold BG. Comparative dose dependence study of FK506 and cyclosporin A on the rate of axonal regeneration in the rat sciatic nerve[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 282:1084-1093.
- [16] Bergman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L, et al. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors[J]. *Nature*, 1995, 378:498-501.
- [17] Bonze H, Bulsara KR, Iskandar BJ, et al. Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons[J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4:38-43.
- [18] Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, et al. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury[J]. *Neuron*, 2003, 38:201-211.
- [19] Kim J, Li S, GrandPré T, et al. Axon regeneration in young adult mice lacking nogo-A/B[J]. *Neuron*, 2003, 38:187-199.
- [20] Zheng B, Ho C, Li S, et al. Lack of enhanced spinal regeneration in nogo-deficient mice[J]. *Neuron*, 2003, 38:213-224.
- [21] Pearson H. In search of a miracle[J]. *Nature*, 2003, 423:112-113.
- [22] Tuszynski MH, Peterson PA, Ray J, et al. Fibroblasts genetically modified to produce nerve growth factor induce robust neuritic in growth after grafting to the spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 1994, 126:1-14.

[收稿日期] 2006-01-19

[修回日期] 2006-03-23

[本文编辑] 孙岩

欢迎订阅《第二军医大学学报》

《第二军医大学学报》是由第二军医大学主办的国内外公开发行的综合性医药卫生类学术期刊。本刊面向全国和海外作者征稿,主要报道基础、临床、预防、军事医学、药理学和中国医学等领域的最新科研成果。由中国科学院院士、肝胆外科专家、国家最高科技奖获得者吴孟超教授任主编。辟有:院士论坛、专家论坛、专题报道、论著、研究快报、临床病理(例)讨论、个案报告等栏目。读者对象主要为从事医药卫生工作的中高级科研、医疗、教学、预防机构人员和高等医药院校的师生。本刊自1980年创刊以来,一直连续被确认为“中国基础医学类核心期刊”、“中国综合性医药卫生类核心期刊”;被权威机构确定为“中国科学引文数据库统计源期刊”、“中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊”;被包括万方数据——中国数字化期刊群、中国学术期刊综合评价数据库等在内的国内所有重要检索系统,以及20多种重要的文摘性刊物收录,被荷兰医学文摘数据库(EMBASE)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(PЖ)、波兰《哥白尼索引》收录。本刊2002年荣获“第二届国家期刊奖百种重点期刊奖”,2004年荣获“第三届国家期刊奖提名奖”和全国高校优秀科技期刊评比一等奖。

本刊为月刊,A4开本,80g铜版纸彩色双胶印刷,每期定价15元,全年共180元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-373),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地址:上海市翔殷路800号《第二军医大学学报》编辑部,邮编:200433

联系人:商素芳。电话:021-25074352,021-25074340 转824分机

E-mail:bxue@smmu.edu.cn,http://journals.smmu.edu.cn