文章编号:1000-5404(2005)14-1523-03

综述

促进脊髓损伤后轴突再生的实验研究进展

Study of promoting axon regeneration after spinal cord injury

初同伟 综述,周 跃 审校 (第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037)

和外周神经系统(PNS)相比,中枢神经系统(CNS)不能再生的原因主要在于:①CNS髓磷脂的几个糖蛋白成分对再生是抑制的;②CNS对损伤的生理反应与PNS不同,CNS损伤后,损伤部位的巨噬细胞浸润较慢,使抑制性的髓磷脂清除延迟,这主要是由于血-脊髓屏障的存在;③损伤脊髓的远端不能象PNS一样在损伤后上调表达细胞粘附分子;④CNS内星形胶质细胞扩增,变成反应性星形胶质细胞,产生抑制再生的胶质疤痕。归结起来即主要是两方面的作用:一是CNS神经元本身缺乏发生轴突再生的能力,二是它们的再生被抑制性的CNS微环境所抑制。后者在其中可能起了更为关键的作用。针对这些因素设计针对性的治疗手段有望促进脊髓损伤(SCI)后的轴突生长和再生修复。

最近几年,针对促进SCI后轴突再生方面进行的研究较多,主要集中在致力于改善SCI后CNS内"不允许"再生的环境等方面,而直接通过干预神经元内再生相关基因等方面进行的研究却相对较少,本研究主要针对前者概括介绍近年来有关SCI后再生修复方面的研究情况,并提出一些尚存在的问题和可能的解决方法,以期对进一步的研究工作有所裨益。

1 针对内在的神经元因素

再生相关基因(RAGs)包括一组促进神经再生的基因,它们在神经系统发育过程中表达,而在健康成体神经内,这些基因的表达几乎可以忽略不计。PNS损伤后,这些基因重新表达,导致成功的再生,但SCI后却不是这样。目前研究最多的2种RAGs是GAP-43和CAP-23,单独过度表达任何一个这2种因子都可诱导轴突发芽性生长,但都不足以达到再生的程度[1]。所以,可能需要共同表达两种或更多的RAGs来协同作用。

另一个促进内源性神经元再生的机制基于细胞骨架驱动轴突再生的动力学之上。肌动蛋白聚合作用和重排对神经突起的延伸是至关重要的。Furnish等[2]的研究表明肌动蛋白的附属蛋白质,如凝溶胶蛋白,可在调节轴突生长方面发生重要作用。

新近的研究表明,SCI后上调表达的GTP酶Rab13和肌动蛋白结合蛋白Coronin 1b也对轴突的生长起了重要的作用[3]。在体外培养的PC-12细胞、成神经细胞瘤细胞和背根神经节神经元中过度表达时,这些基因能增强神经突起生长;而应用RNAi技术使PC-12细胞中的Coronin 1b或Rab13基因沉默后,神经突起的生长显著减少。操纵这些蛋白或许能提供一个新奇的有利于SCI后修复过程的策略。

SCI后,轴突断裂神经元内在的状态也可以影响其进行轴突再生的能力。Neumann等[4]的实验试图通过预处理大鼠背侧神经节(DRG)神经元来达到这种目的,它们在造成影响到脊髓中央部分的背侧柱损伤前1~2周,预先损伤坐骨神经的外周部分,检查的半数动物显示有越过损伤部位并超出一定距离的轴突再生。而在缺乏外周预损伤的情况下,背侧柱却不能再生。其中的分子机制和轴突为什么不被胶质疤痕和髓磷脂所抑制的原因尚不清楚。但外周神经切断后引起的内源性cAMP水平的升高可能在其中起了重要作用,cAMP水平的升高可以中和髓磷脂和髓磷脂相关糖蛋白(MAG)对再生轴突的抑制作用,或逆转抑制分子对生长的影响[5]。升高损伤部位的cAMP水平可以诱导感觉神经轴突较长距离的再生[5,6]。进一步的研究表明,尽管神经节内注射db-cAMP能增加与生长相关的微管蛋白同位体的表达,却不能增加微管蛋白向生长轴突尖端传导的速度,也不能增加轴突的内在生长能力[7]。所以,条件损伤诱导的cAMP升高可能进一步诱导其它一些变化,这些变化对增加轴突内在生长能力也是必不可少的。故而,cAMP促进轴突再生的机制仍需要进一步探讨。

2 针对SCI后的CNS环境

既然SCI后的CNS环境可能是阻碍轴突再生的关键因素,那么如果把这个环境改造成一个适宜轴突生长的微环境,或者是去除其中不利于轴突再生的因素,就应该能够使轴突断裂的神经元重新发出突起,并得以成功再生。近来的促再生研究大多着眼于此,设计的各种促再生方法也相应获得了一定的成果。

2.1 创造适宜再生的局部环境

为使轴突的再生能通过抑制性的损伤部位,可以在其中移植具有生长允许特性的基质。目前研究的移植物主要包括PNS组织、胚胎脊髓组织、各种细胞、生物材料以及结合多种生物分子的细胞移植等。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000173)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000173)

作者简介:初同伟(1967-),男,山东省聊城市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事脊柱脊髓损伤及骨创伤修复方面的研究。电话:(023)68774908

收稿日期:2004-05-17;修回日期:2005-01-20

2.1.1 组织移植 PNS 组织和胚胎 CNS 组织是较早、较常使用的移植材料[8,9]，相较而言，胚胎 CNS 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起作用。

2.1.2 细胞移植 和组织相比，分离的细胞具有减轻损伤、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。目前最急迫的问题是决定最好的种子细胞。

Schwann 细胞和嗅球鞘细胞（OECs）是两种 SCI 后移植治疗中研究较多的细胞，这两种细胞都能支持和引导外周神经轴突的再生。Schwann 细胞支持轴突的生长，是外周神经能够成功再生的主要因素。把 Schwann 细胞移植到损伤的脊髓后，大量 CNS 轴突可以沿 Schwann 细胞形成的引导管道再生[10]。Schwann 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，联合应用其它一些治疗措施能够诱导轴突在宿主内有较长距离的再生，移植基因修饰产生神经营养因子 BDNF 和 NT-3 的 Schwann 细胞时，其再生效果更为明显[11]。

和 OECs 移植相比，Schwann 细胞移植引起的胶质细胞反应面积大、轴突生长抑制性的硫酸软骨素蛋白多糖增加明显[12]。所以，OECs 移植可能更能创造一个促进再生的环境。OECs 是嗅球轴突能够再生和形成特异连接能力的关键因素，OECs 也能产生营养因子和细胞外基质分子，它们也能表达粘附分子[13]；正常情况下，OECs 不形成髓鞘，但当把它们移植到脱髓鞘的脊髓后，它们能形成外周神经样的髓鞘；当把 OECs 移植到损伤的脊髓内时，OECs 和宿主胶质细胞巧妙地一起作用，创造一个利于减轻局部损害的环境，同时能促进多种轴突的再生反应，并能减少胶质疤痕的形成[13]。

近年来，各种原始细胞包括胚胎干细胞[14]、骨髓基质细胞[15]和神经干细胞[16]等在 SCI 修复治疗中的作用越来越引起了人们的重视，已有的证据表明这些细胞不仅能分泌多种神经营养因子，具有神经保护作用，它们组成的基质也能更好地支持轴突生长，但这些细胞移植后在细胞替代方面的作用值得进一步关注。

2.1.3 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，目前设计应用的生物材料的主要成分多为各种多聚水凝胶，这些材料具有良好的组织相容性，能够减轻损伤局部的疤痕形成和减少继发性的神经损伤[17]，同时能植入各种种子细胞和生物分子[18]。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。

2.1.4 营养因子和其它因子的使用 多种神经营养因子在促进轴突再生方面具有重要的作用。目前应用的神经营养因子主要包括 BDNF[19]、GDNF[20]、NT-3[21] 和 CNTF[22] 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[19~21]。传递的方法包括主要有局部直接注射[22]以及应用病毒载体[19]和细胞载体[20]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、Schwann 细胞、OGCs 和神经干细胞等。

2.2 对抗 CNS 内抑制轴突再生的相关因素

CNS 组织内轴突生长受到抑制的观点最早在 1985 年由 Schwab 提出，此后 Schwab 等进一步发现了髓磷脂内最主要的两种抑制分子 NI-250 和 NI-35，它们对轴突再生具有强有力的抑制作用[23]。其它对轴突再生具有抑制作用的分子包括髓鞘相关蛋白多糖（MAP）、细胞粘合素-R、硫酸软骨素蛋白多糖（CS-PGs）等[24]。

SCI 后 CNS 环境中抑制轴突再生的信号可以采用多种方法进行中和。Bregman 等[25]报道用抗体治疗的胸髓损伤大鼠，再生的皮质脊髓束轴突可以损伤部位 7～11 mm，而对照组只有 1 mm。抑制因子似乎已经被抗体抑制，而且该治疗方法可能促进 SCI 动物神经功能的显著恢复。Xu 等[24]应用针对特殊抑制性抗原决定簇的重组 DNA 分子免疫实验动物后，重组 DNA 疫苗能活化免疫系统，也获得了促进轴突再生的效果。Wiksten 等[26]则应用 γ 层粘连蛋白的 KDI（赖氨酸-天冬氨酸-异亮氨酸）结构域来中和胶质和髓鞘来源的抑制性信号，发现在成年大鼠完全性脊髓横断后，通过渗透性的微型泵灌注 KDI 结构域，能使轴突生长越过损伤部位并进入远侧残端。针对 CS-PGs 设计的研究也在促进轴突再生方面起了一定的作用[27]。

3 目前存在的问题和对策

尽管 SCI 后再生修复研究已经取得了一定的成果，但存在的问题仍然很多。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，目前迫切需要对实验动物和损伤模型等方面进行规范，以便对各个小组的实验结果进行对比分析，从中找出最优的治疗方法；同时，使用的结果评定方法的缺陷和局限性也影响了结果的可信性，发展并使用尽可能客观、科学的结果评定体系将有助于解决这方面的问题。

目前 SCI 再生修复研究中使用的实验动物大多是啮齿类动物，由于低等动物和人之间存在的巨大差别，我们不可能草率地把从实验中在动物身上取得的一点成绩应用到临床上来。所有取得的实验成果需要进一步在较为高等的大动物如犬、猪、羊等动物身上得以验证，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。

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治疗性手段是必要的。已有的研究已经表明联合应用一些治疗手段能更好地促进轴突的再生生长[6,28]。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。

关键词:脊髓损伤;再生;移植;抑制分子;营养因子
中图法分类号:R364.33　　**文献标识码**:A

参考文献:

[1] Bomze H M, Bulsara K R, Iskandar B J, *et al*. Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons[J]. Nat Neurosci, 2001, 4(1): 38 - 43.

[2] Furnish E J, Zhou W, Cunningham C C, *et al*. Gelsolin overexpression enhances neurite outgrowth in PC12 cells[J]. FEBS Lett, 2001, 508(2): 282 - 286.

[3] Di Giovanni S, De Biase A, Yakovlev A, *et al*. *In vivo* and *in vitro* characterization of novel neuronal plasticity factors identified following spinal cord injury[J]. J Biol Chem, 2005, 280(3): 2084 - 2091.

[4] Neumann S, Woolf C J. Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury[J]. Neuron, 1999, 23(1): 83 - 91.

[5] Pearse D D, Pereira F C, Marcillo A E, *et al*. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury[J]. Nat Med, 2004, 10(6): 610 - 616.

[6] Lu P, Yang H, Jones L L, *et al*. Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2004, 24(28): 6402 - 6409.

[7] Han P J, Shukla S, Subramanian P S, *et al*. Cyclic AMP elevates tubulin expression without increasing intrinsic axon growth capacity[J]. Exp Neurol, 2004, 189(2): 293 - 302.

[8] Kawaguchi S, Iseda T, Nishio T. Effects of an embryonic repair graft on recovery from spinal cord injury[J]. Prog Brain Res, 2004, 143: 155 - 162.

[9] Lee Y S, Lin C Y, Robertson R T, *et al*. Motor recovery and anatomical evidence of axonal regrowth in spinal cord-repaired adult rats[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2004, 63(3): 233 - 245.

[10] Takami T, Oudega M, Bates M L, *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.

[11] Tobias C A, Shumsky J S, 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.

[12] Lakatos A, Barnett S C, Franklin R J. Olfactory ensheathing cells induce less host astrocyte response and chondroitin sulphate proteoglycan expression than Schwann cells following transplantation into adult CNS white matter[J]. Exp Neurol, 2003, 184(1): 237 - 246.

[13] Chuah M I, Choi-Lundberg D, Weston S, *et al*. Olfactory ensheathing cells promote collateral axonal branching in the injured adult rat spinal cord[J]. Exp Neurol, 2004, 185(1): 15 - 25.

[14] Jendelova P, Herynek V, Urdzikova L, *et al*. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(2): 232 - 243.

[15] Ankeny D P, McTigue D M, Jakeman L B. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats[J]. Exp Neurol, 2004, 190(1): 17 - 31.

[16] Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, *et al*. Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury[J]. Semin Cell Dev Biol, 2003, 14(3): 191 - 198.

[17] Woerly S, Doan V D, Sosa N, *et al*. Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord[J]. J Neurosci Res, 2004, 75(2): 262 - 272.

[18] Bakshi A, Fisher O, Dagci T, *et al*. Mechanically engineered hydrogel scaffolds for axonal growth and angiogenesis after transplantation in spinal cord injury[J]. J Neurosurg Spine, 2004, 1(3): 322 - 329.

[19] 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.

[20] Cao L, Liu L, Chen Z Y, *et al*. Olfactory ensheathing cells genetically modified to secrete GDNF to promote spinal cord repair[J]. Brain, 2004, 127(Pt 3): 535 - 549.

[21] Tuszynski M H, Grill R, Jones L L, *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.

[22] Ye J, Cao L, Cui R, *et al*. The effects of ciliary neurotrophic factor on neurological function and glial activity following contusive spinal cord injury in the rats[J]. Brain Res, 2004, 997(1): 30 - 39.

[23] Chen M S, Huber A B, van der Haar M E, *et al*. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. Nature, 2000, 403(6768): 434 - 439.

[24] Xu G, Nie D Y, Chen J T, *et al*. Recombinant DNA vaccine encoding multiple domains related to inhibition of neurite outgrowth: a potential strategy for axonal regeneration[J]. J Neurochem, 2004, 91(4): 1018 - 1023.

[25] Bregman B S, 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.

[26] Wiksten M, Vaananen A J, Liebkind R, *et al*. Regeneration of adult rat spinal cord is promoted by the soluble KDI domain of gammal laminin[J]. J Neurosci Res, 2004, 78(3): 403 - 410.

[27] Grimpe B, Silver J. A novel DNA enzyme reduces glycosaminoglycan chains in the glial scar and allows microtransplanted dorsal root ganglia axons to regenerate beyond lesions in the spinal cord[J]. J Neurosci, 2004, 24(6): 1393 - 1397.

[28] Iannotti C, Li H, Yan P, *et al*. Glial cell line-derived neurotrophic factor-enriched bridging transplants promote propriospinal axonal regeneration and enhance myelination after spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2003, 183(2): 379 - 393.

(编辑　陈聪连)