·综 述·

基因工程细胞移植治疗坐骨神经损伤的研究进展

Research progress on transplantation of gene engineering cells for repairing the sciatic nerve injury

贺菊芳,余资江 (贵阳医学院人体解剖学教研室,贵州 贵阳 550004)

[关键词] 基因转染;坐骨神经损伤;修复与再生
[中图分类号] R322.85 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)06-0666-03

坐骨神经是人体最粗大的神经,主要支配股二头肌长头、半腱肌、半膜肌和大收肌、小腿及足的全部肌肉以及除隐神经支配区以外的小腿与足的皮肤感觉。在损伤严重的情况下,远段发生的轴突坏死、髓鞘分解消失和神经鞘膜增生等,即“瓦勒变性”过程,引起股后部肌肉及小腿和足部所有肌肉全部瘫痪,导致膝关节不能屈、踝关节与足趾运动功能完全丧失,呈足下垂,且小腿后外侧和足部感觉丧失,足部出现神经营养性改变,可严重影响伤者的日常生活。坐骨神经损伤为临床常见且术后修复效果不佳,如何修复其损伤、修复后的效果如何等难题已成为基础与临床研究的重要热门课题。基因工程细胞[1-2],即在体外对供体细胞用基因重组技术导入或删除某一或某些基因以改变细胞的表型(包括生长特性、对毒物的抵抗力以及生产分泌某些治疗性蛋白)等,即进行遗传修饰过的细胞。因此基因工程细胞技术结合显微手术的应用,使得坐骨神经损伤后康复的效果更加理想。本文结合近些年国内外热门研究的几种基因工程细胞,用于移植治疗动物模型坐骨神经损伤的研究现状进行阐述。

1 神经干细胞

神经干细胞(neural stem cells,NSCs)是一种高度未分化具有自我更新和多向分化潜能的母干细胞。在损伤或者病理状态下,内源性神经干细胞受局部微环境的影响可以及时准确地向损伤部位迁移,并向特定细胞类型分化,使神经系统的损伤或退行性疾病得以恢复相应功能[3],桥接功能赋予其在治疗神经系统疾病治疗中具有很大潜能。此外,神经干细胞也可广泛应用于潜在的治疗性转基因载体,并且还能为在功能上高效稳定表达有效因子的转基因产物提供平台[2,4]。

多方面的生物优势使得神经干细胞在基础研究中占据重要地位。Fu 等[5]研究发现,胶质源性神经营养因子和脑源性神经营养因子修饰的神经干细胞(通过 PCR 技术检测在转录水平上持续 6 周表达),具有促进坐骨神经再生和功能恢复的应用潜力。雷正旺等[6]研究还发现利用神经营养素-3基因修饰神经干细胞,通过肌内注射使局部释放神经营养素-3 加快轴突再生速度以促进坐骨神经再生,有效减缓了失神经支配肌肉的萎缩。这些很好地证明了在坐骨神经的修复与再生试验中,通过基因转染技术的可以充分利用神经干细胞的桥接作用、自我更新和多向分化潜能并在局部释放有效因子,同时也验证了它在神经损伤后的迁徙特性。

2 施旺细胞

施旺细胞(Schwann cells,SCs)是周围神经系统的胶质细胞,沿着神经元的轴突分布,反复包裹着轴突形成髓鞘。髓鞘表面固有的一层基膜能分泌神经营养因子,在周围神经再生中起到很重要的作用,主要是促进受损的神经元的存活和轴突的再生。当神经被切断后,受到破坏的施旺细胞立即在轴突断端发生封闭保护,以防止健康的轴突轴浆流失和弥散性溃变,进而起到神经的重要作用。

胡莲美等[7-8]实验研究,通过脂质体介导的转染方法,成功地将外源性基因神经生长因子和脑源性神经生长因子导入施旺细胞中,使外源性基因成功表达,而且被转染的施旺细胞仍保持较强的增殖能力,后将基因修饰的细胞与 HHK(人发角蛋白)复合移植。实验 3 周后观察到 HHK 丝间增生了大量排列整齐的施旺细胞和少量轴突;6 周后 HHK 丝束中出现大量与正常神经纤维基本一致的神经纤维;9 周后再生的神经纤维明显增多,有明显的神经外膜形成,增殖的组织中有新形成的微血管和排列规则的施旺细胞。Zong 等[9]的研究中发现,NT-3 基因修的饰施万细胞与 PLGA 管构建的神经移植复合体能促进大鼠坐骨神经的缺损再生,其再生的效果明显优于单 NT-3 基因组和施旺细胞组。施旺细胞是治疗周围神经损伤的种子细胞,但分泌神经营养物质有时效局限性[10-11],利用基因转染技术弥补这一缺陷,为治疗周围神经损伤提供另一条有效途径。

3 神经元

神经元是构成神经系统结构和功能的基本单位,由细胞体和长的细胞轴突构成。丁文彬[12]和高峰等[13]从家兔脊髓中提取骨髓源性神经组织定向干细胞(简称为 NTCSCs)作为母体细胞,使携带 GFP 病毒的 NTCSCs 分化为神经元细胞,培养出能够进行移植的干细胞源性神经元细胞。实验结果发现 1.5 cm 的长距离坐骨神经缺损的家兔在 8 周后能正常行走,肌肉力量恢

doi:10.11659/jjssx.01E015003
[基金项目] 国家自然科学基金(81060108);贵州省科技厅 2012 年社会发展攻关项目(黔科合 SY 字[2012]3153 号)
[收稿日期] 2015-05-16 [修回日期] 2015-06-10

复良好,工程化神经元组织能够快速传导生物电。12 周时,检测到腓肠肌蛋白含量趋向正常,经过 HKP 示踪法、透射电镜、免疫组织化学检测之后,发现受损坐骨神经中植入的 NTCSCs 神经元存活状况良好。神经元作为神经组织的关键组成成分,用作于基因载体,对神经损伤的修复可起到重要作用。

4 神经前体细胞

神经前体细胞(neural precursor cells,NPCs)泛指处于发育更早期的细胞,是不甚严格的概念,属于多能干细胞,具有多向分化潜能、自我更新和增殖的能力,在特定的微环境变化中可分化为神经细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞[13]。人前脑啡肽是中枢神经系统重要的镇痛介质,属于一种内源性的阿片肽,由前脑啡肽原经酶切加工而来。有研究发现,人前脑啡肽原基因修饰永生化大鼠神经前体细胞后,可长时间高水平地分泌高氨酸脑啡肽,在大鼠坐骨神经鞘内注射基因转染细胞,可产生明显的镇痛效果[13]。

5 骨髓间充质干细胞

骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells,BMSCs)是一类存在于骨髓中的原始细胞,在合适的条件下可分化为机体内许多不同种类的细胞。其具有来源丰富、取材方便、培养简单、免疫原性低和可分泌多种神经营养因子等优点[14],因此受到研究者们的青睐。Chen 等[15]证实了骨髓间充质干细胞具有多向分化的的特点,使其向神经样细胞方向分化,为移植修复神经损伤提供了证据。

近几年骨髓间充质干细胞是国内的热门研究之一。张威等[16]用转染 NT-3 的骨髓间充质干细胞联合去细胞同种异体神经作为坐骨神经缺损修复的材料,有效提高了神经传导速度的恢复,对靶器官也具有明显的促进作用。陈解元等[17]使用大鼠坐骨神经慢性压迫性损伤模型,鞘内注射人前脑啡肽原基因修饰骨髓间充质干细胞,结果发现人前脑啡肽原 mRNA 表达明显上调,减轻了神经病理性疼痛。杨劲松等[18]使用基因工程的骨髓间充质干细胞明显促进了兔坐骨神经的再生。郑明辉等[19]的试验中,脑源性神经营养因子基因修饰骨髓间充质干细胞移植治疗坐骨神经损伤,对神经纤维的再生和功能的恢复有促进作用,这与 Ding 等[20]的实验结果一致。

6 肌源细胞

肌源细胞(myogentic cells)起源于胚胎血管祖细胞,在适当的人为环境下也可分化为血细胞、成骨细胞、神经细胞等不同胚层的组织细胞。这种具有可塑性强、分布广泛、来源丰富的肌源细胞,为自体干细胞治疗退行性疾病或组织器官损伤的修复提供理想的种子细胞。Dadon-Nachum 等[21]研究了神经营养因子修饰肌源细胞在大鼠坐骨神经损伤模型的治疗效果。在试验中,他们分别给肌源细胞单一转染脑源性神经生长因子、胶质细胞源性神经生长因子、类胰岛素一号增长因子和血管内皮生长因子后混合培养,从中获取的培养基可以在低氧环境中减轻运动神经元系 NSC34 表现出的毒性效应。此外,被转染的且存活下来的肌源细胞在整个实验过程中表达和分泌上述神经生长因子,移植后 4 种神经生长因子在协同作用下可减轻坐骨神经损伤。

7 存在的问题和展望

坐骨神经损伤是常见的周围神经损伤,在当前受到广泛的关注和研究。目前基础研究主要是通过基因转染技术,使目的细胞大量表达特定蛋白来改善局部微环境,促进神经的修复与再生,其效果相对于神经移植和单纯性的细胞移植要明显。然而基因工程细胞技术当前还处于动物实验阶段,在临床上应用甚少,且基因工程细胞修复神经损伤的机制、选何种目的细胞及表达的特定蛋白等问题,都有待于进一步的深入研究。基因工程细胞技术作为一种新的治疗手段得到了重视,应联合外科显微技术、药物治疗、针灸等多种治疗方法联合,通过综合治疗,相信将会在周围神经自体移植或神经导管支架桥接手术中得到广泛应用并起到更好的治疗效果,从而减轻患者术后的活动不便和经济负担。

[参考文献]

[1] Maurer MH, Thomas C, Bürqers HF, et al. Transplantation of adult neural progenitor cells transfected with vascular endothelial growth factor rescues grafted cells in the rat brain[J]. Int J Biol Sci, 2008, 4(1): 1 – 7.

[2] Zheng XR, Zhang SS, Yin F, et al. Neuroprotection of VEGF-expression neural stem cells in neonatal cerebral palsy rats[J]. Behav Brain Res, 2012, 230(1): 108 – 115.

[3] 康 庄, 胡志强. 神经干细胞培养、鉴定及分化调控机制的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(23): 3929 – 3932.

[4] Flax JD, Aurora S, Yang C, et al. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(11): 1033 – 1039.

[5] Fu KY, Dai LG, Chiu IM, et al. Sciatic nerve regeneration by microporous nerve conduits seeded with glial cell line-derived neurotrophic factor or brain-derived neurotrophic factor gene transfected neural stem cells[J]. Artif Organs, 2011, 35(4): 363 – 372.

[6] 雷正旺, 薄占东, 洪光祥, 等. 神经营养素 3 基因修饰的神经干细胞对周围神经再生修复的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(1): 80 – 82.

[7] 胡莲美, 朴英杰, 武 雷, 等. 人发角蛋白丝束修复大鼠坐骨神经损伤的实验研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2005, 23(2): 172 – 176.

[8] 胡莲美, 朴仲贤, 王启伟, 等. 大鼠坐骨神经切除后人发角蛋白诱导的神经的再生机制[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(7): 1136 – 1140.

[9] Zong HB, Zhao HX, Zhao YL, et al. Nanoparticles carrying neurotrophin-3-modified Schwann cells promote repair of sciatic nerve defects[J]. Neural Regeneration Research, 2013, 8(14): 1262 – 1268.

[10] Liu G, Wang X, Shao G, et al. Genetically modified Schwann cells producing glial cell line-derived neurotrophic factor inhibit neuronal apoptosis in rat spinal cord injury[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(4): 1305 – 1312.

[11] Svaren J, Meijer D. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells[J]. Glia, 2008, 56(14): 1541 – 1551.

[12] 丁文彬. GFP 转染的骨髓来源神经元样细胞桥接修复坐骨神经长距离缺损的研究[D]. 上海:第二军医大学,2013.
[13] 高 峰,田玉科,杨 辉,等. 鞘内移植 hPPE 修饰 INPC 对大鼠慢性神经病理性疼痛的镇痛效应[J]. 中华麻醉学杂志,2007,27(3):264 - 267.
[14] Neuhuber B, Timothy HB, Shumsky JS, et al. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations [J]. Brain Res, 2005, 1035(1):73 - 85.
[15] Chen SH, Wanq JJ, Chen CH, et al. Umbilical cord blood-derived CD34 + cells improve outcomes of traumatic brain injury in rats by stimulating angiogenesis and neurogenesis [J]. Cell Transplant, 2014, 23(8):959 - 979.
[16] 张 威,周明武,幸超峰,等. NT-3 转染的 BMSCs 联合异体去细胞神经移植修复大鼠坐骨神经缺损[J]. 实用医药杂志,2013,30(10):907 - 911.
[17] 陈解元,孙 怡,赵国栋. 神经病理性痛大鼠鞘内注射人前脑啡肽原基因修饰骨髓间充质干细胞的镇痛效果[J]. 中华麻醉学杂志,2010,30(12):1437 - 1439.
[18] 杨劲松,陈峥嵘. 携带胶质细胞源性神经营养因子基因的骨髓间充质干细胞移植对兔坐骨神经缺损的治疗作用[J]. 中华创伤杂志,2010,26(11):1030 - 1034.
[19] 郑明辉,张志坚,黄东煜,等. 脑源性神经营养因子基因修饰骨髓间充质干细胞治疗坐骨神经损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(1):120 - 124.
[20] Ding P, Yang Z, Wang W, et al. Transplantation of bone marrow stromal cells enhances infiltration and survival of CNP and Schwann cells to promote axonal sprouting following complete transection of spinal cord in adult rats[J]. Am J Transl Res, 2014, 6(3):224 - 235.
[21] Dadon-Nachum M, Ben-Zur T, Srugo I, et al. herapeutic effect of myogenic cells modified to express neurotrophic factors in a rat model of sciatic nerve injury[J]. J Stem Cells Regen Med, 2012, 8(1):21 - 27.

(编辑:周小林)

线粒体通透性转换孔与心肌缺血再灌注损伤

Mitochondrial permeability transition pore and myocardial ischemia-reperfusion injury

杨新征[1],于 飞[2] (1. 解放军第 222 医院病理科,吉林 吉林 132011;2. 解放军第 222 医院特诊科,吉林 吉林 132011)

[关键词] 线粒体通透性转换孔;心肌;缺血再灌注
[中图分类号] R541 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)06-0668-03

线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,MPTP)是位于线粒体内、外膜之间的非特异性孔道,是由多种线粒体蛋白构成的复合体。目前,国内外研究已经证实,MPTP 开放所引起的线粒体通透性变化在细胞凋亡过程中发挥了重要作用[1]。随着研究的深入,人们发现缺血、缺氧、氧化应激等刺激因素都可能引起 MPTP 开放,使线粒体通透性发生改变,从而对多种疾病的发生、发展过程产生影响[2]。本文就 MPTP 及其与心肌缺血再灌注损伤的关系进展情况作一综述。

1 MPTP 的结构与功能

1.1 MPTP 的结构

迄今为止,研究人员仍未能完全阐明 MPTP 的具体结构。目前通常认为 MPTP 是由多种蛋白组合而成的复合体,其成分主要包括电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel,VDAC)、腺嘌呤核苷酸转位酶(adenine nucleotide translocase,ANT)、亲环蛋白 D(cyclophilin D,Cyp D)等。

1.1.1 VDAC 电压依赖性阴离子通道(VDAC)位于线粒体外膜,具有阴离子选择性和电压依赖性。VDAC 能够形成亲水性的电压依赖通道,调控细胞浆和线粒体间的物质交换和能量代谢,在细胞的生长及凋亡过程中发挥着重要作用[3]。通常情况下,VDAC 处于稳定开放状态,对带负电荷的阴离子具有优先选择性。VDAC 的电压依赖性表现为低电压时的高通透性和高电压时的低通透性。当跨膜电压突然大幅度升高或降低时,VDAC 开放被抑制,对阴离子的通透性明显降低。VDAC 结构和功能的变化直接影响了细胞的物质交换,从而损伤线粒体的呼吸功能,引起能量代谢异常。因此,VDAC 又被称为线粒体功能的调控者。

1.1.2 ANT 腺苷酸转位酶(ANT)是线粒体内膜上含量最多的蛋白,其功能是将线粒体内合成的 ATP 运送至细胞浆,同时将细胞浆中的 ADP 运送至线粒体内,完成胞浆与线粒体的 ADP 与 ATP 交换[4]。进入线粒体基质的 ADP 不仅参与线粒体的磷酸化作用,也对线粒体的氧化呼吸功能起到刺激作用。ANT 存在多种异构体,其分布具有明显的组织特异性,ANT 的不同表型在组织中的特异性表达可能与不同组织的能量需求有关。人类主要有 ANT1、ANT2、ANT3,大鼠只有 ANT1、ANT2 两种。

1.1.3 Cyp D 亲环蛋白 D(Cyp D)位于线粒体基质,是具有 MPTP 关闭作用的环孢素 A(CsA)的结合位点。当发生缺血再灌注时,Cyp D 的构型产生变化,从而影响线粒体转换孔的形成。研究显示,在心肌细胞中,Cyp D 和线粒体通透性改变是 Ca^{2+} 超载和氧化损伤引起细胞死亡的关键因素[5]。Tsujimoto

doi:10.11659/jjssx.01E015033
[收稿日期] 2015-07-28 [修回日期] 2015-09-15