维普资讯 http://www.cqvip.com

capsulated interleukin-2 cure murine MC-38 and 3LL tumors and establish tumor-specific immunity. Blood, 1997, 89: 2529 - 2536.

9. Park JN, Gillespie GY, Love CE, et al. Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. PNAS, 2000, 97: 2208 - 2213.

10. Horton HM, Anderson D, Hernandez P, et al. A gene therapy for cancer using intramuscular injection of plasmid DNA encoding interferon alpha. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 1553 - 1558.

11. Kikuchi T, Joki T, Saitoh S, et al. Anti-tumor activity of interleukin-2-producing tumor cells and recombinant interleukin-12 against mouse glioma cells located in the central nervous system. Int J Cancer, 1999, 80: 425 - 430.

12 Giezeman-Smits K, Okada H, Brissette-Storkus CS, et al. Cytokine gene therapy of gliomas: induction of reactive CD_4^+ T cells by interleukin-4 transfected 9L gliosarcoma is essential for protective immunity. Cancer Res, 2000, 60: 2449 - 2457.

13. Fakhrai H, Dorigo O, shawler DL, et al. Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy. Pro Nat Acad Sci USA, 1996, 93: 2909 - 2914.

(收稿日期:2002-01-15)

周围神经修复与再生研究进展

段现来* 曾志成*

周围神经修复与再生基础研究涉及到诸多因素:神经营养因子对神经元胞体的保护;神经再生微环境的重建;桥接物与神经缺损的修复与再生;神经末梢及效应器的再生与重建等。为进一步探讨周围神经的修复与再生,现综述如下。

一、神经营养因子对损伤神经元胞体的保护

周围神经损伤虽然局限于神经元轴突的部位,但作为基础研究应分为对神经元胞体、神经轴突、神经末梢和效应器四个部分加以研究。周围神经损伤导致神经轴突中断后,可引起轴突损伤远端发生华氏变性和近端的逆行性溃变。由于神经轴突逆行运输中断,神经元失去赖以生存的基础,逐渐变性甚至部分死亡,一定数量的神经元死亡是神经功能恢复不满意的主要原因之一。作为细胞的营养中心,只有在神经元胞体没有死亡的条件下才有轴突再生。因此设法保护神经元胞体在周围神经损伤后免于或较少发生退变死亡,是恢复神经功能的关键。神经损伤早期给予神经营养物质,它们可作用于细胞表面的相应受体,然后分别通过相应的信号传导通路来调控某些基因的表达,对神经元存活和轴突生长起重要作用[1]。

神经营养因子作为一类小分子肽类物质,主要包括神经生长因子家族(NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6)及非NGF家族(CNTF, IGF, GDNF, SDNF)等多种物质:①NGF是神经系统最重要的生物活性因子之一,主要对交感神经元、感觉神经元生长、发育、分化、存活和功能特性的表达具有重要调节作用,有防止神经元胞体在周围神经损伤后发生退变死亡的作用,在断端给以外源性的NGF即可取得对周围神经损伤后的脊神经节神经元较好的保护效应,另一方面对运动神经元也有明显的保护作用,促进神经轴突延伸和髓鞘化;②BDNF对神经元存活及轴突再生影响方面的研究也比较多,BDNF和NGF有50%的同源性,参与促进感觉、运动神经元的存活、突起的生长及突触的可塑性调节。在成年大鼠脊髓背神经和新生幼鼠坐骨神经切断后,给以外源BDNF、CTNF、GDNF等可以减少相应运动神经元的死亡[2]。实验则证实啮齿类动物坐骨神经的再生及髓鞘化需要内源性的BDNF;③在阻止损伤后运动神经元死亡的作用上,NT-3和BDNF有相同效应,两者共同作用更有利于髓化纤维的再生,极强地挽救损伤运动神经元的死亡,长期利用有利于轴突再生;④雪旺细胞源性神经生长因子(SDNF)不但具有维持体外培养神经元存活的显著作用,对受损的运动神经元有显著的保护作用;⑤除了上述这些神经营养因子外,还有其它一系列物质:IGF, IL-1β, TNF, FGF, GAP-43, ATP, t-PA, 糖皮质激素,雌激素、褪黑激素等方面的报道[1]。

二、神经再生微环境的重建

神经损伤部位的微环境状况是影响神经再生的重要因素之一,重建最佳神经再生微环境,有利于保护受损神经元,促进轴突的有效再生。基础研究已关注到有关成分的作用:层粘连蛋白、纤维连接蛋白、胶原蛋白、雪旺细胞(SC)、基膜和促神经生长的多种因子,均可促进轴突生长和功能恢复[4,5]。神经再生局部微环境的重建,除了直接加入外源性的神经营养因子或细胞外基质外,SC及其基膜对轴突再生起重要的诱导作用,以前用于移植的SC多采用经培养后,直接将细胞悬液或混入胶体材料注射入损伤部位,这样生长的SC缺乏立体结构和方向性,不利于轴突的再生及髓鞘化,近年人们探索建立了各种有效的立体培养体系,运用组织工程学原理进一步改进,对聚羟基乙酸细丝支架进行化学改性处理,再以层粘连蛋白进行生物学修饰,在模拟微重力条件下SC悬液接种在支架材料上培养,取得了更好的效果。

* 作者单位:410078 长沙市中南大学湘雅医学院解剖学教研室

维普资讯 http://www.cqvip.com

对周围神经的损伤或病变部位实行细胞替代或基因转移治疗，是当代新发展起来并极有前景的治疗战略。Sorensen等[6]认为腺病毒基因转染受损神经的SC是可行的，此种细胞所产生的神经营养因子物质，可以作为受损神经外科修复治疗的补充。有人移植NT-4基因修饰细胞到大鼠坐骨神经离断处，发现对损伤所致运动神经元的退变有显著的改善作用；采取NT-3重组腺病毒，即Ad-NT-3感染靶细胞能表达足够量有较强生物活性的NT-3蛋白，此蛋白能促进体外培养的DRG细胞的存活[7]。将CNTF、BDNF转染以腺病毒为载体的体细胞，促进了切断轴突的神经元存活和再生；还有学者[8,9]能够表达t-PA(纤溶酶原激活剂)的含有t-PA基因的重组质粒转染一种称为PC12的嗜铬细胞，在三维基质的培养基中比普通培养基中轴突生长快，证实t-PA在一定条件下形成良好的微环境。由于神经再生具有一定特异性，采用神经再生小室构建神经再生局部微环境效果可靠。

三、桥接物与神经缺损的修复

周围神经横断损伤后可分为无缺损和有缺损两种情况：无缺损时可以直接缝合；有缺损时，应尽早采取措施有效恢复损伤神经的连续性。后者临床上又分两种情况：小段缺损(2～4cm)可以通过延长或游离损伤神经、屈曲关节等方式克服神经缺损，然后再按无缺损损伤处理。但应保证神经的无张力缝合，否则，神经会在张力牵引下出现水肿、脱髓鞘及轴突退变，导致周围神经再生不佳；长段神经缺损临床上多采取神经移位、选择桥接物(自体神经)的方法。自体神经移植仍然是临床修复神经缺损的重要方法，自体神经移植修复时，可以通过牺牲周围另一条功能相对次要的神经，移位到毁损的神经与神经的远端进行缝合，以恢复重要的神经功能。但自体神经来源有限，直径往往与损伤神经不符，切取后可造成供区神经功能障碍及神经瘤的形成。因此人们不断探索研究，先后实验寻找构建许多不同类型的桥接物：①生物材料桥接物：除了自体神经外，国内外学者有不少尝试，如曾志成等[10,11,13]利用荧光标记显示骨骼肌桥接周围神经缺损疗效确切、并运用同系异体神经桥接修复大鼠周围神经缺损，用胎儿神经加自雪旺氏细胞桥接修复周围神经缺损；刘强[12]应用深低温冷冻加液氮双重冷冻处理胎兔周围神经降低抗原性后进行同种异体移植。实验表明上述桥接物可不同程度恢复损伤神经功能，有的则与自体神经移植无显著差异；其他学者还用静脉体基底膜雪旺细胞和神经生长因子复合来修复周围神经的缺损，这些都不同程度满足了自体神经桥接作用。②非生物材料桥接物：国内外报道很多：Lundborg[14]等利用有内支架硅胶管可较好修复大鼠15mm神经缺损，但此类非降解材料会作为异物留在体内，影响神经功能的进一步恢复；Kiyotani等[15]用覆有胶原的生物可降解材料多聚羟基乙酸管结合神经营养因子桥接修复大鼠25mm缺损，结果恢复理想；Dunne等[16]用生物可降解材料聚乳胶(PLA)与聚ε-己内酯的共聚物神经导管，效果堪与自体神经媲美。近几年来，随着生命科学以及材料学的发展，组织工程学应运而生。SC在神经轴突再生过程中可以为其提供Büngner带，分泌多种神经营养物质、相关细胞外基质和细胞粘附分子等，已成周围神经组织工程的核心。沈尊理等[17]利用种植SC、具有内部支架的组织工程化人工神经来修复大鼠长段神经缺损，六个月支架生物纤维完全降解，适合修复神经缺损。若进一步将SC和相应基质与具有良好生物相容性和可渗透性，能保证SC存活、分裂、增殖和发挥其促进神经再生作用的生物可降解材料复合，对SC利用基因工程技术进行基因修饰立体三维培养，即制成有特定三维结构的可降解神经导管内，有生物活性、能分泌各种生长因子的SC在支架内有序地排列分布，类似Büngner带，制成理想的周围神经修复材料，从而在治疗周围神经损伤上取得突破。

生物与非生物的桥接物要替代自体神经移植真正用于临床，还有待进一步研究。在无法进行神经移植和神经移位术的部位，进行神经端侧吻合，使神经功能得到部分恢复。当受损神经两端同一正常神经干进行端侧缝合后，受损神经能够沿着正常神经干克服缺损进行再生。受损神经远端的再生纤维部分来自受损神经近段，部分来自正常神经的侧芽生长，正常神经侧向分流式生长的可能性提示，单纯将一受损神经的远端与神经干行端侧吻合后也可能取得神经功能的恢复。正常神经干在小的缺损范围内能为再生纤维提供引导支架和引导再生的雪旺细胞。易西南等[18]实验表明"再生纤维部分来自正常神经的侧芽生长"尚没有直接依据，故周围神经端侧吻合的临床应用推广有待于寻求进一步基础研究的支持。

四、神经末梢及效应器的再生与重建

周围神经损伤后，如果再生轴突没有及时到达，可引起运动终板、感觉终器的退变和肌肉萎缩，这已引起人们的重视。Card[19]认为神经元轴突损伤后，骨骼肌会退化萎缩，尤其靠近骨骼肌的神经损伤更会加速肌的萎缩。有人认为对损伤神经行端侧吻合，在受损神经近端的再生纤维未到达时，来源于正常神经干再生纤维的先期支配，有利于防止肌肉萎缩及终板退变；利用胚胎运动神经元种植到失神经支配骨骼肌，结果可以有效防止骨骼肌的萎缩；Tews等[20]提出如何在基因水平阻断肌细胞凋亡，是治疗失神经骨骼肌萎缩的一个崭新的概念。在长期失神经支配的骨骼肌中运动终板和肌卫星细胞含量的下降是造成神经修复疗效欠佳的重要原因。在损伤局部应用NGF则可减少运动终板的变性，促进损伤神经的功能恢复。Koirala等[21]则认为再生轴突终末和突触前SC交互作用调控神经肌接头的再支配过程，即再生神经终末引导突触前SC形成突起，而突触前SC反过来引导神经肌接头进一步完善、重塑。

周围神经损伤的修复、再生与治疗已取得了可喜的临床效果，但很多有待解决问题的研究还停留在实验室动物实验的阶段。临床医学的发展离不开基础医学理论的支持，科学研究者任重而道远。但随着分子生物技术的发展及基因工程的进展，使用携带所需基因的逆转录缺陷病毒等的基因治疗，进行体细胞基因转染及细胞移植，为神经元损伤性疾病的治疗提供了一个新途径。生物技术产品的蓬勃发展，组织工程桥接物的出现，部分研究成果已用于临床、但并不象人们所望的那样"药到病除"。神经损伤修复机制复杂，组织工程、基因治疗代表一个阶段的开始，而不是这个问题的终结，但已为神经损伤的修复、再生与治疗开辟了广阔的前景。

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

1. Martin G, Hanson JR, Bavres BA, et al. Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neuron in vitro. J Neurosci, 1998, 18(8): 7361.
2. Sendtner M, Hotlmann B, Kolbeck R, et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. Nature, 1992, 360(6406): 757-759.
3. Chang, HM, Ling EA, Lue JH, et al. Melationin attenuates neuronal NADPH-d/NOS expression in the hypoglosssl nucleus of adult rats following peripheral nerve injury. Brain Res, 2000, 873(2): 243-251.
4. Rodriguez FJ, Gomez N, Perego G, et al. Highly permeable polylacide-caprolactone nerve guides enhance peripheral nerve regeneration through long gaps. Biomaterial, 1999, 20: 1489-1500.
5. Tong XJ, Hirai KI, Shimada H, et al. Sciatic nerve regeneration navigated by laminin-fibronectin double coated biodegradable collagen grafts in rats. Brain Res, 1994, 663: 155-162.
6. Sorensen J, Haase C, Kranip C, et al. Gene transfer to Schwann cells after peripheral nerve injury: a delivery system for therapeutic agents. Ann Neurol, 1998, 43(2): 205-211.
7 Dijkhuizen PA, Heeuents WT, Teuuis MA, et al. Adenovira; vector-directed expression of neurotrophin-3 in rat dorsal root ganglion explants results in a robust neurite outgrowth response. J Neurobiol, 1997, 32(2): 172-184.
8. Pittmann RE, Dibenieditto AJ. PC12 cell overexpressing tissue plasminogen activator regenerate neurites to a greater extent and migrate fast than control cell in complex extracellular matrix. J Neurochem, 1995, 64: 566-575.
9. Hyden SM, Seeds NW. Modulated expression of plasminogen activitor system components in cultured cells from dissociated mouse dosal root ganglia. J Neurosci, 1996, 16: 2307-2317.
10. 曾志成. 荧光标记法对骨骼肌桥接周围神经缺损的评价. 中国临床解剖学杂志, 1991, 19(6): 541-544.
11. 曾志成, 王铁霞. 同系异体神经桥接大鼠周围神经缺损的形态学观察. 湖南医科大学学报, 1991, 19(6): 541-544.
12. 刘 强, 孟庆水, 韩西城, 等. 同种异体移植神经再生能力的实验研究. 中华创伤杂志, 1996, 12(5): 315-316.
13. 易西南, 曾志成. 胎儿神经加自雪旺氏细胞桥接修复周围神经缺损实验研究. 中国局解手术学杂志, 1998, 7(4): 194-198.
14. Lundborg G, Dahin L, Dohi D, et al. A new type of bioartificial nerve gratt for bridging extended defects in nerves. J Hand Surg (Br), 1997, 22(3): 299.
15. Kiyotani T, Teranuchi M, Takimoto Y, et al. Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collgen tube: a histological and electrophsiological evaluation of regenerated nerves. Brain Res, 1996, 740: 66-74.
16. Dunne WF, Vader L B, Schakenraad JM, et al. Poly (DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guides perform better than autologous nerve grafts. Mirosurg, 1996, 17(7): 348.
17. 沈尊理, Berger A, Hiemer R, 等. 组织工程化人工神经修复长段神经缺损的实验研究. 中华手外科杂志, 2001, 17(2): 112-115.
18. 易西南, 李昌琪. 周围神经端侧吻合再生纤维的实验研究. 中国临床解剖杂志, 2001, 19(3): 252-253.
19. Card DJ. Denervation in sequence of neuromuscule degenerative changes in rats and the effects of stimulation. Exp Neurol, 1997, 54: 251-265.
20. Tews DS, Goebel HH, Meinck HM. DNA Fragmentation and apoptosis-related proteins of muscle cells in motor neuron. Acta Neurol Scand, 1997, 96: 380-386.
21. Koirala S, Qiang H, Ko CP. Reciprocal interaction between perisynaptic Schwann cells and regenerating nerve terminals at the frog neuromuscular junction. J Neurobiol, 2000, 44(3): 343-360.

(收稿日期: 2002-02-18)

少突胶质细胞应用的研究与思维方法

许愿忠* 曾志成*

少突胶质细胞是中枢神经系统的成髓鞘胶质细胞,但传统认为其抑制中枢神经系统损伤后的再生。直到最近利用神经干细胞分化、纯化、培养少突胶质细胞方法的出现,才使人们对其应用的研究产生了兴趣并在某些方面取得了成功。科学在于创新,在于突破,实践-认识-再实践-再认识的思维方法对指导少突胶质细胞应用的研究起着十分重要的作用。

一、传统对少突胶质细胞的认识和困惑

少突胶质细胞是位于中枢神经系统内的一种神经胶质细胞,在金属浸镀标本上,少突胶质细胞的突起比星形胶质细胞的小和少,故 Delrio-Hortega(1921年)称之为少突胶质细胞。其又可分为束间、神经元周和血管周少突胶质细胞三种,据其电镜下的不同致密度和胞核异染色质聚集情况差异,Mori 等(1970年)把少突胶质细胞分为亮型、中间型和暗型三种,而 3H-胸腺嘧啶核苷法研究指出亮型少突胶质细胞分裂最活跃。GC(半

* 作者单位:410078 长沙市中南大学湘雅医学院解剖学教研室