DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.033
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2143-03

综述

移植修复脊髓损伤的实验研究方法进展

Advances in methods for experimental studies of repair of spinal cord injury

张一鸣[1] 综述,李振强[2] 审校 (第三军医大学:[1]学员旅五队;[2]基础医学部解剖学教研室,重庆 400038)

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)可因各类事故、运动、暴力等造成,患者常有截瘫等后遗症,生活不能自理。如何促进SCI后的神经再生和功能恢复,治愈截瘫,一直是医学界一大难题。近年来,采用移植方法修复受伤脊髓的实验研究取得了较大进展。周围神经、胚胎中枢神经、多种细胞都被证实能够改善脊髓损伤部位的微环境,促进损伤脊髓的再生和修复;不同移植方法也对实验结果造成影响,现就此进行综述。

1 周围神经移植

1.1 移植物及作用机制

周围神经移植是指利用自体或异体的周围神经移植物(Peripheral nerve graft, PNG)进行移植。PNG的选取应遵循容易获得和对供体损伤尽量小的原则,大多取自自体正中神经、腓神经和胫神经等,也可用异体小段肋间神经[1]。其作用机制为:①神经束膜内层扁平上皮的基膜构成基膜管,为新生轴突提供物理性通道;②PNG的雪旺细胞(SC)可髓鞘化再生轴突,并能合成、分泌多种高浓度神经营养因子(NTF)、细胞外基质和细胞间粘附分子,有利于神经元存活并促进轴突再生;③SC可抑制星形胶质细胞过度增殖,减轻胶质瘢痕形成;④适度刺激室管膜细胞增殖,使其有利于脊髓再生[2]。

1.2 移植方法

基本术式有二:①将PNG一端植入脊髓伤处颅侧几个节段内,另一端与脊神经缝合,以恢复脊神经的中枢支配;②将PNG两端分别植入创伤处的颅侧和尾侧,重建脊髓内部的联系通路。PNG的移植效果受其血供、移植部位、处理方法和连接方式等因素影响,有关实验也集中在探索PNG的最佳移植方式。

游离PNG难以和受体床建立良好血液循环,只能靠组织液渗透维持存活,若其厚度过大,容易发生"中心性坏死",失去"桥梁"作用。若PNG带血管蒂,则可改善创伤局部的缺血状态,提供丰富营养物质,减轻继发性病理反应。用自体带血管蒂正中神经转位植入脊髓创腔,术后观察,新生轴突数量,S-100(100%饱和硫蛋白)和NF(神经微丝蛋白)阳性反应均明显高于不带蒂的对照组[3]。但应注意勿使血管蒂扭转。

通常PNG被取得后立即移植,但所含SC尚未大量地分化和增殖,不能有效地促进轴突再生;移植术后,PNG发生瓦勒氏变性,SC受到刺激而分化增殖,几日后达到一定数量,但已形成的胶质瘢痕可抑制轴突再生。Senoo对腓总神经进行预先结扎,7 d后切取小段预处理的腓总神经植入脊髓创腔。结果实验组星形胶质细胞的增殖被抑制;4到16周,实验组再生轴突数量是对照组(未损伤PNG)的10倍,同时胶质瘢痕显著低于对照组,他认为经预损伤处理的PNG含有大量的活化SC,促轴突再生的作用更强[4]。

用PNG桥接脊髓损伤处颅尾端的上下行传导束,原有传导束的再生轴突极少能贯穿PNG;另外,再生轴突大多发自损伤处附近的中间神经元。基于此,Cheng[1]用异体小段肋间神经将创腔颅侧下行传导纤维与尾侧灰质连接,尾侧上行传导纤维与颅侧灰质连接,术后大鼠后肢功能有明显而持久的恢复,第1次确定运动功能可以恢复。Liu[5]还指出,若用PNG桥接受伤脊髓和脊神经,PNG植入处应至少距损伤处2个节段以避开继发性病理损伤区。还有学者将NTF与PNG联合应用促进和诱导轴突生长。

利用PNG移植修复SCI的手术难度大,在脊髓和外周靶目标间搭桥,不符合原有解剖结构,可能存在潜在不利因素。

2 胚胎中枢神经组织移植

2.1 移植物及作用机制

移植物包括胚胎脊髓组织(FSC)和胚脑组织。作用机制为:①移植物所含神经元生长分化后与宿主脊髓形成突触联系,所含胶质细胞对再生轴突髓鞘化;②作为"桥"供新生轴突通过;③抑制胶质细胞增殖,减轻胶质瘢痕。④一些含特殊细胞团块的移植物,如含中缝蓝斑核的脑干移植物,可促进轴突再生。Zurita[2]发现移植的胚脑皮质分化增殖强于FSC,但修复效果无差异。Itoh认为FSC优于胚脑组织[6]。目前多采用FSC。

2.2 移植方法

多用组织块直接植入,移植物可用显微器械在镜下分离切取获得,但操作较难。采用交替挤压剪取的脊柱,使FSC从一端膨出的方法获取移植物[7],快速简便。用注射器抽吸法获取FSC,再注入脊髓创腔[8],则更为简单。移植时应注意清除脑脊膜等组织,也要避免将周围组织带入,以免瘢痕生成。条状组织块还应尽量沿颅尾方向移植,以符合原有解剖结构。对于更符合人类SCI的挫伤模型,组织块移植需要分离不完全损伤的脊髓,难度较大,可采用FSC的混合细胞悬液注入法。

FSC移植也存在移植物的血供和营养等问题,减轻抑制轴

作者简介:张一鸣(1981-),男,河南省郑州市人,1999级七年制学员,电话:(023)68752414
通信作者:李振强,电话:(023)68752225
收稿日期:2003-01-17;修回日期:2003-08-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

突再生因素的方法包括联合移植大网膜或 PNG、应用 NTF 等。大网膜可吸收损伤局部的渗血、渗液、减轻水肿。若大网膜带血管蒂,因其血运丰富,可与脊髓建立广泛的血管联系,改善胚胎移植物和宿主神经元的存活,减轻继发病理反应[8]。实验证实,接受带血管蒂大网膜和 FSC 联合移植的动物,其功能恢复优于FSC 单纯移植[8]。用胚胎组织和带血管蒂 PNG 联合移植,发挥协同作用也可更大程度地促进轴突再生[9]。有学者还用含FSC的生物导管作为移植物,发现虽然再生轴突可进入导管,不能通过远端的移植物-宿主界面[10]。

胚胎移植物的取得存在伦理、法律等问题。若采用自体带血管蒂组织联合移植,其转位路径上任何一处的压迫都会造成缺血,受体还要经受由游离带蒂组织引起的二次打击,均对机体恢复不利。

3 细胞移植

3.1 移植物

移植细胞主要分为神经元、胶质细胞、干细胞等。此法可克服移植物来源及伦理道德等问题,也有利于研究各种细胞的具体作用,被广泛采用。

向脊髓创伤处移植有活力的神经元可替代坏死神经元与未受损脊髓建立联系。移植细胞包括单胺能神经元、运动神经元、背根神经节(DRG)神经元等。例如:胚鼠中缝核的 5-HT 能神经元植入成年大鼠损伤的脊髓后,不仅和单胺能纤维建立联系,还可下调受伤后过度表达的 GABA 能受体,动物功能有部分恢复[11]。植入未损伤颈髓的胚鼠腰髓腹角的运动神经元可在灰质和白质中向脊髓吻、尾侧分别迁入 2 mm,并发出突起与宿主神经元形成局部联系,存活达 10 周[7]。植入成年大鼠未损伤脊髓中的人胚 DRG 神经元可克服 PNS-CNS 界面与外周靶肌肉形成功能性突触,表明 DRG 神经元可用于 SCI 的修复[12]。

SCI 破坏了胶质微环境,阻碍神经再生。如果通过植入胶质细胞重建适宜的胶质微环境,将有利于轴突再生。SC 在 PNG 移植修复中起关键作用,为胶质细胞移植的首选。嗅鞘细胞(Olfactory sheath cell, OEC)不仅可像 SC 一样形成髓鞘包裹轴突,还可随轴突进入 CNS,推测也可为再生轴突提供通道,促进引导轴突再生。在 Li 首次报道移植 OEC 修复 SCI 之后,Lu 等[13]将成年大鼠脊髓全横断 4 周后植入 OEC,10 周观察,发自中缝核的 5-HT 能纤维长入横断处尾侧脊髓,大鼠运动功能明显改善。还有作者发现植入脊髓创腔的未成熟星形细胞可相互连接成疏松网状结构填充创腔阻止脑脊膜的侵入,从而减轻瘢痕形成,利于受伤脊髓的修复[14]。

其它移植细胞还有干细胞、嗜铬细胞、巨噬细胞等。如神经干细胞可存活并分化为神经元和胶质细胞,分别发挥作用;嗜铬细胞可减轻轴突无序再生引起的慢性疼痛;巨噬细胞可行使小胶质细胞功能,吞噬抑制轴突再生的组织崩解碎片[14,15]。

3.2 移植方法

供体细胞多用微量注射器直接向创伤处注射,但细胞液可渗入脊膜间隙导致受伤处移植细胞数减少,此法还不能有效抑制周围组织的侵入生长和胶质细胞增殖形成的瘢痕。生物性导管可抑制瘢痕形成和保证局部细胞的浓度,但易引起异物和毒性反应,还对脊髓造成机械性压迫,并不能证明含移植细胞的生物导管更能促进脊髓再生[16]。可降解导管能减轻不良反应,但若降解过快也不能有效阻止结缔组织侵入,降解塌陷的导管还压迫内部移植细胞索,阻碍轴突生长[17]。未来研究应着力开发有适宜力学特征、良好通透性、降解速率合适的生物相容性导管。

细胞移植时可联合应用 NTF,但采用直接注射法不能保持创伤局部有持久高浓度的 NTF,静注或口服存在 NTF 不能通过血脑屏障的问题。若埋置导管,用动力泵持续输入 NTF[18]有可能造成受体感染。将外源性基因导入受体细胞再行移植,使 NTF 持续释放,可有效促进神经再生。常用受体细胞有 SC、成纤维细胞、胶质细胞等。成纤维细胞获取简便、易于繁殖,被广泛应用。但转移基因的表达不能持久,外源基因的靶向性等问题尚需解决。

尽管细胞移植的临床应用前景较好,但移植细胞的致肿瘤潜能与机体的免疫排斥问题都不容忽略。

4 问题与展望

综上所述,随着对脊髓再生机制的认识深入以及实验方法的改进,用移植方法修复 SCI 取得了一些令人振奋的结果,但仍有许多问题需要解决。例如:缺乏统一的实验标准,不同的实验动物、致伤条件、致伤部位和手术操作均会对实验结果造成影响,影响对移植物的作用评价。脊髓的再生机制仍然不清,尽管发现了一些与脊髓再生有关的生物因子、微环境因素等,但尚未能进行有效地人工干预。建立新型有效模型及可靠的评价标准,继续深入研究不同的脊髓再生控制因素,是今后仍需努力的方向。相信随着研究的深入,移植修复 SCI 有望成为临床治疗 SCI 的有效手段。

关键词:脊髓损伤(SCI);移植;再生
中图法分类号:R617;R651.2 文献标识码:A

参考文献:

[1] Cheng H, Cao Y H, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function[J]. Science, 1996, 273(5274): 510-513.

[2] Zurita M, Vaquero J, Oya S. Grafting of neural tissue in chronically injured spinal cord: influence of the donor tissue on regenerative activity[J]. Surg Neurol, 2000, 54(2): 117-125.

[3] 郭庆山, 王爱民, 孙红振, 等. 带蒂神经植入脊髓后许旺细胞的存活与迁移[J]. 中华显微外科杂志, 2001, 24(4): 275-277.

[4] Senoo E, Tamaki N, Fujimoto E, *et al*. Effects of prelesioned peripheral nerve graft on nerve regeneration in the rat spinal cord[J]. Neurosurgery, 1998, 42(6): 1347-1356.

[5] Liu S, Aghakhani N, Boisset N, *et al*. Innervation of the caudal denervated ventral roots and their target muscles by the rostral spinal motoneurons after implanting a nerve autograft in spinal cord-injured adult marmosets[J]. J Neurosurg, 2001, 94(1 Suppl): 82-90.

[6] Itoh Y, Mizoi K, Tessler A. Embryonic central nervous system transplants mediate adult dorsal root regeneration into host spinal cord[J]. Neurosurgery, 1999, 45(4): 849-856; discussion 856-858.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[7] Demierre B, Ruiz P, Kato A C. Grafting of embryonic motoneurons into spinal cord and striatum of adult mice[J]. Stereotact Funct Neurosurg, 1990, 54—55: 328—336.
[8] 张 强, 廖维宏, 王正国, 等. 胚胎脊髓不同移植方法促进成鼠损伤脊髓功能恢复的研究[J]. 创伤外科杂志, 1999, 1(2): 89—91.
[9] 郭庆山, 王爱民, 蒋祖言, 等. 多种神经组织修复成鼠脊髓损伤的实验研究[J]. 创伤外科杂志, 2002, 4(1): 20—23.
[10] Bamber N I, Li H, Aebischer P, *et al*. Fetal spinal cord tissue in mini-guidance channels promotes longitudinal axonal growth after grafting into hemisected adult rat spinal cords[J]. Neural plast, 1999, 16(4): 103—121.
[11] Dumoulin A, Privat A, Gimenze R M. Transplantation of embryonic Raphe cells regulates the modifications of the gabaergic phenotype occurring in the injured spinal cord[J]. Neuroscience, 2000, 95(1): 173—182.
[12] Levinsson A, Holmberg H, Schouenborg J, *et al*. Functional connections are established in the deafferented rat spinal cord by peripherally transplanted human embryonic sensory neurons[J]. Eur J Neurosci, 2000, 12(10): 3589—3595.
[13] Lu J K, Feron F, Mackay S A, *et al*. Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord[J]. Brain, 2002, 125(Pt 1): 14—21.
[14] Barami K, Diaz F G. Cellular transplantation and spinal cord injury[J]. Neurosurgery, 2000, 47(3): 691—700.
[15] Eaton M J, Martinez M, Karmally S, *et al*. Initial characterization of the transplant of immortalized chromaffin cells for the attenuation of chronic neuropathic pain[J]. Cell Transplant, 2000, 9(5): 637—656.
[16] Guest J D, Rao A, Olson L, *et al*. The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in the transected nude rat spinal cord[J]. Exp Neurol, 1997, 148(2): 502—522.
[17] Oudega M, Gautier S E, Chapon P, *et al*. Axonal regeneration into Schwann cell grafts within resorbable poly(alpha—hydroxyacid) guidance channels in the adult rat spinal cord[J]. Biomaterials, 2001, 22(10): 1125—1136.
[18] Coumans J V, Lin T T, Dai H N, *et al*. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins[J]. J Neurosci, 2001, 21(23): 9334—9344.

（编辑 郭建秀）

文章编号: 1000-5404(2003)23-2145-03

综述

乳腺癌基因治疗进展

Advances in gene therapy of breast cancer

唐 波 综述, 姜 军 审校 （第三军医大学附属西南医院乳腺疾病中心, 重庆 400038）

乳腺癌是威胁妇女生命的常见疾病, 是导致女性患者死亡的重要原因之一。以手术、放疗、化疗和内分泌治疗为主的综合治疗模式极大地提高了乳腺癌患者的生存率, 但仍有较高的复发和转移率。随着医学分子生物学研究的深入和应用以及人们对疾病认识水平的提高, 基因治疗逐渐成为肿瘤生物治疗学中的重要组成部分, 在乳腺癌的治疗中显示出良好的应用前景。现就近年来乳腺癌的基因治疗进展作一综述。

1 乳腺癌基因治疗的方向和策略

1.1 恢复抑癌基因功能或抑制癌基因功能

乳腺癌的基因改变主要有两种形式: 特异性染色体臂的缺失与基因扩增。Rb、P53、BRCA-1、BRCA-2、FHIT、HIN-1 等抑癌基因缺失或突变是乳腺癌中常见的分子遗传学改变。乳腺癌基因扩增常见于几种生长因子受体基因: 上皮生长因子受体(EGFR), c-erbB2, 成纤维细胞生长因子受体, 胰岛素样生长因子受体等。因此, 恢复抑癌基因功能或抑制癌基因功能是乳腺癌治疗中的重要策略。恢复抑癌基因功能, 常以腺病毒为载体, 转染相应抑癌基因(如 P53、FHIT 等)入乳腺癌细胞, 体内外实验证实能显著抑制乳腺癌细胞生长[1,2]。

常用的抑制癌基因功能的方法有: ①使用核酶、反义分子或 siRNA 技术阻止癌基因 mRNA 转录和翻译。许多与乳腺癌有关的基因可受反义寡核苷酸的有效靶击。实验证实, 反义寡核苷酸能显著下调乳腺癌细胞 c-erbB2 mRNA 表达, 抑制癌细胞增生, 且反义寡核苷酸与传统化疗药物联合能协同抗肿瘤[3]。最近有研究利用 RNA 聚合酶 III 依赖的 H1—RNA 基因启动子驱动的 SiRNA 重组腺病毒转染乳腺癌细胞, 获得稳定的转染体系, 显著抑制靶基因表达。该方法克服了传统反义技术的缺点, 即不能在细胞内稳定表达, 且抑制靶基因效率低等缺点[4]。②以显性负突变体干扰肿瘤细胞内信号转导, 如酪氨酸激酶受体基因可在乳腺癌中发生扩增及过量表达(erbB-1/EGFR, erbB-2 和 erbB-3), 这种过量表达的受体通过与相应配体(如 EGF)结合而刺激肿瘤细胞的生长。向肿瘤细胞浆内转染该受体的突变型基因后, 其对 EGF 亲和力丧失, 受体内吞及生物学信号传导功能丧失, 肿瘤细胞生长受抑。另有研究证实, 约 30% 恶性肿瘤中可见 ras 癌基因的激活性突变, 而 ras 信号通路组成性激

作者简介: 唐 波(1976—), 男, 四川省阆中市人, 硕士, 医师, 主要从事乳腺癌治疗方面的研究。电话: (023)68754160
通信作者: 姜 军, 电话: (023)68754160
收稿日期: 2003-08-26; 修回日期: 2003-09-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net