

· 研究进展 ·

脊髓损伤再生修复研究现状及展望

郭艳芬^{1,2} 曹河圻^{1*}

(1. 国家自然科学基金委员会 医学科学部, 北京 100085;

2. 河北医科大学第二医院 神经内科, 石家庄 050000)

[摘要] 脊髓损伤给患者、家庭和社会带来沉重的负担, 脊髓损伤再生修复是最具挑战性的医学难题之一。本文总结脊髓损伤再生修复机理及临床转化的研究现状, 分析其所面临的科学问题, 并展望脊髓损伤再生修复的未来发展前景。

[关键词] 脊髓损伤; 再生修复; 临床转化

脊髓是大脑和外周神经系统之间信息沟通的主要载体, 脊髓损伤后往往导致损伤平面以下感觉、运动及自主神经功能障碍或丧失, 严重致残。创伤性脊髓损伤常见于车祸、坠落、运动、地震等事故, 我国现有创伤性脊髓损伤患者超过 200 万, 每年新增 10—14 万人, 主要为年轻患者, 给家庭和社会带来了沉重的负担。脊髓损伤再生修复是最具挑战性的医学难题之一, 公元前 1700 年人们就认识到脊髓损伤是不能治愈的难题, 直到 3700 年后的今天, 脊髓损伤的临床治疗手段依然进展甚微, 治疗方案很大程度上还停留在脊柱固定减少继发损伤及康复训练提高生活能力等方面, 而对促进神经功能恢复却没有有效的方法^[1]。本文将对脊髓损伤再生修复机理及临床转化的研究现状进行总结, 分析其所面临的科学问题、并展望脊髓损伤再生修复的未来发展前景。

1 脊髓损伤再生修复的研究现状

1.1 脊髓损伤再生修复的机理研究

许多损伤的组织(如骨和皮肤组织等)能在损伤区产生一个有利于再生的微环境, 因而具备一定自愈修复能力。与其他组织不同, 脊髓损伤后, 损伤部位会形成一个持续性的炎性微环境, 虽然有可增殖的内源性神经干细胞存在, 却由于炎性微环境的限制, 不能向功能性神经元分化, 反而分化为星形胶质细胞, 后者则形成阻碍轴突再生的致密性胶质瘢痕,

使得中枢神经再生非常困难。目前, 针对脊髓损伤再生修复机理的研究主要集中在以下 3 个方面:

(1) 脊髓损伤后微环境解析: 研究发现脊髓损伤后, 损伤微环境中的多种分子如髓鞘相关的抑制蛋白(Nogo, MAG, Omgp)^[2]、硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPGs)^[3]及轴突导向分子(semaphorins, ephrins)^[4]等, 可通过不同的信号途径抑制神经元的轴突再生。进一步研究还发现, 除了抑制轴突生长外, 脊髓损伤微环境中的髓鞘蛋白还可促进神经干细胞向星形胶质细胞分化而抑制其向神经元分化^[5-7], 这也为解释神经干细胞在脊髓损伤区主要分化为星形胶质细胞, 而极少分化为神经元提供了理论依据。最近通过对大鼠损伤后不同时间点脊髓损伤组织的表达谱分析, 发现急性与陈旧性脊髓损伤差异表达基因的时间窗存在明显不同, 且主要变化的信号通路存在明显差异, 进一步对损伤不同时间点微环境组学和不同细胞进行分析, 将有助于系统地揭示脊髓损伤微环境的变化规律。

(2) 脊髓损伤再生微环境的构建: 利用生物材料、生长因子与干细胞重建有利于神经再生的微环境, 促进全横断脊髓损伤功能恢复是脊髓损伤的有效治疗策略。早期研究利用胚胎神经组织移植修复脊髓损伤具有较好的效果^[8], 提示将脊髓损伤微环境转化为发育阶段微环境有助于神经组织再生。而最近美国加州大学研究人员进一步证实, 诱导向神

收稿日期: 2018-04-04; 修回日期: 2018-05-22

* 通讯作者, Email: caohq@nsfc.gov.cn

经管尾端分化的多能神经祖细胞移植能更好地与宿主脊髓组织整合,尤其与再生的皮质脊髓束建立有效的突触联系^[9]。这些结果提示了构建脊髓损伤后的再生微环境应该以特定组织类型为框架,利用发育过程中诸分子的协同作用实现再生事件的动态调控。鉴于此,国外学者通过10种再生因子改善脊髓损伤微环境,分别促进外源神经干细胞或多潜能干细胞向神经元分化,并与宿主神经元形成连接修复裸鼠或应用免疫抑制剂的啮齿类脊髓损伤。我国科学家在生物支架材料结合再生因子构建脊髓损伤微环境研究中也取得长足进展,比如利用壳聚糖支架搭载 NT3 的复合生物材料促进成年内源性神经发生修复脊髓损伤,避免了伦理纠纷、免疫排斥反应及肿瘤发生的风险,同时借助转录本分析揭示了脊髓损伤修复的分子机理:即 NT3-壳聚糖支架在激活成年内源性神经发生的同时促进了血管的生成并抑制了炎症细胞的浸润^[10]。2013年诺贝尔奖获得者美国斯坦福大学教授 SüDHOF Thomas C 专门撰文对此项研究成果评述。我国学者还研制出能与胶原材料特异结合的神经再生因子,通过与胶原支架材料特异结合,构建了特异结合再生因子的智能生物材料,如 CBD-BDNF、CBD-NT3、CBD-NGF、CBD-bFGF、CBD-VEGF,解决了再生因子空间定位和浓度维持的技术难题,通过大鼠脊髓损伤模型证实,该生物材料能够减少损伤面积扩散,引导神经纤维有序再生,促进神经再生及神经功能的恢复,在随后的比格犬大段缺损全横断脊髓损伤修复实验证明具有相同的效果,并首次实现全横断脊髓损伤犬的站立和行走^[11]。此外,应用一种组织工程神经网络(或类脊髓组织)移植修复脊髓损伤的研究也正在开展,通过将过表达 NT-3 的雪旺细胞与过表达 TrkC 的神经干细胞(或间充质干细胞)种植在明胶海绵支架中,在体外构建一种具有突触传递功能的神经网络支架或类脊髓组织,然后将它移植到大鼠全横断脊髓损伤处。结果证实组织工程神经元中继器能够营造促进神经再生微环境,增强宿主上、下行神经纤维再生^[12]。更重要的是,此组织工程神经网络中的成体干细胞来源的神经元能够与宿主神经环路整合,起到桥接脊髓断端上、下行信息的“中继器”的作用。此工作在啮齿类和犬脊髓损伤运动功能修复中均观察到明显的效果。

(3) 完全性脊髓损伤再生修复的机制研究:目前对不完全脊髓损伤的再生机制人们已经有较多的认识,但对于完全性脊髓损伤的机制却缺乏了解。

研究发现完全性脊髓损伤后,即使 PTEN, SOCS3 等基因敲除,也仅能促进相对有限的受损伤皮质脊髓束(CST)再生,同样神经干细胞移植实验检测不到 CST 能再生跨越移植细胞区,表明 CST 再生不是完全性脊髓损伤恢复的主要机制^[13]。在急性脊髓损伤后,损伤激活内源神经干细胞向损伤部位迁移;我国科学家发现功能支架材料可引导内外源性神经干细胞定向分化为神经元,形成神经桥接,促进神经功能恢复^[14],同样,移植组织工程神经网络也能有效地整合到宿主神经环路,桥接脊髓损伤区断端,提示这可能是完全性脊髓损伤再生修复的主要机制^[15]。

1.2 脊髓损伤再生修复的临床转化研究

在临床转化研究方面,各国学者们都已开展了治疗脊髓损伤患者的临床试验研究^[16,17],包括移植人源性的胚胎干细胞、血单核细胞、嗅鞘细胞、雪旺氏细胞及神经再生胶原支架结合外源性干细胞等,由于诊断方式及评价方式的不统一,缺乏足够的对照、双盲等研究手段,导致临床疗效的评价鱼龙混杂良莠不齐,很多干预措施并未能大规模推广以解决实际医疗问题。而且,临床试验很难对不同治疗措施的机制方面予以深度阐述,这限制了未来临床治疗措施的广泛应用。

脊髓损伤属于尚未解决的重大医学难题。只有按照国际标准实施临床试验研究,研究成果才能够得到国际同行认可。我国科学家在脊髓损伤临床试验研究方面做了大量的尝试。六家三甲医院曾经与美国脊柱脊髓损伤学会前主席 Wies-yang 合作开展脐带血干细胞、施万细胞等移植修复脊髓损伤达到一万例;2015年1月16日开展神经再生胶原支架结合外源性干细胞修复陈旧性完全性脊髓损伤的临床研究,首次采用术中电生理等手段鉴定神经组织和瘢痕组织,并实施了对瘢痕组织的安全清除,首次进行了神经再生胶原支架的移植,并证明临床安全性,完成了安全性评价。随后建立了结合 ASIA 评分、影像学检查、电生理以及术后功能恢复相结合的急性脊髓损伤的判定标准,颈段和胸段患者出现较准确的大小便感觉,下肢出现自主的运动功能恢复并伴随有中断的感觉诱发电位和运动诱发电位的恢复。查询 clinicaltrial 网站,目前开展的脊髓损伤临床研究中干细胞结合生物支架材料临床研究均为中国注册,表明相关临床研究已走在世界前列。2016年 Cell Transplantation 发表慢性完全性脊髓损伤的国内临床 I/II 试验结果表明^[18],脐带血单核细胞

移植辅助髓内减压和支持行走训练 65% 的患者表现不同程度的功能恢复,但是单纯细胞移植患者虽然在影像学方面出现了脊髓内部纤维可塑性变化,但是功能恢复不明显。为了推动脊髓损伤临床标准化研究,我国科学家已于 2017 年 5 月 12 日和美国迈阿密截瘫修复计划项目签署了“北京-迈阿密项目脊髓损伤合作协议”。

总体来说,我国学者已鉴定了脊髓损伤微环境中的抑制神经轴突生长和神经干细胞分化的关键分子,为解释脊髓神经再生困难的原因提供了依据;通过支架材料、再生因子与干细胞结合构建脊髓损伤再生微环境,促进神经干细胞向神经元分化,重建脊髓受损的神经网络,实现部分脊髓损伤功能修复;提出并初步证实了内源性神经干细胞分化为神经元和组织工程神经网络(或类脊髓组织)形成神经元中继器是完全性脊髓损伤功能恢复的主要机制;开展了生物材料结合干细胞治疗脊髓损伤的临床研究,多策略修复脊髓损伤的临床研究我国已走在世界前列,为后续研究奠定了基础。

2 脊髓损伤再生修复所面临的科学问题

针对脊髓损伤修复的基础研究和临床转化的需求,所面临的科学问题包括以下方面:

(1) 脊髓损伤微环境的解析:脊髓损伤后,创伤导致损伤局部缺血、缺氧、水肿、干细胞激活等反应,进而神经轴突脱髓鞘、胶质细胞增生、神经元坏死等,最终在损伤部位形成空洞或瘢痕,形成不利于神经再生的微环境。脊髓横断性损伤会导致损伤区头尾两端 6—8 mm 的物理空间上的轴突持续性溃变,髓鞘崩解这一持续的动态变化过程中伴随着微环境中多种信号分子和多种细胞的动态变化,但在此动态变化过程中,微环境及微环境中的细胞(神经元、间质细胞、免疫细胞等)如何变化?目前人们对这个动态变化过程缺乏系统了解。

(2) 脊髓损伤再生微环境的重建:传统观念认为受损伤的神经元轴突是不能再生的,内源性神经干细胞的发现打破了传统的观念,使神经元新生成为可能。但脊髓损伤后,内源神经干细胞或移植的外源性神经干细胞在损伤部位主要分化为星形胶质细胞参与瘢痕的形成,几乎没有新生神经元的产生。同时脊髓损伤局部瘢痕或囊腔的存在使神经元失去支撑和粘附的细胞外基质,以及微环境存在多种神经再生抑制分子,使得受损伤的神经轴突再生及延伸非常困难。因此如何重建损伤脊髓的微环境,促

进神经再生及内源性神经干细胞定向分化为神经元是神经损伤修复面临的一个关键问题。同时,目前的临床试验结果提示干细胞移植促进脊髓损伤患者不同功能的恢复,有可能是激活脊髓的内源性机制,改善微环境,促进损伤后神经的可塑性变化。慢性脊髓损伤患者的髓内减压和支持行走训练是否同时促进脊髓微环境的改善,需要进一步阐明。

(3) 完全性脊髓损伤再生修复机制:脊髓损伤可分为完全性损伤和不完全性损伤。不完全脊髓损伤后由于损伤处邻近的未受损伤神经元的轴突可通过侧支出芽等方式去支配那些失去支配的残存神经元,实现神经再生及功能恢复。但是,对于完全性脊髓损伤由于损伤处所有的神经束都被横断,其神经再生修复机制是需要深入研究的关键问题。

(4) 脊髓损伤临床研究的路径:目前注册开展的脊髓损伤的临床研究主要包括神经干细胞、间充质干细胞、嗅鞘细胞等细胞移植治疗脊髓损伤,但单纯移植细胞临床研究效果不理想。2011 年 11 月, Geron 公司放弃胚胎干细胞来源 OPC 治疗脊髓损伤研究计划;2016 年 5 月 31 日, StemCells 公司宣布终止人 NSC 治疗脊髓损伤临床试验。总结已有的临床研究结果,科学家认为由于脊髓损伤后复杂的微环境,单一的治疗方法效果非常有限,多种策略联合应用(生物材料、再生因子、干细胞)被认为是促进神经功能恢复的一种有效策略。但在脊髓损伤临床研究中尚面临一些需要解决的问题,比如:如何判定急性完全性损伤:由于脊髓休克的存在,目前常用的 ASIA 分级并不完全适合急性脊髓损伤严重程度的判定,如何判定患者为完全性损伤?陈旧性脊髓损伤患者损伤区的瘢痕抑制神经再生,在手术中如何区分陈旧性脊髓损伤的瘢痕组织与未受损伤的脊髓组织,以便清理瘢痕?如何防止脊髓损伤后外周神经和肌肉废用性萎缩等问题亟待解决。

3 脊髓损伤再生修复的未来发展

脊髓损伤再生修复一直是困扰医学界的世界性难题,是影响国家经济社会发展的重大科学问题。神经损伤修复是一个及其复杂的生物学过程,神经组织又涵盖大量不同类型的细胞,加之损伤后有淋巴系统的侵入,以及各类内源干细胞的活化,进一步增加了细胞群体内的异质性。在未来的研究中,需要进一步阐释脊髓损伤后微环境动态变化规律,寻找损伤微环境中与脊髓组织再生相关的新分子;通过生物材料、生长因子与干细胞相结合的功能性支架材料,重建有利于神经再生的微环境,并利用大

鼠、犬和猴等脊髓损伤模型,研究功能性支架材料如何桥接脊髓损伤两断端,引导神经元轴突生长的方向、抑制瘢痕组织的形成、促进损伤区内的神经元发生及神经干细胞的定向分化,有效促进全横断脊髓损伤动物的神经功能修复,形成有利于神经再生的长距离神经传导的“中继站”;阐明脊髓损伤后内外源性干细胞激活、迁移、定向神经元分化以及与宿主神经元连接的机制,加深对脊髓损伤再生修复机制的理解;加强脊髓损伤再生修复的临床转化研究,建立术前诊断、手术方案、术后功能评估及康复一体化的脊髓损伤临床研究方案,促进脊髓损伤基础研究和临床转化的快速发展。

参 考 文 献

- [1] Silva NA, Sousa N, Reis RL, et al. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 2014, 114:25—57.
- [2] Lee JK, Zheng B. Role of myelin-associated inhibitors in axonal repair after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2012, 235(1):33—42.
- [3] Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2006, 7(8):617—627.
- [4] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 2004, 5:146—156.
- [5] Wang B, Xiao Z, Chen B, et al. Nogo-66 promotes the differentiation of neural progenitors into astroglial lineage cells through mTOR-STAT3 pathway. *Plos one.* 2008, 3(3): e1856.
- [6] Li X, Xiao Z, Han J, et al. Promotion of neuronal differentiation of neural progenitor cells by using EGFR antibody functionalized collagen scaffolds for spinal cord injury repair. *Biomaterials.* 2013, 34(21):5107—5116.
- [7] Li X, Zhao Y, Cheng S, et al. Cetuximab modified collagen scaffold directs neurogenesis of injury-activated endogenous neural stem cells for acute spinal cord injury repair. *Biomaterials.* 2017, 137:73—86.
- [8] Lu P, Wang Y, Graham L, et al. Long-distance growth and connectivity of neural stem cells after severe spinal cord injury. *Cell.* 2012, 150(6):1264—1273.
- [9] Lu P, Woodruff G, Wang Y, et al. Long-distance axonal growth from human induced pluripotent stem cells after spinal cord injury. *Neuron.* 2014, 83(4):789—796.
- [10] Li X, Yang Z, Zhang A. The effect of neurotrophin-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials.* 2009, 30(28):4978—4985.
- [11] Han S, Wang B, Jin W, et al. The linear-ordered collagen scaffold-BDNF complex significantly promotes functional recovery after completely transected spinal cord injury in canine. *Biomaterials.* 2015, 41:89—96.
- [12] Lai BQ, Wang JM, Ling EA, et al. Graft of a tissue-engineered neural scaffold serves as a promising strategy to restore myelination after rat spinal cord transection. *Stem Cells Dev.* 2014, 23(8): 910—21.
- [13] Tuszynski MH, Steward O. Concepts and methods for the study of axonal regeneration in the CNS. *Neuron.* 2012, 74(5):777—91.
- [14] Xu B, Zhao Y, Xiao Z, et al. A Dual Functional Scaffold Tethered with EGFR Antibody Promotes Neural Stem Cell Retention and Neuronal Differentiation for Spinal Cord Injury Repair. *Adv Healthc Mater.* 2017, 6(9). doi: 10.1002/adhm.201601279.
- [15] Zhao Y, Xiao Z, Chen B, et al. The neuronal differentiation microenvironment is essential for spinal cord injury repair. *Organogenesis.* 2017, 13(3):63—70.
- [16] Zhao Y, Tang F, Xiao Z, et al. Clinical study of NeuroRegen scaffold combined with human mesenchymal stem cells for the repair of chronic complete spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2017, 26(5):891—900.
- [17] Xiao Z, Tang F, Tang J, et al. One-year clinical study of NeuroRegen scaffold implantation following scar resection in complete chronic spinal cord injury patients. *Sci China Life Sci.* 2016, 59(7):647—655.
- [18] Zhu H, Poon W, Liu Y, et al. Phase I-II clinical trial assessing safety and efficacy of umbilical cord blood mononuclear cell transplant therapy of chronic complete spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2016, 25(11):1925—1943.

Thoughts on spinal cord injury and regenerative repair

Guo Yansu^{1,2} Cao Heqi^{1*}

(1. Department of Health Sciences, National Nature Science Foundation of China, Beijing 100085;
2. Department of Neurology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

Abstract Spinal cord injury brings heavy burden to patients, families and society. Regenerative repair of spinal cord injury is the most challenging medical problem. This article summarizes the research status of regenerative repair mechanism and clinical transformation of spinal cord injury, analyzes the scientific problems faced, and prospects the future development of regenerative repair of spinal cord injury.

Key words Spinal cord injury; regenerative injury; clinical transformation