

· 述评 ·

文章编号 1000-2790(2006)10-0865-03

组织工程化的雪旺细胞在视神经损伤修复中的应用

胡丹, 卢春光 (第四军医大学西京医院眼科, 全军眼科研究所, 陕西 西安 710033)

【关键词】视神经损伤 组织工程 雪旺细胞 神经导管

【中图分类号】R774.10 【文献标识码】A

0 引言

视神经损伤(optic nerve injury)是常见的眼外伤类型,临床上常见各种面部及颅脑外伤如压迫、牵伸、撕裂、切断等原因致使视神经走行的某一段受损,如果治疗不及时可能造成患者视功能不可逆性的丧失。

人类的视神经是由特殊躯体感觉纤维,即视网膜神经节细胞(retinal ganglion cell, RGC)的轴突组成的视神经束再被视神经鞘包绕所形成的。它起于RGC的轴突穿过巩膜筛板处,止于间脑。由于其特殊的解剖走行和组织结构决定了其容易受到损伤。

以往经典理论认为成熟的视神经是一种特殊分化的中枢神经,其损伤后只有再生的反应,即在损伤早期RGC的轴突出现极有限的再生“芽体”,但不久就萎缩凋亡了,无法完全再生和恢复功能。这一观点直到1981年才被Aguayo的研究结果推翻。他们采用外周神经作为桥接物证实了大鼠视神经横断伤后的RGC轴突可以获得一定程度的再生。进一步研究表明,虽然影响轴突再生的具体微环境和RGC本身性质尚不十分清楚,但这种再生的机制与桥接于损伤处的外周神经所提供的雪旺细胞(schwann cells, SCs)的激活、增殖、迁移和多种神经营养因子(neurotrophic factor, NTF)的分泌,以及中枢靶组织的趋化作用有紧密的联系。其他学者用电生理学的实验证明了损伤后形成再生轴突的RGC的功能可以部分性的恢复,然而再生轴突不足原有轴突总数的10%^[1-2]。所以寻求更有利于RGC存活和轴突再生的桥接材料成为学者们讨论和研究焦点。

近些年随着组织工程学理论和技术的发展,许多学者应用可降解的人工合成材料修复周围神经损伤,并且进一步将体外培养的神神经胶质细胞和各种NTF,促神经生长剂等负载到其上用于视神经损伤修复的研究中,其中SCs是最早被肯定的种子细胞。

1 SCs 及其对视神经损伤的修复作用

SCs是周围神经的胶质细胞,由Schwann于1839年首先发现并命名。已有大量实验证实,SCs不仅对周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)的神经发生、发育、形态、功能等方面起着支持和保护作用,而且对中枢神经系统(central nervous system, CNS)的神经也具有同样的重要作用。

正常生理情况下SCs存在于周围神经,而在视神经中存在的神经胶质细胞主要是星形胶质细胞和少突胶质细胞。移植SCs在正常视神经周围,由于星形胶质细胞或少突胶质细胞形成的胶质界膜存在,它不能接近RGC轴突,但当损伤因素致使胶质界膜遭到破坏时,SCs可以活跃增殖、迁移到受损RGC轴突周围。SCs促进受损视神经修复的作用主要包括以下几个方面:①视神经损伤后,RGC轴突远端发生瓦勒氏变性,移植的SCs很快增殖活化,在受损的神经束膜管内形成多条纵行排列的细胞索,其与SCs的基底膜共同形成导管样结构为再生轴突提供生长通道;②增殖活化的SCs和血源性的巨噬细胞共同吞噬变性的轴突和髓鞘碎屑,为轴突再生清除障碍物,并能减轻胶质瘢痕的形成;③SCs可以合成分泌包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)在内的多种NTF,它们都具有维持RGC存活、促进其轴突生长的作用;④SCs可以合成分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、细胞黏附分子(cellular adhesion molecule, CAM)和其他具有支持趋化作用的特异性物质,它们存在于导管样结构的表面,引导和趋化近端相应的再生轴突沿SCs索定向性生长,到达相应的靶组织;⑤SCs可以包绕再生轴突形成或不形成髓鞘,促进再生轴突成熟;⑥SCs可以在靶组织内诱导轴突末梢芽生,形成新的突触结构,利于神经再支配。这些现象提示SCs为RGC存活、轴突再生提供了十分有利的微环境。

1988年Berry等通过实验证明,切断大鼠视神经并移植周围神经能促进RGC轴突再生,RGC的存活率明显增加,其中主要依赖于有活性的SCs的存在。

收稿日期 2006-01-18; 接受日期 2006-03-16

作者简介 胡丹, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师。Tel:

(029) 84775375 Email: hoodan@fmmu.edu.cn

1995年 Son等^[3]证实,在培养的SCs表面的鸡胚RGC轴突生长速度每日超过500 μm。黄蔚等^[4]采用冷冻真空干燥法,将SCs培养液上清超滤浓缩后制成SCs源性神经营养活性物质(Schwann cells derived neurotrophic active mass, SCNA),再将其注射入视神经夹伤的大鼠玻璃体内以观察RGC数量的变化。结果显示在注射后1, 2, 3, 4 wk时RGC数量均明显高于未损伤对照组和损伤后未经任何治疗对照组,表明SCs分泌的物质对受损RGC具有保护作用,可以维持4 wk甚至更长时间。蔡莉等^[5]采用向视神经钝挫伤的兔眼玻璃体内注射培养的同种异体SCs的方法得到了较为近似的结论。由此可见,SCs与视神经再生的关系十分密切。

2 组织工程技术在周围神经损伤修复方面的应用

1979年Lundborg创立了“神经再生室”的概念,为研究神经再生过程中分子生化现象及细胞行为学规律提供了理想的实验模型。理论上要求在神经损伤两端之间构建的“神经再生室”具有良好的生物相容性、适宜的长度,可提供利于神经纤维生长的三维、多孔支架结构,可以负载SCs等种子细胞和多种NTF并使之最大限度的发挥作用,以及可以在长期应用后降解吸收且不引起病态转归和胶质瘢痕等毒副作用。

自1932年Balance首先采用自体神经移植的方法来修复周围神经损伤以来,出现了多种自体或同种异体的组织材料,如动脉、静脉、反转静脉、肌肉、筋膜等桥接修复神经损伤的方法。1991年Glasby等^[6]采用去除肌细胞只留肌细胞基底膜的变性骨骼肌桥接神经缺损,能够让再生神经通过,与自体神经移植比较更利于神经再生。但这些组织材料普遍存在一些不可避免的问题,如桥接物组织的病态转归、供体组织来源不足、同种异体组织常引起免疫排斥现象等等。所以,许多学者将寻找替代物的目光移向生物相容性好、可降解吸收的人工合成材料。

20世纪80年代初出现了人工神经移植技术(artificial nerve graft technique),即采用人工合成的生物降解材料制备神经导管(nerve guidance channel, NGC),并在导管内部腔中构建利于神经再生的微环境,引导并促进神经轴突再生。与其他神经损伤修复方法相比,采用NGC可以为神经再生提供一个更为有利的局部微环境:它可以在神经再生中暂时固定并支持缺损神经的两端,引导和促进再生轴突沿原有轴向生长,避免病态外生和形成神经瘤;与其外的大环境相对隔绝,减少成纤维细胞等入侵,防止疤痕形成;

可以富集多种NTF,促进轴突快速再生,降解速度符合神经再生的需要,降解产物不影响再生的微环境等等。1995年邵景范等^[7]报道了白芨胶负载NGF促进周围神经再生的实验研究,与对照组比较具有明显促进神经再生的作用。1998年Widmer等^[8]报道了应用聚左旋乳糖或聚乳酸羟基乙酸制成的多孔可降解导管修复神经缺损获得良好效果,这种导管具有一定的机械强度,在体内发生降解的同时还能保持良好的形状,多孔的结构利于营养物质透过,SCs黏附和生化物质缓慢释放。2000年Matsumoto等^[9]报道了应用填入表面涂有层粘连蛋白的胶原纤维的聚羟基乙酸导管修复了长达8 cm的神经缺损。这些研究说明,与其他神经损伤修复方法相比,采用NGC可以为神经再生提供一个更为有利的局部微环境。

3 组织工程化的SCs对视神经损伤的修复作用

所谓组织工程化的SCs,既是将体外培养的自体或同种异体SCs以及转染有NTF基因的SCs,应用组织工程学原理和技术方法接种或填充到生物组织材料或人工合成材料上,再将其制成有活性的复合性人工神经移植物,通过合适的方法进行动物或临床研究神经损伤修复。这样,一方面依托这些材料的支架作用作为SCs长期存活、生长的基质,另一方面更有效地发挥SCs修复神经损伤、促进轴突再生的作用,从而提供更有利于神经再生的微环境,获得更好的修复效果。

1979年Aguayo等首先开展了将体外培养的SCs种植到血管移植物桥接小鼠5 mm长的周围神经缺损的研究,结果发现培养的SCs能够种植存活,还可以引导并促进再生轴突跨越神经缺损区。1996年Bryan等^[10]报道了应用负载有单层自体SCs的聚乙烯导管桥接修复了2 cm长的神经缺损。1999年叶震海等^[11]等利用聚乳酸管作为外管,以聚羟基乙酸纤维作为内部纵行的三维支架结构制成神经桥接物,接种SCs后发现其可以黏附于聚乳酸管壁和聚羟基乙酸纤维上存活,引导再生轴突向损伤远端生长。2000年沈尊理等^[12]采用经基质蛋白胶涂层、贴附有SCs的聚二甲基硅氧烷纤维植入胶原神经导管内,修复1.5 cm长的大鼠坐骨神经获得成功。

当组织工程化的SCs在周围神经修复研究中应用的同时,其对视神经修复的研究也取得了较好的效果。2000年Plant等^[13]将培养的SCs通过晶状体囊膜来源的ECM负载到2.5 mm长的聚碳酸酯导管上,另外负载成纤维细胞生长因子(basic fibroblast

growth factor, bFGF)或神经营养因子-4,5(neurotrophin-4, 5, NT-4, 5)用以桥接大鼠视神经损伤处之后发现,二者均能明显促进 RGC 轴突再生。2001 年 Negishi 等^[14]通过实验比较了单纯负载 ECM,负载 ECM 和 SCs,负载 ECM 和 SCs 以及不同 NTF 的硅胶导管修复大鼠视神经断端的作用,其结果显示负载 ECM 和 SCs 以及两种以上 NTF 的硅胶导管对视神经轴突再生的促进作用明显优于其他,从而说明构建越接近生理状态的视神经周围微环境越有利于其再生。2003 年 Campbell 等^[15]发现,视神经挤压伤后轴突的再生与星形胶质细胞有关,而横断伤后采用周围神经桥接断端,轴突的再生主要与 SCs 有关,再生轴突直径大于挤压伤后由星形胶质细胞修复的。这一结果表明,周围神经的 SCs 和中枢神经胶质细胞在 RGC 轴突再生过程中所起的作用明显不同。2004 年 Li 等^[16]将体外培养的 SCs 注射入成年大鼠玻璃体内,观察视神经横断后 RGC 轴突再生的情况,结果表明玻璃体内注射 SCs 可以延缓 RGC 的凋亡,促进其断端轴突再生。Heiduschka 等^[17]采用自体周围神经缝合移植大鼠视神经断端并行玻璃体内注射氢化可的松等药物的方法,发现可以有效地促进 RGC 轴突再生。2005 年 Hu 等^[18]通过慢病毒介导 CNTF 基因感染 SCs,后者可以有效表达 CNTF 长达 4 wk 以上,再将其负载到自体周围神经作为移植物桥接在大鼠视神经横断处,结果显示其可以提高大鼠 RGC 的存活和轴突再生。

尽管在以往的实验研究中采用生物可降解的神经导管,并使其负载一定数量、有活性的 SCs 可以在一定程度上修复损伤的视神经,但如何在缺损局部获得足够数量的 SCs,使其在受损视神经再生的整个过程中更持久的发挥作用,是尚待解决的问题。如果人们能够运用组织工程化的 SCs 在视神经损伤修复的研究中取得更显著的成绩,必将给临床上治疗由于视神经损伤而危及视功能的患者带来希望。

【参考文献】

[1] Thanos S. Neurobiology of the regenerating retina and its functional reconnection with the brain by means of peripheral nerve transplants in adult rats [J]. *Surv Ophthalmol*, 1997, 42(1): S5-S26.

[2] Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y. Number, distribution and morphology of retinal ganglion cells with axons regenerated into peripheral nerve graft in adult cats [J]. *Neuroscience*, 1993, 13(5): 2105-2117.

[3] Son YJ, Thompson WJ. Nerve sprouting in muscle is induced and

guided by processes extended by Schwann cells [J]. *Neuron*, 1995, 14(1): 133-141.

[4] 黄蔚, 惠延年, 刘兵等. 雪旺细胞源营养神经活性物质对大鼠视网膜节细胞损伤的作用 [J]. *中华眼底病杂志*, 2000, 16(1): 45-47.

[5] 蔡莉, 惠延年, 马吉献等. 乳兔雪旺细胞对成兔视神经挫伤修复的作用 [J]. *中华眼底病杂志*, 2000, 16(2): 91-93.

[6] Glasby MA, Davies AH, Gattuso JM, et al. Specificity for homonymous pathways following repuin of peripheral nerves with treated skeletal muscle autografts in the Primate [J]. *Br J Plast Surg*, 1991, 44(2): 135-141.

[7] 邵景范, 罗永湘. 白苡胶载神经生长因子促周围神经再生的实验研究 [J]. *中华手外科杂志*, 1995, 11(1): 42-44.

[8] Widmer MS, Gupta PK, Lu L, et al. Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration [J]. *Biomaterials*, 1998, 19(21): 1945-1955.

[9] Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, et al. Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: A histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves [J]. *Brain Res*, 2000, 868(2): 315-328.

[10] Bryan DJ, Wang KK, Chakalis-Haley DP. Effect of Schwann cells in the enhancement of peripheral-nerve regeneration [J]. *Reconstr Microsurg*, 1996, 12(7): 436-439.

[11] 叶震海, 顾立强. 雪旺细胞和聚乳酸材料的体外相容性研究 [J]. *中国创伤骨科杂志*, 2000, 2(4): 306-307.

[12] 沈尊理, Alfred B, Robert H. 组织工程化人工神经内部支架及其生物相容性研究 [J]. *中华手外科杂志*, 2000, 16(4): 232-235.

[13] Plant GM, Harvey AR. A new type of biocompatible bridging structure supports axon regrowth after implantation into the lesioned rat optic tract [J]. *Cell Transplant*, 2000, 9(6): 759-772.

[14] Negishi H, Dezawa M, Oshitari T, et al. Optic nerve regeneration within artificial Schwann cell graft in the adult rat [J]. *Brain Res Bull*, 2001, 55(3): 409-419.

[15] Campbell G, Kitching J, Anderson PN, et al. Different effects of astrocytes and Schwann cells on regenerating retinal axons [J]. *Neuroreport*, 2003, 14(16): 2085-2088.

[16] Li S, Hu B, Tay D, et al. Intravitreal transplants of Schwann cells and fibroblasts promote the survival of axotomized retinal ganglion cells in rats [J]. *Brain Res*, 2004, 1029(1): 56-64.

[17] Heiduschka P, Fischer D, Thanos S. Neuroprotection and regeneration after traumatic lesion of the optic nerve [J]. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 2004, 221(8): 684-701.

[18] Hu Y, Leaver SG, Plant GW, et al. Lentiviral-mediated transfer of CNTF to schwann cells within reconstructed peripheral nerve grafts enhances adult retinal ganglion cell survival and axonal regeneration [J]. *Mol Ther*, 2005, 11(6): 906-915.