

脑卒中后内源性神经修复的研究进展

郑磊¹ 朱建国¹ 袁栋才^{1,2}

脑卒中后大脑皮质缺血或局灶性病变可引起损伤区微环境变化,导致神经元细胞及胶质细胞结构改变,触发内源性神经修复,但这种由疾病引发的自身适应性改变对受损神经功能的修复作用有限。神经修复治疗就是对这一过程的发生、发展及影响因素进行研究,通过药物或细胞治疗刺激和增强机体的内源性神经修复,同时抑制引发神经元胞体和轴突死亡的不利因素,促进神经细胞重塑并最大限度修复患者受损神经功能^[1-2]。

1 脑卒中后内源性神经修复

脑卒中触发机体的内源性神经修复是大脑应对损伤的适应性反应,Murphy TH等^[3]发现,在脑卒中急性缺血性阶段存在一个关键的时间窗,其特点就是强烈的神经发芽,即远离缺血性病变区或相邻区域的神经元细胞通过侧支发芽,向靶组织或其他神经元延伸,生成新的突触,促进神经细胞的重塑和神经功能的修复。研究发现,大脑微血管和神经胶质细胞对脑卒中缺血性压力或神经修复治疗可产生一致的回应,通过分泌神经营养及保护因子等,为神经功能修复创造一个良好的环境^[4]。如星形细胞分泌的多种细胞因子及基质分子,小胶质细胞和巨噬细胞分泌的促神经再生因子等内源性神经促进因素,均在一定程度上促进了受损神经突触和血管的再生,并对神经功能缺损症状的修复起到一定作用^[4]。

与内源性神经促进因素不同,脑卒中后缺血刺激可引发一系列造成神经损伤的因素,主要表现为:细胞膜受损导致兴奋氨基酸和氧自由基的释放增加、内质网功能紊乱、线粒体释放细胞凋亡因子、炎症因子的产生、胶质瘢痕的生成等,进而引发一系列的生物化学和(或)分子生物学“瀑布样”事件,最终导致轴突损伤和神经元的死亡。但这些因素又可作为一个刺激信号,促进星形细胞清除有害因子,抑制神经元的兴奋性,促进神经营养因子的释放和轴突再生^[4]。再生轴突同时受到如少突胶质细胞释放的Nogo-A,星形细胞和巨噬细胞形成的胶质瘢痕以及其释放的硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin sulfate proteoglycans, CSPGs)等抑制因素制约,从而避免再生的轴突跨界影响甚至破坏健康神经元,防止非适应性神经再生的发生,使轴突再生处于机体可控制的范

围。正是由于机体内源性神经修复功能的存在,才使大脑在损伤后具有一定的自我修复能力,但这种由疾病引发的自身适应性改变对神经功能修复的作用有限^[2]。

2 神经修复治疗与内源性神经修复

神经修复治疗旨在研究内源性神经修复发生、发展的过程及影响因素,通过药物或细胞治疗增强机体的内源性神经修复作用,如轴突再生、神经再生、血管再生、胶质细胞激活等,同时抑制促进轴突和神经元死亡的不利因素,最大限度修复患者神经功能缺损症状。

2.1 轴突再生

脑卒中继发的缺血性改变可引起一系列分子和细胞水平的级联反应,进而导致锥体束轴突 Wallerian 变性和大量神经元死亡^[5]。研究发现,成年哺乳动物中枢神经系统(central nervous system, CNS)轴突损伤后,由于缺乏促进轴突再生和引导其正确延伸的微环境,很难再生形成功能性突触联系,往往导致永久性的神经功能缺失,引起运动、感觉、认知等功能障碍^[6]。

脑卒中后内源性轴突再生包括轴突纤维束沿梗死边缘重组,幸存的锥体束轴突在缺血性脑损伤区域的远端发芽等。另外,受损侧和对侧的锥体束末端轴突发芽率在脑卒中后均有明显提高^[5]。研究证实,对侧可塑性可在许多物种中发生,如鼠、猕猴等,是CNS损伤后神经修复的基础^[2]。除锥体束纤维发芽重塑外,连接两个运动皮质的胼胝体突起也可发生重塑^[7]。这些神经的适应性改变在一定程度上代偿由于轴突损伤所引起的神经纤维束的破坏。此外,研究发现,脑卒中后过度增殖的少突胶质细胞所表达的鞘相关糖蛋白和Nogo-A,是抑制CNS轴突生长的主要因素^[8]。另外损伤灶周围星形细胞,小胶质细胞以及侵入的炎症细胞释放的CSPGs,神经毒性因子,炎性因子和由于炎症浸润导致的胶质瘢痕等均阻碍了突触和神经再生。

近年来,神经修复治疗促进脑卒中后轴突再生的证据已在基础研究中得到充分证实。在啮齿类动物实验中,外源性药物和细胞治疗可有效促进存活的锥体束轴突再生,并为其与靶区域的正确连接提供良好的导向因素^[9-10]。值得注意的

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.01.026

1 河北省衡水市哈励逊国际和平医院神经内科,衡水,053000; 2 通讯作者
作者简介:郑磊,男,硕士研究生; 收稿日期:2012-12-03

是,神经修复治疗如给予促红细胞生成素生长因子和血管内皮生长因子,并不一定促进损伤部位远端的轴突生长;相反,位于损伤对侧半球的运动皮质发生明显的结构变化,其轴突发芽越过大脑中线到达损伤区域再生形成新的突触^[11]。

研究表明,不同的神经修复治疗手段对轴突再生的促进作用相似,均表现出明显的侧支发芽^[2]。这些治疗措施包括:输入神经生长因子,抗体中和轴突生长抑制因子Nogo-A,神经兴奋剂(如,苯基丙胺)^[12],细胞治疗,即骨髓基质细胞或神经前体细胞等^[13-14]。再生突触与靶器官的正确连接是神经功能修复的关键,研究发现,神经营养因子,如NTF、BDNF、NT-3、NT-4等除促进突触再生外,还具有生长趋化的作用,而细胞外基质如层粘蛋白,纤维连接蛋白,IV/V型胶原,硫酸肝素蛋白等可使新生轴突沿基质桥生长,从而保持生长的稳定性,引导神经纤维定向生长^[15]。研究证实,神经修复治疗过程中,同时给予神经营养因子、整合素、层粘蛋白1、纤维连接蛋白等物质,可明显促进轴突再生。另外,神经生长因子促进轴突侧枝发芽还可能与下调轴突生长抑制因素和受损侧锥体束附近的炎症信号有关^[16]。在啮齿类动物实验中发现,无论是年轻还是年长的动物,在脑卒中发生数天,数周甚至数月后,接受神经修复治疗均可收到良好的疗效^[9]。

2.2 神经再生

成年哺乳动物室管膜下区(subventricular zone, SVZ)、嗅球、海马齿状回等部位的神经前体细胞终生都可以生成神经细胞^[17],大量证据表明,脑卒中可刺激上述区域神经再生,神经修复法则对其再生具有显著促进作用。脑卒中发生后,神经前体细胞增殖并沿血管走行途径迁移到受损区域,在局部微环境诱导下分化,对神经传导通路的重建和机体功能修复起到一定作用^[18]。但是神经前体细胞对受损神经的修复作用是有限的,研究发现,神经前体细胞在脑实质中的存活率低,神经元的分化率更低,所以神经细胞替代在神经修复过程中所起的作用仍是值得商榷的^[19]。

Alagappan D等^[20]研究表明,单纯移植神经前体细胞难以达到治疗的目的,而同时加入外源性神经营养因子和生长因子后则能明显加强其对损伤神经元的修复作用。已经证实,神经前体细胞发挥其抗缺血性脑损伤和促进神经功能修复的作用有赖于神经前体细胞和脑微血管之间的相互作用,二者通过释放营养因子相互支持,为神经再生创造一个良好的微环境^[21-22]。神经修复治疗可以刺激并加强这一过程,从而增强大脑可塑性、抑制继发性神经元的变性坏死、调节胶质细胞反应、减轻脑部炎症,促进神经再生^[23]。

2.3 血管再生

脑卒中后,诱导脑微血管生长的血管生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在神经元和胶质细胞中均有表达。VEGF通过和位于新生毛细血管前端的血管生成

因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2)结合,诱导内皮细胞增殖和新生毛细血管的生成;同时还可上调内皮细胞跨膜配体Dll4的表达,激活Dll4-Notch1信号系统、下调VEGFR-2的表达,抑制脑毛细血管的过多生成^[24-25]。VEGF与Dll4-Notch1横向的抑制信号通路在个体发育和脑损伤修复过程中发挥重要作用^[26]。

脑卒中后患者神经功能修复与脑血流密切相关^[27]。新生的微血管对脑实质的营养作用主要通过释放生长因子实现,如脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)。梗死区域新生的微血管通过释放基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor-1, SDF-1),VEGF,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)2和9等吸引神经母细胞,并为其迁移、归巢、分化创造适宜的微环境^[28]。与此同时,神经再生亦通过刺激VEGF的释放进一步加强新生血管的生成^[29]。在CNS修复过程中,正是血管再生与神经再生的协同调控作用,共同促进了神经功能的修复。研究发现,在脑卒中发生后的1个月内,内皮细胞和神经母细胞之间的相互作用最强,这为脑卒中后早期进行康复治疗提供了直接证据^[29]。

通过神经修复治疗输入丝氨酸蛋白酶活化蛋白C可增强神经母细胞和新生毛细血管的相互影响,丝氨酸蛋白酶活化蛋白C与其蛋白酶激活受体1结合,刺激内皮细胞增殖、新生毛细血管生成、诱导神经前体细胞的增殖和迁移^[30]。研究表明,新生血管对缺血性脑卒中后脑损伤的重塑作用并不依赖于缺血区域的再灌注,可独立促进脑卒中患者神经功能康复^[2]。

2.4 胶质细胞激活

神经胶质细胞尤其是星形细胞,可为CNS损伤后神经重塑创建一个良好的微环境,其通过维持胞内外K⁺平衡、清除氧自由基、表达神经营养因子、摄取过量兴奋性氨基酸、调节离子通道等方式调控神经元的兴奋性,促进轴突生长^[31]。

研究表明,由星形细胞和少突胶质细胞合成的CSPGs在CNS损伤后初期表达增加,可明显抑制轴突的生长,可能与损伤部位血脑屏障破坏,巨噬细胞侵入有关^[32]。脑卒中发生2—3周后,受缺血性病灶区域的影响,CSPGs表达开始下调,受损神经元轴突开始再生。神经修复治疗如移植VEGF或骨髓间质细胞则能进一步减少蛋白聚糖的表达水平,有效促进轴突再生^[33]。最新研究表明应用软骨素酶-ABC通过降解胶质瘢痕中的CSPGs治疗CNS损伤取得了很好效果^[34]。

脑卒中后,受缺血性病灶区域的影响,星形细胞表达的CSPGs下调,同时神经营养因子表达上调,如胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)、VEGF和丝氨酸蛋白酶,即组织纤维蛋白溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA),促进轴突再生^[35]。移

植骨髓间质细胞或间充质干细胞可增加GDNF和tPA的水平,可减少tPA抑制因子纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)的水平,同样可以促进突触和神经的再生^[36]。

2.5 轴突和树突再生的信号控制

脑卒中后神经功能修复是一个动态的过程,需要一个高效的信号控制体系,抑制无效的轴突或树突的生长,防止非适应性神经发芽的发生,与星形细胞和少突胶质细胞表达的CSPGs相比,神经生长信号具有高度的特异性,只有在特定的神经元细胞群和特定的重塑过程中发生^[2]。以肿瘤抑制基因PTEN调控哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)为例,二者相互作用只诱导小鼠大脑皮层2/3层锥体神经元树突顶端发芽,而对5层的树突再生无任何作用^[37]。

研究发现,脑卒中发生后的3—14天,皮质层2/3中的锥体神经元再生受到突触外GABAA受体的持续性抑制,而通过给予拮抗剂或基因敲除GABAA受体的 $\alpha 5$ 亚基可以防止其过度抑制,从而促进脑卒中神经功能的修复^[38]。另外,Clarkson AN等^[39]证实,谷氨酸AMPA受体有利于再学习所诱导的运动功能恢复,其原因可能和脑卒中后AMPA受体激活并释放BDNF到梗死皮质周围有关,从而为运动再学习提供有力的理论基础。

CNS损伤后可产生大量轴突生长抑制因子,是阻碍轴突再生的重要原因。已经证实Nogo-A, CSPGs等抑制因子可激活RhoA信号途径,RhoA通过影响肌动蛋白诱导生长锥回缩及塌陷,抑制轴突再生,而神经营养因子可抑制RhoA信号通路的活动,从而促进轴突再生^[40]。Qiu等^[41]发现在CNS轴突损伤后环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)水平增加为损伤前的3倍,增加的cAMP可激活蛋白激酶A(protein kinase A, PKA),而PKA可使RhoA的某些位点发生特异性磷酸化,降低其与下游激酶的结合能力,从而拮抗RhoA对轴突再生的抑制作用。同时激活的PKA又可与神经营养因子协同促进轴突在生和生长锥的导向调节^[41]。

神经元活动可调整脑细胞在时间和空间上的反应,正是这种不间断激活的信号模式为轴突和树突再生提供时间和空间基础,而只有深入了解轴突和树突再生的信号控制系统,才能探寻更好的增强神经功能修复的康复策略。

3 小结

内源性神经修复是CNS损伤后神经功能修复的基础,随着对神经再生基础研究的深入,神经修复治疗将会对脑卒中后神经功能缺损症状临床治疗提供更多思路和方法。目前为止,虽然神经修复治疗仍处于基础研究阶段,但其良好的效果显而易见,而如何将其转化到临床应用将是下一步的工

作重点。应充分考虑到影响脑卒中患者神经功能修复的各种因素,通过神经修复治疗最大限度的发挥机体内源性神经修复作用,促进患者神经及受损功能的修复,同时结合常规的康复手段,实现脑卒中后受损神经和功能全面康复的理想状态,难点在于如何根据内源性神经修复机制选择合适的康复手段,这需要基础和临床的完美结合。

参考文献

- [1] Dimyan MA, Cohen LG. Neuroplasticity in the context of motor rehabilitation after stroke[J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(2):76—85.
- [2] Hermann DM, Chopp M. Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation[J]. *Lancet Neurol*, 2012, 11(4):369—380.
- [3] Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(12):861—872.
- [4] Zhang ZG, Chopp M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(5):491—500.
- [5] Reitmeir R, Kilic E, Kilic U, et al. Post-acute delivery of erythropoietin induces stroke recovery by promoting perilesional tissue remodelling and contralesional pyramidal tract plasticity[J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 1):84—99.
- [6] Pernet V, Schwab ME. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(1):97—104.
- [7] Liu Z, Li Y, Zhang ZG, et al. Bone marrow stromal cells enhance inter- and intracortical axonal connections after ischemic stroke in adult rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(7):1288—1295.
- [8] Wiessner C, Bareyre FM, Allegrini PR, et al. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(2):154—165.
- [9] Shen LH, Li Y, Chen J, et al. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke[J]. *Stroke*, 2007, 38(7):2150—2156.
- [10] Cui X, Chopp M, Zacharek A, et al. Niacin treatment of stroke increases synaptic plasticity and axon growth in rats[J]. *Stroke*, 2010, 41(9):2044—2049.
- [11] Reitmeir R, Kilic E, Reinboth BS, et al. Vascular endothelial growth factor induces contralesional corticobulbar plasticity and functional neurological recovery in the ischemic brain[J]. *Acta Neuropathol*, 2012, 123(2):273—284.
- [12] Papadopoulos CM, Tsai SY, Guillen V, et al. Motor recovery and axonal plasticity with short-term amphetamine after stroke[J]. *Stroke*, 2009, 40(1):294—302.
- [13] Liu Z, Li Y, Zhang RL, et al. Bone marrow stromal cells promote skilled motor recovery and enhance contralesional

- axonal connections after ischemic stroke in adult mice[J]. *Stroke*, 2011, 42(3):740—744.
- [14] Andres RH, Horie N, Slikker W, et al. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain[J]. *Brain*, 2011, 134(Pt 6):1777—1789.
- [15] Gardiner NJ. Integrins and the extracellular matrix: key mediators of development and regeneration of the sensory nervous system[J]. *Dev Neurobiol*, 2011, 71(11):1054—1072.
- [16] Herz J, Reitmeir R, Hagen SI, et al. Intracerebroventricularly delivered VEGF promotes contralesional corticorubral plasticity after focal cerebral ischemia via mechanisms involving anti-inflammatory actions[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 45(3):1077—1085.
- [17] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke[J]. *Nat Med*, 2002, 8(9):963—970.
- [18] Zhang RL, Chopp M, Gregg SR, et al. Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(7):1240—1250.
- [19] Doeppner TR, Kaltwasser B, ElAli A, et al. Acute hepatocyte growth factor treatment induces long-term neuroprotection and stroke recovery via mechanisms involving neural precursor cell proliferation and differentiation[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(5):1251—1262.
- [20] Alagappan D, Lazzarino DA, Felling RJ, et al. Brain injury expands the numbers of neural stem cells and progenitors in the SVZ by enhancing their responsiveness to EGF[J]. *ASN Neuro*, 2009, 1(2):e00009.
- [21] Bacigaluppi M, Pluchino S, Peruzzotti-Jametti L, et al. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms[J]. *Brain*, 2009, 132(Pt 8):2239—2251.
- [22] Teng H, Zhang ZG, Wang L, et al. Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(4):764—771.
- [23] Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke[J]. *Brain*, 2008, 131(Pt 3):616—629.
- [24] Ridgway J, Zhang G, Wu Y, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis[J]. *Nature*, 2006, 444(7122):1083—1087.
- [25] Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis[J]. *Nature*, 2007, 445(7129):776—780.
- [26] Al Haj Zen A, Oikawa A, Bazan-Peregrino M, et al. Inhibition of delta-like-4-mediated signaling impairs reparative angiogenesis after ischemia[J]. *Circ Res*, 2010, 107(2):283—293.
- [27] Arkuszewski M, Swiat M, Opala G. Perfusion computed tomography in prediction of functional outcome in patients with acute ischaemic stroke[J]. *Nucl Med Rev Cent East Eur*, 2009, 12(2):89—94.
- [28] Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q. Neurogenesis, angiogenesis, and MRI indices of functional recovery from stroke[J]. *Stroke*, 2007, 38(2 Suppl):827—831.
- [29] Chen J, Zacharek A, Zhang C, et al. Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(9):2366—2375.
- [30] Thiagarajan M, Fernández JA, Lane SM, et al. Activated protein C promotes neovascularization and neurogenesis in postischemic brain via protease activated receptor1[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(48):12788—12797.
- [31] Pannasch U, Vargová L, Reingruber J, et al. Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(20):8467—8472.
- [32] Galtrey CM, Fawcett JW. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system[J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1):1—18.
- [33] Shen LH, Li Y, Gao Q, et al. Down-regulation of neurocan expression in reactive astrocytes promotes axonal regeneration and facilitates the neurorestorative effects of bone marrow stromal cells in the ischemic rat brain[J]. *Glia*, 2008, 56(16):1747—1754.
- [34] Hill JJ, Jin K, Mao XO, et al. Intracerebral chondroitinase ABC and heparan sulfate proteoglycan glypican improve outcome from chronic stroke in rats[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(23):9155—9160.
- [35] Xin H, Li Y, Shen LH, et al. Increasing tPA activity in astrocytes induced by multipotent mesenchymal stromal cells facilitate neurite outgrowth after stroke in the mouse[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):e9027.
- [36] Xin H, Li Y, Shen LH, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells increase tPA expression and concomitantly decrease PAI-1 expression in astrocytes through the sonic hedgehog signaling pathway after stroke (in vitro study)[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(11):2181—2188.
- [37] Chow DK, Groszer M, Pribadi M, et al. Laminar and compartmental regulation of dendritic growth in mature cortex[J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12(2):116—118.
- [38] Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, et al. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke[J]. *Nature*, 2010, 468(7321):305—309.
- [39] Clarkson AN, Overman JJ, Zhong S, et al. AMPA receptor-induced local brain-derived neurotrophic factor signaling mediates motor recovery after stroke[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(10):3766—3775.
- [40] Schweigreiter R, Walmsley AR, Niederöst B, et al. Versican V2 and the central inhibitory domain of Nogo-A inhibit neurite growth via p75NTR/NgR-independent pathways that converge at RhoA[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2004, 27(2):163—174.
- [41] Qiu J, Cai D, Dai H, et al. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP[J]. *Neuron*, 2002, 34(6):895—903.