

神经元学说的补丁——脑细胞生存的微环境

韩鸿宾

北京大学第三医院放射科,磁共振成像设备与技术北京市重点实验室,北京 100191

摘要 以西班牙病理学家卡哈尔的神经元学说为根基的西方脑科学和脑病研究已发展 100 多年,然而,研究结果与人们的预期相差甚远。尽管微环境概念已提出 150 多年,但在脑科学领域,人们始终将研究的焦点集中在神经元上,而在活体上占据脑容积 20% 的脑细胞外间隙一直未受到重视。通过系统综述脑缺血性中风神经治疗研究的发展历程,分析了神经元学说体系下脑卒中神经保护药物研发失败的原因和重视脑细胞外间隙研究的重要意义,阐述以神经元为脑的唯一代理的神经元学说的潜在漏洞,论述了脑细胞微环境研究的广阔应用前景,提出脑细胞生存微环境研究是神经元学说不可或缺的重要补充,是脑科学未来的研究方向和重点。

关键词 神经元;脑卒中;神经科学;对流增强给药;简单扩散给药

中图分类号 R741

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.26.011

Micro-environment of Neurons: A Neglected Issue

HAN Hongbin

Radiology Department, Peking University Third Hospital, Beijing Key Lab of MRI Device and Technology, Beijing 100191, China

Abstract In the neuroscience, the neuron doctrine has been considered as the gold standard for more than 100 years. In the meantime, unfortunately, the achievements during past several decades have been proved to be far away from what would have been expected: the mystery of human's memory and emotion is still an open question, and the Alzheimer's disease and the stroke etc. still cause the disability and crush the dignity of human beings. Although Claude Bernard had stressed the importance of the internal environment 150 years before, not much attention has been paid to the micro-environment around neurons (brain extracellular space), although this space occupies about 20% of the brain volume in vivo. The significance of the micro-environment of neurons is emphasized in this paper based on a review and analysis of the unsuccessful investigations on neuro-protective agents against cerebral ischemic stroke. The defects of neuron's doctrine are discussed. The nature of the micro-environment around neurons is a neglected issue in the neuroscience for a long time and it will be an indispensable complement of the neuron's doctrine.

Keywords neuron; stroke; neuroscience; convection enhanced delivery; simple diffusion delivery

0 引言

神经科学主要解决两类问题:一是对人类认知、记忆、情感、意识等的解读,二是对脑病机制和诊治的研究。但是脑科学计划的实施、脑基因组图谱的完成,以及各类神经药物的研究,都没有取得人们所预期的实质性进展。从认知的角度,没有解开记忆和智力之谜,没有解开毒品上瘾之谜,没有找到精神类疾病和老年痴呆的明确有效治疗方法;在脑病治疗方

面,脑血管病、免疫相关性脑病的诊治研究进展缓慢。纵观神经科学的发展,尽管投入巨大,但基础研究中能够转化并解决临床实际问题的科学研究很少;更有即使投入了巨额经费,耗费了巨大社会人力、物力,而最终被证实是无效的诸多实例。上述种种是否表明神经科学发展的基础存在某些缺陷,抑或是人类发展脑科学的思路或方向存在问题?本文以人类对缺血性中风神经保护药物研究的失败为例来探讨脑

收稿日期:2012-07-10;修回日期:2012-08-06

基金项目:国家自然科学基金项目(30972811,81071148,81171080);国家十二五科技支撑计划项目(2012BAI15B009)

作者简介:韩鸿宾,教授,研究方向为磁共振成像新技术开发与临床应用、脑血管病诊治,电子邮箱:hanhongbin@bjmu.edu.cn

科学研究领域存在的死角,反思当今科学界过于重视细胞而轻视细胞生存微观环境的科学研究体系以及为此而付出的惨重代价,阐述以神经元为脑的唯一代理的神经元学说的潜在漏洞,论述脑细胞微环境研究的广阔应用前景,提出脑细胞生存微环境研究是神经元学说不可或缺的重要补充,是脑科学未来的研究方向和重点。

1 脑卒中治疗历史

脑卒中有史可查的最早描述者是希波克拉底(公元前400年)^[1]。从解剖学家盖伦以来,人们对脑血管全貌的认识经历了1500余年。但真正形成现今西方医学中脑卒中治疗原则和方法的历史基本集中在近200年内。19世纪末20世纪初,卡哈尔在高尔基的工作基础上创立神经元学说^[2]。之后,随着神经细胞培养技术的发展,针对神经细胞损伤机制的各类研究得以成行。随着介入技术的发展以及溶栓药物研究的发展,介入治疗缺血性卒中(心肌梗死等)开始进入临床实践。19世纪70年代以后,由于计算机断层扫描(Computed Tomography, CT)和磁共振成像法(MRI)等高级影像设备,脑卒中脑实质损伤可在超早期实现定量诊断和成像显示,这直接促进了脑卒中“再通治疗”(包括溶栓、抗凝、外科手术和血管介入治疗)的临床研究;但脑卒中血管再通治疗始终没有出现像心肌梗死介入手术一样世界公认的治疗有效性的报道。

对于罹患脑中风的每个个体而言,急性期治疗是关系到未来生存及其家庭生活质量的的关键环节。除了临床降颅压等一般性治疗和针对病因的“血管再通”治疗外,神经保护药物治疗是针对受损神经元最主要的治疗措施。但神经保护药物研究的进展也不顺利,投资数百亿美元的神经保护药物至今没有一种被最终证实对急性卒中治疗具有明确疗效^[3]。

无论“血管再通”,还是神经保护药物治疗,都没有将人类从急性卒中疾病中解脱出来。致死率、致残率没有显著下降,反而成为中国疾病中的第一杀手。高致残率使得现代医学对卒中病人生命的挽救苍白无力,相继造成的社会负担更是沉重不堪。

脑卒中随年龄的增大其发病后的致死率和致残率都明显增高。由于卒中急性期治疗没有取得突破性进展,加之中国社会的老龄化,中国脑卒中的发病率逐年升高。中国生物技术发展中心抽样调查数据显示^[4],中国城乡脑血管病的年发病率平均为200/10万,死亡率为130/10万,患病率为400—700/10万,全国每年新发脑血管病病例250万,显著高于国际平均水平。脑卒中急性期治疗效果的不确定性使得各国对脑卒中疾病的预防都非常重视^[5]。

针对脑卒中的发病病因的流行病学研究都表明脑卒中是一个复杂的疾病,血压、血糖、血脂、吸烟等生活习惯都被证实与脑卒中的发病有关。早在1950年,美国就开始了脑卒中的人群防治,1972—1985年间脑卒中死亡率下降了35%。日本在1950—1970年脑血管病为第一位,重视预防工作后,1985

年降到第三位,死亡率由最高时的170/10万下降到了100/10万。此外,西欧、北欧、北美和大洋洲的多数国家在1970—1985年脑卒中的标化死亡率下降,可见预防在脑血管病发病中的重要作用^[6]。近来,卫生部成立了脑卒中筛查与管理办公室,通过预防来对抗脑卒中的理念和相关措施得以在全国范围内展开。

2 脑卒中神经保护药物研发失败的原因分析

目前已经完成临床试验的神经保护剂超过50余种,然而,多个在动物实验中被认为有希望的神经保护剂都在后期临床试验中因为无效被终止。针对这种情况,2008年卒中治疗学术产业圆桌会议对急性卒中试验提出了一些推荐意见,包括规范卒中研究标准,完善动物模型设计和治疗结局评价,加强新药与新技术开发等^[7]。但在2008—2011年数种神经保护药物还是相继被宣布失败。从结果看,显然上述分析远未涉及问题的本质。基础与临床研究的脱节,新药筛选研发与临床的脱节,商业对药物研发的强力介入与引导等因素并未被全面地考虑。

脑细胞在面对缺血、缺氧打击时的损伤机制是通过神经细胞培养来进行研究和证实的,损伤的过程和步骤被基础神经科学家研究清楚后,药学专家针对每个关键环节或可能的靶点来筛选药物对抗和逆转神经细胞的缺血损伤和死亡过程。然而,尽管离体细胞培养,甚或基因层面证实某类药物对神经元具有保护作用,但以现有的给药途径(口服和静脉后入血),药物根本无法从血液这个途径有效地到达已经缺血或血供完全中断的脑区。而且一个离体的脱离内环境的细胞并不能模拟一个接受神经内分泌、免疫调节的在体细胞在接触某个刺激(包括药物)的真实状态。因此,离体细胞模型所得出的数据往往和在体的实际情况南辕北辙。更何况脑这个人体的特殊器官所具备的保护屏障——血脑屏障(Blood-Brain Barrier, BBB)能有效阻止外来物质的侵入。脑缺血性中风本身就是缺血性疾病,病变及周边的区域缺血或无血流;即使药物能够到达缺血区周边,也由于血脑屏障的阻隔而无法通过;退一步假使药物通过机械辅助或者药物化学特性的改良而通过BBB,药物从BBB如何经过细胞周围的间隙到达需要保护的神经元仍然是未解之谜。这是因为人脑毛细血管只占脑容积的3%左右^[8],而脑细胞外间隙却占据着活体脑容积的20%^[9]。细胞生物学、分子生物学、基础科学、药学与临床医学之间的脱节造成了社会资源的巨大浪费。

以西班牙病理学家卡哈尔的神经元学说^[2]为根基的西方脑科学、脑病研究耗费了巨大的社会资源,但人们对脑的认识并没有突破性的进展。神经科学发展至今,神经元学说、突触学说在笛卡尔等学者的还原论和机械论引擎上不断发展和前进。按照现有的思维方式和研究模式,人本身如同机器一样,可随意拆分,因此对疾病的认识,也被认为可以直接在细胞、分子、蛋白、基因水平进行诠释,而结果是很多实际问

题至今无法解决,诸多在离体研究中令人振奋的发现和发明在复杂的人体系统内根本无法复制而生效。

3 脑细胞外间隙的研究现状

中国古代的黄帝内经就已经提出天人合一的概念,人和自然的和谐是通过人与人周围的自然环境之间信息与信息的交互来实现的。由法国生理学家 Bernard 提出的内环境稳态概念^[8]在众多系统疾病研究和防治中发挥了重要作用,如肾脏。然而,在神经科学领域,这一理念促成了神经细胞培养产业的发展,催生了神经生物学学科,但神经解剖学这一传统学科被忽视了。从人类科学研究活动的社会性质来看,利益价值往往在理性判断中占据着平衡的上风。当基因被作为下一代产业革命的命题时,社会资源的把控部门和科学家们的研究活动很容易被引导至这一方向。神经细胞周围微环境的研究不再是重点,只有少数人如 Nicholson 等^[6-7]在坚持研究。田牛等^[9-10]、玉国卿等^[11]进行过系列攻关,但也未能引起神经科学界的普遍重视^[12]。人们没有过多地关注神经细胞外间隙和组织通道,更多的精力集中在神经元。

科学研究方向的自身矫正往往需要付出巨大的代价,但都会向着真理真相逐渐发展。经脑细胞周围的组织通道进行治疗的对流增强给药技术 (Convection Enhanced Delivery, CED)项目被美国食品和药物管理局(FDA)批准^[13],更加微创的简单扩散给药(Simple Diffusion Delivery, SDD)技术也已证实可使神经保护药物在脑缺血治疗研究中“复活”^[14]。由于人们对脑细胞外周围间隙的解剖和生理认识的局限性,这一治疗方法的获批距专利申请^[15]已 16 年。

目前,针对神经元周围微观环境的研究主要分为两个方向:一是脑细胞外间隙的研究方向,二是针对脑组织液的研究方向。两个研究方向及其研究团队基本没有交集。其中关于脑组织液的研究结果和结论争议较多,而对脑细胞外间隙的争议较少,这与后者的研究方法基本都是在活体上完成,而前者基本都是离体实验的结果有关。两者缺少交集的原因也在于测量技术比较局限,两个研究团队使用的技术都无法实现对脑细胞外间隙和脑组织液的同时定量分析和测量。

针对脑细胞外间隙,自 20 世纪 70 年代以来,科学家们共发明了 8 类脑细胞外间隙的研究方法。其中,放射性示踪法^[6]、实时离子导入与压力引射法^[16]、集成光学成像法^[17]技术成熟,应用广泛;而磁共振成像法(扩散加权成像技术)^[18]、光散射与透射法^[19]、荧光漂白恢复法^[20]、微透析法^[21]以及阻抗法^[6],由于所涉及的理论机制尚未明确,与传统测量方法测量结果相差较大,仍需进一步证实。这 8 类方法中,放射性示踪法、光散射/透射法、荧光漂白恢复法采用离体测量;实时离子导入与压力引射法是在活体上的检测方法,但只能测量到两个微电极间 30—100 μm 微小范围内的扩散参数;而集成光学成像法尽管也是在活体上完成测量,但由于光的物理性质,测量的深度最多可达到皮层下 200 μm 左右^[6]。并且,上述

测量技术获得的都是关于组织通道的结构性参数,如有效扩散系数 D^* 、迂曲度 λ 、体积分数 α ,而脑组织液流动速率 v 与清除率 $f(C)$ 等生理参数指标无法提供。

针对脑组织液,学者们通常借助分子探针,将其注入入局部脑组织后不同时间点处死动物,制作常规病理切片或冰冻切片,进行免疫组织化学染色或者激光共聚焦显微成像,观察示踪剂在脑内局部的分布情况。但是,这些离体标本处理过程中的固定、脱水等操作可能会对研究结果的准确性产生影响。常用于研究脑组织液引流的示踪剂分子有放射性碘标记的白蛋白(RISA)^[22]、辣根过氧化物酶(HRP)^[23]、聚乙烯葡聚糖^[24]、卵白蛋白^[25]、免疫荧光微球^[26]等。这些方法利用各个时刻示踪剂在脑内的局部定位推测脑组织液的动态引流过程,无法准确确定其来源和作用。Muldoon 等^[26]应用 MRI 采用阴性 MRI 示踪剂超顺磁性氧化铁纳米颗粒在鼠脑组织液内引流过程的研究对在体研究脑组织间液(ISF)引流具有重要意义。中国研究人员在 2009 年建立了一种基于 MRI 阳性对比剂的示踪技术,实现了脑组织液在活体的生理定量分析与成像显示(简称 MRI 示踪法)。该方法所采用的示踪剂为小分子极性药物钆喷酸葡胺(Gd-DTPA, 相对分子质量为 938.02Da, Gadolinium -Diethylenetriamine Pentaacetic Acid)。MRI 示踪法是目前唯一可同时定量测量脑组织液流动性与脑细胞外间隙生理参数的技术方法,也是目前唯一可在全脑范围进行可视化分析的活体测量法。因此,与其他方法相比,更适合用于针对脑组织通道的脑病发病机制研究和相关药物治疗研究^[27-28]。

4 神经元微环境研究展望

经脑细胞周围的脑间质途径给药治疗,最早由 Bobo 等^[29]以专利的形式于 1994 年提出,1996 年被美国卫生部拥有,1998 年被美国军方购买拥有^[15]。美方专利的核心理念为 CED,即通过施加一个正向液压梯度向脑内持续注射药物,被认为是未来治疗神经系统疾病的有效途径^[30]。CED 法对于大分子药物来说尤其适用,额外的液压梯度能够帮助药物扩散到距离注射部位较远的脑区。但很多神经保护药物的相对分子质量都小于 1000Da。中国科学家的研究表明,对于小分子物质,如 Gd-DTPA,可以不借助任何外加压力,只依赖局部浓度梯度导致的自扩散运动就可到达靶区,这就使得非外加压力性的微创、微剂量给药成为可能,并可有效避免 CED 因持续加压注射引起的脑水肿等并发症。在此基础上,按照生物相容性等原则选择胞二磷胆碱作为经间质途径给予的神经保护药物,在大鼠永久性大脑中动脉栓塞模型上证实了经脑间质提前给予微剂量、低浓度胞二磷胆碱可更有效地保护缺血神经元^[14]。上述研究表明,以往被证实无效的神经保护药物、肿瘤药物、阿尔兹海默氏病和帕金森等药物都有可能通过这一新的途径“复活”。上述针对脑细胞周围间隙的研究也表明,神经元学说存在重要的漏洞,其所生存的微环境是人

类对人脑尚未完全认识的解剖死角,人类对这一间隙的解剖和生理的阐明将有望使脑科学进入一个崭新的时代。当人们对脑的解剖尚有 20% 还未研究清楚的时候,展开“创造脑”的脑科学计划为时尚早。随着人们对脑细胞生存的微环境的生物学特征的进一步阐明和经脑间质途径给药治疗脑病的实践,神经元学说中将得到必要的补充和完善,脑科学也将进入一个新时代。

参考文献 (References)

- [1] Tilikidis A, Boukouvalas C, Eleuthriamtzorou, 等. 希波克拉底经脉脉络[J]. 天津中医药, 2008, 25(5): 422-424.
Tilikidis A, Boukouvalas C, Eleuthriamtzorou, et al. *Tianjin Journal of Traditional Chin Medicine*, 2008, 25(5): 422-424.
- [2] Cajal S R Y. Neuron theory or reticular theory?[M]. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Instituto Ramony Cajal; 1st Edition in English edition, 1954.
- [3] Fisher M, Feuerstein G, Howells D W, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations [J]. *Stroke*, 2009, 40(6): 2244-2250.
- [4] 王陇德. “脑卒中筛查与防治工程进展与防控策略”工作报告[R]. 北京, 2011.
Wang Longde. Report on screening and control engineering development of brain stroke and preventive strategies[R]. Beijing, 2011.
- [5] Hankey G J. Neuroprotection for acute ischaemic stroke: hope reignited [J]. *Lancet Neurology*, 2006, 5(4): 287-288.
- [6] Sykova S, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space[J]. *Physiological Reviews*, 2008, 88: 1277-1340.
- [7] Nicholson C. Diffusion and related transport mechanisms in brain tissue [J]. *Reports on Progress in Physics*, 2001, 64: 815-884.
- [8] Bernard C. An introduction to the study of experimental medicine[M]. New York: Dover Publications, 1957.
- [9] 田牛, 李玉珍, 刘凤英. 脑微循环的特点 [J]. 微循环学杂志, 1999(3): 40-44.
Tian Niu, Li Yuzhen, Liu Fengying. *Chinese Journal of Microcirculation*, 1999(3): 40-44.
- [10] 田牛, 赵秀梅. 组织通道对医学、生物学发展的重要作用[J]. 微循环学杂志, 2006(3): 1-3.
Tian Niu, Zhao Xiumei. *Chinese Journal of Microcirculation*, 2006(3): 1-3.
- [11] 王国卿, 封丽芳, 夏作理. 脑内物质的淋巴引流与脑细胞微环境[J]. 中国微循环, 2005, 9(3): 72-75.
Wang Guoqing, Feng Lifang, Xia Zuoli. *Journal of Chinese Microcirculation*, 2005, 9(3): 72-75.
- [12] 李玉珍, 田牛. 24 位专家对临床微循环目前存在问题和改进意见的汇总[J]. 中国微循环, 2005, 9(2): 71-75.
Li Yuzhen, Tian Niu. *Journal of Chinese Microcirculation*, 2005, 9(2): 71-75.
- [13] Debinski W, Tatter S B. Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors [J]. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2009, 9(10): 1519-1527.
- [14] Han H B, Xia Z L, Chen H, et al. Simple diffusion delivery via brain interstitial route for the treatment of cerebral ischemia [J]. *Science in China Series C—Life Sciences*, 2011, 54: 235-239.
- [15] Laske D W, Oldfield E H, Bobo R H. Convection-enhanced drug delivery, US 5720720[R]. Washington, D C: The United States of America as Represented by Department of Health and Human Services, 1998.
- [16] Michael A C, Borland L M, Mitala J J, et al. Theory for the impact of basal turnover on dopamine clearance kinetics in the rat striatum after medial forebrain bundle stimulation and pressure ejection [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 94(5): 1202-1211.
- [17] Thome R G, Hrabetova S, Nicholson C. Diffusion of epidermal growth factor in rat brain extracellular space measured by integrative optical imaging[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2004, 92(6): 3471-3481.
- [18] Sykova E, Mazel T, Hasenohr R U, et al. Learning deficits in aged rats related to decrease in extracellular volume and loss of diffusion anisotropy in hippocampus[J]. *Hippocampus*, 2002, 12(2): 269-279.
- [19] Tao L. Light scattering in brain slices measured with a photon counting fiber optic system [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2000, 101(1): 19-29.
- [20] Binder D K, Papadopoulos M C, Haggie P M, et al. In vivo measurement of brain extracellular space diffusion by cortical surface photobleaching[J]. *Journal of Neuroscience*, 2004, 24(37): 8049-8056.
- [21] Chen K C, Hoistad M, Kehr J, et al. Quantitative dual-probe microdialysis: mathematical model and analysis[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2002, 81(1): 94-107.
- [22] Weller R O, Kida S, Zhang E T. Pathways of fluid drainage from the brain—Morphological aspects and immunological significance in rat and man[J]. *Brain Pathology*, 1992, 2(4): 277-284.
- [23] Cserr H F, Cooper D N, Milhorat T H. Flow of cerebral interstitial fluid as indicated by the removal of extracellular markers from rat caudate nucleus[J]. *Experimental Eye Research*, 1977, 25(S): 461-473.
- [24] Cserr H F, Ostrach L H. Bulk flow of interstitial fluid after intracranial injection of blue dextran 2000[J]. *Experimental Neurology*, 1974, 45(1): 50-60.
- [25] Carare R O, Bernardes-Silva M, Newman T A, et al. Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology [J]. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2008, 34(2): 131-144.
- [26] Muldoon L L, Varallyay P, Kraemer D F, et al. Trafficking of superparamagnetic iron oxide particles (Combidex) from brain to lymph nodes in the rat[J]. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2004, 30(1): 70-79.
- [27] 和清源, 韩鸿宾, 许方婧伟, 等. Gd-DTPA 磁共振成像示踪法对脑细胞外间隙成像与定量分析的初步研究 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2010, 42(2): 188-191.
He Qingyuan, Han Hongbin, Xufang Jingwei, et al. *Journal of Peking University: Health Sciences*, 2010, 42(2): 188-191.
- [28] Xu F, Han H, Yan J, et al. Greatly improved neuroprotective efficiency of citicoline by stereotactic delivery in treatment of ischemic injury[J]. *Drug Delivery System*, 2011, 18(7): 461-467.
- [29] Bobo R H, Laske D W, Akbasak A, et al. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(6): 2076-2080.
- [30] Bidros D S, Liu J K, Vogelbaum M A. Future of convection-enhanced delivery in the treatment of brain tumors [J]. *Future Oncology*. 2010, 6(1): 117-125.

(责任编辑 安莹, 吴晓丽)