

Nogo 基因及其相关蛋白与脊髓神经再生的研究进展

李红宇, 袁 文

(第二军医大学附属长征医院骨科 200003 上海市)

中图分类号: Q786, R683.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-406X(2005)-10-0625-03

成人中枢神经系统(CNS)损伤后几乎无再生能力^[1]。神经缺血、局部炎症反应导致的大量上、下行纤维束阻断, 神经细胞、神经胶质细胞缺失, 髓磷脂的破坏, 以及脊髓损伤后疤痕的病理生理特点均直接影响到脊髓神经再生^[2,3]。近来有研究发现, 中枢神经损伤后神经纤维在局部有短时间修复反应, 其轴突再生和轴突发育一样可通过移动的生长锥形成突触联系, 但却不能生长, 因此考虑可能在受损部位存在相关抑制因素, 如胶质疤痕的空间阻碍作用、促神经生长因子的缺乏及髓鞘抑制因子等^[4]。目前已确认的中枢神经髓鞘来源的抑制因子至少有以下三种: Nogo-A、髓鞘相关性糖蛋白(MAG)和少突胶质细胞蛋白多糖(OMgP)。其它可能相关的还有 Arretin、角质素、细胞粘合素 R、硫酸软骨素蛋白多糖(CSPG)等^[5]。现就 Nogo 基因及其相关蛋白与脊髓再生的研究现状做一回顾。

1 Nogo 基因及其相关蛋白的发现

1988 年, Schwab 等^[6]分离大鼠 CNS 轴突周围起隔离作用的髓磷脂蛋白, 获得两种对神经突起生长具有强烈抑制作用的磷脂相关性糖蛋白(MAG), 分子量分别为 35kD 和 250kD, 并分别被称为 NI35/NI250。1998 年 Spillmann 等^[7]从牛脊髓中提取纯化相当于大鼠 NI250 的牛的同源物 bNI220, 两者即 Nogo-A。从此 Nogo-A 成为第一个被提纯的髓磷脂膜蛋白抑制因子。其后利用 Nogo-A 克隆出了 Nogo 基因。Chen 等^[8]用相关序列探针的方法从大鼠 cDNA 文库中获得了其 cDNA; GrandPre 等^[9]发现了目前 GenBank 中已收录的人的全长 cDNA。Nogo 基因是一种重要的神经突起抑制因子, 通过对神经突起生长的作用, 从而抑制中枢神经系统损伤后神经纤维的再生及功能的恢复。Nogo 基因的发现, 相关抑制性因素的研究成为中枢神经再生的研究重点。基于其启动子和剪切方式的不同, Nogo 基因编码三种蛋白质: Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C, 尤其是 Nogo-A, 主要由少突胶质细胞表达的整合膜蛋白, 在体内和体外都表现出强烈的抑制轴突生长的作用。

2 Nogo-A 的分布及特点

在成年大鼠 CNS 的组织切片中, 用 Nogo-A 特异探针

进行原位杂交, 除大量少突胶质细胞得到标记, 其它亚型的神经元在脑、脊髓及外周神经节内也能见到标记, 在发育神经组织中更为明显。Huber 等^[10]用共聚焦和免疫电镜揭示出 Nogo-A 主要在少突胶质细胞的细胞体和突起表达, 位于最内的轴突旁和最外层的髓鞘膜上, 但在神经元和其它组织的分布提示 Nogo-A 可能还有其它功能。Wang 等^[11]的结果显示, Nogo-A 在细胞内分布于少突胶质细胞的胞体和神经毡内。Jin 等^[12]运用 Western blotting 方法发现嗅球、大脑皮质、海马、丘脑、下丘脑、小脑皮质、胼胝体、脊髓都呈现 220kDa 带, 还存在于神经元的核周体、质膜和细胞核。进而运用原位杂交和免疫组化技术发现, 成年大鼠大脑神经元 Nogo mRNA 普遍阳性, Nogo-A 在 CNS 神经元中广泛存在, 在嗅脑(特别是梨状皮层)、颅神经的躯体运动神经元和脊髓前角、丘脑中前背侧核及浦肯野细胞中呈强阳性。说明 Nogo-A 在不同功能系统中发挥不同的作用。

3 Nogo 分子构象特点及受体

围绕着对 Nogo 基因、相关蛋白以及结合受体的深入研究, 目前对 Nogo-A 的结构已研究得比较清楚^[13], 全长 1163 个氨基酸, 其氨基端缺乏可作为普通信号序列的疏水氨基酸肽段; 靠近羧基端, Nogo-A 有两个长度分别为 35 和 36 个氨基酸的疏水区即跨膜区; 羧基端两个跨膜区之间有一个长 66 个氨基酸的短连接子, 位于内质网腔或细胞外, 氨基端和羧基端都位于细胞质, 这个细胞外的结构域称为 Nogo-66。Nogo-66 在三个亚型中均存在。初期认为 Nogo-A 全长存在两个抑制性功能域, 一个可能位于细胞表面的 Nogo-66, 另一个为长的氨基端区段(NiG)。Oerthle 等^[14]为明确定位 Nogo 发挥抑制作用的区域, 构建了重组 Nogo-A 缺失文库, 用大肠杆菌和真核细胞表达了 50 余种 Nogo 蛋白片段, 并用这些片段作为底物或添加剂来培养细胞, 进一步明确了三个活性区域: ①Nogo-A/Nogo-B 的 N 端, 该区域抑制成纤维细胞播散而对神经元影响甚微; ② Nogo-A 特有区域(NiG)及其中心 181 个氨基酸, 该区域抑制轴突生长和成纤维细胞播散, 并诱导生长锥菱陷; ③C 端区域(Nogo-66), 该区域诱导生长锥菱陷。有实验还发现 Nogo-A 片段 aa1-172 和 aa544-725 在不含 Nogo-66、没有 Nogo 受体(NgR)的情况下也能抑制细胞播散和轴突生长, 故推测存在一种独立的 Nogo-A 特有受体。研究证实了该受体存在于 3T3 成纤维细胞表面等处。这说明

第一作者简介: 男(1972-), 主治医师, 在读博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (021)63610109-73838 E-mail: lhyu925@sohu.com

Nogo-A 分子具有数个结合位点(至少两个),分别与成纤维细胞和神经元细胞结合。Fournier 等^[15]运用碱性磷酸酶融合技术首次发现了 NgR。NgR 属糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白,具有多个富亮氨酸的重复结构,它与 Nogo-A 细胞外的结构域 Nogo-66 结合,同时也是 OMgP 和 MAG 结合的受体成分。通过分析 Nogo-C 末端 66 残基活性位点,发现 66 个残基的前 40 个所组成肽段不需要激活即可与 NgR 结合,Nogo-40 以其内在固有的螺旋形式存在,溶解后可检测到一个松散的一环连接了 2 个界限清楚的单环,正是与 Nogo-66 受体的一级结构结合的区域^[16]。

4 Nogo-A 对脊髓损伤的作用及其作用机制

脊髓损伤后,少突胶质细胞和髓磷脂释放出细胞内 Nogo-A 到细胞外基质,通过信号转导,抑制轴突再生。对于活体脊髓损伤后,皮质脊髓束作为最大的下行纤维主要运载有髓鞘和无髓鞘感觉及运动纤维,反应敏感,便于观察。应用 Nogo-A 抗体中和中枢神经髓磷脂或中枢神经提纯物所致的强效抑制神经再生活性可达到促进神经再生作用。其中中和性 Nogo-A 抗体(IN-1)在体外能有效地中和抑制作用,在大鼠 CNS 损伤模型中能诱导长距离轴突再生,增加结构可塑性,功能恢复良好^[17,18]。IN-1 在活体内应用同样有效,通过注射 IN-1 Fab 抗原结合片段及新提纯的抗 Nogo-A 活性结合位点 IgG,可增加再生出芽以及受伤脊髓的轴突生长,上调浦肯野细胞多个早期生长相关性基因^[19],且可诱导完整成熟中枢神经系统的生长反应。

可溶性 NgR 片段、NgR 阻断性肽段(NEP1-40)可有效阻断 Nogo 受体,明显减轻髓磷脂的抑制活性^[20]。应用 NgR 阻断性肽段局部注射或全身用药可提高皮质脊髓束的出芽及再生,延迟应用 NEP1-40(伤后 7d)同样有效^[21]。Wang 等^[22]报道,NgR 抑制轴突再生中,需要与一种神经营养素家族生长因子的受体蛋白 p75 相结合形成受体复合物后才能起作用。该复合物由内在的神经生长潜能及胞外信号所支配,并在成人脊髓轴突的可塑性中起重要作用^[23]。对 p75NTR 敲除小鼠研究发现,p75NTR 功能丧失后脊髓损伤下行皮质脊髓束和上行感觉神经元的再生受阻,有人推测 p75NTR 是在体调节髓磷脂相关抑制物功能的关键因子^[24]。Nogo-66 和 NgR 结合主要影响轴突引导^[25]及神经可塑性和再生。Nogo-A 与受体结合后启动信号级联,引起生长锥局部肌动蛋白细胞骨架的改变,导致丝状伪足和薄片状伪足收缩,从而改变生长锥的形态和稳定性,最终造成生长锥塌陷^[26]。

在轴突横断伤后华勒氏变性模型检测其累及 Rho 可能性中发现,Rho 激酶活性与 Nogo-66 联系密切^[27],神经华勒氏变性过程中髓磷脂蛋白序列存在丢失^[28],脊髓损伤体内应用 Nogo 多肽后,Rho 活性在受损神经元局部大量激活^[29],通过抑制 Rho/Rho 相关蛋白激酶(ROCK)途径、细胞内高钙及高浓度 cAMP,达到促进神经再生作用^[30]。给予 Rho 激酶抑制剂可明显阻止皮质脊髓束变性,推测是通过

信号通路阻止其轴突变性。Nogo-A 特异性活性片段和 Nogo-66 通过对抗性调节小 GTP 水解酶中的 RhoA 和 Rac1 来发挥作用,导致 RhoA 激活,Rac1 受抑制,用 C3 转移酶或者是其下游的 Rho 激酶的受动者 ROCK 来失活 RhoA,则 Nogo-A 片段的抑制作用消失,在视神经及脊髓损伤中表现突出,可提高视黄醛轴索及皮质脊髓束纤维再生。已有证据显示,失活 RhoA 或 ROCK 能够在体外诱导抑制性底物上神经元轴突的生长,使 CNS 损伤后出现功能上的恢复。RhoA 已经成为多个抑制性因子的关键信号转导蛋白,同时其抑制物在脊髓中具有显著的神经保护作用^[31]。既往研究显示,内源性 cAMP 水平升高能够激活磷酸激酶 A(PKA),使 RhoA 磷酸化失活,进而阻断对轴突再生的抑制。最近有研究提示 cAMP 升高,激活 PKA,该信号级联引发基因转录,包括精氨酸酶 I(Arg I)的合成,该酶又是多胺(Polyamines)合成通路上的限速酶;而多胺的上调反过来阻断由 MAG 导致的轴突生长的抑制^[32]。

脊髓组织损伤后的代偿机制尚不清楚,局部的脊髓环路可以产生一些简单的运动及自律性运动,这些环路是通过反射或下行的传导通路控制并修饰的。有观察显示,尽管大面积的脊髓损害也可以有一定程度上的功能康复,但往往需要时间,背侧皮质脊髓束横断伤可以诱导一部分腹侧皮质脊髓束纤维自发性出芽^[33]。近来的研究发现,Nogo-A 是一种支配实验性自身免疫性脑脊髓炎及多发性硬化发展进程的重要因素,通过阻断该途径可有效地维持或恢复其中枢神经元的完整性,结果证实,Nogo-A 与中枢神经自身免疫性脱髓鞘作用密切相关^[34]。应用编码多个磷脂相关性抑制物的重组 DNA 分子疫苗接种到 lewis 鼠,可激活其免疫活性,并促进神经轴突的再生^[35],但作用机制还不十分清楚。

目前很多研究机构都在从事中枢神经系统再生的相关研究,取得了不少令人欢欣鼓舞的进步。Nogo 基因及相关蛋白的发现,改变了对中枢神经再生的认识,通过中和性 Nogo-A 抗体、Nogo 基因敲除、可溶性 NgR 片段、NgR 阻断性肽段等手段,实验观察中枢神经组织已得到良好再生,Nogo 基因及相关蛋白似乎已经成为限制中枢神经纤维自发再生的决定性因素。但依然有一些问题有待解决:各种中枢神经组织及髓磷脂中抑制因子之间是否存在相互作用?它们的受体、信号传导及时间相如何?干预途径的选择,作用机制,以及多种治疗基因协同治疗方面的研究,仍需深入探索。相信在不久的将来,必能揭开中枢神经再生的神秘面纱!

5 参考文献

1. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord [J]. *Physiol Rev*, 1996, 76 (2): 319-370.
2. Schwab ME. Repairing the injured spinal cord [J]. *Science*, 2002, 295 (5557): 1029-1031.
3. Sekhon LHS, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and

- pathophysiology of acute spinal cord injury [J]. *Spine*, 2003, 26 (Suppl 24): S2-S12.
4. McKerracher L, David S, Jackson DL, et al. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth [J]. *Neuron*, 1994, 13(4): 805-811.
 5. Woolf CJ, Bloechlinger S. It takes more than two to Nogo [J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1132-1134.
 6. Caroni P, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory propensities for neurite growth and fibroblast spreading [J]. *J Cell Biol*, 1988, 106 (4): 1281-1288.
 7. Spillmann AA, Bandtlow CE, Lottspeich F, et al. Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220) [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(30): 19283-19293.
 8. Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1 [J]. *Nature*, 2000, 403 (6768): 434-439.
 9. Grandpré T, Nakamura F, Vartanian T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein [J]. *Nature*, 2000, 403 (6768): 439-444.
 10. Huber AB, Weinmann O, Brosamle C, et al. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions [J]. *J Neurosci*, 2002, 22 (9): 3553-3567.
 11. Wang XX, Chun SJ, Treloar H, et al. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(13): 5505-5515.
 12. Jin WL, Liu YY, Liu HL, et al. Intraneuronal localization of Nogo-A in the rat [J]. *J Comp Neurol*, 2003, 458(1): 1-10.
 13. Liu BP, Fournier A, GrandPré T, et al. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor [J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1190-1193.
 14. Oerthle T, Van der Haar ME, Bandtlow CE, et al. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13): 5393-5406.
 15. Fournier AE, Grandpré T, Strittmatter SM, et al. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 341-346.
 16. Li M, Shi J, Wei Z, et al. Structural characterization of the human Nogo-A functional domains: solution structure of Nogo-40, a Nogo-66 receptor antagonist enhancing injured spinal cord regeneration [J]. *J Biochem*, 2004, 271 (17): 3512-3522.
 17. Fiedler M, Horn C, Bandtlow C, et al. An engineered IN-1 Fab fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity [J]. *Protein Eng*, 2002, 15 (11): 931-941.
 18. Fouad K, Klusman I, Schwab ME. Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1 [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(9): 2479-2482.
 19. Buffo A, Zagrebelsky M, Huber AB, et al. Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured Purkinje cell axons [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(6): 2275-2286.
 20. Dergham P, Ellezam B, Essagian C, et al. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(15): 6570-6577.
 21. Li S, Strittmatter SM. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(10): 4219-4227.
 22. Wang KC, Kim JA, Koprivica V, et al. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp [J]. *Nature*, 2002, 420(6911): 74-78.
 23. Scott AL, Borisoff JF, Ramer MS. Deafferentation and neurotrophin-mediated intraspinal sprouting: a central role for the p75 neurotrophin receptor [J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(1): 81-92.
 24. Song XY, Zhong JH, Wang X, et al. Suppression of p75NTR does not promote regeneration of injured spinal cord in mice [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(2): 542-546.
 25. He XL, Bazan JF, McDermott G, et al. Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition [J]. *Neuron*, 2003, 38(2): 177-185.
 26. Monnier PP, Siera A, Nitsch R, et al. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth-inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar [J]. *MOL Cell Neurosci*, 2003, 22(3): 319-330.
 27. Yamagishi S, Fujitani M, Hata K, et al. Wallerian degeneration involves RHO/RHO-kinase signaling [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(21): 20384-20388.
 28. Buss A, Pech K, Merkler D, et al. Sequential loss of myelin proteins during Wallerian degeneration in the human spinal cord [J]. *Brain*, 2005, 128(2): 356-364.
 29. Madura T, Yamashita T, Kubo T, et al. Activation of Rho in the injured axons following spinal cord injury [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(4): 412-417.
 30. Fournier AE, Takizawa BT, GrandPré T, et al. Rho kinase inhibition enhances axonal regeneration in the injured CNS [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(4): 1416-1423.
 31. Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher L. Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system [J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(2): 233-243.
 32. Cai D, Deng K, Mellado W, et al. Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth on MAG and myelin in vitro [J]. *Neuron*, 2002, 35(4): 711-719.
 33. Weidner N, Ner A, Salimi N, et al. Spontaneous corticospinal axonal plasticity and functional recovery after adult central nervous system injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (6): 3513-3518.
 34. Karnezis T, Mandemakers W, McQualter JL, et al. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination [J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(7): 736-744.
 35. Xu G, Nie DY, Chen JT, et al. Recombinant DNA vaccine encoding multiple domains related to inhibition of neurite outgrowth: a potential strategy for axonal regeneration [J]. *J Neurochem*, 2004, 91(4): 1018-1023.

(收稿日期: 2004-12-22 末次修回日期: 2005-09-05)

(本文编辑 卢庆霞)