

抗神经再生抑制因子促进轴突再生的研究进展

张宏志, 冯世庆

(天津医科大学总医院骨科 300052 天津市)

中图分类号: Q593, R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-02-0153-03

成年哺乳动物中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 损伤后轴突生长明显受限, 其主要原因是损伤后内环境的改变造成轴突再生分散且不完全, 即使形成生长锥也很难建立功能性突触, 而周围神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 损伤后却可有效再生。其原因主要取决于二者髓鞘细胞构成的不同。PNS 的髓鞘主要由雪旺细胞构成, 损伤后产生许多神经营养因子, 可促进 PNS 轴突生长, 而 CNS 的髓鞘主要由少突胶质细胞构成, 损伤后产生许多神经生长抑制因子如轴突生长抑制因子 (neurite outgrowth inhibitory, Nogo)、髓磷脂相关糖蛋白 (myelin-associated glycoprotein, MAG) 和少突胶质细胞-髓磷脂糖蛋白 (oligodendrocyte-myelin glycoprotein, Omgp) 等, 并与细胞膜上的受体 (NgR) 结合, 激活 RhoA 信号转导, 抑制神经轴突生长。笔者就神经再生抑制因子的作用机制及如何阻断其抑制作用、促进轴突再生和再髓鞘化综述如下。

1 细胞外途径

1.1 NogoA 单克隆抗体 (IN-1)

目前发现的神经再生抑制因子很多, 其中 Nogo 是髓磷脂中最重要的一种抑制轴突再生的蛋白质。Nogo 分子有三个不同的异构体, 分别命名为 Nogo-A、B 和 C, 是由同一基因 (在人类位于染色体 2p14-p13) 通过使用不同的启动子和剪接方式所形成^[1]。Nogo-A 主要表达于哺乳动物发育期的 CNS 中, 成年哺乳动物 CNS 中表达很低, 但是在 CNS 损伤后 Nogo-A 表达明显增高。Nogo-B 表达于许多组织, 但主要表达于内皮细胞和血管平滑肌。Nogo-C 主要在肌肉中表达, 其功能目前尚不清楚。所有的 Nogo 异构体都有一个由 188 个氨基酸构成的羧基端, 包含两个高度保守的疏水分支作为跨膜区, 而两个跨膜区之间存在一个长度为 66 个氨基酸的连接子即 Nogo66。Nogo-A 有两个发挥作用的区域: Nogo66 和细胞内的氨基端, Nogo66 主要存在于少突胶质细胞表面, 而再生轴突生长锥表面存在 Nogo66 特异性受体 (NgR), 二者结合通过细胞内的信号转导, 引起生长锥的溃变, 抑制轴突再生^[2]。

IN-1 为 NogoA 的单克隆抗体, 体外实验证实其能明

显促进神经轴突的延长^[3]。体内实验也证明了该结论。Liebscher 等^[4]将 IN-1 注入脊髓损伤大鼠的硬膜腔内, 6 周后发现皮质脊髓束断端延长 10~20mm, 且后肢功能有明显改善, 较对照组有显著性差异。Fouad 等^[5]应用分泌 IN-1 的杂交瘤注入猕猴大脑的海马, 利用免疫荧光技术发现在脊髓损伤部位有大量 IN-1 表达, 且主要与表达 Nogo 的神经胶质细胞结合, 轴突出芽、增生较对照组增强 5~10 倍, 并可通过损伤区向尾端长入 5mm。Florence 等^[6]将分泌 IN-1 的杂交瘤注入到大鼠的海马中, 应用生物素化葡聚糖胺 (biotinylated dextran amine, BDA) 逆行神经示踪技术, 发现 IN-1 可促进大鼠脊髓损伤区轴突的出芽和延伸, 同时应用逆转录聚合酶链反应 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测, 发现应用 IN-1 可使脊髓损伤区生长相关蛋白-43 (growth related proteins-43, GAP-43) 和脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 表达增高, 较对照组有显著性差异。提示 IN-1 除了可以阻断 NogoA 的作用外, 还可能具有其他功能。

1.2 Nogo-66 氨基端 1-40 个残基肽 (NEP1-40)

尽管 NI-1 被证明能够促进脊髓损伤动物轴突的再生和运动的恢复, 但其在 Nogo 上的抗原决定簇不明确, 特异性不强。Fournier 等^[7]在离体实验中证实 NEP1-40 能抑制 Nogo-66 与 NgR 的结合。体内实验中, GrandPre 等^[8]应用 NEP1-40 75μg/kg/d 以微量渗透泵的方法注射于脊髓背侧半切损伤模型大鼠的硬膜腔内, 连用 4 周, 发现皮质脊髓束轴突增生明显增强, 同时发现治疗组新生的轴突较正常轴突增粗 25 倍, 并可见突触结形成, 从而证实再生轴突并非健侧脊髓侧突生芽所致, 经 BBB 评分显示治疗组大鼠运动功能显著改善。

为了更安全、方便应用 NEP1-40, Li 等^[9]改进了实验用药方法, 采用 NEP1-40 1.2mg/kg/d 皮下注射 2 周治疗急性脊髓损伤, 可见轴突再生增强, 小鼠运动功能恢复, 较对照组有显著性差异。证明 NEP1-40 可以通过损伤后的血-脊髓屏障到达损伤部位。同时应用分子生物学技术发现轴突生长相关蛋白 (small praline-rich repeat protein 1A, SPRR1A) 表达增高, 促进轴突再生及突触的建立。虽然皮下注射 NEP1-40 较硬膜腔内注射应用剂量较大, 但其应用方便, 更贴近临床。但是对于慢性脊髓损伤, 血脊髓屏障未被破坏, 皮下注射是否有效需要进一步研究探讨。

基金项目: 天津市科委基金 (07JCYBJC10200)

第一作者简介: 男 (1979-), 医师, 医学硕士, 研究方向: 脊柱外科
电话: (022)23523733 E-mail: zhang790707@163.com

1.3 NgR 外端 27-310 个氨基酸的肽[NgR(310)etco]

研究发现脊髓损伤后另外两种抑制轴突再生的蛋白质 MAG 和 Omgp 也是通过与 NgR 特异性结合,从而发挥其抑制轴突生长的作用^[10,11]。因此,尽管 NEP1-40 能够抑制 Nogo-66 与 NgR 结合,但是不能阻断 MAG 和 Omgp 抑制轴突再生的作用。为了找到更有效的方法,Liu 等^[12]发现可溶性 NgR (310)etco 能阻断 Nogo-66、MAG 和 Omgp 对 CNS 神经生长的抑制作用。Li 等^[13]在转染 NgR(310)etco 基因并能够分泌 NgR(310)etco 的小鼠胸椎中段背侧脊髓大部分切断模型中观察到,皮质脊髓束生长明显,虽然进入腰段的皮质脊髓束相对于正常脊髓密度很小,但动物的步态改善明显,接近正常组;远端脊髓中 5-羟色胺能神经元分布几乎达到正常水平,且可能支配了运动功能。作者认为 NgR(310)etco 的效果在功能恢复方面要比 NEP1-40 好。Ji 等^[14]以 T7 背侧半切损伤的大鼠作为动物模型,联合应用 NgR (310)etco 和糖皮质激素治疗急性脊髓损伤,发现二者均可促进大鼠后肢功能的恢复及皮质脊髓束轴突的再生,但是糖皮质激素的作用主要在脊髓损伤 2 周内,而 NgR(310)etco 的作用主要在损伤 2 周后,联合应用较各自单独应用效果更加显著。他认为 NgR(310)etco 和糖皮质激素通过不同的时间和机制促进脊髓损伤的恢复,二者联合应用具有协同作用。

1.4 髓磷脂疫苗

由于脊髓损伤后产生多种抑制神经再生的髓磷脂因子,如 Nogo、MAG、Omgp 等,因此如果能够制备抑制这些因子的疫苗,则可产生免疫效应抗体阻断其抑制神经再生的作用。Huang 等^[15]应用纯化的髓磷脂对脊髓损伤前的大鼠进行免疫注射,发现大鼠脊髓背侧半切损伤的皮质脊髓束纤维中轴突再生长达 11mm,后肢运动功能恢复明显,认为纯化的髓磷脂刺激机体产生的抗体可以通过脊髓损伤后的血脊髓屏障,中和髓磷脂抑制神经再生的作用。为防止髓磷脂中其他抗原可能诱发的自体免疫性疾病,Sicotte 等^[16]应用 Nogo-66 和 MAG 对小鼠进行免疫,结果发现促进了成年小鼠皮质脊髓束中轴突再生和神经出芽。虽然实验研究表明疫苗免疫治疗脊髓损伤有着诱人的前景,但是在应用髓磷脂疫苗时,其安全性及应用剂量还需要进一步深入的研究。

2 细胞内途径

2.1 C3 转移酶(C3 transferase)

Nogo66、MAG 和 Omgp 与其受体复合物结合后如何抑制轴突的再生,其机制是目前研究的热点。1999 年 Kuhn 等^[17]报道了神经再生抑制因子是通过激活细胞内的 RhoA,引起生长锥溃变。后来的实验证明,RhoA 是 Rho 家族(类 Ras 蛋白家族)的成员之一,分子量在 21kDa 左右,有 GTP-RhoA、GDP-RhoA 两种形式,其中 GTP-RhoA 是激活态,可以激活下游的 ROCK(RhoA 相关激酶),进而影响细胞内细胞骨架蛋白的形成和流动,引起生长锥的溃

变。近来的研究^[18]表明,RhoA 不仅能调控生长锥的生长,还与损伤后细胞凋亡有关。

体外实验证明^[19],C3 转移酶能够抑制 GDP-RhoA 向 GTP-RhoA 的转变,减少 RhoA 的激活,促进轴突的再生。Dergham 等^[20]以人纤维蛋白原为载体将 C3 转移酶注射于 T7 背侧半切损伤模型的小鼠,发现皮质脊髓束轴突再生延长达 12mm,部分可以通过损伤区,而对照组轴突萎缩约 300 μ m,同时应用原位杂交的方法证明运动皮质中 GAP-43 表达明显增高,并与神经轴突再生延长呈正相关,表明 C3 转移酶有调节基因表达的作用。应用 C3 转移酶治疗的小鼠,1d 后经过 BBB 评分发现,分数和运动功能恢复明显高于对照组;利用分子生物学技术发现,应用 C3 转移酶后损伤部位凋亡细胞较对照组明显减少,认为 C3 转移酶不仅能促进轴突的再生,还有神经保护、抑制凋亡的作用,从而促进损伤后早期的功能恢复。Dubreuil 等^[18]的实验也证实 C3 转移酶可明显减少脊髓损伤后细胞的凋亡,认为 C3 转移酶可抑制凋亡前蛋白(如 P75)的过度表达,从而抑制凋亡,促进脊髓损伤后的神经功能恢复。Marler 等^[21]的实验研究表明,C3 转移酶还可抑制硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulfate proteoglycan,CSPG)对神经再生的抑制作用。

2.2 Y27632

Y27632 是一种人工合成的 ATP 竞争性抑制物,可抑制 ROCK 的活性,从而促进轴突的再生。Borisoff 等^[19]的体外实验证明,Y27632 可抑制 RhoA 对生长锥的抑制作用,轴突再生增强 5~10 倍,且生长锥内长肌动蛋白明显增多。Chan 等^[22]应用大鼠 C4/5 的脊髓半切损伤模型,将 Y27632 硬膜腔内注射,发现只有大剂量 Y27632 才能促进轴突的再生。

3 前景展望

随着分子生物学技术的飞速发展,对脊髓损伤后神经抑制因子及其作用机制有了更深入的认识。在今后的研究中将神经抑制因子抗体与某种载体结合,使其可以通过外周静脉注射穿过血脊髓屏障,到达损伤区;将神经抑制因子抗体与细胞移植相结合,起到功能互补,互相促进的作用;将神经抑制因子抗体与神经生长营养因子相结合,共同促进神经再生,成为众多研究者的研究热点。虽然目前脊髓损伤的治疗面临许多困难,但是随着基础研究和临床研究的不断深入,终会攻克脊髓损伤这一顽疾。

4 参考文献

1. Chen MS, Huber AB, Vander Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite out-growth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. Nature, 2000, 403(6768): 434-439.
2. Acevedo L, Yu J, Erdjument-Bromage H, et al. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling [J]. Nature

- Medicine, 2004, 10(4):382-388.
3. Brösamle C, Huber AB, Fiedler M, et al. Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment [J]. J Neurosci, 2000, 20(21):8061-8068.
 4. Liebscher T, Schnell L, Schnell D, et al. Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats [J]. Ann Neurol, 2005, 58(5):706-719.
 5. Fouad K, Klusman I, Schwab ME. Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1 [J]. Eur J Neurosci, 2004, 20(9):2479-2482.
 6. Baregre FM, Haudenschield B, Schwab ME, et al. Long-lasting sprouting and gene expression changes induced by the monoclonal antibody IN-1 in the adult spinal cord [J]. Neurosci, 2002, 22(16):7097-7110.
 7. Fournier AE, Gould GC, Liu BP, et al. Truncated soluble Nogo receptor binds Nogo-66 and blocks inhibition of axon growth by myelin [J]. J Neurosci, 2002, 22(20):8876-8883.
 8. GrandPre T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration [J]. Nature, 2002, 417(6888):568-573.
 9. Li S, Strittmatter SM. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury [J]. J Neurosci, 2003, 23(10):4219-4227.
 10. Liu BP, Fournier A, GrandPre T, et al. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor [J]. Science, 2002, 297(5584):1190-1193.
 11. Wang KC, Koprivica V, Kim JA, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth [J]. Nature, 2002, 417(6892):941-944.
 12. Liu BP, Li M, Ji B, et al. Blockade of Nogo-66, Myelin-associated glycoprotein and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury [J]. J Neurosci, 2004, 24(46):10511-10520.
 13. Li S, Kim JE, Budel S, et al. Transgenic inhibition of Nogo-66 receptor function allows axonal sprouting and improved locomotion after spinal injury [J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 29(1):26-39.
 14. Ji B, Li M, Budel S, et al. Effect of combined treatment with methylprednisolone and soluble Nogo-66 receptor after rat spinal cord injury [J]. Eur J Neurosci, 2005, 22(3):587-594.
 15. Huang DW, McKerracher L, Braun PE, et al. A therapeutic vaccine approach to stimulate axon regeneration in the adult mammalian spinal cord [J]. Neuron, 1999, 24(3):639-647.
 16. Sicotte M, Tsatas O, Jeong SY, et al. Immunization with myelin or recombinant Nogo-66/MAG in alum promotes axon regeneration and sprouting after corticospinal tract lesions in the spinal cord [J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 23(2):251-263.
 17. Kuhn TB, Brown MD, Wilcox CL, et al. Myelin and collapsin-1 induce motor neuron growth cone collapse through different pathways: inhibition of collapse by opposing mutants of Rac1 [J]. J Neurosci, 1999, 19(6):1965-1975.
 18. 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.
 19. Borisoff JF, Chan CC, Hiebert GW, et al. Suppression of Rho-kinase activity promotes axonal growth on inhibitory CNS substrates [J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 22(3):405-416.
 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. Marler KJ, Kozma R, Ahmed S, et al. Outgrowth of neurites from NIE-115 neuroblastoma cells is prevented on repulsive substrates through the action of PAK [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(12):5226-5241.
 22. Chan CC, Khodarahmi K, Liu J, et al. Dose-dependent beneficial and detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and functional recovery after rat spinal cord injury [J]. Exp Neurol, 2005, 196(2):352-364.
- (收稿日期:2007-06-13 修回日期:2007-07-10)
(本文编辑 卢庆霞)

消息

中国老年学学会老年脊柱关节疾病专业委员会成立大会暨第一届学术会议征文通知

为适应我国老龄化社会发展,中国老年学学会即将成立老年脊柱关节疾病专业委员会,由我国著名脊柱外科专家党耕町教授担任第一届主任委员。第一届学术会议由北京大学第一医院、北京大学人民医院、北京大学第三医院、北京市垂杨柳医院、北京医院和北京军区总医院共同承办。

征文内容:老年性脊柱、老年性关节疾病、创伤的基础研究、临床经验和功能康复等相关内容。征文要求:500-800字结构式中文摘要(目的、方法、结果和结论)一份,并提交 Word 文本电子版(欢迎通过软盘或 E-mail 发送)。来稿请注明:脊柱、关节、创伤、其他。投稿请寄:北京市海淀区花园路 B3 号南楼,迪蒙大厦 702 室 北京城际阳光会议服务有限公司 刘艳平,沈斌 收,邮编:100083。电子邮件传送征文地址:jason.liu@city-link.net; bella.shen@city-link.net。截稿日期:2008 年 2 月 28 日(以当地邮戳为准),逾期不予受理。会议日期:2008 年 3 月 28 日~30 日;会议地点:中苑宾馆(北京西直门外高粱桥斜街 18 号,北京动物园海洋馆西侧)。