

Lingo-1 及其在脊髓损伤神经再生中作用的研究进展

吴洪福^{1,2}, 侯景义¹, 邓宇斌¹

(1 中山大学中山医学院病理生理学教研室 510089 广州市; 2 广东医学院生理教研室 523808 东莞市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.01.17

中图分类号: R683.2, Q71 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-01-0067-04

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)可导致损伤部位神经元死亡,轴突变性和脱髓鞘等,促进神经轴突再生,再建损伤轴突与其支配靶器官联系,引导脊髓功能恢复对SCI的治疗有着重要意义。有报道证实在中枢神经再生发育中其结构中富含亮氨酸重复单位(leucine-rich repeat, LRR)的蛋白起着关键作用,使得该类蛋白成为研究神经损伤后再生修复的目标之一^[1,2]。Lingo-1 (leucine rich repeat and Ig domain containing 1) 结构中富含亮氨酸重复单位,其在神经系统中的限制性表达、特异调节以及损伤后的诱导性变化,均提示该分子对神经发育、轴突导向以及髓鞘形成发挥重要作用。现就 Lingo-1 及其在 SCI 后神经再生中的作用作一综述。

1 Lingo-1 的结构与分布

Lingo-1 是由 15 号染色体编码含 614 个氨基酸残基的蛋白质。Lingo 蛋白家族成员还有 Lingo-2、Lingo-3 以及 Lingo-4。Lingo-1 是主要的功能分子,其 N 端含有 12 个 LRR 基序, C 端有帽子结构域、Ig 区域、跨膜区以及一个短的胞浆尾。Lingo-1 进化上高度保守,人和小鼠的 Lingo-1 蛋白结构有 99.5% 相同。Mosyak 等^[3]通过分析人类 Lingo-1 配体结合外功能区的晶体结构,发现它是双模块、扭结结构,由亮氨酸富集重复片段(LRR)和 Ig 样的分子组成(图 1)。

Mi 等^[4]首先在脑内神经元上发现了 Lingo-1。她应用 Northern blot 法检测人体主要组织器官,发现 Lingo-1 只在脑和脊髓中表达,而在非神经组织中未检测到其表达;在大鼠脑内, Lingo-1 在皮层表达水平最高,而脊髓中表达水平最低。大鼠脑内 Lingo-1 的表达在出生后 1d 表达水

平达到峰值,此后 4~8d 内逐渐减少。在大鼠脑内, Lingo-1 mRNA 在多巴胺能神经元、视网膜神经节以及小脑颗粒神经元等许多类型的神经元上均有表达,并在少突胶质前体细胞(oligodendrocyte progenitor cells, OPC)中高水平表达,但在星形胶质细胞中未检测到其表达^[5-9]。

2 Lingo-1 的生物学作用

Lingo-1 是中枢神经系统特有的蛋白,只表达于脊髓、脑神经元以及少突胶质细胞上。研究者最初是通过分析 Lingo-1 与 Nogo-66 受体(NgR1)复合物的相互作用而揭示其功能的^[4,9]。有研究证实该信号转导复合体可与轴突生长抑制因子(neurite outgrowth inhibitory A, NogoA)、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)等髓磷脂抑制因子结合并激活 RhoA (Ras homolog gene family, member A),从而抑制神经轴突的生长^[10,11]。NgR1 复合物最初被认为由 NgR1 和 p75 神经营养因子受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)两种成分组成^[12,13]。但当 p75 和 NgR1 在非洲绿猴肾成纤维细胞(COS-7)上共表达时, OMgp 并不能激活小 G 蛋白 RhoA, 提示在 Nogo-66 受体信号传导中还需要神经元上的另外一种重要成分,研究发现这种成分就是 Lingo-1 分子^[4]。Mi 等应用 ELISA 和免疫共沉淀两种方法都证明 Lingo-1 能与 NgR1 和/或 p75 共同参与受体复合物的形成^[4]。Lingo-1 能与其共受体 p75 或孤儿受体 Troy 分别组成 NgR1/p75/ Lingo-1 或 NgR1/Troy/Lingo-1 信号转导复合体而调控神经轴突的再生(图 2)^[14]。髓磷脂抑制因子与 NgR1 信号复合体结合



图 1 Lingo-1 蛋白的结构域

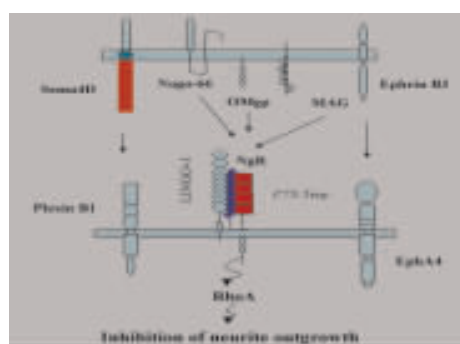


图 2 神经轴突生长的抑制通路

第一作者简介:男(1972-),讲师,在读博士,研究方向:干细胞移植与中枢神经损伤再生

电话:(076)922896328 E-mail:E-mail:hongfuw@126.com

通讯作者:邓宇斌

后,可将抑制信号导入神经元胞内,激活小 G 蛋白 RhoA,使其从无活性的 GDP 抑制形式转变为活化的 GTP 结合 RhoA,后者是一种重要的胞内调节蛋白,可产生一系列反应,最终抑制神经轴突生长。Lingo-1 是 NgR1 信号复合体发挥作用的重要功能组分,其胞质区第 591 位氨基酸残基的磷酸化是 NgR1 信号复合体发挥活性的必要基础。因此,Lingo-1 分子是 NgR1 信号复合体的必要成分并参与神经轴突再生负调节,其在髓磷脂抑制因子阻滞轴突再生的信号通路中起着重要作用。

除了神经元,Lingo-1 同样表达在少突胶质细胞系的细胞上。利用四种方法可抑制 OPC 上内源性 Lingo-1 的功能:Lingo-1 RNAi、显性负突变 Lingo-1、Lingo-Fc 或者 Lingo-1 敲除均可引起少突胶质细胞形态学变化,即有更多高度分化的成熟的特点,如延伸长度增加以及多层的髓鞘结构,这些变化常伴有细胞成熟的生化标记,如少突细胞分化标志物髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)的表达增强,以及参与少突胶质细胞分化的信号通路 Fyn 磷酸化增加等,但全长 Lingo-1 (FL-Lingo-1)过表达则具有相反的效应^[8,15,16]。Lingo-1 基因敲除动物的少突胶质细胞培养时与其野生型相比其少突胶质细胞分化更迅速,而且其髓鞘形成要更早于后者^[15]。这些发现提示阻断内源性 Lingo-1 能逆转 Lingo-1 分子的抑制作用,从而促进少突胶质细胞分化。

Lingo-1 拮抗剂对少突胶质细胞的效应提示它们可能有助于中枢神经系统髓鞘形成,这首先在少突胶质细胞/神经元的共培养中得到验证。Lee 等^[8]将大鼠的原代少突胶质细胞与背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元共培养,培养基中含 50ng/ml 神经生长因子(NGF),可观察到有极少的髓鞘形成,与此相对,在含有 NGF 的培养基中加入 Lingo-1-Fc 或 DN-Lingo-1 或抗 Lingo-1 抗体,则髓鞘形成水平呈剂量依赖性显著增加,并与髓鞘蛋白的主要成分 MAG 和 MBP 表达增加相关联。其他的髓鞘成分,如髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)、OMGp 以及环核苷酸-3' 磷酸水解酶随 Lingo-1 拮抗同样表达水平上调。用 FL-Lingo-1 处理则降低髓鞘形成过程中表达 MBP 的细胞^[15]。这些研究进一步表明内源性 Lingo-1 抑制髓鞘形成,而拮抗 Lingo-1 则可逆转这种抑制。另外研究者还观察到 Lingo-1 敲除小鼠与其野生型同窝出生者相比其中枢神经组织的有髓轴突纤维数目增加^[17]。相反,Lingo-1 的过表达则延缓转基因小鼠髓鞘的形成^[8]。但在 Lingo-1 基因敲除小鼠中并未检测到其对周围神经系统髓鞘形成的影响。以上结果均提示 Lingo-1 可能对中枢神经系统少突胶质细胞分化和髓鞘形成具有负性调节作用。

3 Lingo-1 对 SCI 后神经再生的作用

研究发现,SCI 后髓鞘和胶质瘢痕释放的髓磷脂抑制因子是抑制神经再生的主要因子^[18-20]。目前发现的髓磷脂

相关抑制因子主要包括 MAG、OMGp 以及 Nogo-66 等。这些因子通过抑制轴突再生和生长,使得轴突再生或芽生的距离有限,难以穿越损伤部位与残存或未受损的神经形成功能性突触,造成 SCI 后的神经再生修复障碍。Mi 等^[4]发现大鼠 SCI 14d 后 Lingo-1 mRNA 的表达增加约 5 倍,此外在 SCI 后大鼠的脊髓轴索以及多发性硬化(multiple sclerosis, MS)的白质病变中 Lingo-1 表达上调。Lingo-1 分子在髓磷脂抑制因子阻滞轴突再生的信号通路中起着重要作用,因此,Lingo-1 的发现为改善 SCI 后的局部抑制环境,促进轴突再生提供了新的途径,即通过抑制 Lingo-1 表达,阻滞 NgR1/p75/ Lingo-1 及其下游信号的传导而促进轴突生长。为了更好地研究 Lingo-1 在体内的生理作用,具有拮抗 Lingo-1 功能的试剂相继被开发出来。Lingo-1-Fc 是人 Lingo-1 的 N 端与 IgG 的融合蛋白,在体外实验中它能抑制内源性 Lingo-1 功能并促进轴突生长^[4]。Mi 等^[4]研究发现,在体外进行少突胶质细胞和神经元共培养时加入可溶性 Lingo-1-Fc 使 Lingo-1 功能失活后,可促进培养环境中的轴突生长、髓鞘形成,而 Lingo-1 过表达则抑制少突胶质细胞分化和髓鞘形成。Ji 等^[21]利用脊髓背根半横断损伤大鼠模型对 Lingo-1-Fc 促进轴突再生的能力进行了检测,在对大鼠进行脊髓背外侧半横断后持续鞘内输注可溶性 Lingo-1-Fc 4 周后,60%的受处理动物 BBB 评分均在 14 以上,为确定 Lingo-1-Fc 处理是否促进轴突再生,他还在损伤动物模型的感觉-运动皮层注射生物素葡聚糖胺(biotin dextran amine, BDA)示踪皮质脊髓束轴突,以标记再生的轴突,结果发现经 Lingo-1-Fc 处理的大鼠与对照组相比有更多的 BDA 标记的轴突,用 Lingo-1-Fc 处理的 SCI 大鼠其轴突退缩现象减少大约 62%,并且这种现象与 RhoA 的激活减少直接相关。说明用 Lingo-1-Fc 处理能改善 SCI 模型后肢功能,与之直接相关的是增进轴突再生,减少轴突退缩,减少 RhoA 激活。Lv 等^[22]用高滴度兔源性 Lingo-1 抗血清鞘内注射治疗 SCI 动物模型,他们发现利用 Lingo-1 抗血清被动免疫能显著降低 RhoA 的活性,并能促进成年大鼠后肢运动功能一定程度的恢复。吕俊等^[23]在大鼠 SCI 局部给予 Lingo-1 多克隆抗体治疗,大鼠半横断损伤后立刻通过微量渗透泵局部给予 Lingo-1 多克隆抗体,而对照组仅给予兔源性 IgG, Lingo-1 多克隆抗体组大鼠术后 3d 和 28d 均可检测出兔源性抗体;术后 3d 对照组 Lingo-1 染色强度明显强于 Lingo-1 多克隆抗体处理组。提示局部给予的 Lingo-1 多克隆抗体在较宽的时间窗里均可进入 SCI 区并特异性识别 Lingo-1 分子。这在一定程度证明被动免疫治疗 SCI 是可行的。

拮抗 Lingo-1 对神经元的促进存活效应首先是在与帕金森氏病(parkinson's disease, PD)有关的中脑多巴胺(dopamine, DA)神经元中发现的。在体外利用显性失活 DN-Lingo-1、可溶性 Lingo-1 或 Lingo-1 抗体等阻断 Lingo-1 功能可增加 DA 神经元轴突长度,并可使其在 MPP+神经毒性的环境中继续存活。用 6-羟基多巴胺(6-

hydroxydopamine, 6-OHDA) 诱导细胞变性的动物模型体内同样可观察到拮抗 Lingo-1 对 DA 神经元存活和轴突生长的促进作用。Inoue 等^[24]发现在 6-OHDA 诱导的动物模型敲除 Lingo-1 基因后可观察到 DA 神经元存活增多以及运动不对称现象减少等。Fu 等^[25]报道阻断 Lingo-1 功能促进眼高压后大鼠慢性青光眼模型受损视网膜神经节细胞存活。Zhao 等^[26]发现在体外利用 Lingo-1-Fc 阻断 Lingo-1 同样能促进小脑神经节存活。

在 SCI 研究中, Ji 等^[24]利用脊髓背根半横断损伤大鼠模型就 Lingo-1-Fc 对损伤部位神经元的效应进行了检测, 发现 Lingo-1-Fc 处理的脊髓损伤大鼠与对照组相比, 在其脊髓损伤部位明显观察到更多的存活神经元和少突胶质细胞, 提示利用 Lingo-1-Fc 拮抗 Lingo-1 分子能增加与损伤部位相邻的神经元和少突胶质细胞的存活。Lv 等^[22]的研究也证实高滴度兔源性 Lingo-1 抗血清鞘内注射治疗脊髓损伤动物模型, 能增加动物脊髓损伤区附近神经元的存活。这些证据表明拮抗 Lingo-1 有利于 SCI 后损伤局部神经元的存活。

Lingo-1 影响中枢神经元存活的机制得到阐释。在帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 动物模型中, 观察到 Lingo-1 的上调与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 蛋白水平的降低相关^[24]。用表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 处理能保护 PD 动物模型的多巴胺能 (Dopaminergic, DA) 神经元, 而 EGFR 的细胞内信号传导受 PI3-K 通路的调节^[24, 27, 28], 后者能增加 Akt 的磷酸化和激活^[24]。已有报道生长因子激活的磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3-K)/Akt 信号传导通路能增加神经元的存活和轴突再生。与 Lingo-1 和 EGFR 信号传导之间的功能联系相一致的是, 阻断 Lingo-1 功能可增加 DA 神经元上 EGFR 和 p-Akt 的水平, 这也与它保护 DA 神经元免遭损伤诱导的细胞损害的作用相一致^[24]。在青光眼动物模型, Lingo-1 的抑制可导致视网膜神经节细胞继续生存以及 Akt 磷酸化水平的上调^[25]。其他有关 Lingo-1 影响神经元存活的机制包括 Lingo-1 抑制与 p75NTR^[29]或 RhoA^[30]相关的细胞死亡途径的能力。但目前在脊髓损伤中 Lingo-1 影响神经元存活的机制尚不清楚, 还有待深入研究。

4 展望

SCI 后神经的再生和修复涉及多种机制。目前主要是应用神经营养因子和生长因子如脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophin factor, BDNF)、NGF、睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor, CNTF)、血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) 等促进神经再生修复, 但其效果不甚理想^[31]。鉴定与神经再生抑制相关的因子并阻断它们的功能以促进脊髓神经再生是一种极具潜力的新策略。其中 Lingo-1 是一个特别引人注目的目标, 因为它对轴突再生、神经元

再生以及少突胶质细胞分化和髓鞘再生都能进行有效的负调控。鉴于 SCI 的特殊性, 如何实现在体内有效拮抗 Lingo-1 从而促进神经再生亟待研究。目前较常应用的 Lingo-1-Fc 拮抗 Lingo-1 分子的处理仍然存在需微泵持续注射, 损伤大, 且抗体大分子不易渗透进入组织进而影响其对目标细胞的作用等问题, 而利用组织工程生物支架如水凝胶等输送抗体或能导致 Lingo-1 基因沉默的小分子药物可能是未来拮抗 Lingo-1 促进脊髓神经再生的更可行方法。对 Lingo-1 的拮抗及其相关机制的深入研究有可能为 SCI 的修复和治疗提供新的途径。

5 参考文献

1. Kuja Panula J, Kiiltomaki M, Yamashiro T, et al. AMIGO a transmembrane protein implicated in axon tract development; defines a novel protein family with leucine-rich repeats [J]. J Cell Biol, 2003, 160(6): 963-973.
2. Chen Y, Aulia S, Li L, et al. AMIGO and friends: an emerging family of brain-enriched, neuronal growth modulating, type I transmembrane proteins with leucine-rich repeats (LRR) and cell adhesion molecule motifs [J]. Brain Res Rev, 2006, 51(2): 265-274.
3. Mosyak L, Wood A, Dwyer B, et al. The structure of the Lingo-1 ectodomain, a module implicated in central nervous system repair inhibition [J]. J Biol Chem, 2006, 281(47): 36378-36390.
4. Mi S, Lee XH, Shao ZH, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex [J]. Nat Neuroscience, 2004, 7(3): 221-228.
5. Carim Todd L, Escarceller M, Estivill X, et al. LRRN6A/LERN1 (leucinerichrepeat neuronal protein 1), a novel gene with enriched expression in limbic system and neocortex [J]. Eur J Neurosci, 2003, 18(12): 3167-3182.
6. Okafuji T, Tanaka H. Expression pattern of Lingo-1 in the developing nervous system of the chick embryo [J]. Gene Expr Patterns, 2005, 6(1): 57-62.
7. Barrette B, Vallieres N, Dube M, et al. Expression profile of receptors for myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the intact and injured mouse central nervous system [J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 34(4): 519-538.
8. Lee X, Yang Z, Shao Z, et al. NGF regulates the expression of axonal Lingo-1 to inhibit oligodendrocyte differentiation and myelination [J]. J Neurosci, 2007, 27(1): 220-225.
9. Lorens F, Gil V, Iraola S, et al. Developmental analysis of Lingo-1/Lern1 protein expression in the mouse brain; interaction of its intracellular domain with Myt1l [J]. Dev Neurobiol, 2008, 68(4): 521-541.
10. Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS [J]. Nat Rev, 2003, 4(9): 703-713.
11. McGee AW, Strittmatter SM. The Nogo-66 receptor: focusing myelin inhibition of axon regeneration [J]. Trends Neurosci,

- 2003, 26(4): 193-198.
12. Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. Nature, 2001, 409: 341-346.
13. Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, et al. P75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp [J]. Nature, 2002, 420: 74-78.
14. Mi S, Troy/Taj and its role in CNS axon regeneration [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2008, 19(3-4): 245-251.
15. Mi S, Miller RH, Lee X, et al. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes [J]. Nat Neurosci, 2005, 8(6): 745-751.
16. Zhao XH, Jin WL, Ju G. An in vitro study on the involvement of Lingo-1 and Rho GTPases in Nogo-A regulated differentiation of oligodendrocyte precursor cells [J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 36(2): 260-269.
17. Shao Z, Browning JL, Lee X, et al. TAJ/ TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor 1 and regulates axonal regeneration [J]. Neuron, 2005, 45(3): 353-359.
18. Liu BP, Fournier A, GrandPre T, et al. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor [J]. Science, 2002, 297: 1190-1193.
19. Wang KC, Koprivica V, Kim JA, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth [J]. Nature, 2002, 417: 941-944.
20. Mi S, Sandrock A, Miller RH, et al. LINGO-1 and its role in CNS repair [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(10): 1971-1978.
21. Ji B, Li M, Wu WT, et al. Lingo-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury [J]. Mol Cell Neurosci, 2006, 33(3): 311-320.
22. Lv J, Xu RX, Jiang XD, et al. Passive immunization with LINGO-1 polyclonal antiserum afforded neuroprotection and promoted functional recovery in a rat model of spinal cord injury [J]. Neuroimmunomodulation, 2010, 17(4): 270-278.
23. 吕俊, 徐如祥, 法志强, 等. Lingo-1 多克隆抗体对大鼠脊髓损伤模型干预的可行性分析 [J]. 中华神经医学杂志, 2009, 8(5): 476-478, 483.
24. Inoue H, Lin L, Lee X, et al. Inhibition of the leucine-rich repeat protein Lingo-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(36): 14430-14435.
25. Fu QL, Hu B, Wu WT, et al. Blocking Lingo-1 function promotes retinal ganglion cell survival following ocular hypertension and optic nerve transection [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(3): 975-986.
26. Zhao XH, Jin WL, Wu J, et al. Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta and up-regulation of Lingo-1 are involved in Lingo-1 antagonist regulated survival of cerebellar granular neurons [J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(5): 727-735.
27. Iwakura Y, Piao YS, Mizuno M, et al. Influences of dopaminergic lesion on epidermal growth factor-ErbB signals in Parkinson's disease and its model: neurotrophic implication in nigrostriatal neurons [J]. J Neurochem, 2005, 93(4): 974-983.
28. Wang X, McCullough KD, Franke TF, et al. Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 14624-14631.
29. Wang X, Bauer JH, Li Y, et al. Characterization of a p75 (NTR) apoptotic signaling pathway using a novel cellular model [J]. J Biol Chem, 2001, 276(19): 33812-33820.
30. 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.
31. Zhang L, Zhang HT, Hong SQ, et al. Cofrafted Wharton's jelly cells-derived neurospheres and BDNF promote functional recovery after rat spinal cord transection [J]. Neurochem Res, 2009, 34(11): 2030-2039.

(收稿日期: 2010-07-22 修回日期: 2010-11-10)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

欢迎订阅《中国脊柱脊髓杂志》2010 年合订本

《中国脊柱脊髓杂志》2010 年合订本为精装本(上、下册), 定价为 110 元/册, 全年共 220 元; 另外还有 2006~2010 年合订本, 均为精装本(上、下册), 2006 年定价 180 元/套, 2007~2009 年定价 200 元/套。有需要者请与本刊经理部联系。

联系地址: 北京市朝阳区中日友好医院内《中国脊柱脊髓杂志》经理部, 邮编: 100029。联系电话: (010) 64206649, 64284923。E-mail 地址: cspine@263.net.cn。

汇款时请在汇款单上注明所需物品及数量。