

Eph家族及其在脊髓损伤中作用的研究进展

张玉强¹, 吕刚²

(1 中国医科大学附属一院骨科 110001 辽宁省沈阳市; 2 辽宁医学院附属第一医院骨科 121000 辽宁省锦州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.05.15

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-05-0419-04

Eph家族(Eph受体和ephrin配体)是最大的受体酪氨酸蛋白激酶亚族,在胚胎期具有调节细胞粘连或排斥、细胞迁移、轴突导向、突触形成、骨稳态调节、血管形成等多种作用。近年来的研究发现,Eph家族蛋白在脊髓损伤后表达升高,可能参与神经再生活动^[1]。有学者认为其可作为脊髓损伤治疗的靶点^[2]。笔者就Eph家族及其在脊髓损伤中作用的研究进展综述如下。

1 Eph家族的结构和功能

Eph家族成员众多,目前已经发现16个Eph受体和9个ephrin配体^[3,4]。根据其序列同源性和相互间的亲和力,Eph家族蛋白分为A、B两个亚族,Eph受体包括10个EphA受体(EphA1-EphA10)和6个EphB受体(EphB1-EphB6),ephrin配体包括6个ephrinA配体(ephrinA1-ephrinA6)和3个ephrinB配体(ephrinB1-ephrinB3)。Eph受体属于跨膜蛋白,具有胞外区、跨膜结构域和胞内区,胞外区有配体结合域、一个富含半胱氨酸的结构和两个纤维连接蛋白重复序列,胞内区有两个酪氨酸残基的近膜区、经典蛋白酪氨酸激酶结构域、不育 α 基序(SAM)结构域以及盘状同源区域(PDZ)结合模序。ephrin配体具有一个保守的胞外受体结合域,结合相应的Eph受体。其中ephrinA不具有跨膜结构域,通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜上,ephrinB是跨膜蛋白,胞内区的酪氨酸残基可发生磷酸化,C端含有的PDZ序列可结合蛋白引起信号传导。通常,EphA结合ephrinA配体,EphB结合ephrinB配体;但也有例外,EphA4除与ephrinA结合外还可结合多个ephrinB;ephrinA5除结合EphA外还可结合EphB2。Eph家族的一个重要特征是引起双向信号,即经典的经Eph受体酪氨酸激酶途径和反向的Eph作为配体经ephrin进行信号转导的途径^[3,4]。

Eph家族具有多种生物学功能,但在神经系统作用的研究最为广泛。Eph参与神经系统发育过程中轴突导向、后脑分节、神经嵴细胞的迁移^[5]。Eph是影响突触后神经结构的重要细胞内信号分子^[6,7]。EphA高度表达于大脑,尤其是海马;EphA4表达于突触后的树突棘,ephrinA3主

要位于突触周围的星形胶质细胞突起^[8]。EphA4受体活化诱导了树突棘的退缩和收缩,减少树突棘密度^[7,8]。突触前的ephrinB通过突触后的EphB受体前向信号活化促进突触形成^[9,10]。ephrinB3缺失小鼠表现为海马CA1区突触功能异常,表明ephrinB3反向信号参与调节突触形成^[11,12]。Nestor等^[13]研究发现外源性ephrinA在数分钟内可诱导大鼠海马薄层培养体系内源于星形胶质细胞的丝足突起向外生长。内源性ephrinA的释放也能产生相同作用。内源性和外源性ephrin并不能诱导转染EphA受体的星形胶质细胞突起向外生长,表明EphA对神经胶质的重要性。Kozulin等^[14]在恒河猴视网膜发育期的研究中发现抑制EphA6与配体ephrinA1和A4信号转导引起表达ephrinA1和A4的星形胶质细胞沿EphA6表达梯度迁移速度减慢。他们认为EphA6受体与ephrinA1和A4配体抑制信号在视网膜血管形成和出生后黄斑与神经节细胞中央凹投射的维持方面有重要作用。Ho等^[15]研究发现EphB2阻碍前联合的轴突投射进入腹侧前脑,EphA4限制轴突进入前联合前支。EphA4缺失小鼠表现为中线导向错误,导致前联合的外侧和腹侧移位。Kadison等^[16]研究发现ephrinB3或多种EphB受体缺失小鼠腹侧中线附近有大量轴突通过,交叉横断联合轴突继续向底板(FP)对侧的横断面投射,表现为更高频率的ephrinB2和EphB突变;在ephrinB3突变小鼠脊髓中并未观察到正中中线投射错误和大量的交叉横断联合轴突,ephrinB3突变小鼠只表达一个传递前向信号的短截形式ephrinB3;相反在EphB和ephrinB3突变的胚胎可观察到中线投射缺失,在ephrinB1或ephrinB2缺失小鼠能够观察到野生型对侧投射。

此外,Eph家族在血管发生和肿瘤形成方面也发挥重要作用,表达于动脉的ephrinB2和静脉内皮细胞上的EphB4调节胚胎血管发生和动静脉分化;成熟期ephrinB2和EphA2参与新生血管形成和肿瘤的血管发生^[2]。多种Eph家族成员表达于乳腺癌、肺癌、前列腺癌、神经瘤、淋巴瘤,其表达水平与肿瘤的恶性程度相关^[17]。研究认为Eph/ephrin通过调节细胞粘附和增加新生血管形成促进肿瘤转移^[18,19]。

2 Eph家族在损伤脊髓中的表达及作用

2.1 EphA-ephrinA

发育期 EphA 受体与 ephrinA1-A5 配体的相互作用调节轴突导向,成熟期 ephrin 活化引起的反向信号促进轴突粘附或排斥。研究发现脊髓损伤后 ephrinA 配体和 EphA 受体的表达升高。Arocho 等^[20]研究发现脊髓损伤后 ephrinA 配体升高与它们同源性 EphA 受体升高有关。大鼠脊髓挫伤后 7d 的免疫组化显示 ephrinA1 配体与胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经元核抗原(NeuN)都表达于脊髓组织,双染色结果显示 ephrinA1 配体表达于反应性的星形胶质细胞和运动神经元,Western Blot 检测进一步证实 ephrinA1 蛋白的表达增加。国内学者^[21]研究发现脊髓损伤后 EphA2 表达升高,主要表达于脊髓前角运动神经元,他们认为 EphA2 可能通过前向信号引起细胞其他信号转导的变化直接保护了脊髓神经细胞,也可能参与调节神经细胞的凋亡、增生、转化,直接或间接保护神经;活化的 EphA2 与脊髓损伤后增高的 VEGF 协同作用促进血管新生及微血管改型,增加了脊髓的局部血液循环,间接保护神经细胞。因此,他们认为 EphA2 表达升高是脊髓损伤的一个保护性因素。

EphA3 分子在正常脊髓表达较低,视神经和脑损伤后表达增加^[22,23]。Irizarry-Ramírez 等^[24]在脊髓挫伤模型中发现 EphA3 的 mRNA 水平呈时间依赖性,伤后 2d 开始升高,持续到伤后 28d;双染色发现 EphA3 表达于正常脊髓腹侧角运动神经元,损伤脊髓腹侧区白质的神经胶质细胞,ephA1、ephA2、ephA3 在腹侧束和腹外侧束的表达显著增加;结果表明 EphA3 引发的前向信号有助于轴突再生抑制环境形成,参与脊髓损伤的病理生理过程。Willson 等^[25]研究发现脊髓损伤后 EphA3、A4、A7 的 mRNA 增加,免疫组化显示 EphA3、A4、A6、A8 表达于腹侧白质,在正常脊髓和损伤脊髓中都是 EphA7 表达最高;EphA 受体主要表达于白质的星形胶质细胞和少突胶质细胞,而 EphA7 表达于腹侧灰质运动神经元和背侧神经元;结果证实损伤脊髓中 EphAs 受体表达的增加抑制了轴突再生和功能重建,EphAs 表达升高表明它们通过前向信号对再生轴突产生抑制作用。

EphA4 在脊髓损伤中的研究最广泛和深入,但其作用尚有争议。EphA4 表达于损伤脊髓的星形胶质细胞和神经元,早期研究认为 EphA4 有助于细胞间的相互作用,参与调节神经胶质纤维瘢痕形成。Herrmann 等^[26]通过 β -半乳糖苷酶分析发现 EphA4 主要表达于脊髓的星形胶质细胞、大脑皮层神经元和脊髓神经元,与正常组脊髓相比,损伤脊髓组织中并未观察到 GFAP 表达的明显降低,阻断 EphA4 表达未见明显的纤维瘢痕形成减少。他们认为 EphA4 基因缺失不影响星形胶质反应和神经胶质瘢痕形成。Cruz-Orengo 等^[27]的研究发现损伤早期 EphA4 表达降低,伤后 7d 升高,反义寡核苷酸阻断 EphA4 的表达不能产生相应的解剖或生理反应,推测脊髓损伤后 EphA4 表达的增加与轴突再生和神经传导功能恢复无关。脊髓损伤后皮质脊髓束轴突表达 EphA4,周围的星形胶质细胞表达

ephA2,表明 ephA2 可能通过反向信号通路抑制损伤轴突再生^[28]。与野生型相比,EphA4-/-纯合子小鼠的脊髓横断后有大量轴突通过损伤部位,动物的功能恢复较好;EphA4-/-轴突对 ephA2 抑制生长信号的反应降低,野生型小鼠损伤脊髓中 EphA4 表达升高,再生轴突表达 ephA3,再生轴突上 ephA3 的反向信号抵消 EphA4 介导的抑制作用^[29]。

脊髓损伤后功能缺失的部分原因是由于神经细胞死亡,神经功能的进一步丧失是由于少突胶质细胞的凋亡引起。研究表明 Eph-ephA 信号参与胚胎发育期细胞的凋亡,ephA 与 EphA2 的相互作用抑制凋亡^[30];敲除室下区的 ephA3 引起细胞死亡增加,EphA4 缺失出现大量神经母细胞^[31]。有研究发现 EphA7 参与大脑发育过程中凋亡调节^[32]。Figuerola 等^[33]应用定量逆转录聚合酶链式反应(QRT-PCR)分析显示,脊髓损伤后 7d EphA7 mRNA 增加,免疫组化结果显示 EphA7 主要表达于损伤脊髓白质星形胶质细胞,而正常脊髓组织中 EphA7 主要表达于腹侧灰质运动神经元;应用反义寡核苷酸阻断大鼠脊髓组织 EphA7 的表达,脊髓凋亡细胞密度显著减少。

2.2 EphB-ephA

EphB 亚族成员较 EphA 亚族少,但其功能非常重要,在神经发育过程中 EphB-ephA 引起的双向信号参与调节神经嵴细胞的迁移、后脑分节运动、神经母细胞迁移和增殖、原胚形成中的形态发生、大脑镰形成、内耳轴突导向、视网膜神经节细胞轴突导向、海马轴突束等^[34]。体内研究证实 EphB-ephA 信号在小鼠脊髓突触可塑性方面发挥重要作用^[35]。小鼠脊髓中线 ephA3 可阻止表达 EphA4 轴突从脊髓联合部向对侧生长,同时协调 EphA4 信号传导^[36]。有研究^[37,38]证实,EphB 受体和 ephA 配体在损伤脊髓中表达升高,参与轴突再生和神经传导功能的调节。Miranda 等^[37]研究发现大鼠脊髓损伤后 7d 白质中 EphB3 mRNA 显著升高,腹侧角灰质和中间带 EphB3 mRNA 表达也升高,免疫组化结果与分子生物学检测结果一致,免疫组化和双染色显示 EphB3 表达于脊髓白质星形胶质细胞和灰质运动神经元。Willson 等^[38]的研究也证实在大鼠损伤脊髓组织中 EphB3 mRNA 和蛋白表达显著升高,EphB3 表达于神经胶质细胞,而在脑神经核的表达无明显变化。EphB3 的增加有助于轴突再生抑制环境的形成。

Bundesen 等^[39]的研究发现,胸段脊髓横断伤后 ephA2 和 EphB2 蛋白水平在伤后第 1 天就开始升高,伤后第 14 天明显增加,免疫组织化学结果显示 ephA2 表达于反应性星形胶质细胞,EphB2 表达于从邻近脑膜浸润的成纤维细胞;伤后第 3 天,星形胶质细胞和成纤维细胞与 ephA2 和 EphB2 的双向激活同时发生,伤后第 7 天,两种细胞之间建立起含有密集细胞网络和交织突起的限制性结构域,第 14 天时,形成完整的星形胶质细胞-脑膜成纤维细胞瘢痕,将星形胶质细胞和脑膜成纤维细胞彼此

分离;形态学改变的同时, ephrinB2 和 EphB2 活性降低。他们认为细胞接触介导的双向信号发生在细胞级联反应早期, 引起神经胶质瘢痕的形成和脑膜成纤维细胞的清除, 脊髓损伤后 EphB2 和 ephrinB2 表达升高引起的双向信号促进胶质瘢痕形成, 不利于轴突再生。

EphB1 受体和 ephrinB1 配体引起的前向信号和反向信号在中枢神经系统发育过程中起重要作用, 在脑损伤和视神经损伤后表达增加, 在脊髓损伤中的研究较少。Song 等^[40]在研究 EphB-ephrinB 信号与坐骨神经损伤和背侧神经根切断术造成的慢性缩窄性损伤的相互关系时发现, ephrinB1 和 EphB1 在背侧神经节和脊髓的表达明显升高, 并呈时间依赖性;组织学检测发现 ephrinB1 配体和 EphB1 受体主要表达于中、小背根神经节中的神经元, 脊髓背侧角浅层神经元。他们认为背侧脊神经根切断术可激活背根神经节和脊髓背侧神经元上的 ephrinB1 配体和 EphB1 受体表达。

3 展望

Eph 受体和配体 ephrin 在脊髓损伤后表达增加可能引起神经元轴突再生失败, 因而有学者认为抑制 Eph-ephrin 的药物可用于治疗脊髓损伤。Song 等^[40]应用分子生物学和多种生物物理学方法探明 ephrinB2 胞浆域结构, 可阻断反向信号的酪氨酸磷酸化。通过小分子准确抑制 Eph-ephrin 结合界面增强了中枢神经系统再生, 有助于神经功能的恢复。但 Eph 家族在脊髓损伤中的研究尚属起始阶段, 部分 Eph 家族成员尚未发现是否表达, Eph 作用尚不完全清楚, 多个 Eph 同时表达的作用是否一致也不明确。因此, 通过研究 Eph 家族在脊髓损伤中的作用可进一步加深对其功能的理解, 为脊髓损伤的分子治疗提供新靶点。

4 参考文献

- Goldshmit Y, McLenachan S, Turnley A. Roles of Eph receptors and ephrins in the normal and damaged adult CNS [J]. Brain Res Rev, 2006, 52(2): 327-345.
- Du J, Fu C, Sretavan DW. Eph/ephrin signaling as a potential therapeutic target after central nervous system injury [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(24): 2507-2518.
- Aoto J, Chen L. Bidirectional ephrin/Eph signaling in synaptic functions [J]. Brain Res, 2007, 1184: 72-80.
- Klein R. Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling [J]. Nat Neurosci, 2009, 12(1): 15-20.
- Wilkinson DG. Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development [J]. Nat Rev Neurosci, 2001, 2(3): 155-164.
- Murai KK, Pasquale EB. Eph ective signaling: forward, reverse and crosstalk [J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 14): 2823-2832.
- Nishida H, Okabe S. Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines [J]. J Neurosci, 2007, 27(2): 331-340.
- Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Togawa A, et al. Synaptic activity prompts gamma-secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation [J]. J Cell Biol, 2009, 185(3): 551-564.
- Moeller ML, Shi Y, Reichardt LF, et al. EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation [J]. J Biol Chem, 2006, 281(3): 1587-1598.
- Tremblay ME, Riad M, Bouvier D, et al. Localization of EphA4 in axon terminals and dendritic spines of adult rat hippocampus [J]. J Comp Neurol, 2007, 501(5): 691-702.
- Aoto J, Ting P, Maghsoodi B, et al. Postsynaptic ephrinB3 promotes shaft glutamatergic synapse formation [J]. J Neurosci, 2007, 27(28): 7508-7519.
- Rodenas-Ruano A, Perez-Pinzon MA, Green EJ, et al. Distinct roles for ephrinB3 in the formation and function of hippocampal synapses [J]. Dev Biol, 2006, 292(1): 34-45.
- Nestor MW, Mok LP, Tulapurkar ME, et al. Plasticity of neuron-glial interactions mediated by astrocytic EphARs [J]. J Neurosci, 2007, 27(47): 12817-12828.
- Kozulin P, Natoli R, Madigan MC, et al. Gradients of Eph-A6 expression in primate retina suggest roles in both vascular and axon guidance [J]. Mol Vis, 2009, 15: 2649-2662.
- Ho SK, Kovacevic N, Henkelman RM, et al. EphB2 and EphA4 receptors regulate formation of the principal inter-hemispheric tracts of the mammalian forebrain [J]. Neuroscience, 2009, 160(4): 784-795.
- Kadison SR, Mäkinen T, Klein R, et al. EphB receptors and ephrin-B3 regulate axon guidance at the ventral midline of the embryonic mouse spinal cord [J]. J Neurosci, 2006, 26(35): 8909-8914.
- Surawska H, Ma PC, Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(6): 419-433.
- Sugimura H, Wang JD, Mori H, et al. Eph/ephrin in human gastrointestinal cancers [J]. World J Gastrointest Oncol, 2010, 2(12): 421-428.
- Scarberry KE, Mezencev R, McDonald JF. Targeted removal of migratory tumor cells by functionalized magnetic nanoparticles impedes metastasis and tumor progression [J]. Nanomedicine (Lond), 2011, 6(1): 69-78.
- Arocho LC, Torrado AI, Miranda JD. Expression profile of inhibitory molecules resulting from spinal cord injury [C]. Proceedings of the Beijing Joint Conference of Physiological Sciences. 2008. 138.
- 裴有智, 康学文, 汪玉良. 大鼠慢性压迫性脊髓损伤后 EphA2 在脊髓前角运动神经元中的表达 [J]. 兰州大学学报, 2008, 35(3): 35-38.
- King C, Lacey R, Rodger J, et al. Characterisation of tectal ephrin-A2 expression during optic nerve regeneration in goldfish: implications for restoration of topography [J]. Exp

- Neurol, 2004, 187(2):380-387.
23. King CE, Wallace A, Rodger J, et al. Transient up-regulation of retinal EphA3 and EphA5, but not ephrin-A2, coincides with reestablishment of a topographic map during optic nerve regeneration in goldfish [J]. *Exp Neurol*, 2003, 183 (2):593-599.
 24. Irizarry-Ramirez M, Willson CA, Cruz-Orengo L, et al. Upregulation of EphA3 receptor after spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(8):929-935.
 25. Willson CA, Irizarry-Ramirez M, Gaskins HE, et al. Upregulation of EphA receptor expression in the injured adult rat spinal cord [J]. *Cell Transplant*, 2002, 11(3):229-239.
 26. Herrmann JE, Shah RR, Chan AF, et al. EphA4 deficient mice maintain astroglial-fibrotic scar formation after spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2010, 223(2):582-598.
 27. Cruz-Orengo L, Figueroa JD, Torrado A, et al. Reduction of EphA4 receptor expression after spinal cord injury does not induce axonal regeneration or return of teMMEP response [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 418(1):49-54.
 28. Fabes J, Anderson P, Yanez-Munoz RJ, et al. Accumulation of the inhibitory receptor EphA4 may prevent regeneration of corticospinal tract axons following lesion [J]. *Eur J Neurosci*, 2006, 23(7):1721-1730.
 29. Goldshmit Y, Galea MP, Wise G, et al. Axonal regeneration and lack of astrocytic gliosis in EphA4-deficient mice [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(45):10064-10073.
 30. Holen HL, Shadidi M, Narvhus K, et al. Signaling through ephrin-A ligand leads to activation of Src-family kinases, Akt phosphorylation, and inhibition of antigen receptor-induced apoptosis [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(4):1183-1191.
 21. Furne C, Ricard J, Cabrera JR, et al. EphrinB3 is an anti-apoptotic ligand that inhibits the dependence receptor functions of EphA4 receptors during adult neurogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(2):231-238.
 32. Depaape V, Suarez-Gonzalez N, Dufour A, et al. Ephrin signalling controls brain size by regulating apoptosis of neural progenitors [J]. *Nature*, 2005, 435(7046):1244-1250.
 33. Figueroa JD, Benton RL, Velazquez I, et al. Inhibition of Eph-A7 up-regulation after spinal cord injury reduces apoptosis and promotes locomotor recovery [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(7):1438-1451.
 34. Jevince AR, Kadison SR, Pittman AJ, et al. Distribution of EphB receptors and ephrin-B1 in the developing vertebrate spinal cord [J]. *J Comp Neurol*, 2006, 497(5):734-750.
 35. Liu WT, Han Y, Li HC, et al. An in vivo mouse model of long-term potentiation at synapses between primary afferent C-fibers and spinal dorsal horn neurons: essential role of EphB1 receptor [J]. *Mol Pain*, 2009, 5:29.
 36. Kullander K, Butt SJB, Lebreton JM, et al. Role of EphA4 and ephrinB3 in local neuronal circuits that control walking [J]. *Science*, 2003, 299(5614):1889-1892.
 37. Miranda JD, White LA, Marcillo AE, et al. Induction of EphB3 after spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 1999, 156(1):218-222.
 38. Willson CA, Miranda JD, Foster RD, et al. Transection of the adult rat spinal cord upregulates EphB3 receptor and ligand expression [J]. *Cell Transplant*, 2003, 12(3):279-290.
 39. Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, et al. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(21):7789-7800.
 40. Song XJ, Cao JL, Li HC, et al. Upregulation and redistribution of ephrinB and EphB receptor in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury and dorsal rhizotomy [J]. *Eur J Pain*, 2008, 12(8):1031-1039.
 41. Song JX. Discovery and design of molecules to enhance CNS regeneration by targeting eph-ephrin signaling interface [C]. The 3rd International Association of Neurorestoratology Annual Conference Program and Abstracts. 2010.57.

(收稿日期:2010-12-01 修回日期:2011-02-28)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

2011年 AO-Spine 中国区“脊柱畸形”高级研讨会通知

由 AO-Spine 中国部主办、南京鼓楼医院骨科承办的 2011 年“脊柱畸形”高级研讨会将于 2011 年 6 月 25~26 日在南京举行,届时将邀请国内外著名脊柱畸形专家作专题报告。内容包括:(1)脊柱畸形的临床评价和支具治疗原则;脊柱畸形矫形的美学与平衡理念,特发性脊柱侧凸发病机理研究进展;(2)病例讨论:本研讨会将进行复杂脊柱畸形的临床病例讨论,参会人员可利用现代矫形理论进行讨论。

有关此研讨会的详细内容请访问 AO-Spine 网站 www.aospine.org 或南京鼓楼医院脊柱外科网站 www.sosscoliosis.com。报名截止日期:2011 年 6 月 5 日。

来信请寄:南京中山路 321 号南京鼓楼医院脊柱外科(邮编 210008)张林林收。

E-mail: sshen@aospine.org 或 scoliosis2002@sina.com。联系电话:13816946695 沈黎平或 025-83105121 张林林。