

以 NgR 为靶点治疗脊髓损伤的研究进展

许朝进

(温州医学院组织胚胎学教研室 325035 浙江省温州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.11.16

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-11-0955-03

目前对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的治疗方式有细胞移植^[1]、化学药物^[2]、基因治疗^[3]、针刺^[4]等。由于在 SCI 过程中, 常伴有少突胶质细胞受损后释放的 Nogo-A、髓鞘相关蛋白(MAG)、少突胶质细胞相关髓鞘糖蛋白(OMgp)三种髓鞘相关抑制分子, 它们可以与 Nogo-66 受体(NgR)结合而抑制轴突再生^[5]。近几年, 有些学者设计出针对 NgR 的拮抗性肽 NEP-1^[6]、NgR 蛋白疫苗^[7]、NgR DNA 疫苗^[8]等尝试治疗动物 SCI。笔者拟就该领域以 NgR 为靶标促进 SCI 后轴突再生的研究进展进行综述。

1 NgR 的结构

2001 年 Fournier 等^[9]首次报道了可以与 Nogo-66 (Nogo-A 胞外环状结构域)结合的受体 NgR1, 并发现 NgR 介导 Nogo-66 对轴突的抑制作用。随后又有研究发现 NgR 同样是 MAG 和 OMgp 的受体, 介导 MAG、OMgp 对轴突生长的抑制^[10, 11]。NgR 有两个亚型: NgR2、NgR3, 前者的配体是 MAG, 后者仍未鉴定出。人类 NgR 基因位于染色体 22q11, 跨越 2.7kb, 两个外显子, 其正式基因名称是 RTN4R。NgR 蛋白主要表达在中枢神经系统的神经元以及轴突上。NgR 蛋白是糖基磷脂酰肌醇(GPI)偶联的, 由富含 8 个亮氨酸的结构域(LRR)以及 LRR 两侧的氨基端与羧基端部分组成。NgR 所传递的抑制信号经过 LINGO-1(含亮氨酸重复单位及 IgG 结构域的 NgR 接头蛋白)和 p75/Troy 组成的受体复合物执行, 导致胞内的 RhoA 激酶的活化, 最终引起轴突生长的抑制^[12]。Zhang 等^[13]的研究发现 B 淋巴细胞刺激分子(B lymphocyte stimulator)亦是 NgR 的配体, 体外实验表明两者结合后可使背根神经节(DRG)神经元轴突生长受抑制。

2 可溶性 NgR 蛋白

有效阻止髓鞘相关抑制分子与 NgR 的结合, 可采用诱饵受体, 也就是用可溶性的 NgR 蛋白去结合髓鞘抑制分子, 以避免后者与神经元上 NgR 的结合, 造成对轴突生长的抑制。体外研究发现可溶性的 NgR 蛋白(NgREcto, 含

有 NgR 蛋白外功能区域的氨基酸残基 1-310)可以拮抗髓鞘对轴突的生长抑制^[14]。对大鼠脊髓进行半横切损伤, 然后将盛有 1.2mg 的 sNgR310-Fc[NgR(310)ecto-Fc, 含有 NgR 蛋白外功能区域的氨基酸残基 27-310 与 IgG1Fc 功能区的可溶性分子]微量泵放置 SCI 大鼠的皮下, 再通过导管连接到蛛网膜下腔, 经过 4 周治疗, 发现 sNgR310-Fc 可促进 SCI 大鼠 BBB 评分提高及斜板试验倾斜角度的减小, 皮质脊髓束及 5-羟色胺(5-HT)能神经纤维的增多^[6]。Wang 等^[15]报道, 对脊髓受损伤的大鼠, 通过微量泵将 sNgR310-Fc 以 0.25 μ l/h 的速度释放到蛛网膜下腔立即治疗, 或在大鼠损伤后 3d 用同样的方法将 sNgR310-Fc 以 2.5 μ l/h 的速度释放到脑室内延迟治疗, 两者均在损伤后第 7 周进行行为学评估, 结果表明 sNgR310-Fc 可以促进损伤大鼠 BBB 评分的改善, 另外亦可促进损伤大鼠的红核脊髓束与皮质脊髓束增殖(sprouting), 认为脑脊髓束的改变与 BBB 评分有一定的相关性, 但 sNgR310-Fc 对于 SCI 后空洞面积没有影响。这些体内体外实验均表明 sNgR310-Fc 可有效促进 SCI 大鼠轴突的生长以及运动功能恢复, 从而为 sNgR310-Fc 可能的临床应用打下了基础。

与蛋白质拮抗剂相对应的有最近报道的 RNA aptamer, 此寡聚物与 NgR 的结合力高于髓鞘三种抑制分子, 体外实验表明可以显著拮抗髓鞘抑制分子对轴突生长的阻碍作用^[16]。

3 NgR 疫苗

NgR 疫苗是根据 NgR 设计, 通过疫苗免疫, 使机体产生抗 NgR 的抗体, 从而阻断 NgR 介导的轴突抑制, 促进 SCI 运动功能的恢复。有学者^[7]报道 NgR 的蛋白疫苗免疫半横断 SCI 大鼠, 在大鼠脊髓半横断损伤模型中, 利用生物素化的葡聚糖胺(BDA)对大鼠皮质脊髓束(CST)进行逆行标记, 结果显示, 经 NgR 蛋白免疫的大鼠, 75%的个体的部分切断的神经纤维可发生再生, 并穿越损伤区, 长入损伤的下游, 部分个体的轴突再生距离超过了 10mm; 而对照组中, 所有标记的神经纤维均停止于损伤部位的上游; 行为学试验 BBB 评分和网格步行试验的结果则进一步证明, 接种 NgR 蛋白疫苗后半横断 SCI 大鼠模型瘫痪下肢的功能有明显恢复。在 Yu 等^[17]的研究中, 一组将小脑皮层

第一作者简介: 男(1979-), 博士, 讲师, 研究方向: 神经再生与免疫

电话: (0577)86689976 E-mail: xuzhaojin@gmail.com

神经元种植在 MAG 包被的盖玻片中, 另外一组种植神经元同时加入 DNA 疫苗免疫后的血清(含抗 NgR 抗体), 发现此血清对 MAG 所介导的轴突抑制有一定的逆转作用。Yu 等^[8]还报道了 NgR 的 DNA 疫苗(人 NgR 基因片段与人免疫球蛋白 IgG Fc 段的基因融合构建成真核表达质粒 pcDNA3.1-hNgR-Fc), 直接将质粒注射至大鼠股四头肌, 结果表明抗 NgR 的 DNA 疫苗使 SCI 大鼠的功能明显恢复, BBB 评分提高。Li 等^[17]报道, 用抗 NgR 抗体 7E11 可以阻止 NogoA、MAG、OMgp 与 NgR 的结合, 而且将 P3 代 DRG 神经元种植在髓鞘包被的盖玻片上 (6~15 ng/mm²), 发现 NgR 抗体 7E11 可促进 DRG 神经元突起在髓鞘上面的生长。

4 NgR 拮抗肽

Nogo-A 是 Nogo 家族里最重要的亚型之一, 它主要表达在少突胶质细胞, 包含一个长的氨基末端 (amino-Nogo) 和跨越 2 次膜的环状 66 个氨基酸结构域。以前研究的抑制性中和抗体 (IN-1) 抗体就是针对 Nogo 氨基端的, 但是此抗体识别的表位在 Nogo-66 结构域外, 所以它可能对 Nogo-66、MAG、OMgp 与 NgR 的结合不产生影响, 其作用途径和 NgR 拮抗剂不同。GrandPre 等^[18]报道他们已经合成可以拮抗 Nogo-66-NgR 结合的具有 40 个氨基酸的多肽——NEP1-40 (Nogo66 residue 1-40, 含有 40 个氨基酸残基的 NgR 蛋白), 体外实验表明, NEP1-40 可以阻止中枢神经系统髓鞘或 Nogo-66 对轴突的抑制作用, 若在胸段脊髓半横切大鼠蛛网膜下腔 (intrathecal space) 内注射 NEP1-40, SCI 大鼠的皮质脊髓束再生以及行为学评估均有明显改善。Li 等^[19]报道对 SCI 后大鼠用微量泵将 NEP1-40 持续皮下给药 (考虑到临床实际的需要), 共给药 14d, 无论损伤后立即给药, 损伤后 3h 或 7d 给药, 皮质脊髓束与 5-HT 能神经纤维及突触均有大量的生成, 运动功能恢复良好。对于颈部脊髓侧索损伤的大鼠, 通过渗透泵将 NEP1-40 释放到蛛网膜下腔治疗 4 周, 可促进大鼠行为学的改进及轴突的再生^[20]。Dupuis 等^[21]报道 NEP1-40 可以拮抗依赖 p75NTR 诱导的大鼠胚胎运动神经元死亡以及坐骨神经损伤导致的脊髓运动神经元的死亡。

5 NgR 基因的敲除 (knockout)

为了对 SCI 后 NgR 所起的作用进一步研究, 有学者开始用基因敲除 (gene knockout) 技术。Kim 等^[22]研究发现小鼠敲除 NgR 基因仍然可以存活, 但是其运动功能受到损害, DRG 的 NgR-/- 神经元不能够与 Nogo-66 结合, 也未出现 Nogo66 诱导的生长锥塌陷; 而对脊髓半横切损伤的 NgR-/- 小鼠, 其运动功能有明显改善, 但是皮质脊髓束无显著再生, 然而红核脊髓束与中缝脊髓束却有再生现象, 说明 NgR 对神经纤维再生作用有限。另外, NgR-/- 敲除小鼠^[23]或经 RNA 干扰大鼠^[24]的缺血性大脑中风模型中发现, 穿越中线投射到对侧红核的神经纤维数目大量增加, 而且

此模型小鼠或大鼠的运动功能有了明显改善, 因为 NgR 基因的敲除或沉默影响了轴突的可塑性 (axon plasticity)。然而, Zheng 等^[25]报道 NgR 基因的敲除并没有在体外减轻髓鞘对出生后 DRG 神经元轴突生长的抑制, 而在体内试验中也没有发现皮质脊髓束的再生现象, 作者研究结果不支持 NgR 在体外介导的轴突抑制或在体内皮质脊髓束的再生障碍所起的中枢作用。Lee 等^[26]的研究也发现, NgR 基因缺陷小鼠脊髓全部横断后, 5-HT 能神经元的轴突并没有穿过损伤位点, 不能使其再生。但是最近又有报道称, 将 NgR-/- 敲除的小鼠进行颈部脊髓部分半横切 14 周后, 行为学评估有了很大改善^[27]。

6 总结与展望

尽管 SCI 治疗的方式多种多样, 但以 NgR 为靶点的治疗, 多数研究得出了比较相似的结论, 比如运动功能改善、皮质脊髓束再生等。关于与 NgR 结合的三种抑制分子在体内的相互作用、NgR 亚型在 SCI 中的作用以及 NgR 的共受体^[28]等问题, 需进一步研究。另外, 我们的研究结果亦表明, NgR 蛋白疫苗与神经干细胞移植可以促进 SCI 大鼠运动功能的改善^[29], 但是, 关于此疫苗产生的抗体与未损伤神经组织上表达的 NgR 结合后产生的效应如何, 目前仍不清楚。当然, 髓鞘相关蛋白并不是唯一的抑制轴突生长的胞外因素, 还有硫酸软骨素多糖等, 对这些细胞外的抑制因素 (髓鞘、硫酸软骨素多糖等) 如何与神经营养因子等促再生因子协同调控轴突的生长, 仍需要再深入研究。

7 参考文献

1. Ruff CA, Wilcox JT, Fehlings MG. Cell-based transplantation strategies to promote plasticity following spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2011, [Epub ahead of print].
2. Paterniti I, Mazzon E, Gil C, et al. PDE 7 inhibitors; new potential drugs for the therapy of spinal cord injury[J]. PLOS One, 2011, 6(1): e15937.
3. Bo X, Wu D, Yeh J, et al. Gene therapy approaches for neuroprotection and axonal regeneration after spinal cord and spinal root injury[J]. Curr Gene Ther, 2011, 11(2): 101-115.
4. Choi DC, Lee JY, Moon YJ, et al. Acupuncture-mediated inhibition of inflammation facilitates significant functional recovery after spinal cord injury[J]. Neurobiol Dis, 2010, 39(3): 272-282.
5. Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. Cell therapy for spinal cord regeneration[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(2): 263-276.
6. Li S, Liu BP, Budel S, 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.
7. Yu P, Huang L, Zou J, et al. Immunization with recombinant Nogo-66 receptor (NgR) promotes axonal regeneration and re

- covery of function after spinal cord injury in rats[J].*Neurobiol Dis*, 2008, 32(3):535-542.
8. Yu P, Huang L, Zou J, et al. DNA vaccine against NgR promotes functional recovery after spinal cord injury in adult rats [J].*Brain Res*, 2007, 1147(1):66-76.
9. Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J].*Nature*, 2001, 409(6818):341-346.
10. 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.
11. Domeniconi M, Cao Z, Spencer T, et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the Nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth[J].*Neuron*, 2002, 35(2):283-290.
12. Teng FYH, Tang BL. Why do Nogo/Nogo-66 receptor gene knockouts result in inferior regeneration compared to treatment with neutralizing agents [J]?*J Neurochem*, 2005, 94(4):865-874.
13. Zhang L, Zheng S, Wu H, et al. Identification of BLYS(B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor[J].*J Neurosci*, 2009, 29(19):6348-6352.
14. 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.
15. Wang X, Baughman KW, Basso DM, et al. Delayed Nogo receptor therapy improves recovery from spinal cord contusion [J].*Ann Neurol*, 2006, 60(5):540-549.
16. Wang Y, Khaing ZZ, Li N, et al. Aptamer antagonists of myelin-derived inhibitors promote axon growth[J].*PLOS One*, 2010, 5(3):e9726.
17. Li W, Walus L, Rabacchi SA, et al. A neutralizing anti-Nogo 66 receptor monoclonal antibody reverses inhibition of neurite outgrowth by central nervous system myelin[J].*J Biological Chem*, 2004, 279(42):43780-43788.
18. GrandPre T, Li S, Strittmatter SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration [J].*Nature*, 2002, 417(6888):547-551.
19. Li S, Strittmatter SM. Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury [J].*J Neurosci*, 2003, 23(10):4219-4227.
20. Cao Y, Shumsky JS, Sabol MA, et al. Nogo-66 receptor antagonist peptide (NEP1-40) administration promotes functional recovery and axonal growth after lateral funiculus injury in the adult rat [J].*Neurorehabil Neural Repair*, 2008, 22(3):262-278.
21. Dupuis L, Pehar M, Cassina P, et al. Nogo receptor antagonizes p75NTR-dependent motor neuron death [J].*Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(2):740-745.
22. Kim JE, Liu BP, Park JH, et al. Nogo-66 receptor prevents raphespinal and rubrospinal axon regeneration and limits functional recovery from spinal cord injury [J].*Neuron*, 2004, 44(3):439-451.
23. Lee JK, Kim JE, Sivula M, et al. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity [J].*J Neurosci*, 2004, 24(27):6209-6217.
24. Wang T, Wang J, Yin C, et al. Down-regulation of Nogo receptor promotes functional recovery by enhancing axonal connectivity after experimental stroke in rats [J].*Brain Res*, 2010, 1360:147-158.
25. Zheng B, Atwal J, Ho C, et al. Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo [J].*Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(4):1205-1210.
26. Lee JK, Chow R, Xie F, et al. Combined genetic attenuation of myelin and semaphorin-mediated growth inhibition is insufficient to promote serotonergic axon regeneration [J].*J Neurosci*, 2010, 30(32):10899-10904.
27. Harel NY, Song KH, Tang X, et al. Nogo receptor deletion and multimodal exercise improve distinct aspects of recovery in cervical spinal cord injury [J].*J Neurotrauma*, 2010, 27(11):2055-2066.
28. McDonald CL, Bandtlow C, Reind M. Targeting the Nogo receptor complex in diseases of the central nervous system [J].*Curr Med Chem*, 2010, 18(2):234-244.
29. Xu CJ, Xu L, Huang LD, et al. Combined NgR vaccination and neural stem cell transplantation promote functional recovery after spinal cord injury in adult rats [J].*Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011, 37(2):135-155.

(收稿日期:2011-02-21 修回日期:2011-04-06)

(本文编辑 李伟霞)