

综述

髓磷脂相关抑制因子与脊髓损伤后轴突再生抑制的研究进展

刘晓伟, 史国栋

(第二军医大学附属长征医院骨科 200003)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.12.15

中图分类号: R682.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-12-1030-04

发生损伤的脊髓内,大量神经元、神经胶质细胞因直接的机械损伤出现凋亡、坏死,继发性损伤则导致轴突受损和少突胶质细胞的凋亡、坏死,促使包绕轴突的髓鞘结构破坏严重,大量难以清除的髓磷脂相关抑制因子(Myelin-associated inhibitors)则在较长的时间内通过神经元表面受体的介导而抑制轴突的再生^[1]。随着研究的深入,关于髓磷脂抑制性因子导致脊髓损伤后轴突再生抑制的机制已逐渐清晰,针对性的干预措施亦在动物模型和临床研究中逐步开展。作者就髓磷脂相关抑制性因子研究的进展、干预效果和研究趋势综述如下。

1 髓磷脂相关抑制因子与轴突再生抑制的相关性

与轴突再生抑制相关的一系列髓磷脂抑制因子,包括髓磷脂相关糖蛋白(Myelin-associated glycoprotein, MAG)、Nogo、少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(Oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMgp)等是目前的研究热点^[1],而一些经典的轴突导向因子如 semaphorin、ephrin 及 netrin 等,可能亦参与构成损伤脊髓轴突抑制性微环境,但具体的信号通路目前尚不明确^[2]。

1.1 MAG 及其配体抑制轴突再生

MAG 是由 5 个类似免疫球蛋白(immune globulin, Ig)的区域组成的可被唾液酸识别的外源凝集素,有胞浆内囊状区域和跨膜区域两大结构,并参与构成髓鞘,是目前研究最多的一个轴突再生抑制因子^[3]。

1.1.1 MAG 对轴突再生的调节呈双向性 MAG 以一种细胞周期依赖的模式实现对轴突生长的双向调节作用,即能促进许多类型的幼稚神经元生长,而抑制成熟的轴突生长^[4]。但近来的许多研究结果与此观点有出入,尽管研究^[5]发现晚期胚胎鼠海马及皮质神经元轴突的生长可以被 MAG 抑制,但处于分化阶段的海马前体细胞系同样可被 MAG 抑制^[5]; Mehta 等的一系列研究证实, MAG 可抵抗损伤后轴突的退变,且可减少由 NMDA 诱导的体外培养细胞毒性,抑制由长春新碱诱导的轴突退变^[6,7]。Quarles 认为,正常状态下的 MAG 具有可促进轴突成熟、存活及髓鞘

化的能力,而由该分子介导的轴突再生抑制可能是微环境改变后的生理功能异常^[8],但脊髓损伤时,相应的受体和信号通路可能发生改变,不同来源和发育阶段的神经元受损时,亦可能通过特殊的信号途径来介导轴突的生长或抑制。而目前关于 MAG 实现双向调节的分子基础依然不清楚。

1.1.2 神经元表面的配体介导 MAG 抑制轴突再生 目前认为 MAG 主要通过神经元膜上的包括神经节苷脂、Nogo 受体(Nogo receptor, NgR)在内受体实现对轴突生长的抑制。位于髓鞘最里层的 MAG 配体可通过唾液酸与 GD1a 和 GT1b 结合,实现轴突和髓磷脂之间结构的稳定性,同时也是导致脊髓损伤后轴突再生受抑的关键因素^[3,9]。以药物抑制神经节苷脂的生物合成后,吸附有 dMAG 的培养基中小脑颗粒神经元的轴突抑制亦被解除,分离自缺乏 GD1a 和 GT1b 的变异小鼠的小脑颗粒神经元中, MAG 的抑制作用被大幅削减^[10,11]。

NgR 是介导 MAG 抑制轴突的另一种配体,可以和 Nogo-66 结合,通过形成糖基磷脂酰肌醇(glycosyl phosphatidyl inositol, GPI)锚形体结合到细胞表面^[11]。NgR1、NgR2、NgR3 是目前鉴定出的三个亚型,但尚无关于 NgR3 介导 MAG 作用的报道。NgR2 与 MAG-Fc 亲和力较高^[11],新生背根神经节神经元中, NgR2 表达的增多诱发了 MAG 导致的轴突生长抑制,而 NgR1 可能是以受体复合物的形式与 MAG 结合^[12]。虽然有人认为神经节苷脂与 NgR 对于 MAG 的介导是彼此独立的,但关于二者彼此辅助的观点仍然存在^[10,13]。

1.2 Nogo 家族、NgR 与轴突的再生抑制

Nogo 家族分子由 Nogo/RTN4 编码形成,包括 A、B、C 三个亚型,由 66 个氨基酸构成的 C 端亲水性环(Nogo-66)是其共同特征。Nogo-A 分子结构最大,在少突胶质细胞及某些发育中或已成熟的神经元细胞表面均可有表达^[14]。阻断大脑中动脉血流 2 个月与损伤部位相邻的白质内 Nogo-A(+)的少突胶质细胞数目显著增加^[14],在脊髓损伤模型中发现 Nogo-A 的表达会持续较长一段时间,可能与轴突再生抑制性微环境形成相关^[15]。研究^[16,17]发现,以抗体或 DNA 疫苗中和 Nogo-A 后,体外培养的皮质脊髓束和神经元通路的再生得到增强,而动物模型的运动能力亦得到部分恢复。

第一作者简介:男(1987-),在读博士,研究方向:脊柱外科

电话:(021)81885630 E-mail:liuwei0211989@163.com

通讯作者:史国栋 E-mail:hgd008@163.com

NgR1 与 Nogo66 结合后能否抑制轴突再生, 目前仍有争议^[4,18], 而 NgR1 与 p75、Lingo-1 以复合物的形式介导 Nogo66、MAG 和 OMgp 的轴突抑制作用在目前被认同^[19]。p75 在体外培养的神经元中能与 NgR1 形成复合物介导髓磷脂抑制因子的轴突抑制作用, 而阻断 NgR1/p75 复合物后, 抑制作用可被解除^[20]; Lingo-1 可以与 NgR1、p75 形成三体复合物, 介导 Nogo66 对于体外培养的神经元的抑制作用, 关于该分子的结构研究亦证明了三体复合物形成的假说^[21]。与 p75 类似, TROY 属于 TNF 受体超家族, 可以介导包括 Nogo-A 在内的髓磷脂抑制性因子的轴突抑制作用^[22], 但由于未在成熟中枢神经系统内检测到 TROY 的表达, 它是否参与受体复合物的形成, 仍值得商榷^[23]。

除了 C 端的 Nogo66 外, Nogo-A 亦可通过包括 $\alpha 4\beta 1$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 和 $\alpha v\beta 3$ 在内的特定整联蛋白 (integrin) 抑制体外培养的轴突生长和细胞粘附^[24]。整联蛋白能介导细胞增殖、轴突定向等功能, 而这些功能可被细胞内外的信号调控, 因此, Nogo-A 通过整联蛋白调控轴突再生的机制可能是间接的^[25]。

1.3 OMgp 与轴突抑制

OMgp 为富含亮氨酸重复片段, 发育中或已成熟的中枢神经系统的神经元和少突胶质细胞均可合成, 其可以通过 GPI 锚形体与细胞膜相连, 参与构成髓鞘^[26]。脊髓损伤后, OMgp 主要以神经元和少突胶质细胞的表达为主, 其表达曲线与 NgR 类似, 均呈迅速升高而缓慢下降的曲线, 而体外培养的神经干细胞增殖可以被 OMgp 抑制^[26]; 因此它很有可能与脊髓损伤后的轴突再生抑制相关。

既往研究证实, 体外培养的神经元轴突再生可被 OMgp 抑制, 而 OMgp 表达缺陷的脊髓损伤动物模型中, 轴突再生和脊髓功能恢复亦得到增强^[27]。关于 OMgp 与 MAG、Nogo-A 的关系, Lee 等^[27]认为 OMgp 通过与 MAG 共同辅助 Nogo-A, 实现对轴突生长的抑制, 而三者均发生基因突变的小鼠轴突生长、脊髓功能恢复的情况亦与单独抑制 Nogo-A 一致; 但 Lee 在三者均突变的小鼠发生脊髓损伤后, 并未观察到轴突再生的增强。这提示我们, 三种分子间的相互作用机制复杂, 而这一现象能否正确解释, 对后续以髓磷脂相关抑制因子为靶点治疗措施的开发有着指导意义。

OMgp 实现轴突抑制的双重机制尚不清晰。目前认为主要是 NgR 介导 OMgp 抑制神经元轴突生长, 而 NgR1/p75/Lingo-1 复合物可能是该分子发挥作用的主要受体^[20]; 由于脊髓损伤后神经元细胞膜上的 OMgp 表达增多, 因此 OMgp 亦可能参与构成传导 MAG 轴突抑制信号的受体复合物^[28], 但目前尚无分子和细胞水平的确切证据。

2 对髓磷脂相关抑制因子的干预方法

随着研究的深入, 对髓磷脂相关抑制因子及其受体的各种干预策略已在脊髓损伤动物模型上逐步开展, 限于现有生物技术的水平, 目前的干预策略主要集中于抗体中

和、拮抗剂效应及基因敲除或沉默。

2.1 抗体中和效应或拮抗剂效应

Freund 等^[29]利用 Nogo-A 抗体在猴脊髓损伤模型中开展的一系列研究证实, 尽管受损神经元的皱缩不能避免, 但其轴突再生却能得到促进, 且能促进猴手指运动能力的恢复。NEP1-40 是目前在大鼠模型中应用最广泛的 Nogo-A 单克隆抗体, 它通过与 Nogo-A 结合而发挥拮抗受体的效应, 促进神经元粘附和轴突再生, 同时使动物脊髓神经功能得到恢复^[30]。与甲强龙或运动训练结合后, Nogo-A 抗体治疗的效果能得到增强^[31]。

NgR1 是 3 种主要髓磷脂相关抑制因子的共同受体, 针对 Nogo66 受体的干预策略可能较单独抑制 Nogo-A 更直接^[32]。以能中和三种髓磷脂相关抑制因子的 Nogo66 的可溶性受体 NgR(310)ecto-Fc 处理脊髓挫伤的大鼠后, 其中缝脊髓的轴突增殖得到促进^[33]; 而以 NgR 疫苗注射联合神经干细胞移植后, 其效果更佳^[34]。将 Nogo-A 或 NgR 的特异性抗原注射至模型后诱导抗体产生, 是一种安全且有效的干预手段^[35], 而将 Nogo-A 抗体用于急性脊髓损伤的临床 I 期研究已证实其具有促进功能恢复的效果^[36]。

2.2 基因干预策略

基因敲除的动物是研究髓磷脂相关抑制因子及其相关受体功能、机制的有效模型, 以小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 实现基因沉默则是将关于髓磷脂相关抑制因子的基础研究转化为基因干预策略, 并应用于临床治疗的主要途径, 而 NgR 被认为是目前的最佳干预靶点^[32]。Garaway 等设计了针对 NgR1 的 siRNA, 并在动物模型中验证了它的干扰效力^[37]; 可能干扰序列的设计不同, 但最近的两项研究均提示, siRNA 在脊髓损伤后能促进轴突再生、抑制神经元凋亡, 增强损伤脊髓的功能恢复^[18,38]。若将基因干扰联合干细胞移植, 或许能获得更好的脊髓修复效果。

虽然目前对于髓磷脂相关抑制因子导致轴突再生的机制已逐步清晰, 但由于神经元表面结构复杂, 因此仍有很多未知受体, 加上各受体之间有着很大的相关性, 最终导致现有干预措施对损伤脊髓的修复效果并不理想。因此, 揭示髓磷脂相关抑制因子及其受体之间的具体机制对于促进损伤脊髓功能的修复有着重要意义。

3 参考文献

- Onose G, Anghelescu A, Muresanu DF, et al. A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury [J]. Spinal Cord, 2009, 47(10): 716-726.
- Giger RJ, Hollis ER 2nd, Tuszynski MH. Guidance molecules in axon regeneration [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(7): a001867.
- Cao Z, Qiu J, Domeniconi M, et al. The inhibition site on myelin-associated glycoprotein is within Ig-domain 5 and is distinct from the sialic acid binding site [J]. J Neurosci, 2007,

- 27(34):9146-9154.
4. Chivatakarn O, Kaneko S, He Z, et al. The Nogo-66 receptor NgR1 is required only for the acute growth cone-collapsing but not the chronic growth-inhibitory actions of myelin inhibitors[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(27):7117-7124.
 5. Mellough CB, Cho S, Wood A, et al. Neurite formation by neurons derived from adult rat hippocampal progenitor cells is susceptible to myelin inhibition [J]. *Neurochem Int*, 2011, 9(3):333-340.
 6. Mehta NR, Nguyen T, Bullen JW, et al. Myelin-associated glycoprotein (MAG) protects neurons from acute toxicity using a ganglioside-dependent mechanism [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2010, 1(3):215-222.
 7. Lopez PH, Ahmad AS, Mehta NR, et al. Myelin-associated glycoprotein protects neurons from excitotoxicity [J]. *J Neurochem*, 2011, 116(5):900-908.
 8. Quarles RHA. A hypothesis about the relationship of myelin-associated glycoprotein's function in myelinated axons to its capacity to inhibit neurite outgrowth [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(1):79-86.
 9. Schnaar RL. Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(9):1741-1747.
 10. Mehta NR, Lopez PH, Vyas AA, et al. Gangliosides and Nogo receptors independently mediate myelin-associated glycoprotein inhibition of neurite outgrowth in different nerve cells [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(38):27875-27886.
 11. Semavina M, Saha N, Kolev MV, et al. Crystal structure of the Nogo-receptor-2[J]. *Protein Sci*, 2011, 20(4):684-689.
 12. Venkatesh K, Chivatakarn O, Lee H, et al. The Nogo-66 receptor homolog NgR2 is a sialic acid-dependent receptor selective for myelin-associated glycoprotein[J]. *J Neurosci*, 2005, 25(4):808-822.
 13. Williams G, Wood A, Williams EJ, et al. Ganglioside inhibition of neurite outgrowth requires Nogo receptor function; identification of interaction sites and development of novel antagonists[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(24):16641-16652.
 14. Eslamboli A, Grundy RI, Irving EA. Time-dependent increase in Nogo-A expression after focal cerebral ischemia in marmoset monkeys[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 408(2):89-93.
 15. 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(Pt 2):356-364.
 16. Freund P, Schmidlin E, Wannier T, et al. Nogo-A-specific antibody treatment enhances sprouting and functional recovery after cervical lesion in adult primates [J]. *Nat Med*, 2006, 12(7):790-792.
 17. Mullner A, Gonzenbach RR, Weinmann O, et al. Lamina-specific restoration of serotonergic projections after Nogo-A antibody treatment of spinal cord injury in rats [J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 27(2):326-333.
 18. Peng X, Zhou Z, Hu J, et al. Soluble Nogo receptor down-regulates expression of neuronal Nogo-A to enhance axonal regeneration[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(4):2783-2795.
 19. Cao Z, Gao Y, Deng K, et al. Receptors for myelin inhibitors: Structures and therapeutic opportunities[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 43(1):1-14.
 20. 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(6911):74-78.
 21. 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 Biol Chem*, 2006, 281(47):36378-36390.
 22. Park JB, Yiu G, Kaneko S, et al. A TNF receptor family member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors [J]. *Neuron*, 2005, 45(3):345-351.
 23. Mi S. Troy/Taj and its role in CNS axon regeneration[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19(3-4):245-251.
 24. Hu F, Strittmatter SM. The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(5):1262-1269.
 25. Hines JH, Abu-Rub M, Henley JR. Asymmetric endocytosis and remodeling of beta1-integrin adhesions during growth cone chemorepulsion by MAG [J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(7):829-837.
 26. Martin I, Andres CR, Vedrine S, et al. Effect of the oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) on the expansion and neuronal differentiation of rat neural stem cells[J]. *Brain Res*, 2009, 1284:22-30.
 27. Lee JK, Geoffroy CG, Chan AF, et al. Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice[J]. *Neuron*, 2010, 66(5):663-670.
 28. Giger RJ, Venkatesh K, Chivatakarn O, et al. Mechanisms of CNS myelin inhibition: evidence for distinct and neuronal cell type specific receptor systems. *Restor Neurol Neurosci*, 2008, 26(2-3):97-115.
 29. Freund P, Schmidlin E, Wannier T, et al. Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates - re-examination and extension of behavioral data [J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29(5):983-996.
 30. Atalay B, Bavbek M, Cekinmez M, et al. Antibodies neutralizing Nogo-A increase pan-cadherin expression and motor recovery following spinal cord injury in rats [J]. *Spinal Cord*, 2007, 45(12):780-786.
 31. Wu J, Yang H, Qiu Z, et al. Effect of combined treatment with methylprednisolone and Nogo-A monoclonal antibody after rat spinal cord injury[J]. *J Int Med Res*, 2010, 38(2):570-582.
 32. McDonald CL, Bandtlow C, Reindl M. Targeting the Nogo receptor complex in diseases of the central nervous system

与腰椎椎弓根钉相关的顽固性腰痛

刘宪义, 李淳德, 邕晓东, 刘洪, 林景荣, 卢海霖, 于峥嵘, 李宏

(北京大学第一医院骨科 100034 北京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.12.16

中图分类号: R619 文献标识码: B 文章编号: 1004-406X(2011)-12-1033-02

腰椎内固定术后患者远期可出现腰痛, 其疼痛原因较多, 包括腰椎不稳定、邻近节段退变、感染、肿瘤及腰背肌无力等等。我院自 2006 年 8 月~2009 年 6 月共收治腰椎内固定术后半年仍有顽固性腰痛的患者 6 例, 严重者不能下地行走, 患者均经口服消炎止痛药、理疗、局部封闭等治疗方法, 腰痛不缓解, 采取取出内固定后, 患者疼痛缓解, 现总结分析如下。

一般资料 本组女性 4 例, 男性 2 例, 年龄 52~76 岁, 平均 65.3 岁, 体重 55~71kg, 平均 63.1kg。所有患者的手术方式均为腰椎管减压、椎弓根螺钉内固定、植骨融合术, 手术节段 L2~L5 1 例、L3~L5 3 例、L4~S1 2 例, 均行后外侧融合术 (posterior lateral fusion, PLF), 矢状位曲度术前与术后比较, 术后腰前凸增加, 但术后随访期各时间点腰椎矢状位曲度无变化。所有患者术后半年仍然腰痛, 有 2 例患者伴有大腿痛。患者均经过严格的保守治疗至少 1 个月, 包括口服消炎止痛药、理疗、局部封闭等治疗方法, 患者腰痛未缓解, 疼痛严重, 不能下地行走, VAS 评分 7~10 分。术后 MRI 复查, 均未见神经及硬膜受压征象。

手术治疗 1 例患者强烈要求取出内置物, 同时排除了腰椎不稳定、邻近节段退变、感染、肿瘤、腰背肌无力等

因素。其后 5 例是在排除了上述原因后向患者建议考虑取出椎弓根钉, 症状可能会缓解, 患者表示接受取钉手术。

手术采用全麻下原切口进入, 仅显露椎弓根钉棒系统, 术中可感觉椎弓根螺钉有松动, 未见到钉周围软组织发红及液体渗出, 钉骨界面组织非骨性组织, 为膜样结构的软组织。取钉-骨界面组织送病理, 做组织学观察 (HE 染色), 同时做细菌培养观察。X 线片: 有 3 例患者在取钉前的 X 线片可见椎弓根螺钉松动, 其中 2 例为单个椎弓根螺钉松动, 分别为 L3 右侧椎弓根钉 (术前 L3~L5 共 6 颗椎弓根钉) 和 L4 左侧椎弓根螺钉 (术前 L4~S1 共 6 颗椎弓根钉); 1 例为双侧椎弓根螺钉松动, 为 L4 双侧椎弓根螺钉松动 (术前 L4~S1 共 6 颗椎弓根钉)。松动螺钉影像见图 1、2, 另外 3 例无椎弓根螺钉松动。

术后细菌培养包括需氧菌及厌氧菌培养。随访采用疼痛视觉模拟评分 VAS 评分法评估患者的疼痛。

结果 取出椎弓根螺钉后, 患者 VAS 评分从术前的平均 8.2 分降至术后的平均 3.3 分。随访半年患者均未再出现腰痛复发。组织学观察示椎弓根钉与骨的界面为生物膜性结构, 而非松质骨。松动螺钉钉-骨界面病理结果显示: 纤维组织伴玻璃样变性、钙化, 间质有少量慢性炎细胞浸润 (图 3), 无松动螺钉的钉-骨界面病理结果: 纤维组织伴玻璃样变性、钙化, 未见炎细胞浸润。

讨论 本组病例中患者在取钉后腰痛缓解, 这提示腰痛与椎弓根钉置入相关。其中有 3 例出现椎弓根钉松动

第一作者简介: 男 (1970-), 副主任医师, 研究方向: 脊柱外科
电话: (010)83572326 E-mail: liuxianyi@medmail.com.cn
通讯作者: 李淳德 E-mail: ichunde@medmail.com.cn

- [J]. Curr Med Chem, 2011, 18(2): 234-244.
33. 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.
34. 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.
35. Yu P, Huang L, Zou J, et al. Immunization with recombinant Nogo-66 receptor (NgR) promotes axonal regeneration and recovery of function after spinal cord injury in rats [J]. Neurobiol Dis, 2008, 32(3): 535-542.
36. Zorner B, Schwab ME. Anti-Nogo on the go: from animal models to a clinical trial [J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 1198 (Suppl 1): E22-34.
37. Garraway SM, Xu Q, Inturrisi CE. Design and evaluation of small interfering RNAs that target expression of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit gene in the spinal cord dorsal horn [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 322(3): 982-988.
38. Xu S, Liu M, Zhang T, et al. Effect of lentiviral shRNA of Nogo receptor on rat cortex neuron axon outgrowth [J]. Can J Neurol Sci, 2011, 38(1): 133-138.
- (收稿日期: 2010-11-09 修回日期: 2011-05-06)
(本文编辑 彭向峰)