

综述

环磷腺苷在脊髓损伤神经再生中的作用

祁 全, 毕郑钢

(哈尔滨医科大学第一临床医学院骨科 150001)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.10.18

中图分类号: R683.2, Q513

文献标识码: A

文章编号: 1004-406X(2009)-10-0792-03

脊髓损伤(SCI)治疗的关键在于神经传导束的恢复,即轴突的再生。而成年哺乳动物中枢神经系统(CNS)在损伤后难以自发再生,主要原因包括中枢神经元很弱的再生能力和神经细胞周围抑制性内环境的存在。一般认为 CNS 的抑制成分主要来源是髓磷脂;另外,星形胶质细胞损伤后的增生并形成胶质疤痕也起到阻碍作用^[1]。目前关于成年神经元再生的研究集中在两方面,一是鉴别并阻断髓磷脂和胶质疤痕中各种抑制因子,如发现髓磷脂中含有 Nogo-A、MAG、OMgp 等抑制轴突再生蛋白,应用 IN-1 等中和性抗体能诱发再生的出现^[2];另一方面是通过一些方法克服抑制物作用并增强神经元的再生能力,其中有很多证据表明环磷腺苷(cAMP)能够增强神经元再生能力,并改变神经元对髓磷脂的反应,在 SCI 神经再生研究具有重要意义,综述如下。

1 神经元的 cAMP 水平与再生能力的关系

1.1 神经元 cAMP 水平与 MAG 和髓磷脂的抑制作用

成年 CNS 神经元可以长入周围神经移植物,但再生轴突不能超越移植物,接触到宿主 CNS 时再生停止。这意味着周围神经系统(PNS)环境比 CNS 有更好的神经再生条件,而且说明 CNS 神经元本身的再生能力并没有完全失去,在适合的条件下可以轴突再生。Berry 等^[3]发现视神经损伤后,外周神经移植物植入,视神经轴突广泛的长入移植物白质,并超越了损伤区。相似的是,BDNF 或者 NF-3 加入到胚胎移植组织中,损伤脊髓轴突不仅长入移植物,而且在白质中扩展了相当长的距离^[4]。这些研究结果提示:神经营养因子和外周神经移植物的一些分泌成分影响了轴突对髓磷脂的反应,甚至一定程度上中和了后者对轴突的抑制作用。神经元体外培养实验显示,一系列神经营养因子直接加入培养基,并未发现对抑制性底物的克服作用;而若小脑颗粒细胞预先与 BDNF 或 GDNF 培养过夜,然后转入到 MAG 和髓磷脂等抑制性底物,抑制作用被彻底克服^[5]。对 DRG 细胞,BDNF、GDNF、NGF 可达到类似效果,而且与神经营养因子的作用时间和剂量有关。

通过对神经元生长锥动力的研究发现了这种阻断作用的分子机制^[6]。许多神经营养因子和轴突导向因子对轴突具有化学引导作用。例如,netrin-1 的成分通常对培养中的脊髓神经元生长锥产生吸引作用^[7]。有趣的是,如果培养液中加入 cAMP 竞争性抑制物或加入 PKA 的抑制剂,这种化学吸引作用转化为排斥作用^[8]。相反,一种重组的可溶性 MAG 排斥生长锥,但向培养基中加入 cAMP 后这种排斥会转化为吸引。这些研究提示细胞内 cAMP 水平可能指导着神经元对特殊导向信号及髓磷脂蛋白的反应。

在神经营养因子改变神经元对 MAG 反应的研究中发现,如果 MAG 同时存在,神经营养因子不能增加神经元 cAMP 水平;如果神经元预先与神经营养因子作用,同时存在 PKA 抑制剂,阻断 MAG 和髓磷脂抑制作用的效果也会彻底消失;利用一种 cAMP 类似物 db-cAMP 人工提高 cAMP 水平也阻断了抑制作用;如果存在 G 蛋白抑制物的情况下,神经元同时受到神经营养因子和 MAG 或髓磷脂作用,不需预先处理,抑制作用可以被阻断^[9]。也有研究显示 BDNF 是通过激活细胞外调节酶(Erk)抑制磷酸二酯酶抑制剂(PDE4)来增加 cAMP 克服 MAG 的抑制作用^[9]。由此可见,提高 cAMP 水平和激活 PKA 通路能够克服 MAG 和髓磷脂对神经元的抑制作用;神经元 cAMP 的升高能被 MAG 和髓磷脂通过激活抑制性的 G 蛋白来阻止。

1.2 发育过程中神经元内源性的 cAMP 与再生能力的改变

MAG 是髓磷脂中的一种成份,对轴突再生起着重要作用。对于不同发育阶段的神经元,MAG 既可以促进又能抑制轴突再生。对于视网膜神经节神经元(RGC)、脊髓神经元,这种转化发生在出生时,MAG 对胚胎期的 RGC 和脊髓神经元是促进作用,而出生后转化为强烈的抑制作用。对于 DRG 神经元,这种转化发生在生后 3~4d,迅速由促进转化为抑制作用^[9]。而且发育过程中 MAG 对很多其他不同神经元也由促进转化为抑制。

移植胚胎神经元在成年 CNS 中可以长距离再生,这说明幼稚的神经元内在能力与成熟的不同,不被 MAG 和髓磷脂所抑制。内源性的 cAMP 水平在胚胎期和新生神经元是高的,随着成熟而下降。PKA 抑制剂可以减少 MAG 和髓磷脂对幼稚神经元的促进作用,使新生大鼠脊髓传导束发育的可塑性明显降低。而 db-cAMP 能够阻断 MAG 和

第一作者简介:男(1972-),博士,副主任医师,研究方向:脊柱脊髓损伤

电话:(0451)53641918-5153 E-mail:qiqian999@sina.com

髓磷脂对成熟神经元的抑制作用。因此,神经元内源性 cAMP 水平发育性的降低可能调节了 MAG 和髓磷脂的促进-抑制的转化作用,也标志着再生能力的丢失^[4]。

1.3 cAMP 与“条件性损伤”作用的分子机制

Neumann 和 Woolf 研究坐骨神经支和脊髓背柱同时的横断损伤,虽然促进了损伤脊髓轴突在损伤区生长很远的距离,但仍旧没有超越损伤区。然而在脊髓背柱损伤前 1 周切断坐骨神经,大约 50% 的动物显示轴突长入并超越损伤区,大多数通过灰质,但也有相当数量的再生发生在白质。相比较之下,切断坐骨神经同时或提前两周切断脊髓背侧柱的促进效果较差。这意味着 DRG 神经元外周突(坐骨神经)损伤引起的分子改变增强了中枢轴突的再生能力,这种损伤也称作“条件性损伤”^[10]。进一步研究发现,切断坐骨神经后 1d, DRG 细胞内 cAMP 提高了 3 倍,1 周时降至对照组水平。体内通过导管应用 PKA 抑制剂 H89 作用于脊髓 DRG 细胞,“条件性损伤”的促进效果完全消失。这意味着“条件性损伤”促进了短暂的 cAMP 提高,激活 PKA 活性,引起一系列生物通路及信号的反应,促进了生长。将 db-cAMP 直接注入损伤区的 DRG 细胞,可以完全模仿“条件性损伤”的促进作用,引起了脊髓背侧柱上行感觉神经元轴突的再生^[11]。

1.4 脊髓及周围神经损伤后 cAMP 的变化

SCI 后 1d, cAMP 在脊髓组织下降 64.3%, 脑干下降 68.1%, 相应感觉运动皮质下降 69.7%, 这种情况至少持续 2 周, 而在与损伤无联系的脑组织没有发现 cAMP 的改变^[12], 这意味着 cAMP 水平的降低与轴突损伤有关。周围神经(如坐骨神经)挤压损伤后, 短时间内磷酸二酯酶(PDE)增高 3~3.5 倍, 至第 21~35 天时下降到 2 倍的水平, 致使 cAMP 水平降低; 坐骨神经内膜中发生显著变化的 PDE 同工酶是 PDE4 和 PDE1, 它们在损伤后均上调, PDE4 所起的水解 cAMP 作用远大于其他同工酶, 故对其特异性抑制能使 cAMP 明显增高。同时, 腺苷酸环化酶在损伤后 7d 活性降至正常的 19%, 因此合成下降、水解增加导致损伤后 cAMP 水平的降低^[13]。体外实验中, 髓磷脂蛋白抑制体外培养神经元突起生长的同时可降低胞内的 cAMP 水平。

这种重要的细胞内信号分子明显下降, 必定会引起细胞的一系列生物学变化。SCI 后细胞凋亡、脊髓萎缩、再生障碍等表现的一部分原因可能与此有关。

2 神经细胞中 cAMP 的生理作用机制

cAMP 是细胞内的第二信使, 联合细胞外 Ca^{2+} 信号改变酶、神经递质、多肽和受体的基因表达, 从而促成神经元形态和功能的改变。

cAMP 途径包括腺苷酸环化酶激活和通过钙调节蛋白或非通道的 G 蛋白结合受体引起的钙离子通道外流。受体的激活引起异源三聚体 G 蛋白耦联 GTP, 分解为腺苷酸环化酶。腺苷酸环化酶转化 ATP 为 cAMP, 而 cAMP 信号转导途径的关键是蛋白激酶-PKA, 它调节下游靶蛋白的

磷酸化和脱磷酸化。PKA 存在于细胞浆中, 由两个相同的催化亚基(C 亚基)和两个相同的调节亚基(R 亚基)组成, 胞浆 cAMP 浓度升高时, C 亚基和 R 亚基解离, 激活 PKA, 游离的 C 亚基除使细胞质组分磷酸化, 如 p75NTR^[4], 还进入细胞核, 对包括 cAMP 应答元件结合蛋白(CREB)在内的核内成分起磷酸化作用, CREB 位于细胞核内, 分子量 43kDa, 其转录激活是第 133 位的丝氨酸位的磷酸化。CREB 分子是多种蛋白激酶的磷酸化底物, 除 PKA 之外, 还包括钙离子依赖的蛋白激酶 PKC、酪蛋白激酶 CK-II 等, 故可以经过多种细胞内通道激活 CREB, 但主要是受 cAMP 通道和钙离子通道两大信使系统共同调控的。磷酸化后的 CREB 可增强多种靶基因的表达, 促进如 c-fos, jun-B、bcl-2、BDNF、NGF 等多种蛋白的基因转录, 从而抑制神经细胞凋亡, 促进细胞分化和再生, 而应用 CREB 的阻遏物可以促进神经细胞的凋亡。神经元再生比较集中的海马颗粒细胞下层及其附近有磷酸化 CREB 的高水平表达, CREB 能增强颗粒细胞神经元的整合和功能的可塑性^[14], 故可以推测 CREB 在细胞存活和神经元可塑性方面是个重要因素。

很多实验证实 cAMP 和 PKA 的激活是神经元再生通路的关键, 但其下游信号尚不十分清楚。Marie Filbin 科研小组对 cAMP 调节神经细胞生长的内在机制进行了一系列的实验研究, 他们发现 cAMP 升高引起 DRG 神经元在抑制性底物上生长是依赖于 CREB 的激活, 后者刺激基因转录, 导致精氨酸酶 I 的上调和下游多胺的合成。相似的, 神经营养因子和 db-cAMP 可使小脑神经元精氨酸酶 I 基因的转录, 下游多胺产物腐胺合成增加。有研究显示载有精氨酸酶 I 基因的腺病毒感染小脑神经元, 导致小脑神经元过表达精氨酸酶 I, 在表达 MAG 的 CHO 细胞表面和纯化髓磷脂上培养比对照组可产生更长的轴突; 而且如果药物阻断多胺合成途径, 神经营养因子和 db-cAMP 对神经元克服髓磷脂抑制作用的现象消失, 而如果补充下游多胺产物腐胺, 这一现象又恢复。精氨酸酶 I 的表达水平在成熟个体显著下降, 与 cAMP 水平下降相吻合, 也与 CNS 对神经元由促进到抑制过程相吻合^[15]。多胺在神经系统发育和损伤后轴突再生中起很多作用。其中最重要的是参与各种细胞骨架形成, 如微管的组装和骨架蛋白表达的调节。可能是直接影响骨架稳定性和重新排列, 因此阻止了髓磷脂的抑制作用。

目前研究的与神经再生有关的 cAMP/PKA 的作用还包括: (1) 调解体外培养神经生长锥的行为, 尤其对于导向因子的反应。(2) 通过抑制 Rho 活性的途径阻断抑制性信号在神经元内的传导, 神经元胞内 Rho-rock 途径对于调节几种抑制性蛋白引起的生长锥塌陷和回缩具有重要作用。PKA 磷酸化导致 Rho 失活, 阻止非神经细胞内应力纤维的形成。(3) 除了提高神经再生能力, 许多学者通过实验还证实 cAMP 具有促进多种神经元存活的功能^[16,17], 如 BDNF 对 RGC 细胞的保护作用依赖于细胞内 cAMP; 但也

有人发现它能抑制 PI3 激酶途径以对抗 BDNF 对皮质神经细胞的保护作用。提高 cAMP 水平可能的保护作用机制如下: (1) 增强神经营养因子的作用; (2) 通过 PKA 磷酸化神经细胞的钙离子通道阻止钙离子内流和钙超载; (3) 通过 MAPK-ERK 等途径参与抗凋亡作用^[18]; (4) 通过增强顺行或逆行的轴浆运输, 尤其胞体和轴突间的快速运输可以减缓轴突损伤的扩散; (5) 磷酸二酯酶 IV 抑制剂提高 cAMP 同时有强大的抗炎作用, 包括防止免疫细胞激活和炎症因子的产生等^[19]。

3 调控 cAMP 对脊髓损伤的影响

对于促进成年 CNS 损伤后再生, 人工调控 cAMP 水平可能是有效的治疗手段。动物 SCI 实验显示, cAMP 单独使用时损伤轴突可以长入损伤区, 但不能超越。cAMP 和 NT3 联合应用促使轴突超越损伤区。Schering 开发出来的一种磷酸二酯酶 IV 抑制剂——咯利普兰 (Rolipram) 再度被人们重视起来, 用于脊髓损伤的动物实验治疗。Damien 等通过单独或合并 dp-cAMP 使用 Rolipram 提高 SCI 后脊髓的 cAMP 水平, 甚至超过正常水平, 同时损伤部位移植雪旺细胞, 明显促进了轴突再生、再髓鞘化和运动功能^[12]。Elena 等^[20]应用神经干细胞移植联合 Rolipram 治疗脊髓损伤的大白鼠, 渗透性微泵皮下给药 10d, 伤后 6~8 周后观察结果, 大白鼠运动功能恢复, 与对照组差异显著, 而且反应性星型细胞形成的胶质瘢痕明显减少。cAMP-CREB 通路功能及其介导的神经营养因子表达可能是调节神经元再生关键性环节之一。

总之, 内源性 cAMP 水平调解着神经元对 CNS 环境的反应, 幼稚神经元 cAMP 水平高并随着发育成熟而下降, 伴随发生的是神经元再生能力的逐渐消失。成年神经元 cAMP 的提高会增加其生长能力和克服 MAG 和髓磷脂的抑制作用。尽管这条途径尚不完全清楚, 但目前这些发现提供了许多治疗干预的潜在目标, 进一步探索将有助于阻断 CNS 损伤后成年 CNS 环境的抑制信号。

4 参考文献

- Monnier PP, Sierra A, Schwab JM, et al. The Rho/ROCK pathway mediates neurite growth inhibitory activity associated with the chondroitin sulfate proteoglycans of the CNS glial scar[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 22(3): 319-330.
- Chen MS, Huber AB, vander Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1 [J]. *Nature*, 2000, 403 (6768): 431-439.
- Berry M, Carlile J, Hunter A. Peripheral nerve explants grafted into the vitreous body of the eye promote the regeneration of retinal ganglion cell axons severed in the optic nerve[J]. *J Neurocytol*, 1996, 25(2): 147-170.
- Tim S, Marie T, Filbin A. A role for cAMP in regeneration of the adult mammalian CNS[J]. *J Anat*, 2004, 204(1): 49-55.
- Qiu J, Cai D, Filbin MT, et al. A role for cAMP in regeneration during development and after injury [J]. *Prog Brain Res*, 2002, 137(1): 381-387.
- Song H, Ming G, He Z, et al. Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides[J]. *Science*, 281(5382): 1515-1518.
- Ming GL, Song HJ, Berninger B, et al. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1[J]. *Neuron*, 1997, 19(6): 1225-1235.
- Cai D, Qiu J, Cao Z, et al. Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(13): 4731-4739.
- Ying G, Elena N, Wilfredo M, et al. Neurotrophins elevate cAMP to reach a threshold required to overcome inhibition by MAG through extracellular signal-regulated kinase-dependent inhibition of phosphodiesterase [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(37): 11770-11777.
- Neumann S, Woolf CJ. Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury[J]. *Neuron*, 1999, 23(1): 83-91.
- Neumann S, Bradke F, Tessier L, et al. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation[J]. *Neuron*, 2002, 34: 885-893.
- Damien D, Francisco C, Alexander E, et al. cAMP and schwann cell promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury[J]. *Nature medicine*, 2004, 10(6): 610-616.
- Randall S, Walikonis J, Joseph F, et al. Activity of cyclic AMP phosphodiesterases and adenylyl cyclase in peripheral nerve after crush and permanent transection injuries [J]. *Biol Chem*, 1998, 273(15): 9070-9077.
- Haruhisa H, Toshihide Y, Hideki Y, et al. PKA phosphorylates the p75 receptor and regulates its localization to lipid rafts [J]. *EMBO J*, 2003, 22(8): 1790-1800.
- Jacek J, Barbara M, Amelia S, et al. Inducible cAMP early repressor, an endogenous antagonist of cAMP responsive element-binding protein, evokes neuronal apoptosis in vitro[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(11): 4519-4526.
- Tsutomu S, Kazuo K, Emi O, et al. The phosphodiesterase inhibitor rolipram promotes survival of newborn hippocampal neurons after ischemia[J]. *Stroke*, 2007, 38(5): 1597-1605.
- GM Rose, A Hopper, MDe Vivo, et al. Phosphodiesterase inhibitors for cognitive enhancement [J]. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(26): 3329-3334.
- Bing G, Ottavio V, Fabrizio T, et al. Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(11): 1624-1634.
- Heleen C, Anne-Christine T, Patricia S, et al. Phosphodiesterase 4 inhibitors reduce human dendritic cell inflammatory cytokine production and Th1-polarizing capacity [J]. *Int Immunol*, 2003, 15(7): 827-835.
- Elena N, Lille T, Hai ND, et al. The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery [J]. *PNAS*, 2004, 101(23): 8786-8790.

(收稿日期: 2008-12-15 修回日期: 2009-03-11)

(本文编辑 彭向峰)