

nogo 基因及其相关蛋白与中枢神经再生的研究进展

丁月霞, 李林

[关键词] Nogo 蛋白; Nogo66 受体; 神经再生; 综述

中图分类号: R741 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)03-0224-02

[本文著录格式] 丁月霞, 李林. nogo 基因及其相关蛋白与中枢神经再生的研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(3): 224-225.

哺乳动物体内大部分组织如肌肉、皮肤、肝脏和外周神经损伤后均有很强的再生能力,而大脑和脊髓组成的中枢神经系统(CNS)却很难再生,损伤后的轴突及神经元几乎不能再生,导致损伤后功能迟迟不能恢复。CNS 缺乏自我再生和修复能力一直是神经科学界的难点和热点。目前认为,成熟的 CNS 极其微弱的再生能力主要与内、外两方面的因素有关:①CNS 神经元自身缺乏足够的再生能力;②CNS 神经元所生存的环境中各种外源性生长促进性和抑制性因子的影响^[1]。目前,人们已经在 CNS 髓磷脂中分离出了多种抑制神经再生的因子,其中 Nogo 蛋白(勿动蛋白)是最重要的因素之一。随着 nogo 基因克隆成功,为 Nogo 蛋白的研究铺平了道路,也为中枢神经系统的损伤修复带来新的希望。本文主要就 nogo 基因及其产物的研究概况及其在中枢神经系统损伤后神经再生修复方面可能的应用前景进行综述。

1 nogo 基因的发现

Nogo 的研究可追溯到 20 世纪 80 年代。Schwab 等首次用 SDS-PAGE 从大鼠的脊髓髓磷脂中分离获得两种轴突抑制性活性成分 NF-35 和 NF-250;这两种蛋白对轴突生长都有很强的抑制作用。其特异性抗体能和这两种蛋白结合,并拮抗髓鞘崩解产物对轴突再生的抑制作用^[2]。随后,该研究组制备出针对 NF-250 的单克隆抗体 1N1,1N1 在体外可阻断少突胶质细胞和髓鞘对轴突生长的抑制,在体内可增强脊髓损伤大鼠损伤部位受损轴突的再生,并出现明显的功能恢复,由此推测髓鞘中可能存在抑制轴突生长的分子^[3]。2000 年,得益于对牛的 bNF-220 蛋白(NF-250 的同源物)6 个肽段的分析,Chen、Gramdppe 和 Prinjha 所在的 3 个实验室几乎同时分别克隆出大鼠和人类抑制受损轴突再生的基因——nogo 基因^[4-6]。

2 Nogo 蛋白的结构及分布

2.1 Nogo 蛋白的结构 nogo 基因的表达产物称为 Nogo 蛋白,Nogo 蛋白是 CNS 髓鞘中具有抑制神经生长活性的跨膜蛋白。由于使用不同的启动子与 mRNA 的不同拼接,nogo 基因(在人类位于染色体 2p14-p13)有 3 个 mRNA 转录体,它们所编码的蛋白质为三种同型异构体:NogoA、NogoB 和 NogoC。人的 NogoA(hNogoA)由 1192 个氨基酸残基组成,相当于大鼠的 NF-250;与 NogoA 相比,NogoB 由 360 个氨基酸残基组

成,缺少了 186~1004 残基,相当于大鼠的 NF-35;而 NogoC 由 199 个氨基酸残基组成,分子量最小,相当于以前所描述的大鼠的 vp20 和 foccens^[5-6]。这 3 种蛋白质的氨基端没有同源性,也缺乏通常可作为信号序列的疏水氨基酸肽段。但 3 者有一共同的羧基端(含 188 个氨基酸),靠近羧基端,有 2 个长度分别为 35 和 36 个氨基酸的疏水结构域,即跨膜区;表位作图(epitope mapping)研究表明,2 个跨膜区被一包含 66 个氨基酸残基的亲水结构域分开,这一序列称为 Nogo66,与主要定位于内质网的浆膜蛋白家族有很高的同源性^[6];另外,3 种 Nogo 蛋白在其羧基端均含有一对赖氨酸内质网驻留(retention)信号。故认为 Nogo 蛋白是网状蛋白质家族(reticulon protein, Rtn)的第 4 个成员——Rtn4A。对 NogoA 的进一步分析发现,它有两个完全独立的结构域:Nogo66 和 aminNogo。Nogo66 是指上述两个跨膜区之间的序列,aminNogo 包括从 Nogo 氨基端到第一个疏水区的氨基酸序列,两者都具有独立的抑制活性^[7]。

2.2 Nogo 蛋白的分布 在成年哺乳动物体内,最初发现 NogoA 主要分布于 CNS 少突胶质细胞内质网,只有极少量位于少突胶质细胞表面,在某些神经细胞膜上或细胞内也有表达。NogoB、NogoC 的分布较 NogoA 广泛,除 CNS 外,两者在外周组织如软骨、皮肤及骨骼肌中也有低水平的分布。Josephson 等研究发现,在脊髓运动神经元、海马、前脑皮质、红核、三叉神经节和三叉神经脑桥核等都有 Nogo mRNA 表达,但在星形胶质细胞和雪旺氏细胞中未见分布^[8]。Jin 等采用 Western blot、免疫组织化学方法和免疫金电子显微镜技术证实,在脑和脊髓组织的细胞核、细胞质和细胞器有 NogoA 广泛分布^[9]。细胞表面的 NogoA 仅占总的细胞 NogoA 的 1%,大量的 NogoA 位于少突胶质细胞内,以一种未处理的前体的形式存在^[10]。Hasegawa 等^[11]采用原位杂交组织化学方法发现,NogoA mRNA 广泛存在于中枢神经系统神经元和少突胶质细胞中,Nogo 蛋白与 nogo 基因分布一致。

3 Nogo 蛋白受体(NgR)的结构及分布

3.1 NgR 的结构 Strittmatter 等运用碱性磷酸酶融合技术,通过筛选转入 COS-7 细胞的小鼠脑 cDNA 文库,首次识别出 Nogo66 的特异性受体 NgR^[12]。此蛋白质包含 473 个氨基酸残基,氨基端有一易位信号序列,其后为 8 个富含亮氨酸的重复序列(LRR),羧基端含丰富的半胱氨酸,与糖基化磷酸肌醇(GPI)相连。NgR 分子通过 GPI 结构固定于细胞膜表面,分子序列中不存在跨膜的成分。GPI anchor 结构的存在提示胞膜上可能还存在着其他受体亚单位,与 NgR 协同作用,向胞浆内转导 Nogo66 细胞生长抑制信号。研究发现,p75^{NTR}是 NgR 的复合受体亚单位^[13-14],已知 p75^{NTR}是神经生长因子受体即酪氨

基金项目:国家重点基础发展计划 973 计划项目(2003CB517104);国家自然科学基金项目(30472184);北京市自然科学基金项目(7032013,7050001);北京市科技计划项目(D0204003000031)。

作者单位:首都医科大学宣武医院药物研究室,教育部神经变性病重点实验室,北京市 100053。作者简介:丁月霞(1981-),女,山东冠县人,硕士研究生,主要研究方向:神经药理学。通讯作者:李林。

酸激酶受体 trk 家族的一种复合体, $p75^{NTR}$ -NgR 形成的受体复合物将细胞外的抑制信号跨膜转运进入靶神经元内。

3.2 NgR 的分布 NgR 在 CNS 中分布广泛, 灰质中含量较高, 大脑皮层、海马、脑桥、小脑蒲肯野细胞也有分布, 但不存在于少突胶质细胞。在外周组织中, 只有心脏和肾脏有极少量的分布。人类的 NgR 与小鼠 NgR 有 89% 的同源性, 其基因的外显子位于 22q11 染色体上。Hasegawa 等采用原位杂交方法研究发现, NgR mRNA 与 Nog α mRNA 表达不一致, NgR mRNA 主要在海马、大脑皮质、丘脑核、松果体、嗅球、杏仁核等部位表达, 在海马锥体细胞和颗粒细胞中有阳性反应, 在中间神经元却没有表达^[11]。

4 Nogo 蛋白在 CNS 再生中的抑制性作用及其作用机制

4.1 Nogo 蛋白在 CNS 再生中的抑制性作用 Nog α A 是 CNS 神经元轴突生长抑制因子, 主要由少突胶质细胞表达的整合膜蛋白, 在体内和体外都表现出强烈的抑制轴突生长的作用^[4,6]。为了分析中枢神经系统髓鞘抑制轴突生长时 Nog α A 的可能作用, Schwab 等使用了 AS472 (Nog α A 特异性抗血清)、AS Bruna (抗 3 种 Nogo 的抗血清)、髓鞘、髓鞘蛋白提取物和 α 池物质 (α pool material, 髓鞘提取物, 富含牛 NF-220), 研究其对成纤维细胞和背根神经节 (DRG) 轴突生长的影响, 结果显示, 单克隆抗体 NF-1 对 Nog α A 有中和作用, Nog α A 有抗血清的抑制作用^[4]。Wiessner 等应用一种提纯的单克隆抗体 Nog α A 抗体 (7B12) 治疗脑卒中的大鼠, 取得了明显的疗效^[15]。

Nog α B 与 Nog α C 的功能目前研究较少。Kim 等研究发现, Nog α C 在转基因鼠中可以抑制神经轴突的再生^[16]。但由于这两者分布较广, 其作用靶点可能不仅限于 CNS 中。曾发现一种基因 ASY, 其异位表达能有效诱导各种肿瘤细胞凋亡。研究表明, ASY 编码的蛋白即为 Nog α B, 诱导凋亡的区域主要位于第 2 个跨膜的疏水结构域, 具体作用机制尚不清楚^[17]。最近发现, Nog α B 参与调整上皮细胞和血管平滑肌细胞对刺激的反应^[18]。

4.2 Nogo 蛋白的作用机制 实验表明, NgR 是 Nog α 66 的一种功能性细胞表面受体, 两者的特异性结合介导了 Nog α 66 的中枢神经抑制活性^[19]。CNS 髓磷脂中另外 2 种轴突生长抑制性蛋白——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) 与 Nog α 66 均通过 NgR 及其相连的受体复合物 $p75^{NTR}$ -NgR 发挥作用, NgR 的表达使得对 MAG、OMgp 和 Nog α 66 不敏感神经元转为敏感状态; 然而, amin α -Nogo 却不与 NgR 结合, 其作用机制不明^[20]。因此 NgR 似乎是 CNS 髓磷脂中各种轴突生长抑制性蛋白发挥作用的集中点。

Nog α 66 的受体 NgR 先与 $p75^{NTR}$ 形成复合物, 然后与 Nog α 66, 以及 MAG 与 OMgp 结合, 通过第二信使 cAMP 和 Ca^{2+} , 启动下游 Rho/ Rock 信号通路; Rho GDI 与 $p75^{NTR}$ 结合后, RhoA 即从 Rho GDI 的抑制中释放, RhoA 去磷酸化被激活^[21], 然后对生长锥中的微丝进行调节, 导致生长锥塌陷及神经突起生长的抑制。但 Nogo 蛋白与 NgR、 $p75^{NTR}$ 、cAMP、Rho 之间具体的作用方式、是否有其他因子参与等仍需要进一步研究明确。

5 小结

Nogo 蛋白是一种主要表达于中枢神经系统髓鞘中的蛋白质。中枢神经损伤后, Nogo 蛋白与 $p75^{NTR}$ -NgR 受体复合物结

合, 发挥抑制神经再生的作用。Nogo 基因及相关蛋白与 NgR 的发现, 为研究中枢神经系统损伤后再生的机制奠定了基础, 为中枢神经系统的损伤修复带来了新的希望。在此基础上建立 Nogo 或 NgR 基因敲除模型, 将为中枢神经再生研究提供新的思路 and 手段。与 Nogo 相关的基因和药物治疗将成为 CNS 损伤后促进神经再生修复及抗肿瘤的新的潜在手段。

[参考文献]

- [1] Perry AB, Flanagan JG. Nogo domains and a Nogo receptor: implications for axon regeneration[J]. *Neuron*, 2001, 30(1): 11-14.
- [2] Caroni P, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibiting properties for neurite growth and fibroblast spreading[J]. *J Cell Bio*, 1988, 106(4): 1281-1288.
- [3] Ng CE, Tang BL. Nogos and the Nog α 66 receptor: factors inhibiting CNS neuron regeneration[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 67(5): 559-565.
- [4] Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nog α A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. *Nature*, 2000, 403(6768): 434-439.
- [5] Prinjha R, Moore SE, Vinson M, et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans[J]. *Nature*, 2000, 403(6768): 383-384.
- [6] Grandpre T, Nakamura F, Vartanian T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein[J]. *Nature*, 2000, 403(27): 439-444.
- [7] Goldberg JL, Barres BA. Neurobiology: Nogo in nerve regeneration[J]. *Nature*, 2000, 403(6768): 369-370.
- [8] Josephson A, Widenfalk J, Widmer H W, et al. Nogo mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury[J]. *J Exp Neurol*, 2001, 169(2): 319-328.
- [9] Jin WL, Liu YY, Liu HL, et al. Intraneuronal location of Nog α A in the rat[J]. *J Comp Neurol*, 2003, 458(1): 1-10.
- [10] Oertle T, van der Haar ME, Bandtlow CE, et al. Nog α A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(13): 5393-5406.
- [11] Hasegawa T, Ohno K, Sano M, et al. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding Nog α A and Nog α receptor in the rat central nervous system[J]. *Mol Brain Res*, 2005, 133(1): 119-130.
- [12] Fournier AE, Grandpre T, Strittmatter SM, et al. Identification of a receptor mediating Nog α 66 inhibition of axonal regeneration[J]. *Nature*, 2001, 409(6818): 341-346.
- [13] Wong ST, Henley JR, Kanning KC, et al. A $p75^{NTR}$ and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin associated glycoprotein[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(12): 1302-1308.
- [14] Mi S, Lee X, Shao Z, et al. LINGO-1 is a component of the Nog α 66 receptor/ $p75$ signaling complex[J]. *Nat Neurosci*, 2004, 7(3): 221-228.
- [15] Wiessner C, Bareyre FM, Allegrini PR, et al. Anti-Nog α A antibody infusion 24 hours after stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(2): 154-165.
- [16] Kim JE, Bonilla IE, Qiu D, et al. Nog α C is sufficient to delay nerve regeneration[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 23(3): 451-459.
- [17] Li Q, Qi B, Oka K, et al. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nog α B to human cancer[J]. *Oncogene*, 2001, 20(30): 3929-3936.
- [18] Acevedo L, Yu J, Erdjument-Bromage H, et al. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling[J]. *Nat Med*, 2004, 10(4): 382-388.
- [19] Gehler S, Gallo G, Veien E, et al. $p75$ neurotrophin receptor signaling regulates growth cone filopodial dynamics through modulating RhoA activity[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(8): 4363-4372.
- [20] Woolf CJ, Bloechlinger S. It takes more than two to Nogo[J]. *Science*, 2002, 297(5584): 1132-1134.
- [21] Niederost B, Oertle T, Fritsche J, et al. Nog α A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(23): 10368-10376.

(收稿日期: 2005-12-08)