

Nogo 在视神经损伤后再生中的研究进展

唐永赢, 马林昆, 曹霞

基金项目: 国家自然科学基金地区基金 (No. 31160206)
作者单位: (650101) 中国云南省昆明市, 昆明医科大学第二附属医院
作者简介: 唐永赢, 硕士, 研究方向: 眼底病。
通讯作者: 马林昆, 硕士, 教授, 院长, 研究方向: 眼底病. mlk_ynkm@163.com
收稿日期: 2013-04-30 **修回日期:** 2013-08-16

Progress in research of Nogo after optic nerve injury

Yong-Ying Tang, Lin-Kun Ma, Xia Cao

Foundation item: National Natural Science Foundation Area (No. 31160206)

The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China

Correspondence to: Lin-Kun Ma. The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, Yunnan Province, China. mlk_ynkm@163.com

Received: 2013-04-30 Accepted: 2013-08-16

Abstract

• After mammalian peripheral nerve injury, axons can regenerate very long distance. In certain conditions, the central nervous system can also partially regenerate after damage. Nogo has been proved to be one of the myelin-associated inhibitors, after central nerve injury increased Nogo release, enhanced Nogo expression, start-up process of apoptosis, leading to neuronal death. In this paper, we summed up the mechanism of action of Nogo from Nogo-A, Nogo-66, soluble NgR fragments, RhoA enzyme and Rho-A/Rho kinase signaling pathway, calcium ion aspects, and discussed its application prospect in nerve regeneration after optic nerve injury.

• **KEYWORDS:** Nogo; optic nerve injury; nerve regeneration

Citation: Tang YY, Ma LK, Cao X. Progress in research of Nogo after optic nerve injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(9):1782-1784

摘要

哺乳动物外周神经损伤后轴突能再生很长距离。在一定条件下, 中枢神经系统受损后也能部分再生。Nogo 是一种已经被证实的髓鞘相关抑制因子, 中枢神经损伤后 Nogo 释放增加、表达增强, 启动神经元凋亡过程, 导致神经元死亡。我们从 Nogo-A, Nogo-66, 可溶性 NgR 片段、RhoA 酶与 Rho-A/Rho 激酶信号通道、钙离子几个方面综

述 Nogo 的作用机制, 并探讨其在视神经损伤后神经再生中的应用前景。

关键词: Nogo; 视神经损伤; 神经再生

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2013.09.12

引用: 唐永赢, 马林昆, 曹霞. Nogo 在视神经损伤后再生中的研究进展. 国际眼科杂志 2013;13(9):1782-1784

0 引言

和其他中枢神经系统一样, 哺乳动物成熟视神经节细胞不能在富含髓磷脂蛋白的环境中再生, 其再生失败的主要原因是中枢神经系统髓磷脂相关蛋白抑制作用和损伤部位形成的瘢痕组织^[1]。髓磷脂相关蛋白根据结构不同可分为 Nogo、少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白、髓磷脂相关糖蛋白, 目前以 Nogo 的研究较多、较为透彻。Nogo 是一种已经被证实的髓磷脂相关抑制因子, Nogo 蛋白及其受体被认为是中枢神经系统受损后神经元存活和再生的重要抑制因素之一。中枢神经损伤后 Nogo 释放增加、表达增强, 启动神经元凋亡过程, 导致神经元死亡。本文就 Nogo 结构、分布、作用机制作一综述, 并探讨在视神经损伤后再生中应用前景。

1 Nogo 的分布和结构

Nogo 是一种非常古老的内质网基因家族, 广泛见于所有的真核生物, 包括植物和真菌^[2]。陈春林等^[3]在大鼠身上发现 Nogo 主要定位于少突胶质细胞, 同时低表达于丘脑神经核、颅神经核和小脑半球浦肯野细胞层。Nogo 基因编码长度为 3 489bp, 转录三种 mRNA, 编码的氨基酸长度分别为 1163aa, 360aa, 199aa, 分别对应三种蛋白质 Nogo-A, B, C^[4]。Nogo-A 是一个富含酸性氨基酸和脯氨酸的蛋白质, 相对分子量为 126 000。Huber 等^[5]采用 Northern 和 Western-blot 方法分析显示, Nogo-A 主要表达于中枢神经系统少突胶质细胞胞体副轴突深部和髓鞘膜外面, 同时低表达于睾丸和心脏; Nogo-B 表达较为广泛, 见于中枢、外周神经系统和外周组织; Nogo-C 主要见于骨骼肌、脑组织, 心脏也见其表达。

在 Nogo 分子的羧基末端两个跨膜片段之间是由 66 个氨基酸残基组成的环状结构, 称为 Nogo-66。在体外培养系统中, Nogo-A 分子的酸性氨基端和 Nogo-66 片段都表现出强烈的抑制突触生长的活性。

在眼部组织, 马建洲等^[6]通过免疫荧光组织化学方法研究发现, 在大鼠视网膜及视神经中 Nogo-A/B 见于神经纤维层、节细胞层、内网层、外网层、外核层, 尤其以节细胞层、内核层和外核层明显; 而 Nogo-C 在神经纤维层、节细胞层、内网层、内核层表达较为强烈, 外网层、外核层有少量表达。

2 Nogo 功能和作用机制

目前研究认为,Nogo 是主要神经生长抑制因子,但其作用机制尚不完全明确,认为神经损伤后强烈的抑制再生活动与 Nogo-A, Nogo-66,可溶性 NgR 片段、RhoA 酶与 Rho-A/Rho 激酶信号通道、钙离子浓度密切相关。

2.1 Nogo-A Huber 等^[5]发现 Nogo-A 主要表达于发育中的小脑、大脑皮层、脊髓的发育成熟期和分裂期神经元细胞,提示 Nogo-A 可能在神经生长发育过程中起着重要作用。相比于哺乳动物,斑马鱼视神经损伤后能再生并能恢复视功能,其原因可能是斑马鱼缺乏哺乳动物 Nogo 家族中抑制生长的 Nogo-A^[7]。Nogo-A 在外周神经髓鞘不能检测出。通过调控 Nogo-A 在外周神经雪旺细胞转基因表达,发现外周神经轴突再生能力和功能恢复有所减弱,说明其在体内具有抑制轴突再生的潜能^[8]。

李晓双等^[9]建立兔视神经夹持伤模型,发现损伤后 3d 视神经的 Nogo-A 表达明显高于正常视神经,于损伤后 7d 达高峰,而视网膜在损伤后 7d 有比较明显的阳性反应。视神经损伤后,视神经及视网膜均可见 Nogo-A 阳性表达,且 Nogo-A 阳性表达随时间后延呈上升趋势,以损伤区域附近更明显,说明 Nogo-A 在视神经损伤后起抑制轴突生长作用。

Zagrebelsky 等^[10]研究提示,Nogo-A 与生长锥接触后,紧接着会释放一个停止信号,可以使轴突的生长相关基因发生强烈的下调作用。通过小的 iRNA 敲出神经元 Nogo-A 导致轴突明显的生长^[11],也说明 Nogo-A 具有抑制轴突再生的作用。

2.2 Nogo-66 Nogo-66 是脑内特有、富含亮氨酸重复序列、有高度亲和力的水溶性片段。GrandPre 等^[12]研究发现,Nogo 蛋白羧基端和氨基端在膜内,而胞膜外是由 66 个氨基酸组成的残基链,在 Nogo-A, C 中都可以检测到这一完全独立的、且具抑制活性的结构域 Nogo-66,他们认为正是由于这 66 个氨基酸残基的存在,才使 Nogo-A, B, C 都具有神经抑制活性。Abdesselem 等^[7]认为 Nogo-66 是斑马鱼的第二抑制信号,其组成结构 70% 与哺乳动物 Nogo-66 相一致,在斑马鱼身上删除 Nogo-66 可致斑马鱼视神经轴突损伤后不能再生及功能恢复。

2.3 水溶性 NgR 片段 Nogo-66 需与其受体水溶性 NgR (Nogo-66 Receptor) 片段结合后才能发挥作用。NgR 是由 443 个残基糖基磷脂酰肌醇连接而成的、富含亮氨酸的糖蛋白。NgR 广泛分布于脑内,如大脑皮质、海马、脑桥、小脑等的少突胶质细胞和髓磷脂中,在视神经中主要由少突胶质细胞合成^[5]。断开轴突表面 NgR 与其他糖磷脂酰肌醇蛋白的连接而造成 Nogo 不能发挥抑制作用^[12]。Nogo-66 的轴突再生抑制作用主要通过其受体 NgR 介导^[13],诱导生长锥塌陷,对 Nogo-66 不起反应的神经元在转染表达 NgR 的载体后会对 Nogo-66 起反应,NgR 缺失于胚胎期及胎儿期大脑^[14],这也从侧面说明 NgR 具有生长抑制作用。

NgR 不仅是 Nogo-66 的受体,同时也是髓磷脂相关糖蛋白和少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白的受体,结合后具有抑制成熟中枢神经元轴突再生及诱导生长锥溃变的作用^[15]。在中枢神经系统受损时,如阻断 Nogo 与 NgR 的相互结合可促进其恢复^[1]。转基因方法或病毒抑制 NgR 的功能可导致体内轴突萌芽。Li 等^[16]分离提纯 NgR Fc 片段蛋白注入胸部大部分切断的背神经髓鞘内,能诱发小鼠皮质脊髓和脊髓纤维轴突再生,以及脊髓电活动的部分恢

复,说明水溶性 NgR 片段能促进轴突再生和运动功能恢复。

在巨噬细胞源性因子的作用下,用可以表达 NgR 的腺病毒载体转染视神经节细胞,可以成倍增加再生的视神经节细胞轴突数量^[1]。

2.4 RhoA 酶与 Rho-A/Rho 激酶信号通道 NgR 需与 p75NTR(p75 神经营养因子受体)协同作用才能传递抑制信号^[17]。研究发现,p75 能够与 NgR 形成受体复合物,p75 TR 可能是作为 NgR 的一个协同受体参与髓磷脂的抑制作用。由于抑制轴突再生的共同起关键作用的信号通路是 p75 受体复合物刺激 RhoA 酶的活化,有学者用 C3 转移物和 Y27632(一种合成的 RhoA 酶抑制蛋白)分别抑制 RhoA 酶与 Rho-A/Rho 激酶,发现均能阻滞 Nogo 的抑制活性^[18]。当 Nogo-66 与 NgR 结合后,抑制信号经 NgR, p75NTR 和 LINGO-1(中枢神经系统特异的跨膜蛋白)组成的复合受体传入细胞内,激活 Ras 家族的 RhoA,通过 Rho-A/Rho 激酶作用引起肌动蛋白解聚,导致生长锥塌陷,使轴突再生被抑制^[19]。Bandtlow 等^[20]认为 Nogo-66,少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白和髓磷脂相关糖蛋白通过活化 RhoA 酶而具有神经细胞抑制作用,这些作用与 LINGO-1-NgR-p75NTR 复合体相关。

2.5 Nogo 基因删除 Su 等^[21]使用 20 只 Nogo-A/B/C 基因删除小鼠作为实验组,20 只正常小鼠作为对照组。提取视神经节细胞分离提纯并培养,然后进行细胞免疫染色,用计算机图像分析仪对视神经节细胞轴突生长进行计算,结果发现在每一个时间观察点实验组的轴突生长均较对照组活跃。从而认为 Nogo 基因在视神经损伤后轴突生长中起着抑制作用,Nogo-A/B/C 基因删除是一种消除抑制并促进轴突生长的可行方法。

2.6 钙离子 熊南翔等^[22]利用激光共聚焦显微镜技术,检测 Nogo-A 作用于小脑颗粒细胞后不同时间点细胞内钙离子的浓度,并观察加入钙通道阻滞剂尼莫地平对 Nogo-A 抑制轴突生长的影响,结果小脑颗粒细胞内钙离子浓度升高发生于加入 Nogo-A 后 5min,在 30min 时达到最高,然后逐渐下降,2h 后恢复至正常水平。同时加入尼莫地平组的轴突生长与对照组相比有显著差异,说明钙离子可能参与了 Nogo-A 抑制轴突生长活动。

3 展望 Nogo 在视神经损伤后再生中的应用前景

视神经从胚胎发育和解剖上均属于中枢神经系统一部分,无施万细胞,损伤后不能再生。在闭合性颅脑损伤患者中,外伤性视神经病占 0.3% ~ 5%^[23]。视神经损伤后往往能造成不可逆的视神经节细胞凋亡,目前有视神经管减压、激素冲击等对因治疗方法,但对其视功能预后较差。Nogo 的研究发现为视神经损伤修复带来了希望。

研究证明,可通过 Nogo-A/B/C 基因删除、抑制可溶性 NgR 片段、阻碍 Rho-A/Rho 激酶信号通道、提高钙离子浓度、抑制 Nogo-66 等方法消除 Nogo 抑制活动,而促使中枢神经轴突再生。视神经作为中枢神经系统的一部分,理论上也可通过上述方法而促进视神经损伤后的再生及视功能的恢复。

Wang 等^[24]对 Nogo 和 NgR 在小鼠胚胎视路的表达进行研究,发现 Nogo 和 NgR 的相互作用对视神经节细胞的轴突定向生长进入视交叉具有重要意义。程茗^[25]通过原核表达纯化了 Nogo-66 蛋白,以壳聚糖(chitosan, CS)为佐剂,制备 Nogo-66 蛋白疫苗(Nogo-66-CS)。大鼠接种

Nogo-66-CS 疫苗后可激活黏膜免疫和系统免疫,并诱导视网膜小胶质细胞活化,可促进视网膜视神经损伤后 RGCs 的存活和再生。Nogo-66 蛋白眼用疫苗接种后,还可诱导 GDNF 和 BDNF 等视网膜神经营养因子表达上调,对受损的视网膜视神经起到了保护作用。

动物模型中,研究 Nogo 基因抑制作用机制,阻碍相关抑制因素而促进中枢神经轴突再生对视神经损伤后再生具有很大的启发及指导意义,为临床视神经损伤的治疗带来希望,但其临床应用还需更多、更深的研究。

参考文献

- 1 Fischer D, He Z, Benowitz LI. Counteracting the Nogo receptor enhances optic nerve regeneration if retinal ganglion cells are in an active growth state. *J Neurosci* 2004;24(7):1646-1651
- 2 Oertle T, Klinger M, Stuermer CAO, et al. A reticular rhapsody: phylogenic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. *FASEB J* 2003;17(10):1238-1247
- 3 陈春林,叶剑,张巍. Nogo-66 受体 mRNA 在成年大鼠视神经中的表达及意义. *中华眼底病杂志* 2005;21(4):246-248
- 4 Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000;403(6768):434-439
- 5 Huber AB, Weinmann O, Brösamle C, et al. Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J Neurosci* 2002;22(9):3553-3567
- 6 马建洲,贺翔鸽,谢琳,等. Nogo 蛋白在正常大鼠视神经视网膜的表达. *国际眼科杂志* 2006;6(6):1302-1304
- 7 Abdesselem H, Shypitsyna A, Solis GP, et al. No Nogo66- and NgR-mediated inhibition of regenerating axons in the zebrafish optic nerve. *J Neurosci* 2009;29(49):15489
- 8 Pot C, Simonen M, Weinmann O, et al. Nogo-A expressed in Schwann cells impairs axonal regeneration after peripheral nerve injury. *J Cell Biol* 2002;159(1):29-35
- 9 李晓双,王亚南,鞠学红,等. 兔视神经损伤后 Nogo 受体在视神经及视网膜的表达变化. *潍坊医学院学报* 2008;30(4):332-334
- 10 Zagrebelsky M, Buffo A, Skerra A, et al. Retrograde regulation of growth-associated gene expression in adult rat Purkinje cells by myelin-associated neurite growth inhibitory proteins. *J Neurosci* 1998;18:7912-7929
- 11 Peng X, Zhou Z, Hu J, et al. Soluble Nogo receptor down-regulates expression of neuronal Nogo-A to enhance axonal regeneration. *J Biol*

- Chem* 2010;285(4):2783-2795
- 12 GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000;403(6768):439-444
- 13 Fournier AE, Grandpre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 2001;409(6818):341-346
- 14 Wang X, Chun SJ, Treloar H, et al. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci* 2002;22(13):5505-5515
- 15 Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, et al. Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *FASEB J* 1996;10(11):1296-1302
- 16 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 Neurosci* 2004;24(46):10511-10520
- 17 Wang KC, Kim JA, Sivasankaran R, et al. p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 2002;402:74-78
- 18 Wong ST, Henley JR, Kanning KC, et al. A p75NTR and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci* 2002;5(12):1302-1308
- 19 尹小磊,叶剑,陈春林. 中枢神经损伤再生修复去抑制作用的研究. *国际眼科杂志* 2007;7(1):154-156
- 20 Bandtlow C, Dechant G. From cell death to neuronal regeneration, effects of the p75 neurotrophin receptor depend on interactions with partner subunits. *Sci STKE* 2004;2004(235):pe24
- 21 Su Y, Wang F, Zhao S, et al. Axonal regeneration after optic nerve crush in Nogo-A/B/C knockout mice. *Mol Vis* 2008;14:268-273
- 22 熊南翔,赵洪洋,张方成,等. 钙离子参与 Nogo-A 抑制轴突生长的作用. *解剖学报* 2005;36(6):582-585
- 23 Kountakis SE, Maillard AA, Eiharazi SM, et al. Endoscopic optic nerve decomposition for traumatic blindness. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;123(1):34-37
- 24 Wang J, Chan CK, Taylor JSH. Localization of Nogo and its receptor in the optic pathway of mouse embryos. *J Neurosci Res* 2008;86(8):1721-1733
- 25 程茗. Nogo66 蛋白眼用疫苗对大鼠高血压和视神经损伤的免疫保护作用及机制研究. 第三军医大学 2009