

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00670

• 综 述 •

# 以 Nogo 蛋白及其受体为靶点促进神经再生的研究进展

朱庄臣,倪 斌\*

第二军医大学长征医院骨科,上海 200003

**[摘要]** 大量基础研究表明,哺乳动物中枢神经系统(CNS)损伤后神经再生受限的主要原因是轴突生长抑制因子的存在。研究者试图通过不同的方法来中和或破坏髓鞘,清除髓鞘相关抑制分子,从而达到促进脊髓损伤后轴突再生和神经功能恢复的目的。目前,与 Nogo 蛋白相关的药物和基因治疗已成为 CNS 损伤后促进轴突再生新的有效手段,现对其研究进展作一综述。

**[关键词]** Nogo 蛋白;中枢神经系统;神经再生

**[中图分类号]** R 741 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0670-04

## Targeting Nogo protein and its receptor in promoting nerve regeneration: recent progress

ZHU Zhuang-chen, NI Bin\*

Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[Abstract]** Ample evidences have showed that the failure of early regeneration of the central nervous system(CNS) in adult mammals is mainly due to the growth inhibitory factor. Efforts have been made to promote neuron regeneration and neurological function recovery by damaging myelin and removing myelin-associated inhibitors. At present, the Nogo protein associated drugs and gene therapy have become a novel effective way to promote axon regeneration after CNS injury; here we reviews the recent progress on the related issues.

**[Key words]** Nogo protein; central nervous system; nerve regeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(6):670-673]

哺乳动物中枢神经系统(CNS)损伤后神经再生受限的主要原因是轴突生长抑制因子的存在,主要包括 Nogo 蛋白、髓鞘相关蛋白(MAG)和少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(OMgp) 3种,它们有共同的受体——NgR<sup>[1]</sup>。研究者试图通过不同的方法来中和或破坏髓鞘,清除髓鞘相关抑制分子,从而达到促进脊髓损伤(SCI)后轴突再生和神经功能恢复的目的。目前,与 Nogo 蛋白相关的药物和基因治疗已成为 CNS 损伤后促进轴突再生新的有效手段,现对其研究进展作一综述。

### 1 Nogo-A 单克隆抗体(IN-1)

Nogo 蛋白有 3 种同源异构体:Nogo-A、Nogo-B、Nogo-C。其中 Nogo-A 主要存在于中枢神经系统,并因在体外培养时具有很强的轴突生长抑制作用而备受关注。目前一致认为,Nogo-A 是 CNS 髓鞘磷脂神经元轴突生长抑制因子,用抗体中和 Nogo-A 可以促进脊髓损伤大鼠的运动功能恢复。成年哺乳类动物 CNS 中轴突的可塑性和再生能力可以通过 Nogo-A 的单克隆抗体(IN-1)对抗 Nogo-A 得以提高。

IN-1 在体外能有效地中和抑制作用,在大鼠 CNS 损伤

模型中能诱导长距离轴突再生,增加结构可塑性,功能恢复良好<sup>[2-3]</sup>。IN-1 在活体内应用同样有效,通过注射 IN-1 Fab 抗原结合片段及新提纯的抗 Nogo-A 活性结合位点 IgG,可增加再生出芽及受伤脊髓的轴突生长,上调 Purkinje 神经元多个早期生长相关性基因,并促进未受损 Purkinje 神经元突起的生长<sup>[4]</sup>,且可诱导完整成熟中枢神经系统的生长反应。Bareyre 等<sup>[5]</sup>用 IN-1 封闭大鼠体内的 Nogo-A,证实可使大鼠脊髓长出芽及使 BDNF、IGFS、BMPS 等神经营养因子的表达上调。现已证实,大鼠胸段脊髓损伤后,应用 IN-1 可促进轴突再生和功能恢复。Merkler 等<sup>[6]</sup>在脊髓损伤后皮下注射 IN-1 2 周,先检测动物运动和感觉神经功能,然后采用组织学观察脊髓神经纤维的再生情况,结果用抗 Nogo-A 抗体处理的动物经过多种行为学检测并行 BBB 评分,得分明显高于对照。与该结果相一致的是,在 Nogo-A 抗体处理组动物损伤部位明显有更多被切断的轴突发生再生性出芽,并且有超过 20% 的标记神经纤维延伸至整个损伤部位。为促进 Nogo-A 抗体的临床效能,最近 Fouad 等<sup>[3]</sup>对来自美洲的灵长目动物绒猴进行了 SCI 的实验研究,结果提示啮齿类动

**[收稿日期]** 2009-12-16 **[接受日期]** 2010-04-15

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30872612)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30872612)。

**[作者简介]** 朱庄臣,博士。现在泰山医学院附属医院骨科,泰安 271000。E-mail: zhuzhuangchen@sina.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81885623, E-mail: nibin99@sohu.com

物、灵长类动物在损伤脊髓中中和 Nogo-A 可促进轴突再生和功能恢复。

总之,单克隆抗体 IN-1 不仅能促进损伤神经纤维再生,提高未损伤平面运动神经纤维的出芽和可塑性生长<sup>[7]</sup>;还能促进损伤皮质对侧大脑半球完整运动皮质的功能性重塑并相应提高实验动物的前肢活动能力<sup>[8]</sup>。尽管迄今为止还没有发现单克隆抗体 IN-1 治疗的不良反应,但是神经纤维出芽和再生生长可能产生错误的连接,导致功能障碍。长期压制神经元环路抑制因子活性和神经元活动并训练形成新的连接所产生的影响在未来的实验中还需进一步研究。

## 2 Nogo 受体 (NgR) 拮抗剂

NgR 是神经元特有的一种位于细胞膜表面,且能够与 Nogo-A 特异性结合的蛋白,它与 Nogo 蛋白结合后可抑制轴突生长。通过抑制 Nogo-A 与 NgR 的结合削弱 Nogo-A 的抑制作用,可以达到促进轴突生长的目的。近来的研究表明,阻断 NgR 比中和 Nogo 更有效。一种源于 Nogo 蛋白由 66 个氨基酸残基组成的环状区域中的一段短肽 NEP1-40,在体内、体外实验中已成功用作 NgR 拮抗剂<sup>[9]</sup>。现已证实,对在含有 Nogo-66 或全部 CNS 髓磷脂的培养基中培养的感觉神经元,NEP1-40 能够有效促进轴突再生。GrandPré 等<sup>[9]</sup>应用 NEP1-40 治疗脊髓中胸段半切损伤的大鼠,发现皮质脊髓束有明显的轴突生长,并促进了大鼠功能的恢复,表明 NEP1-40 短肽能够有选择性地削弱 Nogo-66 的抑制作用,具有重要的应用价值<sup>[10]</sup>。因为 NgR 不仅能与 Nogo-66 结合,还能与 MAG、OMgp 结合,拮抗 NgR 的肽可能会更加有效地促进轴突再生和功能恢复。最近已证实,有一种单克隆抗 NgR 抗体能够阻断所有 3 种髓磷脂配体与 NgR 结合,并在体外降低依赖于 CNS 髓磷脂的神经突生长抑制作用<sup>[11]</sup>。另外一种具有潜在治疗价值的制剂是可溶性切去头端的 NgR,它能与所有 3 种髓磷脂配体结合从而拮抗 CNS 髓磷脂及 Nogo-A 介导的轴突再生抑制作用<sup>[12]</sup>。在大鼠胸段 SCI 模型中,采用可溶性 NgR 和甲强龙(一种抗炎症药,临床用于 SCI 的早期治疗)联合治疗,可有效促进功能恢复和轴突再生。在损伤后 28 d,联合治疗组的 BBB 行为评分为 16 分,而对照组则仅为 12 分<sup>[13]</sup>。

NgR 拮抗肽的发现及其对 SCI 大鼠轴突再生的促进作用证明 Nogo-66 和 NgR 在体内限制轴突再生中的核心作用。NEP1-40 的高效和特异性使得 NgR 拮抗剂未来可能成为一个有效的临床治疗 SCI 的药物<sup>[9]</sup>。

## 3 Nogo 及其受体基因敲除

Nogo 基因的克隆、表达为直接评估其产物的生长抑制活性提供了有力的工具。理论上,通过敲除 Nogo 及其受体基因可以抑制 Nogo 蛋白的表达,从而减少对轴突生长的抑制作用。然而对 Nogo 基因敲除小鼠脊髓再生研究却得出不同的结果。几个研究小组分别利用 Nogo 基因敲除小鼠模型进一步在体内直接观察 Nogo-A 在中枢神经系统损伤后轴突

再生中的作用, Kim 等<sup>[14]</sup>证明,成年 Nogo-A 基因敲除小鼠脊髓损伤后,皮质脊髓内的轴突可广泛延伸至横断面,神经纤维大量再生并进入侧索节段,动物的运动功能可以恢复。Simonen 等<sup>[15]</sup>也证实, Nogo-A 基因敲除小鼠的脊髓提取物对神经纤维的抑制作用减弱。胸部脊髓半横断后 2 周与野生型小鼠相比, Nogo-A 基因敲除鼠有更多的皮质脊髓束纤维长入损伤处。而 Zheng 等<sup>[16]</sup>却发现, Nogo 基因敲除对神经再生和出芽无明显促进作用。同样, Nogo-66 受体复合体中, NgR 和 p75<sup>NTR</sup> 基因敲除后并不能导致 SCI 后再生的明显改善<sup>[17]</sup>。在另一项研究中,敲除 NgR 体外甚至完全没有检测到任何神经突生长抑制作用的降低,而在脊髓损伤后胸段皮质脊髓束(corticospinal tract, CST)中也没有观察到对神经再生的促进作用<sup>[18]</sup>。

与给予抗 Nogo-A 抗体治疗相比,几乎所有 Nogo 基因敲除个体再生效果均不明显, NgR 与 p75<sup>NTR</sup> 也存在类似的情况。当然,这种不一致性可能与小鼠遗传背景不同有关,因为最近有一种 Nogo 基因敲除小鼠通过回交纯化遗传背景后,也可促进轴突再生;另外,可能还与某些遗传机制如 Nogo-B 表达的补偿性上调有关。因此推断, Nogo 及其受体基因敲除后,脊髓再生效果与抗体中和 Nogo-A 及其受体复合体相比并不明显,可能与其本身的遗传背景和遗传机制有关,同时有人提出以下两种可能:(1)中和性抗体所起的作用不仅是中和作用;(2) Nogo 和 NgR 除神经生长外还有其他作用<sup>[19]</sup>。

## 4 髓鞘匀浆和基因疫苗

CNS 损伤后与 Nogo 蛋白及其受体相关的其他治疗还包括髓鞘匀浆和基因疫苗。Sicotte 等<sup>[20]</sup>将髓鞘免疫小鼠与另两种髓鞘成分(Nogo-66 和 MAG)联合免疫小鼠比较。结果显示,两类小鼠的皮质脊髓束都出现长距离的轴突再生和出芽,然而,髓鞘免疫小鼠的轴突再生和出芽更旺盛,原因可能是髓鞘中其他抑制成分的存在,例如 Nogo-A 中氨基端结构域、OMgp 等。虽然该方法比较简洁有效,但是其安全性还有待于长期实验的检验。尽管实验证实使用髓鞘疫苗联合不完全弗氏佐剂免疫小鼠可以产生抗髓鞘抗体,中和髓鞘抑制作用,促进损伤脊髓再生。但是这种方法在人体应用是比较危险且不实用的,因为它可能影响正常的生命过程。临床评分、免疫组化和细胞超微结构分析证明, DNA 疫苗不会引起 EAE<sup>[21]</sup>。DNA 疫苗作为一个具有应用前景的治疗 SCI 的手段,其生物安全性和效力还有待进一步评价。

## 5 NgR 与巨噬细胞

以 Nogo 或 NgR 为靶点的治疗在脊髓损伤研究中扮演着重要的作用。将神经干细胞和(或)嗅鞘细胞移植到受损脊髓局部,可观察到神经干细胞可分化为神经元及其他神经胶质细胞,并观察到脊髓全横断损伤大鼠 BBB 运动功能评分改善<sup>[22-24]</sup>,尽管实验中观察到不少受损神经再生和(或)出芽,但受损局部微环境的改变使轴突再生或出芽的距离极为

有限,难以冲破髓鞘抑制因子与胶质瘢痕形成的屏障与远侧断端形成功能突触。IN-1可以拮抗 Nogo 的抑制作用,但无法与另外 2 种抑制物 MAG 和 OMgp 结合,GrandPré 等<sup>[9]</sup>尝试以竞争性短肽 NEP1-40 来拮抗 NgR 的作用,结果显示 NEP1-40 可对抗 Nogo-66 诱导的轴突生长抑制,但对除 Nogo-66 外的其他髓鞘抑制物不敏感,使其在体内应用的效果并不十分理想,表明该短肽并不能封闭 NgR 所有与抑制分子结合的位点。因此,找到一种有效且靶向性强的髓鞘碎片清理方法成为当务之急。

巨噬细胞是吞噬和消除受损组织碎片以启动修复过程的免疫细胞。它们在受损部位的存在能清除坏死组织并分泌营养因子,对机体组织修复起重要作用<sup>[25]</sup>,一旦它们完成任务,巨噬细胞的迅速撤离、结束炎症过程、为轴突再生创造条件同样重要,其继续存在会损伤组织、危害修复过程。David 等<sup>[26]</sup>研究了 Nogo 蛋白受体(NgR)在周围神经损伤后浸润巨噬细胞中的作用。研究人员损伤鼠坐骨神经,结果发现,一旦巨噬细胞到达受损部位并开始清除工作,它们就表现为表达 NgR1 的活化形式,并进入施旺细胞基底部。当恢复的神经开始产生新的蛋白质髓鞘(表达 NgR 配体如 MAG 等),这种受体不但抑制巨噬细胞与髓鞘的结合,还会直接抑制髓鞘的形成,当研究人员再次损伤神经,使髓鞘不能形成时,巨噬细胞继续留在受损神经外层施旺细胞基底部吞噬髓鞘碎片。然而,NgR1 基因敲除鼠坐骨神经或使用 Y-27632 抑制 NgR 下游 Rho 相关激酶,可增加巨噬细胞与髓鞘的结合率,证实巨噬细胞表达的 NgR 参与介导该细胞在周围神经损伤修复中的撤离过程。有关中枢神经系统损伤中巨噬细胞是否表达 NgR 及其在中枢神经系统尤其是脊髓损伤修复中的作用有待进一步研究,这可能为脊髓损伤的修复提供新的研究方向。

## 6 展 望

随着 Nogo 蛋白及其受体 NgR 的发现,人们对中枢神经损伤机制及修复研究取得了长足进步。通过 Nogo-A 抗体封闭、NgR 拮抗剂 NEP1-40 阻断、Nogo 基因敲除等手段的应用,观察实验动物中枢神经组织已得到了一定程度上的再生。一个治愈 CNS 损伤的理想前景凸现出来:彻底寻找 Nogo 蛋白的受体,并一一制备出相应的阻断剂,以阻断 Nogo 蛋白与其受体的特异性结合,进而封闭 Nogo 蛋白对损伤 CNS 再生的抑制活性,达到促进中枢神经再生的目的,使 CNS 损伤得到痊愈。然而,关于 Nogo 蛋白与其受体目前还有诸多未知,且影响 CNS 再生的因素众多,因此,要全面实现神经再生及应用于具体的临床还需要很长时间的研究和实践。

## [参 考 文 献]

[1] 朱立华,赵伟佳. Nogo-A 及其受体 NgR 的研究进展[J]. 医学综述,2008,14:328-330.  
[2] Fiedler M, Horn C, Bandtlow C, Schwab M E, Skerra A. An en-

gineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity[J]. Protein Eng,2002,15:931-941.  
[3] Fouad K, Klusman I, Schwab M E. Regenerating corticospinal fibers in the Marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1[J]. Eur J Neurosci,2004,20:2479-2482.  
[4] Buffo A, Zagrebelsky M, Huber A B, Skerra A, Schwab M E, Strata P, et al. Application of neutralizing antibodies against NI-35/250 myelin-associated neurite growth inhibitory proteins to the adult rat cerebellum induces sprouting of uninjured Purkinje cell axons[J]. J Neurosci,2000,20:2275-2286.  
[5] Bareyre F M, Haudenschild B, Schwab M E. Long-lasting sprouting and gene expression changes induced by the monoclonal antibody IN-1 in the adult spinal cord[J]. J Neurosci,2002,22:7097-7110.  
[6] Merkler D, Metz G A, Raineteau O, Raineteau O, Dietz V, Schwab M E, et al. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A[J]. J Neurosci,2001,21:3665-3673.  
[7] Fouad K, Volker D, Schwab M E. Improving axonal growth and functional recovery after experimental spinal cord injury by neutralizing myelin associated inhibitors[J]. Brain Res Rev,2001,36:204-212.  
[8] Emerick A J, Neafsey E J, Schwab M E, Kartje G L. Functional reorganization of the motor cortex in adult rats after cortical lesion and treatment with monoclonal antibody IN-1[J]. J Neurosci,2003,23:4826-4830.  
[9] GrandPré T, Li S, Strittmatter S M. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration[J]. Nature,2002,417:547-551.  
[10] Liu B P, Fournier A, Grandpre T, Strittmatter S M. Myelin-associated glycoprotein as a functional ligand for the Nogo-66 receptor[J]. Science,2002,297:1190-1193.  
[11] Li W, Walus L, Rabacchi S A. A neutralizing anti-Nogo-66 receptor monoclonal antibody reverses inhibition of neurite outgrowth by central nervous system myelin[J]. J Biol Chem,2004,279:43780-43788.  
[12] Li S, Liu B P, Budel S, Li M, Ji B, Walus L, 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,2004,24:10511-10520.  
[13] Ji B, Li M, Budel S, Pepinsky R B, Walus L, Engber T M, et al. Effect of combined treatment with methylprednisolone and soluble Nogo-66 receptor after rat spinal cord injury[J]. Eur J Neurosci,2005,22:587-594.  
[14] Kim J E, Li S, GrandPré T, Qiu D, Strittmatter S. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B[J]. Neuron,2003,38:187-199.  
[15] Simonen M, Pedersen V, Weinmann O, Schnell L, Buss A, Ledermann B, et al. Systemic deletion of the myelin-associated out-

- growth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury[J]. *Neuron*,2003,38:201-211.
- [16] Zheng B, Ho C, Li S, Keirstead H, Steward O, Tessier-Lavigne M. Lack of enhanced spinal regeneration in Nogo-deficient mice [J]. *Neuron*,2003,38:213-224.
- [17] Song X Y, Zhong J H, Wang X, Zhou X F. Suppression of p75NTR does not promote regeneration of injured spinal cord in mice [J]. *J Neurosci*,2004,24:542-546.
- [18] Zheng B, Atwal J, Ho C, Case L, He X L, Garcia K 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 USA*,2005,102:1205-1210.
- [19] Teng F Y, Tang B L. Why do Nogo/Nogo-66 receptor gene knockouts result in inferior regeneration compared to treatment with neutralizing agents [J]. *J Neurochem*,2005,94:865-874.
- [20] Sicotte M, Tsatas O, Jeong S Y, Cai C Q, He Z, David S. Immunization with myelin or recombinant Nogo-66/MAG in alum promotes axon regeneration and sprouting after corticospinal tract lesions in the spinal cord[J]. *Mol Cell Neurosci*,2003,23:251-263.
- [21] Xu G, Nie D Y, Chen J T, Wang C Y, Yu F G, Sun L, et al. Recombinant DNA encoding multiple domains related to inhibition of neurite outgrowth; a potential strategy for axonal regeneration[J]. *J Neurochem*,2004,91:1018-1023.
- [22] Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, et al. Transplantation of *in vitro*-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord injury in adult rats[J]. *J Neurosci Res*,2002,69:925-933.
- [23] Mitsui T, Kakizaki H, Tanak H, Shibata T, Matsuoka I, Koyanagi T. Immortalized neural stem cells transplanted into the injured spinal cord promote recovery of voiding function in the rat [J]. *J Urol*,2003,170(4 Pt 1):1421-1425.
- [24] Li Y, Field P M, Raisman G. Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells[J]. *Science*,1997,277:2000-2002.
- [25] Yu C G, Jimenez O, Marcillo A E, Weider B, Bangerter K, Dietrich W D, et al. Beneficial effects of modest systemic hypothermia on locomotor function and histopathological damage following contusion-induced spinal cord injury in rats[J]. *J Neurosurg*,2000,93(1 Suppl):85-93.
- [26] David S, Fry E J, López-Vales R. Novel roles for Nogo receptor in inflammation and disease[J]. *Trends in Neurosci*,2008,31:221-226.

[本文编辑] 尹 茶

## · 书 讯 ·

## 《扶正祛邪抗癌瘤》已出版

本书由黄衍强等主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0034-8,16开,定价:16.00元。

辨证施治和扶正祛邪是中医药治愈癌症的两大法宝,也是中医药治病的奥秘之所在。本书用通俗的语言,结合真实的案例,全面介绍了中医辨证论治和扶正祛邪的治病原理,让患者感受到中医药的魅力,明白中医药治病的道理,树立起战胜病魔的信心,从而从中医药治疗中获益。同时还详细地对常用食物进行了辨证食疗,做到食疗不求人。本书适合广大癌症患者及其家属阅读,也可供临床肿瘤科医师学习参考。

该书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>