

· 专论与综述 ·

神经轴突生长抑制因子 Nogo 家族的研究进展 *

朱 伟¹ 朱晓丹² 葛海燕²

(1 海军医学研究所航空医学研究室 上海 200433 2 复旦大学中山医院呼吸科 上海 200032)

摘要: Nogo 家族是一类神经轴突生长抑制因子家族, 目前成员包括 Nogo-A、Nogo-B、Nogo-C 三个亚型。Nogo 家族成员因 C 末端具有保守的 RHD 结构域而归属于 RTNs 家族, 表明它们的分布和功能与内质网密切相关。Nogo 家族 C 末端还具有一个进化保守的 66 氨基酸的功能段称为 Nogo-66, 体外表达的 Nogo-66 片段具有抑制神经突生长的作用。Nogo 家族成员结构上的区别主要表现在不同剪切长短的 N 末端序列。Nogo-A 主要在中枢和外周神经系统中广泛分布, Nogo-C 主要分布在骨骼肌, 而 Nogo-B 则几乎遍布于各种组织与细胞之中。目前, 发现可介导 Nogo 胞内信号转导通路的受体主要是膜外糖蛋白偶联的 NgR 和跨膜受体 p75NTR 组成的共受体, 但 NgR 与 Nogo-A 在胚胎发育中时空表达并不同步提示可能还有其它受体存在。虽然 Nogo 家族作为神经轴突生长抑制因子被发现, 但越来越多的研究表明其可能在胚胎发育、细胞凋亡或神经退行性变等重大事件中扮演重要角色。本文拟就 Nogo 家族迄今为止突出的研究进展作一综述, 旨在为下一步的功能研究工作提供理论参考和依据。

关键词: 神经轴突生长抑制因子; 受体; 神经再生; 胚胎发育; 细胞凋亡

中图分类号: Q25, Q78, Q813.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2012)15-2968-03

Research Progress of the Neurite Outgrowth Inhibitor Nogo Family*

ZHU Wei¹, ZHU Xiao-dan², GE Hai-yan²

(1 Navy medical research institute, Shanghai 200433, China;

2 Department of pulmonary medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT: Nogo family is a kind of neurite outgrowth inhibitor, which includes three family members as far as now. Nogo family belongs to the RTNs family because of the common RHD domains in their C-terminal sequence, which indicates their location and function are related to regulation in cell. Nogo family members also have an conservative 66 amino-acids functional peptide(Nogo-66) in evolutionary process, which has been demonstrated effective in inhibiting neurite outgrowth *in vitro*. The main difference in family members exists in their different length of N-terminal sequence. Nogo-A has been found sufficient in the CNS or PNS. Nogo-C has been found only in skeleton-muscle tissue. While Nogo-B is found almost everywhere *in vivo*. Presently, the recognized receptors of Nogo are co-receptors including GPI-anchored glycoprotein receptor (NgR) and trans-membrane receptor p75NTR, through which can onset the signaling transduction of ligand in cell. But the obvious different location of Nogo-A and NgR neither in spatial nor in time series when fetus develop, so that other receptors have not been found maybe exist. Although Nogo family is found to be a group of neurite outgrowth inhibitors, more and more researches show their essential roles in important affairs *in vivo* such as fetus development, cell apoptosis and nerve degradation etc. In this article, we try to review the most outstanding progresses of the Nogo family researches up to now, in order to offer the reference of background information to the future.

Key words: Neurite outgrowth inhibitor; Receptor; Nerve regeneration; Fetus development; Cell apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q25, Q78, Q813.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2968-03

中枢神经系统与周围神经系统最大区别之一在于神经元损伤后难于再生修复, 这也是困扰神经科学基础与临床研究的世界性难题。早在 1985 年, Schwab 等人^[1]就提出了关于中枢神经再生抑制的两条假设: 其一, 中枢神经元神经突再生能力与其周围微环境密切相关, 周围神经系统环境要比中枢神经系统环境更适合神经突再生; 其二, 成熟的中枢神经系统中很可能存在神经突再生抑制因子。事实上, 后续的研究不断证实了以上假设, 本文中重点介绍的神经轴突生长抑制因子 Nogo 家族正是神经突再生抑制因子中的重要成员。

1 Nogo 的发现和克隆

1988 年, Schwab 小组研究发现大鼠脊髓髓鞘和中枢神经系统白质中分子量为 35kDa 和 250kDa 的蛋白有明显的神经突抑制活性, 而大鼠坐骨神经髓鞘和鲑鱼、青蛙等低等脊椎动物中枢髓鞘提取物却没有类似的抑制活性^[2]。在进一步实验中, 他们以 250kDa 大分子量蛋白为抗原制备了单克隆抗体 IN-1, 后者可以显著抑制髓鞘和少突胶质细胞的神经突抑制活性^[3]。1998 年, Adrian 从牛脊髓髓鞘中纯化得到了具有神经突生长

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30900662); 上海市自然科学基金项目(08411965600)

作者简介: 朱伟(1974-) 女, 博士, 助理研究员, 主要研究方向: 分子神经生物学、航空生理学,
Tel: 81883256, E-mail: zhu_wei2002@163.com

(收稿日期: 2012-02-22 接受日期: 2012-03-17)

抑制活性的 220kDa 蛋白并获得了其中六个肽段的序列^[4]。以此为线索,经过大规模文库筛选,Strittmatter 等人在 2000 年成功克隆到了该蛋白的人源和大鼠源 cDNA 序列并命名为 Nogo 基因^[5-7]。

2 Nogo 的分子结构

除了 Nogo-A, Nogo 家族还有 Nogo-B 和 Nogo-C 两个较短的剪切体。Nogo-A 是最长的剪切体,人源 Nogo-A 蛋白含 1192 个氨基酸, Nogo-B(即最早报道为 ASY 蛋白)缺少中间一段 186-1004 氨基酸区域,含 373 个氨基酸, Nogo-C(即最早报道为 vp-20 或 foccen-s 蛋白)仅有很短的 N 末端,含 199 个氨基酸。序列分析表明,三者差异主要在 N 端,而共有一个含 188 氨基酸 C 末端,此末端与已发现的多种蛋白具有较高的同源性(70%),它们均含有 RHD(Reticulons homology domain),因而将其归属于 Reticulons(RTNs)家族。大多数 RTNs 羧基末端含有一个双赖氨酸的内质网膜定位序列(KDEL, Lys-Asp-Glu-Leu),表明它们的分布和功能与内质网密切相关^[10]。Nogo 家族羧基端 RHD 内含二个长约三十余个氨基酸的疏水跨膜区,二区之间是一个含 66 个氨基酸的短片段,称为 Nogo-66。Nogo-66 在进化上高度保守,人与鼠之间的序列仅有一个氨基酸的差别,其中酸性氨基酸的含量很高,体外融合表达的 Nogo-66 亦具有神经突生长抑制活性。

3 Nogo 的形态学分布

形态学研究发现, Nogo-A 在中枢和外周神经系统中有着广泛分布,在睾丸、心脏等非神经组织中也有少量分布, Nogo-C 主要分布在骨骼肌,在神经系统和其它组织中分布很少; Nogo-B 则几乎遍布于各种组织与细胞之中^[1]。

Nogo-A 在中枢神经系统髓鞘的主要组分少突胶质细胞和大多数神经元中有表达,但在星形胶质细胞、Schwann 细胞和小脑浦肯野细胞层神经元中未检测到 Nogo-A 的存在^[1,5-9]。以 Nogo-A 氨基端为抗原制备的抗体可以特异性识别少突胶质细胞、NIH3T3 成纤维细胞、C2C12 成肌细胞和椎根神经节神经元表面的 Nogo-A 免疫信号^[2,11], Nogo-66 为抗原制备的抗体也可以在少突胶质细胞外表面检测到免疫信号^[9]。因此,现在普遍认为 Nogo-A 的氨基端和羧基端 Nogo-66 均可以暴露在细胞膜外表面的,这种结构分布为更好地解释其抑制神经突再生功能提供了空间位点的证据。但令人费解的是,生物信息学分析仅发现在 Nogo-A 羧基端 Nogo-66 两旁有二个疏水跨膜区,也就是说 Nogo-66 膜外分布按照经典的磷脂双层流动结构可以解释,但如何解释 Nogo-66 氨基端膜外分布却是一个难题。不仅如此, Nogo 家族如其所属的 RTNs 家族其它分子一样,氨基末端缺少信号肽序列,那又是什么作用机制使其不但可以穿过内质网,而且转运至高尔基体、突触囊泡,甚至暴露在细胞膜外呢?因此有关 Nogo 家族的细胞内转运机制和拓扑构象尚有待深入研究。

4 Nogo 的受体及其共受体

2001 年, Strittmatter 等筛选到一个可以与 Nogo-66 功能域高度亲和的膜外 GPI- 锚连糖蛋白,该蛋白参与了 Nogo-66 抑制神经突生长过程,因而将其命名为 Nogo-66 受体(NgR)^[12]。

NgR 含 473 个氨基酸,主要组成部分为 8 个亮氨酸富集区(LRR)和 C 末端区(LRR-CT)。NgR 在胚胎期髓鞘形成之前几乎没有表达,在髓鞘形成之后才开始在神经系统及其它组织中广泛表达,并与 Nogo-A 在轴突旁有广泛的共存^[9]。但是 NgR 是膜外受体,无法解释 Nogo 的胞内信号转导机制。2002 年, He Zhigang 等人又发现了一种低亲和力的神经营养素受体 p75NTR,它可以作为共受体与 NgR 的 C 末端发生结合, p75NTR-NgR 结合后能激活 p75NTR 胞内域及下游的小 G 蛋白,从而使髓鞘发挥神经突生长抑制作用^[13]。自此, Nogo 的共受体信号转导机制假说逐渐被认可。

5 Nogo 家族研究的新进展

虽然 Nogo 分子首先是作为中枢神经突再生抑制因子被发现,且研究人员随之做了大量的热点研究。但随着越来越多的研究积累,人们对于 Nogo 分子生理功能的认识逐渐全面客观。

首先, Nogo 基因敲除小鼠神经损伤后再生并没有明显改善^[14-16];神经组织受损后少突胶质细胞和受损区周围神经组织中的 Nogo-A 和 NgR 表达水平没有明显改变^[1,10];中枢神经系统髓鞘中少突胶质细胞髓鞘糖蛋白(OMgp)、髓鞘相关糖蛋白(MAG)等和早前胶质瘤中发现的 Tenascin-C(TEN-C)、硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPGs)等分子都可以抑制轴突生长^[9,17-20],说明神经元轴突生长抑制分子相当多元化,这些分子共同作用给神经损伤后的轴突再生造成了一个错综复杂、羁绊重重的艰难环境,实现损伤后的神经修复不可能仅靠调节一个抑制分子所能解决。

其次, Nogo-A 在胚胎发育早期和神经退行性疾病中发挥重要作用。例如, Nogo-A 在海马神经元发育和嗅神经元发育中时空分布的差异提示了 Nogo-A 在这些已分化的神经组织内神经元的发育成熟和形成正确的突触连接中起着至关重要的作用^[21-22]。Nogo 的临床研究也发现,肌萎缩性(脊髓)侧索硬化(ALS)患者体内慢传导型神经纤维损伤出现后 Nogo-A 表达特异性升高,而肌组织中 Nogo-C 的表达下降,ALS 转基因模型小鼠体内也检测到了类似表现^[23]。多发性硬化(MS)患者体内发现多种抗髓鞘自身免疫抗体,其中包括抗 Nogo-A 自身免疫性抗体^[21,24-25]。癫痫患者海马神经元中 Nogo-A 的表达明显升高^[26]。以上研究表明 Nogo 在神经发育和神经系统疾病尤其是退行性神经病变过程中扮演重要角色。

再者, Nogo-A 与 NgR 的分布在空间和时间上存在很大差异,许多 Nogo-A 高表达的部位和阶段, NgR 却没有表达或低表达^[1,10]。而在 Alzheimer's 患者脑内神经元淀粉样斑块中 NgR 与淀粉样前体蛋白 APP 则有明显共存。NgR 可以与 APP 生理性结合,过表达 NgR 可以减少神经瘤细胞中 A β 生成;阻断 AD 转基因模型小鼠体内 NgR 的表达可以增加鼠脑中 A β 水平、A β 斑沉积和营养不良神经突,灌输可溶性 NgR 片段 NgR(1-310aa)可以产生相反效应。所以 NgR 包括后来发现的 p75NTR 可能都不是 Nogo 唯一的共受体。

最后, Nogo-B 和 Nogo-C 在神经系统外也有广泛分布,除了已知 Nogo-B 与血管重塑有关外^[27], Nogo-B 特别是 Nogo-C 体内的生理作用还知之甚少。酵母双杂交发现 Nogo 高度保守的 C 末端与 Bcl-2 和 Bcl-XL 均可以结合, Nogo-B 可以将二者

滞留在内质网从而阻止其进入线粒体发挥抗凋亡作用^[28]。Qin Li 等也证实 ASY/Nogo-B 可以引起细胞凋亡尤其是肿瘤细胞凋亡^[29]。虽然 2006 年 Chen 等发现 Nogo-C 能通过 JUK-c-Jun 导致细胞凋亡^[30],但对于 Nogo 引起细胞凋亡的分子机制尚未阐明,因此也一直有实验室质疑其诱导细胞凋亡特别是肿瘤细胞凋亡的真实性。

纵观 Nogo 功能研究的现状,对于只分布在中枢神经系统的 Nogo-A 来说抑制轴突生长只是其生理功能之一,其它的功能正在逐渐被人们所认识,尤其 Nogo-A 对神经系统发育的影响是目前亟待探索的领域之一。另外,Nogo-A 抑制轴突生长的研究也还有许多问题存在,如 Nogo-A 的新共受体还未找到,Nogo-A 下游的作用分子还不明确。对于在体内分布广泛的 Nogo-B 和 Nogo-C 分子而言,通过寻找与它们相互作用的分子,探索其新功能和解释已知功能的作用机理,应是值得开展的研究工作。

参考文献(References)

- [1] Andrea B. Schwab. Patterns of Nogo mRNA and Protein Expression in the Developing and Adult Rat and After CNS Lesions [J]. J Neurosci, 2002,22(9):3553-3567
- [2] Caroni P, Schwab ME. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading [J]. J. Cell Biol, 1988,106(4):1281-1288
- [3] Pico Caroni, Martin E, Schwab. Antibody against Myelin-Associated Inhibitor of Neurite Growth Neutralizes Nonpermissive Substrate Properties of CNS White Matter[J]. Neuron,1988,1(1):85-96
- [4] Adrian A. Spillmann, Bandtlow CE, Lottspeich F, Keller F, Schwab ME. Identification and characterization of a bovine neurite growth inhibitor (bNI-220)[J]. J. Biol Chem, 1998,273(30):19283-19293
- [5] Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1 [J]. Nature, 2000,403(6768):434-439
- [6] GrandPré T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein[J]. Nature, 2000,403(6768):439-444
- [7] Prinjha R., Moore S.E., Vinson M. et al. Inhibitor of neurite outgrowth in humans[J]. Nature, 2000,403(6768):383-384
- [8] Oertle T., van der Haar M. E., Bandtlow C. E., et al. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions[J]. J Neurosci, 2003,23(13):5393-5406
- [9] Wang X, Chun S.J, Treloar H, et al. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact[J]. J Neurosci, 2002,22(13):5505-5515
- [10] Jackson, M. R., Nilsson, T., Peterson, P. A. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum[J]. EMBO J., 1990,9(10):3153-3162
- [11] Dana A.D, Barbara N, Stefan B, et al. Nogo-A, B and C are found on the cell surface and interact together in many different cell types [J]. J. Biol Chem, 2005,280(13):12494-12502
- [12] Fournier A.E, GrandPré T, Strittmatter S.M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. Nature, 2001,409(6818):341-346
- [13] Wang KC, Kim J, Srivasankaran 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
- [14] Kim A.J., Lee C.S., Schlessinger D. Bex3 associates with replicating mitochondria and is involved in possible growth control of F9 teratocarcinoma cells[J]. Gene, 2004,343(1):79-89
- [15] Simonen M, Pedersen V, Weinmann O., et al. Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor nogo-a improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury [J]. Neuron, 2003,38(2):201-211
- [16] Zheng B, Ho C, Li S, et al. Lack of enhanced spinal regeneration in nogo-deficient mice[J]. Neuron, 2003,38(2):213-224
- [17] Domeniconi M, Cao Z, Spencer T., et al. Myelin-associated glycoprotein interacts with the nogo66 receptor to inhibit neurite outgrowth[J]. Neuron, 2002,35(2):283-290
- [18] Probstmeier R., Stichel C.C., Muller H.W., et al. Chondroitin sulfates expressed on oligodendrocyte-derived tenascin-R are involved in neural cell recognition[J]. J Neurosci Res, 2000,60(1):21-36
- [19] Bradbury E.J., Moon L.D., Popat R.J., et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury [J]. Nature, 2002,416(6881):636-640
- [20] Moon L.D., Asher R.A., Rhodes K.E., et al. Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC[J]. Nat Neurosci, 2001,4(5):465-466
- [21] Meier S, Brauer A. U., Heimrich B., et al. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure[J]. FASEB J, 2003,17(9):1153-1155
- [22] Richardson P.M., McGuinness U.M., Aguayo A.J. Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts [J]. Nature, 1980,284 (5753):264-265
- [23] Dupuis L., Gonzalez de Aguilar J. L., di Scala F., et al. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis[J]. Neurobiol. Dis, 2002,10(3):358-365
- [24] Bandtlow C. E., Dlaska M., Pirker S., et al. Increased expression of Nogo-A in hippocampal neurons of patients with temporal lobe epilepsy[J]. Eur. J. Neurosci, 2004,20(1):195-206
- [25] Mingorance A., Fontana X., Sole M., et al. Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions [J]. Mol. Cell Neurosci, 2004,26(1):34-49
- [26] Reindl M., Khantane S., Ehling R., et al. Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders [J]. J. Neuroimmunol, 2003,145 (1-2):139-147
- [27] Acevedo L, Yu J, Erdjument B. H., et al. A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling [J]. Nature Medicine, 2004,10 (4):382-388
- [28] Tagami S, Eguchi Y, Kinoshita M, et al. A novel protein, RTN-xS, interacts with both Bcl-xL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity [J]. Oncogene, 2000,19 (50):5736-5746
- [29] Li Q., Qi B., Oka K, et al. Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer [J]. Oncogene, 2001,20 (30):3929-3936
- [30] Chen Y.C., Tang X.J., Cao X.R., et al. Human Nogo-Coverexpression induces HEK293 cell apoptosis via mechanism that involves JNK-c-Jun pathway[J]. BBRC, 2003,348(3):923-928