

髓磷脂抑制因子 Nogo-A 及其受体在缺血性脑卒中
中的作用及机制研究进展邓斌^{1,3,Δ}, 袁欣^{2,Δ}, 徐礼鲜³, 张进³, 孙绪德⁴, 侯立朝^{1*}(1. 厦门大学附属翔安医院麻醉科, 厦门 361101; 2. 厦门警备区医院药剂科, 厦门 361004;
3. 第四军医大学口腔医院麻醉科, 西安 710032; 4. 第四军医大学唐都医院麻醉科, 西安 710038)

【关键词】髓磷脂抑制因子; 受体; 缺血性脑卒中; 机制

DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2018.01.025

作为临床常见的中枢神经系统血管性疾病,缺血性脑卒中中具有发病率高、死亡率高、致残率高的“三高”特点^[1]。从临床资料来看,脑卒中具有非常复杂的病理生理过程,其中一个重要原因是由于脑缺血再灌注后发生大脑局部缺血缺氧,造成组织细胞损伤,比如神经元损伤、轴突生长抑制等,导致运动、感觉、学习和记忆等神经功能障碍^[2]。现有研究成果证明,髓磷脂抑制因子 Nogo-A 及其受体广泛存在于哺乳动物中枢神经系统(central nervous system, CNS)中,它们和缺血性脑损伤所导致的轴突生长抑制和神经元损伤之间有着极为紧密的联系,但是具体的作用机制还不是十分清楚。基于上述情况,本文就 Nogo-A 及其受体在脑卒中中的作用及机制进行综述,希望能够为相关基础研究和临床治疗提供一定的借鉴和参考。

1 Nogo-A 分子的结构、分布及功能

CNS 髓鞘来源的轴突生长抑制因子 Nogo-A 及其家族分子自 2000 年被《Nature》等杂志报道以来,其结构、功能和作用机制已经被广泛研究和探讨^[3,4]。Nogo 基因主要有 3 种异构体,相关蛋白分别被命名为 Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C。其中, Nogo-A 分子在中枢神经系统中的作用和机制研究开展的较为深入。Nogo-A 羧基端(C-端)称为网状蛋白同源结构域(reticulon-homology domain, RHD),含有 188 个氨基酸残基(amino acid, aa); 2 个疏水结构域的跨膜区(transmembrane domain, TMD)靠近 C-端,并被一包含 66 个 aa 的亲水结构域,即 Nogo-66 分离开来,该结构与定位于内质网的浆膜蛋白家族有很高的同源性^[5]。邓斌等^[6]通过制备 Nogo-A 分子单克隆体及其不同截短体的方式,进一步发现 aa 1026-1055 和 aa 634-668 可能是 Nogo-A 发挥轴突生长抑制作用的具体功

能区。目前研究认为, Nogo-A 主要存在于中枢神经系统中,除表达于少突胶质细胞的细胞体和突起外,也高表达于嗅球、海马、大脑皮层、背根节等神经元中^[7,8],并且定位在胞质内质网、细胞膜和突触结构上^[13],这样的结构和分布特点提示 Nogo-A 在神经元存活和轴突生长等方面扮演着重要角色。另外,相关研究发现, Nogo-A 在发育早期阶段神经管里的不成熟神经元中也有表达,在神经干细胞中也可检测到 Nogo-A,这些说明 Nogo-A 在中枢神经系统发育过程中也发挥一定作用^[9]。由此可见, Nogo-A 分布的广泛性预示其除了具有强烈的抑制中枢神经突起生长的作用外,在神经元的发育、生长、存活等方面发挥重要作用。

2 Nogo-A 受体的结构、分布及功能

Nogo-A 受体(Nogo receptor, NgR)具有多个富含亮氨酸的重复结构,属于 GPI 锚定蛋白^[5]。多项研究表明, NgR 主要表达于大脑皮质、海马和背根神经节等神经元胞体和轴突上,定位于神经元表面^[10]。研究进一步发现, NgRs 也表达于 CNS 中活化的小胶质/巨噬细胞中,可能暗示 NgRs 在神经炎症反应中起着更为广泛的作用^[11]。NgR 共有三个亚型,即 NgR1、NgR2、NgR3。NgR1 是首先被证实与 Nogo-A 胞外段的 Nogo-66 具有高亲和力的受体^[12]。现有研究成果证明,该受体及其复合物对轴突生长有着较为直接的影响^[13]。Fournier 等^[14]研究发现,通过抑制 NgR1 的表达可有效促进神经元轴突再生,并对模型动物神经功能恢复起到了积极作用。研究还发现 NgR1 的拮抗剂 TAT-NEP1-40 可对神经元提供保护作用,并可减少降低脑梗死容积,较好促进了模型动物神经系统功能的恢复^[15,16]。李立亚等^[7,10]在新近研究成果中指出, TAT-NEP1-40 可有效提升小鼠脑缺血再灌注损

基金项目:国家自然科学基金(81501207, 81471265, 31570845), 陕西省专项科研计划项目(16JK1645),

陕西省自然科学基金重大基础研究项目(2016ZDJC-16)

* 通讯作者:侯立朝 电话:0592-6332083, E-mail: xajxdb@126.com

Δ 共同第一作者

伤后的记忆能力和学习能力。这些研究显示,NgR1在缺血性脑损伤的发生发展过程中发挥重要作用。

Nogo-A 另一个重要受体即成对性免疫球蛋白受体 B (paired immunoglobulin-like receptor B, PirB) 于 2008 年在《Science》等杂志上首先报道,并且证实基因水平敲除 PirB 后会比起敲除 NgR1 更多的轴突再生,提示 PirB 在髓磷脂抑制作用中发挥更为重要的作用^[17,18]。PirB 是 I 型跨膜糖蛋白,由有 6 个 Ig 样结构的胞外段、一个疏水跨膜段和含有 3 ITIMs 和一个 ITIM 样序列的胞浆部分^[8]。PirB 除了表达于免疫细胞外,还表达 CNS 的各个部位,如海马、小脑、嗅球等^[19-21]。在正常成年动物的大脑皮层和脊髓组织中很难检测到 PirB 表达,但是 CNS 损伤后,皮层和脊髓均能发现高表达的 PirB^[8,19]。研究显示,脊髓损伤后,能促使 PirB 在皮层表达增加,而且损伤后 3 d 本无 PirB 表达的脊髓在其损伤区附近也能发现 PirB 的表达^[22]。在脂多糖诱发小鼠 CNS 慢性炎症的模型中,海马和皮层中 PirB 的表达明显增多,而增加的 PirB 主要定位于星形胶质细胞和神经元上^[23]。另外,有研究发现 PirB 表达于视网膜的节细胞和视神经上,在视神经损伤后其表达显著上调^[24]。利用大鼠局灶性脑缺血模型研究发现,PirB 在损伤侧脑组织中表达增高^[23]。我们在新近研究中利用 C57BL/6 小鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral arterial occlusion, MCAO)模型,发现缺血损伤区内 *pirb* mRNA 及 PirB 蛋白的含量在再灌注后就开始增加,并持续一段时间^[25]。邓斌等^[2,19,20]研究不仅得出了相似的结论,其还发现通过抑制脑缺血损伤后皮层半暗带内 PirB 表达,可促进模型动物神经元存活,轴突生长和神经功能恢复。这些研究提示 PirB 也在缺血性脑损伤的发生发展过程中扮演重要角色。

3 Nogo-A 及其受体 NgR1 和 PirB 在缺血性脑卒中中的作用及机制

3.1 对损伤后轴突生长的影响及机制 多项研究表明 CNS 损伤后,Nogo-A 及其受体 NgR1 和 PirB 对轴突生长具有抑制作用。Cheatwood 等^[26]报道显示,脑缺血再灌注损伤后模型动物神经系统中的多个区域都有不同程度的 Nogo-A 表达。在 Lindau 等^[27]研究中表明,脑缺血损伤后 Nogo-A 对于皮质脊髓束的结构和功能恢复具有一定的抑制作用,通过拮抗 Nogo-A 可有效提升神经功能的恢复效果。Nogo-A 发挥上述作用的机制之一是,Nogo-A 与其受体 NgR1 复合物结合后,启动下游的 RhoA/ROCK 信号途径,导致生长锥的崩溃,抑制轴突再生^[5]。研究进一步证实,基因水平抑制 Nogo-A/NgR1 表达或者蛋白水平拮抗其功能,可以减少 RhoA/ROCK 信号通路活化,促进 MCAO 后模型动物神经功能恢复^[28]。王强等^[15]利用 NgR1 竞争性拮抗剂 TAT-NEP1-40 可有效阻断 Nogo-A 与 NgR1 的作用,促进脑卒中后模型动物神经功能的恢复,相关机制也与其抑制了下游 RhoA 信号通路有关。

Nogo-A 发挥轴突生长抑制作用的另一个机制是:其与 PirB 结合后,通过下游 POSH(plenty of SH3S,POSH)信号分子影响蛋白网络,参与微丝解聚和限制轴突生长。POSH 信

号分子是 PirB 下游的重要底物,具有多个 SH3 结构域,能够影响多个蛋白功能参与抑制神经元突起的生长。研究显示,POSH 通过与肌动-肌球蛋白调节蛋白 Shroom3 结合形成抑制复合物,可以显著抑制轴突生长^[29]。Dickson 等^[19]进一步研究发现,Nogo-A 可使 POSH/Shroom3/ROCK 信号通路活化,使肌球蛋白 2(Myosin IIA)表达减少,导致轴突生长抑制。通过 RNAi 方法,干涉 Nogo-A,PirB 或 POSH,可以抑制下游分子 Shroom3/ROCK 的活化,逆转其轴突生长的抑制作用^[29,30]。Giffard 等^[31]研究进一步证实了 PirB/POSH 信号通路在脑缺血再灌注损伤过程中对轴突生长的抑制作用。邓斌等^[2]研究发现,通过拮抗 Nogo-A 与 PirB 的作用,可以抑制 POSH 表达,抑制 RhoA 活性,从而有效促进了轴突生长相关蛋白(Growth-associated protein 43,GAP43)和 Tau 的表达。这些研究提示,Nogo-A/PirB/POSH/ROCK 信号途径对脑缺血再灌注损伤导致的轴突生长抑制具有重要作用^[32]。

3.2 对损伤后神经元存活的影响 以往研究发现,脑缺血再灌注过程中神经元可发生不同程度的损伤,细胞凋亡是一种重要的表现形式^[33]。相关机制可能是由于脑缺血再灌注损伤后 Nogo-A 与 NgR1 或 PirB 结合,引起下游信号通路活化,从而破坏线粒体结构和功能,导致线粒体释放大量的细胞色素 C(cytochrome C,CytC),其可与凋亡蛋白结合成“凋亡复合物”,相继激活胱天蛋白酶-9(Caspase9)和胱天蛋白酶-3(Caspase3),从而导致 DNA 损伤及细胞凋亡^[2]。Liu 等^[34]发现,脑缺血损伤区内 Nogo-A 的表达水平在再灌注损伤后 28 d 内始终处于较高水平,而通过三七皂甙治疗后,Nogo-A 整体表达水平出现明显下降,有效促进了模型动物神经功能恢复。苟兴春等^[15]报道显示,抑制 Nogo-A 功能可有效降低剥夺氧糖后 P12 细胞的受损情况。其进一步发现,NgR1 的拮抗剂 TAT-NEP1-40 通过抑制 Caspase3 的活化,减轻细胞凋亡,降低脑梗死容积程度,较好的促进了神经功能恢复^[15,16]。

那么,PirB 是否可也参与了脑缺血再灌注后神经元凋亡这一损伤过程呢?在 *pirb* 基因敲除的转基因动物 MCAO 模型研究中,小鼠病灶区 PirB 表达明显低于对照组野生型小鼠的表达,并且脑梗死容积明显减少,证明该受体的缺失对于动物神经功能恢复具有促进作用^[35]。苟兴春等^[25]也同样证明了 *pirb* mRNA 含量和缺血损伤区内神经元损伤之间的关系。赵朝华等^[21]发现 PirB 在氧糖剥夺后的高表达抑制了 TrkB 和 mTOR 的磷酸化,加重了神经元的凋亡。其进一步发现,干涉 PirB 表达能够显著缓解 TrkB 和 mTOR 的磷酸化抑制,使抗凋亡蛋白 Bcl2 表达增加,促凋亡蛋白 Bax 表达减少,从而显著减轻 CytC 从神经元线粒体的漏出。该研究阐明了 PirB 在氧糖剥夺后抑制 TrkB 和 mTOR 的磷酸化,加重神经元凋亡的机制。邓斌等^[2,19,20]研究不仅得出了相似的结论,其还通过制备含有 PirB 胞外段结构的融合蛋白 TAT-PEP,观察其治疗效果,并且进一步阐明了通过抑制 Nogo-A 与 PirB 结合,可减少下游 Caspase3 的活化,抑制 Bax 表达,增加 Bcl2 表达,从而减轻缺血半暗带内神经元凋亡,促进神经功能恢

复。李立亚等^[36]也从相同角度对这一问题进行了深入研究,证明了急性期神经元凋亡数量可在 TAT-PEP 的作用下得到有效抑制,为小鼠脑缺血后神经功能恢复提供了有效的治疗方法。上述这些研究为揭示脑缺血再灌注损伤的分子机制提供新的理论,也为 PirB 成为脑缺血再灌注损伤的新兴治疗靶点提供了实验依据。

综上所述, Nogo-A 及其受体 NgR1、PirB 在缺血性脑卒中的发生发展过程中神经元存活和轴突生长等方面发挥重要作用。但是以往研究都集中于 Nogo-A 及其受体在脊髓损伤修复中的作用,它们在脑缺血再灌注过程中的作用和机制还需要深入探索和阐释。特别是 PirB 通过怎样的信号途径和机制来影响脑缺血再灌注损伤后损伤区和半暗带内神经元的生存和轴突的损伤?能否通过抑制 Nogo-A 与 NgR1 和 PirB 的作用,达到同时促进脑缺血再灌注损伤后轴突生长和神经元存活的目的,从而发挥更为有效的治疗作用?希望通过上述问题的探讨和解决,为缺血性脑卒中的基础研究和临床治疗提供新的思路、新的策略和新的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Dirnagl U, Endres M. Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes [J]. *Stroke*, 2014, 45: 1510–1518.
- [2] 邓 斌. 新型可溶性融合蛋白 TAT-PEP 对 SD 大鼠缺血性脑损伤的保护作用及相关机制研究[D]. 第四军医大学, 2016.
- [3] Grandpre T, Nakamura F, Vartanian T, et al. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein [J]. *Nature*, 2000, 403: 439–444.
- [4] Tessier-Lavigne M, Goodman CS. Perspectives: neurobiology. Regeneration in the Nogo zone [J]. *Science*, 2000, 287: 813–814.
- [5] Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11: 799–811.
- [6] Deng B, Gao F, Liu FF, et al. Two monoclonal antibodies recognizing aa 634-668 and aa 1026-1055 of NogoA enhance axon extension and branching in cultured neurons [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e88554.
- [7] Li L, Deng B, Wang S, et al. Asynchronous therapy targeting Nogo-A enhances neurobehavioral recovery by reducing neuronal loss and promoting neurite outgrowth after cerebral ischemia in mice [J]. *J Drug Target*, 2016, 24: 13–23.
- [8] Gou Z, Mi Y, Jiang F, et al. PirB is a novel potential therapeutic target for enhancing axonal regeneration and synaptic plasticity following CNS injury in mammals [J]. *J Drug Target*, 2014, 22: 365–371.
- [9] Mi Y, Gao X, Ma Y, et al. A novel centrosome and microtubules associated subcellular localization of Nogo-A: implications for neuronal development [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 57: 1–6.
- [10] 李立亚. 针对 NgR1 和 PirB 靶向治疗改善小鼠脑缺血后神经功能的研究[D]. 第四军医大学, 2014.
- [11] Jitsuki S, Nakajima W, Takemoto K, et al. Nogo Receptor Signaling Restricts Adult Neural Plasticity by Limiting Synaptic AMPA Receptor Delivery [J]. *Cereb Cortex*, 2016, 26: 427–439.
- [12] 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: 1302–1308.
- [13] Hunt D, Mason MR, Campbell G, et al. Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 20: 537–552.
- [14] Fournier AE, Grandpre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. *Nature*, 2001, 409: 341–346.
- [15] Gou X, Wang Q, Yang Q, et al. TAT-NEP1-40 as a novel therapeutic candidate for axonal regeneration and functional recovery after stroke [J]. *J Drug Target*, 2011, 19: 86–95.
- [16] Wang Q, Gou X, Xiong L, et al. Trans-activator of transcription-mediated delivery of NEP1-40 protein into brain has a neuroprotective effect against focal cerebral ischemic injury via inhibition of neuronal apoptosis [J]. *Anesthesiology*, 2008, 108: 1071–1080.
- [17] Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, et al. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration [J]. *Science*, 2008, 322: 967–970.
- [18] Filbin MT. PirB, a second receptor for the myelin inhibitors of axonal regeneration Nogo66, MAG, and OMgp: implications for regeneration in vivo [J]. *Neuron*, 2008, 60: 740–742.
- [19] Deng B, Li L, Gou X, et al. TAT-PEP Enhanced Neurobehavioral Functional Recovery by Facilitating Axonal Regeneration and Corticospinal Tract Projection After Stroke [J]. *Mol Neurobiol*, 2016.
- [20] Deng B, Bai F, Zhou H, et al. Electroacupuncture enhances rehabilitation through miR-181b targeting PirB after ischemic stroke [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38997.
- [21] Zhao ZH, Deng B, Xu H, et al. PirB Overexpression Exacerbates Neuronal Apoptosis by Inhibiting TrkB and mTOR Phosphorylation After Oxygen and Glucose Deprivation Injury [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37: 707–715.
- [22] Ma G, Pan PY, Eisenstein S, et al. Paired immunoglobulin-like receptor-B regulates the suppressive function and fate of myeloid-derived suppressor cells [J]. *Immunity*, 2011, 34: 385–395.
- [23] Deng XH, Ai WM, Lei DL, et al. Lipopolysaccharide induces paired immunoglobulin-like receptor B (PirB) expression, synaptic alteration, and learning-memory deficit in rats [J]. *Neuroscience*, 2012, 209: 161–170.
- [24] Cai X, Yuan R, Hu Z, et al. Expression of PirB protein in intact and injured optic nerve and retina of mice [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37: 647–654.
- [25] Gou X, Zhang Q, Xu N, et al. Spatio-temporal expression of paired immunoglobulin-like receptor-B in the adult mouse brain after focal cerebral ischaemia [J]. *Brain Inj*, 2013, 27: 1311–1315.
- [26] Cheatwood JL, Emerick AJ, Schwab ME, et al. Nogo-A expression after focal ischemic stroke in the adult rat [J]. *Stroke*, 2008, 39: 2091–2098.
- [27] Lindau NT, Banninger BJ, Gullo M, et al. Rewiring of the cortico-

- spinal tract in the adult rat after unilateral stroke and anti-Nogo-A therapy [J]. *Brain*, 2014, 137: 739 – 756.
- [28] Wiessner C, Bareyre FM, Allegrini PR, *et al.* Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23: 154 – 165.
- [29] Taylor J, Chung KH, Figueroa C, *et al.* The scaffold protein POSH regulates axon outgrowth [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 5181 – 5192.
- [30] Montani L, Gerrits B, Gehrig P, *et al.* Neuronal Nogo-A modulates growth cone motility via Rho-GTP/LIMK1/cofilin in the unlesioned adult nervous system [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 10793 – 10807.
- [31] Adelson JD, Barreto GE, Xu L, *et al.* Neuroprotection from stroke in the absence of MHCI or PirB [J]. *Neuron*, 2012, 73: 1100 – 1107.
- [32] Li C, Wen H, Wang Q, *et al.* Exercise Training Inhibits the Nogo-A/NgR1/Rho-A Signals in the Cortical Peri-infarct Area in Hypertensive Stroke Rats [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2015, 94: 1083 – 1094.
- [33] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2009, 40: e331 – e339.
- [34] Liu L, Zhu L, Zou Y, *et al.* Panax notoginseng saponins promotes stroke recovery by influencing expression of Nogo-A, NgR and p75NGF, in vitro and in vivo [J]. *Biol Pharm Bull*, 2014, 37: 560 – 568.
- [35] Adelson JD, Barreto GE, Xu L, *et al.* Neuroprotection from stroke in the absence of MHCI or PirB [J]. *Neuron*, 2012, 73: 1100 – 1107.
- [36] Li L, Deng B, Li S, *et al.* TAT-PEP, a novel blocker of PirB, enhances the recovery of cognitive function in mice after transient global cerebral ischemia [J]. *Behav Brain Res*, 2017, 326: 322 – 330.

(收稿日期: 2017 – 09 – 01)