

神经营养因子与脊髓损伤的基因治疗*

席绍松¹ 刘维钢¹ 黄瑾^{2,3}

在20世纪80年代以前,人们普遍认为中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤后不具备再生的能力,所以脑和脊髓损伤一直是临床最难处理的问题之一。现在认为CNS再生困难的主要原因并不是神经元本身的问题,而是受损CNS内缺乏适合神经元轴突再生的微环境。其中脊髓损伤处缺乏神经营养因子类物质被认为是脊髓损伤后神经再生失败的主要原因。因为没有神经营养因子的支持,大部分被切断的神经元轴突甚至其胞体将逐渐溃变;没有神经营养因子的支持和诱导,被切断的轴突更无法进行再生。越来越多的研究表明中枢神经系统损伤后,局部神经细胞中某些神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)的表达上调有益于损伤轴突的再生^[1]。

1 脊髓损伤病理生理机制

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后经历原发性损伤和继发性损伤的序贯过程,造成不同程度的神经元和胶质细胞的坏死、凋亡,轴突的断裂、脱髓鞘。脊髓的继发性损伤是导致感觉和运动功能丧失的主要原因^[2]。SCI后修复面临的主要问题是:①脊髓空洞、胶质瘢痕构成阻碍轴突生长的机械屏障^[3];②原发和继发的神经元凋亡,使脊髓缺乏自我修复能力;③神经营养因子缺乏^[4];④损伤局部存在抑制轴突再生的因素如Nogo、髓磷脂相关糖蛋白等^[5]。由此,改善脊髓损伤处的微环境已经成为当前研究的热点。

2 神经营养因子与脊髓损伤的基因治疗

基因治疗脊髓损伤,既不存在胎儿神经组织移植的组织来源问题,又比外周神经组织移植引起的排异性低,是目前脊髓损伤治疗中最有前途的方法。基因治疗基本原理是利用转基因技术(物理、化学或生物),将某种特定的目的基因(重组DNA)转移到体内,使其在体内表达的基因产物发挥生物学活性。

目前,对SCI进行转基因研究所选择的的目的基因主要是以神经生长因子(nerve growth factor, NGF)为代表的NTFs。NTFs是一组由神经元、神经胶质细胞及神经支配靶组织产生的神经营养多肽,是能促进和维持神经元生长、生存、分化的特异蛋白分子,并能支持受损中枢神经系统神经元的存活,表达神经递质合成的关键酶,其效应主要由高亲和力受体trk和低亲和力受体p75NGFR介导。神经营养因子分两类,一类是神经营养素家族,包括NGF、脑源性神经生长因子(BDNF)、神经营养素-3(NT-3)、神经营养素-4/5(NT-4/5)和神经营养素-6(NT-6)等;另一类是睫状体神经营养因子(CNTF)。其他还有胶质细胞源性神经营养因子GDNF、aFGF、bFGF、IGF、EGF、PDNF、IL-1、IL-6以及酪氨酸磷酸酶受体样物质(RPTP)和生长相关蛋白GAP等^[6]。近年来,对可塑性相关候选基因15(CPG15),即neurtin基因产品的不断深入研

发和利用提示neurtin是神经活动和NTFs发挥作用的共同下游因子,与神经可塑性密切相关。

2.1 神经生长因子

NGF是最早发现的神经营养因子。早期的研究证实,NGF广泛分布于周围组织、外周神经系统和中枢神经系统。主要作用于神经嵴起源的发育中的感觉神经元和交感神经元及前脑基底部某些胆碱能神经元,具有维持细胞存活与发育及促进神经细胞突起向NGF浓度高的方向生长两大类生物效应。它是最具感觉神经元营养活性的因子,能诱导感觉神经元和去甲肾上腺素能神经元纤维延伸,使局部运动神经元纤维发芽。NGF无论对外周神经元还是对中枢神经元都有维持其存活和促进生长的作用。

近年来对NGF受体的实验研究证实,脊髓损伤后脊髓背根神经节中NGF mRNA表达增高,而且这种增高可能同感觉神经元的损伤呈正相关^[7]。脊髓损伤后给予外源性NGF试验表明,可明显促进正常脊髓前角神经元重新表达NGFR,并见神经元的胞体增大^[8]。

2.2 脑源性神经生长因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)

BDNF最具运动神经元营养活性,对多种感觉神经元、胆碱能神经元、多巴胺能神经元及γ-氨基丁酸能神经元的发育分化与生长再生具有维持和促进作用。BDNF可调节神经元的生长和存活,主要作用于红核脊髓束和红核神经元,能促进脊髓损伤后红核脊髓束的再生和功能恢复。

Ikeda等^[9]认为,SCI后早期,由神经元和星形胶质细胞合成的BDNF对损伤脊髓起神经保护作用;而在SCI后晚期,由小胶质细胞巨噬细胞分泌的BDNF则对损伤脊髓起神经修复作用。并在随后的试验中发现,SCI后鞘内注射BDNF可改善SCI急性期内Cu/Zn超氧化物歧化酶(Cu/Zn SOD)和髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)在脊髓神经元和胶质细胞中的表达衰减,从而对损伤脊髓神经功能的恢复起积极作用^[10]。

2.3 神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)

NT-3主要位于运动神经元,除可维持交感神经元、感觉神经元、基底前脑胆碱能神经元及运动神经元存活之外,还能上调胆碱能神经元乙酰胆碱转移酶的表达及支持中脑多巴胺能神经元分化及促进发育或损伤的皮质脊髓束侧枝出芽。NT-3可促进脊髓损伤后皮质脊髓束轴突生长及部分神经功能恢复,减慢横切损伤脊髓神经元死亡速度。

* 基金项目:兵团博士基金资助项目(2008JC11)

1 石河子大学医学院,新疆维吾尔自治区石河子,832002

2 石河子大学医学院生化教研室

3 通讯作者

作者简介:席绍松,男,在读硕士

收稿日期:2008-05-05

近年来围绕 NT-3 进行了多方面的研究,结果表明 NT-3 能够维持交感、感觉、基底前脑胆碱能和运动神经元的存活,减少脊髓损伤后神经元的凋亡^[11]。Zhou 等^[12]向受损脊髓局部持续注入 NT-3,发现可以增加损伤处皮质脊髓束再生出芽。同时 NT-3 还能促进神经细胞的分化及其轴突向靶点扩展和投射形成,诱导轴突再生^[13]。

2.4 胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor,GDNF)

GDNF 在胚胎及新生大鼠脊髓组织中高表达,在成年大鼠脊髓则处于散在低水平表达。其对运动神经元、感觉神经元及多巴胺能神经元均具有强大的营养活性,且其对脊髓损伤及各类神经损伤的治疗效果已在大量实验中得到证实。脊髓的机械性创伤及神经毒性损害的修复过程中均有 GDNF 参与,外源性 GDNF 的应用又有助于这种修复。

Watabe 等^[14]在脊神经撕脱处接种含人 GDNF 基因的腺病毒,1 周后损伤脊髓组织内强表达 GDNF,病损区出现人 GDNF mRNA 转录子,并出现广泛的 GDNF 阳性标记物,结果显著阻止病变部位的运动神经元死亡并改善 ChAT 免疫活性和抑制一氧化氮合酶活性。

2.5 neuritin(candidate plasticity-related genes 15,CPG15)

neuritin 是神经营养因子中的一个新成员。1993 年 Nedivi 在 Nature 杂志上首次以可塑性相关候选基因 15 (CPG15)为名报道出来。1997 年以色列科学家 Naeve 等从鼠海马齿状回中,筛选出此基因,并命名为 neuritin。研究表明,它与神经可塑性密切相关,能够促进神经突起的快速生长,分支及突触的成熟,并抑制神经元祖细胞凋亡^[15]。在神经系统,neuritin mRNA 主要分布于背根节、脊髓、海马、小脑和脑干等处,此外,也表达于骨骼肌、肝脏等多种外周组织。

2.5.1 neuritin 在神经损伤治疗中的研究现状:neuritin 是神经活动和 NTFs 发挥作用的共同下游因子: neuritin 蛋白的初步功能研究提示,重组体 neuritin 促进神经突起的生长和分支,而无论是神经活动的刺激还是神经营养因子的直接作用都能诱导神经突起的生长。这提示 neuritin 是神经活动和 NTs 发挥作用的共同下游因子。2004 年,Pahnke 等^[16]发现 GDNF 在神经祖细胞 ST14A 细胞中过表达,neuritin 是 GDNF 的上调基因,与生长锥的寻路和神经突起向靶细胞生长有关。

neuritin 阻断神经细胞凋亡;神经细胞增殖和凋亡之间的平衡对发育中的神经系统形成正常形态和功能具有极其重要的作用。体内外实验表明^[17],neuritin 对未分化脑皮质祖细胞的存活是必要的,其机制是,neuritin 阻止了细胞凋亡蛋白酶 CPP3(caspase3)的激活,从而阻断了细胞凋亡进程,保护培养的大脑皮质神经元免于凋亡。

neuritin 促进突触成熟;在神经系统发育期间突触活动性通过控制轴突和树突的结构来影响神经元连接的形式。通过对运动神经元连续 3d 的实时双光子成像发现,neuritin 主要通过轴突新突起的增多和原有突起缩短的减少增加轴突的总长度,并促进新突起向突触后膜的延伸及突触囊泡在新突起内的聚集以形成新的突触回路^[18]。由此表明 neuritin 对突触成熟和机构重塑有促进作用。

2.5.2 neuritin 与脊髓损伤的基因治疗:neuritin 在神经再生修复中的作用和机制已被我们认可,并有越来越多的文献报道其对周围神经损伤的修复功效。然而 neuritin 对于脊髓损伤是否也有类似于 NGF、BDNF 的修复作用,国内外尚未见到直接的文献报道。近几年,随着对 neuritin 基因的研究不断深入,人们的目光已经开始转向其在脊髓损伤治疗中的研究前景。

Nedivi 等^[19]通过克隆非洲蟾蜍 CPG15 并应用原位杂交和免疫组化技术来测定 CPG15 的表达模式,发现 CPG15 首先是在发育期的脊髓中被检测到,并随着发育过程而广泛分布。neuritin mRNA 最早表达场所之一是在脊髓腹侧,neuritin 蛋白出现在运动神经元轴突和乙酰胆碱受体簇附近的突触前轴突分支。近年研究证实,neuritin 是雄性激素介导的运动神经元轴突向外生长的分子调节器^[20]。neuritin 可以通过增加突触密度和添加分支的程度来增加运动神经元轴突末端分支。我们已经知道,轴突生长是受运动神经元分支增加、突触形成、突触消失和分支回缩的动态平衡调控的,而 neuritin 则能通过增加和维持额外分支,减少分支回缩将动态平衡转向轴突生长^[21]。

Di 等^[22]采用微点阵分析以辨别与脊髓损伤后功能恢复呈时序性调节表达模式的基因簇,首次报道大鼠脊髓损伤后,neuritin 与整合素、微管相关蛋白 1A 和髓鞘少突胶质糖蛋白协调表达在有丝分裂期后的神经元,并协同促进背根神经节细胞突起的生长。并认为脊髓损伤后 neuritin 基因簇表达时序性调节为神经再生和运动功能恢复提供了有利的微环境。由此提示我们,neuritin 有可能成为脊髓损伤新的治疗靶点。

3 结论

NTFs 是一类能够促进神经元存活、生长和分化的蛋白质,随着分子生物学和基因技术的发展,NTFs 基因修饰细胞移植已被认为是 SCI 治疗的最新、最有前途的治疗方法之一。将某种神经营养基因以一定的方法转染给合适的受体细胞,再移植到脊髓损伤区,让其在体内表达并发挥效应,刺激脊髓再生;此外,脊髓再生过程中有一些抑制脊髓再生的蛋白,可以利用基因工程技术克隆这些蛋白的基因,导入其反义核苷酸,抑制这些蛋白的表达,也可能促进脊髓的再生修复。

目前应用到脊髓损伤的细胞移植多种多样,包括胚胎中枢神经组织、胚胎干细胞、骨髓间充质干细胞、基因转染的成纤维细胞、雪旺细胞、嗅鞘细胞 OECs 等。有实验表明 BDNF 基因修饰神经干细胞移植,可以降低神经细胞的死亡率,促进损伤神经的功能恢复^[23]。近年来,国内学者应用基因转染技术,分别在体外构建 GDNF 和 NT-3 基因修饰细胞进行 SCI 的修复治疗,也取得了可喜的成果^[24-25]。

综上所述,以神经营养因子为代表的基因疗法对脊髓损伤的作用,目前虽然仍停留在实验室阶段,但却不可否认的具有临床应用的前景,尤其基因治疗手段的不断提高为这种前景奠定了基础。而 neuritin 基因产品的进一步开发和应用,必将为脊髓损伤的基因治疗研究拓展出新的思路。

参考文献

- [1] Nomura T, Honmou O, Harada K, et al. I.V. Infusion of brain derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat[J]. *Neurosci*, 2005,136(1):161—169.
- [2] Fei Q, Carl A, Hongbin S, et al. Complement plays an important role in spinal cord injury and represents a therapeutic target for improving recovery following trauma[J]. *American Journal of Pathology*, 2006,169:1039—1047.
- [3] Soheila KA, Eftekhar E, Jian W, et al. Delayed transplantation of a-dult neural precursor cells promotes remyelination and functional neu- rological recovery after spinal cord injury [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2006,26(13):3377—3389.
- [4] Fawcett J. Repair of spinal cord injuries:where are we,where are we going[J]? *Spinal Cord*, 2002,40:615—623.
- [5] Bregman BS, Coumans JV, Dai HN. Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury [J]. *Prog Brain Res*, 2002,137: 257—273.
- [6] 胡蕴玉. 现代骨科基础与临床 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.266—267.
- [7] Brown A, Ricci MJ, Weaver LC. NGF mRNA is expressed in the dorsal root ganglia after spinalcord injury in the rat[J]. *Exp Neurol*, 2007,205(1):283—286.
- [8] Shimode H, Ueki A, Morita Y. Nerve growth factor attenuates hippocampal cholinergic deficits and operant learning impairment in rats with entorhinal cortex lesions [J]. *Behav Pharmacol*, 2003,14(3):179—190.
- [9] Ikeda O, Murakami M, Ino H, et al. Acute up-regulation of brain -derived neurotrophic factor expression resulting from experimentally induced injury in the rat spinal cord [J]. *Acta Neuropathol*, 2001,102(3):239—245.
- [10] Ikeda O, Murakami M, Ino H, et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on compression-induced spinal cord injury: BDNF attenuates down-regulation of superoxide dismutase expression and promotes up-regulation of myelin basic protein expression [J]. *Neuropathol Exp Neurol*, 2002,61 (2):142—153.
- [11] Claire E, Hulsebosch. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury [J]. *Adv Physiol Educ*, 2002,26 (5):235—255.
- [12] Zhou L, Baumgartner BJ, Hill -Felberg SJ, et al. Neurotrophin-3 expressed in situ induces axonal plasticity in the adult injured spinal cord [J]. *Neurosci*, 2003,23(4):1424—1431.
- [13] Schwab ME. Repairing the injured spinal cord [J]. *Science*, 2002,295:1029—1031.
- [14] Watabe K, Ohashi T, Sakamoto T, et al. Rescue of lesioned adult rat spinal motoneurons by adenoviral gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor [J]. *Neurosci Res*, 2000,60(4):511—519.
- [15] Putz U, Harwell C, Nedivi E. Soluble CPG15 expressed during early development rescues cortical progenitors from apoptosis[J]. *Nat. Neurosci*, 2005, 8(3):322—331.
- [16] Pahnke J, Mix E, Knoblich R. Overexpression of glial cell line -derived neurotrophic factor induces genes regulating migration and differentiation of neuronal progenitor cells [J]. *Exp Cell Res*, 2004,297(2):484—494.
- [17] Putz U, HarwEdl C, Nod ivi E. Soluble CPG15 expressed during early development rescues cortical progenitors from apoptosis[J]. *Nat Neurosci*, 2005,8(3):322—331.
- [18] Javahefian A, Cline HT. Coordinated motor neuron axon growth and neuromuscular synaptogenesis are promoted by CPG15 in vivo[J]. *Neuron*, 2005,45(4) :505—512.
- [19] Nedivi E, Javaherian A, Cantallops I, et al. Developmental regulation of CPG15 expression in *Xenopus* [J]. *Comp Neurol*, 2001,435(4):464—473.
- [20] Marron TU, Guerini V, Rusmini P, et al. Androgen-induced neurite outgrowth is mediated by Neuritin in motor neurons[J]. *Neurochem*, 2005,92(1):10—20.
- [21] Javaherian A, Cline HT. Coordinated motor neuron axon growth and neuromuscular synaptogenesis are promoted by CPG15 in vivo[J]. *Neuron*, 2005,45(4):505—512.
- [22] Di Giovanni S, Faden AI, Yakovlev A, et al. Neuronal plasticity after spinal cord injury: identification of a gene cluster driving neurite outgrowth [J]. *FASEB*, 2005,19(1):153—415.
- [23] Yan Jing -feng, Yue Chang -bo. Effect of implantation of neural stem cell modified by BDNF on apoptosis of neural cells after spinal cord injury [J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2006,11(9):547—560.
- [24] 丁继固,丁文杰,李光,等.胶质源性神经营养因子体外诱导小鼠胚胎中脑神经干细胞分化的研究[J].*中国康复医学杂志*,2008, 23(4): 341—343.
- [25] 肖向建,刘卫刚,李敏,等.胶质细胞源性神经营养因子对肌萎缩侧索硬化症培养模型的保护作用[J].*中国康复医学杂志*,2007, 22(6): 506—507.