

DOI: 10.13376/j.cbls/2015027

文章编号: 1004-0374(2015)02-0191-07

## 以髓磷脂相关抑制因子及其受体为靶点的脊髓损伤免疫治疗策略研究

陈开廷<sup>1</sup>, 王永堂<sup>2</sup>, 舒亚海<sup>1</sup>, 肖 岚<sup>1</sup>, 鲁秀敏<sup>1\*</sup>

(1 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054; 2 第三军医大学大坪医院  
野战外科研究所创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400042)

**摘 要:** 脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 往往导致患者下肢活动功能受限, 甚至瘫痪, 降低患者生活质量, 且治愈率低。髓磷脂相关抑制因子 (myelin associated inhibitors, MAIs) 是抑制受损中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 再生修复的一个重要因素。对 MAIs 及其信号通路的干扰能有效逆转 CNS 神经再生抑制信号, 促进脊髓损伤后轴突的再生。MAIs 抑制轴突再生信号通路的发现及其深入研究为损伤脊髓的免疫治疗提供了充分的理论依据和研究靶点。将对抑制神经再生信号通路中 MAIs 及其受体的生物学功能新进展以及以此为治疗靶点设计的脊髓损伤免疫治疗策略作一综述。

**关键词:** 髓磷脂相关抑制因子; Nogo 受体; 配对免疫球蛋白样受体 B; 脊髓损伤; 免疫治疗  
中图分类号: R651.2 文献标志码: A

## The study of immunotherapy strategies for spinal cord injury targeting myelin-associated inhibitors and their receptors

CHEN Kai-Ting<sup>1</sup>, WANG Yong-Tang<sup>2</sup>, SHU Ya-Hai<sup>1</sup>, XIAO Lan<sup>1</sup>, LU Xiu-Min<sup>1\*</sup>

(1 College of Pharmacy and Biological Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;  
2 State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third  
Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract:** Spinal cord injury (SCI) often leads to lower limb function even paralysis with declined cure rate, and obviously reduces life quality of patients. Myelin-associated inhibitors (MAIs) play a pivotal role in inhibition of the regeneration of damaged central nervous system (CNS). Interferencing the function of MAIs or theirs signaling pathway is a promising method to overcome the inhibitory effects of MAIs in central nervous system, and enhances axonal regeneration after SCI. The roles of MAIs and downstream signaling pathway inhibiting axonal regeneration have been well investigated, which provides sufficient theoretical basis and target for SCI immunotherapy. The research of the biological function of MAIs and their receptors in inhibition of axonal regeneration and immunotherapy strategies for SCI is reviewed in this article.

**Key words:** myelin-associated inhibitory factors; NgR; PirB; spinal cord injury; immunotherapy

成体哺乳动物中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 损伤后, 由于受损神经再生能力弱往往导致患者部分功能缺失, 甚至瘫痪。相比而言, 周围神经系统 (peripheral nervous system, PNS) 轴突损伤后却有较强的再生能力, 致残率较低。损伤神经元轴突在 CNS 和 PNS 表现出不同的再生能力已引起广泛关注。外周神经系统微环境有益于轴突的再生, 而中枢神经系统微环境对轴突再生具有明显

抑制作用<sup>[1]</sup>。这是由于中枢神经系统微环境中的髓磷脂相关抑制因子及其相关物质基础阻碍了中枢神

收稿日期: 2014-08-30; 修回日期: 2014-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(81101464); 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室自主研究课题资助项目(SKZZ201215); 重庆理工大学研究生创新基金资助项目(YCX2013223)

\*通信作者: E-mail: luxm@cqut.edu.cn

经系统的自我修复。随着 IN-1 抗体抑制 CNS 髓磷脂轴突再生抑制作用的发现, Nogo 诱导生长锥塌陷和抑制神经生长功能的确认, 以及其他髓磷脂抑制因子及其受体的发现, 特别是相关体内和体外研究的逐步深入, 进一步阐明了中枢神经损伤后轴突再生抑制效应的分子机制, 为脊髓损伤修复提供了研究靶点, 使脊髓损伤的免疫治疗成为可能。

### 1 MAIs及其受体

成体脊椎动物脊髓损伤后, 中枢微环境存在许多抑制轴突生长的因子。髓磷脂相关抑制因子 (myelin associated inhibitors, MAIs) 是损伤神经中枢微环境中抑制轴突再生最主要的因素, 其中 Nogo、髓磷脂相关糖蛋白 (myelin associated glycoprotein, MAG)、少突细胞髓磷脂糖蛋白 (oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMgp) 是损伤的中枢神经系统环境中抑制神经元再生最关键的 MAIs。Nogo 是细胞内质网膜上膜蛋白基因家族的成员之一, 由于其中枢神经系统具有显著抑制神经突再生的能力而使损伤神经再生失败, 因此, 在中枢神经再生领域

得到较早的关注和深入研究。Nogo 有 3 种亚型: Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C, 其中 Nogo-A 研究最多。中枢神经系统损伤后, 具有抑制神经再生活性的 MAIs 被释放到脊髓损伤部位附近的微环境, 与轴突神经元细胞表面多种受体和共同受体相互作用, 最终通过 Rho 及 Rho 相关激酶信号通路引起细胞骨架重排, 发挥抑制轴突再生的效应。

#### 1.1 MAIs的生物学功能

中枢神经系统中目前已经发现与轴突再生抑制有关的 MAIs 有多种, 其中 MAG、OMgp 及 Nogo 最为重要, 其抑制轴突再生的信号通路见图 1。

##### 1.1.1 MAG

MAG 是首个被确定的 MAIs, 其在髓磷脂形成早期便在 PNS 的雪旺细胞及 CNS 的少突胶质细胞上有表达, 是一种在中枢神经系统高表达的跨膜糖蛋白。MAG 在 CNS 髓磷脂及 PNS 髓磷脂含量不同, 前者 1%, 后者 0.1%, 这可能是 CNS 损伤神经再生能力明显弱于 PNS 的一个原因。MAG 对轴突再生的调节可能呈双向性, 即促进幼稚神经元生长, 抑制成熟神经元生长。早期作为一种神经生

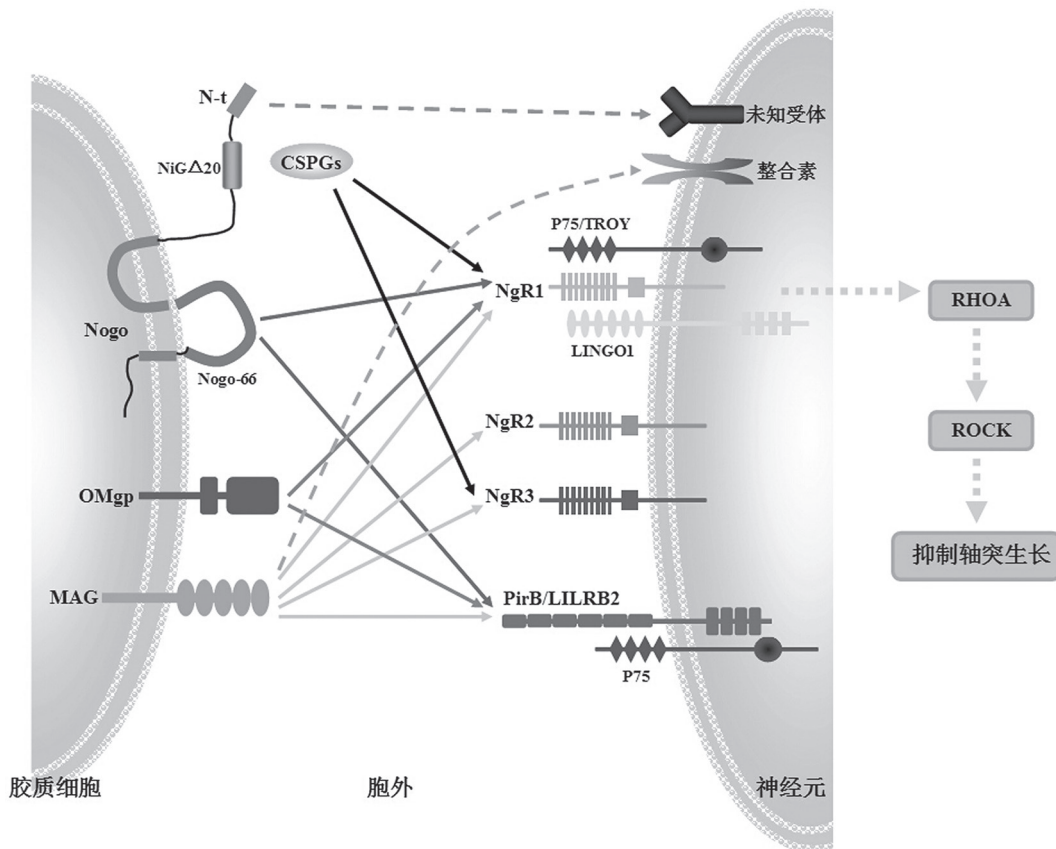


图1

长抑制因子, MAG 曾广泛用于对出生后和成熟神经元轴突生长的分析。尽管基因缺失与鞘内唾液酸酶传递共同干扰 MAG 结合神经节苷脂 GD1a 和 GT1b, 促进 5-羟色胺 (5-HT) 能轴突的出芽<sup>[2-3]</sup>, 而 MAG 基因敲除反而能减少皮质脊髓束 (cortical spinal tract, CST) 轴突神经的出芽<sup>[2]</sup>。同样, 单独靶向作用于 MAG 并不能有效促进轴突再生<sup>[4]</sup>。由此可见, 成体 CNS 中 MAG 可能对神经元的生长抑制作用具有选择性。在成体 CNS, MAG 在一定程度上能够防止受损轴突细胞的恶化, 并具有促进局部轴突生长的作用, 这可能是 CNS 损伤后并非不能再生, 只是再生能力弱的一个原因。

### 1.1.2 OMgp

OMgp 是早期从人 CNS 白质中分离的一种新的花生凝集素蛋白, 其富含亮氨酸重复序列, 在 PNS 及 CNS 少突胶质细胞和神经元中均有表达。脊髓损伤后, OMgp 主要在少突胶质细胞和神经元中表达, 且 OMgp 表达缺陷的脊髓损伤骨髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 动物模型, 其轴突再生及功能恢复均得到不同程度的改善<sup>[2]</sup>。OMgp 基因敲除不能促进 CST 轴突再生和 5-HT 能轴突再生<sup>[2, 4]</sup>, 但能促进 5-HT 轴突出芽<sup>[4]</sup>。因此认为, SCI 后 OMgp 可能抑制轴突的出芽。目前在外周神经系统 OMgp 促进轴突出芽的作用机制仍知之甚少, 但值得注意的是, OMgp 可能参与调节突触强度所依赖的突触活性和可塑性<sup>[5]</sup>。

### 1.1.3 Nogo

作为一类重要的 MAIs, Nogo 的 3 种亚型 (Nogo-A、Nogo-B 和 Nogo-C) 均由同一基因通过不同启动子或 RNA 剪切而成。其中 Nogo-A 是研究最多的 MAIs, 由于其在少突胶质细胞中高表达且在 CNS 中显著的神经再生抑制作用而引起广泛关注。Nogo-66 是 Nogo-A 的功能区域之一, 能够诱导生长锥塌陷和抑制神经突生长。而 Amino-Nogo-A 是 Nogo-A 的特有抑制功能区域, 位于少突胶质细胞和胞外, 该区域的 NiG- $\Delta 20$  (aa544-725) 对神经突的生长具有强烈的抑制作用。通过特异性封闭该区域, 可降低 CNS 髓磷脂对轴突生长的抑制效应<sup>[6]</sup>。目前对 Amino-Nogo-A 发挥抑制轴突生长和细胞扩散的作用机制尚知之甚少, 但神经元和成纤维细胞的 Akt1 通路是 Amino-Nogo-A 作用机制的一个已知信号通路。Amino-Nogo-A 通过降低 Akt1 的磷酸化, 活化蛋白激酶 D 和 Akt1, 进而促进脊髓损伤轴突的再生。将小鼠进行不同的 Nogo

基因敲除并对各实验小鼠的轴突生长和损伤修复效果进行分析<sup>[7-8]</sup>, 结果发现各种 Nogo 基因敲除后均会导致小鼠缺乏 Nogo-A, 同时也不同程度地影响 Nogo-B 和 Nogo-C 的表达<sup>[9]</sup>, 但仍表现出对体外培养的神经元细胞生长具有降低抑制作用的功能, 由此可见 Nogo 在髓鞘相关抑制轴突生长方面有巨大作用。

## 1.2 MAIs受体及其生物学功能

### 1.2.1 NgRs

Nogo 受体 (Nogo-66 receptors, NgRs) 是一类富含亮氨酸并可与糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 偶联的蛋白, 主要位于中枢神经系统神经元和轴突上的细胞膜表面, 其基因位于染色体 22q11, 长 2.7 kb, 并包含两个外显子, 其基因名为 *RTN4R*。因无细胞内结构和跨膜区域, 所以接收到的抑制信号需要借助其他共同受体才可向下游传递<sup>[10]</sup>。NgRs 中枢神经系统中的 NgRs 主要有 3 种: NgR1、NgR2 和 NgR3。NgR1 对 Nogo-66 具有高度亲和力, 能与具有 Nogo-66 结构的 MAIs 相互作用, 通过信号转导最终产生较强的轴突再生抑制作用。此外, NgR1 还能够与 MAG 和 OMgp 结合。与 NgR1 相比, NgR2 与 MAG 的亲和力更强。值得注意的是硫酸软骨素蛋白多糖 (CSPGs), 作为星形胶质细胞衍生的一种轴突生长抑制剂, 能通过与 NgR1 和 NgR3 作用调节轴突的出芽, 发挥其对 CNS 最初的修复作用<sup>[11]</sup>。

NgR1 与其共同受体 (LINGO-1/p75NTR/TROY) 形成复合体介导神经再生抑制信号的传递。MAIs 与 NgR1 结合形成的配体 / 受体 / 共同受体复合物可促进 p75NTR 与 Rho-GDI 的结合, 导致 RhoA 的释放。释放的 RhoA 被 Rho 鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) 激活。激活的 RhoA 和蛋白激酶 C 进一步活化 ROCK 激酶和 LIM 激酶-1 (LIM kinase-1, LIMK-1)<sup>[12]</sup>, 分别使脑衰反应调节蛋白 (CRMP-2) 及丝切蛋白第 3 位丝氨酸发生磷酸化。丝切蛋白是关键肌动蛋白结合蛋白, 其磷酸化导致肌动蛋白骨架发生改变, 引起丝状伪足和板状伪足塌陷, 导致轴突神经生长锥的崩解和麻痹。RhoA/Rho 激酶 (ROCK) 信号通路能促进生长锥肌动蛋白的解聚并抑制轴突再生, 对 Rho-ROCK 信号通路抑制或封闭能够促进 CNS 轴突再生和神经功能的恢复<sup>[13-14]</sup>。MAIs 与受体复合物 p75NTR/NgR1/LINGO-1 和 TROY/NgR1/LINGO-1 相互作用, 导致 Rho-AGTP 酶和 ROCK 信号途径活化, 调控少突胶质神经细胞祖细胞的分化以及髓鞘形成。遗传学研



究发现, NgR1 及其共同受体 p75NTR 基因敲除均不能促进 CST 的再生<sup>[15]</sup>。NgR1 基因敲除小鼠经全脊髓横断术后, 5-HT 神经轴突没有表现出促再生的作用<sup>[16]</sup>。由此可见, 除 NgR 外, 可能还存在其他因素对中枢神经系统轴突再生抑制信号的传递起重要作用。LINGO-1 富含亮氨酸重复序列, 在 CNS 神经元和少突胶质细胞中选择性表达。LINGO-1 作为 p75NTR/NgR1 和 TROY/NgR1 信号复合体的重要部分, 通过酪氨酸相关激酶 B(TrkB) 信号通路负向调控脑源性神经营养因子(BDNF), 是少突胶质前体细胞(oligodendrocyte precursor cells, OPCs) 分化和髓鞘形成的重要负调控子<sup>[17]</sup>。LINGO-1 基因敲除对斑马鱼髓鞘的形成和少突胶质细胞的分化也具有一定的影响<sup>[18]</sup>。

### 1.2.2 配对免疫球蛋白样受体B

配对免疫球蛋白样受体 B (paired-immunoglobulin-like receptor B, PirB) 是继 NgR 后新发现的另外一种 MAIs 受体, 在中枢神经系统其能够与 Nogo、MAG 及 OMgp 高亲和性结合, 参与 MAIs 抑制信号的转导。PirB 可在成熟 CNS 中表达, 但其表达量要低于其他 MAIs<sup>[19]</sup>, 尤其是在 CST, 甚至检测不到 PirB 的表达<sup>[20]</sup>。有趣的是, MAIs 与 PirB 结合后生长抑制信号的传递同样需要 p75NTR 的参与<sup>[21]</sup>, 结果导致磷酸酶(SHP-1 和 SHP-2) 的聚集, 然后调节原肌球蛋白受体激酶磷酸化和相关信号的转导<sup>[22]</sup>。随着 PirB 研究的深入, 人们发现 PirB 对损伤脊髓轴突再生也具有明显的抑制作用, 且除 NgR 外, 为治疗脊髓损伤, 促进轴突再生以及神经功能恢复提供了新的治疗靶点<sup>[23]</sup>。PirB 基因敲除后产生的轴突再生效果某种程度上甚至优于 NgR1 基因敲除, 表明 PirB 在髓磷脂抑制作用方面的功能可能要优于早先发现的 NgR1, 如果同时敲除 NgR1 和 PirB 则可完全逆转由髓磷脂所致的神经元生长锥塌陷。体外轴突再生实验表明, NgR1 基因敲除能够促进 PirB 基因敲除对髓磷脂轴突再生抑制作用的逆转<sup>[20]</sup>。以上研究证实, 除 NgR 外, PirB 是介导 MAIs 轴突再生抑制效应的又一重要受体, 提示在脊髓损伤修复的研究中可以将 PirB 与 NgR 的协同作用作为今后研究的重点。

## 2 免疫治疗策略

MAIs 及其受体是抑制中枢神经损伤后轴突再生的主要因素。以 MAIs 及其受体为靶点中和或破坏髓鞘相关蛋白, 可消除 SCI 后 MAIs 的抑制作用,

促进轴突再生。目前人们对以 MAIs 及其受体为靶点的不同脊髓损伤免疫治疗策略进行了大量探索。

### 2.1 中和性抗体

Nogo 是研究得最为广泛的 MAIs, 其抑制损伤轴突再生的生物学功能迅速得以确定, 关于中和 Nogo 以抑制其相应生物学功能的研究屡见不鲜, 尤其是 Nogo-A。早期通过制备 Nogo-A 单克隆抗体和髓鞘匀浆促进损伤脊髓的轴突再生, 结果发现该类免疫治疗策略均能在一定程度上促进神经再生。在成年高等脊椎动物中, 中和 Nogo-A 单抗、肽类、融合蛋白能够促进损伤脊髓出芽和轴突再生以及肢体功能性恢复<sup>[24]</sup>。随着研究的深入, 用于阻断 Nogo-A 以治疗脊髓损伤修复药物的临床研究已趋于成熟, 然而, 该类药物临床研究的其他相关方面同样也引起了研究者的关注。Craveiro 等<sup>[25]</sup>对成年大鼠模型进行抗 Nogo-A 抗体免疫治疗, 观察功能阻断性抗 Nogo-A 抗体是否会导致正常动物在行为上的改变。通过蛋白质组学和免疫组化发现, 在完整中枢神经系统中缓慢地中和 Nogo-A 会增加细胞骨架蛋白、纤维生长相关蛋白以及突触蛋白的表达, 连续给药 4 周或 4 周以上的抗 Nogo-A 免疫治疗是安全的。Gonzenbach 等<sup>[26]</sup>对最佳给药时间进行探讨, 结果发现及时或延迟 1 周给予抗 Nogo-A 抗体药物后, 损坏 CST 纤维再生超过几毫米并且大鼠游泳恢复良好, 但是延迟 2 周处理却没有表现出明显的恢复效果。因此推断, 对于成年啮齿动物, 有效应用抗 Nogo-A 抗体治疗脊髓损伤的时间段应控制在 2 周之内。该研究不仅扩大了抗 Nogo-A 抗体药物临床前的研究范围, 使其实际应用研究更加全面, 也为药物的临床治疗研究提供更可靠的数据参考。鞘内注射抗 Nogo-A 抗体能通过脑脊髓液分布到整个脊髓和大脑, 促进脊髓发芽、轴突再生以及运动功能恢复。

### 2.2 靶向短肽拮抗剂

Nogo-66 位于 Nogo-A 的碳端, 被确认为是 3 种 Nogo 亚型抑制神经突生长的主要功能区域。对 Nogo-66 与 NgR 进行联合干扰能有效阻断 CNS 髓磷脂抑制信号的传递。Nogo 胞外肽 NEPI-40 是源于 Nogo-66 的 NgR 竞争性拮抗剂, 能逆转髓磷脂对损伤脊髓的抑制作用, 广泛诱导 CNS 的神经纤维生长、轴突生长蛋白上调、血清素纤维的出芽和突触的再生。Deng 等<sup>[27]</sup>对短肽类阻碍 Nogo-66/NgR 信号通路的转导以及促进轴突再生进行了探讨, 结果发现, 在噬菌体展示肽库中筛选出抗 NEPI-

35 的 Nogo-66 结合肽, 能够有效中和髓磷脂抑制剂。最近又在噬菌体展示肽库中设计并合成小型 Nogo-66 结合肽 PepIV 和 PepII, 经腹腔注射后对其抑制 Nogo-66/NgR 信号通路和促进 SCI 神经再生的有效性进行检测<sup>[28]</sup>。结果发现, PepIV 及 PepII 能下调小型 GTP 酶 RhoA 的 mRNA 表达水平并可部分中和 CNS 髓鞘抑制剂, 导致小脑颗粒细胞 (CGCs) 的生长。行为学观察也证实两种肽均可促进 SCI 后神经再生和运动功能的恢复。因此, 应用在噬菌体肽库设计合成并能与 Nogo-66 部分结合的小型肽类能促进 SCI 神经元的存活和轴突再生, 逆转 CNS 髓磷脂对神经再生的抑制作用并保护未损伤脊髓。小型肽制作工艺简单, 能降低药物成本。相对于蛋白而言, 小型肽的副作用小, 刺激机体自身免疫应答的可能性较低, 药物治疗的效价更高, 药物在体内停留时间更长。小型肽类药物由于结构简单、相对分子质量小, 可认为该类物质有可能与 CNS 髓鞘蛋白上的某些未知的活性位点结合, 而这些活性位点可能是修复损伤脊髓的潜在治疗靶点。

### 2.3 蛋白疫苗免疫治疗

在抑制中枢神经再生信号通路中, NgR 和 PirB 是抑制神经再生因子的主要受体, 基因敲除后可促进损伤脊髓的再生、修复及运动功能的改善<sup>[23-24]</sup>。NgR1 能与多种 MAIs 结合, 并且与 Nogo-66 片段具有高亲和力<sup>[15]</sup>, 因此, 在神经元的再生及 CNS 的修复过程中具有重要作用。Yu 等<sup>[29]</sup>给 SCI 大鼠注射重组 NgR 蛋白疫苗, 刺激机体产生抗 NgR 抗体从而有效逆转 NgR 介导的轴突生长抑制效应。研究发现, 重组 NgR 蛋白能够产生较高的抗体滴度, 抗血清能促进大鼠小脑神经元的生长。脊髓半横切损伤大鼠经免疫治疗后, BDA 顺行示踪检测发现重组 NgR 蛋白免疫能促进损伤的 CST 轴突生长, 显著缩小伤口体积, 有效提高 BBB 行为评分及网格步行成绩, 显著改善脊髓损伤的修复效果。我们课题组曾用 15 nm 纳米金包被的人 NgR-Fc 融合蛋白疫苗免疫 SCI 大鼠, 结果发现, 同样能有效促进轴突再生和脊髓损伤后运动功能的恢复<sup>[30]</sup>。另外, NgR 蛋白疫苗分别与生长因子<sup>[31]</sup>和神经干细胞<sup>[32]</sup>联合应用治疗脊髓损伤, 结果发现, 联合应用多种修复方法比单独使用一种方法的效果更好。此外, NgR 疫苗还有助于移植到体内的神经干细胞分化为神经元和少突胶质神经细胞, 促进损伤脊髓神经纤维束的再生。

MAIs 受体的共同受体对于神经再生抑制信号

的传递同样发挥重要作用。LINGO-1 通过激活 RhoA 和抑制蛋白激酶 B(Akt) 磷酸化, 能够负向调控少突胶质细胞的分化和神经元的存活并可抑制髓鞘的形成<sup>[33]</sup>。靶向抑制 LINGO-1 是治疗 CNS 疾病和修复损伤脊髓的新方法。研究发现, 给予成年脊髓损伤大鼠免疫高效价兔 LINGO-1 多克隆抗血清后, 能显著降低 RhoA 的活性, 增加神经元的生长活力, 能够有效逆转 NgR 介导的神经再生抑制作用。脊髓半横切损伤大鼠模型经抗血清免疫治疗, 动物后肢运动功能得到显著恢复<sup>[34]</sup>。细胞因子干扰 p75NTR 的表达能显著影响神经元在体内的生长状态以及神经再生<sup>[35-36]</sup>, 因此 p75NTR 的探索研究对损伤脊髓修复的治疗同样具有重要意义。

### 2.4 核酸疫苗免疫治疗

核酸疫苗作为一种新型疫苗, 与常规蛋白疫苗相比, 具有制备简单、稳定性好、储运方便的特点, 并且在体内可以同时诱发细胞免疫和体液免疫<sup>[37]</sup>。不仅如此, 核酸疫苗具有灵活性, 运载病原体可多样化。多个抗原基因可同时整合到一个质粒载体上或将多种重组质粒联合进行免疫, 从而引起机体产生多种免疫反应, 达到治疗疾病的目的。

#### 2.4.1 靶向 MAIs 核酸疫苗

用于脊髓损伤修复的核酸疫苗通常根据靶蛋白设计重组核酸疫苗, 核酸疫苗 DNA 序列能在宿主体内编码表达髓磷脂衍生分子的目的区域, 刺激机体产生抗体并与宿主自身髓磷脂分子的抑制功能区域结合, 削弱或解除髓磷脂对 CNS 神经的生长抑制作用。早期人们对脊髓损伤修复有关的核酸疫苗进行了大量研究, 设计编码多种抑制轴突生长的结构域, 包括含有 MAG、Nogo-A 的氨基端、细胞外 66 氨基酸残基、Tenascin-R 结构域的重组核酸疫苗<sup>[38]</sup>。研究发现, 该核酸疫苗免疫动物后, 血清中含有 MAG、Nogo-A 的氨基端、细胞外 66 氨基酸残基及 Tenascin-R 结构域蛋白的相应抗体, 停止免疫大鼠 6 w 后, 血清中仍存在大量抗体。这些核酸疫苗免疫产生的抗体可有效抑制 MAIs 的再生抑制信号, 促进神经再生。Bourquin 等<sup>[39]</sup>制备 Nogo-A 核酸疫苗免疫动物, 结果发现, Nogo-A 核酸疫苗能有效诱导产生 Nogo-A 特异性抗体, 其能特异性识别 Nogo-A、体外培养的细胞内 Nogo-A 以及少突胶质细胞表面 Nogo-A。值得注意的是, 与蛋白肽类免疫小鼠易导致实验性自身免疫性脑脊髓炎相比, Nogo-A 核酸疫苗会明显降低患者发生脑脊髓炎的概率, 这对于核酸疫苗用于脊髓损伤治疗具有重要意义。



### 2.4.2 靶向MAIs受体核酸疫苗

Yu 等<sup>[40]</sup>成功构建了 NgR 核酸疫苗并在体内外得到相应表达, 将其用于免疫大鼠, 发现脊髓损伤大鼠经免疫后运动功能恢复较快, 且该疫苗能诱导 T 细胞应答和刺激机体产生含 NgR 抗体的抗血清, 能部分逆转 MAG 对轴突生长抑制; 通过三维重组组织学评估发现, 与未免疫组相比, 免疫大鼠脊髓伤口体积减小 30.8%, NgR 核酸疫苗能够促进轴突再生并使脊髓损伤大鼠的行为学功能得到显著改善。

近年有研究报道, 以慢病毒作为载体携带有 NgR 基因片段的 DNA<sup>[41]</sup> 或 RNA<sup>[42]</sup>, 在机体内的表达同样可刺激自身免疫系统产生 NgR 抗体, 促进轴突再生。由于慢病毒特有的生物性质, 所以相比于单纯的核酸疫苗, 作为载体的慢病毒能够刺激产生更多的抗体, 对于抑制 NgR 在中枢神经系统中介导髓鞘再生抑制效应具有显著作用。Wu 等<sup>[43]</sup>应用聚醚 F-127 凝胶运送慢病毒载体, 该慢病毒载体通过编码短 LINGO-1 超敏蛋白干扰 RNA 以达到抑制 LINGO-1 在体内的表达。结果发现, 该方法能够有效降低 LINGO-1 的表达, 促进轴突生长和突触形成, 保护髓鞘轴突并诱导神经胶质细胞的增殖, 对神经再生及运动功能的恢复具有明显的促进效应。复合移植 LINGO-1 核酸疫苗也能保护神经元细胞并抑制细胞凋亡, 且与 SCI 后内质网表面张力的减弱有关。

## 3 展望

目前尽管有大量以 MAIs 及其受体作为靶点的 CNS 损伤免疫治疗研究, 但由于 MAIs 及其受体的多样性及其信号转导的复杂性, 单纯以某一分子为靶点的治疗效果往往并不理想。因此, 需要多个靶点多种方法的联合应用才可能会达到理想的治疗效果。另外蛋白类疫苗能够快速有效地刺激机体产生相应的抗体, 并对于脊髓损伤也具有良好的治疗效果, 但其抗原性较强, 在引起机体产生相应抗体的同时也易于导致机体产生过激的免疫反应, 使蛋白类疫苗有效期缩短甚至导致 CNS 过度炎症反应。核酸疫苗治疗中枢神经损伤的研究已有很多, 被认为是治疗脊髓损伤的有效措施之一, 在中枢神经损伤方面有很大的应用前景。核酸疫苗相对于蛋白类疫苗, 制作工艺简单, 方便储运且不会导致 CNS 炎症反应, 但核酸疫苗治疗脊髓损伤的效果一定程度上弱于蛋白类疫苗。虽然蛋白类疫苗和核酸疫苗

对于脊髓损伤都是有效的预防和治疗手段, 但目前两种疫苗均处于基础研究阶段, 要真正运用于临床可能还需要很长的路要走。

### [参 考 文 献]

- [1] Brösamle C, Halpern ME. Nogo-Nogo receptor signaling in PNS axon outgrowth and pathfinding. *Mol Cell Neurosci*, 2009, 40(4): 401-9
- [2] Lee JK, Geoffroy CG, Chan AF, et al. Assessing spinal axon regeneration and sprouting in Nogo-, MAG-, and OMgp-deficient mice. *Neuron*, 2010, 66(5): 663-70
- [3] Mountney A, Zahner MR, Lorenzini I, et al. Sialidase enhances recovery from spinal cord contusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(25): 11561-6
- [4] Cafferty WB, Duffy P, Huebner E, et al. MAG and OMgp synergize with Nogo-A to restrict axonal growth and neurological recovery after spinal cord trauma. *J Neurosci*, 2010, 30(20): 6825-37
- [5] Raiker SJ, Lee H, Baldwin KT, et al. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci*, 2010, 30(37): 12432-45
- [6] Dodd DA, Niederoest B, Bloechlinger S. Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *J Biol Chem*, 2005, 280(13): 12494-502
- [7] 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. *Neuron*, 2003, 38(2): 201-11
- [8] Lee JK, Chan AF, Luu SM, et al. Reassessment of corticospinal tract regeneration in Nogo-deficient mice. *J Neurosci*, 2009, 29(27): 8649-54
- [9] Lee JK, Zheng B. Role of myelin-associated inhibitors in axonal repair after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 2012, 235(1): 33-42
- [10] Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature*, 2001, 409(6818): 341-6
- [11] Starkey ML, Bartus K, Barritt AW, et al. Chondroitinase ABC promotes compensatory sprouting of the intact corticospinal tract and recovery of forelimb function following unilateral pyramidotomy in adult mice. *Eur J Neurosci*, 2012, 36(12): 3665-78
- [12] 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 Biol Chem*, 2009, 284(16): 10793-807
- [13] Wu BQ, Bi ZG, Qi Q. Inactivation of the Rho-ROCK signaling pathway to promote neurologic recovery after spinal cord injuries in rats. *Chn Med J*, 2013, 126(19): 3723-7
- [14] Loske P, Boato F, Hendrix S, et al. Minimal essential length of *Clostridium botulinum* C3 peptides to enhance neuronal regenerative growth and connectivity in a non-enzymatic mode. *J Neurochem*, 2012, 120(6): 1084-96

- [15] Lee H, Raiker SJ, Venkatesh K, et al. Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *J Neurosci*, 2008, 28(11): 2753-65
- [16] Wills ZP, Mandel-Brehm C, Mardinly AR, et al. The nogo receptor family restricts synapse number in the developing hippocampus. *Neuron*, 2012, 73(3): 466-81
- [17] Lee XH, Shao ZH, Sheng GQ, et al. LINGO-1 regulates oligodendrocyte differentiation by inhibiting ErbB2 translocation and activation in lipid rafts. *Mol Cell Neurosci*, 2014, 60: 36-42
- [18] Wu Y, Bing H. Knockdown of Lingo1b protein promotes myelination and oligodendrocyte differentiation in zebrafish. *Exp Neurol*, 2014, 251: 72-83
- [19] Huebner EA, Kim BG, Duffy PJ, et al. A multi-domain fragment of Nogo-A protein is a potent inhibitor of cortical axon regeneration via Nogo receptor 1. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 18026-36
- [20] Omoto S, Ueno M, Mochio S, et al. Genetic deletion of paired immunoglobulin-like receptor B does not promote axonal plasticity or functional recovery after traumatic brain injury. *J Neurosci*, 2010, 30(39): 13045-52
- [21] Fujita Y, Takashima R, Endo S, et al. The p75 receptor mediates axon growth inhibition through an association with PIR-B. *Cell Death Dis*, 2011, 2: e1908
- [22] Fujita Y, Endo S, Takai T, et al. Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *JEMBO*, 2011, 30(7): 1389-401
- [23] Nakamura Y, Fujita Y, Ueno M, et al. Paired immunoglobulin-like receptor B knockout does not enhance axonal regeneration or locomotor recovery after spinal cord injury. *J Biol Chem*, 2011, 286: 1876-83
- [24] Harel NY, Song KH, Tang X, et al. Nogo receptor deletion and muhimodal exercise improve distinct aspects of recovery in cervical spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 2010, 27(11): 2055-66
- [25] Craveiro LM, Weinmann O, Roschitzki B, et al. Infusion of anti-Nogo-A antibodies in adult rats increases growth and synapse related proteins in the absence of behavioral alterations. *Exp Neurol*, 2013, 250: 52-68
- [26] Gonzenbach RR, Zoerner B, Schnell L, et al. Delayed anti-nogo-a antibody application after spinal cord injury shows progressive loss of responsiveness. *J Neurotrauma*, 2012, 29(3): 567-78
- [27] Deng Q, Cai W, Li S, et al. Identification of a NEP1-35 recognizing peptide that neutralizes CNS myelin inhibition using phage display library. *Neurosci Lett*, 2013, 536: 80-4
- [28] Deng QY, Cai WQ, Li SR, et al. Small Nogo-66-binding peptide promotes neurite outgrowth through RhoA inhibition after spinal cord injury. *Brain Res Bull*, 2013, 99: 140-4
- [29] Yu PP, Huang LD, Zou J, et al. Immunization with recombinant Nogo-66 receptor (NgR) promotes axonal regeneration and recovery of function after spinal cord injury in rats. *Neurobiol Dis*, 2008, 32(3): 535-42
- [30] Wang YT, Lu XM, Zhu F, et al. The use of a gold nanoparticle-based adjuvant to improve the therapeutic efficacy of hNgR-Fc protein immunization in spinal cord-injured rats. *Biomaterials*, 2011, 32: 7988-98
- [31] Guo XD, Zahir T, Mothe A, et al. The effect of growth factors and soluble Nogo-66 receptor protein on transplanted neural stem/progenitor survival and axonal regeneration after complete transection of rat spinal cord. *Cell Transplant*, 2012, 21(6): 1177-97
- [32] Xu CJ, Xu L, Huang LD, et al. Combined NgR vaccination and neural stem cell transplantation promote functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *Neuropathol App Neurobiol*, 2011, 37(2): 135-55
- [33] Mi S, Miller RH, Tang W, et al. Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells. *Ann Neurol*, 2009, 65(3): 304-15
- [34] Lv J, Xu RX, Jiang XD, et al. Passive immunization with LINGO-1 polyclonal antiserum afforded neuroprotection and promoted functional recovery in a rat model of spinal cord injury. *Neuroimmunomodulation*, 2010, 17(4): 270-8
- [35] Choi S, Friedman WJ. Interleukin-1 $\beta$  enhances neuronal vulnerability to prongf-mediated apoptosis by increasing surface expression of p75NTR and sortilin. *Neuroscience*, 2014, 257: 11-9
- [36] Dedoni S, Olanas MC, Ingianni A, et al. Type I interferons up-regulate the expression and signalling of p75NTR/TrkA receptor complex in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuropharmacology*, 2014, 79: 321-34
- [37] 邱春红, 陈开廷, 王永堂, 等. 核酸疫苗的安全性及其优化策略研究. *生命科学*, 2013, 25(9): 858-64
- [38] Xu G, Nie DY, Chen JT. Recombinant DNA encoding multiple domains related to inhibition of neurite outgrowth: a potential strategy for axonal regeneration. *J Neurochem*, 2004, 91(4): 1018-23
- [39] Bourquin C, Marjan E, Anz D, et al. DNA vaccination efficiently induces antibodies to Nogo-A and does not exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Pharmacol*, 2008, 588(1): 99-105
- [40] Yu PP, Huang L, Zou J, et al. DNA vaccine against NgR promotes functional recovery after spinal cord injury in adult rats. *Brain Res*, 2007, 1147: 66-76
- [41] Zhang Y, Gao FY, Wu DS, et al. Lentiviral mediated expression of a NGF-soluble Nogo receptor 1 fusion protein promotes axonal regeneration. *Neurobiol Dis*, 2013, 58: 270-80
- [42] 刘百峰, 王晓芳, 徐行, 等. NgR特异性siRNA筛选及其慢病毒表达载体构建. *中国伤残医学*, 2013, 21(7): 99-101
- [43] Wu HF, Cen JS, Zhong Q, et al. The promotion of functional recovery and nerve regeneration after spinal cord injury by lentiviral vectors encoding Lingo-1 shRNA delivered by Pluronic F-127. *Biomaterials*, 2013, 34(6): 1686-700