

·综述·

# 神经营养素家族与周围神经再生的研究进展\*

张力<sup>1</sup> 王伟<sup>1,2</sup> 孙亮<sup>1</sup>

周围神经损伤再生一直是临床医学亟待解决的难题之一。研究表明,神经再生修复是一个复杂的生物学问题,要进一步提高周围神经再生修复的效果,必须深入研究调节神经生长和生长方向的微环境因素。在周围神经再生微环境中,神经营养素家族(neurotrophins)发挥着维持神经细胞存活和再生功能的重要作用,其在临床上的应用也逐渐成为研究热点。神经营养素家族又称为神经生长因子家族,是一类结构和功能上密切相关、在核酸和氨基酸序列上存在高度同源性的蛋白质,属于神经营养因子中的重要家族,主要包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophin factor, BDNF)、神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)、神经营养素-4/5(neurotrophin-4/5, NT-4/5)、神经营养素-6(neurotrophin-6, NT-6)、神经营养素-7(neurotrophin-7, NT-7)等。我们现就这一家族在周围神经损伤修复中的应用研究现状及进展情况作一综述。

## 1 神经生长因子

NGF是最早被发现、目前研究最深入的神经营养素<sup>[1]</sup>,它是上世纪50年代Levi-Montalcini和Cohen发现的由两条肽链借非共价键联成的二聚体,兼有神经营养因子和促神经突起生长因子的双重生物学功能,对中枢和周围神经元的发育、分化再生和功能特性的表达均有重要的调控作用<sup>[2]</sup>。NGF与周围神经系统关系十分密切,是周围神经系统维持正常发育和功能的必要因素,在周围神经再生和损伤修复中发挥着重要作用。

### 1.1 NGF的结构及其受体

经典的NGF从小鼠颌下腺分离出来的,由 $\alpha$ 、 $\beta$ 与 $\gamma$ 3种肽链按 $\alpha 2\beta\gamma 2$ 的比例以非共价键结合而成。NGF的 $\beta$ 亚单位是其生物功能活性区,因而又称为 $\beta$ NGF; $\gamma$ 亚单位是一类肽酶,在蛋白前体分子的剪切过程中发生作用,释放有活性的 $\beta$ 亚单位; $\alpha$ 亚单位的功能尚不清楚。研究表明,直接将NGF注射到细胞或核染色体内不能引起神经纤维增生及酶的变化,NGF必须通过与反应神经元表面的特异性受体结合才能发挥其生物活性,其活性由两个受体蛋白P75和TrkA来调节的。这就提示NGF受体(nerve growth factor receptor, NGFR)的存在是该细胞对NGF产生应答的关键。

### 1.2 NGF与周围神经再生

正常情况下,NGF和NGFR在成年动物周围神经中很少被发现。当周围神经受到损伤后,损伤就作为一种刺激信号启动NGFR的表达,使NGFR水平迅速上升,从而为轴突再生提供了分子结构基础。NGF还可以通过促进雪旺氏细胞(Schwann cells, SCs)的增殖和加快对变性坏死髓鞘等碎片的清除,最终发挥其促进髓鞘再形成和成熟的作用。NGF对周围神经再生的促进作用表现在4个方面:①神经元营养效应:NGF能维持靶神经元的存活、生长、发育及分化。神经损伤

后,NGF靶神经元的NGFR表达增加,同时靶区NGF水平也明显升高,提示NGF能促进效应神经元的修复。Zochodne DW等<sup>[3]</sup>在周围神经再生室应用NGF发现其可加快感觉神经纤维的再生速度,提示外源性NGF作为靶源性神经营养因子对交感和感觉神经元生长发育、分化、存活和功能特异性表达有重要的调控作用。②促进和诱导轴突生长:一方面NGF可分别与神经生长锥和SCs膜上的NGFR结合,促使P75NGFR mRNA上调,从而在SCs表面浓集NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5等神经营养因子,以促进损伤的轴突发芽和再生从而达到促神经再生的目的<sup>[4]</sup>;另一方面,NGF能介导神经元对许多结构蛋白和脂质的合成增加,这些产物被运输到轴突远端为轴突生长提供原料;而且NGF的浓度梯度还决定神经轴突的延伸方向<sup>[5]</sup>。③作用于SCs,使其释放内源性神经营养因子,并促进髓鞘的形成,加速轴突的成熟与恢复<sup>[6]</sup>。NGF在防止失神经支配肌肉萎缩方面也有重要作用<sup>[6]</sup>。

关于NGF的作用机制有学者认为<sup>[6-7]</sup>,神经损伤后靶源性NGF先与SCs表面的低亲和力受体结合,并与其他一些与轴突再生有关的物质如层黏蛋白、纤黏蛋白等共同作用,在再生轴突前方扩散形成一个浓度梯度,引导生长锥沿SCs膜表面向前生长与靶细胞建立联系。经过第二信使体系的转导,启动一系列级联反应,对靶细胞的基因表达进行调控而发挥其生物效应,最终使再生轴突成熟及髓鞘化,达到完全再生和恢复功能的目的。一旦轴突重新支配靶组织,后者又成为NGF来源,SCs又回到原来静止状态。外源性NGF研究进一步巩固了这些理论<sup>[8]</sup>。

关于NGF在周围神经损伤后再生和修复中的应用,目前主要处于实验研究阶段,并开始实验性地应用于临床。实验研究多采用体外细胞培养和动物体内实验,其给药途径多采用局部喷洒或注射、肌肉注射或者静脉注射、再生室、复合载体和微泵缓释等,近年来通过转基因技术将NGF转入靶细胞来治疗周围神经损伤和神经退变性疾病的研究也取得很大的进展<sup>[9]</sup>。尽管不同的实验方法、给予NGF的途径和剂量不同等所得到的实验结果有所不同,对实验结果的分析也有所不同,但几乎都得出了NGF可以促进周围神经损伤后再生和修复的结论,而且还发现NGF在受损神经的神经传导功能上显示一定的量效关系。在临床应用上,由于NGF所具有的营养、保护神经元及促进受损神经的再生和修复等多种生物学功能,其已经应用于治疗外伤性、中毒性和糖尿病性周围神经病,以及HIV相关性感觉神经病等周围神经系统疾病,疗

\* 基金项目:辽宁省自然科学基金项(20052204);辽宁省教育厅高等学校科学研究计划(A类)(202173365);中国博士后科学基金(2005038055)

1 锦州医学院附属第一医院骨科,辽宁锦州,121001

2 通讯作者:王伟(锦州医学院附属第一医院,辽宁锦州,121001)

作者简介:张力,男,硕士研究生

收稿日期:2006-01-10

效确切,具有广泛的应用前景<sup>[10]</sup>。赵淑清等<sup>[11]</sup>通过临床应用观察发现 NGF 局部应用具有明显的促神经再生作用,疗效满意,是有效的促神经生长药物。

## 2 脑源性神经营养因子

### 2.1 BDNF 的结构与分布

BDNF 是 1982 年 Barde 等报道由猪脑提取液中分离获得的,其参与调节神经元的分化、增殖和存活。BDNF 在生理状态下以二聚体的形式存在,属碱性蛋白质,与家族中其他的神经营养因子有 50%氨基酸序列的同源性。BDNF 基因也编码含分泌信号肽的大分子前体,能与其低亲和力受体 P75NTR 及高亲和力受体 trkB 结合引起一系列的生物反应,说明 BDNF 是一种细胞外因子<sup>[10]</sup>。正常情况下 BDNF 主要分布于脑,在心、肺和脊髓运动神经元的外周靶组织也有一定的分布。

### 2.2 BDNF 在周围神经中的作用

BDNF 对在体运动神经元的发育、成年后运动神经元的存活以及病变运动神经元的存活和轴突再生有着十分重要的作用,还参与突触结构与突触联系的产生、神经环路的形成<sup>[11]</sup>。在周围神经损伤时,BDNF 主要来源于周围神经的 SCs 或靶组织的肥大细胞。切断大鼠坐骨神经后可导致受损神经远侧端 BDNF mRNA 表达增加,其增高水平为 NGF mRNA 的 10 倍;其时空表达模式也与 NGF mRNA 有所不同。神经损伤后 3 天 BDNF mRNA 开始缓慢增加,至 3—4 周达到最高峰,此时 BDNF mRNA 和 P75NGFR mRNA 可以在近侧神经干断端检测到,在远侧神经干呈高水平表达,还能检测到一定量的 trkB mRNA,原位杂交证实 BDNF mRNA 和 P75NGFR mRNA 及 trkB mRNA 均存在于雪旺氏细胞。李昌琪等<sup>[12]</sup>在小鼠坐骨神经压榨损伤后,腹腔注射 BDNF 抗体中和内源性 BDNF,证实了小鼠坐骨神经损伤后内源性 BDNF 可参与脊髓前角运动神经元内突触素 mRNA 表达的调节。提示内源性 BDNF 对周围神经的再生和髓化起重要作用。然而目前 BDNF 作用机制仍存在争议,Foster 发现 BDNF 对周围神经再生的影响可能依赖受损神经元的高亲和力受体 TrkB<sup>[13]</sup>,但 Cosgaya 认为 P75NTR 是促进髓鞘形成的功能性受体,而非 TrkB 介导 BDNF 促髓鞘形成<sup>[14]</sup>。

## 3 神经营养素家族中的其他成员

### 3.1 神经营养素-3

NT-3 是 1990 年由 Ernfors 等发现的,主要存在于中枢神经系统的海马,新大脑皮层及外周肌肉组中,是一种小分子量的碱性蛋白质,与 NGF 及 BDNF 高度同源,功能上相互关联<sup>[15]</sup>。NT-3 具有较广泛的生物学活性,不仅能在体内促进受损神经元的存活及其神经纤维的再生,而且也能影响体外培养神经元的分化<sup>[16]</sup>。研究表明切断坐骨神经后,近端神经干和脊髓中的 NT-3 高亲和力受体 trkC mRNA 显著上调,然而 NT-3 在体内的含量极低,因此通过基因治疗手段在体内大量表达 NT-3 将具有重要的意义。用基因工程方法获得的 NT-3 并通过基因转染达到长期表达,维持 NT-3 稳定的浓度,动物实验显示出了良好的效果。最近研究发现,经过 NT-

3 基因修饰的神经干细胞移植治疗周围神经损伤的效果良好,这也为 NGF 基因治疗周围神经损伤提供了初步的理论和实验依据<sup>[17]</sup>。

### 3.2 神经营养素-4 和神经营养素-5

NT-4/5 是上世纪 90 年代分别由 Ip 等和 Berkmeier 等报道在哺乳动物发现的,其实它们是同一物质,现一般称为 NT-4/5。一般认为,NT-4 不仅对某些特定亚群神经元的存活、增殖、分化及轴突可塑性有一定的调节作用,而且对周围神经系统(peripheral nerve system, PNS)的感觉神经元和中枢神经系统(central nervous system, CNS)的某些神经元的生存也是必需的。研究表明 NT-4/5 能支持鼠胚运动神经元存活,并在神经元上发现了其受体;运动神经元损伤后能诱导神经调节素(neuroglins, NRGS)表达增多,这都说明它们具有运动神经营养作用。大鼠坐骨神经横断两周后 NT-4/5 mRNA 显著上调,上升到正常的 8 倍以上,推测 NT-4/5 具有保护运动神经元和促进轴突外向生长的能力<sup>[18]</sup>。

### 3.3 神经营养素-6 和神经营养素-7

NT-6 是 1994 年 Gotz R 等<sup>[19]</sup>意外发现的,对交感神经节及脊髓背根神经节的神经元有营养作用。NT-7 是 Lai 等<sup>[20]</sup>近年从 *Cyprinus carpio* 鱼类基因文库中克隆的新成员,其作用也与 NGF 相似。目前关于 NT-6 和 NT-7 在周围神经系统的研究还甚少。

## 4 小结

周围神经损伤后的微环境构成对神经的再生具有十分重要的意义,其作用机理尚在探索之中。在这些微环境因素中神经营养素家族尤其是 NGF 的作用尤为突出,对维持神经细胞存活和再生功能意义重大,在临床上也展示出了广阔的应用前景。然而,目前对这个家族的作用及作用机制的实验研究仍有待完善,还需要更多的选取与人类更为接近的种属(如灵长类动物)作为实验对象,其在临床应用方面也有待进一步研究探讨。

## 参考文献

- [1] Aloe L, Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology [J]. Trends cell Biol, 2004, 14(7): 395—399.
- [2] Aloe L, Rita Levi-Montalcini and the discovery of nerve growth factor: past and present studies [J]. Arch Ital Biol, 2003, 141 (2-3): 65—83.
- [3] Zochodne DW, Cheng C. Neurotrophins and other growth factors in the regenerative milieu of proximal nerve stump tips [J]. J Anat, 2002, 196: 279—832.
- [4] Hudson TW, Evans G, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair [J]. Orthop Clin North Am, 2000, 11(3): 485—497.
- [5] Kury P, Stoll G, Muller HW. Molecular mechanisms of cellular interactions in peripheral nerve regeneration [J]. Curr Opin Neurol, 2001, 14 (5): 635—639.
- [6] 苏刚, 刘贵麟, 王燕. 神经生长因子促进自体去神经带血管移植肌神经的再生 [J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(4): 373—374.
- [7] 李强, 李民, 伍亚民. 雪旺氏细胞促进周围神经再生的分子机制 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004, 26(9): 561—563.
- [8] 黄立, 洪光祥, 王发斌. 神经生长因子对周围神经端侧吻合靶器官功能恢复影响的实验研究 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(7): 1254—1255.
- [9] Sorensen J, Hase G, Krarup C, et al. Genetransfer to Schwann

- cells after peripheral nerve injury:a delivery system for therapeutic agents[J].Ann Neurol,1998,43:205—211.
- [10] 许珊丹,曾娟,陈冠民,等.神经生长因子在周围神经系统疾病中的临床应用[J].中国新药杂志,2004,13(7):587—589.
- [11] 赵淑清,刘建丰,金宇,等.神经生长因子促周围神经生长的临床应用[J].河北医药,2002,24(2):122—123.
- [10] Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors [J]. J Neurobiol,1994,25 (11):1386—1403.
- [11] Huang EJ,Reichardt CF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function [J].Annu Rev Neurosci,2001,24:677—736.
- [12] 李昌琪,刘丹,卢大华,等.小鼠坐骨神经损伤后内源性 BDNF 对脊髓前角运动神经元内突触素 I mRNA 表达的调节[J].神经解剖学杂志,2005,21(4):345—349.
- [13] Foster E,Robertson B,Fried K.TrkB-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia following sciatic nerve injury[J].Brain Res,1994,659 (1-2):267—271.
- [14] Cosgaya JM,Chan JR,Shooter EM. The neurotrophin receptor P75NTR as a positive modulator of myelination [J].Science,2002,298(5596):1245—1248.
- [15] Yan H,Wood PM. NT23 weakly stimulates proliferation of adult rat O1 (-)O4 (+) oligodendrocyte-lineage cells and increases oligodendrocyte myelination in vitro[J].J Neurosci Res,2000,62(3):329—335.
- [16] Novikoval LN,Novikov LN,Kellerth JO. Survival effects of BDNF and NT-3 on axotomized rubrospinal neurons depend on the temporal pattern of neurotrophin administration[J].Eur J Neurosci,2000,12(2):776—780.
- [17] 雷正旺,薄占东,洪光祥,等.神经营养素-3 基因修饰的神经干细胞对周围神经再生修复的影响 [J].中华实验外科杂志,2005,22 (1):80—82.
- [18] Braun S,Croizat B,Lagrange MC,et al.Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord -human muscle cocultures [J]. J Neurol Sci,1996,136: 17.
- [19] Gotz R,Koster R,Winkler C,et al.Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family[J].Nature,1994,372: 266.
- [20] Lai Ko,Fu WY, Ip FC, et al. Cloning and expression of a novel neurotrophin,NT -7,from carp [J].Mol Cell Neurosci,1998,11: 64—76.

## ·综述·

# 血管内皮生长因子、血管生成素与缺血性脑损伤

郑庆平<sup>1</sup> 胡永善<sup>1</sup>

在啮齿动物的胚胎发育过程中,脑血管的发育主要是通过血管发生(angiogenesis),而在成年人类和啮齿动物脑内,新生血管的生成则只在如低氧、缺血等病理生理条件下发生,原先存活的毛细血管经发芽或潜在吻合血管枝增大形成新血管,过程包括内皮细胞趋化移动、增殖,形成新管腔,周细胞、血管平滑肌细胞等血管周围细胞的移入、黏附至内皮层形成完整的血管壁;血管丛经重塑(修剪)形成成熟的血管系统等。在新生血管生成过程中,两条调节途径起到非常重要的作用:一条是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)及其受体(flt-1等)调节通路,另一条是血管生成素(angiopoietin,Ang)及其受体(Tie)调节通路,这两条途径协同作用,共同促进机体血管形成。

## 1 血管内皮生长因子及其受体的生物学特征及表达特点

### 1.1 血管内皮生长因子

VEGF 又名血管通透性因子(vascular permeability factor,VPF),被认为是唯一特异性地作用于内皮细胞的重要的血管生成因子。1983年 Senger 等首先在豚鼠肿瘤腹腔渗液及多种肿瘤细胞培养液中发现 VEGF,随后 1989年 Ferrara 等在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来的糖类蛋白质。VEGF 可由许多正常细胞,包括平滑肌细胞、黄体细胞、及肾上腺皮质细胞产生和分泌,正常情况下如创伤愈合,组织器官修复,胚胎发育以及一些病理情况如肿瘤、缺血发生的血管增殖都与它密切相关。

VEGF 是一种有肝素亲和性的同源二聚体多肽,相对分子量 34—45KD。有一个独特的 NH<sub>2</sub> 末端氨基酸顺序,其单体无活性。人 VEGF 基因位于染色体 6P12 上,全长 14kb,由 8 个外显子和 7 个内含子组成。目前发现的 VEGF 家族包括 5

大成员:由于 mRNA 的剪接方式不同,产生 5 种分子变异,即 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 及胎盘生长因子(placenta growth factor,PLGF)。

### 1.2 VEGF 受体

现已发现三种 VEGF 受体:VEGF 受体 1 (VEGFR1,flt-1),VEGF 受体 2(VEGFR2,kdr/flk-1)和 VEGF 受体 3(VEGFR3,flt-4),均为跨膜的有酪氨酸活性的受体。它们都是糖基化的跨膜受体,其胞外部分有 VEGF 的结合位点,含有 7 个免疫球蛋白样功能区,胞内部分为一个有插入片段的蛋白质酪氨酸激酶序列。不同的受体激活后发挥不同的调节作用:促进新血管生成的主要是 VEGFR2;VEGFR-1 负相调节 VEGF 的功能,VEGFR3 主要调控淋巴管的发生。

## 2 血管生成素及其受体 Tie 的生物学特征及表达特点

Ang/Tie 通路是一种新发现的调节血管生成的重要信息途径。最近发现它在血管的成熟、稳定性及重建方面扮演着非常重要的角色<sup>[1]</sup>。

### 2.1 血管生成素

血管生成素最早是从人结肠癌细胞中分离得到的,该蛋白质家族有 4 个成员:Ang1-4,特异性作用于内皮细胞,具有很强的促血管生成活性。它们具有共同的结构,即由三个结构域组成的糖蛋白:N-端疏水性分泌信号肽、介导同源寡聚体形成的 α-螺旋样结构域和 C-端介导配体活性的纤维蛋白原样结构域(fibrinogen-like domain,FD)。

1 华山医院康复科,上海市乌鲁木齐中路 12 号,200040

作者简介:郑庆平,女,硕士

收稿日期:2006-02-20