

癌钙调蛋白在炎症反应促视神经再生作用中的研究进展

马林昆¹, 曹霞², 罗生平¹

基金项目: 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目 (No. 2015HB041); 云南省高校外科重大疾病诊治工程中心
作者单位: (654000) 中国云南省昆明市, 昆明医科大学第二附属医院¹眼科; ²中心实验室

作者简介: 罗生平, 女, 在读硕士研究生。

通讯作者: 马林昆, 硕士, 教授, 院长, 研究方向: 眼底病. mlk-ynkm@163.com

收稿日期: 2017-01-17 修回日期: 2017-06-09

Role of inflammation in the relationship between OM and regeneration of optic nerves

Lin-Kun Ma¹, Xia Cao², Sheng-Ping Luo¹

Foundation items: Yunnan Young and Middle-aged Academic and Technical Leaders Reserve Talents Training Project (No. 2015HB041); Yunnan University Surgical Center for Diagnosis and Treatment of Major Diseases

¹Department of Ophthalmology; ²Department of Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 654000, Yunnan Province, China

Correspondence to: Lin-Kun Ma. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 654000, Yunnan Province, China. mlk-ynkm@163.com
Received: 2017-01-17 Accepted: 2017-06-09

Abstract

• Oncomodulin (OM) is known by us progressively as a Calcium binding protein. Recently, OM has been found that it is secreted by inflammatory cells (neutrophilic granulocyte), and a signal which can promote cell growth between innate immunity and neurons, and a key to regenerate the damaged optical nerves by activating inflammation. The function of promoting the regeneration progress of axons has become a hot issue in recent years. This article summarized the mechanism of OM and the relationship between inflammation-induced OM and optic nerve regeneration research and progress were reviewed.

• **KEYWORDS:** oncomodulin; inflammation; neutrophils; optic nerve regeneration

Citation: Ma LK, Cao X, Luo SP. Role of inflammation in the relationship between OM and regeneration of optic nerves. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(7):1268-1270

摘要

癌钙调蛋白 (oncomodulin, OM) 作为钙结合蛋白的一种,

逐渐为我们熟知。近年来有研究证实, OM 源于活化的炎症细胞 (中性粒细胞), 是体内先天免疫系统和神经元之间一种有效的生长促进信号, 通过炎症反应诱导的 OM 是受损视神经轴突再生的关键。OM 的促视神经轴突再生作用逐渐成为研究的热点之一。本文就近年来 OM 作用机制和炎症诱导下 OM 与视神经再生关系方面的研究和进展做一综述。

关键词: 癌钙调蛋白; 炎症反应; 中性粒细胞; 视神经再生
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.7.17

引用: 马林昆, 曹霞, 罗生平. 癌钙调蛋白在炎症反应促视神经再生作用中的研究进展. 国际眼科杂志 2017; 17(7): 1268-1270

0 引言

中枢神经损伤的修复一直是研究的热点之一, 视神经作为中枢神经的范畴有了广泛的研究和探索。视神经损伤继发视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cell, RGCs) 凋亡, 导致严重的视觉传导功能障碍甚至致盲, 视神经损伤时诱导活化大量炎症细胞, 近来文献报道, 炎症反应可促进神经再生, 特别是巨噬细胞和中性粒细胞。癌钙调蛋白 (oncomodulin, OM) 作为钙结合蛋白家族一员, 最早发现于大鼠肝癌组织, 也是现如今临床上用于检测乳腺癌等肿瘤的标记物。2006年 Yin 等证实了炎症时活化的巨噬细胞分泌 OM 成为损伤视神经修复再生的关键。这一研究将 OM 与炎症反应促视神经再生联系起来。本文就目前不同炎症反应诱导下 OM 发挥促视神经再生的作用和研究作一综述。

1 癌钙调蛋白

OM 是一种分子量为 11.7kD 的具有钙离子结合区域的酸性小钙结合蛋白。最早在大鼠肝癌组织中发现, 因与钙调蛋白 (Calmodulin, CaM) 具有相似之处, 故名为癌钙调蛋白^[1-3], 人 OM 含有 149 个氨基酸, 其末端含有由 40 个氨基酸残基组成的静息钙离子结合区域和一个 70 个氨基酸残基组成的螺旋-环-螺旋的蛋白模体的 EF 手形区域, 这个手形区域含有两个结合位点, 一个对钙离子和镁离子亲和力均较低, 一个对钙离子具有高度特异性亲和力。

人们在大鼠 OM 基因上游发现了 LTR 序列, 此序列来源于逆转录病毒 (intracisternal A particle, IAP) 存在于所有大鼠的基因组里, 是逆转录病毒整合基因至宿主基因的元件。由于逆转录病毒常将基因组整合至原癌基因当中, 诱发宿主细胞癌变。大鼠高水平的 OM 可能与 LTR 序列的整合相关, 随后该假设被证实, 即 LTR 序列调控了大鼠 OM 的表达 (参考序列)。高水平的 OM 已在啮齿类和人类的 50 多种实体肿瘤中检出, 提示其与肿瘤细胞的某些生物学特异性相关^[3], 在细胞生长和分裂

过程、细胞代谢中具有重要作用。OM 在肿瘤细胞生长调节中的作用机制研究得较为透彻,临床上通过免疫检测法可协助诊断膀胱癌、肝癌等。

2 癌钙调蛋白与视神经再生

2.1 视神经损伤与自身修复

视神经(optic nerve, ON)是由视网膜神经节细胞胞体及其轴突穿过巩膜筛孔汇集延伸而成,属于中枢神经的一部分。视神经损伤是指视神经传导通路因外伤、肿瘤、高眼压、缺血、炎症等病因素导致的传导功能障碍的疾病,表现为视网膜神经节细胞(reteinal ganglion cells, RGCs)的继发变性导致的凋亡。继发变性的机制是细胞内与细胞外的共同因素来调控:(1)因为视神经损伤后眼内谷氨酸水平升高^[4];(2)TNF- α 启动的细胞内信号途径可诱导神经元凋亡^[5-6];(3)NO:大量实验表明,视神经横切后视网膜小胶质细胞和 Müller 细胞内诱导型 NOS 表达增加,给予 NOS 抑制剂可以促进 RGCs 存活和延缓轴索变性^[7]。视神经轴索损伤后,营养因子的剥夺,轴浆逆行运输障碍,RGCs 所获靶源性神经营养因子减少或缺乏,可能参与诱导神经元变性。

视神经修复是指存活的 RGCs 生长出新的轴突到中枢神经系统的特定靶位置并恢复正常功能。当前视神经损伤修复研究主要局限于如何让受损伤的 RGCs 免于凋亡的同时能够延长轴突。视神经损伤后许多因素构成了抑制轴突延长的微环境。如髓鞘相关抑制分子 Nogo、髓鞘相关糖蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)和少突胶质细胞髓磷脂糖蛋白(oligodendrocyte myelin glycoprotein, OMGP)和硫脂^[8-10]。少突胶质细胞和星形胶质细胞分泌抑制分子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)^[11-12]。虽然视神经损伤后也会产生一些短暂的促进轴突再生的因素,但 RGCs 自身再生能力不足^[13-14]和再生作用时间短,作用弱,不足以支持视神经再生。

2.2 癌钙调蛋白与视神经损伤修复中的作用

通常 OM 在肿瘤细胞中高表达,然而 Yin 等^[15]和 Kurimoto 等^[16]分别证实 OM 也可来源于活化的巨噬细胞和中性粒细胞。Yin 等^[15]提出 OM 通过对下游的钙-钙调蛋白激酶的调节来发挥促轴突再生的作用。视神经发生损伤时,活化的巨噬细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞等会分泌神经营养因子来保护受损伤的视网膜神经节细胞^[17-18],而这些营养因子又通过增加细胞内的 cAMP 来克服抑制 RGCs 再生的髓磷脂等分子^[19],说明 RGCs 的再生依赖细胞内的高浓度 cAMP;也有研究者证实在活体玻璃体内注射 OM,使其持续释放,加上升高胞内 cAMP 水平,可以在受损伤的成熟视神经的高抑制环境中,使视网膜神经节细胞轴突再生。因此,OM 同样也会受到细胞内 cAMP 水平的调控^[20]。然而,它在视神经损伤修复中的作用机制还待研究。

3 炎症反应促视神经再生

在炎症反应诱导神经再生的研究中,最为广泛和熟知的就是促进视神经的再生。近来越来越多文献证实,眼内炎症反应可促进 RGCs 轴突再生,但其内在机制一直尚未完全清楚。作为免疫应答的重要受者,中性粒细胞在炎症、损伤、缺血这些因素作用下都能被活化^[21-22],活化的中性粒细胞发挥吞噬周围坏死的细胞、碎片及入侵细菌的作用,同时又释放趋化因子等其他分子^[23-25],

为损伤的轴突提供缓慢修复再生微环境。

3.1 巨噬细胞源性 OM 发挥促再生作用

近几年人们把焦点集中到了 OM 身上。2006 年 Yin 证实了 OM 是一种由活化巨噬细胞分泌的钙结合蛋白,眼内炎症反应后 OM 在眼内迅速累积,高亲和力地结合 RGCs 表面受体,呈现 cAMP 依赖性的促视网膜神经节细胞再生作用,且认为活化巨噬细胞源性发挥作用的信号通路是钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)^[15,26-27]。体外实验给予 OM 能明显增加 RGCs 的轴突延长长度,在去除 OM 的含巨噬细胞培养基中 RGCs 的轴突延长明显减弱。体内实验表明,玻璃体腔内注射 OM 也可以促进 RGCs 的轴突延长,当与 cAMP 共用时效果更明显^[28]。应用 OM 拮抗剂和 OM 抗体都可以阻断眼内炎症反应的促再生作用^[29]。在其他动物模型的实验为了证实不仅可发挥促视神经再生,其他神经元也能够发挥促再生作用,如背根神经节(dorsal root ganglion, DRG),在损伤的背根神经元培养液中加入 OM 发现受损轴突增长,在加入弗斯可林培养液的神经元轴突增长更为明显,说明周围感觉神经元再生研究中可观察到 OM 具有相同的促再生现象。炎症诱导的活化巨噬细胞源 OM 在促神经再生中起到大部分作用。

3.2 中性粒细胞源性 OM 发挥促再生作用

而 Yin 等^[15]和 Kurimoto 等^[16]证实炎症反应的中性粒细胞表达 OM,并发挥促进视神经再生的作用,在炎症反应介导的神经再生中占有重要地位^[16]。在他们的研究中,通过建立小鼠视神经外伤模型,同时往小鼠眼内注入酵母多糖共同诱发眼内炎症反应,检测炎症反应 72h 以内小鼠眼内炎症反应变化,并通过流式细胞仪分析检验小鼠受损视神经内 OM 的表达。一般眼前房内很少含细胞,但是在该实验中往视神经受损伤的眼内注入酵母多糖后,眼内出现大量的浸润细胞。通过流式细胞仪分析这些浸润细胞类型,在实验结果中可以发现,在眼内诱发炎症反应后的 12h 时,(74 \pm 4)% 为中性粒细胞,而仅有(5.3 \pm 2.2)% 为巨噬细胞。同时在诱发眼内炎症反应前 3d 内,中性粒细胞数量依然明显多于巨噬细胞数量。为了表明在 72h 以内检测到的炎症反应中性粒细胞反应的特异性,该研究组运用了中性粒细胞特异的抗原 Ly6G 进行检测,将 24h 时单独加入酵母多糖和同时加入酵母多糖和 Ly6G 抗原进行比较,发现后者中性粒细胞数量少于单独加酵母多糖实验组。经 qRT-PCR 验证中性粒细胞和巨噬细胞都高表达 OM mRNA。且 OM 在炎症反应的第 1d 达到峰值^[16,29],在中性粒细胞的免疫消耗过程中,视网膜 OM 的表达水平也在眼内炎症反应的 72h 后随之降低,且轴突再生现象也逐渐减少。这一系列过程后巨噬细胞反应才开始出现。与此同时在 2008 年,Haak 等提出减少巨噬细胞反应后,炎症反应的促视神经再生现象依然存在并没有减少^[29]。这一发现提示我们在巨噬细胞出现之前可能存在其他细胞才是促使损伤的视神经轴突再生的关键。2012 年有研究显示去除抑制基因 PTEN,加上细胞内足够浓度的 cAMP 和 OM,证实再生的 RGCs 轴突不仅到达相应的靶区,并且恢复了部分视功能^[30]。

4 问题与展望

就目前国内外关于 OM 在视神经损伤修复再生研究

来看,促视神经再生的研究取得了一些成果,然而最终恢复视功能仍然是一项艰巨任务,未来研究还存在许多待解决问题:(1)OM本身特性与发挥促再生作用的关系及调控机制还有待研究;(2)怎样使修复及再生的轴突到达靶组织并形成突触联系、最终恢复视觉传导功能是一项待解决难题;(3)OM与RGCs表面特异性受体结合的机制;(4)是否存在其他因子可能发挥促再生作用。目前关于OM促轴突再生的研究及实验大部分处于动物实验过程,很多现已知的理论和观点还有待在实践中验证,并且未来运用于临床治疗还有很长的路要摸索。但是相信在不久的将来在各个学科的相互协助与支持下,上述疑问和难题定将一一解答,为受视神经损伤困扰的患者带来希望。

参考文献

- 1 MacManus JP, Whitfield JF, Boynton AL, et al. Oncomodulin--a widely distributed, tumour-specific, calcium-binding protein. *Oncodev Biol Med* 1982;3(2-3):79-90
- 2 Gillen MF, Banville D, Rutledge RG, et al. A complete complementary DNA for the oncodevelopmental calcium-binding protein, oncomodulin. *J Biol Chem* 1987;262(11):5308-5312
- 3 MacManus JP, Brewer LM. Isolation, localization, and properties of the oncodevelopmental calcium-binding protein oncomodulin. *Methods Enzymol* 1987;139(139):156-168
- 4 Yoles E, Schwartz M. Elevation of intraocular glutamate levels in rats with partial lesion of the optic nerve. *Arch Ophthalmol* 1998;116(7):906-910
- 5 Tezel G, Li LY, Patil RV, et al. TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(8):1787-1794
- 6 Tezel G, Yang X, Yang J, et al. Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. *Brain Res* 2004;996(2):202-212
- 7 Lee EJ, Kim KY, Gu TH, et al. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in the axotomized ganglion cells of the rat retina. *Brain Res* 2003;986(1/2):174-180
- 8 Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000;403(6768):434-439
- 9 Grandpre T, Nakamura F, Vartanian T. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature* 2000;403(6768):439-444
- 10 吕立权. 髓鞘相关抑制分子和视神经再生. *中华眼科杂志* 2006;42(9):854-858
- 11 Bahr M, Przyrembel C, Bastmeyer M. Astrocytes from adult rat optic nerves are nonpermissive for regenerating retinal ganglion cell axons. *Exp Neurol* 1995;131(2):211-220
- 12 Bahr M, Przyrembel C. Myelin from peripheral and central nervous system is a nonpermissive substrate for retinal ganglion cell axons. *Exp Neurol* 1995;134(1):87-93
- 13 Bregman BS, Goldberger ME. Anatomical plasticity and sparing of function after spinal cord damage in neonatal cats. *Science* 1982;217(4559):553-555

- 14 Chen DF, Jhaveri S, Schneider GE. Intrinsic changes in developing retinal neurons result in regenerative failure of their axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(16):7287-7291
- 15 Yin Y, Henzl MT, Lorber B, et al. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal cells. *Nat Neurosci* 2006;9(6):843-852
- 16 Kurimoto T, Yin Y, Habboub G, et al. Neutrophils express Oncomodulin and Promote Optic Nerve Regeneration. *J Neurosci* 2013;33(37):14816-14824
- 17 Frank T, Schlachetzki JCM, Goricke B. Both systemic and local application of granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is neuroprotective after retinal ganglion cell axotomy. *BMC Neurosci* 2009;10(1):49-58
- 18 King CE, Rodger J, Bartlett C. Erythropoietin is both neuroprotective and neuroregenerative following optic nerve transection. *Exp Neurol* 2007;205(1):48-55
- 19 Cai D, Shen Y, De Bellard M, et al. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron* 1999;22(1):89-101
- 20 Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, et al. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit Trk B to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 1998;21(4):681-693
- 21 Yin Y, Cui Q, Li Y, et al. Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 2003;23(6):2284-2293
- 22 de Lima S, Koriyama Y, Kurimoto T, et al. Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(23):9149-9154
- 23 Hauk TG, Muller A, Lee J, et al. Neuroprotective and axon growth promoting effects of intraocular inflammation do not depend on oncomodulin or the presence of large numbers of activated macrophages. *Exp Neurol* 2008;209(2):469-482
- 24 Popovich PG, Longbrake EE. Can the immune system be harnessed to repair the CNS? *Nat Rev Neurosci* 2008;9(6):481-493
- 25 Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012;198(5):773-783
- 26 Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem J* 2003;374(Pt1):1-20
- 27 Schnell L, Feam S, Klassen H, et al. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* 1999;11(10):3648-3658
- 28 Donnelly DJ, Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2008;209(2):378-388
- 29 Yin Y, Cui Q, Gilbert HY, et al. Oncomodulin links inflammation to optic nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(46):19587-19592
- 30 de Lima S, Koriyama Y, Kurimoto T, et al. Full-length axon regeneration in the adult mouse optic nerve and partial recovery of simple visual behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(23):9149-9154