

脑源性神经营养因子前体的研究进展

白贤淑, 廖红

中国药科大学新药筛选中心, 南京 210009, 江苏

摘要 神经营养因子是一种分泌性多肽类生长因子家族, 参与神经系统的多种生理功能活动, 研究发现成熟的脑源性神经营养因子与其前体分子具有不同的生物学活性, 它们的受体以及介导的细胞内信号通路也大相径庭。本文对近年来关于脑源性神经营养因子前体分子的研究进展予以综述, 着重讨论其体内分布、生物合成与分泌、生物学活性以及与疾病的联系。研究脑源性神经营养因子前体分子在生理和病理状态下的作用将对未来的药物开发和神经系统疾病的治疗具有重要的意义。

关键词 脑源性神经营养因子前体分子; 分布; 生物合成; 生物学功能

中图分类号: R96

文献标识码: A

文章编号: 1009-2501(2010)06-0700-05

神经营养因子是一种分泌性多肽类生长因子家族, 参与神经系统的多种生理功能活动, 如: 可促进中枢和外周神经元的生长、存活以及分化; 活性依赖性的调节突触可塑性, 在学习与记忆过程中发挥重要作用^[1-2]。神经营养因子与酪氨酸酶受体家族高亲和结合或与 p75NTR 结合发挥其生物学作用。神经营养因子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 neurotrophic factor, BDNF), neurotrophin-3 (NT-3), NT-4/5, NT-6 和 NT-7 等。一直以来, 神经营养因子的前体被视为只是单纯的蛋白前体分子而不具有生物学活性。自 1997 年 Dicou 等首次报道神经生长因子的前体分子前体区域的两个片段具有生物学活性^[3]、2001 年 Lee 等也证明神经生长因子前体可导致 PC12 细胞和颈上神经节神经元细胞凋亡以来^[4], 有关神经生长因子前体和脑源性神经营养因子前体的研究日益受到人们的关注^[5-8]。大量的研究发现成熟的脑源性神经营养因子与其前体分子(precursor of brain derived neurotrophic factor, proBDNF)同样具生物学活性, 但在生物学活性方面存在差异, 充分认识 proBDNF 在生理和病理状态下的作用将对未来的药物开发和神经系统疾病的治疗具有重要的意义。

1 proBDNF 的分布

大量研究表明, proBDNF 主要分布在中枢神经系统的大脑和脊髓, 外周神经系统和一些其它非神经组织也有少量分布。众多研究者通过免疫染色和 Western blot 等方法发现, 在猴、大鼠和成年海鲈的大部分脑区, 如: 大脑皮质、海马、杏仁核、基底核、小脑、丘脑、孤束核、下丘脑、中脑、脑桥、延髓和脊髓有 proBDNF 表达^[9-11]。除中枢神经系统外, 大鼠外周组织的浅表神经末梢、人的唾液和成年海鲈的肝脏、肾脏以及肌肉上也有 proBDNF 的分布^[10-12]。

2 proBDNF 的生物合成与分泌

与其他分泌性蛋白类似, BDNF 以糖基化前体——proBDNF 形式在内质网合成后转运至高

2010-04-17 收稿 2010-07-08 修回

国家“重大新药创新”科技重大专项(2009ZX09302); 国家自然科学基金(30670793); 江苏省自然科学基金(BK2009296)

白贤淑, 女, 硕士, 研究方向: 神经分子药理学。

Tel: 13770532605 E-mail: qingmeibxs@sina.com

廖红, 通信作者, 女, 博士, 博士研究生导师, 研究方向: 神经分子药理学。

Tel: 13705185128 E-mail: gcrh@yahoo.com.cn

尔基体,胞内的 proBDNF 或经福林蛋白酶 (furin)、前体转换酶的剪切生成 BDNF,然后分泌到细胞外;胞内的 proBDNF 也可能直接分泌到胞外,经胞外的一些水解酶,如基质金属蛋白酶和纤溶酶进行剪切形成 BDNF^[13]。脑源性的神经营养因子究竟以成熟形式 (BDNF) 分泌,还是以前体形式 (proBDNF) 分泌,一直存在争议。

早期的研究认为 proBDNF 在胞内经一些酶的修饰成为 BDNF,然后以 BDNF 的形式分泌到细胞外^[14-15]。Matsumoto 等的研究也表明,中枢神经系统的神经元不能分泌 proBDNF,认为 proBDNF 只是一个短暂的中间产物,新合成的 proBDNF 在胞内迅速转变成 BDNF,并以成熟体形式储存在胞内并释放到胞外^[16]。

然而, Pang 等以及 Teng 等的研究认为 proBDNF 可以前体形式分泌到胞外并与 p75NTR 结合引起神经元的凋亡^[17-18]。Yang 等对转染 BDNF/proBDNF 基因的小鼠海马神经元进行研究,发现神经元不仅可以分泌 BDNF,也可以分泌 proBDNF。动物实验表明,出生后几周内 proBDNF 表达水平逐渐升高,且在幼年小鼠体内 proBDNF 的总量比 BDNF 多。进一步的实验表明小鼠海马区 proBDNF 的水平是动态变化的,在轴突投射和突触形成过程中其水平最高^[19]。Nagappan 等对上述现象的机制进行了更为深入的研究。他们发现海马神经元释放 BDNF 和 proBDNF 的相对水平与电刺激的频率有关,高频刺激提高 BDNF 与 proBDNF 的比例而低频刺激则使得 proBDNF 的相对比例提高,这一过程可能是通过高频电激诱导的纤溶酶原分泌,后者促进 proBDNF 的水解导致的^[20]。这些研究从不同角度证明了神经元能够分泌 proBDNF,而与 Matsumoto 等的实验结果之所以不一致,可能是由于一些实验条件上存在着不同,如细胞培养的条件、纤溶酶抑制剂的使用等^[21]。有研究发现在神经细胞中, BDNF 主要通过调节性分泌途径分泌,即含有 BDNF 的分泌泡经转运到达树突及树突棘,在树突形成突触后被分泌到胞外^[22]。proBDNF 的前体区域与成熟区域对其分泌都有重要的调节作用,据报道,编码前体区域的基因的 (196 bp) 单一核苷酸变异可改变 BDNF 的转运和分泌^[23-24]。进一步研究表明, sortilin 受体与

proBDNF 前体区 Box2 和 Box3 亚结构域相互作用调节 proBDNF 的分泌^[25]。星形胶质细胞对维持神经元周围微环境的稳定具有重要调节作用。星形胶质细胞摄取神经元释放的谷氨酸,在胞内加工成谷氨酰胺再重新提供给神经元,促进神经元长时程增强。研究表明,星形胶质细胞在氧化应激情况下分泌的神经生长因子前体较正常情况下明显增多^[26]。Bergami 等利用荧光标记的 proBDNF 蛋白,观察星形胶质细胞中 proBDNF 的摄取和分泌情况,对皮层 II/III 区域进行 θ -短阵快速脉冲刺激,发现神经元新合成的 BDNF 以 proBDNF 的形式分泌到胞外,并迅速被周围的星形胶质细胞摄取,其中大部分 proBDNF 水解成 BDNF,其余的进入胞内循环或被重新分泌。这同时也提出了星形胶质细胞在受到刺激时重新分泌 proBDNF 的可能性^[27]。

本实验室的研究发现,腹腔源性的巨噬细胞和骨髓源性巨噬细胞在正常情况下和 LPS 刺激条件下均可分泌 proBDNF,继而影响巨噬细胞的移动^[28]。

3 proBDNF 的生物学作用

3.1 对细胞存活的影响 一直以来,研究者们认为只有 BDNF 具有生物学活性。BDNF 与高亲和受体 TrkB (tyrosine kinase B) 或 TrkB-p75NTR 共受体结合发挥多种生物学作用,如促进中枢和外周的神经元与胶质细胞的分化和存活、髓鞘形成、神经元的移动和轴突的伸缩等等^[18]。研究表明神经生长因子前体与 p75NTR 或与 p75NTR-sortilin 复合受体高亲和结合介导 PC12 细胞和颈上神经节神经元凋亡,使得 proBDNF 的生物学功能也开始受到了关注^[4]。

以往研究表明, BDNF 单独与 p75NTR 结合的情况下,会导致神经元凋亡。当 proBDNF 与 p75NTR-sortilin 结合而不与 TrkB 发生联系时, proBDNF 也可能导致神经元凋亡。Teng 等首次证明了 proBDNF 可诱导颈上神经节神经元凋亡的事实,这一作用需要 p75NTR 和 sortilin 受体的共同参与,进一步将 proBDNF 作用于敲除 p75NTR 基因的小鼠和正常小鼠的原代培养颈上神经节神经元,观察到 p75NTR^{-/-}神经元并不受 proBDNF 影响。可溶性 sortilin 受体也可拮

抗 proBDNF 的促细胞凋亡作用^[18]。随后有大量研究表明, proBDNF 通过 p75NTR 通路引起小脑颗粒神经元、感觉神经元凋亡, 抑制新生大鼠背根神经节神经元数量增加^[29-30]。

然而, 王慧等的研究发现 proBDNF 也可结合 TrkB 受体, 诱导 TrkB 磷酸化, 激活 ERK1/2 信号通路, 维持海马神经元存活并促进其轴突生长^[31]。proBDNF R103 残基突变会影响与 TrkB 的结合而不影响与 p75NTR 的结合。当用丙氨酸取代 BDNF 序列中的精氨酸, 则 TrkB-Fc 与 proBDNF 的结合受阻而 BDNF 却不受影响, 提示 proBDNF 与 BDNF 结合 TrkB 并非在同一位点^[32]。

3.2 对神经再生的影响 中枢神经系统的神经元是一群高度分化的细胞, 一旦损伤后其修复与再生是非常困难和复杂的。中枢神经再生困难, 其原因之一可能是由于髓鞘碎片不能被及时清除。Wong 等研究了脊髓损伤时 proBDNF 对神经再生的影响, 在脊髓损伤后 1~3 d 内可检测到 proBDNF, 而 7 d 后表达有所减少。对脊髓病理切片进行免疫染色, 在连续给予 proBDNF 抗体 1~3 d 内可显著增加损伤区 ED1⁺ 巨噬细胞的数量, 这可能有利于巨噬细胞吞噬髓鞘碎片促进神经再生。细胞迁移实验结果也表明 proBDNF 可抑制 CD11b⁺ 的巨噬细胞的迁移能力, 表明 proBDNF 是脊髓损伤后神经再生过程中的抑制因子^[28]。

3.3 对学习记忆的影响 proBDNF 对小鼠的学习和记忆也可能产生影响。许志强等通过 Morris 水迷宫实验和空间探索实验, 观察内源性和外源性 proBDNF 对老龄鼠学习记忆的影响, 结果发现, 给予 proBDNF 抗体可改善 proBDNF 引起的老龄鼠学习记忆能力下降。提示 proBDNF 能够降低老龄鼠的学习记忆功能, 而阻断内源性 proBDNF 后能改善老龄鼠的学习记忆能力, 提示 proBDNF 有着与成熟 BDNF 相反的功能^[33]。Barnes 等利用 tPA 抑制剂抑制雄性成年 Lister hooded 大鼠海马区 proBDNF 向 BDNF 的转化, 发现恐惧记忆的消失伴随着海马区 proBDNF 的上调, 说明海马区 proBDNF 向 BDNF 的转化对于蛋白合成依赖性恐惧记忆的消失具有重要调节作用^[34]。

3.4 对阿尔茨海默症(AD)的影响 BDNF 对胆碱能神经元的存活与功能具有重要作用。研究发现在晚期 AD 病人脑内 BDNF 的 mRNA 表达水平下降 50% 且 proBDNF 蛋白的表达量较正常人有 2.25 倍的减少^[35]。在轻度意识障碍病人和轻中度 AD 病人脑内 proBDNF 与 BDNF 的含量较非意识障碍病人, 均有一定程度减少^[36], 提示 proBDNF 与 BDNF 在轴突减少以及细胞功能紊乱过程中可能起到重要作用, 从而导致 AD 病人的认知障碍。

3.5 对突触可塑性的影响 BDNF 与 TrkB 结合促进海马区长时程增强, 而 proBDNF 结合 p75NTR 可促进海马神经元 N-甲基-D-天(门)冬氨酸(NMDA)受体依赖性的长时程抑制而不影响其他形式的突触可塑性, 提示 BDNF 与 proBDNF 对突触可塑性具有双向调节作用^[37]。研究表明老年 Lou/C 大鼠较相应周龄的 Wistar 大鼠保持良好的认知能力, 可能是由于 Lou/C 大鼠脑内海马区 proBDNF 与 BDNF 的量较 Wistar 大鼠高, 有利于维持突触联系和循环; 且老年 Lou/C 大鼠脑内 proBDNF 会减少而 Wistar 大鼠脑内 proBDNF 会升高, 也可能是维持 Lou/C 大鼠认知能力的因素之一^[38]。

3.6 对缺血再灌注的影响 Wang 等在利用大鼠视网膜缺血再灌注模型研究瞬时受体电势通道(TRPC6)过程中发现, TRPC6 激动剂可显著提高视网膜缺血再灌后视网膜神经节细胞的存活。他们发现, 在缺血再灌 24 h 后 BDNF 的基因转录水平显著增加, 当阻断 TRPC6 通道, proBDNF 上调而 BDNF 无显著变化, 提示通过 TRPC6 保护视网膜缺血再灌是通过 BDNF 调节, 而 proBDNF-p75NTR 通路可能是引起视网膜缺血损伤后视网膜神经节细胞死亡的原因之一^[39]。

4 展望

proBDNF 与 BDNF 的生物学活性可能在多方面存在相反作用, 并且它们在神经再生、神经退行性疾病中的重要作用日益受到重视, 因此对 proBDNF 的深入研究, 尤其是 proBDNF 在疾病状态下的合成和分泌, 以及在疾病发生和发展中的作用, 将有助于今后针对 proBDNF 的药物开发和疾病的治疗。

参考文献

- [1] Lauterborn JC, Rex CS, Kramar E, et al. Brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic plasticity in a mouse model of fragile X syndrome[J]. *Neurosci*, 2007, 27 (40): 10685—10694.
- [2] Carvalho AL, Caldeira MV, Santos SD, et al. Role of the brain-derived neuro- trophic factor at glutamatergic synapses[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153 (Suppl 1): S 310—324.
- [3] Dicou E, Pflug B, Magazin M, et al. Two peptides derived from the nerve growth factor precursor are biologically active[J]. *Cell Biol*, 1997, 136 (2): 389—398.
- [4] Lee R, Kermani P, Teng KK, et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins[J]. *Science*, 2001, 294 (5548): 1945—1948.
- [5] Lebrun-Julien F, Bertrand MJ, De Backer O, et al. ProNGF induces TNF alpha-dependent death of retinal ganglion cells through a p75NTR non-cell-autonomous signaling pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107 (8): 3817—3822.
- [6] Al-Shawi R, Hafner A, Olsen J, et al. Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system[J]. *Eur J Neurosci*, 2008, 27 (8): 2103—2114.
- [7] Al-Shawi R, Hafner A, Chun S, et al. ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1119: 208—215.
- [8] Yune TY, Lee JY, Jung GY, et al. Minocycline alleviates death of oligodendrocytes by inhibiting pro- nerve growth factor production in microglia after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2007, 27 (29): 7751—7761.
- [9] 徐丹, 李力燕, 张洪钊, 等. BDNF 前体蛋白在成年恒河猴中枢神经系统中的分布[J]. *神经解剖学杂志*, 2007, 23 (6): 591—598.
- [10] Zhou XF, Song XY, Zhong JH, et al. Distribution and localization of pro-brain- derived neurotrophic factor-like immunoreactivity in the peripheral and central nervous system of the adult rat[J]. *J Neurochem*, 2004, 91 (3): 704—715.
- [11] Tognoli C, Rossi F, Di Cola F, et al. Acute stress alters transcript expression pattern and reduces processing of proBDNF to mature BDNF in *Dicentrarchus labrax*[J]. *BMC Neurosci*, 11 (1): 4.
- [12] Mandel AL, Ozdener H, Utermohlen V. Identification of pro- and mature brain-derived neurotrophic factor in human saliva[J]. *J Arch oral boil*, 2009, 54(7): 689—695.
- [13] Ethell IM, Ethell DW. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets[J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85 (13): 2813—2823.
- [14] Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, et al. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases[J]. *FEBS Lett*, 1996, 379 (3): 247—250.
- [15] Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, et al. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons[J]. *J Neurosci*, 1999, 19 (6): 2069—2080.
- [16] Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, et al. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF[J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11 (2): 131—133.
- [17] Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity[J]. *Science*, 2004, 306 (5695): 487—491.
- [18] Teng HK, Teng KK, Lee R, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin[J]. *J Neurosci*, 2005, 25 (22): 5455—5463.
- [19] Yang J, Siao CJ, Nagappan G, et al. Neuronal release of proBDNF[J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12 (2): 113—115.
- [20] Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV, et al. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (4): 1267—1272.
- [21] Barker PA. Whither proBDNF[J]. *Nat Neurosci*, 2009, 12 (2): 105—106.
- [22] 邓兴力, 雷德强, 刘如恩, 等. 神经营养因子前体研究进展[J]. *医学综述*, 2008, 12(6): 806—808.
- [23] Chen ZY, Patel PD, Sant G, et al. Variant brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Met66) alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons[J]. *J Neurosci*, 2004, 24 (18): 4401—4411.
- [24] Wichers M, Kenis G, Jacobs N, et al. The BDNF Val (66) Met x 5—HTT LPR x child adversity interaction and depressive symptoms: An attempt at replication[J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2008, 147B (1): 120—123.
- [25] Chen ZY, Ieraci A, Teng H, et al. Sortilin controls intracellular sorting of brain— derived neurotrophic

- factor to the regulated secretory pathway[J]. J Neurosci, 2005, 25 (26): 6156—6166.
- [26] Domeniconi M, Hempstead BL, Chao MV. Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 34 (2): 271—279.
- [27] Bergami M, Santi S, Formaggio E, et al. Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes[J]. J Cell Biol, 2008, 183 (2): 213—221.
- [28] Wong I, Liao H, Bai X, et al. ProBDNF inhibits infiltration of ED₁⁺ macrophages after spinal cord injury[J]. Brain Behav Immun, 2010, 4 (24): 585—597.
- [29] Koshimizu H, Hazama S, Hara T, et al. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons[J]. Neulet, 2010, 473(3): 229—232
- [30] Fan Y, Wu LL, Li H, et al. Differential effects of pro-BDNF on sensory neurons after sciatic nerve transection in neonatal rats[J]. Eur J Neurosci, 2008, 27 (9): 2380—2390.
- [31] 王慧, 陈旦, 伍校琼, 等. proBDNF 对培养的海马神经元存活的影响及其机制[J]. 中南大学学报: 医学版, 2007, 32 (5): 800—805.
- [32] Fayard B, Loeffler S, Weis J, et al. The secreted brain-derived neurotrophic factor precursor pro-BDNF binds to TrkB and p75NTR but not to TrkA or TrkC[J]. J Neurosci Res, 2005, 80 (1): 18—28.
- [33] 许志强, 张涛, 张猛, 等. proBDNF 对老龄鼠空间学习与记忆功能的影响[J]. 重庆医学, 2008, (07): 683—685.
- [34] Barnes P, Thomas KL. Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory[J]. PLoS One, 2008, 9 (3): e3248 1—11.
- [35] Fahnestock M, Garzon D, Holsinger RM, et al. Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule[J]. J Neural Transm Suppl, 2002, 62: 241—252.
- [36] Peng S, Wu J, Mufson EJ, et al. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 2005, 93 (6): 1412—1421.
- [37] Woo NH, Teng HK, Siao CJ, et al. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression[J]. Nat Neurosci, 2005, 8 (8): 1069—1077.
- [38] Silhol M, Arancibia S, Perrin D, et al. Effect of aging on brain-derived neurotrophic factor, proBDNF, and their receptors in the hippocampus of Lou/C rats[J]. Rejuv Res, 2008, 6 (11): 1031—1040.
- [39] Wang X, Teng L, Li A, et al. TRPC6 channel protects retinal ganglion cells in a rat model of retinal ischemia/reperfusion-induced cell death[J]. Toxicol Sci, 2010, 116 (1): 249—263.

Advancement in research on precursor of brain derived neurotrophic factor

BAI Xian-shu, LIAO Hong

National Center for Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

ABSTRACT The neurotrophins are a family of growth factors belong to a class of secreted proteins, which participate in several physiological events of neural system. Recent studies indicate that pro-neurotrophins and their mature forms often have opposite function in biological effects, their receptors and the intracellular signaling pathways. The recent progress of precursor of brain derived neurotrophic factor (proBDNF), especially the distribution, biosynthesis, secre-

tion, bioactivity of proBDNF and the relationship between proBDNF and neural system diseases are reviewed in this article. It is very important to study the function of proBDNF participated in the physiological and pathological conditions for drug researching and developing and for the treatment of nervous system diseases.

KEY WORDS proBDNF; Distribution; Biosynthesis; Bioactivity

本文编辑: 余文涛