

林古法, 脊柱脊髓损伤再生修复教育部重点实验室(同济大学)研究员, 同济大学生命科学与技术学院博士生导师。担任中国细胞生物学学会发育生物学分会委员,《遗传》编委。实验室以蝾螈、爪蛙及小鼠等多种动物为模型,研究器官再生的细胞与分子生物学机理,并探讨促进哺乳动物器官再生的策略。

<https://life.tongji.edu.cn/03/29/c12618a131881/page.htm>

黑皮质素受体-4通路在器官损伤修复中的作用

林古法* 陈瑛

(脊柱脊髓损伤再生修复教育部重点实验室, 同济大学附属同济医院, 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200065)

摘要 下丘脑黑皮质素系统是机体能量代谢的主要调节者。近年来研究证明黑皮质素系统,特别是黑皮质素受体-4(melanocortin receptor-4, MC4R)介导的信号在器官的稳态维持与损伤修复中也发挥了重要作用。该文对MC4R在中枢下丘脑之外的器官中的表达及作用相关研究进展进行简要综述,并探讨MC4R通路在下丘脑外的器官组织损伤修复中的重要作用。

关键词 器官再生; 损伤修复; MC4R; 代谢调节; 神经营养作用

Melanocortin Receptor-4 Signaling in Organ Repair and Regeneration

LIN Gufa*, CHEN Ying

(Key Laboratory of Spine and Spinal Cord Regeneration and Repair, Tongji Hospital,
School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200065, China)

Abstract While the central role of the hypothalamus melanocortin system is to regulate energy homeostasis, recent studies demonstrate that the melanocortin system, especially the MC4R (melanocortin receptor-4) mediated signaling, functions in organ homeostasis and tissue repair. Here, this short review summarizes the accumulating findings of the expression and regulatory role of MC4R in organs other than the hypothalamus, and proposes that the MC4R signaling is an important regulator of organ regeneration and repair.

Keywords organ regeneration; tissue repair; MC4R; metabolism regulation; neurotrophic function

黑皮质素系统包括黑皮质素(melanocortin)及其受体(melanocortin receptor)、神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)以及内源黑皮质素拮抗剂agouti和agouti相

关蛋白(agouti related protein, AgRP)^[1-2]。黑皮质素是一大类调节不同功能的多肽集合,包括 α -、 β -、 γ -促黑素(melanocyte stimulating hormones, MSH),促

收稿日期: 2022-02-27

接受日期: 2022-03-07

国家自然科学基金(批准号: 31771608、31970778)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65983272, E-mail: lingufa@tongji.edu.cn

Received: February 27, 2022

Accepted: March 7, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31771608, 31970778)

*Corresponding author. Tel: +86-21-65983272, E-mail: lingufa@tongji.edu.cn

肾上腺皮质激素(adrenocorticotropin, ACTH)。它们均来源于阿黑皮素原(pro-opiomelanocortin, POMC)的组织特异性翻译后加工。黑皮质素受体系统包括五个MCRs(MC1R~MC5R)及两个受体辅助蛋白MRAP(melanocortin receptor associated protein)。除了MC2R特异性地与ACTH结合外, MC1R、MC3R、MC4R、MC5R均能与所有促黑素结合, 但其亲和力在不同受体之间有所差别^[3]。MCR受体的功能与MCR在组织中的特定表达有关。与能量代谢调控有关的黑皮质素受体则为MC3R和MC4R^[4-5]。MC4R因其功能丧失在小鼠和人类中均表现为肥胖类疾病表型, 而被认为是调控个体能量代谢的关键因子^[6-7]。新近研究表明, *MC4R*基因功能缺失突变在人群中具有较高的发生率^[8], 这很好地解释了为什么目前有大量的研究集中在找寻MC4R激动剂上。而美国食品与药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)对MC4R激动剂RM-493的批准则是最好的注脚。有关黑皮质素系统与代谢、肥胖的研究, 已经有很多综述。如最近YEO等^[1]回顾了黑皮质素系统的能量代谢调节中的作用是如何被发现和证明的以及其是如何作为肥胖症治疗靶点的。LOOS与YEO^[7]在2022年第2期*Nature Reviews Genetics*上亦对肥胖症的遗传学基础(包括*MC4R*基因突位点)进行了梳理, 也探讨了MC4R激动剂临床应用前景。

但除了参与代谢调节和与代谢性疾病发生相关外, MC4R介导的信号可能具有更广泛的作用。本文仅以MC4R为例, 对其在中枢下丘脑外的组织器官中的作用进行讨论。

1 MC4R的表达

与其调控进食与能量代谢相符合, MC4R主要在中枢神经系统中表达。GANTZ等^[9]通过Northern blot发现*Mc4r*在脑中表达, 成体小鼠脑切片中的原位杂交显示*Mc4r* mRNA定位于丘脑、下丘脑和海马区域。*Mc4r* mRNA在海马的CA1和CA2区域广泛表达, *Mc4r* mRNA也存在于齿状回、皮质和杏仁核中。对大鼠脑的研究表明, *Mc4r* mRNA在成年大鼠脑, 包括皮质、丘脑、下丘脑、脑干和脊髓中广泛表达。在下丘脑中, 它在室旁核(paraventricular nucleus, PVN), 包括小细胞(parvocellular)和大细胞(magnocellular)神经元中高度表达。

除了中枢神经系统外, *Mc4r* mRNA还在大鼠

胎儿期的许多组织, 包括心脏(E14)、肺(E16)、肋间肌(E14)中表达。而在成年大鼠的肾上腺、肝脏、脑垂体、肠系膜脂肪和脾脏中却无法检测到*Mc4r* mRNA, 似乎*Mc4r* mRNA仅在发育中的心脏、肺、肾和胎儿期间的睾丸中表达^[10]。MC4R在肠内分泌L细胞中表达, 它被 α -MSH激活后导致发生了YY肽(peptide YY)和胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)的释放, 从而调节营养物质的吸附^[11]。这些研究证明, MC4R在神经系统中起作用, 且MC4R介导的信号有更广泛的生理作用。

早期研究提示, *Mc4r* mRNA也在发育中的胚胎肢体中表达^[10]。我们利用*Mc4r-gfp*转基因报告小鼠^[12]对MC4R-GFP在胚胎发育中的表达进行了仔细分析^[13]。我们的分析表明, MC4R-GFP在胚胎肢体中有较广泛的表达。整体而言, MC4R的表达与肢体的神经组织紧密相关联。在E9.5或E10.5肢芽中MC4R-GFP尚未出现, 但在E11.5开始的前肢和后肢中, MC4R-GFP与bIII-微管蛋白有非常高的共表达。自E13.5期肢体中神经肌肉建立联系起, MC4R-GFP明显见于肢体肌肉中。已有研究证明, 发生*MC4R*基因突变的个体身材高大^[14-15], 提示MC4R通路与骨骼生长相关。但我们发现MC4R-GFP并不在Sox9阳性的成骨细胞中表达, 说明MC4R对骨骼的生长调节不是通过细胞自主性机制, 而是以系统性信号来实现的。已有研究表明, 来自成骨细胞的脂质运载蛋白2(lipocalin 2, LCN2)可以跨过血脑屏障激活下丘脑MC4R神经元^[16], 从而调节骨骼的生长。

有意思的是, 在出生后及成体四肢中, 我们发现MC4R-GFP非常特异性地表达于趾尖, 位于趾骨间的结缔组织中。MC4R-GFP在近端趾甲基质中的表达持续到成体。其表达区域相当于趾甲干细胞瞬时扩增区域^[17]。而趾甲器官对断趾趾骨的再生具有非常重要的影响^[18]。因此, MC4R在肢体中的表达模式支持其在肢体的发育与损伤修复中起作用。

在非哺乳动物物种中, *Mc4r*也在除脑外其余多种组织中表达。如在鸡中, 发现*Mc4r*在各种组织包括肾、肾上腺、睾丸、骨骼肌和眼睛^[19]中表达。在某些鱼类中, *Mc4r*也在中枢神经系统外的组织, 例如斑马鱼的眼睛、卵巢和胃肠道, 金鱼的子房, 牙鲆的肝脏、卵巢和睾丸中表达^[20-22]。与哺乳动物相同, *Mc4r*在这些组织中的生理功能尚不清楚。最近的研究则提示, MC4R与器官的功能稳态维持相关。

2 MC4R与组织器官损伤修复的联系

MC4R对器官稳态的作用, 实际已早有研究提示。如除了上述提及的由*Mc4r*突变引起的肥胖表型外, *Mc4r*的缺失也会导致小鼠扩张性心肌病^[23]。尽管目前尚未有研究对其机制进行阐述, 但是扩张性心肌病的发生与损伤修复缺陷可能存在关系。有报道发现在大鼠肝脏部分切除后, *Mc4r* mRNA表达会发生上调^[24]。在外周神经损伤后, 给予MC4R激动剂 α -MSH则可以促进外周髓鞘化神经末梢的生长^[25]。

在探索下丘脑损伤对器官再生的影响时, 我们发现爪蛙蝌蚪一侧下丘脑损伤会导致对侧肢体再生芽基不能形成, 说明下丘脑来源的信号对断肢再生是必要的。而在五个黑皮质素受体中, 只有MC4R的表达与蝌蚪肢体发育与再生相关, 且在肢体细胞中降低MC4R表达也同样会导致断肢再生缺陷。因此, MC4R通路对蝌蚪断肢再生是必需的^[26]。这种必要性也是保守的, 因为*Mc4r*突变小鼠的趾尖也不能再生^[26]。有意思的是, MC4R通路对于断肢再生而言具有一定的充分性。这是因为在不能再生的晚期蝌蚪断肢, 以及不能再生的小鼠近端趾端中提供MC4R激动剂 α -MSH可以很好地促进再生^[13,26]。这些结果充分证明了MC4R通路能够调控肢体再生。

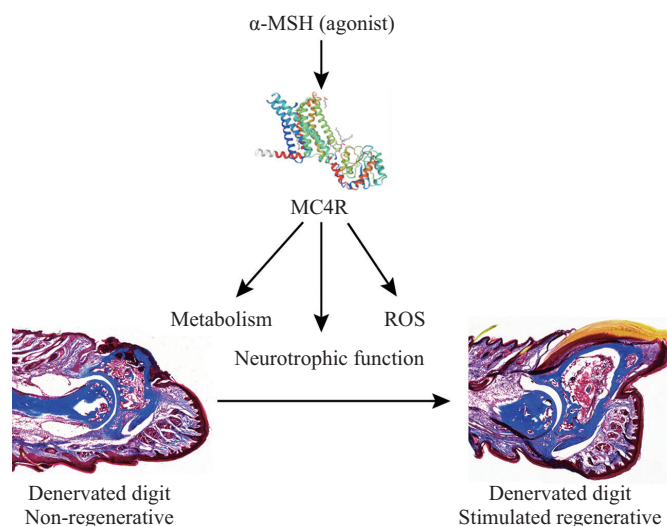
3 α -MSH/MC4R在损伤修复中的作用机制

目前有关MC4R调节个体进食与能量代谢的机

制已有比较深入的研究。简要而言, MC4R与Gs蛋白耦联激活cAMP/PKA通路发挥作用, 与Gq蛋白结合激活PKC通路, 或者通过耦联Gi蛋白激活ERK1/2^[27]。而Ca²⁺、PKA、PKC及PI3K均可以导致ERK1/2的激活, 其中PKA依赖的ERK1/2激活则抑制个体对食物的摄入。

在损伤修复中, 现有研究显示MC4R功能缺失与线粒体结构完整性及活性有关, 从而导致过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生而引起细胞、组织损伤^[23]。在断肢再生芽基细胞中, MC4R敲降的细胞的线粒体活性与产生ATP的能力也发生了改变。但与过量ROS生成导致心肌损伤不一致的是, 在断肢再生中MC4R敲低导致的是ROS产生不足^[26]。而在损伤修复中适量的ROS对启动损伤修复与再生是必要的^[28]。与此相符的是, 在失神经的断肢细胞中, ROS含量也是下调的, 但其水平在 α -MSH激活MC4R后得到了恢复。断肢细胞中ROS水平的恢复伴随的是再生芽基细胞的增殖及再生缺陷表型的拯救^[26]。

基于 α -MSH激活MC4R能够调节断肢再生中的ROS产生并拯救断肢再生的现象, 我们提出了 α -MSH/MC4R具有神经营养因子的作用, 能够替代神经组织对断肢再生的支配作用。对此, 我们已进行了初步论证^[29]。我们实验室在小鼠断趾再生中的结果, 则进一步支持 α -MSH/MC4R在损伤修复中的神经营养作用(图1)。



MC4R被激动剂 α -MSH激活后, 调节断趾小鼠能量代谢、活性氧(ROS)含量, 发挥神经影响作用, 促进失神经的断趾再生。

Activation of MC4R signaling by its endogenous agonist, α -MSH, regulates energy metabolism and production of ROS (reactive oxygen species) in the injured mouse digit, and exerts neurotrophic functions to induce regeneration of denervated digits.

图1 MC4R通路诱导失神经断趾再生(根据参考文献[13,26]修改)

Fig.1 MC4R signaling induces regeneration of the denervated digits (modified from references [13,26])

所谓神经营养作用是指神经组织对其所支配的组织器官具有营养作用。神经细胞合成的营养因子通过轴浆流动运输到神经末梢, 释放后作用于神经支配的组织, 维持靶组织的正常生理机能。而器官再生, 特别是断肢再生, 依赖于神经支配的现象已广为人知。尽管曾经存在一些争论, 小鼠趾尖再生对神经支配的依赖性现已得到共识。通过坐骨神经及股神经的离断, 可以实现小鼠后肢趾端较完全的去神经支配^[30]。失神经支配的小鼠第三趾节远端离断不能再生, 但此缺陷可以经由 α -MSH的皮下注射得到拯救(图1)^[13]。

4 讨论与展望

*Mc4r*的缺失除了导致断趾再生缺陷外^[26], 也会导致小鼠扩张性心脏病^[23]。我们正在开展的研究显示*Mc4r*突变小鼠的心脏再生能力也受到了影响, 但相关机制有待于进一步阐明。有研究报道MC4R在肝脏切除后的再生中表达上调^[24], 但MC4R信号在不同肝脏细胞中的表达是否有异质性, 其作用机制如何, 尚需要进一步研究。如前所述, 非哺乳动物物种MC4R在中枢神经系统之外的多种器官组织中有表达。其生理作用如何, 是怎样起作用的, 目前也鲜有研究。最近, 我们初步研究发现MC4R在再生能力超强的蝾螈组织中的表达更为广泛^[31]。系统性分析MC4R在这些器官组织中的生理作用, 有助于深入理解黑皮质素系统对器官组织损伤修复的调控, 为探索促进器官损伤修复提供新的思路。

参考文献 (References)

- [1] YEO G S H, CHAO D H M, SIEGERT A M, et al. The melanocortin pathway and energy homeostasis: from discovery to obesity therapy [J]. *Mol Metab*, 2021, 48: 101206.
- [2] ANDERSON E J, CAKIR I, CARRINGTON S J, et al. 60 YEARS OF POMC: regulation of feeding and energy homeostasis by α -MSH [J]. *J Mol Endocrinol*, 2016, 56(4): T157-74.
- [3] YEO G S H, HEISLER L K. Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics [J]. *Nat Neurosci*, 2012, 15(10): 1343-9.
- [4] KRASHES M J, LOWELL B B, GARFIELD A S. Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19(2): 206-19.
- [5] GAUTRON L, ELMQUIST J K, WILLIAMS K W. Neural control of energy balance: translating circuits to therapies [J]. *Cell*, 2015, 161(1): 133-45.
- [6] HUSZAR D, LYNCH C A, FAIRCHILD-HUNTRESS V, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice [J]. *Cell*, 1997, 88(1): 131-41.
- [7] LOOS R J F, YEO G S H. The genetics of obesity: from discovery to biology [J]. *Nat Rev Genet*, 2022, 23(2): 120-33.
- [8] WADE K H, LAM B Y H, MELVIN A, et al. Loss-of-function mutations in the melanocortin 4 receptor in a UK birth cohort [J]. *Nat Med*, 2021, 27(6): 1088-96.
- [9] GANTZ I, MIWA H, KONDA Y, et al. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(20): 15174-9.
- [10] MOUNTJOY K G, WU J C S, DUMONT L M, et al. Melanocortin-4 receptor messenger ribonucleic acid expression in rat cardiorespiratory, musculoskeletal, and integumentary systems [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(12): 5488-96.
- [11] PANARO B L, TOUGH I R, ENGELSTOFT M S, et al. The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 *in vivo* [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(6): 1018-29.
- [12] LIU H, KISHI T, ROSEBERRY A G, et al. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(18): 7143-54.
- [13] XU H, ZHANG H, FANG Y, et al. Activation of the Melanocortin-4 receptor signaling by α -MSH stimulates nerve-dependent mouse digit regeneration [J]. *Cell Regen*, 2021, 10(1): 19.
- [14] LEPSER E W, ZHANG J, HOLLENSTED M, et al. Adults with pathogenic MC4R mutations have increased final height and thereby increased bone mass [J]. *J Bone Miner Metab*, 2020, 38(1): 117-25.
- [15] MARTINELLI C E, KEOGH J M, GREENFIELD J R, et al. Obesity due to melanocortin 4 receptor (MC4R) deficiency is associated with increased linear growth and final height, fasting hyperinsulinemia, and incompletely suppressed growth hormone secretion [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(1): E181-8.
- [16] MOSIALOU I, SHIKHEL S, LIU J M, et al. MC4R-dependent suppression of appetite by bone-derived lipocalin 2 [J]. *Nature*, 2017, 543(7645): 385-90.
- [17] TAKEO M, CHOU W C, SUN Q, et al. Wnt activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration [J]. *Nature*, 2013, 499(7457): 228-32.
- [18] ZHAO W, NEUFELD D A. Bone regrowth in young mice stimulated by nail organ [J]. *J Exp Zool*, 1995, 271(2): 155-9.
- [19] TAKEUCHI S, TAKAHASHI S. Melanocortin receptor genes in the chicken: tissue distributions [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1998, 112(2): 220-31.
- [20] CERDA-REVERTER J M, RINGHOLM A, SCHIOTH H B, et al. Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: involvement in the control of food intake [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(6): 2336-49.
- [21] RINGHOLM A, FREDRIKSSON R, POLIAKOVA N, et al. One melanocortin 4 and two melanocortin 5 receptors from zebrafish show remarkable conservation in structure and pharmacology [J]. *J Neurochem*, 2002, 82(1): 6-18.
- [22] KOBAYASHI Y, TSUCHIYA K, YAMANOME T, et al. Food deprivation increases the expression of melanocortin-4 receptor in the liver of barfin flounder, *Verasper moseri* [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 155(2): 280-7.
- [23] LITT M J, OKOYE G D, LARK D, et al. Loss of the melanocor-

- tin-4 receptor in mice causes dilated cardiomyopathy [J]. *eLife*, 2017, 6: e28118.
- [24] XU M, ALWAHSH S M, RAMADORI G, et al. Upregulation of hepatic melanocortin 4 receptor during rat liver regeneration [J]. *J Surg Res*, 2016, 203(1): 222-30.
- [25] VERHAAGEN J, EDWARDS P M, JENNEKENS F G, et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone stimulates the outgrowth of myelinated nerve fibers after peripheral nerve crush [J]. *Exp Neurol*, 1986, 92(2): 451-4.
- [26] ZHANG M, CHEN Y, XU H, et al. Melanocortin receptor 4 signaling regulates vertebrate limb regeneration [J]. *Dev Cell*, 2018, 46(4): 397-409, e5.
- [27] RODRIGUES A R, ALMEIDA H, GOUVEIA A M. Intracellular signaling mechanisms of the melanocortin receptors: current state of the art [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(7): 1331-45.
- [28] LOVE N R, CHEN Y, ISHIBASHI S, et al. Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(2): 222-8.
- [29] 林古法, 陈瑛. 神经系统对断肢再生的调控[J]. *中国细胞生物学学报*(LIN G, CHEN Y. Limb regeneration under check by the nervous system [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2018, 40(11): 1935-43.
- [30] RINKEVICH Y, MONTORO D T, MUHONEN E, et al. Clonal analysis reveals nerve-dependent and independent roles on mammalian hind limb tissue maintenance and regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(27): 9846-51.
- [31] WANG X, XUE S, LEI X, et al. Pharmacological evaluation of melanocortin 2 receptor accessory protein 2 on axolotl neural melanocortin signaling [J]. *Front Endocrin*, 2022, 13: 820896.