

• 文献综述 •

促红细胞生成素(EPO)对神经细胞的保护作用

陈淑强,徐又佳,郑祖根

(苏州大学附属第二医院骨科,苏州 215004)

摘要:促红细胞生成素是一种多功能的营养因子,目前发现 EPO 对脊髓损伤有良好的神经保护作用。本文回顾了国内外近年来促红细胞生成素(EPO)对脊髓损伤的研究进展,对 EPO 可能的神经保护机制作一综述。

关键词:促红细胞生成素;脊髓损伤;神经保护

中图分类号:Q591.2;R744.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-7234(2007)05-0422-03

脊髓损伤(SCI)致死致残率很高,SCI 的治疗仍是目前骨科研究的重大课题之一。最近人们发现促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)不仅可影响红系血细胞,还是一种多功能的营养因子,对中枢神经有着良好的神经保护作用。本文回顾了近几年来 EPO 对 SCI 神经保护作用的研究文献,对 EPO 可能的神经保护机制作综述如下:

1 神经递质传递的调节作用

EPO 作为体内一种重要的神经生长调节因子,可以调节许多神经细胞的内在功能:神经递质的合成及传递、膜去极化、钙离子流等。实验表明 EPO 能增加培养的海马神经元内的突触传递功能;另外,在鼠的脊髓损伤和坐骨神经损伤模型中,EPO 可通过对突触传递的直接作用而起到伤后即刻的神经保护作用^[1]。

EPO 的这些作用可能通过抑制或刺激神经递质的合成来完成对突触可塑性的调节。在 PC12 细胞实验中,EPO 通过激活钙离子通道刺激多巴胺的释放和酪氨酸羟化酶的活性,诱导膜的去极化,增加 NO(nitric oxide)的合成;NO 的合成可促进神经递质(γ -氨基丁酸、乙酰胆碱和多巴胺)的释放^[2]。在海马薄片培养中,EPO 受体被激活后,通过激活 JAK2 (Janus-amino tyrosine kinase-2,一种非受体型酪氨酸激酶)降低钙离子介导的兴奋性氨基酸释放来实现对神经元缺血性损伤的保护。

关于钙通道活性的调节,研究表明 EPO 能刺激 T 型电压依赖性钙通道的活性,通过影响神经细胞内钙离子的平衡来产生对神经细胞的保护作用。对人类神经细胞瘤的膜片钳的研究证实有 T 型钙通道的表达,并且当把 EPO 加入到培养基中,通过激光共聚焦显微镜扫描分析得知,作为对细胞外应用 EPO 的应答,细胞内游离的钙离子有短暂性的升高^[3]。

2 营养神经、促进神经生长的作用

EPO 的作用并不仅限于直接影响神经细胞的生存,在神经细胞培养中也显示了其营养作用^[4]。Siren 等证实 EPO 在代谢异常条件下具有神经元保护作用,在正常生理条件下具有促使神经元增生、树突增多、功能增强、分化良好等作用,而且 EPO 对于神经元保护是一种直接作用,不必依赖于神经胶质细胞^[5]。在鼠的 NS20Y 细胞和人 SK-N-MC 成神经瘤细胞株的体外培养中,用 17 种氨基酸加 EPO 作为营养成分,他们能启动细胞的分化,能阻止细胞的死亡和增强胆碱乙酰基转移酶的活性。这些结果说明,EPO 对神经损伤产生的抑制神经元凋亡是其短暂的效果,对神经的营养作用是长期作用。

EPO 的另一个可能的长期作用机制是它能调节神经的再生。EPO 能通过前脑的神经干细胞调节神经前体细胞的产生,能控制神经干细胞的分化和增殖。在神经系统发育过程中,EPO 受体在胚胎的胚性细胞区(相当于成人的室下区)表达,直到成年,此区域始终有神经元产生^[6]。在缺氧状态下培养的神经干细胞能产生 2~3 倍的神经元,这个过程中伴有 EPOmRNA 表达的增加。

3 调节血循环、促进血管生成的作用

EPO 对脊髓损伤早期所发挥的保护作用之一可能是通过维持受伤组织局部充足的循环血量实现的。脊髓组织在遭受暴力损伤后,局部循环血量明显减少,随着时间的发展缺血继续加重,并可持续达 24h^[7];此外,创伤本身所造成的神经功能异常所导致的低血压和心率缓慢可以使神经组织的缺血进一步加重。EPO 可以缓解这种局部组织缺血的情况。对兔蛛网膜下腔出血的实验研究发现,EPO 可以明显缓解由于血流灌注的刺激作用所造成的大脑中动脉痉挛^[8];经腹腔注射 rhEPO 能够使血管保留对血流的调节能力,并且这种 EPO 的血管保护作用是全身性的^[9]。脊髓损伤后,NO 即在心血管系统的改变中发挥作用^[10],有研究表明 EPO 对脊髓微循环的调节作用可能是通过减少 NO 的合成实现的^[11]。

EPO 促进新血管的生成可能是其另一个保护机制,这能有助于代谢较差的组织保持灌注。中枢神经的内皮细胞上也存在 EPO 受体,并能对 EPO 的治疗产生应答。无论在正常还是在病理条件下,EPO 都具有调节血管生成的功能^[12]。体内和体外实验都已报道 EPO 具有刺激血管生成的作用。另外 EPO 也能防止缺氧诱导的血管内皮损伤。

4 增强神经细胞的缺氧耐受性

在神经损伤时内源性保护机制激活了 EPO-EPOR 系统,并且能通过外源性的 EPO 得到增强。在缺血和缺氧预处理条件下,EPO 是最主要的调节因子之一。低氧能使鼠脑对局部持久的缺血产生延迟的、短暂的耐受并激活低氧诱导因子-1 (Hypoxia inducible factor

收稿日期:2007-02-05;修订日期:2007-04-09

作者简介:陈淑强(1982-),男,山东籍,硕士研究生
研究方向:脊柱外科,骨关节疾病研究。

通讯作者:徐又佳

电话:13013870777

电子邮箱:xuyoujia@medmail.com.cn

1, HIF-1) 活性显著增高。HIF-1 能使与适应低氧有关的基因转录增强, 涉及改善低氧条件的基因如 VEGF (vascular endothelial growth factor)、EPO、iNOS (inducible nitric oxide synthase)、运铁蛋白、酪氨酸羟化酶、糖酵解酶等大量表达, 有利于增强对低氧的耐受^[13]。近来, 在体外利用氧和糖缺乏的模型, 阐明了缺血缺氧预处理后信号传导的一系列变化^[14]: 低氧激活了 HIF-1、星形胶质细胞表达和释放 EPO, 激活了神经细胞 EPO 受体, 进而通过 Akt2 介导的磷酸化使 JAK2 和磷脂酰肌醇-3 激酶 PI (3)K 灭活引起凋亡。

5 抑制神经细胞炎症反应

脊髓损伤后损伤局部将发生炎症反应, 炎症细胞可对神经胶质造成损伤并最终影响轴突的髓鞘化。应用 EPO 治疗 7d 后的组织学观察发现脊髓组织的空腔变明显少于对照组, 损伤区域的炎细胞数目也明显少于对照组。在应用 EPO 治疗脑损伤时也有类似发现^[9]。在脑和脊髓的创伤和缺血损伤以及多发性硬化模型中, EPO 的抗炎作用已得到验证^[16,17]。研究表明 EPO 虽不能直接降低 TNF- α (tumor necrosis factor- α) 的表达, 但可以使其表达的高峰时间延迟。EPO 可通过调控炎症基因的主要调控子胞核因子- κ B (NF- κ B) 家族来发挥其抗炎作用, 脊髓损伤后, NF- κ B 明显上调^[8]。NO 合成酶是 NF- κ B 基因依赖性产物之一, NO 合成酶在伤后合成增加, 并在伤后 7d 达到高峰; 抑制 NO 合成酶合成可能是 EPO 抗炎作用的另一条途径^[9]。

此外, EPO 也能降低由缺血诱导的促炎性细胞因子 (IL-6, MCP-1) 的表达^[20]。在损伤前 24h 给予 EPO 预处理的实验组与对照组比较, 发现 EPO 能明显降低小鼠顿挫伤模型中组织坏死的范围和坏死区的炎症反应。在损伤后 3h 内给予 EPO 的实验组, 也得到相似的保护和抗炎效果。

6 抑制氧化反应的作用

脊髓损伤后, EPO 可通过抑制 NO 介导的氧自由基产生或者对抗它们的毒性产生神经保护作用^[21]。Kaptanoglu 等发现急性脊髓损伤后, 大鼠体内脂质

过氧化反应增强, 代谢产物硫代巴比妥酸反应产物 (TBARS) 明显升高, 而 EPO 能够抑制脂质过氧化, 降低体内 TBARS 的水平, 改善脊髓超微结构, 并发现 EPO 5000IU/kg 组较 100IU/kg 组、100IU/kg 组、甲强龙琥珀酸钠组和空白对照组抑制脂质过氧化的作用更强^[22]。在大鼠实验性脊髓损伤的模型和沙土鼠脑缺血模型中, 系统应用 EPO 后能降低脂质过氧化反应。在鼠的星形胶质细胞培养中, EPO 能增强谷胱甘肽过氧化物酶的活性^[23]。

7 抑制兴奋性氨基酸介导的细胞毒作用

脊髓损伤后兴奋性氨基酸所介导的细胞毒性在继发性脊髓损伤中发挥重要作用。谷氨酸诱导 N-甲基-D-天门冬氨酸 (NMDA) 受体所引发的细胞外 Ca^{2+} 内流可使细胞器破坏而导致细胞死亡^[24]。对于体外培养的神经细胞, EPO 可以保护其免受由 NMDA 受体介导的谷氨酸兴奋性毒性损伤^[25]。EPO 可通过减少细胞内 Ca^{2+} 浓集发挥细胞保护作用, 还可以通过减少 NO 的合成减少兴奋性氨基酸的神经毒性作用。

8 抗凋亡

细胞死亡有炎性坏死和细胞凋亡两种方式。在脊髓组织遭受损伤的最初几天内, 部分神经细胞将发生程序性死亡—凋亡, 并造成神经功能的进一步丧失^[26]。EPO 对神经元的保护作用得益于对这两种方式的双重阻断。最近的研究证实, EPO 在体内和体外的多种神经细胞损伤模型中都有抗凋亡作用^[27]。神经细胞 EPO 受体被激活后通过干扰 JAK2 和 NF- κ B, 能防止 NMDA 和 NO 诱导的凋亡^[28]。脊髓缺血性损伤后, 经生理盐水处理的实验动物脊髓前角运动神经元 TUNEL (脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法) 标记是广泛而明显的, 而经 EPO 治疗的实验动物脊髓前角运动神经元几乎没有 TUNEL 标记, 说明 EPO 能够抑制脊髓损伤后神经细胞的凋亡^[29]。这一点在脑损伤模型中也得以证实。

体外实验的结果也同样印证了 EPO 的抗凋亡作用^[30]。在体外, EPO 可以调节由缺氧和氧自由基引起神经细胞

损伤的多种细胞内死亡通路。通过开始激活蛋白激酶 B 的信号通路, EPO 能保持线粒体的膜电位, 然后抑制与细胞色素 C 释放有关的 caspase-8、caspase-1 和 caspase-3 类似活性酶的活性。在自由基损伤模型中, EPO 调节神经膜外部分的磷脂酰丝氨酸 (Ps) 残基, 通过调节下游线粒体的膜电位, 细胞色素 C 的释放, caspase-8、caspase-1 和 caspase-3 类似活性酶的活性, 增加蛋白激酶 Akt1 的活性, 促进凋亡的蛋白磷酸化而保持 DNA 的完整性。在运动神经元培养中, EPO 能抑制因血清缺乏或红藻氨酸诱导的细胞凋亡: 在这个培养系统中, 用 EPO 预处理后发现该过程有基因表达的变化。先前发现的 EPO 促进红细胞生成的细胞信号传导通路中所调节的许多基因, 在神经细胞内也同样被 EPO 所调节。在 PC12 细胞内, EPO 能持续增加抗凋亡基因 Bcl-XL 的表达和降低促凋亡基因 Bak 的表达; 在小胶质细胞的培养中, EPO 能改变 Bcl-2/Bax 的比率^[31], 而表现出抗凋亡的作用。Bcl-2 和 Bcl-XL 的过量表达能抑制多种因素诱导的凋亡, Bax 和 Bak 的过量表达能使凋亡易于发生^[32]。这些研究说明, EPO 的神经保护作用可能与控制抗凋亡基因和促凋亡基因的平衡有关。

结语

尽管支持 EPO 的神经保护作用的证据正在增加, 对于 EPO 治疗的临床应用仍存在忧虑, 最近的动物实验表明红细胞在血细胞比容中的增加可以加重中枢神经系统的损伤^[33,34]。目前, 研究人员正在努力合成缺乏造血作用的红细胞生成素的衍生物, 通过去除残基而产生的去唾液酸促红细胞生成素 (Asialoerythropoietin) 可以生成一种具有神经保护作用的具有缩短的半衰期的 EPO 衍生物。Asialo-EPO 在脊髓损伤的动物模型、中风、外周神经病中, 表现出保护神经的作用, 并且不影响红细胞集块^[35]。第二种 EPO 衍生物是把 EPO 的赖氨酸残基氨甲酰化产生的, 这种合成的产物 (CEPO) 没有了造血的潜力, 但仍保持了神经保护能力^[36]。

希望在不久的将来 EPO 或 EPO 的

衍生物能够作为治疗脊髓损伤的一种新药应用于临床。

参考文献:

- [1] Weber A, Maier RF, Hofmann U, et al. Erythropoietin improves synaptic transmission during and following ischemia in rat hippocampal slice cultures [J]. *Brain Res*, 2002, 958: 305-311.
- [2] Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, et al. Effects of erythropoietin on neuronal activity [J]. *J Neurochem*, 2000, 72: 2565-2572.
- [3] Assandri R, Egger M, Gassmann M, et al. Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line [J]. *J Physiol*, 1999, 5, 16: 343-352.
- [4] Tabira T, Konishi Y, Gallyas F. Neurotrophic effect of hematopoietic cytokines on cholinergic and other neurons in vitro [J]. *In J Dev Neurosci*, 1995, 13: 241-252.
- [5] Siren A, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98(7): 4044-4049.
- [6] Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, et al. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells [J]. *J Neurosci*, 2001, 21: 9733-9743.
- [7] Rivlin A, Tator CH. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma [J]. *Neurosurg*, 1978, 49(6): 844-853.
- [8] Grasso G, Buemi M, Alafaci C, et al. Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(8): 5627-5631.
- [9] Springborg JB, Ma X, Rochat P, et al. A single subcutaneous bolus of erythropoietin normalizes cerebral blood flow to regulation after subarachnoid haemorrhage in rats [J]. *Pr J Pharmacol*, 2002, 135(3): 823-829.
- [10] Bravo G, Roias-Martinez R, Larios F, et al. Mechanisms involved in the cardiovascular alterations immediately after spinal cord injury [J]. *Life Sci*, 2001, 68(13): 1527-1534.
- [11] Calapai G, Mareiano MC, Coriea F, et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 401(3): 349-556.
- [12] Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, et al. Erythropoietin as an angiogenic factor, *Eur J Clin Invest*, 2003, 33: 891-896.
- [13] Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, et al. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22: 393-403.
- [14] Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model [J]. *J Neurosci*, 2002, 22: 10291-10301.
- [15] Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(19): 10526-10531.
- [16] Hoke A [Editor]. Erythropoietin and the Nervous System: Novel Therapeutic Options for Neuroprotection [M]. New York: Springer, 2006, 147-164.
- [17] Brines M L, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 10526-10531.
- [18] Gorio A, Cokmen N, Erbayraktar S, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14): 9450-9455.
- [19] Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(8): 4635-4640.
- [20] Villa P, Bigini P, Mennini T, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis [J]. *Exp Med*, 2003, 198: 971-975.
- [21] Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 4635-4640.
- [22] Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, et al. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings [J]. *Neurosurgical review*, 2004, 27(2): 113-20.
- [23] Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NFkappaB signaling cascades [J]. *Nature*, 2001, 412: 642-647.
- [24] Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent [J]. *Neurosci Lett*, 1985, 58(3): 293-297.
- [25] Morishita E, Masuda M, Nagao M, et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate induced neuronal death [J]. *Neuroscience*, 1997, 76(1): 105-116.
- [26] Hayashi T, Sakurai M, Abe K, et al. Apoptosis of motor neurons with induction of caspases in the spinal cord after ischemia [J]. *Stroke*, 1998, 29(5): 1007-1013.
- [27] Arishima Y, Yoshiya MD, Setoguchi T, Takao MD, Yamaura I, Ichiro MD, Yone K, Kazunori MD, Komiyama S, Setauro MD. Preventive Effect of Erythropoietin on Spinal Cord Cell Apoptosis Following Acute Traumatic Injury in Rats [J]. *Spine*, 2006, 31(21): 2432-2438.
- [28] Sirena L, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 4044-4049.
- [29] Gelik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2258-2263.
- [30] Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NFkappaB signalling cascades [J]. *Nature*, 2001, 412: 641-647.
- [31] Vairano M, Russo CD, Pozzoli G, et al. Erythropoietin exerts antiapoptotic effects on rat microglial cells in vitro [J]. *Eur. J. Neurosci*, 2002, 16: 584-592.
- [32] Liu WG, Yang XF, Li G. Study on effect of Naloxone on apoptosis of neuron and expression of Bcl2 Bax gene after severe brain injury [J]. *Chin J Neurosurg*, 2004, 20: 2170-2172.
- [33] Wiessner C, Allegrini PR, Ekato D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin [J]. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 2001, 21: 857-864.
- [34] Grasso G, Sforzetta A, Cerami A, Brines M. Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go [J]. *Neuroscientist* 2004; 10: 93-98.
- [35] Erbayraktar S, Grasso G, Sforzetta A, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 6741-6746.
- [36] Leist M, Ghezzi P, Grasso G, et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic [J]. *Science* 2004, 305, 239-242.