

- natural killer cells (pit cells) express mRNA and protein similar to in vitro interleukin-2 activated natural killer cells. *Cellular Immunology*, 2001; 210(1) : 41
- 8 Bioulac-Sage P, Boulard A, Rossignol D, *et al.* The increase in the number of liver sinusoidal pit cells in four patients with primary or metastatic cancer of the liver. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1988; 20(2) : 335
- 9 陈 罡, 罗殿中, 李 萍, 等. 肝癌、肝硬化中 NK 细胞的免疫组织化学研究. *肝胆胰外科杂志*, 2005; 17(2) : 101
- 10 Hata K, Van Thiel DH, Herberman RB, *et al.* Phenotypic and functional characteristics of lymphocytes isolated from liver biopsy specimens from patients with active liver disease. *Hepatology*, 1992; 15(5) : 816
- 11 Winnick M, Garcia-Barcina M, Huet S, *et al.* Functional characterization of liver-associated lymphocytes in patients with liver metastasis. *Gastroenterology*, 1993; 105(4) : 1152
- 12 Shiratori Y, Nakata R, Okano K, *et al.* Inhibition of hepatic metastasis of colon carcinoma by asialo GM1--positive cells in the liver. *Hepatology*, 1992; 16(2) : 469
- 13 Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, *et al.* Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*, 2004; 173(10) : 6072
- 14 Francavilla A, Vujanovic NL, Polimeno L, *et al.* The in vivo effect of hepatotrophic factors augments of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions. *Hepatology*, 1997; 25(2) : 411
- 15 刘 婷, 俞 维. 自然杀伤细胞在妊娠子宫中的作用. *陕西医学杂志*, 2004; 33(2) : 158
- 16 Ortaldo JR, Winkler-Pickett RT, Nagashima K, *et al.* Direct evidence for release of pore-forming protein during NK cellular lysis. *J Leukocyte Biol*, 1992; 52(5) : 483
- 17 Luo D, Vermijlen D, Vanderkerken K, *et al.* Involvement of LFA-1 in hepatic NK cell (pit cell)-mediated cytolysis and apoptosis of colon carcinoma cells. *J Hepatology*, 1999; 31(1) : 110
- 18 Vermijlen D, Luo D, Robaye B, *et al.* Pit cells (hepatic natural killer cells) of the rat induce apoptosis in colon carcinoma cells by the perforin/granzyme pathway. *Hepatology*, 1999; 29(1) : 51
- 19 Luo D, Vermijlen D, Ahishali B, *et al.* MHC class I expression protects colon carcinoma cells from cytolysis and apoptosis by hepatic NK (pit) cells by blocking the perforin/granzyme pathway. *Comparative Hepatology*, 2002; 1(1) : 1

(收稿: 2005-10-31)

## 促红细胞生成素对神经系统作用的研究进展

西安交通大学第二医院干部病房(西安 710004) 何 娅 综述 刘文超 赵英贤 审校

促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)是调节红细胞生成的细胞因子, 可通过抑制红细胞生成组织中的红系祖细胞凋亡, 促进红细胞的产生。近年来研究发现, 包括神经组织在内的多种非红细胞生成组织表达功能性促红素受体(EPO-R), 提示 EPO 是具有多种活性的生长因子。脑内的 EPO 糖基化水平低, 含唾液酸较少, 分子量较小, 作用更强, 具有神经营养、神经保护和促进神经发育的作用。EPO 和 EPO-R 在神经系统的表达和作用, 已成为目前研究的重点。

### 1 EPO 及 EPO-R 在神经系统的表达

近年来研究显示了 EPO-R mRNA, EPO-R 蛋白, EPO 与 EPO-R 结合及位于多种非红细胞生成细胞与器官的细胞内信号通路。这些器官包括: 大脑, 心血管组织, 肝脏, 胃肠道组织, 胰岛, 肾脏, 睾丸和女性生殖器官。人和啮齿类动物大脑中广泛存在 EPO 及其受体(EPO-R), 且主要分布于海马及大脑皮层的神经元和神经胶质细胞。原代混合培养的神经组织和 NT<sub>2</sub> 与 hNT 人类神经元细胞系均可表达 EPO 及 EPO-R mRNA。培养的人类星形细胞可表达 EPO mRNA 和产生 EPO。人类胚胎发育的前 6 个月, 脊髓组织表达 EPO mRNA<sup>[1]</sup>。胚胎未分化神经

细胞表达 EPO 及 EPO-R, 胚胎发育后期, 星形细胞明显表达 EPO-R, 神经元表达 EPO<sup>[2]</sup>。

## 2 神经系统 EPO 和 EPO-R 的表达调节

大脑发育期间 EPO 和 EPO-R 的表达发生极大的改变。胚胎鼠神经组织和大脑 EPO-R 的表达量与成年骨髓相近。脑发育成熟阶段 EPO-R 表达明显减弱, 至出生后可降低 100 倍<sup>[3]</sup>。人类神经系统中 EPO 的含量在妊娠期间增高, 分娩后降低<sup>[2]</sup>。这些研究提示 EPO/EPO-R 系统在神经系统发育中具有重要的作用。

包括大脑在内的许多组织中, EPO 的基因表达受缺氧诱导因子-1(HIF-1)调节。多种刺激因素可激活 HIF-1。诱发 EPO 的基因表达具有组织特异性, 肾脏、大脑及子宫为主要效应器官。雌激素存在的情况下, 仅可诱发 EPO mRNA 表达<sup>[4]</sup>。缺氧可诱导培养的海马神经元产生 EPO 和 EPO-R mRNAs。而这一刺激因子所致星形细胞和神经元 EPO mRNA 表达明显增强可被蛋白质合成抑制剂-环磷酸胺阻断。去铁胺和氯化钴可诱导星形细胞和神经元表达 EPO mRNA。脑缺氧亦刺激 EPO 和 EPO mRNA 的产生。脑内 EPO 的上调时间与肾脏不同。持续缺氧 2h 后鼠肾脏 EPO mRNA 的表达达到高峰, 8h 降低至峰值的 30%, 而脑内 EPO mRNA 的表达在缺氧 4h 后达到高峰, 且高表达可持续 24h<sup>[4]</sup>。

此外, 代谢紊乱如低血糖等可通过激活 HIF-1 增强大脑 EPO 的表达。胰岛素和胰岛素样生长因子可刺激培养的星形细胞呈剂量依赖方式表达 EPO mRNA。细胞因子 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 TNF- $\alpha$  下调星形细胞的 EPO 表达。

正常人大脑中主要是神经元表达 EPO/EPO-R 的弱免疫反应性。急性缺血性损伤发生后, 血管、神经元和星形细胞表达 EPO-R 上调, 可维持 18d 以上。在新近梗死灶内, EPO 免疫反应性表现于血管内皮细胞, EPO-R 表达于微血管和神经纤维。较陈旧的梗死灶内, 反应性星形细胞表现 EPO/EPO-R 免疫反应性。因此表明, 在脑缺血或缺氧状态下, EPO/EPO-R 上调作为内源性神经保护系统发挥作用<sup>[5]</sup>。

## 3 促红素对神经系统的作用

胚胎发育期, EPO 主要产生于肝脏, 为胚胎生存所必需。动物试验发现, 去除或阻断 EPO 及 EPO-R 的功能, 胚胎发育至 13d 死亡。这些鼠的其他器官发育异常, 如心室发育不良, 胚胎肝脏、心脏和大脑的细胞凋亡增强。利用 EPO-R 的转基因技术, 可矫正动物的发育异常。EPO-R 基因敲除鼠与野生型相比, 在胚胎发育期间大脑神经祖细胞减少, 神经发生作用减弱, 神经元凋亡增强。对基因敲除动物的皮质神经元进行培养研究发现, 神经细胞对低氧的敏感性增强<sup>[6]</sup>。这些研究提示 EPO 和 EPO-R 具有促进神经发育的作用。

现已证实, EPO 营养序列是由 17 个氨基酸组成, 它

能触发鼠 NS20Y 细胞系和人 SK-N-MC 神经母细胞系分化, 提高乙酰胆碱脂酶活性, 影响胆碱能神经元分化、生存及再生<sup>[7]</sup>。在缺乏血清和神经生长因子的情况下, EPO 能迅速调节胞浆内游离钙的浓度, 诱导细胞膜去极化, 增强多巴胺的释放, 以剂量依赖方式提高分化的 PC12 细胞酪氨酸羟化酶活性<sup>[8]</sup>。研究显示 EPO 还能抑制谷氨酸的神经毒性作用, 保护培养的神经元, 而利用可溶性 EPO-R 中和内源性 EPO, 可消除其保护作用<sup>[9]</sup>。

EPO 的神经保护作用已被证实。全身应用 EPO 能减少海马区 CA1 神经元的丢失, 脑室内使用 rhEPO 能减小永久性大脑中动脉阻塞中风易感自发性鼠的皮质梗死灶, 增强丘脑神经元的生存能力<sup>[10]</sup>。侧脑室灌注 EPO 能预防缺血诱发的认知障碍, 保护海马区 CA1 神经元免遭致命性缺血的损害, 而中和内源性 EPO 则加重缺血性脑损伤<sup>[11]</sup>。提示在缺血性损伤时内源性 EPO 对维持神经元生存具有重要的作用。

通过对脊髓受压和挫伤动物模型的研究发现, EPO 能明显减轻损伤所致的炎症反应, 改善神经系统功能状态<sup>[12]</sup>。此外亦发现, EPO 能明显减少坐骨神经横断后运动神经元的丢失, rhEPO 可显著减轻坐骨神经挤压引起的功能缺损<sup>[13]</sup>。

## 4 EPO 的神经保护机制

抑制凋亡: 大量的实验已经表明, EPO 能抑制神经细胞凋亡。EPO 与 EPO-R 结合, 导致后者聚合, 酪氨酸激酶 (JAK-2) 磷酸化并活化, 引起下游包括磷脂酰激酶 3 (PI-3K)、Ras-丝裂素激活的蛋白激酶 (MAPK) 和信号转导和转录激活因子-5 (STAT-5) 等信号通路的磷酸化。这一过程最终导致靶细胞增生, 抑制其凋亡和分化<sup>[14]</sup>。体外实验显示 EPO 可导致 PC12 细胞增生、分化和生存的基因发生改变, 增强细胞抗凋亡基因 bcl-XL 表达, 抑制促凋亡基因表达。提示 EPO 可能参与调控促凋亡与抗凋亡分子的平衡表达, 通过调节与凋亡过程有关的基因发挥神经保护作用<sup>[15]</sup>。

缓解血管痉挛: EPO 能提高神经元和内皮细胞的 NO 合酶活性, 降低 NO 的含量<sup>[8]</sup>。而 rhEPO 亦可与内皮细胞特异性受体结合, 竞争性调控脑血管张力, 维持正常脑血流<sup>[16]</sup>。体内实验显示<sup>[17]</sup>, 腹腔内使用 rhEPO 可明显逆转基底动脉收缩, 减少神经元凋亡, 降低蛛网膜下腔出血模型动物的病死率, 促进神经功能的恢复。

抗氧化作用: EPO 能减少 NO 诱导的自由基产生, 拮抗其毒性, 发挥神经保护作用<sup>[8]</sup>。其次它能增强神经元的抗氧化物酶 (过氧化物歧化酶, 谷胱甘肽过氧化物酶, 过氧化氢酶) 的活性, 保护脑实质免遭缺血性损伤。动物实验显示<sup>[18]</sup>, 全身应用 EPO 可减少缺血后脂质过氧化物的产生, 减轻缺血灌注诱发的致命性氧化损伤和实验性脊髓损伤。

促进新生血管生成:脑梗死发生后,血管内皮细胞和神经元 EPO 和 EPO-R 的表达上调。研究显示,rhEPO 刺激表达功能性 EPO-R 的内皮细胞诱导促血管生成表型的产生,生成蛋白酶,增强细胞的有丝分裂和增生。在 HIF-1 的作用下,EPO 与 VEGF 发挥协同作用,促进新生血管形成,增强缺血组织周围的血流,改善氧供<sup>[19]</sup>。

调节炎症反应:已经证实 EPO 能降低促炎性细胞因子的生成,抑制脑缺血时的炎症反应和实验性免疫性脱髓鞘性脑炎(EAE)<sup>[20]</sup>,还可通过抑制小神经胶质细胞的激活和其磷脂酰丝氨酸(PS)受体表达,防止神经元被吞噬,提供外源性的保护作用。另外,近期的体内外研究提示 EPO 为缺血和低氧耐受的关键调节因子。阙下的缺血或低氧刺激可激活特定的细胞内病理通路,使机体产生低氧缺血耐受,减轻以后发生的严重缺血所致的脑损害。

调节干细胞积聚:EPO 可调节神经干细胞的增生和分化。神经发育期胚胎生发区及成年体脑室下区表达 EPO-R,后者在成年期持续产生神经元。EPO 灌注侧脑室可减少脑室下区的神经干细胞,而使嗅球内迁移的新生细胞和中间神经元增多,提示 Epo 能通过前脑神经干细胞调节神经祖细胞的产生<sup>[21]</sup>。

#### 5 EPO 的临床应用

大量的研究已经证明促红素具有神经保护作用。临床的广泛应用表明,患者对 rhEPO 的耐受性极高。近期的临床试验证实,患者出现中风症状的 8h 内静脉使用 rhEPO,可显著改善患者的治疗结果<sup>[22]</sup>。此外,rhEPO 治疗新生儿窒息临床一期试验已经开始。

#### 参考文献

- Juul SE, Anderson DK, Li Y, *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res*, 1998; 43(1) : 40
- Juul SE, Yachnis A, Rojiani AM, *et al.* Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol*, 1999;2(2) : 148
- Liu C, Shen K, Liu Z, *et al.* Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem*, 1997; 272(51) : 32395
- Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, *et al.* Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000;279(6) : E1242
- Siren AL, Knerlich F, Poser W, *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol*, 2001; 101(5) : 271
- Yu X, Shacka JJ, Eells JB, *et al.* Erythropoietin receptor signaling is required for normal brain development. *Development*, 2002;129(2) : 505
- Campana WM, Misasi R, O'Brien JS. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *Int J Mol Med*, 1998;1(1) : 235
- Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, *et al.* Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem*, 1999;72(6) : 2565
- Morishita E, Masuda S, Nagao M, *et al.* Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*, 1997;76(1) : 105
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, *et al.* A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999;19(6) : 643
- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, *et al.* In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95(8) : 4635
- Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, *et al.* Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002;99(15) : 9450
- Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, *et al.* Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003;100(11) : 6741
- Yoshimura A, Misawa H. Physiology and function of the erythropoietin receptor. *Curr Opin Hematol*, 1998;5(3) : 171
- Renzi MJ, Farrell FX, Bittner A, *et al.* Erythropoietin induces changes in gene expression in PC12 cells. *Brain Res*, 2002;104(1) : 86
- Buemi M, Allegra A, Aloisi C, *et al.* Hemodynamic effects of recombinant human erythropoietin. *Nephron*, 1999;81(1) : 1
- Grasso G, Buemi M, Alafaci C, *et al.* Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002;99(8) : 5627

- 18 Calapai G, Marciano MC, Corica F, *et al.* Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol*, 2000;401(3): 349
- 19 Marti HH, Bernaudin M, Petit E, *et al.* Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol Sci*, 2000;15(3): 225
- 20 Agnello D, Bigini P, Villa P, *et al.* Erythropoietin exerts anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*, 2002;52(1): 128
- 21 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 Neurosci*, 2001;21(24): 9733
- 22 Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, *et al.* Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med*, 2002;8(8): 495

(收稿:2005-08-13)

## 类风湿性关节炎滑膜细胞凋亡研究进展<sup>△</sup>

三峡大学医学院(宜昌 443002) 姚琦 综述 袁丁 审校

类风湿性关节炎(RA)是一种主要累及小关节的慢性自身免疫性疾病。研究表明,RA滑膜细胞与疾病的发展存在着某些相关性。RA来源的滑膜细胞主要是指淋巴细胞、巨噬细胞、树突状细胞、B细胞和内皮细胞以及成纤维细胞,近来研究发现滑膜细胞的凋亡在RA的发病过程中起着十分重要的作用。

### 1 RA滑膜细胞凋亡相关分子

目前对RA滑膜细胞中细胞凋亡研究的分子主要有:p53、bcl-2、Fas/FasL、TRAIL/TRAIL受体等。

1.1 p53:作为一种抑癌蛋白,p53在细胞周期的调节、DNA的修复、凋亡等方面发挥着重要的作用。RA的滑膜细胞上可检测到大量的p53。Salvador等<sup>[1]</sup>发现p53的异常表达与关节损伤存在着相关性,并且p53在滑膜组织中的表达可能是RA关节损伤的预兆。Yamanishi等<sup>[2]</sup>使用显微解剖也发现,RA的滑膜组织上观察到大量P53的转换突变,这是由于氧化应激引起的特征性的DNA损伤。p53的突变和p53mRNA的表达一样,主要存在于滑膜的衬里层。他使用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测时发现,被野生型p53调控的IL-6mRNA的水平在p53的高突变区明显多于低突变区。p53在Fas介导的RA滑膜细胞凋亡中机制的研究是近来的热点。近来研究表明,体外培育的RA病人的滑膜成纤维细胞,经抗Fas的单克隆抗体处理后检测发现,随着Fas的连接,p53的活性可通过自身丝氨酸15位上的磷酸化和其靶基因p53调节凋亡诱导蛋白(p53AIP1)的向上调节充分表

现出来;并且Fas介导的滑膜细胞的凋亡能被错义的p53寡核苷酸和显性的p53(-)显著抑制<sup>[3]</sup>。

1.2 bcl-2:bcl-2这一重要的凋亡相关基因最初是在滤泡状淋巴瘤细胞中发现的,与Fas不同,bcl-2主要表达于血管内皮细胞和淋巴细胞中<sup>[4]</sup>;其过度表达可使细胞的生理性死亡减少,导致肿瘤的发生;现已发现,bcl-2基因家族均参与调控细胞凋亡。其中bax促进凋亡,而bcl-2、bcl-xl抑制凋亡。在与正常的滑膜组织比较时发现,RA病人的滑膜组织Bax在滑膜的CD68(+)和CD68(-)中的表达高于正常人,较多的Bax也表达于软骨的破坏部位;然而Bax并没有能降低滑膜的增生<sup>[5]</sup>。这一结果提示Bax在RA滑膜增生方面作用甚微。近来的研究表明B细胞凋亡调节中的缺陷可使bcl-2的表达水平上调。Kuroki等<sup>[6]</sup>对C57BL/6小鼠进行研究时发现,B细胞中增强的bcl-2的表达促进了这些小鼠中类风湿因子(RF)和IgG抗体DNA的诱导,从而出现了免疫复合物型肾炎。这一结果提示增强的bcl-2可使某些途径致凋亡作用受阻,活化诱导的细胞死亡发生障碍。

1.3 Fas/FasL:fas基因的表达产物Fas蛋白是肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体家族表面分子,是凋亡家族经典分子,其胞内段含有独特的死亡结构域(Death domain,DD)。死亡受体Fas与其相应配体FasL结合后,可导致受体构象改变或者多聚化,组成死亡诱导的信号复合物(Death inducing signaling complex,DISC)。在DISC中,Caspase-8被水解活化,激活效应Caspase-3、6、7。激活的效应Caspase作用于胞内死亡相关底物而导致了凋亡形态学改变的发生。RA病人关节的巨噬细胞同

<sup>△</sup>湖北省卫生厅资助基金(项目编号:JX2B75)