

· 综述 ·

促红细胞生成素与脑损伤保护作用

张俊河, 赵长安, 付云

(新乡医学院生物化学与分子生物学教研室, 河南 新乡 453003)

摘要: 促红细胞生成素(EPO)是由肾脏分泌的内源性细胞因子。各种脑细胞均有 EPO 及 EPO 受体(EPOR)的表达。EPO 可作为神经保护因子,通过抗兴奋性氨基酸毒性、抗细胞凋亡、增加细胞钙内流、抑制一氧化氮(NO)合成等作用实现对脑损伤的保护作用。作者通过综述近年来国内外相关文献,以了解促红细胞生成素及其受体的产生、结构及其在脑损伤中的保护机制。

关键词: 促红细胞生成素;信号转导;脑损伤

中图分类号:R651.1⁺5 文献标识码:A 文章编号:1004-7239(2007)02-0204-04

The protective effect of erythropoietin on brain injury

ZHANG Jun-he, ZHAO Chang-an, FU Yun

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Erythropoietin(EPO) is a kind of endogenesis cell factor which was excreted by the kidney. Each kind of brain cell has found EPO and its receptor(EPOR). EPO may take one kind of neuro-protective factor. It has been shown that EPO exerted protective effect on brain injury and its mechanisms include anti excitatory amino acids toxicity, anti cell apoptosis, promoting cell calcium flows-in, inhibiting nitric oxide formation, etc. Recent domestic and foreign papers were reviewed for learning the development of EPO and its receptors, its structure and protective mechanism on brain injury.

Key words: erythropoietin; signal transduction; brain injury

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是由肾脏分泌的内源性细胞因子,主要作用是通过促进骨髓中红系祖细胞的存活、增殖和分化来调控红细胞的生成,在临床上主要用于治疗肾性贫血和癌性贫血患者。近来的研究表明,EPO广泛地存在于机体的多个器官,比如肝脏、大脑、子宫、卵巢等。和其他的糖蛋白激素一样,EPO是通过与其表面的受体(erythropoietin receptor, EPOR)结合而发挥作用的,在正常情况下,EPO与EPOR在脑组织中均有低水平表达,而在脑损伤时,EPO表达的上调提示它在脑损伤后可作为神经营养和神经保护因子存在。

1 EPO 及其受体的结构特点

EPO 是一种酸性糖蛋白,其相对分子质量约为 34 000。成熟的人 EPO 分子由 165 个氨基酸残基组成,糖基化程度很高,而糖基的存在使 EPO 在体内有更长的半衰期以及和受体有较高的亲和力。人类 EPO 基因定位于 7 号染色体长臂 21 区。人与猴和鼠的 EPO 的氨基酸序列分别有 92%、80% 的相同序列,这反映了物种间 EPO 的交叉反应性。成年个体 EPO 主要由肾皮质或髓质外带的小管旁细胞合成

分泌,而在胚胎早期,主要由肝脏合成 EPO。

EPO 是通过幼红细胞表面的 EPOR 来促进红细胞系统的增殖和分化的。EPOR 属于细胞因子受体家族中的红细胞生成素受体超家族。EPOR 在细胞膜外的结构域与 EPO 在氨基酸序列上有较高的同源性,在分子结构上也较为相似。根据 cDNA 分析,该受体是一个相对分子质量为 55 000,508 个氨基酸残基的跨膜蛋白,其中包括一个 24 个氨基酸信号肽,226 个氨基酸的外侧片段,22 个氨基酸的跨膜片段和一个 236 氨基酸的胞浆区。当 EPO 与 EPOR 结合后引起 EPO 受体二聚化,并通过磷酸化作用激活 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) (一种 EPO 受体细胞内部分相关的酪氨酸激酶)相关性受体,使受体胞内结构域特异性酪氨酸磷酸化成为细胞内信号转导通路上信号分子的作用位点^[1]。

2 EPO 介导的中枢神经系统信号转导机制

2.1 Janus 激酶-信号转导和转录激活子 (Janus kinase-Signal transducer and activator of transcription, JAK-STAT) 途径 EPO 与 EPOR 结合后,EPOR 二聚化,使 JAK2 激活,激活的 JAK2 使信号转导和转录激活子 5 (Signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) 磷酸化后激活,然后迅速转移到细胞核内,与相应 DNA 序列结合,调节基因表

收稿日期 2006-08-17

作者简介 张俊河(1979-),男,河南商丘人,学士,助教,从事生化专业方面的研究。

达。同时 JAK2 磷酸化与 EPO 受体结合 STAT5 ,并使 STAT5 与受体脱离 ,两分子 STAT5 通过其 Src 同源片段 (Src homology 2 ,SH2)酪氨酸磷酸区之间的互补作用形成二聚体^[2]。STAT5 二聚体移至细胞核 ,并激活相应的靶基因^[3]。虽然 JAK-STAT 途径大部分研究集中在红系祖细胞中 ,但近来的研究表明该途径也存在于中枢神经系统。故 JAK-STAT 途径可能参与了神经细胞的缺血脑保护。

2.2 磷脂酰肌醇-3-激酶 (Phosphatidylinositol 3-kinase PI3-K) 途径 当 EPO 受体和磷酸化的胰岛素受体底物 (insulin receptor substrate-2 ,IRS-2)作用激活 PI3-K^[2] ,活性 PI3-K 通过 SH2 区与活化的 EPO 受体连接 ,并且这种激酶激活的模式无须 PI3-K 与 EPO 受体的酪氨酸间的相互作用。当 EPO 与神经元细胞的 EPOR 结合后 ,会导致 EPOR 相关的 JAK2 激活 ,导致下游的信号转导途径激活 ,包括 PI3-K 和 STAT5 ,进而刺激靶细胞增生 ,抑制神经元细胞凋亡。

2.3 核转录因子 (Nuclear transcription factor-kappa B ,NF- κ B) 途径 NF- κ B 是一种转录因子 ,可被多种细胞外刺激活化 ,参与细胞凋亡、炎症等多种过程中的基因调控^[4-7]。未被激活的 NF- κ B 与其抑制蛋白 I- κ B 家族的成员结合 ,以复合物的形式存在于胞浆中 ,被激活后的 I- κ B (inhibitor κ B)磷酸化并与 NF- κ B 解离 ,活化了的 NF- κ B ,最终激活神经保护因子的 NF- κ B 依赖性转录 ,包括 B 细胞淋巴瘤/白血病-X (Bcelllymphoma/leukemia- X ,Bcl-X) ,发挥其抗凋亡作用^[8]。Digicaylioglu 等^[9]证明 ,当神经元存在 EPO 时 ,可激活 JAK2 ,JAK2 能促进 NF- κ B 释放 ,最终 NF- κ B 移行入细胞核激活靶基因。

3 EPO 在脑组织中的表达及作用

除造血细胞外 ,EPO 对于胚胎期神经系统的发育有促进作用 ,对神经组织损伤也有重要的保护作用。近年来大量研究表明 ,神经组织也有 EPO 和 EPOR 的表达。Bernandin 等^[10]在大鼠大脑中动脉栓塞模型中证实 ,栓塞前 24 h 脑室内注射 EPO 能有效减少梗死面积 47%。同时 ,还发现 EPO 能维持梗死后大鼠的定向力和学习能力 ,明显改善梗死区的神经功能。通过海马神经元和皮质神经元等体外神经元培养 ,进一步证明 ,在缺氧、谷氨酸中毒、血清缺乏等多种代谢性应激中 ,EPO 均有明显的神经元保护作用。Siren 等^[11]运用免疫组化方法观察到 ,人脑组织缺血缺氧时也可见 EPO 和 EPOR 的表达 ,并且进一步证实 ,EPO 在代谢异常情况下具有神经保护作用 ,在正常生理条件下具有促进神经元增生肥

大 ,树突增多 ,功能增强 ,分化良好等一系列营养作用 ,而且 EPO 对于神经元的保护是一种直接作用 ,不必依赖于神经胶质细胞。在原代培养的星形胶质细胞和神经元体系中 ,Ruscher 等^[12]研究显示 ,缺氧可致星形胶质细胞中缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor-1 ,HIF-1)激活 ,进入细胞核 ,引起 EPO 的转录、表达增加 ,并以旁分泌的形式作用于神经元细胞膜上的 EPOR ,发挥神经细胞保护作用。在 7 d 新生鼠脑局部永久缺血的模型中发现 ,缺血 6 ~ 12 h 后脑组织 EPOR 蛋白明显升高 ,EPOR 阳性细胞也明显增加 ,24 h 后检测发现 EPOR 阳性细胞为神经元细胞、小胶质细胞或巨噬细胞 ,但无阳性的星形胶质细胞 ,提示缺血激活了 EPOR 的表达^[13]。上述实验表明 ,EPO 是中枢神经系统中的内源性细胞因子 ,通过神经元和胶质细胞的旁分泌作用 ,作为一个神经递质在大脑的发育过程中起调节和调控作用。

4 EPO 对脑损伤保护作用的机制

4.1 抗兴奋性氨基酸毒性作用 脑缺氧缺血后 ,能量代谢障碍可导致谷氨酸大量释放 ,通过 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate ,NMDA)受体及 α -氨基羟甲基异恶唑丙酸 (amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid ,AMAP)受体引起兴奋性氨基酸毒性 ,致神经元死亡。Kawakami 等^[14]发现 ,在缺氧情况下 ,大量谷氨酸从体外培养的小脑神经元颗粒中释放出来 ,加入重组红细胞生成素 (rEPO)后 ,谷氨酸产生减少且神经元数目明显增加。他们继续用 EMPI (EPO mimetic peptide I ,EPOR 的合成肽拮抗剂)与 EPOR 结合 ,虽然其结合位点与 EPO 的完全不同 ,但它也能减少谷氨酸释放。EPO 和 EMPI 都可激活与 EPOR 相连的 JAK2 ,因此推测 ,EPO 减少神经元的死亡可能通过激活 EPOR 和 JAK2 来抑制谷氨酸释放这一途径来实现。

4.2 抗细胞凋亡作用 EPO 对损伤造成的神经细胞凋亡有很强的阻断作用。Siren 等^[15]阻塞大鼠中动脉制成缺血模型后立即腹腔注射 5000 IU \cdot kg⁻¹ rEPO 24 h 后观察到鼠脑组织梗死面积显著减少 ,而且由末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记的凋亡神经元几乎很少。Yu 等^[16]的研究表明 ,缺乏 EPOR 的小鼠胚胎在经过 24 h 的缺氧暴露后 ,在肝脏、心内膜、脑部发生了广泛的细胞凋亡 ,而存在 EPOR 表达的神经元在 EPO 的刺激下能使 EPOR 的表达进一步增强 ,EPO 增强了细胞增生和降低了细胞凋亡 ,表明 EPO 于胚胎脑中有防止细胞凋亡的功能。Digicaylioglu 等^[17]认为 ,被 EPOR 激活后的双激酶-2 能够使 NF- κ B 的抑制剂磷酸化而

发生退化,结果 NF- κ B 被激活进入细胞核与 DNA 结合,转录依赖 NF- κ B 的抗细胞凋亡的基因。

4.3 增加细胞钙内流 大量证据表明细胞内 Ca^{2+} 能调控细胞凋亡。Koshimura 等^[18]认为 EPO 在脑内的许多功能由钙离子通道介导。将 rEPO 加入 PC₁₂ 细胞的培养液中,rEPO 与 PC₁₂ 细胞表面的 EPOR 结合使 PC₁₂ 细胞去极化,细胞外标记的⁴⁵Ca²⁺ 进入 PC₁₂ 细胞内,⁴⁵Ca²⁺ 的短暂内流使 PC₁₂ 细胞有丝分裂原蛋白激酶及酪氨酸羟化酶活性增强,促进多巴胺释放,从而有利于神经元的存活。但这些作用可被钙离子拮抗剂尼莫地平和抗 EPO 抗体所取消。这提示 EPO 提高细胞生存能力和其他细胞功能是通过激活钙离子通道而起作用的,说明钙离子在 EPO 激发的信号通路中起着重要的第二信使作用,但其具体机制尚不清楚。目前认为 EPO 发挥其神经保护作用可能通过激活钙通道作为始动因素的^[19]。

4.4 抑制 NO 的合成 虽然 EPO 和 NO 之间的信号通路尚不清楚,但目前研究认为 EPO 通过调节 NO 的合成起到保护性作用。脑缺血缺氧时,谷氨酸大量释放,激活 NMDA 受体,引起细胞内 Ca^{2+} 增加,而 Ca^{2+} 与钙调蛋白结合激活一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS),使 NO 产生增加。Galapai 等^[20]利用蒙古鼠双侧颈动脉结扎 5 min 后进行灌注,观察到缺血后腹腔或脑室内注射 rEPO,能降低缺血后脑内丙二醛(Malondialdehyde, MDA)水平,抑制 NO 合成,减轻脑水肿以及减少海马 CA₁ 区神经元丢失。Genc^[21]用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶诱导 C57/BL 鼠制成帕金森病模型,给予 rEPO 后发现,黑质和纹状体中 NO 含量升高且鼠的成活率明显高于未给予 rEPO 的对照组。Genc 认为 EPO 的神经保护作用是由于促进了 NO 的合成。目前认为 NO 在脑缺血缺氧中具有神经保护和神经毒性两种作用,所以 EPO 可能是通过调节 NO 合成来发挥其神经保护作用的。

4.5 其他抗损伤保护机制 除了以上几种机制外,EPO 还可能具有其他抗损伤作用机制:EPO 可以调节神经细胞生成,培养的前脑神经干细胞经过中毒缺氧后,神经元数量增加 2~3 倍,且上述作用能被 EPO 的抗体所中和,提示 EPO 具有调节神经细胞生成的作用^[22];在大鼠的卒中模型中观察到,EPO 可通过促进血管内皮生长因子和脑源性神经营养因子,使卒中后脑组织出现血管新生和神经细胞再生,有利于脑功能恢复^[23],这提示 EPO 具有神经营养作用,EPO 还可能作为促血管生成因子,直接作用于血管内皮细胞,促进血管新生和侧支循环形成^[24],这提示 EPO 具有促进血管生成的作用。

5 展望

随着对 EPO 研究的深入,人们对其认识已经由单一的促进造血功能转变为是存在于多种组织中具有多种作用的细胞因子,EPO 通过与其表面的受体相结合,启动下游级联信号转导进而产生生物学效应。大量实验证明 EPO 有脑保护作用,这为 EPO 应用于临床提供了理论依据,目前在动物中已开展了许多 EPO 的治疗性实验。Wang 等^[25]近来首次尝试用缺血缺氧性脑损伤幼鼠一次性静脉注射含有 EPO 的 cDNA 的质粒 DNA,发现在注射 1 d 后 EPO 蛋白达到高峰,且能维持 14 d,并能阻止海马神经元的凋亡,证明 EPO 能对缺血缺氧性脑损伤起有效的治疗作用。Juul 等^[26]应用幼年 and 成年灵长类动物实验后发现,动物可以耐受全身应用大剂量的 rEPO,在注射 rEPO 2~2.5 h 后,脑脊液中 EPO 的浓度可达到有效神经保护浓度。尽管 EPO 的神经保护作用机制尚未完全阐明,有待进一步研究,但这些实验结果给临床上治疗各种脑损伤提供了一个新的选择。作者相信,EPO 具有广阔的临床应用前景。

参考文献:

- [1] Mulcahy L. The Erythropoietin receptor [J]. *Semin Oncol* 2001, 28(2 Suppl 8):19-23.
- [2] 肖雨龙,翟振艳,袁伟杰. 红细胞生成素的信号转导研究进展 [J]. 中国病理生理杂志 2003, 19(7):996-999.
- [3] 李中春,陈怀红. 促红细胞生成素对缺血性脑损伤保护作用的研究进展 [J]. 全国医学临床与教育 2005, 3(1):51-54.
- [4] 徐自超,王淑秀. 核转录因子在动脉粥样硬化形成中的作用 [J]. 新乡医学院学报 2006, 23(3):201-204.
- [5] 武志远,曾建生,樊寻梅. 小剂量氯化可的松对脓毒症大鼠海马组织核因子 κ B 表达的影响 [J]. 实用儿科临床杂志 2006, 21(6):331-333.
- [6] 刘国庆,王永玲,高建芝. 核因子 κ B 在脓毒症大鼠肾细胞凋亡中的作用 [J]. 新乡医学院学报 2006, 23(4):344-345.
- [7] 刘建民,封琳,刘卫梅,等. 核因子- κ B p65 和 VEGF 在胰腺癌中的表达及意义 [J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(5):464-466.
- [8] Senzer N. Rationale for a phase III study of erythropoietin as a neurocognitive protectant in patients with lung cancer receiving prophylactic cranial irradiation [J]. *Oncology*, 2002, 29(6):47-52.
- [9] Bittorf T, Buchse T, Sasse T *et al.* Activation of the transcription factor NF- κ B by the erythropoietin receptor: structural requirements and biological significance [J]. *Cell Signal*, 2001, 13:673-681.
- [10] Bernaudin M, Marti HH, Roussel S *et al.* A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice [J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 1999, 19(6):643-651.
- [11] Siren AL, Knerlich F, Poser W *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain [J]. *Acta Neuropathol (Berl)* 2001, 101(3):271-276.

- [12] Ruscher K ,Freyer D ,Karsch M *et al.* Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain :evidence from an in vitro mode[J]. *Neurosci* ,2002 22(23) :10 291-10 301.
- [13] Wen TC ,Rogido M ,Genetta T *et al.* Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain [J]. *Neurosci Lett* ,2004 355(3) :165-168.
- [14] Kawakami M ,Sekeguchi M ,Sato K *et al.* Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia[J]. *J Boil Chem* ,2001 276 (42) 39 469-39 475.
- [15] Siren AL ,Fratelli M ,Brines M *et al.* Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 (7) 4 044-4 049.
- [16] Yu X ,Shacka JJ ,Eells JB *et al.* Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development[J]. *Development* ,2002 , 129 505-516.
- [17] Digiacyioglu M ,Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves Cross-talk between JAK2 and NF-kB signaling cascades[J]. *Nature* 2001 412(6847) 641-647.
- [18] Koshimura K ,Murakami Y ,Sohmiya M *et al.* Effects of erythropoietin on neuronal activity[J]. *J Neurochem* ,1999 72(6) 2 565-2 572.
- [19] Gene S ,Koroglu TF ,Gene K. Erythropoietin and the nervous system[J]. *Brain Res* ,2004 1 000 :19-31.
- [20] Calapai G ,Marciano MC ,Corica F *et al.* Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation [J]. *Eur J Pharmacol* 2000 401(3) 349-356.
- [21] Gene S ,Kuralay F ,Gene K *et al.* Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1 ,2 ,3 ,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production[J]. *Neurosci Lett* ,2001 298(2) :139-141.
- [22] Shin go 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 9 733-9 743.
- [23] Wang L ,Zhang Z ,Wang Y *et al.* Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats[J]. *Stroke* 2004 35(7) :1 732-1 737.
- [24] Rabatti D ,Vacca A ,Roccaro AM *et al.* Erythropoietin as an angiogenic factor[J]. *Eur J Clin Invest* 2003 33 891-896.
- [25] Wang CH ,Liang CL ,Huang LT *et al.* Single intravenous injection of naked plasmid DNA encoding erythropoietin provides neuroprotection in hypoxia-ischemia rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun* ,2004 314(4) :1 064-1 071.
- [26] Juul SE ,McPherson RJ ,Farrell FX *et al.* Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin[J]. *Biol Neonate* , 2004 85(2) :138-144.

(本文编辑 徐自超 英文编辑 徐自超)

耳蜗血管纹内皮细胞的机械敏感性离子通道

陈 浮 , 苏纪平

(广西医科大学附属第一临床医学院耳鼻咽喉头颈外科 广西 南宁 530021)

摘要：机械敏感性离子通道主要由3大膜蛋白家族构成，其中有多种已证实在血管纹有表达，因血管纹解剖结构的特殊性，作者推测机械敏感离子通道对其有重要作用，对2者联系的进一步研究将揭示内耳学迷路屏障的多种生理和病理过程。

关键词：耳蜗 血管纹 机械敏感性离子通道

中图分类号：R339.16 文献标识码：A 文章编号：1004-7239(2007)02-0207-04

Stretch-activated channels in endothelial cells of stria vascularis

CHEN Fu ,SU Ji-ping

(Department of E. N. T the First Affiliated Hospital of Clinical Medicine ,Guangxi Medical University ,Nanning 530021 ,China)

Abstract : Stretch-activated channels were composed of three major membrane protein families ,transient receptor potential 2 pore domain K⁺ and the epithelial Na⁺ channels have been shown to form stretch-actiated channels in animal cells and most of them have been proved to exist in stria vascularis. Stretch-activated channels should play an important role in the functions of stria vascularis and the relation between them would further reveal multiple physiological and pathological process in labyrinth of inner ear.

Key words : cochlea ,stria vascularis ,stretch-activated channel

收稿日期 2006-11-13

基金项目 广西科学基金资助项目(桂科回0342008) 国家教委留学回国人员基金973#

作者简介 陈 浮(1980-) ,女(回) ,河南人 ,硕士研究生 ,主要从事内耳机械敏感离子通道方向研究 ;苏纪平(1962-) ,男(壮) ,广西人 ,主任医师 ,博士 ,主要从事耳科临床及基础研究 ,主持了一项厅级和多项院级课题的科研工作 ,多篇文章为SCI收录。