

促红细胞生成素对视神经视网膜的保护作用

李丹,段宣初

Neuroprotective properties of erythropoietin on neuro-retinopathy

Dan Li, Xuan-Chu Duan

Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central-South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Xuan-Chu Duan, Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central-South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. duanxchu@yahoo.com.cn

Received: 2006-02-18 Accepted: 2006-07-31

Abstract

Erythropoietin (EPO) is a hematopoietic growth factor and cytokine which stimulates erythropoiesis. In recent years, EPO has been shown to have important nonhematopoietic functions in the nervous system. A wide variety of experimental studies have shown that EPO and its receptor (EPOR) are expressed in the nervous system and EPO exerts remarkable neuroprotection in cell culture and animal models of nervous system disorders. The apoptosis of retinal ganglion cell (RGC) and photoreceptor cell are common causes of reduced visual function in several ocular diseases, including glaucoma, retinal detachment, retinal pigmental degeneration, etc. EPO may be a potent neuroprotective therapeutic agent for the treatment of ocular disease that are characterized by RGC and photoreceptor cell death. In this review, we summarized the current knowledge on the neurotrophic and neuroprotective properties of EPO, the mechanisms by which EPO produces neuroprotection and the signal transduction systems regulated by EPO in the nervous system, which may represent the potential basis for future strategies against neuronal injury.

KEYWORDS: erythropoietin; neuroprotection; apoptosis; inflammation; signal transduction; ocular disease; glaucoma; RGCs

Li D, Duan XC. Neuroprotective properties of erythropoietin on neuro-retinopathy. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)*, 2006;6(4): 860-864

摘要

促红细胞生成素 (Erythropoietin, EPO) 主要作用于骨髓巨核前体细胞, 刺激红系造血祖组织及早幼红细胞形成成熟

作者单位: (410011) 中国湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院眼科

作者简介: 李丹, 女, 硕士, 中南大学湘雅二医院眼科。

通讯作者: 段宣初. duanxchu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-02-18 修回日期: 2006-07-31

860

熟的红细胞集落。近年来, 大量的研究显示 EPO 和 EPO 受体在神经系统上有功能表达, 在体外培养及动物试验中都显示了显著的神经保护功能。在眼科, 青光眼、视网膜脱离、视网膜色素变性等疾病的共同病理机制是视网膜神经节细胞、光感受器细胞等神经元的凋亡, 最终导致视力的丧失。因此, EPO 的神经保护作用对治疗这些疾病有一定的实际意义。现总结了 EPO 的神经保护性质分子机制及信号传导途径, 探讨 EPO 用于青光眼神经保护治疗的基础和可能性。

关键词: 促红细胞生成素; 神经保护; 凋亡; 信号转导; 青光眼; 视网膜神经节细胞

李丹, 段宣初. 促红细胞生成素对视神经视网膜的保护作用. 国际眼科杂志, 2006;6(4):860-864

1 EPO 的生物功能

促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是分子量约为 30~39ku 的糖蛋白, 以前认为它主要是调节红细胞的生成的造血细胞因子, 产生于胎儿的肝脏和成人的肾脏。EPO 和它的受体 (erythropoietin receptor, EPOR) 主要存在于骨髓的造血干细胞并刺激它向红细胞分化。EPO 的造血作用主要是抑制红系前体细胞的凋亡, 促进它向红细胞的增殖和分化^[1]。红细胞生成可以进一步改善组织的氧供, 同时, 组织氧供又作为一种关键的激素反馈机制, 是 EPO 产生和造血功能的主要调节器。

EPO 在 1985 年从再生障碍性贫血患者的尿液中分离出来, 并成功克隆^[1], 在哺乳动物细胞中获得表达。不久, 重组 EPO 获得成功, 在晚期肾病患者中进行临床试验及评估。1989 年美国食品与药品管理局 (FDA) 正式批准 EPO 在临床应用。现在它已经广泛应用于肾衰、癌症、早产、慢性炎症和 HIV 感染所致的贫血^[1]。

很多年来, EPO 一直被认为只能作用于红系前体细胞, 然而, 许多研究显示 EPO 除了造血功能外, 还有许多潜在作用, 证据之一就是 EPO 和它的受体在不同组织中都有表达, 包括神经系统^[2-4]。EPO 也并不只是只由胎儿肝脏和成人肾脏分泌产生, 在神经系统内, 不同的细胞形态 (包括神经元、胶质细胞和内皮细胞) 都产生和表达 EPO 和 EPOR。Masuda 等首先在鼠胚胎 18d 脑组织的体外培养中用 Southern 杂交和免疫化学染色方法发现了神经细胞自身分泌的 EPO, 且与肾源性 EPO 结构相同, 在脑组织中同样有 EPO 存在并对神经元有旁分泌作用。近 10a 来, 大量的实验研究显示 EPO 不论在细胞培养和神经系统疾病的动物模型中都显示了显著的神经保护作用。

2 EPO 和 EPOR 在神经系统中的表达

以前认为 EPO 只作用于造血系统, 然而, 目前的研

究显示在许多人类和动物模型中器官组织细胞都有功能性 EPOR 的存在,这些非造血细胞包括内皮细胞^[6,6]、肠上皮细胞^[7,8]、肌肉^[9-12]、胎盘组织,以及神经系统中神经元和非神经元细胞。由于 EPO 是通过活化特定的 EPOR 而发挥作用。弄清 EPOR 在中枢神经系统中的分布有助于我们了解 EPO 的生物功能。EPO 和 EPOR 在啮齿类、灵长类及人类的神经系统中都有功能性表达,脑源性 EPO 和它的受体在结构、功能及调节与其他组织分泌 EPO 的差别已经明确^[13],脑源性 EPO 与血浆 EPO 相比,脑源性 EPO 更小更有活性,这种区别具体机制不清。

2.1 鉴定 EPOR 的方法 ①放射性碘化 EPO 进行结合试验^[3]。②逆转录聚合酶链式反应分析 (RT-PCR)。③细胞免疫染色^[14],EPOR 受体在啮齿类、灵长类及人类的神经系统中已被鉴别出来,集中在原代神经元细胞系和胶质细胞上。此外,神经元和胶质细胞对 EPO 的免疫组化反应阳性^[14],提示在神经系统中这些细胞参与了 EPO 的合成和生产。

2.2 EPOR 在神经系统中的表达 在活体外试验中发现表达 EPOR 的神经元和胶质细胞有:大鼠海马和大脑皮质神经元^[14];大鼠海马神经元^[15];P₁₂ 大鼠嗜铬细胞瘤细胞^[16];SN6 间隔胆碱能细胞^[17];人类神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞的培养物^[4];大鼠的少突胶质细胞^[18];Wistar 大鼠视网膜的外丛状层、光感受器内节、神经节细胞层、内丛状层^[19];大鼠视网膜的神经节细胞^[20]。EPOR 在原位的表达:成年小鼠的海马、内囊、皮质、中脑^[3];灵长类动物大脑海马、扁桃体、颞侧皮质^[21];人类大脑海马、扁桃体、小脑、颞侧皮质^[21];妊娠前 6mo 的脊髓组织^[18];人类胎儿^[22];大鼠视网膜神经节细胞胞体和树突、内核层、外核层^[23]。

3 神经系统中 EPO 和 EPOR 表达的调节

神经系统包括大脑,EPO 基因表达主要受缺氧诱导因子 1 (HIF-1 调节 EPO 表达的转录因子)的调节,HIF 受许多应激原而激活,包括缺氧^[1],在大脑和肾脏最明显,而在子宫 EPORmRNA 只有在雌激素存在下才能表达。因此,EPO 是以组织特异性的方式表达,有证据表明星形胶质细胞 EPO 的表达在 mRNA 水平上主要受缺氧水平的调节,缺氧可以大大加速其表达^[16]。在海马神经元培养中,缺氧可以诱导 EPO 和 EPORmRNA 的表达^[24]。大鼠神经元培养中缺氧大大促进 EPORmRNA 的表达,而亚胺环己酮(一种蛋白合成抑制剂)可以完全阻断这种作用^[25]。所以,类似于肝癌细胞系和肾脏中已被鉴别出来的一种氧传感系统,可能控制了星形胶质细胞和神经元表达 EPORmRNA。在活体内缺氧也可诱导 EPORmRNA 的表达,缺氧条件下,大鼠海马区的 EPORmRNA 的表达也增加^[25],EPO 增量调节的时间在脑和肾脏不同,在鼠的肾脏持续缺氧 2h,EPORmRNA 表达达高峰,8h 后下降至最高值的 30%。而相反,在脑内缺氧刺激 4h EPORmRNA 表达达顶峰,并持续 24h^[27]。薛文等^[26]发现 EPO 在无损伤脊髓中即有少量表达,缺血再灌注损伤后 8h 表达显著上调。在缺氧预处理的条件下,大鼠视网膜 EPO 表达增加^[29]。

3.1 其他影响神经系统中 EPO 和 EPOR 表达的因素 缺氧可能不是刺激大脑 EPO 产生的唯一因素,另外一些代

谢紊乱,如低血糖或强烈的神经元去极化产生的线粒体活性氧簇,都可以通过 HIF-1 的活化增加脑内 EPO 的表达^[27]。胰岛素和胰岛素样生长因子可以刺激培养的星形胶质细胞表达 EPORmRNA 并呈剂量依赖性。胰岛素和胰岛素样生长因子在中枢神经系统内大量表达,但它对脑内 EPO 产生的刺激作用的生理重要性并不清楚^[2]。在活体外,在暴露炎症因子如白介素-1 β 、白介素 6 及肿瘤坏死因子 (TNF- α)^[4]后,星形胶质细胞 EPO 表达下降。在缺血性视网膜病变(如增殖型糖尿病性视网膜病变和视网膜分支静脉闭塞等)玻璃体内 EPO 的浓度大量增加^[30],研究者认为对缺血性视网膜病变来说,EPO 可能是一种神经保护因素。

3.2 神经系统受损后 EPO 和 EPOR 表达的变化 缺氧可以诱导 EPO 和 EPOR 表达增加,提示 EPO 在中枢神经系统可能作为一种神经营养因子和神经保护因子,特别是在神经损伤的情况下例如缺氧、缺血或大脑出血等情况。有报道在局部缺血损伤下大脑组织 EPOR 基因表达增加,大脑中动脉闭塞后的缺血半影区 EPOR 表达增加^[31]。在正常人的大脑,EPOR 免疫反应主要在神经元^[32]。在急性缺血损伤中,血管、神经元、星形胶质细胞 EPOR 表达上调;在陈旧性缺血性梗塞中,有活性的胶质细胞表达仍然增加(中风后 >18d);在新鲜的缺血性梗塞中,血管内皮细胞显示 EPO 免疫反应;在微血管和神经纤维上显示了 EPOR 免疫反应性。在人类缺血缺氧性脑损伤中 EPOR/EPOR 大量增加,强调了他们是一种内源性的神经保护系统。另外一些应激原如癫痫发作,也可以刺激大脑微血管内 EPOR 表达大量增加^[33]。

4 EPO 的神经保护作用

从神经心理测试和电生理评估情况看,重组 EPO 的治疗有益于大脑功能恢复^[34]。这种改善与红细胞增加,脑内缺氧状态得到纠正有关。有报道称由于贫血改善,红细胞容积恢复正常,神经认知能力得到进一步的改善^[35]。同时,已有活体及体外培养试验显示 EPO 可能有直接的神经营养和神经保护作用。

4.1 活体外试验 越来越多证据表明,与其它血细胞生成因子一样,EPO 与中枢神经系统有联系,它们作用于中枢胆碱能神经元,作为一种神经营养因子,影响其分化、存活和再生^[36]。EPO 保护神经元初级培养物免受谷氨酸神经毒性作用,并且呈剂量依赖性。细胞预处理 8h 后,保护作用达到最高值,这提示 RNA 和蛋白质合成对于这种保护是必须的^[14],并且用可溶性的 EPOR 中和内源性的 EPO 后,可以阻止 EPO 对谷氨酸毒性的保护作用。EPO 分子神经营养氨基酸序列(17 分子)已被分离出来,这部分序列在可以增加大鼠 NSZOY 和人类 SK-N-MC 成神经瘤细胞株的胆碱乙酰基转移酶的活性,阻止细胞死亡,但并不刺激老鼠原代脾细胞株或红细胞生成细胞株的增殖^[37]。如果加用 EPOR 胞外域抗体的话,可以阻断这种作用,由此证明此作用是 EPOR 调节的,EPO 能保护培养的神经元细胞免受死亡,但不能保护神经胶质细胞^[38,39]。EPO 对人神经母细胞瘤细胞有相同作用^[18],EPO 可以刺激啮齿类动物皮质神经元的存活能力^[40]。还可以促进大鼠少突神经胶质细胞的分化和成熟^[18]。这些发

现说明 EPO 可能影响少突胶质细胞,使之促进正常或受损的成熟 CNS 髓鞘的修复。在视网膜神经节细胞 (Retinal ganglion cells RGCs) 培养中,证明 EPO 可以保护 RGCs 免受谷氨酸和氧化亚氮的细胞毒性作用^[19],使用 EPO 可以阻止神经营养因子去除后的免疫纯化的 RGCs 的死亡^[23],EPO 还可以促进 RGCs 的生长。

4.2 活体内试验 已经有许多神经系统损伤的模型 (小鼠、沙土鼠、兔等) 证明了 EPO 作为神经保护剂的有效性。包括大脑和脊髓缺血模型^[41-49]、蛛网膜下腔出血模型^[46,50]等。由于视网膜是中枢神经系统的延伸,目前研究认为 EPO 对眼的视网膜也有保护作用。

通过升高眼内压而引起暂时性的视网膜缺血,在缺血前或缺血后立即全身给予 EPO 治疗可以减少组织病理学损伤和细胞凋亡,通过视网膜电流图检查发现还可以促进其功能恢复。用可溶性的 EPOR 中和内源性的 EPO 后,反而加剧视网膜缺血损伤,这说明 EPO/EPOR 系统对于缺血损伤后神经元的存活和恢复有重要作用。在成年鼠视网膜光损伤模型中,全身应用 EPO 可以通过血-视网膜屏障并阻止细胞凋亡^[51]。

在青光眼和一些眼病中,RGCs 的死亡,导致视功能的进行性丧失,神经保护治疗对于阻止 RGCs 的死亡就显得相当重要,在轴索切断后的大鼠视神经损伤模型中,EPO 可以提高 RGCs 的存活率^[23]。在大鼠青光眼模型中,玻璃体腔内注射 EPO,与生理盐水及空白对照组相比,RGCs 的数目没有明显的减少^[52]。把大鼠的视网膜放在不同浓度的葡萄糖液中培养发现,EPO 在低浓度糖中对神经元有保护作用,在高浓度糖中没有作用,作者推测糖尿病患者中的 EPO 作用减弱可能参与了糖尿病视网膜病变的发生^[53]。也有研究认为 EPO 对光诱导的或是先天性视网膜变性动物模型 (rds) 有保护作用^[54]。在缺氧情况下,EPO 可以减少光感受器细胞的凋亡^[29]。Junk 证明 EPO 通过抗凋亡机制可以对 RGCs 缺血再灌注损伤有保护作用。

不过,EPO 对视网膜的保护作用也不是万能的,有研究^[31]认为 EPO 对遗传性色素性视网膜变性没有保护作用,并认为这可能是急性光诱导的光感受器细胞的死亡机制与遗传性色素性视网膜变性不同所致。

5 神经保护的作用机制

EPO 的神经保护作用的机制并不完全清楚,有多种机制可以解释 EPO 对神经元的保护作用。EPO 受体属于细胞因子受体超家庭成员,这些受体本质上都与信号的转导有关,EPO 在神经系统内的传导机制可能与红细胞生成的机制相同,EPO 与 EPO 受体结合使受体形成二聚体,JAK2 发生自身磷酸化反应和受体活性,JAK2 的激活导致几个下游的信号转导途径被激活,包括 Ras-MAPK、PI(3)K 和 STAT-5。EPO 受体受刺激通过网络效应可引起相应靶细胞的增殖,抑制凋亡,以及分化作用,受体通过 SHP-1 脱磷酸化而失活^[55]。这些途径对 EPO 的神经保护作用也是关键的。因此 MAPK 和 PI(3)K 的特异性抑制剂能明显减弱 EPO 对缺氧导致神经细胞死亡的保护作用,EPO 活化 EPOR 增强 MAPK 磷酸化,诱导 JAK-2 酪氨酸磷酸化^[56],另外一些生长因子 (如 BDNF 和 VEGF)

的细胞保护作用也牵涉到这些信号机制。神经元内 JAK2、STAT-5 和 NF κ B 信号转导系统的相互作用最近已被证明^[57]。EPO 能产生剂量依赖性的核内 NF κ B 升高,胞浆内 NF κ B 降低,这与它的神经保护作用相一致,JAK2 磷酸化对 NF κ B 的核转运是必需的,对 EPO 的神经保护作用也是必需的^[57],但是在红细胞内 EPO 所诱导的 NF κ B 激活并不依赖 JAK2 途径。JAK2 和 NF κ B 的信号转导系统的相互影响已有报道^[57],通过这条途径,EPO 可以防止兴奋性中毒和一氧化氮诱导的神经元的凋亡。通过 JAK-2 显性负相过度表达或 I κ B 抑制剂或 NF κ B 易位抑制剂可以阻断 EPO 的神经保护作用,神经元内 NF κ B 通过 Akt-1 的活化,Bad 磷酸化和 Bcl-XL 上调而起到抗凋亡作用,Akt 也被 PI(3)K 激活,而 MAPK 和 STAT-5 使 Bcl-XL 上调。Akt 活化后稳定线粒体膜电位阻止细胞色素 C 的释放,从而保护神经元^[58],细胞色素 C 从线粒体释放可使 Caspase 家族活化,使细胞死亡,DNA 断裂,神经膜外部分的磷脂酰丝氨酸暴露。在一个氧自由基损伤模型中,EPO 通过增加 Akt-1 活性,进而调节线粒体膜电位细胞色素 C 释放和 Caspase-1,3,8 活性来防止神经元膜上磷脂酰丝氨酸的暴露和 DNA 断裂^[15]。EPO 还可调节促进抗凋亡分子的基因表达,从而起到神经保护作用^[59],在一些试验模型中,EPO 需要一个较长的时间来诱导基因表达程序。近来,有研究指出,EPO 可以促进 BDNF 的 mRNA 表达和具有生物活性的 BDNF 产生 (在初级海马神经元培养),从而长期活化特异性受体 TrkB,当 BDNF 被特异性抗体中和后,可以降低 EPO 的神经保护和 TrkB 磷酸化作用,这证明 BDNF 和 TrkB 也参与 EPO 的神经保护作用,大鼠脑室内注入 EPO 也可以诱导 BDNF 的表达^[60]。

EPO 可以促进神经元内 Ca²⁺ 增加,这是 EPO 神经保护作用很重要的步骤,而电压依赖式 Ca²⁺ 通道的活化、Ca²⁺ 敏感转录因子的募集可以诱导神经元 BDNF 的表达。实际上,EGTA (钙离子螯合剂) 或钙离子通道抑制剂可以阻断 EPO 的保护作用 (在谷氨酸毒性^[60]或生长因子去除的情况^[14])。细胞内 Ca²⁺ 增加可以调节 NF κ B、PI(3)/Akt 和 MAPK 和 STAT-5 的活性。EPO 的另外一个神经保护的特点就是抑制白细胞的浸润和抑制促炎症细胞因子,如 TNF IL-6 和 MCP-1^[61],由于炎症可以使神经元进一步损伤。因此,EPO 的神经保护作用也可能是减轻炎症反应所致,然而,在人类单核细胞和老鼠神经胶质细胞的体外培养中,EPO 并不能抑制肿瘤坏死因子 (TNF) 的产生^[61]。在选择性神经毒剂处理的胶质细胞和神经元混合培养物中,EPO 减少了 TNF- α 的产生,在培养基中,胶质细胞可被濒死神经元活化^[62],这说明 EPO 具有不直接的抗炎活性是由于它减少了神经元的死亡所致。

另外,EPO 的神经保护作用还包括促进血管生成^[63]和神经营养^[64],及促进神经生长的作用^[65]。

在视网膜神经节细胞培养中,EPO 神经保护机能可能与上调 Bcl-2 和 Bcl-XL 基因有关^[19]。

另外有一些研究对保护机制有不同意见,在 tg21 转基因鼠轴索切断模型的研究发现 tg21 与野生型相比较,

前者对 RGCs 有保护作用, 研究还发现起保护作用的可能是 ERK-1/-2 和 AKt 及下降的 Caspase-3, 与 STAT-5 和 Bcl-XL 无关。可能确切的机制还需要进一步的研究。

6 总结

从本文综述的细胞培养和动物实验的结果看, 可以肯定 EPO 有神经保护作用。在各种原因引起的中枢神经系统疾病中, 神经保护就是一个阻止神经元的凋亡的工具, 是一种新的治疗方法^[66]。在生长因子的细胞培养和动物实验中, 证实生长因子有利于神经元的存活和功能恢复, 进而证明了神经保护是一种很好的治疗方法。但是这些生长因子在动物实验中所发现的毒性限制了他们在临床上的应用。rhEPO 是一种耐受性良好的药物, 已经在许多患者身上使用。并且已有证据显示其可以通过血-脑屏障和血-视网膜屏障^[67], 从而有可能作为一种神经保护药在临床上使用。

但如果作为神经保护药长期使用的话, EPO 也有一些副作用, 如血液粘滞性升高, 血小板聚集, 红细胞增多, 血压增高等^[68]。EPO 的促红细胞的生成、神经保护及血管生成素活性功能的抗原决定簇的识别和分离, 发展 rhEPO 的衍生物, 使之只有神经保护作用而没有促红细胞生成的作用将有利于 EPO 在神经系统疾病中, 包括眼科疾病的长期使用。有研究者将 rhEPO 酶解成 asialoEPO, 有神经保护功能而没有促红细胞生成的作用^[69]。对于眼科来说, 我们还可以将 EPO 用于局部治疗来减轻它的副作用^[70]。

总之, EPO 可作为一种新的神经保护药物, 但对 EPO 应用于眼科临床还需要更进一步的研究。

参考文献

- 1 Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev*, 1992;72:449-489
- 2 Masuda S, Chikuma M, Sasaki R. Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res*, 1997;746:63-70
- 3 Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C. Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995;92:3717-3720
- 4 Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and digendrocytes grown in culture. *J Neurophthal Exp Neurol*, 2001;60:386-392
- 5 Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kessimian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994;91:3974-3978
- 6 Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali R, Dammacco F. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *in vivo*. *Blood*, 1999;93:2627-2636
- 7 Juul SE, Joyce AE, Zhao Y, Ledbetter DJ. Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates. *Pediatr Res*, 1999;46:263-268
- 8 Okada A, Kinoshita Y, Maekawa T, Hassan MS, Kawanami C, Asahara M, Matsushima Y, Kishi K, Nakata H, Naribayashi Y, Chiba T. Erythropoietin stimulates proliferation of rat-cultured gastric mucosal cells. *Digestion*, 1996;57:328-332
- 9 Orakkabati N, Gollnick F, Meyer R, Fandrey J, Jelkmann W. Erythropoietin induces Ca^{2+} mobilization and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. *Exp Hematol*, 1996;24:392-397
- 10 Gilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V, Pulido SM, Liu C, Ruegg UT, Guich CTI. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *J Biol Chem*, 2000;275:39754-39761
- 11 Wald MR, Borda ES, Sterin-Borda L. Mitogenic effect of erythropoietin on neonatal rat cardiomyocytes: signal transduction pathways. *J Cell Physiol*, 1996;167:461-468
- 12 Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*, 1999;126:3597-3605
- 13 Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki RA. Novel site of erythropoietin production: oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*, 1994;269:19488-19493
- 14 Morishita E, Masuda S, Nagao M, Tasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents *in vitro* glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*, 1997;76:105-116
- 15 Hong ZZ, Lin SH, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *J Neurosci Res*, 2003;71:659-669
- 16 Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Gallyas JF. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem*, 1993;268:11208-11216
- 17 Juul SE, Anderson DK, Li Y, Christensen RD. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res*, 1998;43:40-49
- 18 Sugawa M, Sakurai Y, Ishikawa-Ieda Y, Suzuki H, Asou H. Effects of erythropoietin on glial cell development; digendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res*, 2002;44:391-403
- 19 Yamasaki M, Mishima HK, Yamashita H, Kashiwagi K, Murata K, Minamoto A, Inaba T. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res*, 2005;1050(1-2):15-26
- 20 Bocker-Meffert S, Rosenstiel P, Rohl C. Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002;43:2021-2026
- 21 Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M. Erythropoietin gene expression in human monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*, 1996;8:666-676
- 22 Li Y, Juul SE, Morris-Wiman JA, Calhoun DA, Christensen RD. Erythropoietin receptors are expressed in the central nervous system of mid-trimester human fetuses. *Pediatr Res*, 1996;40:376-380
- 23 Weishaupt JH, Rohaden G, Polking E, Siren AL, Ehrenreich H, Bahr M. Effect of erythropoietin axotomy-induced apoptosis in rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004;45(5):1514-1522
- 24 Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Siren AL, Ehrenreich H. Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuro Report*, 2000;11:3485-3488
- 25 Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, Yvon A, Vivien D, Duchatelle I, Mackenzie ET, Petit E. Neurons and astrocytes express Epo mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia*, 2000;30:271-278
- 26 Siren AL, Fratelli K, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and in metabolically stressed neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001;98:4044-4049
- 27 Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M, Sasaki R. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000;279:1242-1248
- 28 薛文, 孙正义, 全东和. 促红细胞生成素在大鼠脊髓缺血再灌注损伤中的表达及意义. *中国脊柱脊髓杂志*, 2005;15(5):292-295
- 29 Jelkmann W, Hellwig-Burgel T. Biology of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol*, 2001;502:169-187
- 30 Inomata Y, Hirata A, Takahashi E, Kawaji T, Fukushima M, Tanihara H. Elevated erythropoietin in vitreous with ischemic retinal diseases. *Neuroreport*, 2004;15(5):877-879

- 31 Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*,1999;19:643- 651
- 32 Grimm G, Wenzel A, Stanescu D, Marijana JS, Hotop S, Groszer M, Naash M, Gassmann M, Remé C. Constitutive Overexpression of Human Erythropoietin Protects the Mouse Retina against Induced But Not Inherited Retinal Degeneration. *J Neuroscience*,2004;24(25):5651- 5658
- 33 Brines M. What evidence supports use of erythropoietin as a novel neurotherapeutic. *Oncology*,2002;16:79- 89
- 34 Nissenson AR. Epoetin and cognitive function. *Am J Kidney Dis*,1992;20: 21- 24
- 35 Pickett JL, Theberge DC, Brown WS, Schweitzer SJ, Nissenson AR. Normalizing hematocrit in dialysis patients improves brain function. *Am J Kidney Dis*,1999;33:1122- 1130
- 36 Konishi Y, Chui DH, Hirose H, Kunishita T, Tabira T. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons *in vitro* and *in vivo*. *Brain Res*,1993;609:29- 35
- 37 Campana WM, Misasi R, O'Brien JS. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *Int J Mol Med*,1998;1:235- 241
- 38 Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an *in vitro* model. *J Neurosci*,2002;22:10291- 10301
- 39 Snor AD, Greenberg DA. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett*,2000;290: 213- 215
- 40 Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian RM, Przygodzki B, Beleslin-Cokic CS, Lin VM, Nikodem C, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*,2002;192:505- 516
- 41 曾志磊,姜季宇,苗旺.促红细胞生成素对大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血侧皮层神经元凋亡和 Bcl-2 表达的影响.实用神经疾病杂志,2005;8(2): 31- 32
- 42 Sekanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. *In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998;95:4635- 4640
- 43 Catania MA, Marciano MC, Parisi A, Sturiale A, Buemi M, Grasso G, Squadrito F, Caputi AP, Calapai G. Erythropoietin prevents cognition impairment induced by transient brain ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol*,2002;437:147- 150
- 44 Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, Caputi AP, Buemi M. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol*,2000;401:349- 356
- 45 Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*,2000;97:10526- 10531
- 46 Grasso G. Neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Sci*,2001;45:7- 14
- 47 丁建光,姜德咏.视网膜缺血-再灌注损伤的保护.国际眼科杂志,2005;5(5):1010- 1015
- 48 丁建光,姜德咏,吴荣瀚,唐朝珍,李文生.兔视网膜不同缺血时间再灌注后 ERG 的变化.国际眼科杂志,2005;5(4):659- 662
- 49 牛膺筠,赵岩松,高云霄,周占宇,王红云.视网膜缺血再灌注损伤的机制及 bFGF 对其干预作用.国际眼科杂志,2003;3(3):27- 31
- 50 Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J, Kato Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem*,1999;72:2565- 2572
- 51 Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Maysler H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Reme CE. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med*,2002;8:718- 724
- 52 Tsai JC, Wu L, Worgul B, Forbes M, Cao J. Intravitreal Administration of Erythropoietin and Preservation of Retinal Ganglion Cells in an Experimental Rat Model of Glaucoma. *Curr Eye Res*,2005;30(11):1025- 1031
- 53 Layton CJ, Wood JP, Childow G, Osborne NN. Neuronal death in primary retinal cultures is related to nitric oxide production, and is inhibited by erythropoietin in a glucose-sensitive manner. *J Neurochem*,2005;92(3):487- 493
- 54 Onia S, Rex OS, Allocca M, Domenici L, Surace EM, Maguire AM, Lyubarsky A, Cellerino A, Bennett J, Auricchio A. Systemic but not intracocular EpoGene Transfer Protects the Retina from Light- and Genetic- Induced Degeneration. *Molecular therapy*,2004;10(5):855- 861
- 55 Jiao H, Berrada K, Yang W, Tabrizi M, Platanias LC, Yi T. Direct association with and dephosphorylation of JAK2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol*,1996;16:6985- 6992
- 56 Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J*,2001;15: 1804- 1806
- 57 Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*,2001;412: 641- 647
- 58 Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol*, 1999;19:5800- 5810
- 59 Renzi MJ, Farrell FX, Bittner A, Galindo JE, Morton M, Trinh H. Erythropoietin induces changes in gene expression in PC12 cells. *Brain Res*,2002;104: 86- 95
- 60 Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Villa P, Ghezzi P, Garau A. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem*,2005;93:412- 421
- 61 Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello T, La ragione T, Cagnotto A. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*,2003;198:971- 975
- 62 Viviani B, Corsini E, Galli CL, Padovani A, Cusani E, Marinovich M. Dying neuronal cells activate glia through the release of protease product. *Glia*,2000; 32:84- 90
- 63 Ridatti D, Vacca A, Rocaro AM. Erythropoietin as an angiogenic. *Eur J Invest*, 2003;33:891- 896
- 64 Tabira T, Konishi Y, Gallyas F. Neurotrophic effect of hematopoietic cytokines on cholinergic and other neurons *in vitro*. *Int J Dev Neurosci*,1995;13: 241- 253
- 65 Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T. Erythropoietin regulates the *in vitro* and *in vivo* production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*,2001;21:9733- 9743
- 66 吴凌,陈晓明.青光眼的视神经保护治疗.国际眼科杂志,2004;4(3): 496- 499
- 67 Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck K. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res*,2002;64:326- 326
- 68 Wiessner C, Allegrini PR, EkatoDRAMIS D, Jewell UR, StalImach T, Gassmann M. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab*,2001;21:857- 864
- 69 Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, LTorup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuertth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*,2003;100:6741- 6746
- 70 Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002;99:10659- 10664