

# 综述

## 红细胞生成素:一种新的神经保护剂

陈婷方, 侯冰, 任长虹, 吴祖泽, 张成岗\*

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所蛋白质组学国家重点实验室, 北京 100850)

**[摘要]** 红细胞生成素(erythropoietin, EPO)作为细胞因子超家族中的一员,在体内和体外均显示出显著的神经保护功能。该作用可能主要通过抗凋亡、抗氧化、促进血管再生等机制实现。大剂量 EPO 能通过血脑屏障并发挥神经保护作用。EPO 经人工改造后可消除造血系统不良反应。EPO 的临床应用有望对神经系统疾病的预后及治疗提供新的思路。

**[关键词]** 红细胞生成素; 神经保护; 缺血缺氧性脑损伤

**[中图分类号]** Q513.2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1000-5501(2008)05-0464-04

### Erythropoietin: a new neuroprotective agent

CHEN Ting-Fang, HOU Bing, REN Chang-Hong, WU Chu-tse, ZHANG Cheng-Gang\*

(State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

**[Abstract]** Erythropoietin, a member of cytokine superfamily, has been recently proven to have distinct neuroprotective activity either *in vivo* or *in vitro*. Anti-apoptosis, antioxidation and proangiogenesis are believed to be the underlying mechanisms of EPO for neuroprotection. High doses of EPO can be transported across the blood-brain barrier and its modified form can be utilized without side-effect on the hematopoietic system. The clinical applications of EPO will provide new insight into the prognosis and treatment for various neurological diseases.

**[Key words]** erythropoietin; neuroprotection; ischemic-hypoxic brain injury

红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一个由166个氨基酸组成的含唾液酸的酸性糖蛋白,其相对分子质量为 $34 \times 10^3$ 。多年来, EPO 仅被认为是促进红细胞生成的糖蛋白。直到发现非红细胞系亦可表达 EPO 及其受体(EPO receptor, EPOR),人们才认识到 EPO 可能具有促进造血之外的其他功能。1997年, Morishita 等<sup>[1]</sup>首次证明 EPO 具有减轻谷氨酸所致的原代培养的大鼠皮质和海马神经元损伤的作用,立刻引起人们对 EPO 在神经系统功能的极大关注。通过十多年的研究, EPO 的神经保护功能已被广泛证实,它正作为一种新的神经保护剂应用于临床研究。

### 1 神经系统中 EPO 及 EPOR 的表达与分布

一直以来, EPO 被认为仅来源于胎肝和肾,直到 1992 年在肺、睾丸及脑中检测到 EPO mRNA 的表达才改变了人们长期以来的认识<sup>[2]</sup>。人类 EPO 和 EPOR 的表达从胚胎第 7 周开始,到胚胎第 8~24 周达到高峰。小鼠 EPOR 在胚胎 E8.5 期开始在神经管中表达,而 EPO 的表达晚于 EPOR。EPO 和 EPOR 基因缺陷型小鼠在胚胎 E13.5 期死亡,死亡胚胎除具有严重贫血等症狀外,脑组织发育不良,神经元凋亡增多,这些说明 EPO 和 EPOR 在神经系统发育过程中起到

关键作用。

目前发现 EPO 和 EPOR 在啮齿类、非人灵长类及人类的中枢神经系统均有表达。正常脑组织中的 EPO 和 EPOR 表达水平较低。EPOR 主要分布于海马、小脑皮质、中脑及脑毛细血管内皮细胞,在脊髓运动神经元及毛细血管内皮细胞、施万细胞也有少量分布。EPOR 在神经系统的广泛分布,提示 EPO 可通过旁分泌和自分泌的形式发挥作用。EPO 主要分布于海马、内囊、大脑皮质、中脑及小脑<sup>[3]</sup>。PC12 细胞(大鼠嗜铬细胞瘤细胞)、SN 细胞(中隔胆碱能神经元)

**[收稿日期]** 2008-01-02

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展规划项目("973"计划)(2006CB504100);国家自然科学基金(30772293, 30600365);北京市自然科学基金重点项目(7061004)

**[作者简介]** 陈婷方(1977-),女,浙江省绍兴市人,助理研究员,博士生。主要从事脑缺氧与脑保护方面研究。Tel: 010-66930210; E-mail: tingfangchen525@163.com.

\*通讯联系人,张成岗(1970-),男,陕西省白水县人,研究员,博士。主要从事脑缺氧与脑保护方面研究。Tel: 010-66931590; E-mail: zhangcg@bmi.ac.cn

及原代培养大鼠皮质及海马神经元中均可检测到 EPOR 的表达。原代培养的人脑神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞中也可检测到 EPOR 的表达,但体外培养的人脑少突胶质细

胞中没有 EPOR 的表达。EPO 在体外培养的大鼠、人脑神经元、星形胶质细胞中均可检测到<sup>[4]</sup>(表 1)。

表 1 EPO 和 EPOR 的表达谱

名称	EPO	EPOR
细胞表达谱	体外培养的大鼠、人脑神经元、星形胶质细胞	PC12细胞、SN6细胞及原代培养大鼠皮质及海马神经元、体外培养的人脑神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞
组织表达谱	海马、内囊、大脑皮质、中脑及小脑、脑脊液	海马、大脑皮质、中脑及脑毛细胞管内皮细胞、脊髓运动神经元及毛细血管内皮细胞、施万细胞

人类脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 在出生前后均能检测到 EPO。对于 EPO 是否能通过血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB), 目前认识不一。早期研究显示, 新生婴儿经静脉注射重组人源红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rhEPO) 后, 在 CSF 中 EPO 的含量并未增加, 提示 EPO 似乎不能通过 BBB。但后来在脑毛细血管内皮细胞腔面和星形胶质细胞的足板 (foot plate) 内发现存在大量 EPOR, 使人们认识到 EPO 可能能够通过 BBB。后续研究显示, EPO 能与脑血管内皮细胞的 EPOR 结合, 通过内吞方式进入脑内<sup>[5]</sup>。

EPO 和 EPOR 的表达均受缺氧调控。缺氧后, 缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 和缺氧诱导因子 2 (hypoxia-inducible factor-2, HIF-2) 可增加 EPO 的表达, 而缺氧诱导因子 3 (hypoxia-inducible factor-3, HIF-3) 和 NF- $\kappa$ B 则抑制 EPO 的表达; 另外, 低血糖、胰岛素和胰岛素样生长因子可刺激 EPO mRNA 的表达, 同时也能刺激体外培养的星形胶质细胞中 EPO 的表达。脑缺血缺氧、脑创伤、癫痫均可使 EPO 和 EPOR 表达上调, 在脑缺血或脑创伤时, 脑脊液中 EPO 的含量可由于 BBB 的破坏而增加<sup>[6]</sup>。另外, CSF 中 EPO 的含量与肌萎缩性侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 的预后呈负相关<sup>[7]</sup>。

## 2 EPO 的分子结构

人 EPO 基因位于 7q21。人与猴、大鼠和小鼠 EPO 的氨基酸序列分别有 90%、80%、78% 的同源性。人 EPO 基因含有 5 个外显子和 4 个内含子。根据 EPO cDNA 序列推定, 人 EPO 基因可编码包括信号肽在内的 193 个氨基酸的 EPO 前体。成熟的 EPO 由 166 个氨基酸组成, 其中含有 2 个二硫键, 3 个氮末端 N 型糖基化位点 (asp24, asp38, asp83) 和 1 个丝氨酸 O 型糖基化位点 (Ser126)。从再生障碍性贫血患者尿液中纯化的天然 EPO 的相对分子质量为  $34 \times 10^3$ , 是一种含唾液酸的酸性糖蛋白, 其中糖基约占 40%, 蛋白质部分约占 60%, 而通过 DNA 重组技术在 CHO 细胞表达的 rhEPO 相对分子质量为  $30.4 \times 10^3$ , 具有天然 EPO 的生物活性。去唾液酸或去糖基化的 rhEPO 虽然同样具有天然 EPO 的生物活性, 但却缩短了其体内的半衰期, 说明糖基化对保持 EPO 生物活性的稳定十分重要<sup>[8]</sup>。

## 3 EPO 的神经保护作用

大量研究显示 EPO 无论在体内还是在体外均具有神经

保护作用。

### 3.1 EPO 在体外的神经保护作用

作为一种细胞因子, EPO 除对造血系统有支持和促进作用外, 对中枢神经系统也具有营养作用。EPO 可作为神经营养因子促进胆碱能神经元的成熟、分化与神经发生; 可促进多巴胺能神经元的分化并维持细胞内环境的稳定; 还可增强 SN6 细胞、SK-N-MC 细胞 (人神经细胞瘤细胞系) 和 NS20Y 细胞 (小鼠神经瘤细胞) 的胆碱乙酰基转移酶活性并防止细胞死亡; 同时还可使已分化的 PC12 细胞在无血清及无营养因子的培养条件下活性增强<sup>[9]</sup>。

兴奋性氨基酸毒性是缺血缺氧性脑损伤后引起神经元死亡的主要原因之一。目前已知 EPO 可减轻谷氨酸所致的原代培养神经元损伤, 并且这种保护作用具有剂量依赖性。EPO 的抗兴奋性氨基酸毒性作用需在损伤前 8 h 加入才能发挥, 这提示 EPO 可启动特定基因 mRNA 和蛋白质的合成; 另外, EPO 还具有对抗钙超载的作用, 体外培养的大鼠原代培养神经元与 EPO 孵育后, 可明显减轻神经元因钙超载导致的损伤。EPO 还可通过 JAK2 和 NF- $\kappa$ B 通路减轻 NO 所致的损伤。EPO 还可减小缺氧所致的原代培养神经元损伤, 但对原代培养的胶质细胞没有类似作用。EPO 对体外培养的少突胶质细胞和星形胶质细胞也具有营养作用, 还能促进少突胶质细胞和星形胶质细胞的成熟与分化, 并可减轻由干扰素所致的少突胶质细胞损伤, 减轻 1 甲基-4 苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP) 所导致的 PC12 细胞损伤<sup>[10]</sup>。

### 3.2 EPO 在体内的神经保护作用

1998 年, Sakanaka 等<sup>[11]</sup>将可溶性 EPOR 注射到缺血损伤的沙鼠脑内, 结果导致沙鼠海马神经元缺血损伤加重, 提示内源性 EPO 具有神经保护作用。近年来, 随着 rhEPO 的生产与应用, 外源性 EPO 同样被证实具有很好的神经保护作用。2003 年, Kumral 等<sup>[12]</sup>通过侧脑室注射 rhEPO, 使大鼠中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型大鼠的脑梗死面积减小 50% ~ 75%, 并减少海马 CA1 区神经元的凋亡及长时程空间记忆的丧失。曾志磊等<sup>[13]</sup>发现腹腔注射 3 000 U/kg rhEPO, 能减轻大鼠局灶性脑缺血再灌注所致损伤, 通过上调 bcl-2 基因的表达, 抑制缺血再灌注损伤后缺血侧皮质的细胞凋亡。随后的研究显示, EPO 除对缺血性脑损伤有保护作用外, 对创伤性脑损伤同样具有保护作用。在大鼠脑创伤后立即给予 5 000 U/kg 的 rhEPO, 两周后治疗组创伤面积明显减小, 而海马 CA1 和 CA3 区存活神经元也

明显多于对照组,其治疗窗为损伤后6 h以内<sup>[14]</sup>。对于脊髓损伤, rhEPO同样具有神经保护作用。King等<sup>[15]</sup>在大鼠脊髓损伤后24 h内给予 rhEPO,结果发现大鼠脊髓损伤面积明显小于对照组。陈凡帆等<sup>[16]</sup>发现静脉注射1 000 U/kg的 rhEPO后,蛛网膜下腔出血模型犬脑血管痉挛明显减轻,神经元坏死明显减少,其作用可能是通过增加血液和CSF中NO含量致血管舒张而实现的。

rhEPO对于神经变性疾病也有一定疗效。Xue等<sup>[17]</sup>给予6羟多巴胺(6-OHDA)所诱导的帕金森综合征(parkinsonism)大鼠一定剂量的 rhEPO,结果发现大鼠脑多巴胺能神经元存活率明显增加,大鼠运动功能也得到改善。此外,EPO还具有抗炎作用。Agnello等发现,腹腔注射500~5 000 U/kg rhEPO可减轻急性实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的症状,明显降低动物体内神经胶质酸性蛋白(GFAP)和TNF- $\alpha$ 的含量。EPO对视网膜神经元也具有保护作用。刘夫玲等<sup>[18]</sup>给予体外原代培养的大鼠视网膜神经元一定剂量的 rhEPO预处理后,用化学方法导致神经元缺氧性损伤。免疫组织化学及凋亡检测结果显示,原代培养的大鼠视网膜神经元缺氧后EPOR的表达明显增加, rhEPO预处理能抑制视网膜神经元的凋亡,改善细胞缺氧性损伤的形态学变化,这种保护作用具有明显的浓度和时间依赖性。

#### 4 EPO的神经保护机制

EPO可能通过多种机制发挥神经保护作用。一系列的研究证明,EPO具有抗凋亡作用,其在神经系统的作用通路与在造血系统的相似:EPO首先与EPOR结合导致受体二聚化,并激活JAK2,后者使STAT-5磷酸化,并活化蛋白酪氨酸磷酸酶(SHC)、PI3K和NF- $\kappa$ B。磷酸化的STAT-5迅速入核与DNA结合促进抑制凋亡基因***bcl-2***和***bcl-xL***转录。活化的SHC通过MAPK通路增加NO的合成。活化的PI3K则通过磷酸化PIP3使蛋白激酶B(AKT)激活,最终导致抗凋亡基因***bcl-xL***的激活,同时PIP3又通过AKT使BAD磷酸化而灭活,从而抑制了半胱天冬酶(caspase)-1、3、9的激活而起到抗凋亡的作用。而活化的NF- $\kappa$ B则从胞浆入核,调节凋亡抑制基因的表达<sup>[19]</sup>(图1)。在造血系统EPO强大的抗凋亡作用,使红系祖细胞得以存活并最终向成熟红细胞分化;在神经系统,EPO通过以上信号转导通路,减少神经元的凋亡,促进神经元的发生。

除了抗凋亡作用之外,EPO还具有抗谷氨酸、N-甲基-D-天冬氨酸、红藻氨酸等兴奋性氨基酸毒性损伤的作用,而且能抑制缺氧时谷氨酸的大量释放,并通过增加超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等抗氧化酶的表达而起到抗氧化作用<sup>[20]</sup>;同时EPO还能减少缺血后肿瘤坏死因子及白介素-6和白介素-8等炎症因子的表达,并使抗炎因子表达量增高。在大鼠大脑中动脉阻塞后,EPO能减轻梗死区域内淋巴细胞和小胶质细胞的聚集。此外,EPO可通过增加BBB的通透性减轻癫痫发作所致的脑水肿;通过结合血管内皮细胞上的EPOR,刺激血管再生,并上调NO的表达,使血管舒张,改善组织供血;EPO还能通过上调血管内皮细胞基质金属蛋白酶,促进

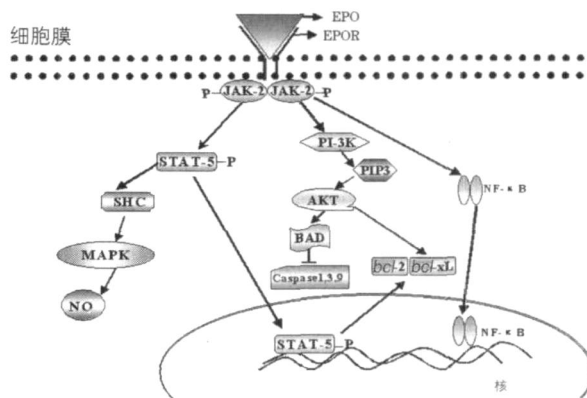


图1 EPO的信号转导通路

血管内皮细胞的增殖、分化和迁移<sup>[21]</sup>。

EPO对突触的神经递质释放也具有调节能力。在PC12细胞中,EPO能通过激活Ca<sup>2+</sup>通道,刺激多巴胺的释放,诱导膜去极化并增加NO的合成。另外,EPO可能通过抑制NO介导的氧自由基产生或者对抗其毒性而产生神经保护作用。EPO还可作为神经营养因子诱导神经元的分化成熟并促进神经发生<sup>[22]</sup>。

#### 5 EPO的临床应用与展望

随着EPO神经保护功能的发现,EPO正作为一种新的神经保护剂被应用于临床研究。由于BBB的存在,只有应用大剂量的EPO才能通过BBB,而大剂量EPO的应用又会导致红细胞增多、血压增高、血黏度升高、脑梗死概率增大等严重不良反应的产生。因此,人们期待能研发出新型rhEPO,使其能够保留rhEPO的神经保护活性并能通过BBB,同时又能降低红细胞增多等不良反应。去糖基化EPO(asiaberythropoietin)作为人工改造rhEPO的一种,去除了rhEPO的糖基化。如前所述,糖基化可增加EPO在循环系统中的稳定性,去除糖基化后,EPO在血中的清除速率增加,因此去糖基化EPO仅具有神经保护作用,而不再产生红细胞慢性增多的不良反应<sup>[23]</sup>。另一种改造的EPO——氨基酰化EPO(carbamylated EPO)则不与造血细胞表面EPOR结合,但能结合神经元表面的EPOR,因此氨基酰化EPO在发挥神经保护作用的同时也不导致红细胞增多<sup>[24]</sup>。

EPO在基因治疗方面也已取得一定进展。Wang等<sup>[25]</sup>于2004年将含有EPO编码区序列的真核表达载体pCMV-EPO经过尾静脉注射到新生小鼠体内,结果发现在注射后1 d小鼠体内EPO的表达最高,其表达量可维持14 d。经注射pCMV-EPO的脑缺血小鼠,其认知障碍明显减轻,海马CA1区神经元的凋亡明显减少,胼胝体中神经胶质细胞活性明显下降。EPO的基因治疗进展为其临床应用提供了新的思路。目前人工改造的rhEPO正广泛应用于临床。一期试验中,在成人脑缺血缺氧性疾病的治疗中已获得令人满意的效果。相信在不久的将来EPO将会成为治疗神经系统疾病的一种新型分子。

## [参考文献]

- [1] 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 [J]. *Neuroscience*, 1997, 76 (1): 105 - 116.
- [2] Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, *et al* Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia[J]. *Am J Physiol*, 1992, 263 (3 Pt 2): 474 - 481.
- [3] Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, *et al* Erythropoietin gene expression in human, monkey and human brain [J]. *Eur J Neurosci*, 1996, 8 (4): 666 - 676.
- [4] Lykissas MG, Korompilias AV, Vekris MD, *et al* The role of erythropoietin in central and peripheral nerve injury [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2007, 109 (8): 639 - 644.
- [5] 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.
- [6] 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 (23): 10291 - 10301.
- [7] Brettschneider J, Widl K, Schattauer D, *et al* Cerebrospinal fluid erythropoietin (EPO) in amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 416 (3): 257 - 260.
- [8] Sytkowski AJ. Erythropoietin: Blood, Brain and Beyond [M]. New York: Wiley-VCH, 2004. 55 - 69.
- [9] Noguchi CT, Asavaritikrai P, Teng R. Role of erythropoietin in the brain [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2007, 64 (2): 159 - 171.
- [10] Wu Y, Shang Y, Sun SG, *et al* Protective effect of erythropoietin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurodegeneration in PC12 cells [J]. *Neurosci Bull*, 2007, 23 (3): 156 - 164.
- [11] 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.
- [12] Kumral A, Ozer E, Yilmaz O, *et al* Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. *Biol Neonate*, 2003, 83 (3): 224 - 228.
- [13] 曾志磊, 娄季宇, 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 [J]. *实用神经疾病杂志*, 2005, 8 (2): 31 - 32.
- [14] Cherian L, Goodman JC, Robertson C, *et al* Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322 (2): 789 - 794.
- [15] King VR, Averill SA, Hewazy D, *et al* Erythropoietin and carbamylated erythropoietin are neuroprotective following spinal cord hemisection in the rat [J]. *Eur J Neurosci*, 2007, 26 (1): 90 - 100.
- [16] 陈凡帆, 全伟吕, 建平, 等. EPO 在犬蛛网膜下腔出血模型中对脑血管痉挛的影响 [J]. *岭南现代临床外科*, 2007, 7 (4): 309 - 311.
- [17] Xue YQ, Zhao LR, Guo WP, *et al* Intrastriatal administration of erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcome in a rat model of Parkinson's disease [J]. *Neuroscience*, 2007, 146 (3): 1245 - 1258.
- [18] 刘夫玲, 牛鹰筠, 王红云, 等. 促红细胞生成素预处理对视网膜神经元缺血性损伤的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2007, 23 (2): 228 - 233.
- [19] Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades [J]. *Nature*, 2001, 412 (6847): 641 - 647.
- [20] Wu Y, Shang Y, Sun S, *et al* Antioxidant effect of erythropoietin on 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 564 (1 - 3): 47 - 56.
- [21] Ogunshola OO, Djonov V, Staudt R, *et al* Chronic excessive erythrocytosis induces endothelial activation and damage in mouse brain [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290 (3): 678 - 684.
- [22] Iwai M, Cao G, Yin W, *et al* Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2007, 38 (10): 2795 - 2803.
- [23] Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, *et al* A sialoberythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (11): 6741 - 6746.
- [24] Leist M, Ghezzi P, Grasso G, *et al* Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic [J]. *Science*, 2004, 305 (5681): 239 - 242.
- [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): 1064 - 1071.

(本文编辑 姜晓舜)

\* \* \*

·读者·作者·编者·

## 医学名词术语使用规范

在科技论文的写作中,有关名词术语应规范统一,不要一义多词或一词多义。应以全国自然科学名词审定委员会公布的各种学科名词为准。外文新名词尚无统一译名时,可自译并在第一次引用时用括号注出原文。药名(包括中药)以《中华人民共和国药典》或卫生部药典委员会编的《中国药品通用名称》(1997年版)为准。药物名称不用商品名。

(本刊编辑部)