

· 综述 ·

促红细胞生成素与急性脊髓损伤

丁文元¹ 赵 晔¹ 张 为¹ 申 勇¹ 姚晓光¹

脊髓损伤是致残率、死亡率很高的严重创伤,给社会和个人造成了沉重负担。脊髓继发损伤是脊髓原发损伤之后由于各种因素引起的脊髓再损伤,所产生的脊髓损害可能大大超过了原发损伤。关于脊髓损伤治疗方面国内外已进行了大量研究,多是针对抑制继发损伤方面机制的。目前临床上仅应用甲泼尼龙治疗脊髓急性损伤具有一定治疗效果,但是由于其应用的时间窗及并发症问题,甲泼尼龙在治疗脊髓损伤方面的应用一直备受关注,有学者对此渐渐产生怀疑。因此,找到一种更为安全有效的药物一直是脊髓损伤药物治疗领域研究的重点,尤其在脊髓损伤远期治疗方面更需要有效的药物及方法。随着近几年来对促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的研究,发现其在中枢以及周围神经系统中均有广泛表达,并对神经系统损伤具有保护作用。本文拟对 EPO 在脊髓损伤保护方面的作用机制进行综述。

1 促红细胞生成素的结构及生物学特性

EPO 是一种主要由肾脏及胎肝分泌的酸性糖蛋白,自 1906 年发现以来已有近一百年的历史,由于其在促进造血方面的作用一直作为治疗贫血的药物而广泛应用于临床。EPO 是一种含唾液酸的酸性糖蛋白,分子量为 34KD,由 193 个氨基酸序列合成,经过转化其活性蛋白为 165 个氨基酸,随后被高度糖基化。人类 EPO 基因定位于 7q 11—12,含 5 个外显子和 4 个内含子。1985 年重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rHu-EPO)问世,它是一种通过基因重组 DNA 技术生产的、含有与天然分离的 EPO 完全相同氨基酸序列的糖蛋白,生物学活性也极为相似,临床上已大量用于治疗贫血。EPO 可以被缺血缺氧以及体内多种激素所诱导分泌增加,必须通过与一种缺乏酪氨酸活化酵素大分子结构的特殊受体(EPO-R)结合而发挥作用。EPO-R 基因定位于 19p 13.3,属 I 类细胞因子受体超家族中造血生长因子受体家族成员,是一种含 508 个氨基酸、分子量为 66KD 的单链跨膜糖蛋白,其胞浆区中的保守区,为促进有丝分裂与诱导酪氨酸磷酸化配基偶联所必需,胞浆近膜区部分为与 Jak2 作用所必需。EPO 与细胞表面的 EPO-R 结合后,胞内区的酪氨酸发生磷酸化引发细胞间信号传导,从而调节核内基因表达,控制细胞的存活、增殖和分化^[1]。近年来研究表明,EPO 除具有促进红细胞增生、分化和成熟的作用外,还具有抗血管痉挛、抗凋亡和抗炎等多种功能^[2],被视为全身性保护因子,尤其在损伤修复及保护中发挥重要作用。

2 促红细胞生成素在中枢神经系统中的表达及调控

EPO 及 EPO-R 不仅存在于造血系统中,研究已证实在中枢和周围神经系统中也存在这两种蛋白的表达,并受缺氧所诱导^[3]。免疫组化发现,EPO 及 EPO-R 在大脑中主要分布

于海马及大脑皮质中的神经元和神经胶质细胞中,在脊髓组织中主要分布于前角运动神经元和带髓鞘的轴突上。EPO 对正常以及病理情况下的神经组织均可发挥重要作用^[4]。Michael 等^[5]通过透射电镜观察证实:在人和哺乳动物的脑部微血管周围星形胶质细胞的终足内与微血管内皮细胞内及表面,抗重组人促红细胞生成素受体(rHu EPO-R)的免疫反应呈现阳性。该结果表明:在正常情况下,EPO 由血液循环透过血脑屏障进入脑实质是具有一定的解剖学基础的。该结论又在后续的生物素标记实验中进一步被证实。EPO 及 EPO-R 的表达除受缺血、缺氧调控外,还受多种因素影响。Bernaudin 等^[6]在小鼠胚胎神经元体外培养时发现低氧诱导的 EPO 表达增加,可被环氧合酶(COX)所阻断,表明在神经元中 EPO 的产生受前列腺素途径调节。此外,一些代谢紊乱(低血糖)、细胞因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 以及胰岛素和胰岛素样生长因子等)均可影响 EPO 和 EPO-R 在神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞的表达。

3 促红细胞生成素对中枢神经系统损伤保护的分子机制

实验证明各种原因造成的 CNS 损伤可促使神经细胞分泌 EPO,EPO 通过与 EPO-R 结合启动信号传导通路,发挥保护作用。信号传导较为复杂,其机制目前尚未完全清楚,通过实验研究提出了几种可能的主要保护机制^[7-9]。

3.1 酪氨酸激酶 Janus 激酶 2 通路

Janus 激酶 2(Jak2)在 EPO 的信号传导中起着关键的作用。目前认为 Jak2 先与 EPO-R 结合,EPO 与 EPO-R 结合后造成 EPO-R 二聚化,导致 Jak2 与 EPO-R 的结合亲和力提高,自身激活位点被磷酸化而自我激活。激活的 Jak2 引发了酪氨酸磷酸化瀑布,使 EPO-R 的酪氨酸残基和胞浆内多个蛋白如 PI3K、STAT5、Shp1 等磷酸化而相继被激活,产生一系列效应。

3.2 磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)通路

PI3K 由 P110 催化亚基和 P85 调节亚基组成。当 EPO 与 EPO-R 结合激活 Jak2 及 EPO-R 后,含有 SH2 结构的 P85 亚基与 EPO-R 的酪氨酸 479 (Tyr 479) 结合而激活,激活的 PI3K 将其底物磷脂酰肌醇-4-磷酸(PIP)和磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2)的 3-OH 磷酸化生成肌醇-3,4-二磷酸(IP2)和肌醇-3,4,5-三磷酸(IP3),后者可在磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1(PDK1)和磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 2(PDK2)参与下激活蛋白激酶 B(PKB,又称 Akt)。

PKB 介导多种生物学效应,是最重要的抗凋亡调节因子,其机制可能如下:①促使凋亡相关因子如半胱天冬酶

1 河北医科大学第三医院脊柱外科,石家庄,050051

作者简介:丁文元,男,硕士,副主任医师,副教授

收稿日期:2005-11-28

caspase-3 和 caspase-9 磷酸化而失活, 抑制其促凋亡作用。②磷酸化核因子 κ B (NF- κ B) 的抑制酶 I κ B α (I κ B α), 使 NF- κ B 能够进入核内调节抗凋亡基因的转录。③抑制糖原合成酶激酶-3 (GSK3) 活性。使 GSK3 失活而阻止凋亡发生。④引起 Forkhead 转录因子成员 FKHL-1 蛋白磷酸化, 使其与磷酸丝氨酸结合蛋白 14-3-3 结合留于胞浆内, 不能进入核内编码 FasL (CD95 配基) 基因表达从而抑制凋亡。⑤防止线粒体释放凋亡因子。线粒体可释放细胞色素 C 及凋亡诱导因子, PKB 可阻止其释放从而起到防止细胞凋亡的作用。

3.3 信号传导和转录活化因子 (STAT)

STAT 在细胞生存和增殖方面起着重要的媒介作用。EPO 主要激活其成员 STAT5。Jak2 激活后使 STAT5 酪氨酸磷酸化, 随后 STAT5 定位于 EPO-R 酪氨酸残基 Tyr 343 或 Tyr 401 后被激活, 激活的 STAT5 与 EPO-R 脱离形成二聚体, 然后转入核内束缚到 DNA 的特定调节序列, 如 Bcl-X/L, β -casein, p21 WAF1/CIS, cyclin, DL, c-fos 等, 激活目的基因的转录。虽然 Jak2/STAT5 通路大部分研究集中在红系祖细胞中, 但近来的研究表明该通路也存在于 CNS 中。故 Jak2/STAT5 通路也可能参与了神经细胞的保护机制。

4 促红细胞生成素对脊髓损伤的保护作用及机制

大量实验表明, 促红细胞生成素对于不同类型的脊髓损伤均具有保护作用。Gorio A 等^[9]设计了两种不同的脊髓损伤模型, 以观察 EPO 对不同类型的脊髓损伤的保护作用。一种损伤模型造成大鼠中度可恢复的脊髓损伤, 伤后立即给予 rhEPO (1000U/kg) 腹腔注射, 在伤后 12h 内, 实验动物即表现出明显的功能恢复, 整个恢复过程持续 28d。另外一种损伤模型造成较为严重的脊髓挫伤, 伤后 1h 给 rhEPO 腹腔注射 (5000U/kg), 相对于生理盐水对照组, EPO 明显地抑制了继发性脊髓损伤、从而减少神经细胞凋亡。两组均获得了明显优于对照组的功能恢复。此研究表明 EPO 对于不同类型的脊髓损伤、在损伤的不同时期均能迅速发挥神经保护作用。Kaptanlylu E 等^[10]学者的研究表明, EPO 对严重脊髓损伤的保护作用要强于甲泼尼龙。

由于对 EPO 的神经保护作用认识时间较短, 在脊髓损伤过程中的保护机制目前并不十分清楚, 通过实验研究表明 EPO 在脊髓损伤中作用的机制主要有以下几点:

4.1 改善局部血流及氧供

EPO 对脊髓损伤早期所发挥的保护作用可能是通过其能够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, 并持续达 24h^[11]。实际上除了致伤物本身的压迫损伤作用外, 创伤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。研究表明 EPO 的血管保护作用与 EPO 调节诱导性 NO 合成酶的活性有关^[12]。NO 在脊髓损伤后即在心血管系统的改变中发挥作用^[13], 而 EPO 对脊髓微循环的调节作用也可能是通过减少 NO 的合成实现的^[14]。另有报道 EPO 可以刺激血管内皮细胞的迁移和增生, 保护内皮细胞, 促进血管生成, 增加缺血区域的血流量, 从而起到保护作用^[15]。

4.2 减少神经细胞凋亡

凋亡在神经系统损伤及退行性变过程中起重要作用^[15]。大量研究表明, 在脊髓急性损伤初期, 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^[16]。脊髓急性损伤后造成局部组织严重缺血, 缺血是引起继发损伤的重要因素。以往研究显示在短暂时全脊髓缺血损伤的兔子模型中, 运动神经元发生了细胞凋亡。EPO 在大脑和脊髓具有对抗神经元凋亡的功能, 对缺血造成的神经细胞凋亡, 有很强的抑制作用^[17]。Celik 等^[18]的研究表明, 正常脊髓前角运动神经元大量表达 EPO, 静脉注射 rHu EPO, 明显缓解了由于缺血诱导的运动神经元凋亡而引起的神经功能丧失。用盐水作为对照进行处理时, 原位末端标记物 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nicend labeling, TUNEL) 作为细胞凋亡的特异性标记, 在脊髓前角运动神经元显示是广泛而明显的, 而在 rHu-EPO 处理组却缺乏这种标记物, 表明在这种脊髓损伤模型中, EPO 能够很好地抑制脊髓损伤后神经细胞的凋亡。

4.3 抑制继发性炎症反应

脊髓损伤后的继发损伤中, 局部炎症反应是主要因素之一。炎症因子和炎症细胞在触发和介导炎症反应中起重要作用, 可通过多种因素造成神经细胞损伤, 导致轴突的脱髓鞘化, 引起细胞凋亡。以往的研究发现, 在接受血液透析的患者中, 长期应用 EPO 可使患者体内干扰素 γ (INF γ)、肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白介素 (IL-6) 和白介素 8 (IL-8) 等致炎因子降低, 而使抗炎因子白介素 10 (IL-10) 升高, 提示 EPO 在体内有抗炎作用。后来的大量实验证明^[19-20], rHu-EPO 能够明显抑制大鼠脊髓损伤节段及邻近区域内 TNF- α , IL-6 及 IL-8 mRNA 和蛋白的表达, 同时促进 IL-10 的上调。但是 EPO 具体的抗炎机制到目前尚未完全明确。核因子- κ B 是炎症基因的主要调控因子, 脊髓损伤后, NF- κ B 明显上调, EPO 可能通过调控 NF- κ B 来发挥抗炎作用^[21], 使用四氢化吡咯二硫代氨基甲酸盐 (PDTC) 特异性抑制 NF- κ B 的实验发现, 脊髓的病理损伤程度得到明显减轻^[21]。另外, NO 合成增加是加重脊髓继发性炎症损伤的重要因素。NO 的生成主要受诱导型 NO 合成酶 (iNOS) 调控, iNOS 是 NF- κ B 基因依赖性产物之一, 在伤后合成明显增加, 并于伤后 7d 达到高峰。IL-10 能够明显抑制大鼠脊髓损伤后 iNOS mRNA 的高表达, 减轻脊髓损伤^[22], 可见抑制 iNOS 合成也可能是 EPO 抗炎作用的另一条途径^[23]。

4.4 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 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 可通过降低细胞内 Ca^{2+} 浓度发挥细胞保护作用, 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^[26]。

近年来研究已证实 EPO 还具有神经营养活性, 能提高脊髓细胞对缺血缺氧的耐受能力, 从而起到神经保护作用。目前研究认为: 抑制神经元细胞凋亡是 EPO 短期神经保护作用的基础, 而 EPO 的神经营养作用则具有长期保护效果^[18]。

5 展望

随着对 EPO 在神经系统中作用的不断深入研究,对于脊髓损伤后神经元的保护作用机制正逐渐被人们所揭示,尽管这种保护机制比较复杂,目前尚未彻底明确,但大量的实验研究已表明,脊髓损伤后一定时间内,导入外源性 rHu-EPO 对于多种类型的急性脊髓损伤及其继发损伤都具有神经保护作用。虽然目前国内外还没有 EPO 应用于临床治疗急性脊髓损伤的报道,但是其明确的神经保护作用,相对较长的应用时间范围及良好的安全纪录,均使人们有理由相信 rHu-EPO 有可能成为将来治疗急性脊髓损伤更为理想的生物制剂。另外,由于 EPO 的神经营养作用具有长期保护效果,可能为 EPO 在更多领域的应用奠定基础。

参考文献

- [1] Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors [J]. *Oncologist*, 2003, 8(suppl 1):15—18.
- [2] Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, et al. Erythropoietin is a multifunctional tissue—protective cytokine [J]. *Curr Hematol Rep*, 2003, 2(6):465—470.
- [3] 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]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(4):393—403.
- [4] Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* [J]. 2001, 79(3—4):228—235.
- [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] Bernaudin M, Bellail A, Marti H H, et al. Neurons and astrocytes express Epo Mra: Oxygen—sensing mechanisms that involve the redox—state of the brain [J]. *Glia*, 2000, 30(3):271—278.
- [7] Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin—mediated neuroprotection involves cross—talk between Jak2 and NF— κ B signal in cascades [J]. *Nature*, 2001, 412(6847):641—647.
- [8] Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades [J]. *J Cereb Blood Flow METAB*, 2002, 22(5):503—514.
- [9] 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.
- [10] Kaptanglu 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]. *Neurosurg Rev*, 2004, 27(2): 113—120.
- [11] Rivlin A, Tator CH. Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma [J]. *J Neurosurg*, 1978, 49(6):844—853.
- [12] Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, et al. Tacrolimus suppresses tumour necrosis factor—alpha and protects against splanchnic artery occlusion shock [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 127(2):498—504.
- [13] Bravo G, Rojas—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.
- [14] 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.
- [15] Constantini S, Young W. The effect of methylprednisol and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury rats [J]. *J Neurosurg*, 1994, 80(1):97—111.
- [16] 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—1012.
- [17] 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, 98(7):4044—4049.
- [18] Celik 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.
- [19] Villa P, Bigini P, Mennini T, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(3):971—975.
- [20] 陈宣维, 贾连顺, 林建华, 等. 重组人促红细胞生成素对大鼠脊髓损伤后肿瘤坏死因子— α 表达的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2004, 12(5):362—364.
- [21] La Rosa G, Cardali S, Genovese T, et al. Inhibition of nuclear factor—kappaB activation with pyrrolidine dithiocarbamate attenuating inflammation and oxidative stress after experimental spinal cord trauma in rats [J]. *J Neurosurg Spine*, 2004, 1:311—312.
- [22] 彭昊, 刘世清, 周华. 白细胞介素—10 对大鼠脊髓诱导型一氧化氮合酶基因表达的干预作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21: 735—736.
- [23] 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.
- [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.