

Epo/Epo receptor 系统在神经系统作用的研究^{*}

彭波, 项辉

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 促红细胞生成素(Epo)不仅影响红系细胞,而且是一种多功能的营养因子。在神经发育过程中Epo及其受体的表达显著改变。脑缺血时,Epo的生成量成倍增加,发挥抗炎、增强NO扩血管的作用,并促进血管新生,在缺血部位建立侧枝循环,有助于改善局部缺血状况,对神经元起保护作用。此外Epo还能促进神经元增生。

关键词: Epo; Epo receptor; 神经发育; 脑缺血

中图分类号: Q461 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579(2004)S1-0056-04

在以前的认识中,人们认为促红细胞生成素(erythropoietin, Epo)仅仅影响红系细胞,它通过结合特异的膜受体(EpoR)刺激红系祖细胞的增殖和分化。然而,自从重组Epo和EpoR应用以来,许多试验和临床研究已经表明Epo是一种多功能营养因子,有不同的表达位点,组织特异性调节和作用机制。事实上,已在非红系血细胞和非造血细胞发现了Epo的功能性受体,如髓系、淋巴和巨核细胞,内皮细胞、系膜细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和神经来源的细胞。除肝和肾(分别为胎儿和成人主要的Epo产生部位)外,已发现另外两个可产生Epo的部位:子宫和脑^[1]。在脑的发育过程中Epo和EpoR的表达显著改变,表明Epo/EpoR系统在神经发育中的重要性^[2]。此外,在成人脑中发现缺氧引起的反应性Epo产生,表明在脑损伤后Epo可能起到神经营养因子和神经保护因子的作用。

1 EpoR的分子结构和功能定位

EpoR的基因定位于19号染色体短臂,长约5~6.5 kb,有8个外显子和7个内含子构成,编码一种62 000跨膜蛋白质,由508个氨基酸组成,人与鼠有82%的同源性。其结构可分为3部分:胞膜外部分、跨膜区、胞内区部分。

胞膜外部分有226个氨基酸,N端连接由24个氨基酸组成的信号肽。EpoR膜外部分有两个特殊结构:①在靠近N-末端处含4个保守的半胱氨酸残基;②在近跨膜区有一5-氨基酸结构:Trp-Ser X Trp Ser (WSXWS),X代表任一种氨基酸。保

守的WSXWS结构是受体维持特定构型并与配体结合的必需组成部分,其突变将导致Epo诱导的信号传导功能显著降低。

跨膜区由22个疏水氨基酸构成。

胞内区无明显的酪氨酸激酶区,在靠近跨膜区含Box1和Box2两个高度保守的结构域单元,Box1(8个氨基酸)由一系列疏水氨基酸后接pro-X-X-pro构成,Box2(10~12个氨基酸)为一系列疏水氨基酸后接1~2个指定的氨基酸。Box1是EpoR与酪氨酸激酶相联系的部位,例如JAK2是一种典型酪氨酸激酶,它是通过Box1与EpoR结合在一起,激活后可发挥其激酶活性。JAK2的活性对介导Epo生长信号是至关重要的。若去除EpoR的Box1则JAK2不能激活,也不引起细胞的增殖。EpoR胞内区含8个酪氨酸残基,Epo刺激使均发生磷酸化,其中Tyr343位于近跨膜区,其他均位于C末端。这些磷酸化位点是EpoR与含SH2的效应蛋白的结合部位。

2 Epo的临床应用

传统认识中,Epo是一种作用于骨髓造血细胞,促进红系祖细胞增生、分化、最终成熟的内分泌激素。临床上广泛应用于各种贫血的治疗。其中最有效的是肾衰、尿毒症所伴随贫血的治疗。其他对肿瘤相关性贫血、人类免疫缺陷病毒相关贫血、骨髓移植后贫血、早产儿和孕产妇贫血,围手术期减少异源性输血等方面也有良好的疗效。

* 收稿日期: 2004-04-18

基金项目: 广东省重大科技专项基金资助项目(01-022-422516)

作者简介: 彭波(1973年生),女,讲师;通讯联系人: 项辉; E-mail: ls44@zsu.edu.cn

3 Epo 和 EpoR 在神经细胞和脑的表达和调节: 在神经发育中的作用

Masuda 等^[3]首先在两种神经来源的啮齿类细胞系—PC12 和 SN6 细胞发现了 EpoR 的存在。Epo 由星形胶质细胞产生, 与邻近神经元的 EpoR 结合, 缺氧时 Epo 表达显著增加。由于完整的血脑屏障似乎阻止了肾脏来源的循环 Epo 的通过^[2], Epo 可通过旁分泌和自分泌的方式作用于神经元, 不依赖于内分泌 Epo 系统。在大鼠、猴和人的胚胎、胎儿和成年脑的特殊部位已发现 Epo 和 EpoR。在前脑皮层、海马、小脑和扁桃体可见 Epo 和 EpoR mRNA, 且在诱发性贫血小鼠的脑(低 O₂ 水平时)表达增加^[4,5]。

在神经发育过程中 Epo 和 EpoR 的表达显著改变。在小鼠胚胎神经组织和脑可见高水平 EpoR 的表达, 可达到相似于成人骨髓的水平。在脑的发育和成熟过程中, EpoR 表达显著减少, 出生后减少 100 倍。

在脑的发育过程中, 神经管 EpoR 的表达是最早可检见的 EpoR, 且 Epo 和 EpoR 在中枢神经系统的分布随着妊娠月份的增加而变化^[6]。Juul 等^[7,8]应用 RT-PCR 和免疫组化方法评估了从怀孕后 5 周、胚胎发育至成人阶段 Epo 和 EpoR 在人脑的分布。早在怀孕后 5 周即可检见 Epo 和 EpoR mRNA。在 5~6 周, Epo 和 EpoR 染色主要出现在室周区的未分化神经上皮细胞, 该区是新生神经元的生发区。随着发育的进展, 两种蛋白的表达方式发生了改变。在第 10 周, Epo 存在于整个皮质层, 最强的免疫反应出现在室带和室下带。EpoR 主要定位于室下带, 该区含有可发展为寡突胶质细胞和星形胶质细胞的多潜能细胞。随着神经分化的进展, EpoR 的染色开始主要位于星形胶质细胞, 而 Epo 主要位于神经元。这些发现不同于在小鼠模型报道—EpoR 的主要位于神经元, 而 Epo 主要位于星形胶质细胞。然而, 在生后和成人脑, 星形胶质细胞和神经元都可与 EpoR 和 Epo 的抗体反应。在其他细胞类型也发现了 Epo 和 EpoR 表达, 如 Cajal-Retzius 神经元和脉络丛细胞。在成人脑中 EpoR 的量较造血组织少 30 倍, 与鼠相似。发育脑和成熟脑中存在 Epo 和 EpoR 表明他们在神经发育中起作用^[9-11]。

在 Epo 和 EpoR 敲除小鼠模型, 由于胎肝不能生成红细胞, 大约在胚胎第 13.5 天小鼠死亡。这些鼠伴同时伴有其他的器官异常, 如心室发育不良、胎肝、心和脑凋亡增加等。最近, Yu 等^[12]发

现这些缺陷在表达 EpoR 的转基因动物可得到纠正。

神经元 Epo 免疫组化阳性表明神经元也可产生 Epo。1998 年, Juul 等^[13]发现不仅星形胶质细胞, 而且神经元能产生 Epo。2000 年, Bernaudin 等^[14]发现来源于 OF1 小鼠胚胎神经元的培养细胞表达 Epo mRNA, 缺氧时表达显著增加, 而放线酮(一种蛋白质合成抑制剂)可完全阻止表达。作者认为相似于肝癌细胞系和肾的 O₂ sensing 系统, 可能控制了星形胶质细胞和神经元的 Epo 产生。而且两种在缺氧的肝癌细胞诱导 Epo 产生的试剂, desferrioxamine 和 CoCl₂, 能够诱导星形胶质细胞和神经元的 Epo mRNA 的表达。

4 Epo 在脑缺血时的神经元保护作用

近来大量研究表明 Epo 的生成量与脑组织的供血供氧情况相关。脑缺血时, Epo 的生成量成倍增加, 并对神经元起保护作用。事实上, Epo 生成增多是机体生理性自我保护机制的一个重要组成部分。脑缺血时, 局部会生成一种缺氧反应因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1), HIF-1 进入细胞并到达核内与染色体上的缺氧反应成分(hypoxia response element, HRE)相结合, 启动一系列基因的转录, 包括葡萄糖转运蛋白, 糖酵解酶系, 血管内皮生长因子(VEGF)以及 Epo。

低 O₂ 水平和贫血使脑 EpoR 的表达上调^[5]。在体外培养细胞 NT2 (人神经元前体细胞系), 缺氧诱导 EpoR 的合成。缺氧状态下添加 Epo 到培养基中, 可使细胞生长恢复到或超过无低 O₂ 压的水平。缺氧和贫血应激状态都可诱导 Epo 和 EpoR 的表达, 提高 EpoR 对 Epo 的敏感性。

缺氧可能并不是仅有的脑 Epo 产生的相关刺激剂。其他代谢紊乱, 如低血糖症或强的神经元去极化可通过激活 HIF-1 增加脑 Epo 表达^[19]。而且, 胰岛素和胰岛素样生长因子以剂量依赖的方式刺激培养星形胶质细胞的 Epo mRNA 的表达。

5 脑缺血及其他代谢性应激中 Epo 的作用

大量实验证明, 在脑缺血或其他代谢障碍时, Epo 能够保护神经元, 提高神经元的存活能力。在大鼠大脑中动脉栓塞模型中^[17], 栓塞前 24 h 脑室内注射 Epo 能有效减少梗塞面积(47%, $P < 0.0002$)。同时还发现 Epo 能维持梗塞后大鼠的定向力和学习能力, 明显改善梗塞区的神经功能。体外神经元培养(主要是海马和皮层神经元)进一步

证明, 在缺血、谷氨酸或红藻氨酸 (兴奋性毒素) 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。

细胞死亡分为细胞凋亡和炎性坏死两种方式。Epo 对神经元的保护作用得益于对这两种方式的双重阻断。一方面, Epo 对缺血造成的神经元凋亡有很强的阻断作用。大鼠脑梗塞模型的脑组织切片的 TUNEL 染色发现, 实验组 (栓塞同时静注 Epo) 局部缺血内的阳性标记凋亡神经元明显少于对照组, 甚至消失。体外实验的结果也同样印证了 Epo 的抗凋亡作用^[18]。另一方面, 在对 10 个血液透析病人的调查中发现, 接受 Epo 治疗 6 个月后, 病人体内的致炎因子 TNF 减少、抗炎因子 IL-10 增多。同样是以血液透析病人为对象, Sela 等^[19]用多种方法证实, 病人多形核白细胞的胞膜上有 EpoR, 还发现 Epo 能够抑制多形核白细胞所引发炎症反应。更为直接的证据是给实验诱发的自身免疫性脑膜炎大鼠注射 Epo 后, 脑膜炎症状得到明显改善^[20]。以上诸多事实证明 Epo 还具有抗炎作用。

此外有研究证明, Epo 能增强 NO 的扩血管作用, 明显缓解血管挛缩, 并能直接作用于血管内皮细胞, 促进血管新生, 在缺血部位建立侧枝循环。这些作用都有助于改善局部缺血状况, 有助于缺血部位神经细胞的存活。

应该注意的是, 虽然 Epo 能够对脑缺血后的神经元凋亡起明显的阻断作用, 从而提高神经元的存活能力, 但 Epo 的作用只是暂时性的阻断细胞死亡, 尽量降低缺血造成的组织损伤, 推迟组织坏死的过程, 并不能彻底解除缺血造成的损害。如果脑部缺血状况持续得不到改善, 即使及时使用了 Epo, 细胞死亡仍然在所难免。这与其他抗凋亡因子的作用特点相一致。

6 其他作用

(1) 神经元增生作用。除了在代谢异常条件下的神经元保护作用, Epo 在正常生理条件下具有促使神经元增生肥大、树突增多、功能增强、分化良好等一系列营养性作用。

(2) 保护红细胞膜。Epo 能防止氧自由基攻击红细胞膜, 避免脂质过氧化物的发生。

参考文献:

[1] CHIKUMA M, MASUDA S, KOBAYASHI T, et al. Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain and uterus[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 279: E1242—E1248.

[2] MARTI H, GASSMAN M, WENGER R H, et al. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain[J]. *Kidney Int*, 1997, 51: 416—418.

[3] MASHDA S, NAGAO M, TAKAHATA K, et al. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 11208—11216.

[4] MARTI H, WEMGER R H, RIVAS L A, et al. Erythropoietin gene expression in human, mokey and muine brain [J]. *Eur J Neurosci*, 1996, 8: 666—676.

[5] LI Y, JUUL S, MORRIS WIMAN J A, et al. Erythropoietin receptors are expressed in the central nervous system of midtrimester human fetused[J]. *Pediatr Res*, 1996, 40: 376—380.

[6] LIU C, SHEN K, LIU Z, et al. Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 32395—32400.

[7] JUUL S E, YACHNIS A T, ROJIANI A M. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain[J]. *Pediatr Dev Pathol*, 1999, 2: 148—158.

[8] JUUL S E, YACHNIS A T, CHRISTENSEN R D. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetuses[J]. *Early Hum Dev*, 1998, 52: 235—249.

[9] JUUL S E. Erythropoietin in the neonate[J]. *Curr Probl Pediatr*, 1999, 29: 129—149.

[10] JUUL S E. Nonerythropoietic roles of erythropoietin in the fetus and neonate[J]. *Clin Perinatol*, 2000, 27: 527—541.

[11] DAME C, BARTMANN P, WOLBER E, et al. Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2000, 125: 69—74.

[12] YU X, LIN C S, COSTANTINI F, et al. The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse[J]. *Blood*, 2001, 98: 475—477.

[13] JUUL S E, ANDERSON D K, LI Y, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system[J]. *Pediatr Res*, 1998, 43: 40—49.

[14] BERNAUDIN M, BELLAIL A, MARTI H H, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain[J]. *Glia*, 2000, 30: 271—278.

[15] CHIN K, YU X, BELESLIN-COKIC B, et al. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain [J]. *Mol Brain Res*, 2000, 81: 29—42.

[16] CHANDEL N S, MALTEPE E, GOLDWASSER E, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998,

95: 11715—11720.

[17]BERNAUDIN M, MARTI H H, ROUSSEL S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice[J] . J Cereb Blood Flw Metab, 1999, 19: 643—651.

[18]SIREN A L, FRATELLI M, BRINES M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 4044—4049.

[19]SELA S, SHURTA-SWIRSKI R, SHARON R, et al. The polymorphonuclear leukocyte: a new target for erythropoietin[J] . Nephron, 2001, 88: 205—210.

[20]BRINES M L, 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: 10526—10531.

Studies on Epo/Epo receptor in the Functions of Nervous System

PENG Bo, XIANG Hui

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Erythropoietin (Epo) has effects on the cells of erythroid, and it's a multifunctional nutrition factor also. The expression of Epo and its receptor will change remarkably in the development of nervous system. When the cerebrum is blood lacking, the creation of Epo will increase in gemination. Epo has effects on anti inflammation, and it can boost up the enlarging veins effects of NO. Epo can accelerate the renascence of veins and build up side—branch circulation in the blood lacking place, that can help to improve the situation of local blood lacking and protect the neurons. Epo can improve the hyperplasia of neurons.

Key words: Epo; Epo receptor; the development of nervous system; cerebrum blood lacking