

红细胞生成素及其衍生物治疗脊髓损伤的研究进展

周传利, 陈晓亮, 郑修军

(山东省青岛大学医学院附属医院骨科 266003 青岛市)

中图分类号: R683.2, Q571 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2008)-05-0395-04

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后,除创伤造成的直接损伤外,脊髓局部还将发生一系列继发性病理改变,如血管病变、缺血再灌注、谷氨酸兴奋性中毒、离子稳态失衡、细胞氧化损伤、严重的炎症应答及细胞凋亡等,而且造成的损害超过原发性损伤,最终会导致脊髓的进行性变性^[1,2]。针对以上直接损伤及继发性病理变化目前尚没有很好的治疗方案,这是脊柱外科以及临床康复亟待解决的难题。

红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种内源性的造血生长因子,调节红细胞生成,在医学上常用来治疗贫血、慢性肾衰或药物中毒。但最近研究表明, EPO 是一种多功能营养因子及神经保护因子,具有调节中枢神经系统发育、神经营养及神经保护作用,能够保护缺血、缺氧和神经系统变性疾病中大脑神经元的损伤^[3]。另外,新的 EPO 衍生物的出现较 EPO 本身具有更直接的神经保护作用,羧甲基化 EPO(carbamylated erythropoietin, CEPO)、去唾液酸基 EPO 不能与正常红细胞生成素受体(erythropoietin receptor, EPO-R)结合,在人类细胞信号试验或长期用于各种动物未见任何造血活性^[4]。这表明, CEPO 和各种非造血 EPO 衍生物在体外可保护细胞,对中风、脊髓压迫、糖尿病性神经病及实验性自体免疫性脑脊髓炎具有保护作用 and 潜在临床应用价值^[5,6]。基于此,笔者对 EPO 及其主要衍生物在中枢神经系统尤其在脊髓损伤治疗方面的实验研究作一综述。

1 EPO 及其衍生物的结构及生物学功能

1.1 EPO 及其受体结构与功能

EPO 是一个分子量为 34kD 的糖蛋白,其基因位于 7q11-q22,由 5 个外显子和 4 个内含子组成。EPO 通过与 EPO-R 结合而发挥作用, EPO-R 是一种分子量为 66kD 的膜受体,其基因定位于染色体 19p13.3。该受体是 508 个氨基酸残基组成的跨膜蛋白,其中包括一个 24 个氨基酸的信号肽、226 个氨基酸的跨膜片段和一个 236 个氨基酸的胞浆区。

EPO/EPO-R 在神经系统发育过程中高表达,出生后表达下调,神经损伤后表达再度上调,显示 EPO/EPO-R 可

能是内源性的神经保护系统。中枢神经系统内 EPO 的表达受多种因素影响,缺血、缺氧是影响 EPO 生成的关键因素^[7]。但研究表明脊髓损伤后脊髓内神经元和少突胶质细胞中 EPO 及其受体表达并不平行,内源性 EPO 表达相对不足,而大量表达 EPO 受体的神经元和少突胶质细胞处于缺乏 EPO 的状态,因此不能启动 EPO 和 EPO-R 结合后的一系列神经保护信号传导途径,导致神经细胞死亡,功能缺失。因此对外源性 EPO 或重组 EPO 的研究成为热点。

1.2 重组人 EPO(recombinant human erythropoietin, rHu-EPO)的结构与功能

重组人 EPO(rHu-EPO)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,生物学活性也相似。作为一种含唾液酸的酸性蛋白质,由 165 个氨基酸组成,结构中有 4 个半胱氨酸形成两条二硫键。成分包括 60%蛋白质(重量)及 40%的碳水化合物,碳水化合物部分由 3 个 N-键复合碳水化合物侧链及 1 个 O-键侧链组成。N 末端前有 27 个高度疏水的氨基酸构成分泌前导肽。去唾液酸或去糖基化不影响本品的体外生物学活性,但却缩短了在体内的半衰期,使其完全丧失了体内的活性。Grasso 等^[8]研究表明,去唾液酸基 EPO 与 EPO-R 具有较高的亲和力,但却具有较短的血清半衰期,而且证明这种非造血衍生物能够在不产生其他不良作用的情况下提供神经保护功能。

2 EPO 及其衍生物对损伤脊髓作用的实验研究

有研究表明, EPO 通过多种途径介导对中枢神经系统损伤产生保护作用:降低炎症反应、抑制凋亡和恢复血管的自动调节功能、促进神经干细胞和祖细胞增殖与分化等。

2.1 EPO 及其衍生物对抗炎症的作用

Sela 等^[9]经多种方法证实,血液透析患者多型核白细胞的胞膜上有 EPO-R,还发现 EPO 能抑制多型核白细胞的致炎反应。在应用 EPO 后 6 个月,患者体内的致炎因子、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)减少、抗炎因子白介素-10(interleukin-10, IL-10)增多。更直接的证据是给肿瘤实验诱发的自身免疫性脑膜炎大鼠注射 EPO 后,脑膜炎症状明显改善^[10]。Gorio 等^[11]通过鼠脊髓损伤模型对比伤后 1 个月应用 EPO 和甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)对致炎因子生成、组织损伤和运

第一作者简介:男(1981-),硕士研究生在读,研究方向:脊柱外科
电话:(0532)82911331 E-mail:justin_5257@hotmail.com

功功能的作用,发现只有 EPO 与小神经胶质细胞的浸润、减少瘢痕形成和持续的神经恢复有关。Okutan 等^[12]对大鼠急性脊髓损伤模型进行了此类研究,伤后 24h 开始功能评价并检测细胞凋亡蛋白酶 (caspase-3) 和髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性,发现伤后两者水平较正常组明显升高,而经 EPO 或者 MPSS 治疗后有明显降低。表明 EPO 能够促进脊髓损伤后早期的功能恢复。需要指出的是,尽管 EPO 和 MPSS 对脊髓损伤都具有明显的抗炎作用,但是两者却没有协同作用,同时服用 MPSS 会拮抗 EPO 的神经保护作用^[11]。

2.2 EPO 及其衍生物对细胞凋亡的作用

中枢神经细胞在缺血再灌注损伤中主要表现为细胞凋亡,这是由基因调控的一种程序性细胞死亡。B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, bcl-2) 和 B 细胞相关 X 蛋白 (bcl-2 associated X protein, bax) 是一组在细胞凋亡中发挥重要作用的抗/促凋亡因子,它们可各自形成同源二聚体,也可相互形成异源二聚体。bax/bax 二聚体的过量表达可促进凋亡的发生, bcl-2 表达增高可抑制凋亡的发生, bcl-2 通过与 bax 形成 bcl-2/bax 异源二聚体可抑制凋亡的发生,维持细胞的活性。体内外研究^[13]显示 EPO 能够抑制缺血诱导的中枢神经细胞的凋亡,可以降低缺氧条件下凋亡的发生;外源性 EPO 能减轻因缺血所导致的脊髓细胞凋亡,这种作用可能与下调 bcl-2 和上调 bax 蛋白表达有关。也说明这种外源性 EPO 可能与脑源性 EPO 的保护机理类似。基于外源性 EPO 与脑源性 EPO 相似的神经保护机理,外源性 EPO 将可能作为一种治疗药物应用于临床。

已证实 EPO 可以在缺氧时促进神经元的存活^[14], EPO 对缺血神经元具有很强的抗凋亡作用。在动物实验中发现大鼠在缺血前后给予 EPO 能减少海马和皮层神经元的死亡^[15]。Siren 等^[14]对大鼠脑梗死组织切片进行末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸尾标记 (terminal doxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 发现, EPO 使局部缺血半影区内的阳性标记凋亡神经元明显减少,甚至消失。Celik 等^[16]报道,正常脊髓前角运动神经元大量表达 EPO-R, 静脉注射 rHu-EPO 可使缺血诱导的运动神经元凋亡减少,神经功能障碍减轻。对照组 (生理盐水) 脊髓前角运动神经元可见 TUNEL 标记,而 rHu-EPO 处理组则否,表明 EPO 可以阻止缺血诱导的神经元凋亡。体外实验也证明 EPO 具有抗凋亡作用^[14]。Morishita 等^[17]将培养的鼠胚海马和皮层神经置于谷氨酸 15min 后再培养 24h,发现在置于谷氨酸前 8h 经 EPO 处理的细胞存活数增加,而应用可溶性 EPO 抗体的细胞则明显减少。王金光等^[18]将 30 只 Sprague-Dawley (SD) 大鼠根据脊髓损伤及治疗情况分为 4 组:空白组、损伤组、治疗 A 组和治疗 B 组,观察药物治疗 (rHu-EPO 和 β -七叶皂甙钠) 前后大鼠的神经功能行为、红细胞、血红蛋白的变化,发现 rHu-EPO 能抑制脊髓神经细胞凋亡,对损

伤脊髓的神经功能具有保护作用,联合应用 rHu-EPO 和 β -七叶皂甙钠效果更明显。

综上,外源性的 EPO 能够明显降低脊髓运动神经细胞的损害,其机理可能是通过调控 bcl-2/bax 表达而实现对神经细胞活性的保护作用,但是外源性 EPO 是如何与脊髓运动神经细胞发生作用,以及通过何种信号级联途径来调控 bcl-2/bax 的表达,进而实现对神经细胞凋亡的启动的抑制作用,仍需进一步研究。

2.3 EPO 对血管内皮细胞的作用研究

Anagnostou 等^[19]的研究表明,血管内皮细胞上有 EPO 受体。Carlini 等^[20]研究表明,在体外 rHu-EPO 可增加神经血管的形成。吴岩等^[21]研究发现, rHu-EPO 可以抑制脂多糖诱导的内皮细胞凋亡。Marti 等^[22]发现, EPO 还可以促进缺血区域的血管增生,在缺血部位建立侧支循环,从而起到间接保护神经的作用。Bernaudin 等^[23]证实在缺血后第 1 天病灶血管内皮细胞有 EPO mRNA 表达。以上研究表明, EPO 能促进血管内皮细胞增殖和新生血管形成。脊髓损伤后有大量血管内皮细胞表达 EPO-R, EPO 作为血管内皮细胞的丝裂原,刺激内皮细胞增殖迁移,形成血管。还可通过提高来自骨髓的循环内皮祖细胞募集,刺激血管的新生,增加组织内氧供,缓解局部缺氧。

2.4 EPO 对神经干细胞和祖细胞增殖与分化的作用

EPO 可以促进祖干细胞的生长和增殖,提高胚胎皮质神经元的生存力,促细胞存活并可上调神经祖细胞的增殖反应。在一些细胞群中,如前脑神经干细胞, EPO 选择性地促进神经祖细胞的产生。和其他造血因子一样, EPO 也充当着分化细胞的神经营养因子,例如 EPO 可以影响细胞的再生、分化和存活,并诱导干细胞分化为多巴胺能神经元或星形胶质细胞^[24]。有研究表明^[10]在实验性自身免疫脑脊髓炎的鼠模型中给予 rhuEPO 能够促进少突神经胶质细胞的增殖和髓鞘形成,以促进神经功能恢复。

3 EPO 对中枢神经系统的保护机制

实验证明神经细胞可产生内源性 EPO,以旁分泌的方式发挥保护作用。各种原因造成的中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 损伤可促使 EPO 的分泌, EPO 通过与 EPO-R 结合启动信号传导通路。同样当给予外源性的 EPO 后, EPO 与神经元和少突胶质细胞上的 EPO-R 结合,使受体形成二聚体,蛋白酪氨酸激酶 2 (JAK2) 发生自磷酸化反应和受体活化,激活一系列的受体后保护机制。

3.1 激活 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 转录途径

最新的研究表明, EPO 能够激活 CREB 转录途径并增加脑源性神经营养因子的表达,这促成了 EPO 介导的神经保护作用。Sonmez 等^[25]通过建立鼠脊髓局部缺血模型,再灌注之初静脉内给一定剂量的 rHu-EPO,发现 EPO 能够加速运动缺陷恢复,阻止短暂性局部缺血后脊髓中运动神经元的死亡。其机制是脊髓缺血性损伤诱导脊髓前角中 pCREB 的磷酸化,而 EPO 能明显促进脊髓前角中

pCREB 的表达。

3.2 抑制兴奋性氨基酸的毒性作用

兴奋性氨基酸在各种脑损伤,特别是缺血性脑损伤的发病机制中起重要作用。Kawakami 等^[26]研究发现,EPO 能使钙离子诱导培养的小脑粒细胞神经元的谷氨酸释放受抑制,使神经元的死亡减轻;EPO-R 的合成肽拮抗剂 EMP1 (EPO mimetic peptide 1) 可通过抑制谷氨酸的胞吐作用而产生类似效应。由于 EPO 和 EMP1 都可激活与 EPO-R 相连的酪氨酸激酶 Janus 激酶 2 (Jak2)。因此推测 EPO 减少神经元死亡的作用是通过激活 EPO-R 和 Jak2,从而抑制谷氨酸释放这一机制实现的。

3.3 激活酪氨酸激酶 Janus 激酶 2 (Jak2)

Jak2 在 EPO 的信号传导中起着关键的作用。Parganas 等^[27]发现 Jak2 基因缺陷小鼠因红细胞生成障碍而死于胚胎期,即使应用 EPO 也不能改变结局。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磷酸酰肌醇-3-激酶 (PI3K)、信号转导子和转录活化子 5 (STAT5)、Shp1 等磷酸化而相继被激活,产生一系列效应。

3.4 其他相关机制

①激活磷酸酰肌醇-3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 后激活蛋白激酶 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;②激活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。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。故 Jak2/STAT5 通路也可能参与了神经细胞的缺血性保护;③钙离子内流及 EPO-R 的负调节机制都可能参与了 EPO 对 CNS 的保护作用。EPO 可能通过蛋白酪氨酸磷酸酶 (protein tyrosine phosphatase, PTP) 和细胞因子信号抑制因子家族成员 CIS (cytokine inducible SH2-containing protein) 发挥负调节作用^[28];④上调消耗氧自由基的酶,或下调消耗能量的酶,保护脊髓组织免受缺氧损伤,从而减少神经元和少突胶质细胞的丢失。另外,在 CNS 损伤后 EPO 信号传导中,还可能激活了 Ras/MEK/ERK 通路,但该通路在脑保护中起何种作用仍不明确。

总之,EPO 及其衍生物的神经营养和神经保护功能正日益引起人们的高度重视,尤其为脊髓损伤患者的康复治疗带来了新的希望。但诸多问题有待进一步研究,如内源性 EPO 的表达规律、外源性 EPO 的治疗时间窗和量效关系以及如何早期安全有效地进行临床应用等。

4 参考文献

1. Ramer MS, Harper GP, Bradbury EJ. Progress in spinal cord research—a refined strategy for the International Spinal Re-

- search Trust[J]. Spinal Cord, 2000, 38(8): 449–472.

2. Baptiste DC, Fehlings MG. Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(3–4): 318–334.
3. Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage[J]. Acta Paediatr, 2002, 91(438): 36–42.
4. Doggrel SA. A neuroprotective derivative of erythropoietin that is not erythropoietic [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2004, 13(11): 1517–1519.
5. 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.
6. Hasselbatt M, Ehrenreich H, Siren AL. The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease[J]. L Neurosurg Anesthesiol, 2006, 18(2): 132–138.
7. Sirén AL, Knerlich F, Poser W, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain [J]. Acta Neuropathol, 2001, 101(3): 271–276.
8. Grasso G, Sforzetta A, Erbayraktars, et al. Amelioration of spinal cord compressive injury by pharmacological preconditioning with erythropoietin and a nonerythropoietin derivative [J]. J Neurosurg Spine, 2006, 4(4): 310–318.
9. Sela S, Shurtz SR, Sharon R, et al. The polymorphonuclear leukocyte: a new target for erythropoietin [J]. Nephron, 2001, 88(3): 205–210.
10. Savino C, Pedotti R, Baggi F, et al. Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis [J]. J Neuroimmunol, 2006, 172(1–2): 27–37.
11. Gorio A, Madaschi L, Di Stefano B, et al. Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(45): 16379–16384.
12. Okutan O, Solaroglu I, Beskonakli E, et al. Recombinant human erythropoietin decreases myeloperoxidase and caspase-3 activity and improves early functional results after spinal cord injury in rats [J]. J Clin Neurosci, 2007, 14(4): 364–368.
13. 吴天顺, 任先军, 滕晓华, 等. 促红细胞生成素对脊髓缺血再灌注损伤保护作用及其机理的实验研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(9): 677–679.
14. Sirén 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.
15. 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.
16. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury [J]. Natl Acad Sci US-

- A, 2002, 99(4):2258-2263.
17. 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.
18. 王金光, 郑启新, 郭晓东. 重组人红细胞生成素与 β -七叶皂甙钠治疗大鼠脊髓损伤的实验研究 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2003, 13(11):674-677.
19. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, et al. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells [J]. Natl Acad Sci USA, 1994, 91(9):3974-3978.
20. Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro [J]. Kinsey Int, 1995, 47(3):740-745.
21. 吴岩, 陈友琴, 龚丽, 等. 重组人促红细胞生成素抑制内皮细胞凋亡的实验研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2001, 18(3):185-186.
22. Marti HH, Bernaudin M, Petit E, et al. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia[J]. News Physiol Sci, 2000, 15:225-229.
23. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice [J]. Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19(6):643-651.
24. Lee SM, Nguyen TH, Park MH, et al. EPO receptor-mediated ERK kinase and NF- κ B activation in erythropoietin-promoted differentiation of astrocytes [J]. Biochem Biophys Commun, 2004, 320(4):1087-1095.
25. Sonmez A, Kabakci B, Vardar E, et al. Erythropoietin attenuates neuronal injury and potentiates the expression of pCREB in anterior horn after transient spinal cord ischemia in rats[J]. Surg Neurol, 2007, 68(3):297-303.
26. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, et al. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia [J]. Biol Chem, 2001, 276(42):39469-39475.
27. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors [J]. Cell, 1998, 93(3):385-395.
28. Rtner M, Nielsch U, Mayr LM, et al. A new high affinity binding site for suppressor of cytokine signaling-3 on the erythropoietin receptor[J]. Eur Biochem, 2002, 269(10):2516-2526.
- (收稿日期:2007-04-06 修回日期:2007-08-16)
(本文编辑 彭向峰)

消息

颈椎外科基础与临床研究新技术学习班通知

宁波市第六医院骨科拟于 2008 年 6 月 19~22 日举办国家级继续医学教育项目“颈椎外科基础与临床研究新技术学习班”(编号:2008-04-07-065),届时将由著名颈椎外科专家贾连顺、胡永成、徐林、尹庆水、徐荣明、马迅、陈其昕、徐华梓、马维虎等教授授课。

授课内容:当代颈椎外科研究进展、枕颈内固定技术、寰枢椎椎弓根和侧块螺钉内固定技术的基础及临床研究、经口咽入路治疗难复性寰枢关节脱位、上颈椎四点内固定技术基础及临床研究(Apofix+Magerl 技术)、枢椎椎板螺钉内固定技术的基础及临床研究、Hangman 骨折的手术治疗策略、齿状突骨折的外科治疗策略、下颈椎椎弓根螺钉内固定技术的基础及临床研究、下颈椎侧块螺钉内固定技术的基础及临床研究、下颈椎关节突螺钉内固定技术的基础及临床研究、人工颈椎椎间盘置换技术、颈椎前路内固定技术、一期前后路手术治疗颈椎疾患、颈椎手术失败原因的分析及处理对策、颈椎围手术期处理、颈椎椎弓根螺钉导航技术、颈椎肿瘤治疗策略等。

学习班以具有 5 年以上骨科临床基础的医师为主要对象,鼓励学员携带疑难病例资料交流,计划招收学员 50 名,按报名先后顺序录取,额满为止。学习班结束后,授予国家级 I 类学分 10 分。会务费 800 元(含资料费),住宿费用自理。同时,本院常年招收进修医师。

报名截止日期:2008 年 5 月 31 日。

联系方式:浙江省宁波市中山东路 1059 号 宁波市第六医院脊柱外科 胡勇 博士, 科教科 谢辉 魏素华; 邮编:315040; 电话:(0574)87801999 转 1322; 传真:(0574)87801999 转 1322; E-mail: huyong610@163.com。