

脑红蛋白和缺氧缺血性脑损伤

张莉, 李丽华 综述 屈艺, 母得志 审校

(四川大学华西第二医院儿科, 四川 成都 610041)

[中图分类号] R722.1 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2008)02-0265-04

脑红蛋白(Ngb)由 Moens 等^[1]在 2000 年首次报道,为在大脑中发现的一种新携氧球蛋白,是血红蛋白家族的新成员。Ngb 主要在神经元表达,能可逆性结合氧,对神经元氧的摄取、运输和利用起着极其重要的作用,被誉为神经元内的呼吸球蛋白,相当于肌组织中的肌红蛋白。神经元缺氧和脑缺血能诱导 Ngb 表达,体内外实验均表明其表达增加具有神经保护作用,能增强脑组织对缺氧和缺血损伤的耐受。在缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)、脑卒中等疾病中,Ngb 能提高神经元存活率,为治疗 HIBD 和脑卒中提供了新的理论依据。本文对 Ngb 与 HIBD 的关系及 Ngb 的神经保护作用加以综述。

1 Ngb 的体内分布及其结构

Ngb 是新发现的一种球蛋白。球蛋白属于血红蛋白家族的一员,能结合、转运、感受并清除一些气体分子如 O₂, CO, NO 等,在各个器官氧气利用中发挥非常重要的作用,其表达具有器官特异性^[2]。目前已证实的脊椎动物球蛋白有 4 种,Ngb、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、肌红蛋白(myoglobin, Mb)、细胞红蛋白(cytoglobin, Cygb),它们在蛋白结构、组织分布及功能上不尽相同。Hb 是最早发现的一类携氧球蛋白,与其他球蛋白结构不同,为四聚体蛋白,主要存在于血液红细胞,在组织中运输氧气。Mb 是单链蛋白,主要分布在骨骼肌和心肌细胞的细胞质中,具有短暂储氧功能,便于氧气弥散。Cygb 广泛存在于各种组织,主要分布于成纤维细胞和成纤维样细胞,神经元中也有表达,但其作用尚不完全清楚,可能与胶原合成、参与一些特殊酶系反应、清除活性氧簇有关。Ngb 主要在脊椎动物中枢和外周神

经系统的神经元胞浆中表达^[3],在某些动物的星形胶质细胞中也有表达。哺乳动物视网膜的感光细胞 Ngb 含量最丰富,是脑中的 100 倍,与该细胞高耗氧量有关;一些内分泌组织和细胞也有少量分布,如脑垂体腺前叶、肾上腺、睾丸的精原细胞和初级精母细胞、胰腺的胰岛细胞。Ngb 基因定位于 14q24,含有 4 个外显子和 3 个内含子,是一类高度保守的蛋白质,种属之间的同源性很高,人和鼠的 Ngb 氨基酸序列仅有 6% 的差异。Ngb 是由 151 个氨基酸组成的单一多肽链,分子量约 17 kDa,与 Hb、Mb 的氨基酸序列同源性达 21% ~ 25%。Ngb 属于辅基血红蛋白蛋白,含有一个铁卟啉环结构,有 6 个配位键,其近端组氨酸残基是辅基血红素的结合位点,远端组氨酸残基含有结合辅基血红素-结合配体的位点,苯丙氨酸残基和辅基血红素相互作用,该结构使 Fe²⁺可稳定在血红素分子中,并避免 Fe²⁺氧化为无携氧能力的 Fe³⁺。Fe²⁺的第六个配位体即是可逆性结合的氧分子^[4,5],而且这种结合不易解离,提示 Fe²⁺与氧分子含有很高的内在亲和性。Ngb 与氧的亲合力高于 Hb,但比 Mb 低 2 倍左右。

2 Ngb 的表达及调控机制

2.1 Ngb 在不同动物及不同动物模型中的表达

Ngb 在不同动物及不同动物模型中的表达部位和表达量不同。胡志兵等^[6]在大鼠脑缺血模型中,发现 Ngb 在大脑中广泛表达,皮质明显多于纹状体。Sun 等^[7]发现在幼年、中年、老年大鼠的皮质、海马、尾状核和小脑等部位,Ngb 表达呈年龄相关性减少,即随着年龄的增长逐渐减少,提示具有神经保护作用的 Ngb 丢失可能在年龄相关性神经障碍性疾病中起着重要作用。并发现大鼠大脑 Ngb 主要

[收稿日期]2007-05-21; [修回日期]2007-07-04

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30570623);教育部留学回国人员启动基金(2006331-11-7)。

[作者简介]张莉,女,博士研究生,医师。主攻方向:新生儿专业。

在神经元中表达,在星形胶质细胞则无表达。但也有报道在原代培养的新生小鼠大脑皮质星形胶质细胞中,应用实时逆转录多聚酶链反应和免疫染色证实星形胶质细胞中 Ngf 的存在。原代培养皮质神经元在低氧、去铁胺、氯化钴刺激后,Ngf 蛋白及其 mRNA 表达增加,且主要在 DNA 未损伤的细胞中表达。在大鼠大脑中动脉堵塞模型中,Ngf 也主要在缺血区正常神经元胞质中表达,尤其在半影区表达量最多^[3]。Ngf 转基因小鼠的皮层神经元、胶质细胞及血管内皮细胞中,Ngf 表达均较野生型增加,且在心肌细胞和心肌血管内皮细胞也有相应增加。Hundahl 等^[8]在大鼠自发性高血压短暂大脑中动脉堵塞模型中,发现堵塞后 24 h,Ngf mRNA 在缺血半球的表达明显减少,纹状体神经元 Ngf 和神经元核心抗原(NeuN)阳性细胞数也明显降低,Ngf 主要在下丘脑和杏仁核表达,提示内源性 Ngf 在该动物模型中并不能对缺血损伤起到神经保护作用。

2.2 Ngf 在缺氧后的表达

缺氧时,Ngf 的表达部位和上调机制存在一定的争议。缺氧时间和程度不同可能导致 Ngf 蛋白及其 mRNA 变化的差异。鱼类较其他脊椎动物生存在氧浓度较低的环境,因此有学者在不同缺氧程度下检测一种鱼类脑 Ngf 的表达,发现轻度缺氧时 Ngf mRNA 水平变化不明显,在严重缺氧时脑内 Ngf mRNA 和蛋白水平明显增加,Ngf mRNA 达高峰时间较蛋白提前 24 h^[9]。Li 等^[10]在大鼠大脑不同缺氧模式中检测大脑皮质 Ngf 蛋白及其 mRNA 的表达情况,发现皮质 Ngf 蛋白及其 mRNA 在持续缺氧过程中表达连续上调,而在间歇缺氧模型中,只在早期表达增加。Sun 等^[3]发现原代培养小鼠皮质神经元缺氧 0~24 h 后,Ngf 表达随缺氧时间延长而逐渐升高,在缺氧 16 h 时 Ngf 蛋白及其 mRNA 表达同时达高峰。Schmidt-Kastner 等^[11]在严重低氧 24 h(0%~1% O₂)的神经细胞系中,发现 Ngf mRNA 表达增加,但在大鼠短暂全脑缺血后并未发现 Ngf mRNA 表达增加。Hundahl 等^[12]发现 Ngf 在小鼠正常脑组织的整个皮质层均有表达,尤其在皮层的鼻周、内嗅区、颞叶,丘脑、下丘脑、脉络丛、嗅球及脑干的颅神经核表达丰富。在中脑中央灰质区和浦肯野细胞出现强表达;在小鼠大脑短暂缺氧(7.6% O₂)2 h 后并未使 Ngf 表达增强和表达范围增加,Ngf mRNA 也无变化,与既往报道^[13]认为在小鼠大脑慢性缺氧(10% O₂)2 周后 Ngf 表达量无明显变化的结论一致,提示在活体内单纯缺氧并不能诱导 Ngf 的表达。也有研究认为 Ngf 只能在急性缺血

缺氧时发挥作用,Fordel 等^[14]发现在海马源性神经细胞系慢性缺氧后,Ngf 的表达并无明显增加。

2.3 Ngf 的调控机制

不同的 Ngf 诱导剂对 Ngf 的调控存在不同的信号通路,其中部分信号通路已证实。低氧诱导的 Ngf 表达可能涉及分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MEK)信号通路,应用 MEK 抑制剂 PD98059,能使 Ngf 表达受抑制。由氯化高铁血红素诱导的 Ngf 表达则与蛋白激酶 G(protein kinase G, PKG)和可溶性鸟苷酸环化酶(the soluble guanylate cyclase, sGC)通路有关,当用选择性 PKG 抑制剂 KT5823 和 sGC 抑制剂 LY83583 时,Ngf 蛋白和 mRNA 水平均明显下降。反之,在加入 cGMP 类似物 8-bromo-cGMP 时,能激活 GPK,从而使 Ngf 蛋白及其 mRNA 水平增加。同时研究者还发现氯化高铁血红素处理细胞后,cGMP 上升约 15 倍,而且和 Ngf 上升时间吻合,提示 cGMP 参与了 Ngf 表达的信号调控,PKG 和 sGC 抑制剂能阻止 cGMP 表达增多。因此,提示该反应主要受 sGC-PKG 通路调控^[15]。去铁胺和氯化钴诱导原代培养皮质神经元 Ngf 蛋白及其 mRNA 表达增加的机制可能与重要的缺氧信号通路转录因子缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)有关,因为在其诱导 Ngf 表达的同时,也激活缺氧诱导基因的表达,包括 HIF-1 α ,并且发现在 Ngf 的 5'端非编码序列和 HIF-1 α 的结合序列缺氧反应元件序列相吻合^[3]。但也有研究认为^[16]Ngf 缺少转录激活的缺氧反应元件,而在其 3'端非编码区含有保守的缺氧诱导 mRNA 稳定表达信号序列,可见 Ngf 可能有较强的氧依赖调节能力。

3 Ngf 的神经保护作用及其机制

近年,国内外学者已证实,在脑缺氧缺血时,Ngf 及其 mRNA 表达增加,且具有神经保护作用,但其确切作用机制仍不完全清楚。

3.1 抗凋亡

Chen 等^[17]使用 Ngf 反义寡核苷酸转染原代培养的小鼠大脑皮质星形胶质细胞,发现缺血后细胞凋亡增加。使用反义寡核苷酸转染原代皮质神经元,使 Ngf 表达减少,缺氧时细胞存活率降低,免疫荧光双标显示转染后的神经元表达 caspase-3 裂解产物,从而导致细胞发生凋亡^[13]。

3.2 抗氧化

小鼠眼组织缺氧再氧合后 Ngf 蛋白水平和

H₂O₂ 呈负相关,提示 Ngb 可能是活性氧簇的一种清除剂^[2]。Wakasugi 等^[18]发现 Ngb 与半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 二聚体结合后,能调节后者的胞内转运或分泌,由此对抗氧化应急对细胞的损伤作用。

3.3 激活细胞生存信号

体内外实验表明 Ngb 的表达上调能增加神经元的存活率^[3,19]。Wakasugi 等^[20,21]提出 Ngb 的新作用机制,即 Ngb 作为脑内氧化应急的传感器,发现其与 G 蛋白信号传递调节蛋白(GPS)和 G 蛋白耦联受体激酶的 GPS 域具有同源性,Ngb 具有鸟苷酸解离抑制剂活性,能抑制 GTP 水解为 GDP,增强 G_{αi}和 GTP 的结合,使 α 亚基和 βγ 亚基解离,游离 G_{βγ}释放,G_α即具有 GTP 酶活性,从而激活下游细胞存活的信号通路,提高细胞存活率。

3.4 气体分子感受器

Ngb 可能作为缺氧感受器,触发其下游具有神经保护作用的信号^[19]。Ngb 还可与 NO 和 CO 结合形成复合物,参与其信号传导途径,可能具有清除细胞内 NO 毒性的作用。

3.5 信号传导通路的调节器

Ngb 可以作为 G_α 亚基的鸟苷酸解离抑制剂,与神经元膜蛋白相互作用,进而发挥在体内的调节功能,提示 Ngb 可能是大脑内信号传导通路的一种调节器。徐文琳等^[22]利用酵母双杂交系统从人脑 cDNA 文库中筛选出与 Ngb 有相互作用的蛋白质,发现其中一个克隆的编码产物与能量代谢相关的 Na⁺,K⁺-ATP 酶 β₂(NKA1β₂)亚基序列一致,在体和离体实验表明 Ngb 能和 NKA1β₂ 结合并相互作用,且 Ngb 结构的完整性对两者的结合至关重要。因此推测 Ngb 可能与细胞的能量代谢有关。从人脑 cDNA 文库中筛选出另一种与 Ngb 结合的蛋白,和人 flotillin-1 的氨基酸序列完全相同。flotillin-1 是一种脂筏微域相关蛋白,能结合信号传导蛋白至脂筏,现已证实 Ngb 能和 flotillin-1 结合并相互作用^[23]。由于 flotillin-1 可以将 Ngb 结合至脂筏,G_α 亚基是存在于脂筏中的膜信号传导蛋白,而 Ngb 是 G_α 亚基的鸟苷酸解离抑制剂,因此 Ngb 可阻止神经元死亡。

4 Ngb 和 HIBD

Ngb 对 HIBD 的神经保护作用已被广泛证实。细胞实验中,Sun 等^[3,19]使用反义寡核苷酸转染小鼠皮质神经元和通过重组 pcDNA-Ngb 质粒转染海马细胞株,分别使 Ngb 表达下降和增加,在缺氧情

况下细胞存活率降低和增加。该作者还建立大鼠大脑中动脉堵塞模型,在脑卒中 24 h 前脑室内注射 Ngb 反义寡核苷酸使 Ngb 表达减少,脑梗死体积增加,并加重缺血后神经行为缺陷;而在脑卒中 3 周前脑室内注射使 Ngb 表达增加的腺病毒相关病毒表达载体,则可减少梗死体积,神经系统功能亦相应改善,且梗死减少部位主要在皮质。

Khan 等^[24]构建了 Ngb 转基因小鼠,发现脑内 Ngb 高表达的 Ngb 转基因小鼠脑卒中后,脑梗塞体积较 Ngb 野生型同窝出生的小鼠减少约 30%,从而降低大脑对缺血的敏感性。同时在 Ngb 表达增高的转基因小鼠血管内皮细胞中还发现一氧化氮合酶(endothelial nitric oxidesynthase, eNOS)的表达增加,敲除 eNOS 可使脑梗塞体积增加,推测脑组织 Ngb 的神经保护作用还可能与 eNOS 表达增加有关。因此在活体内,Ngb 可通过直接(器官实质)和间接(通过血管舒缩调节)两种途径起到神经保护作用。

5 Ngb 的应用前景

血清中 Ngb 变化的敏感性和特异性可作为脑损伤的一种潜在生物标记物,为临床评估和监测 HIBD 的严重程度提供参考基础。文献报道^[25,26]在沙鼠全脑缺血再灌注模型中,检测脑和血清中 Ngb 蛋白动态表达情况,发现 Ngb 在大脑皮质的表达增加,血清 Ngb 在缺血再灌注后 8 h 开始明显升高,并呈逐渐上升趋势,到 48 h 达高峰,约为正常血清含量的 3 倍,72 h 开始下降,但仍高于正常水平,说明在正常情况下血清或脑脊液中 Ngb 含量很低,但当脑缺血缺血、中毒或创伤时,细胞的完整性受到破坏,且血脑屏障的通透性增加,Ngb 渗漏并出现在血清或脑脊液中,使其含量发生明显变化。研究还发现神经元受损的形态学变化发生在 16 h 后,而血清 Ngb 已经开始上升,且水平高低与沙鼠神经元损伤程度呈正相关,因此检测 Ngb 血清变化水平可以早期检测缺血性脑损伤的发生,并在一定程度上反映出神经元损伤和修复的情况。

随着对 Ngb 在中枢神经系统中作用的不断认识,应用 Ngb 治疗 HIBD 引起了研究者极大的兴趣。目前,国内外一些学者正致力于探索有效的 Ngb 诱导剂,作为防治 HIBD 有效的药物。研究表明氯化高铁血红素能诱导 Ngb 蛋白及其 mRNA 的表达增加,且具有时间及浓度依赖性,还能提高成神经瘤细胞和神经嵴来源的神经元存活率并促进轴突生

长^[13]。在兔大脑缺血后,腹膜内注射氯化高铁血红素能明显提高皮质和纹状体功能神经元数目。在慢性脑供血不足大鼠腹腔内注射神经节苷脂2周后,可部分提高 Ngb 的表达,还能提高神经生长因子的表达、促进神经细胞生长和抗凋亡^[6]。

Ngb 对 HIBD 的治疗目前还限于动物实验阶段,Ngb 的确切作用机制、调控 Ngb 表达的信号传导通路还需进一步研究,明确上述机制对临床防治 HIBD 具有重要的理论价值。

[参 考 文 献]

[1] Moens L, Dewilde S. Globins in the brain[J]. *Nature*, 2000, 407(6803):461-462.

[2] Fordel E, Thijs L, Moens L, Dewilde S. Neuroglobin and cytoglobin expression in mice. Evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging[J]. *FEBS J*, 2007, 274(5):1312-1317.

[3] Sun Y, Jin K, Mao XO, Zhu Y, Greenberg DA. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(26):15306-15311.

[4] Pesce A, Dewilde S, Nardini M, Moens L, Ascenzi P, Hankeln T, et al. The human brain hexacoordinated neuroglobin three-dimensional structure[J]. *Micron*, 2004, 35(1-2):63-65.

[5] Kriegel JM, Bhattacharyya AJ, Nienhaus K, Deng P, Minkow O, Nienhaus GU. Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(12):7992-7997.

[6] 胡志兵, 孙卫文, 陆雪芬, 戴建武. 慢性脑供血不足大鼠脑中脑血红的表达[J]. *中华神经医学杂志*, 2007, 2(6):131-133.

[7] Sun Y, Jin K, Mao XO, Xie L, Peel A, Childs JT, et al. Effect of aging on neuroglobin expression in rodent brain[J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(2):275-278.

[8] Hundahl C, Kelsen J, Kjaer K, Ronn LC, Weber RE, Geuens E, et al. Does neuroglobin protect neurons from ischemic insult? A quantitative investigation of neuroglobin expression following transient MCAo in spontaneously hypertensive rats[J]. *Brain Res*, 2006, 1085(1):19-27.

[9] Roesner A, Hankeln T, Burmester T. Hypoxia induces a complex response of globin expression in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Exp Biol*, 2006, 209(Pt 11):2129-2137.

[10] Li RC, Lee SK, Pouranfar F, Brittan KR, Clair HB, Row BW, et al. Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain[J]. *Brain Res*, 2006, 1096(1):173-179.

[11] Schmidt-Kastner R, Haberkamp M, Schmitz C, Hankeln T, Burmester T. Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture[J]. *Brain Res*, 2006, 1103(1):173-180.

[12] Hundahl C, Stoltenberg M, Fago A, Weber RE, Dewilde S, Fordel E, et al. Effects of short-term hypoxia on neuroglobin levels and localization in mouse brain tissues[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2005, 31(6):610-617.

[13] Mammen PP, Shelton JM, Goetsch SC, Williams SC, Richardson JA, Garry MG, et al. Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain[J]. *J Histochem Cytochem*, 2002, 50(12):1591-1598.

[14] Fordel E, Geuens E, Dewilde S, De Coen W, Moens L. Hypoxia/ischemia and the regulation of neuroglobin and cytoglobin expression[J]. *IUBMB Life*, 2004, 56(11-12):681-687.

[15] Zhu Y, Sun Y, Jin K, Greenberg DA. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells[J]. *Blood*, 2002, 100(7):2494-2498.

[16] Wystub S, Ebner B, Fuchs C, Weich B, Burmester T, Hankeln T. Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2004, 105(1):65-78.

[17] Chen XQ, Qin LY, Zhang CG, Yang LT, Gao Z, Liu S, et al. Presence of neuroglobin in cultured astrocytes[J]. *Glia*, 2005, 50(2):182-186.

[18] Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Association of human neuroglobin with cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(18):5119-5125.

[19] Sun Y, Jin K, Peel A, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(6):3497-3500.

[20] Wakasugi K, Morishima I. Identification of residues in human neuroglobin crucial for Guanine nucleotide dissociation inhibitor activity[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(8):2943-2948.

[21] Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Gα protein guanine nucleotide dissociation inhibitor[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(38):36505-36512.

[22] 徐文琳, 王春丽, 张永亮, 廖志勇, 余利虹, 孟凡伟, 等. 脑红蛋白与 Na⁺, K⁺-ATP 酶 β₂ 亚基的相互作用及作用位点的鉴定[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(9):823-828.

[23] Wakasugi K, Nakano T, Kitatsuji C, Morishima I. Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318(2):453-460.

[24] Khan AA, Wang Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Miles E, et al. Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(47):17944-17948.

[25] 尚爱加, 周定标, 高艳, 邓亚仙, 张成岗. 沙鼠前脑缺血后脑红蛋白的表达变化[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(16):1390-1392.

[26] Shang A, Zhou D, Wang L, Gao Y, Fan M, Wang X, et al. Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia-reperfusion insults[J]. *Brain Res*, 2006, 1078(1):219-226.

(本文编辑:吉耕中)