

脑红蛋白在创伤性脑损伤中的研究进展

王凯 综述 陈世文 审校

苏州大学上海市第六人民医院神经外科,上海 200233

摘要:脑红蛋白广泛分布于脑内神经元,能可逆性地与氧结合,在缺血缺氧的状态下表达增加并发挥显著的神经保护作用。近年来研究发现创伤性脑损伤后脑组织脑红蛋白的表达反应性增高并表现出良好的神经保护作用。本文就近年来脑红蛋白在创伤性脑损伤中的研究进展作一综述。

关键词:脑红蛋白;创伤性脑损伤;神经保护

脑红蛋白(Neuroglobin, Ngb)是在2000年由Burmester等^[1]首次发现并报道的一种携氧球蛋白,属于血红素类球蛋白,在大脑神经元细胞中广泛表达。Ngb与氧有很高的亲和力,能可逆性地与氧结合,在神经系统氧的摄取、运输和利用的过程中起着重要作用。创伤性脑损伤(Traumatic Brain Injury, TBI)后脑组织出现继发性缺血缺氧改变,研究表明脑组织缺血缺氧状态下Ngb表达增高并表现出显著的神经保护作用。

1 Ngb 的结构与分布

1.1 Ngb 的结构

Ngb是由151个氨基酸组成的单一多肽链,相对分子质量为17KD,其编码基因位于染色体14q24^[1]。Ngb是含有卟啉环的亚铁血红素球蛋白,在生理条件下Ngb主要以脱氧六配体的形式存在,而在病理状态下主要以五配体的突变体形式存在^[2]。Ngb末端组氨酸残基(His E7)占据亚铁血红素的第6个配位键位点,氧和一氧化碳等外源性配体须替换末端的His E7来和Ngb结合^[2]。通过光谱分析发现,脑红蛋白中的血红素嵌在蛋白质的口袋里,远端血红素口袋中存在多个界限构象和多个一氧化碳停泊位点,这些位点可供配体移动^[2]。这种特殊的结构促进了氧和亚铁血红素的结合,使得Ngb表现出较高的氧结合率和较低的氧解离率。

1.2 Ngb 的分布

Burmester等^[1]用Northern杂交和原位杂交分析发现NGB广泛分布于人和小鼠脑内的神经元,尤其在额叶、下丘脑和丘脑表达最强。邓美玉等^[3]利用免疫组织化学方法分析发现,Ngb蛋白免疫反应

阳性物质在大鼠脑中特异性的分布于大脑皮质、海马、丘脑、下丘脑、嗅球和小脑。Hundahl等^[4]对人脑标本研究发现,人脑中Ngb的分布与啮齿类动物相似,在下丘脑、杏仁核和中脑被盖部高度表达,在大脑皮质也有表达,但是在小脑皮质和海马没有检测到。不同脑区中脑红蛋白含量不同,这与不同脑区对缺氧损害的耐受性是一致的,Ngb含量越低,组织对缺氧的耐受性越差^[1]。

Schmidt等^[5]发现Ngb在视网膜神经元中较高表达,约为脑内浓度的100倍。Ngb在外周神经系统和一些代谢活跃的内分泌组织,如肾上腺、垂体等也有表达^[6]。

2 TBI 后 Ngb 的表达变化

很多学者对不同TBI动物模型(包括控制性皮质撞击模型伤、自由落体脑外伤模型)后Ngb的表达进行了测定,发现TBI后损伤灶周围半影区皮质Ngb的基因和蛋白表达均显著增高^[7-13]。陈雪梅等^[13]应用大鼠局灶性脑挫伤模型研究发现大鼠脑挫伤后打击周边缘区Ngb mRNA的表达水平明显增高;而损伤区Ngb mRNA表达则相反,在伤后15分钟开始下降,24小时降至最低水平;非损伤区皮质Ngb mRNA表达和打击周边缘区一样,也强于正常皮质,只是表达水平远不及打击周边缘区。出现这样的表达现象,可能是由于损伤区机械性暴力对神经细胞造成直接损伤导致原发性神经元坏死,使Ngb合成表达障碍;而在损伤周边缘区和损伤侧皮质由于脑微循环障碍、继发性脑缺血缺氧,促使Ngb合成表达增加。一些学者的研究结果显示在TBI后在脑损伤灶同侧的海马Ngb的表达也增

收稿日期:2014-05-19;修回日期:2014-08-18

作者简介:王凯(1990-),男,在读硕士研究生,主要从事脑外伤和脑肿瘤的基础与临床研究。

通讯作者:陈世文(1971-),男,博士,副主任医师,硕士生导师,主要从事脑外伤、脑血管病和脑肿瘤的基础与临床研究。

强^[10-12]。

TBI 后 Ngf 的表达并非无限制的增高,而是会在某个时间点达到高峰。多数实验结果显示 Ngf 蛋白表达只有一个高峰,但高峰时间却不尽相同(分布在伤后 6 小时到 7 天不等),随后表达逐渐降低^[8,11,14-15],但 Lin 等^[7]对大鼠重度闭合性脑损伤模型的研究结果显示 Ngf mRNA 分别在 30 分钟和 48 小时大脑皮层表达达高峰,Ngf 在伤后 30 分钟升高,分别在 2 小时和 5 天达高峰,从而认为 TBI 后 Ngf 的基因和蛋白表达呈双峰变化。总之,TBI 后 Ngf 的表达水平随时间的变化趋势尚没有形成统一的认识^[7-8,11,14-15],这可能与不同实验的动物模型(实验动物的选择、TBI 的致伤方式、损伤的程度等)、测定时间点、实验仪器这几个方面的差别有关。Ngf 的表达水平与 TBI 的严重程度有关。Valentina 等^[14]通过对不同严重程度的大鼠弥漫性轴索损伤模型研究发现:重度脑损伤和轻度脑损伤后 Ngf 的表达水平与对照组相比均增高,且重度脑损伤的 Ngf 表达水平在伤后 12 小时、24 小时、48 小时、120 小时均明显高于轻度脑损伤。Shang 等^[15]的研究也得出了相似的结论。以上研究说明 TBI 程度越重,Ngf 的表达水平越高。以前的研究认为 Ngf 在神经系统中是神经元细胞特有的表达产物,但 DellaValle 等^[10]研究发现在生理状态下 Ngf 只在神经元细胞表达,但在某些病理状态下(包括 TBI、脑型疟、自身免疫性脑脊髓炎)反应性星形胶质细胞和参与瘢痕形成的星形胶质细胞也表达 Ngf,TBI 后 3 天损伤灶周围反应性星形胶质细胞表达 Ngf,不过有趣的是,TBI 后 10 天时 Ngf 表达只局限在损伤灶内的星形胶质细胞,在损伤灶周围的星形胶质细胞未能检测到,这可能与星形胶质细胞从损伤灶周围向中心迁移参与受损脑组织瘢痕修复有关。Taylor 等^[11]的研究结果也显示小鼠 TBI 后在损伤皮质及同侧海马的神经元细胞和神经胶质细胞均有 Ngf 表达。

3 Ngf 的神经保护作用及机制

3.1 神经保护作用

Sun 等^[16]研究发现,当培养的小鼠皮质神经元氧剥夺时,Ngf 的表达上升;用反义寡核苷酸技术去除培养的神经元中的 Ngf mRNA 能加重神经元的缺氧损害;反之,在体外培养的转基因神经元中,Ngf 的高度表达能提高神经元在缺氧状态下的存活率。他们还以腺病毒为载体将 Ngf cDNA 转染

入大鼠脑神经元中,发现急性缺血状态下大鼠脑梗死体积较对照组缩小约 50%,而利用脑室内注射反义寡核苷酸减少 Ngf 表达时,脑梗死体积较对照组增加 60%,说明在缺血缺氧状态下 Ngf 对脑组织有神经保护作用^[17]。很多学者的实验也证实了这一点。

近年来一些研究发现 Ngf 对 TBI 后的脑组织也有保护作用^[7-8,11-12,15]。Shang 等^[15]通过体外培养神经元细胞划伤模型的研究发现:Ngf 过表达能明显提高机械性损伤神经元细胞的存活率,表明 Ngf 具有显著的神经保护作用。Zhao 等^[8]通过对小鼠 TBI 模型的研究发现,Ngf 过表达的转基因小鼠 TBI 后 3 周脑损伤灶的体积较野生型小鼠明显减小。以上结果显示:TBI 后 Ngf 无论在体外细胞培养水平还是动物体内水平均能发挥神经保护作用。

3.2 神经保护机制

关于 Ngf 的神经保护机制目前仍未完全阐明,先前的实验研究表明脑缺血缺氧状态下 Ngf 作为内源性因子可能通过以下几个方面发挥神经保护作用:①转运和储存氧:Ngf 与氧有很高的亲和力,能可逆性地与氧结合,在缺氧状态下 Ngf 在线粒体周围高表达,从而促进氧向线粒体扩散或直接介导氧向线粒体内传递,增加代谢活跃的神经组织的供氧,促进三磷酸腺苷(adenosine tri-phosphate,ATP)的产生,维持神经细胞的功能^[6,20]。②抑制凋亡:Ngf 能维持细胞色素 C 在一个非凋亡的氧化态来抑制内源性细胞凋亡途径^[18]。③对抗自由基的毒性作用:过表达的 Ngf 使得细胞对一氧化氮及其产物的敏感性降低,同时能减轻过氧化氢诱导的活性氧和活性氮的累积并限制脂质过氧化反应,减少氧化应激产生的自由基毒性作用^[8,19-21,22]。④维持神经元体内金属离子的平衡:缺氧神经元体内的钙、铁、铜、锌的浓度增加,促进了炎症反应、线粒体功能的紊乱^[23]。缺氧状态下 Ngf 抑制钙离子内流,减少细胞对铁、铜、锌的吸收,进而抑制细胞的坏死和凋亡^[23]。⑤维持线粒体的功能:Ngf 能够抑制缺氧神经元体内线粒体的聚集,并能激活线粒体的 ATP 敏感的钾离子通道,从而减少氧化应激和增加细胞内的 ATP 水平^[20,24]。

TBI 后脑组织继发性缺血缺氧主要发生于损伤灶周围半影区,与 Ngf 表达增高的部位一致,因此 TBI 后 Ngf 的神经保护机制可能与缺血缺氧状态下的神经保护机制有相同之处。Lin 等^[7]研究发现

凋亡相关的 Bax/Bcl-2 比值在大鼠 TBI 后急剧上升,但是其上升速率在 Ngb 表达急剧升高时明显下降,提示 TBI 后 Ngb 可能通过调节 Bax/Bcl-2 的比值来发挥抗凋亡作用。Zhao 等^[8]的研究结果显示在 TBI 后 6 小时 Ngb 过表达的转基因小鼠脑中氧化损伤标记物 3-硝基酪氨酸(3-NT)较野生型小鼠明显减少,提示 Ngb 的过表达可能减轻脑组织的氧化应激损伤。而 Valentina 等^[14]的研究结果显示轻度 TBI 后 Ngb 的基因和蛋白表达并没有随着氧化/抗氧化平衡的短暂变化而发生明显变化,从而提出了不同的观点,认为:Ngb 不是作为内源性神经抗氧化剂通过抑制过氧化损害发挥作用。这可能是由于轻度 TBI 后脑组织虽然有损伤,但是损伤程度不足以引起 Ngb 表达的明显变化;或者目前的研究检测手段不足以精确检测 Ngb 的表达的轻微变化;又或者 Ngb 的神经保护作用的确不是通过维持氧化/抗氧化平衡来实现,而是通过其他机制发挥作用,这方面仍需进一步研究。

4 Ngb 对 TBI 预后的影响及应用前景

Taylor 等^[11]通过对 Ngb 过表达的转基因小鼠和野生型小鼠的对比实验发现,TBI 后转基因小鼠 Ngb 的表达遍及整个脑组织,而野生型小鼠则主要集中在受伤皮质及同侧海马,转基因小鼠和野生型小鼠在伤后不同时间点的感觉运动功能均下降,但转基因小鼠在伤后 2 天、3 天和 7 天的感觉运动功能明显好于野生型小鼠,并且在伤后 7 天时转基因小鼠基本恢复到与受伤前相近的水平,说明 Ngb 过表达能改善 TBI 的预后。Zhao 等^[8]也做了相似的试验,结果显示:Ngb 无论是受伤前基础表达水平伤后 6 小时的表达水平,转基因小鼠均显著高于野生型小鼠;而脑外伤后 3 周,Ngb 过表达的转基因小鼠尽管损伤灶体积明显小于野生型小鼠,但在感觉运动和空间记忆等功能缺损的恢复方面并没有明显的差别。两个相似的实验却得到了不同的结论,可能是由于二者对伤后神经功能障碍的评估标准、动物模型的脑损伤部位和影响参数的选择不同造成的。Chuang 等^[9]对 196 例重度 TBI 的白种人患者的研究发现,Ngb 的基因多态性与外伤性脑损伤的预后相关。目前中重度 TBI 治疗的预后还不尽如人意,鉴于 Ngb 在实验中对 TBI 具有神经保护作用,其将来有可能使 TBI 的治疗有所突破。

提高神经元体内 Ngb 的水平可能有助于 TBI 的治疗。由于哺乳动物的 Ngb 是一种细胞内蛋白,

不能穿过细胞膜^[25],所以直接应用外源性的 Ngb 不是一种可行性的治疗措施。有学者尝试通过间接途径来提高 Ngb 的表达水平,并发现去铁胺、肉桂酸和丙戊酸在体外培养的条件下能提高神经元细胞体内 Ngb 的表达^[26],通过提高 Ngb 的表达治疗 TBI 具有令人期待的前景。

5 展望

减轻继发性神经损害是临床治疗 TBI 关键。Ngb 特有的体内分布、表达特点和神经保护功能为人们寻找治疗 TBI 新的有效途径提供了可能。过去的研究发现 Ngb 在 TBI 的病程进展过程中也能发挥重要神经保护作用,并且其过表达能有效地改善 TBI 的预后,但是 Ngb 的神经保护机制仍不完全明确。有关 Ngb 在 TBI 方面的研究主要还处于动物实验阶段,进一步探索 Ngb 的神经保护机制及如何在避免附加损伤的前提下提高 Ngb 的水平并应用于临床是今后的研究方向。

参 考 文 献

- [1] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 2000, 407 (6803): 520-523.
- [2] Kriegl JM, Bhattacharyya AJ, Nienhaus K, et al. Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (12): 7992-7997.
- [3] 邓美玉,张成岗,王航雁,等. 免疫组织化学方法检测脑红蛋白在大鼠中枢神经系统的分布. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2002, 11 (3): 271-274.
- [4] Hundahl CA, Kelsen J, Hay-Schmidt A. Neuroglobin and cytoglobin expression in the human brain. *Brain Struct Funct*, 2013, 218 (2): 603-609.
- [5] Schmidt M, Giessel A, Laufs T, et al. How does the eye-breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem*, 2003, 278 (3): 1932-1935.
- [6] Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, et al. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience*, 2002, 115 (3): 645-656.
- [7] Lin X, Li M, Shang AJ, et al. Neuroglobin expression in rats after traumatic brain injury. *Neural Regen Rrs*, 2012, 7 (25): 1960-1966.
- [8] Zhao S, Yu Z, Zhao G, et al. Neuroglobin-overexpression reduces traumatic brain lesion size in mice. *BMC Neurosci*, 2012, 13:67.
- [9] Chuang PY, Conley YP, Poloyac SM, et al. Neuroglobin genetic polymorphisms and their relationship to functional out-

- comes after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* , 2010 , 27 (6) : 999-1006.
- [10] DellaValle B , Hempel C , Kurtzhals JA , et al. In vivo expression of neuroglobin in reactive astrocytes during neuropathology in murine models of traumatic brain injury , cerebral malaria , and autoimmune encephalitis. *Glia* , 2010 , 58 (10) : 1220-1227.
- [11] Taylor JM , Kelley B , Gregory EJ , et al. Neuroglobin overexpression improves sensorimotor outcomes in a mouse model of traumatic brain injury. *Neurosci Lett* , 2014 , 577 : 125-129.
- [12] Shang A ,Feng X , Wang H , et al. Neuroglobin upregulation offers neuroprotection in traumatic brain injury. *Neurol Res* , 2012 , 34 (6) : 588-594.
- [13] 陈雪梅 , 官鹏 , 杜显刚 , 等. 大鼠脑外伤后大脑皮质脑红蛋白的表达. *中国法医学杂志* , 2010 , 25 (5) : 319-322.
- [14] Valentina DP , Giacomo L , Angela MA , et al. Neuroglobin expression and oxidant-antioxidant balance after graded traumatic brain injury in the rat. *Free Radical Biology and Medicine* , 2014 , 69 : 258-264.
- [15] Shang A , Liu K , Wang H , et al. Neuroprotective effects of neuroglobin after mechanical injury. *Neurol Sci* , 2012 , 33 (3) : 551-558.
- [16] Sun Y , Jin K , Mao XO , et al. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2001 , 98 (26) : 15306-15311.
- [17] Sun Y , Jin K , Mao XO , et al. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2003 , 100 (6) : 3497-3500.
- [18] Fago A , Mathews AJ , Brittain T. A role for neuroglobin : resetting the trigger level for apoptosis in neuronal and retinal cells. *IUBMB Life* , 2008 , 60 (6) : 398-401.
- [19] Jin K , Mao XO , Xie L , et al. Neuroglobin protects against nitric oxide toxicity. *Neurosci Lett* 2008 , 430 (2) : 135-137.
- [20] Liu J , Yu Z , Guo S , et al. Effects of neuroglobin overexpression on mitochondrial function and oxidative stress following hypoxia/reoxygenation in cultured neurons. *J Neurosci Res* , 2009 , 87 (1) : 164-170.
- [21] Antao ST , Duong TT , Aran R , et al. Neuroglobin overexpression in cultured human neuronal cells protects against hydrogen peroxide insult via activating phosphoinositide-3 kinase and opening the mitochondrial K (ATP) channel. *Antioxid Redox Signal* , 2010 , 13 (6) : 769-781.
- [22] Li RC , Morris MW , Lee SK , et al. Neuroglobin protects PC12 cells against oxidative stress. *Brain Res* , 2008 , 1190 : 159-166.
- [23] Duong TT , Witting PK , Antao ST , et al. Multiple protective activities of neuroglobin in cultured neuronal cells exposed to hypoxia re-oxygenation injury. *J Neurochem* , 2009 , 108 (5) : 1143-1154.
- [24] Khan AA , Mao XO , Banwait S , et al. Regulation of hypoxic neuronal death signaling by neuroglobin. *FASEB J* , 2008 , 22 (6) : 1737-1747.
- [25] Watanabe S , Wakasugi K. Zebrafish neuroglobin is a cell-membrane-penetrating globin. *Biochemistry* , 2008 , 47 (19) : 5266-5270.
- [26] Jin K , Mao XO , Xie L , et al. Pharmacological induction of neuroglobin expression. *Pharmacology* , 2011 , 87 (1-2) : 81-84.