

## 脑红蛋白在颅脑损伤中脑保护作用的研究进展

李志涛 综述 闫华 刘暎 审校

天津市环湖医院,天津市脑血管与神经变性重点实验室,天津 300060

**摘要:** 脑红蛋白(neuroglobin, NGB)是新近发现存在于人体内重要的一类携氧蛋白,各项研究表明,脑红蛋白主要在脑组织中表达,在神经系统氧的摄取、运输和利用等生理过程以及去除活性氧和一氧化氮(nitrogen oxide, NO)、抑制细胞凋亡等方面起着极其重要的作用。因此,通过分析脑红蛋白的结构和功能及其在颅脑损伤中对神经元的保护作用,可以指导临床有针对性地治疗,为颅脑损伤的诊治提供新靶点的同时也为颅脑损伤患者的康复提供了新的思路及方向。

**关键词:** 脑红蛋白; 颅脑损伤

中、重型颅脑损伤死亡原因分析显示,大约有61%的患者死于继发性脑损伤,其原因是颅脑损伤时常伴有低血压、氧血症,伤后出现的脑水肿、高血压也可引起脑组织缺血缺氧,而脑水肿及缺血缺氧导致能量丧失是神经细胞损伤的重要环节。神经细胞损伤不仅影响神经组织自身康复及预后,也会造成多器官功能衰竭。有研究表明,颅脑损伤后伤灶周围神经元脑红蛋白表达升高可能是神经保护的机制之一<sup>[1]</sup>。

### 1 脑红蛋白的生物学特性

#### 1.1 脑红蛋白的结构

脑红蛋白最早由Burmester等<sup>[2]</sup>在2000年发现,证实其存在于人和小鼠体内,主要在神经元、视网膜和一些内分泌组织细胞中表达。已有研究证实,NGB基因在高级脊椎动物是一种高度保守的基因,序列同源性分析发现小鼠NGB基因编码区的序列与人NGB基因的同源性为88%。Haines等<sup>[3]</sup>研究表明,NGB DNA结构可能是经典的“three-over-three”螺旋三明治折叠结构,基本结构是1个血红蛋白结构和蛋白质肽链,非常类似于另一种球蛋白-肌红蛋白(myoglobin, MGB),它由151个氨基酸组成,相对分子质量为 $1.7 \times 10^4$ 。但在病理状态下NGB主要以五配体形式存在。Yang等<sup>[4]</sup>经过光谱分析发现,NGB末端血红素袋存在结构异质性,从而形成多种结合形式及多个配体结合位点,配体可在各结合位点间移动,该现象可能与NGB局部特定构象有关,这种结构异质性可能有

助于NGB作为氧气载体的功能。

#### 1.2 脑红蛋白的分布

脑红蛋白(NGB)最先被发现分布于中枢及外周神经系统,Khundakar等<sup>[5]</sup>利用免疫组化分析发现NGB也在新陈代谢活跃的内分泌组织如肾上腺和垂体中分布,并用RT-PCR方法检测人13种不同组织中NGB转录水平,发现除脑组织外,其他组织(如肝、肾)也有NGB表达,很可能是NGB在周围神经系统的分布。Hundahl等<sup>[6]</sup>用原位杂交及免疫组化技术分析发现,NGB蛋白免疫反应阳性物质广泛分布于大鼠脑皮质,尤以海马、丘脑、下丘脑、嗅球、颞叶、小脑、扣带皮质、梨状皮质中的阳性细胞较为密集。近年来也有研究报道,NGB主要分布在正常大鼠大脑皮质神经元中,其密度明显高于海马、小脑和丘脑;用RT-PCR研究还发现,NGB基因在正常大鼠脑、肝、肾、心和骨骼肌等多种器官内高度表达,并且在周围神经系统和内分泌组织也有表达<sup>[7]</sup>。

尽管NGB在脑组织广泛分布,但是其含量相对偏低(大概 $< 1 \text{ mol/L}$ ),然而在视网膜的神经元中,因为它代谢需要大量的氧,它的含量大约比脑组织高50~100倍。最新研究显示在内分泌腺中也可见NGB阳性表达,利用免疫组化技术发现脑垂体、神经垂体、肾上腺皮质球状带、束状带和网状带部分细胞呈弱阳性表达,胰岛细胞呈阳性表达<sup>[8]</sup>。男性生殖系统中睾丸间质细胞、精原细胞呈阳性,各级精母细胞、附睾输出小管和附睾管上皮

基金项目:天津市科技支撑计划项目,编号08ZCGYSF01600;天津市自然科学基金项目,编号13JCYBJC21100

收稿日期:2014-06-05;修回日期:2014-12-08

作者简介:李志涛(1982-),男,硕士学位,主治医师,主要从事颅脑创伤的基础和临床研究。

通讯作者:闫华(1972-),男,博士学位,主要从事颅脑创伤的基础和临床研究。

亦呈弱阳性表达<sup>[8]</sup>。综上所述我们知道 NGB 是一种与血红蛋白、肌红蛋白结构相似,分布十分广泛的球蛋白。

## 2 脑红蛋白的脑保护作用机制

### 2.1 脑红蛋白的储氧功能

近些年,越来越多的实验证明脑红蛋白具有携带氧气功能。NGB 的浓度很低,仅占全脑总蛋白含量的 0.01%,其浓度跟细胞线粒体分布紧密联系,但其与氧有很高的亲和力,脑组织中 NGB 作为氧气载体,能提高细胞内的氧分压,促进氧向线粒体的扩散或直接介导氧向线粒体的传递,促进 ATP 的产生,从而维持正常神经元的功能。Zhu 等<sup>[9]</sup>观察发现 NGB 有倾向性地存在于新陈代谢活跃的细胞和亚细胞隔室,而氧分压低的组织通常没有或者很少有 NGB 表达。例如大量哺乳动物的视网膜有毛细血管网供应氧气,感光细胞椎体内节,内外网织层,神经节细胞层氧分压都高,NGB 表达也很高;然而豚鼠的视网膜中只有感光细胞椎体内节有毛细血管供应氧气,视网膜其他部位依靠无氧酵解供能,NGB 表达量相对很少。以上实验充分证明了 NGB 与氧气携带是密切相关的。但是也有研究说脑红蛋白这种与氧有高亲和力、相对低的解离率并不支持经典携氧球蛋白的携氧功能,认为它的六配位携氧蛋白可能只是作为一个暂时的氧储存器起储存氧作用,即在缺氧的情况下在细胞内持续地、少量地为组织供氧和促进氧在线粒体的扩散。总之,NGB 的携氧功能还有待进一步研究。

### 2.2 脑红蛋白在脑损伤后的神经保护作用

Lin 等<sup>[10]</sup>在体外小鼠培养神经细胞缺氧以及体内大鼠局部脑缺血实验中,均检测出 NGB 的增高,同时发现大鼠脑外伤后早期,皮质损伤周半影区 NGB 即增高,且与脑外伤后继发的缺血缺氧、脑水肿的出现时程有一定的一致性,说明 NGB 的增高可能是对损伤的一种防御性保护反应。Dietz 等<sup>[11]</sup>经研究发现,不同脑区 NGB 含量不同与其对缺氧的敏感性不同是一致的,例如缺血导致大脑皮层达到最大损伤一半的时间是 19.1 min,在海马仅为 12.7 min,而海马的 NGB 含量不到皮层的 1/4,说明 NGB 的含量越低,对缺氧的耐受性越差,该研究结果提示 NGB 在脑缺氧的适应性保护过程中起重要作用。Cai 等<sup>[12]</sup>通过构建 NGB 真核表达载体,将其转染至对缺氧反应具有代表性的海马源性神经细胞系 HN33,使 NGB 过度表达,缺氧处理后,该神

经细胞的存活率也增加,降低 NGB 的表达会增加细胞和组织的缺氧损伤程度。这也表明 NGB 对神经元有保护作用。

有研究发现,将培养的神经元缺氧 24 h,NGB 的表达将显著增加<sup>[13]</sup>。还有实验将小鼠大脑中动脉结扎 90 min 后再灌注 24 h,发现神经元胞浆内 NGB 的表达量也增加,在各种原因所引起的神经组织缺氧情况下,由于氧供应不足,必然导致神经元的死亡和部分神经功能的丧失,这种情况下,推测 NGB 贮存氧的释放可缓冲氧分压的变化,在一定程度上延缓细胞的死亡,维持神经功能的正常发挥<sup>[13]</sup>。故有学者推测,缺氧所诱导的 NGB 表达升高具有显著的神经保护作用。Jin 等<sup>[14]</sup>的研究发现,降低 NGB 的表达会增加细胞和组织的缺氧损伤程度,他们通过结扎大鼠大脑中动脉制备全脑缺血模型,脑室内注射 NGB 的反义脱氧寡核苷酸抑制表达 NGB 时,增加了大鼠脑缺血性梗死面积并加重了脑功能障碍;当脑内定点注射腺相关病毒-NGB 表达载体使 NGB 增加时,减少了大鼠脑梗死面积并促进了脑功能恢复,说明缺血缺氧可诱导 NGB 对神经细胞的保护作用。综上所述,NGB 可能作为内源性神经保护因子改善神经功能和预后。关于其作用机理,近年来有学者研究认为:①由于颅脑损伤急性期 NGB 迅速增加,从而促进氧向神经元线粒体的扩散传递,以维持神经元的正常代偿功能,起到神经保护作用;②NGB 可能有某种尚未知晓的酶活性而参与 NO 的代谢,Melgarejo 等<sup>[15]</sup>认为 NGB 可能起着清道夫作用,可清除氧化应激反应中产生的大量 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等活性氧成分而保护细胞;③NGB 可能作为传 O<sub>2</sub> 传感器,根据 O<sub>2</sub> 浓度的变化参与细胞内信号传导通路调节。Marinis 等<sup>[16]</sup>的研究显示:正铁型 NGB 是一种氧化应激感受因子,可抑制鸟嘌呤核苷裂解而促使 Gβγ 释放,进一步激活 PI3K 和丝裂原激活蛋白激酶信号途径保护细胞。目前,NGB 到底通过何种方式发挥其对神经元的保护作用尚有待研究。

## 3 潜在的治疗价值

缺氧缺血性脑损伤一直是临床上难以解决的问题。这主要是因为颅脑损伤过程中存在多种病理机制交互作用,而颅脑损伤后出现的脑水肿、高颅压可引起脑组织缺血缺氧,而脑水肿及缺血缺氧则会导致能量丧失,最终引起神经细胞的损伤<sup>[17,18]</sup>。在诸多的损伤因素中,脑细胞能量衰竭被

认为是首先发生的重要环节<sup>[19, 20]</sup>。脑红蛋白的发现,使人们把研究的眼光转向氧利用的上游环节, NGB作为一种内源性神经保护因子,为临床治疗提供了新的思路。已有报道,可以利用特殊的蛋白转导域将抗凋亡、神经保护蛋白导入颅脑损伤模型的脑组织中,可极大地保护神经元,防止其凋亡,缩小损伤范围<sup>[21, 22]</sup>。如果能将 NGB 利用蛋白转导技术应用用于颅脑损伤疾病,无疑会为颅脑损伤后缺血缺氧提供全新的治疗方向。

#### 4 结语

颅脑损伤治疗、预后评估手段缺乏,逐步证实的颅脑损伤后脑红蛋白的神经元保护作用,无疑为颅脑损伤的诊治提供了新靶点,加强其神经保护机制的研究和临床治疗的应用研究具有良好的应用前景。

#### 参 考 文 献

- [1] Wang XY, Liu JX, Zhu HH, et al. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2008, 39(6): 1869-1874.
- [2] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 2000, 407(6803): 520-523.
- [3] Haines B, Davis D, Zykovich A, et al. Comparative protein interactomics of neuroglobin and myoglobin. *J Neurochem*. 2012, 123(1): 192-198.
- [4] Yang Q, Gao D, Nie Q, et al. Overexpression of the neuroglobin gene delivered by ultrasound-targeted microbubble destruction protects SH-SY5Y cells against cobalt chloride induced hypoxia. *Neural Regeneration Research*. 2011, 6(25): 1947-1953.
- [5] Khundakar A, Morris C, Slade J, et al. Examination of glucose transporter-1, transforming growth factor-[beta] and neuroglobin immunoreactivity in the orbitofrontal cortex in late-life depression. *Psychiatry & Clinical Neurosciences*, 2011, 65(2): 158-164.
- [6] Hundahl C, Hannibal J, Fahrenkrug J, et al. Neuroglobin expression in the rat suprachiasmatic nucleus: Colocalization, innervation, and response to light. *J Comp Neurol*, 2010, 518(9): 1556-1569.
- [7] Chen LM, Xiong YS, Kong FL, et al. Neuroglobin attenuates Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating Akt signaling. *J Neurochem*, 2012, 120(1): 157-164.
- [8] Gorr T, Wichmann D, Pilarsky C, et al. Old proteins—new locations: myoglobin, haemoglobin, neuroglobin and cytoglobin in solid tumours and cancer cells. *Acta Physiol*, 2011, 202(3): 563-581.
- [9] Zhu J, Tang W. Cerebroprotection with recombinant neuroglobin plasmid in a rat model of focal cerebral ischemia. *Neural Regeneration Research*, 2010, 5(1): 52-57.
- [10] Lin X, Li M, Shang A, et al. Neuroglobin expression in rats after traumatic injury. *Neural Regeneration Research*, 2012, 7(25): 1960-1966.
- [11] Dietz G. Protection by neuroglobin and cell-penetrating peptide-mediated delivery in vivo: A decade of research: Comment on Cai et al.: TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*, 2011, 231(1): 1-10.
- [12] Cai B, Lin Y, Xue X, et al. TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. *Experimental Neurology*, 2011, 227(1): 224-231.
- [13] Zhao S, Chu Z, Ma L, et al. Significance of neuroglobin in serum of acute atherosclerotic cerebral infarction patients. *Neural Regeneration Research*, 2011, 6(27): 2140-2145.
- [14] Jin K, Mao Y, Mao X, et al. Neuroglobin Expression in Ischemic Stroke. *Stroke*, 2010, 41(3): 557-559.
- [15] Melgarejo G, Montserrat A, Acosta P, et al. Sleep deprivation reduces neuroglobin immunoreactivity in the rat brain. *Neuroreport*, 2013, 24(3): 120-125.
- [16] Marinis E, Acas-Fonseca E, Arevalo M, et al. 17[beta]-Oestradiol Anti-Inflammatory Effects in Primary Astrocytes Require Oestrogen Receptor [beta]-Mediated Neuroglobin Up-Regulation. *J Neuroendocrinol*, 2013, 25(3): 260-270.
- [17] Duong T, Witting P, Antao S, et al. Multiple protective activities of neuroglobin in cultured neuronal cells exposed to hypoxia re-oxygenation injury. *J Neurochem*, 2009, 108(5): 1143-1154.
- [18] Liu J, Yu Z, Guo S, et al. Effects of Neuroglobin Overexpression on Mitochondrial Function and Oxidative Stress Following Hypoxia/Reoxygenation in Cultured Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 2009, 87(1): 164-170.
- [19] Emar M, Salloum N, Allalunis-Turner J, et al. Expression and hypoxic up-regulation of neuroglobin in human glioblastoma cells. *Mol Oncol*, 2009, 3(1): 45-53.
- [20] 冯兴军, 尚爱加, 周定标. 脑红蛋白脑保护作用的研究现状. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 35(2): 178-181.
- [21] Nayak G, Prentice HM, Milton SL, et al. Role of neuroglobin in regulating reactive oxygen species in the brain of the anoxia-tolerant turtle *Trachemys scripta*. *J Neurochem*, 2009, 110(2): 603-612.
- [22] Burmester T, Hankeln T. What is the function of neuroglobin. *Exp Biol*, 2009, 212: 1423-1428.