

脑红蛋白的神经保护作用及可能机制

张蓓 综述 李亚军 审校

西安医学院第一附属医院, 陕西省西安市 710077

摘要: 脑红蛋白是血红素蛋白家族的新成员, 与氧具有高度亲和力, 主要表达于代谢活跃、耗氧剧烈的脊椎动物神经细胞。在缺血缺氧、氧化应激、毒物损伤等广泛的病理状态下, 脑红蛋白作为一种内源性神经保护因子, 通过调节线粒体功能、协助氧的转运、清除自由基、抑制凋亡、与细胞色素 C 等蛋白相互作用等多种途径增强组织对缺血/缺氧性损伤的耐受, 发挥了神经保护作用, 是一种备受期待的神经元损伤修复介质, 为脑缺血缺氧性损伤的研究提供了新思路。

关键词: 脑红蛋白; 神经保护; 机制

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.06.024

脑红蛋白 (neuroglobin, Ngb) 作为新近发现的一种携氧球蛋白, 它广泛表达于脊椎动物的神经细胞内, 具有高度的氧亲和力, 可逆性地结合氧, 对组织细胞的氧代谢、氧利用有重要作用。在脑缺血缺氧、氧化应激、毒物损伤等病理情况下, Ngb 的表达均有不同程度的增加, 并作为一种内源性神经保护因子增强脑组织对缺血/缺氧损伤的耐受。

1 Ngb 的结构与表达

Ngb 是 Burmester 等^[1] 在 2000 年首次发现的存在于神经组织中一种氧结合球蛋白, 并且由人类基因组的生物信息学分析证实。结构分析^[2] 表明, 人类 Ngb 呈典型的球蛋白折叠, 包含 151 个氨基酸, 分子量 17 kDa, 与肌红蛋白 (myoglobin, Mb) 和血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 仅具有 20% ~ 25% 的同源序列。它包含一个单一的非共价键合的原子 IX 修复基团, 与其他脊椎动物球蛋白不同, Ngb 主要与结合两个组氨酸侧链的血红素铁原子六配位。然而, 该结构与少量的单组氨酸 (五配位) 形式平衡, 呈现与典型气体血红素配体反应的结构。

Ngb 存在于人类和小鼠的中枢神经系统中, 特别是代谢活跃、耗氧剧烈的细胞^[3,4] (如视网膜细胞), 且主要 (约 90%) 位于细胞质中, 但免疫组织化学染色、酵母双杂交测定和生化研究等证据^[5] 均提示 Ngb 也存在于线粒体。

Ngb 是一种高度保守的蛋白质, 人类和小鼠中的 Ngb 只有 6% 的氨基酸存在差异, 其氨基酸替代

率比其他脊椎动物球蛋白降低了近 4 倍^[6], 这表明 Ngb 功能对于某些类型的组织是至关重要的。

2 Ngb 的神经保护作用

Ngb 在广泛的病理状态下的神经保护作用已被很多实验研究证实。在培养的皮质神经元中, 反义介导的 Ngb 敲低使得细胞更易于缺氧, 并且在氧化应激下神经母细胞瘤细胞的活力降低^[7]。相反, 当培养的皮质神经元暴露于氧-葡萄糖剥夺和再氧化 (oxygen-glucose deprivation and reoxygenation, OGD/R) 诱导的神经元损伤时, 轻度降低温度和 Ngb 的联合治疗显著增加细胞活力^[8,9], 从而证实了 Ngb 对 OGD/R 诱导的神经元损伤的保护作用。在细胞培养中, Ngb 的过表达保护细胞免受过氧化氢 (H₂O₂) 毒害^[10]。在亚砷酸钠 (NaAsO₂) 诱发的神经毒性研究^[11,12] 中, 应用 RNA 干扰技术沉默 Ngb, 导致 NaAsO₂ 诱导的对小脑颗粒神经元的细胞毒性加剧, 证实了 Ngb 在该病理状况下的保护作用。

除上述体外实验外, Ngb 的神经保护作用也在体内实验得到了证实。在 Ngb 转基因小鼠中^[13], 由 CMV 启动子或鸡 β-肌动蛋白启动子驱动的 Ngb 过表达改善了卒中模型中组织形态和功能缺陷的严重程度。此外, 在大鼠局灶性脑缺血模型中^[14], 外源性 Ngb 和血红素的联合治疗可以显著改善神经行为评分、脑含水量和脑梗死体积; 通过基因沉默敲低内源性 Ngb 的表达则使大鼠局灶性脑缺血的结果恶化。在心脏骤停和复苏的大鼠模型中,

基金项目: 陕西省教育厅科研基金资助项目 (14JK1629; 09JK713)

收稿日期: 2017-07-04; 修回日期: 2017-10-18

作者简介: 张蓓 (1980-), 女, 神经生物学博士, 副主任医师/副教授, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管病的基础与临床研究。

通信作者: 李亚军 (1970-), 男, 医学博士, 主任医师/教授, 硕士研究生导师, 主要从事癫痫与脑血管病的临床与基础研究。E-mail: liyajun922@sina.com。

Fan 等^[15]发现,远端缺血预处理显著降低神经元凋亡和坏死的发生,这与恢复循环 24 h 后 Ngf 表达增加相关;而在诱导远端缺血预处理之前给予反义 Ngf 核苷酸降低 Ngf 的表达,其神经保护作用也被部分消除。Ngf 过表达也可以保护 Ngf 和淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 双转基因小鼠的创伤性脑损伤和 A β 诱导的神经毒性和阿尔茨海默病表型^[16,17]。此外,研究视网膜损伤^[18]和缺血的体内实验^[19]表明 Ngf 过表达可以保护视网膜神经节细胞。

尽管大多数研究表明 Ngf 具有神经保护作用,但也有报道质疑了 Ngf 对体内神经元的保护能力。例如,在 Ngf 无效的小鼠中,缺乏 Ngf 不影响神经元和生物体的存活率,尽管它改变缺氧诱导的 c-FOS 和低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 基因表达并调控糖酵解途径相关基因^[20]。虽然不能排除 Ngf 的先天缺陷可能诱发补偿机制,但这些研究表明,至少在内源性表达水平,Ngf 不能防止缺血性损伤,所以有学者^[21]提出 Ngf 可能是一种应激诱导蛋白,当其高水平表达时,可以保护神经细胞免受伤害刺激。

3 Ngf 神经保护作用的可能机制

3.1 Ngf 通过调节线粒体功能发挥神经保护作用

Brittain 等^[22]和 Yu 等^[23]提出 Ngf 表达影响线粒体的相关功能,包括 ATP 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成,从而影响神经细胞存活。Ngf 能够稳定线粒体膜电位,Ngf 过表达与线粒体 DNA 损伤减少有关^[19]。亦有研究表明^[23],Ngf 可能参与线粒体动力学。事实上,线粒体是非常活跃的细胞器,发生裂变和融合来交换其所需要物质,并积极转移到需要能量的亚细胞部位。Ngf 过表达可以消除缺氧诱导的细胞器聚集,并且 Ngf 也可能在线粒体转运中发挥作用,改善 H₂O₂ 诱导的肌动蛋白缩合^[24]。上述发现及证据均表明 Ngf 表达局限于代谢活跃、耗氧的细胞类型,其神经保护作用可能是通过调节线粒体功能来实现的。然而,确切的机制仍在研究之中。

3.2 Ngf 通过协助氧扩散发挥神经保护作用

尽管 Ngf 是一种氧结合蛋白,但由于脑中蛋白质水平低 (< 1 μ M),且 Ngf 具有与氧的高结合速率和低解离速率,其保护作用是促进缺氧期间氧扩散的初始假说受到质疑^[25]。然而,虽然 Ngf 的生物及物理性质对于氧气运输来说并不是最佳的,但至

少在某些组织区域,Ngf 实际上却可以发挥这种生理作用,如在视网膜中^[26]。也有学者提出 Ngf 的氧结合特点可能意味着 Ngf 在氧感测和能量代谢即 ATP 产生中具有突出作用,缺氧/再氧化后 ATP 水平的下降被 Ngf 过度表达显著改善支持该假设^[27]。

3.3 Ngf 通过清除 ROS/RNS 发挥神经保护作用

使用重组人 Ngf 的研究证实,该蛋白质可以有效地清除各种活性氧,包括超氧化物阴离子、H₂O₂ 和羟基自由基^[28]。与一氧化氮 (NO) 的反应是 Ngf 与 Mb 共有的反应,基于这一特点,Ngf 在防止 NO 和活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 诱导的神经毒性中起到神经保护作用。在缺血再灌注损伤的小鼠模型发现^[29],Ngf 过表达与海马 CA1 区域的 ROS/RNS 生成和脂质过氧化作用显著降低有关。Ngf 可以通过促进表达 NO 双加氧酶来消除 NO,在 NO 脱氧反应中,含铁的氧-血红素络合物与 NO 反应形成三氧化铁血红素和硝酸盐。然而,由于 Ngf 快速的自动氧化并且在体内表达的量相当低,所以需要还原剂或还原酶还原体系来回收亚铁形式,以便有效地消除 NO^[29]。尽管作出了相当大的努力,但这种再减少系统从未在体内被确定。Liu 和 Brittain^[30]的基于 Ngf 在各种条件下的铁态形式稳态浓度的数学模型研究表明,尽管 Ngf 自动氧化速度快,但在体内仍可以维持低浓度的 Ngf。尽管 Ngf 与血红素配体的反应特征不限于线粒体的多效性,但可以影响它 ATP 和 ROS/RNS 产生方面的功能,并且可能驱动 Ngf 诱导的神经保护的过程,特别是在 Ngf 过表达时。

3.4 Ngf 通过与 Cyt-C 等蛋白相互作用发挥神经保护作用

蛋白质-蛋白质相互作用的生物信息学分析表明^[31],Ngf 分子表面上超过 80% 的氨基酸具有非零倾向性,说明 Ngf 可以利用许多不同的位点与其他蛋白质相互作用。此外,在 STRING 数据库^[31,32]中搜索涉及人 Ngf 的已知和预测的蛋白质-蛋白质相互作用,发现 Ngf 可能与参与调节凋亡过程的许多蛋白质相互作用,例如细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C)、电压依赖阴离子通道 (voltage-dependent anion channel, VDAC) 和信号转导机制 (如 G 蛋白)。大多数所指示的相互作用由 STRING 预测为与 Ngf 结合的直接相互作用。Ngf 上的界面残基 Glu60 和 Glu87 结合 Cyt-C 上的残基 Lys72 和 Lys25,它们将 Cyt-C 与凋亡酶激活因子-1 (apoptotic protease

activating factor-1, APAF1),一种关键的凋亡形成蛋白,强制的结合^[33]。然而,到目前为止,这些氨基酸相互作用尚未经过实验验证。

3.5 Ngf 通过抑制凋亡发挥神经保护作用

Ngf 对 ROS 的清除作用,以及对 NO 和 RNS 诱导的神经毒性的保护作用可以减少细胞内毒性刺激的数量并预防凋亡。此外,Ngf 可以通过与 VDAC, Gα 蛋白和 Cyt-C 等蛋白质的直接相互作用来调节凋亡过程。Ngf 不是简单地抑制凋亡过程,而是重置触发凋亡级联反应所需的细胞损伤水平。许多实验证据提供了 Ngf 表达水平与多种凋亡标志物之间的相关性。在缺氧条件下,使用 TAT PTD-Ngf 融合蛋白上调初级皮质神经元中 Ngf 的水平,降低了胱天蛋白酶-3 (caspase-3) 和 caspase-9 的活性^[34]。在经历 BH3 模拟诱导的细胞凋亡或 Aβ 毒性的人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中也观察到通过 Ngf 过表达可以抑制 caspase-3 和 caspase-9 的活性^[35,36]。

在 Lan 等^[37]的体内研究中,在脊髓损伤前 7 天通过腺病毒注射诱导大鼠 Ngf 过度表达,在脊髓损伤后 24 h 行组织病理学和生物化学评估,结果显示,与对照大鼠相比,过表达 Ngf 的动物细胞凋亡明显减少,Cyt-C 从线粒体到胞浆的释放和 caspase-3 的活性同时降低,表明在该动物模型中,Ngf 的神经保护作用与线粒体依赖性凋亡途径的抑制有关。

4 结语

Ngf 作为一种内源性神经保护因子,通过协助氧的转运、清除自由基、调节线粒体功能、抑制凋亡等多种途径增强了组织对缺血/缺氧性损伤的耐受,进一步明确其涉及的信号通路及相关因子形成的分子信号网络,将为外伤性颅脑损伤^[16]、急性脑血管疾病(缺血性及出血性)、急性心肌缺血、视网膜病变、新生儿窒息及帕金森病和阿尔茨海默病^[17]等神经系统退行性病变的治疗带来新的希望,开启新的航向。

参 考 文 献

- [1] Burmester T, Weich B, Reinhardt S, et al. A vertebrate globin expressed in the brain [J]. *Nature*, 2000, 407 (6803): 520-523.
- [2] Pesce A, Dewilde S, Nardini M, et al. Human brain neuroglobin structure reveals a distinct mode of controlling oxygen affinity [J]. *Structure*, 2003, 11(9): 1087-1095.
- [3] Fabrizio A, Andre D, Laufs T, et al. Critical re-evaluation of neuroglobin expression reveals conserved patterns among mammals [J]. *Neuroscience*, 2016, 3(37): 339-354.
- [4] Burmester T, Hankeln T. Function and evolution of vertebrate globins [J]. *Acta Physiol (Oxford, England)*, 2014, 211 (3): 501-514.
- [5] Guidolin D, Tortorella C, Marcoli M, et al. Neuroglobin, a Factor Playing for Nerve Cell Survival [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 7(11): 1817-1833.
- [6] Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, et al. Neuroglobin and cytochrome b5 in search of their role in the vertebrate globin family [J]. *J Inorg Biochem*, 2005, 99(1): 110-119.
- [7] Nuzzo MT, Fiocchetti M, Servadio M, et al. 17β-Estradiol modulates huntingtin levels in rat tissues and in human neuroblastoma cell line [J]. *Neurosci Res*, 2016, 2(103): 59-63.
- [8] Yu Z, Zhang Y, Liu N, et al. Roles of Neuroglobin Binding to Mitochondrial Complex III Subunit Cytochrome c1 in Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Neurotoxicity in Primary Neurons [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(5): 3249-3257.
- [9] Gao XY, Huang JO, Hu YF, et al. Combination of mild hypothermia with neuroprotectants has greater neuroprotective effects during oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-mediated neuronal injury [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(16): 70-91.
- [10] Amri F, Ghouili I, Amri M, et al. Neuroglobin protects astroglial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptotic cell death [J]. *J Neurochem*, 2017, 140 (1): 151-169.
- [11] Liu X, Gao Y, Yao H, et al. Neuroglobin involvement in the course of arsenic toxicity in rat cerebellar granule neurons [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2013, 155(3): 439-446.
- [12] Liu X, Gao Y, An Y, et al. Neuroglobin Plays a Protective Role in Arsenite-Induced Cytotoxicity by Inhibition of Cdc42 and Rac1 GTPases in Rat Cerebellar Granule Neurons [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(4): 1613-1627.
- [13] Raida Z, Hundahl CA, Nyengaard JR, et al. Neuroglobin over expressing mice: expression pattern and effect on brain ischemic infarct size [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76565.
- [14] Xie F, Xu R, Song X, et al. Joint protective effect of exogenous neuroglobin and hemin in rat focal ischemic brain tissues [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(8): 2009-2016.
- [15] Fan R, Yu T, Lin J L, et al. Remote ischemic preconditioning improves post resuscitation cerebral function via overexpressing neuroglobin after cardiac arrest in rats [J]. *Brain Res*, 2016, 1648 (Pt A): 345-355.
- [16] Lin X, Li M, Shang A, et al. Neuroglobin expression in rats after traumatic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2012,

7(25): 1960-1966.

- [17] Seal M, Uppal S, Kundu S, et al. Interaction of apoNeuroglobin with heme-A β complexes relevant to Alzheimer's disease[J]. J Biol Inorg Chem, 2015, 20(3): 563-574.
- [18] Yu Z L, Qiu S, Chen X C, et al. Neuroglobin-a potential biological marker of retinal damage induced by LED light[J]. Neuroscience, 2014, 270(3): 158-167.
- [19] Chan AS, Saraswathy S, Rehak M, et al. Neuroglobin protection in retinal ischemia[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012, 53(2): 704-711.
- [20] Hundahl CA, Luuk H, Ilmjarv S, et al. Neuroglobin-deficiency exacerbates Hif1A and c-FOS response, but does not affect neuronal survival during severe hypoxia in vivo[J]. PloS One, 2011, 6(12): e28160.
- [21] Fiocchetti M, De Marinis E, Ascenzi P, et al. Neuroglobin and neuronal cell survival[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1834(9): 1744-1749.
- [22] Brittain T, Skommer J, Henty K, et al. A role for human neuroglobin in apoptosis[J]. IUBMB Life, 2010, 62(12): 878-885.
- [23] Yu Z, Poppe JL, Wang X. Mitochondrial mechanisms of neuroglobin's neuroprotection[J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013(6): 1-11.
- [24] De Marinis E, Fiocchetti M, Acconcia F, et al. Neuroglobin upregulation induced by 17 β -estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H₂O₂-induced apoptosis of neuroblastoma cells[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(2): 1-8.
- [25] Ascenzi P, Gustincich S, Marino M. Mammalian nerve globins in search of functions[J]. IUBMB Life, 2014, 66(4): 268-276.
- [26] Roberts PA, Gaffney EA, Luthert PJ, et al. Retinal oxygen distribution and the role of neuroglobin[J]. J Math Biol, 2016, 73(1): 1-38.
- [27] Duong TT, Witting PK, Antao ST, et al. Multiple protective activities of neuroglobin in cultured neuronal cells exposed to hypoxia re-oxygenation injury[J]. J Neurochem, 2009, 108(5): 1143-1154.
- [28] Li W, Wu Y, Ren C, et al. The activity of recombinant human neuroglobin as an antioxidant and free radical scavenger[J]. Proteins, 2011, 79(1): 115-125.
- [29] Trashin S, de Jong M, Luyckx E, et al. Electrochemical Evidence for Neuroglobin Activity on NO at Physiological Concentrations[J]. J Biol Chem, 2016, 291(36): 18959-18966.
- [30] Liu A, Brittain T. A Futile Redox Cycle Involving Neuroglobin Observed at Physiological Temperature[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(8): 20082-20094.
- [31] Guidolin D, Agnati LF, Tortorella C, et al. Neuroglobin as a regulator of mitochondrial-dependent apoptosis: a bioinformatics analysis[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(1): 111-116.
- [32] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration[J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(Database issue): D808-D815.
- [33] Fiocchetti M, De Marinis E, Ascenzi P, et al. Neuroglobin and neuronal cell survival[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1834(9): 1744-1749.
- [34] Lin Y, Cai B, Xue XH, et al. TAT-mediated delivery of neuroglobin attenuates apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation via the Jak2/Stat3 pathway in vitro[J]. Neurol Res, 2015, 37(6): 531-538.
- [35] Skommer J, Brittain T. Extended survival of SH-SY5Y cells following overexpression of Lys67Glu neuroglobin is associated with stabilization of DeltapsiM[J]. Cytometry A, 2012, 81(7): 602-610.
- [36] Li Y, Dai YB, Sun JY, et al. Neuroglobin Attenuates Beta Amyloid-Induced Apoptosis Through Inhibiting Caspases Activity by Activating PI3K/Akt Signaling Pathway[J]. J Mol Neurosci, 2016, 58(1): 28-38.
- [37] Lan WB, Lin JH, Chen XW, et al. Overexpressing neuroglobin improves functional recovery by inhibiting neuronal apoptosis after spinal cord injury[J]. Brain Res, 2014, 15(62): 100-108.