

促红细胞生成素对糖尿病神经病变的保护作用

陈燕 综述 刘志红 审校

关键词 促红细胞生成素 糖尿病神经病变

糖尿病神经病变作为糖尿病最主要的并发症及致残原因之一,严重影响患者的生活质量,目前临床上尚缺乏有效的治疗手段。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是分子质量约30~39kD的糖蛋白。过去一直认为,EPO主要由肾小管细胞合成,仅作用于骨髓巨核前体细胞,刺激红系造血祖细胞及早幼红细胞形成成熟的红细胞集落。近年的研究表明,正常脑组织中均有低水平EPO和EPO受体表达,并且发挥神经保护作用^[1]。动物实验显示外源性EPO对脑缺血、脊髓束或外周神经损伤、自身免疫性脑脊髓炎、视网膜损伤等多种神经系统损伤有保护作用^[2]。在此基础上,随着EPO及EPO受体在外周神经的发现^[3], Bianchi等^[4]进一步证实EPO还能预防甚至逆转大鼠糖尿病神经病变,为防治糖尿病神经病变开拓了新的思路。

糖尿病神经病变的危害

糖尿病神经病变是糖尿病常见的慢性并发症之一,导致糖尿病患者病死率和致残率升高。文献报道其发病率自10%~100%不等,这主要源于对糖尿病神经病变的诊断标准和判定方法不同。临床发病率可达47%~91%;而以神经生理学改变判断,发病率则高达80%~100%。各型糖尿病的神经营变发病率几乎相同。

根据累及神经部位不同,糖尿病神经病变临床表现差异很大,可分为对称性多发性周围神经病变、非对称性神经病变、植物神经病变。患者可出现肢体麻木、发凉、灼热刺痛等感觉异常,有时表现为痛觉减退,四肢远端对称性“手套”、“袜套”型感觉障碍。累及植物神经可以出现心率和血压的改变,甚至体位性低血压;胃部不适、恶心呕吐、腹泻、便秘等

胃肠功能紊乱;此外还可表现为尿潴留、性功能减退、体温调节和出汗异常等,严重影响患者生活质量。糖尿病神经病变是导致足底溃疡、糖尿病足干性坏疽与截肢(趾)的主要原因之一。非创伤性截肢50%~75%源于糖尿病神经病变。糖尿病神经病变患者5~10年内死亡率可达25%~50%。

对糖尿病神经病变目前临床上尚缺乏有效的治疗手段,严格控制血糖只能在一定程度上缓解患者的症状。近来有人研究抗氧化剂、神经营养因子等在糖尿病神经病变治疗中的作用^[5],已进入临床试验阶段,但尚未取得肯定疗效。随着对EPO神经保护作用认识的日益深入,其在糖尿病神经病变防治中的应用也逐渐引起了人们的关注。

EPO神经保护作用机制

研究显示,多种因素参与糖尿病神经病变。有报道,神经内膜局部产生的炎症细胞因子及巨噬细胞浸润在糖尿病神经病变中发挥重要作用^[6,7]。其次,微血管病变可以导致外周神经血供减少、神经内膜缺氧,发生神经功能紊乱^[8],介导糖尿病神经病变。此外,更重要的是,高糖可诱导后根神经节的神经元及施旺细胞发生凋亡^[9],致使髓鞘磷脂减少,产生神经功能异常。这几方面的因素共同作用,导致糖尿病神经病变。

新近的研究表明EPO可以从多方面阻断糖尿病神经病变。EPO可以减轻脑缺血过程中的炎症反应^[10],所以推测其同样可以减轻外周神经病变中的炎症反应,发挥神经保护作用。另外,体内、体外试验均证明EPO还可促进血管生成,增加外周神经血供,促进神经功能恢复^[11]。更重要的是,研究已经证实EPO可防止后根神经节的神经元细胞的凋亡。这一作用依赖于蛋白酪氨酸磷酸激酶(JAK-2)级联信号转导途径的激活^[12]。EPO与神经元上的EPO受体结合,激活JAK-2,使其磷酸化,进一步介

[作者单位] 南京军区南京总医院 解放军肾脏病研究所
(南京,210002)

导下游的信号转导。使用 JAK-2 抑制剂 AG490 可以显著减弱 EPO 的神经保护作用,证实 JAK-2 在 EPO 介导的神经保护方面起关键作用。磷酸化的 JAK-2 可以通过两条信号转导通路——磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K)-Akt 通路、核因子- κ B (NF- κ B) 通路——最终实现其抑制凋亡的作用(图 1)。

JAK-2 磷酸化可以激活下游 PI3K, PI3K 特异性诱导丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt 的丝氨酸及苏氨酸磷酸化,激活 Akt。Akt 在抑制神经细胞凋亡的过程中发挥着核心作用。在正常情况下,非磷酸化的 Bcl-2 死亡相关蛋白(Bad)与抗凋亡蛋白 Bcl-XL 或 Bcl-2 结合形成异二聚体,抑制抗凋亡作用。Akt 通过磷酸化 Bad,激活 Bcl-XL 或 Bcl-2,从而抑制凋亡^[13]。此外,Akt 还可以影响其他细胞凋亡相关因子,如肝糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β)、Caspase-9、Jun 氨基末端激酶(JNK)、叉头转录因子等,促进神经细胞凋亡。

PI3K-Akt 通路主要通过蛋白磷酸化等调控机制迅速发挥作用,但 EPO 的神经保护作用在 24h 后逐渐增强,提示可能涉及某些基因表达增加。Digi-caylioglu 等^[12]研究发现,磷酸化的 JAK-2 还可导致 NF- κ B 抑制因子(I κ B)磷酸化,使其与 NF- κ B 解离,从而 NF- κ B 转位至核内,调节下游基因转录。使用 JAK-2 抑制剂 AG490 可以减少 NF- κ B 的核转位,此外,利用 Ad5 I κ B 抑制 NF- κ B 的活性,可以明显减弱 EPO 的抗凋亡作用。均证实了 NF- κ B 通路在 EPO 神经保护中的重要作用。

NF- κ B 转入核内以后,通过上调凋亡抑制蛋白 XIAP 和 c-IAP2,阻断特异性细胞死亡蛋白酶 Caspase,抑制神经细胞凋亡^[14];也可以通过增加锰、铜、锌结合的超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽的活性,减轻 O₂-及 ONOO-的促细胞凋亡作用^[15,16]。同时 NF- κ B 还可以激活抗凋亡蛋白 Bcl-XL,直接发挥抗凋亡作用。

EPO 治疗糖尿病神经病变的研究现状及临床应用前景

EPO 在糖尿病神经病变治疗中的研究尚处于起步阶段。Bianchi 等^[4]利用链脲霉素(STZ)诱导产生类似于人类糖尿病神经病变的大鼠模型,分别在糖尿病神经病变产生之前或之后给予人重组 EPO(rhEPO)治疗,通过测定温痛觉阈值、神经传导

速度、复合肌肉动作电位、坐骨神经 Na⁺, K⁺-ATP 酶的含量、表皮内神经纤维密度观察神经功能的变化。结果表明,经过 STZ 处理 5 周或 9 周后大鼠的机械疼痛阈值明显降低,而无论在预防组或治疗组,应用 rhEPO 均能显著逆转这一改变。提示 rhEPO 治疗可以部分逆转糖尿病患者的痛觉过敏现象。神经传导速度、复合肌肉动作电位是反应轴突功能的主要指标,STZ 处理的大鼠,其神经传导速度和复合肌肉动作电位均明显下降,rhEPO 治疗可以部分预防或逆转两者的下降。此外,rhEPO 治疗还可完全逆转糖尿病大鼠皮肤神经分布密度的下降,部分恢复 Na⁺, K⁺-ATP 酶的活性。

这一研究结果有力地证明 EPO 对于糖尿病神经病变的防治作用,但其副作用限制了临床应用。长期 EPO 治疗的患者约 30% 出现高血压或高血压加重,需要增加降压药的用量。而 EPO 带来的红细胞比积的增加,则成为 EPO 在糖尿病神经病变中应用的最大障碍。长期 EPO 治疗的糖尿病大鼠红细胞比积可以增加 45%。EPO 提高血红蛋白浓度,增加血液粘滞性,促进血小板聚集,使糖尿病患者更易于形成血栓,增加心血管事件的发生率。

近来发现 EPO 的神经保护作用及促红细胞生成作用具有不同的作用机制和特点,两种作用所需 EPO 的刺激时间不同,参与作用的受体也不同。因此设想通过对 EPO 进行化学修饰,使 EPO 仅发挥神经保护作用,而不作用于骨髓红系造血祖细胞,克服上述 EPO 的副作用。研究表明,促红细胞生成需要持续不断的 EPO 刺激,而神经保护作用仅需要短暂的 EPO 刺激^[17]。据此,可以通过缩短 EPO 的作用时间,将这两种作用分离。Erbayraktar 等^[18]将 EPO 分子中唾液酸基团全部去除生成 asialoEPO,其与 EPO 受体的亲和力不变,但半衰期较普通 EPO 明显缩短,试验证明,asialoEPO 同样具有完全的神经保护作用^[19,20],而不刺激红细胞的生成。

asialoEPO 虽然半衰期很短,但其与 EPO 受体的亲和力与普通 EPO 无区别,仍然不能完全排除刺激骨髓红祖细胞的可能性。根据以往的研究,骨髓中 EPO 的受体主要是 (EPOR)₂,属于 I 类细胞因子家族,参与 EPO 促红细胞生成的作用。而介导神经保护作用的受体无论在分子量、受体亲和力或蛋白结构上都不同于 (EPOR)₂^[21](图 2),在对 EPO 构效关系的研究中发现,EPO 分子中与两种受体结合的

位点分别位于不同区域²² 因此设想,通过改变EPO的局部分子结构破坏(EPOR)₂的结合区域,而不影响其与神经受体的结合 Leist等²³将EPO分子中所有赖氨酸通过氨基甲酰化作用转化为瓜氨酸,产生CEPO 体外实验表明,CEPO即使在持续高浓度存在的情况下也完全不能与造血细胞上的(EPOR)₂结合,且无促红细胞生成的活性,但抑制神经细胞凋亡的活性不变 CEPO的产生使EPO的神经保护作用与其促红细胞生成的作用分离,不介导形成

高机体对EPO的耐受性。

随着糖尿病发病率的日益增高,糖尿病神经病变已经成为影响糖尿病患者生活质量的一个重要问题。长期以来,糖尿病神经病变的治疗始终缺乏有效的手段,随着EPO神经保护作用的发现,其在糖尿病神经病变中的作用也得到了证实。经过分子修饰的asialoEPO和CEPO则进一步克服了普通EPO的促红细胞生成的副作用。因此,我们有理由认为,EPO的应用将成为糖尿病神经病变治疗中的一个重要突破。

参 考 文 献

- 1 Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, et al. Neurons and astrocytes express brain EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia*, 2000, 30(3): 271-278.
- 2 Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(19): 10526-10531.
- 3 Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. *FASEB J*, 2001, 15(10): 1804-1806.
- 4 Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, et al. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(3): 823-828.
- 5 Pradat PF. Treatment of peripheral neuropathies with neurotrophic factors: animal models and clinical trials. *Rev Neurol (Paris)*, 2003, 159(2): 147-161.
- 6 Conti G, Stoll G, Scaipini E, et al. p75 neurotrophin receptor induction and macrophage infiltration in peripheral nerve during experimental diabetic neuropathy: possible relevance on regeneration. *Exp Neurol*, 1997, 146(1): 206-211.
- 7 Conti G, Scaipini E, Baron P, et al. Macrophage infiltration and death in the nerve during the early phases of experimental diabetic neuropathy: a process concomitant with endoneurial induction of IL-1beta and p75NTR. *J Neurol Sci*, 2002, 195(1): 35-40.
- 8 Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, et al. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 2001, 44(11): 1973-1988.
- 9 Russell JW, Sullivan KA, Windelbank AJ, et al. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis*, 1999, 6(5): 347-363.
- 10 Villa P, Bigini P, Mennini T, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*, 2003, 198(6): 971-975.
- 11 Ribatti D, Presta M, Vacca A, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood*, 1999, 93(8): 2627-2636.
- 12 Digeniyoglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection

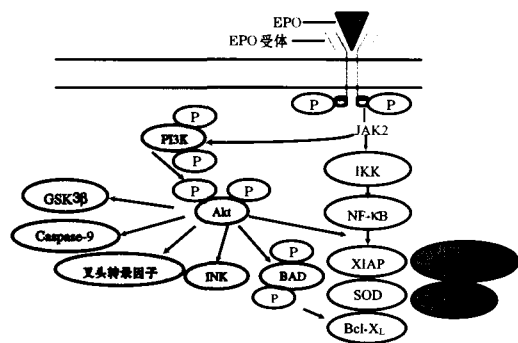


图1 EPO抗神经细胞凋亡作用机制

EPO:促红细胞生成素;PI3K:磷酸肌醇3-激酶;IKK:I-κB激酶;GSK3β:肝糖原合成酶激酶3β;Bad:Bcl-2死亡相关蛋白;JNK:Jun氨基末端激酶;NF-κB:核因子-κB;XIAP:凋亡抑制蛋白;SOD:超氧化物歧化酶

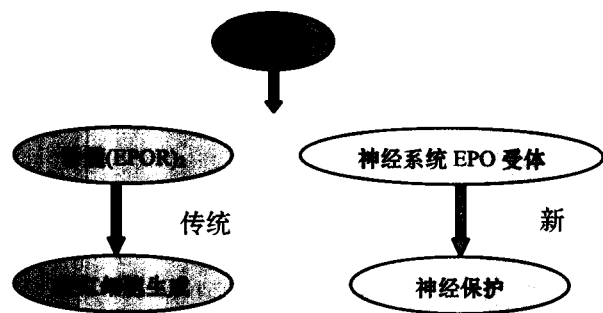


图2 促红细胞生成素作用受体示意图

此外,近来还有研究将EPO与胰岛素样生长因子1(IGF-1)联合应用²⁴,可以产生协同抗凋亡作用,减少给药剂量,减少副作用。EPO与IGF-1均为体内重要的抑制神经元细胞凋亡的细胞因子,两者联合应用,可以协同激活PI3K-Akt途径,降低发挥神经保护作用的最小有效浓度,减少各自的用量,提

- involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signaling cascades. *Nature*, 2001, 412(6847):641-647.
- 13 Ruscher K, Freyer D, Karsch M, *et al.* Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain; evidence from an in vitro model. *Neuroscience*, 2002, 22(23):10291-10301.
 - 14 Wang CY, Mayo M W, Korneluk R G, *et al.* NF- κ B antiapoptosis; induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 1998, 281(5383):1680-1683.
 - 15 O'Neill LA, Kaltschmidt C. NF- κ B; a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*, 1997, 20(6):252-258.
 - 16 Mattson MP, Goodman Y, Luo H, *et al.* Activation of NF- κ B protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis; evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci. Res*, 1997, 49(6):681-697.
 - 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. *Neuroscience*, 1997, 76(1):105-116.
 - 18 Erbayraktar S, Grasso G, Sforzetta A, *et al.* Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100(11):6741-6746.
 - 19 Liu XZ, Xu XM, Hu R, *et al.* Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*, 1997, 17(14):5395-5406.
 - 20 Bethea JR, Castro M, Keane RW, *et al.* Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci*, 1998, 18(9):3251-3260.
 - 21 Masuda S, Nagao M, Takahata K, *et al.* Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. *J Biol Chem*, 1993, 268(15):11208-11216.
 - 22 Campana WM, Misasi R, O'Brien JS, *et al.* Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *Int J Mol Med*, 1998, 1(1):235-241.
 - 23 Leist M, Ghezzi P, Grasso G, *et al.* Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*, 2004, 305(9):239-242.
 - 24 Digicaylioglu M, Garden GA, Timberlake S, *et al.* Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(26):9855-9860.

[收稿日期] 2004-10-08 [修回日期] 2004-10-20
(本文编辑 凡心 丁大洪)

(上接第 356 页)

- 15 Takeda T, Go WY, Orlando RA, *et al.* Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*, 2000, 11(9):3219-3232.
- 16 Orlando RA, Takeda T, Zak B, *et al.* The glomerular epithelial cell anti-adhesin, podocalyxin, associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(8):1589-1598.
- 17 Wharram BL, Goyal M, Gillespie PJ, *et al.* Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpo)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest*, 2000, 106(10):1281-1290.
- 18 Shih NY, Li J, Karpitskii V, *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*, 1999, 286(5438):312-315.
- 19 Barletta GM, Kovari IA, Verma RK, *et al.* Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem*, 2003, 278(21):19266-19271.
- 20 Patrakka J, Kestila M, Wartiovaara J, *et al.* Congenital nephrotic syndrome (NPHS1); features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int*, 2000, 58(3):972-980.
- 21 Lahdenpera J, Kilpelainen P, Liu XL, *et al.* Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases. *Kidney Int*, 2003, 64(2):404-413.
- 22 Roselli S, Heidet L, Sich M, *et al.* Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(2):550-560.
- 23 Yuan H, Takeuchi E, Salant DJ. Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 282(4):F585-F591.
- 24 Shih NY, Li J, Cotran R, *et al.* CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol*, 2001, 159(6):2303-2308.
- 25 Oh J, Reiser J, Mundel P. Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 2004, 19(2):130-137.

[收稿日期] 2005-02-20 [修回日期] 2005-06-29
(本文编辑 丁大洪)