

## 促红细胞生成素的神经保护功能与视网膜保护作用

刘夫玲 牛膺筠 王红云

**【摘要】** 促红细胞生成素(EPO)是一种主要影响红细胞生成的体液因子,在中枢神经系统缺氧缺血性脑损伤中发挥抗细胞凋亡、抗兴奋性氨基酸神经毒性、抗自由基、抗氧化作用和神经营养作用,在视网膜疾病的神经元损伤中具有神经保护和促进神经再生的功能。

**【关键词】** 红细胞生成素/生理学; 神经保护; 综述文献

中图分类号:R774.6

老年性黄斑变性、视网膜脱离、视网膜色素变性、视网膜功能不良性疾病、视神经损伤等眼科发病率较高的视网膜、视神经疾病的共同病理机制是视网膜神经节细胞、光感受器细胞等神经元的凋亡,最终导致视力的丧失<sup>[1,2]</sup>,因而,视网膜保护在眼科基础和临床研究中具有重要意义。最近研究表明,缺血、缺氧可以导致促红细胞生成素(EPO)及其受体(EPOR)在神经细胞的表达及上调;EPO、EPOR在神经对损伤的应答中表现出重要的保护作用,因而又被当成一种重要的神经营养因子<sup>[3]</sup>。

### 1 EPO 的分子结构

EPO来源于肾脏及胚胎肝,是一种含唾液酸的酸性糖蛋白,由165个氨基酸组成。天然存在的EPO有 $\alpha$ 、 $\beta$ 两种类型,两种类型的生物学特性、抗原性相同,主要区别在于碳水化合物含量不同。人类EPO基因位于7号染色体长臂22区。EPO分子由多肽和糖基构成,相对分子质量约 $34 \times 10^4$ ,含有2个二硫键、一个碳末端的精氨酸(Arg)残基。EPO的糖基包括3个氮末端N-糖基(分别位于天冬氨酸 Asp24, Asp38, Asp83)和一个丝氨酸(O-糖基(位于Ser126)。它们的主要成分是甘露糖、岩藻糖、唾液酸等低聚糖<sup>[4]</sup>。其中,唾液酸在维持EPO分子的酸性、阻断细胞表面半乳糖受体结合、防止EPO失活等方面有重要作用<sup>[5]</sup>。重组人促红细胞生成素(rHuEPO)是一种通过使用重组DNA技术生产的、含有与天然分离的EPO完全相同氨基酸序列的糖蛋白,且与天然EPO具有相同的生物学活性,已广泛用于临床<sup>[7]</sup>。

### 2 EPO 的神经保护作用

除造血细胞外,EPO对于胚胎期神经系统的发育有促进作用,对神经组织损伤也有重要的保护作用。近来大量研究表明,神经组织中也有EPO和EPOR的表达。同时发现EPO的生成量与神经组织的供血供氧情况相关。神经元缺血时,EPO的生成量成倍增加,并对神经元起保护作用<sup>[8]</sup>。

Masuda等<sup>[9]</sup>于1994年首先在鼠胚胎18d脑细胞的体外培养中用Southern杂交和免疫化学染色方法发现了神经细胞

自身分泌的EPO,且与肾源性EPO结构相同。提示EPO的产生不仅局限于肾脏,在脑组织中同样有EPO存在并对神经元有旁分泌作用。Juul等<sup>[10]</sup>利用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术在人类胚胎脊髓培养及脑组织中检测到EPO及EPOR的mRNA,利用酶联免疫技术(ELISA)证实了培养液中存在EPO分子,并利用免疫组织化学染色法在胚胎脑组织切片上发现了神经元和神经胶质细胞膜的EPOR。Marti等<sup>[11]</sup>利用脑组织活检和反转录技术证明不仅是胚胎,在鼠、猴和人的脑组织中都能检出EPO和EPOR的mRNA,而且广泛分布于海马和大脑皮质中。同时利用新生小鼠的神经细胞培养发现,EPO的mRNA在缺氧条件下会成百倍的增加。说明神经细胞EPO生成在转录水平上受到供氧量的调节。Bernaudin等<sup>[12]</sup>在大鼠大脑中动脉栓塞模型中证实,栓塞前24h脑室内注射EPO能有效减少梗塞面积47%。同时,还发现EPO能维持梗塞后大鼠的定向力和学习能力,明显改善梗塞区的神经功能。主要通过海马神经元和皮质神经元等体外神经元培养进一步证明,在缺氧、谷氨酸或红藻氨酸(兴奋性毒素)中毒、血清缺乏等多种代谢性应激中,EPO均有明显的神经元保护作用。Siren等<sup>[13]</sup>进一步证实,EPO在代谢异常条件下具有神经元保护作用,在正常生理条件下具有促使神经元增生肥大、树突增多、功能增强、分化良好等一系列营养性作用;而且EPO对于神经元的保护是一种直接作用,不必依赖于神经胶质细胞。

为研究中枢神经系统神经前体细胞的增生和分化是否受氧环境的调节,Studer等<sup>[14]</sup>用浓度为20%的氧和较低浓度(3%±2%)的氧两种培养方法观察了胚胎12d大鼠中脑神经前体细胞。当细胞培养在低浓度氧中时,细胞增生加强,凋亡减少,产生的多巴胺能神经元明显增加,且有更多的EPO的表达;在20%氧环境中,将EPO加入培养基,部分模拟低氧环境,中脑神经前体细胞表现出向具有多巴胺能神经细胞特征的神经元分化增加的现象。Juul等<sup>[10]</sup>分别用半定量-PCR、ELISA技术研究显示,人类大脑及脊髓的神经元、神经元的原代培养时,神经胶质细胞和星形胶质细胞都有EPO、EPOR的mRNA和蛋白的表达,低氧时神经元EPOR的mRNA增加2倍。另有研究显示,当星形胶质细胞培养于1%低氧浓度时,EPO与EPOR的mRNA和蛋白的表达是正常氧培养时的100倍<sup>[11]</sup>。

最近, Nagai 等<sup>[15]</sup>用 RT-PCR、ELISA 技术研究的资料表明,在高度纯化培养人神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞和少突胶质细胞时, EPO 的 mRNA 仅存在于星形胶质细胞,但是 EPOR 表达于神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞,而在少突胶质细胞中未发现 EPO 与 EPOR 表达。由此认为,星形胶质细胞是脑部 EPO 的主要生成细胞,并且在一些细胞因子如白细胞介素、肿瘤坏死因子的作用下 EPO 表达下调。

EPO 神经保护作用的机制可能与 EPO 的抗细胞凋亡作用、保护神经元免受兴奋性氨基酸的毒性作用、增强细胞钙内流、抑制一氧化氮(NO)过度合成等有关。

Juul 等<sup>[10]</sup>发现胚胎发育的神经元的凋亡,而用重组 EPO 能对抗低氧所致的神经元的凋亡。Yu 等<sup>[16]</sup>的研究表明,缺乏 EPOR 的小鼠胚胎在经过 24 h 的缺氧暴露后在肝脏、心内膜、脑部发生了广泛的细胞凋亡,而存在 EPOR 表达的神经元在 EPO 的刺激下能使 EPOR 表达进一步增强, EPO 增强了细胞增生和降低了细胞凋亡,表明 EPO 于胚胎脑中有防止细胞凋亡的功能。最近 Wen 等<sup>[17]</sup>在持续性局部脑缺血大鼠动物模型中发现在缺血 6~12 h 后, Western blot (蛋白质分子杂交) 检测显示 EPOR 的表达明显升高,组织化学双标记提示在损伤部位的脑组织有大量的 EPOR 的阳性染色细胞,以神经元、小胶质细胞为主,并且主要出现在发生凋亡的区域,提示缺血部位的 EPOR 的激活在损伤中起重要作用。相关研究表明,在体外细胞培养中, EPO 能以较低浓度,减少由于缺氧而引起的神经元细胞损伤,并且可以上调神经元的抗凋亡基因 Bcl-xL mRNA 及蛋白质表达,从而可以促进神经元存活<sup>[18]</sup>。目前研究认为缺血后神经元细胞凋亡是 EPO 短期神经保护作用的基础,而 EPO 的神经营养作用则具有长期保护效果<sup>[19]</sup>。

谷氨酸是脊椎动物视网膜和中枢神经系统的主要兴奋性神经递质,它作用于谷氨酸受体,介导视网膜神经细胞间的信息传递。然而,谷氨酸又是一种潜在的神经细胞兴奋性毒素,若其过量,将导致神经细胞的死亡。已有研究证实,谷氨酸在视网膜缺血、青光眼、视神经挫伤等过程中起着重要作用<sup>[20]</sup>。视网膜缺氧缺血时能量代谢障碍导致谷氨酸浓度大量增加,谷氨酸通过与 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体结合导致钙钠通道开放,大量持续钙内流导致细胞内钙超载,从而介导细胞内一系列依赖钙离子的生化反应,最终导致神经元坏死<sup>[21]</sup>。现在认为谷氨酸兴奋性毒性是触发视网膜缺血性神经元损伤级联反应的最主要因素<sup>[22,23]</sup>。

Morishita 等<sup>[24]</sup>在体外培养大鼠海马及大脑皮层细胞,在谷氨酸损伤前 24 h 用 EPO 进行预处理,再暴露于谷氨酸环境 15 min 后再培养 24 h,结果显示用 EPO 治疗的实验组神经元死亡较对照组明显减少,且 EPO 阻止谷氨酸诱导神经元死亡存在剂量依赖效应。实验还发现 EPO 先于谷氨酸加入培养基中至少 8 h 发挥其神经保护作用,用可溶性 EPOR 结合 EPO 可抵消 EPO 的保护作用。Kawakami 等<sup>[25]</sup>进一步证实 EPOR 受体的激活能抑制谷氨酸的释放而对抗神经元缺血损伤。

大量证据表明细胞内  $Ca^{2+}$  能调控细胞凋亡,钙通道是贯穿质膜或细胞器膜上表面糖基化的大分子蛋白质,其中央形成能

通过  $Ca^{2+}$  的亲水性孔道。孔道的开放或关闭调节着细胞内  $Ca^{2+}$  浓度,从而影响细胞的功能。在视网膜缺血病变中因细胞内钙超载诱导产生了大量超氧阴离子、脂质过氧化物而对神经元有毒性作用<sup>[26]</sup>。Koshimura 等<sup>[27]</sup>发现当 EPO 与嗜铬细胞瘤株 PC<sub>12</sub> 结合,可使 PC<sub>12</sub> 细胞去极化,细胞外游离钙短暂内流增加是剂量依赖方式。EPO 使细胞有丝分裂原活性蛋白激酶活性增加,促进多巴胺的释放及酪氨酸羟化酶活性增加,从而促进体外培养神经元生长。用钙离子拮抗剂尼凡地平、抗 EPO 抗体及钙整合剂均可使 EPO 保护性作用消失。EPO 作用与神经元通过增加钙离子的内流维持钙离子的平衡。故目前认为 EPO 发挥其神经保护作用可能通过激活钙通道作为始动因素<sup>[28]</sup>。

在视网膜缺氧缺血中 NO 过度合成具有神经毒性作用,并介导 NMDA 受体诱发谷氨酸神经毒性作用致神经元损伤,可能抑制 NO 过度合成来减轻神经元损伤。NO 产生神经毒作用的可能机制:NO 与  $O^{2-}$  结合产生 ONOO<sup>-</sup>,这是一种强氧化剂,能氧化蛋白质的巯基,使多种酶失活,并且可使脂质过氧化,从而严重影响生物膜的功能。另一种机制是 NO 能引起 DNA 损伤,并能使线粒体电子传递受阻,导致细胞能量代谢障碍,最终引起细胞死亡。Calapai 等<sup>[29]</sup>用鼠脑缺血模型,通过外周或脑室内给 rHuEPO 治疗,观察再灌注后 7 d 内海马神经元死亡、亚硝酸盐和硝酸盐含量较未用 rHuEPO 治疗组减少。Sakanaka 等<sup>[30]</sup>在体内实验证实,提前用 EPO 可阻止 NO 生成因子硝普钠(SNP)诱导的 NO 过度合成,同时加入 EPO 及 SNP 不能减轻 SNP 诱导的神经元损伤。提示在体内 EPO 通过抑制 NO 过度合成发挥其神经保护作用。然而,EPO 对缺氧缺血神经元的保护机制还不能被完全理解。有研究发现,它可通过 Janus 激酶(Jak2)和 NF- $\kappa$ B(核因子- $\kappa$ B)信号级联来起作用,保护初级大脑皮层神经元不受由一氧化氮诱导的细胞死亡的损害<sup>[31]</sup>。

### 3 EPO 在视网膜的研究

EPO 和 EPOR 在胚胎和成年组织中广泛表达,包括中枢神经系统、肾脏、心脏、肺腺、肌肉组织、视网膜等。最近 Morita 等<sup>[32]</sup>研究发现,EPO 和低氧诱导因子-2 $\alpha$ (HIF-2 $\alpha$ ) 在 HLF-基因敲除的鼠(HLF-knock down)视网膜新生血管病变中,EPO 的表达水平随着 HIF-2 $\alpha$  的改变而平行性改变, EPO 在视网膜病变中起关键作用。

Grimm 等<sup>[33]</sup>利用视网膜光化学损伤的动物模型研究发现,低氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) 促进了 EPO 的表达,从而对视网膜光化学损伤起保护作用。显示经过低水平氧(8%)处理的鼠可防止光诱导的细胞凋亡从而保护视网膜感光细胞结构和功能。与视网膜光化学损伤细胞凋亡相关的细胞因子 activator protein-1(AP-1)、caspase-1 在低氧处理后没有抑制,而低氧上调了 EPO 的表达,EPO 蛋白与其在视网膜感光细胞内段的相应受体结合,触发了信号的级联反应,从而抑制感光细胞的凋亡,并且免疫组织化学检查也证实了视网膜感光细胞内段有 EPO 受体<sup>[34]</sup>。这与 EPO 在感光细胞有直接的神经保护作用是一致的。除了内源性 EPO 具有保护作用,rHuEPO 也具有保

护视网膜感光细胞免遭光损伤的作用,说明 EPO 抗凋亡作用在治疗其他的视网膜疾病是有效的。

EPO 不仅对视网膜感光细胞具有保护作用,还对视网膜神经节细胞具有神经保护作用。Junk 等<sup>[34]</sup>发现在急性视网膜缺血再灌注损伤动物模型中缺血上调了视网膜 EPORmRNA 的表达,缺血后 12 h 开始上升,72 h 达到高峰,是正常的 4 倍,而 EPO 的表达呈下降趋势,48 h 后下降 52%。免疫组织化学双标记染色示 EPOR 的表达定位在视网膜神经节细胞、无长突细胞和 Müller 细胞。在缺血前 24 h 预处理或缺血时立即腹腔注射 rHuEPO 有助于视网膜功能的恢复,并发现 TUNEL(原位末端标记物法)阳性细胞减少,而缺血后用 rHuEPO 无效,提示 EPO 通过抗凋亡机制对急性视网膜缺血再灌注损伤具有神经保护作用,外源性全身应用 EPO 可以挽救损伤的神经元。

EPO 除了对视网膜有神经元保护作用,并且与视网膜神经节细胞的轴突生长有关。Bocker-Meffert 等<sup>[35]</sup>在生后鼠视网膜组织培养时分别加入 EPO,血管内皮细胞生长因子(VEGF)呈剂量依赖性促进视网膜神经节细胞轴突的生长,当 EPOR 抗体加入培养基以阻断 EPO 的作用时其促轴突生长作用被抑制;用 RT-PCR、免疫组织化学分别检测到 EPO、EPOR 在视网膜的表达,提示 EPO 不仅有神经保护作用,而且在缺血视网膜中有促神经再生的功能。EPO 可以被认为是多功能的保护性的细胞因子,EPO 和 EPOR 通过自分泌和旁分泌系统对组织的多种应激性损失起保护作用<sup>[36]</sup>。

#### 4 临床应用前景

随着 EPO 越来越多的多种生物学效应被发现,EPO 现已被认为是细胞因子超家族成员之一。Wang 等<sup>[47]</sup>最近首次尝试用缺血缺氧性脑损伤幼鼠一次性静脉注射含有 EPO 的 cDNA 的质粒 DNA,发现在注射 1 d 后 EPO 蛋白达到高峰,且能维持 14 d,并能阻止海马神经元的凋亡,证明 EPO 能对缺血缺氧性脑损伤起有效的治疗作用。最近也有报道全身给予 EPO 治疗光损伤性视网膜变性或遗传性视网膜色素变性,发现对视网膜感光细胞有明显的保护作用<sup>[38]</sup>。

综上所述,EPO 已经从最初单纯促红细胞生成的内分泌激素扩展成为包括旁分泌、自分泌方式,全身作用与局部作用相结合的多功能激素。但是重要的一点是 EPO 的促红细胞生成、神经保护及血管生成素活性功能可能会在视网膜疾病的治疗中产生一些问题,长期给予 EPO 可能会产生一些不良反应,如红细胞增多症,血压增高。为了防止它的副作用,EPO 可用于眼部的局部治疗。此外,EPO 的促红细胞生成、神经保护及血管生成素活性功能的抗原决定簇的识别和分离将为视网膜疾病的治疗开辟新的途径,并可能将其副作用降至最低。仅保留 EPO 分子的视网膜神经保护活性多肽的重组将会有广泛的临床应用前景。

#### 5 参考文献

- Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, et al. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:1435-1442.
- Farkas RH, Grosskreutz CL. Apoptosis, neuroprotection, and retinal ganglion cell death: an overview. *Int Ophthalmol Clin*. 2001;41:111-130.
- Lai PH, Everett R, Wang FF, et al. Structural characterization of human erythropoietin. *J Biol Chem*. 1986;261:3116-3121.
- Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, et al. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection. *Clin Sci*. 2002;103:275-282.
- Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, et al. Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*. 1987; 26:2633-2638.
- Choi D, Kim M, Park J. Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996; 687:189-199.
- Eid T, Brines M. Recombinant human erythropoietin for neuroprotection: what is the evidence? *Clin Breast Cancer*. 2002; 3:109-115.
- Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:4635-4640.
- Masuda S, Okano M, Yamagishi K, et al. A novel site of erythropoietin production: oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*. 1994;269:19488-19493.
- Juul SE, Anderson DK, Li Y, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res*. 1998;43:40-49.
- Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci*. 1996;8:666-676.
- Bernaudin M, Bellail A, Marti HH, et al. Neurons and astrocytes express EPO mRNA; oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia*. 2000;30:271-278.
- Siren AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:4044-4049.
- Studer L, Csete M, Lee SH, et al. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci*. 2000;20:7377-7383.
- Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60:386-392.
- Yu X, Shacka JJ, Eells JB, et al. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*. 2002;129:505-516.
- Wen TC, Rogido M, Genetta T, et al. Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain. *Neurosci Lett*. 2004;355:165-168.
- Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, et al. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res*. 2002; 67:795-803.
- Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage. *Acta Paediatr Suppl*. 2002;91:36-42.
- Carter-Dawson L, Shen FF, Harwerth RS, et al. Glutathione content is altered in Muller cells of monkey eyes with experimental glaucoma. *Neurosci Lett*. 2004;364:7-10.
- Morgan JE, Uchida H, Caprioli J, et al. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 2000;84:303-310.
- Kageyama T, Ishikawa A, Tamai M. Glutamate elevation in rabbit vitreous during transient ischemia reperfusion. *Jpn J Ophthalmol*. 2000; 44:110-114.
- Napper GA, Pianta MJ, Kalloniatis M. Reduced glutamate uptake by retinal glial cells under ischemic hypoxic condition. *Vis Neurosci*. 1999;16:149-158.
- 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;76:105-116.
- Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, et al. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *J Biol Chem*. 2001;276:39469-39475.
- Toriu N, Akaike A, Yasuyoshi H, et al. Lomerizine, a Ca<sup>2+</sup>

- channel blocker, reduces glutamate-induced neurotoxicity and ischemia/reperfusion damage in rat retina. *Exp Eye Res*, 2000, 70:475-484.
- 27 Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, et al. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem*, 1999, 72:2565-2572.
- 28 Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res*, 2004, 1000:19-31.
- 29 Calapai G, Marciano MC, Corica F, et al. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol*, 2000, 401:349-356.
- 30 Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, et al. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:4635-4640.
- 31 Matsushita H, Johnston MV, Lange MS, et al. Protective effect of erythropoietin in neonatal hypoxic ischemia in mice. *Neuroreport*, 2003, 14:1757-1761.
- 32 Morita M, Ohneda O, Yamashita T, et al. HLF/HIF-2 alpha is a key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J*, 2003, 22:1134-1146.
- 33 Grimm C, Wenzel A, Groszer M, et al. HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med*, 2002, 8:718-724.
- 34 Junk AK, Mammis A, Savitz SI, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99:10659-10664.
- 35 Bocker-Meffert S, Rosenstiel P, Rohl C, et al. Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43:2021-2026.
- 36 Erbayraktar S, Yilmaz O, Gokmen N, et al. Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine. *Curr Hematol Rep*, 2003, 2:465-470.
- 37 Wang CH, Liang CL, Huang LT, et al. Single intravenous injection of naked plasmid DNA encoding erythropoietin provides neuroprotection in hypoxia-ischemia rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314:1064-1071.
- 38 Rex TS, Allocca M, Domenici L, et al. Systemic but not intraocular Epo gene transfer protects the retina from light-and genetic-induced degeneration. *Mol Ther*, 2004, 10:855-861.

(收稿日期:2004-03-19)

(本文编辑:唐健)

## 视网膜疾病的蛋白质组研究

肖迎 唐仕波

**【摘要】** 蛋白质组学是研究细胞内所有蛋白质的组成及其动态变化规律的科学,它是在蛋白质水平定量、动态、整体地研究生物体,并在更深层次上获得对疾病的发病机制、过程以及药物治疗靶点的新的认识,但在眼部尤其是视网膜中的研究尚处于起步阶段。现对蛋白质组学的概念、研究内容、相关技术和在视网膜中的研究现状进行综述。

**【关键词】** 视网膜疾病; 蛋白质类/分析; 研究技术; 综述文献

中图分类号:R774.1 R446

以人类基因组测序完成成为标志,生命科学进入了后基因组时代,研究的重心从揭示基因的遗传信息转移到从分子、蛋白质整体水平对功能进行研究,由此产生了一门新兴学科——蛋白质组学(proteomics)<sup>[1]</sup>。

### 1 蛋白质组学的概念和研究内容

蛋白质组的概念首先由澳大利亚的 Wasinger 等<sup>[2]</sup>在 1994 年提出,指在特定的发育阶段,某一细胞或机体中基因组所表达的全部蛋白质的总和,它不仅包括基因转录产物直接翻译的蛋白,还包括转录产物选择性剪接后所编码的蛋白以及翻译后修饰蛋白等。蛋白质组学即是研究某一细胞或机体中全部蛋白质的组成及其动态变化规律的科学<sup>[3]</sup>,它是在蛋白质水平定量、动态、整体地研究生物体,并由此在更深层次上获得对细胞生理和生物化学过程、调控网络、以及疾病过程的广泛而完整的认识。目前蛋白质组学研究的内容和目的主要是比较和分析正常与异常组织细胞、同一疾病不同发展阶段、疾病或治疗等不同条件下蛋白质的表达差异,通过对差异表达蛋白质进行鉴定和定量,寻找与疾病相关的蛋白质和蛋白质药靶,确定在

疾病发生发展过程中起主要作用的蛋白质组群,从而为疾病致病机制的研究和药物治疗提供新的手段和依据。目前已在恶性肿瘤、心血管疾病、感染性疾病等方面取得初步进展<sup>[4]</sup>。

### 2 蛋白质组学研究的相关技术

蛋白质组学的研究程序可概括为:蛋白质制备→等电聚焦→聚丙烯酰胺凝胶电泳→凝胶染色→挖取蛋白质点→胶内酶切→质谱分析确定肽指纹图谱或部分氨基酸序列→数据库确定蛋白。常见的几种研究方法有双向凝胶电泳、多维液相色谱、蛋白芯片以及它们和质谱鉴定的有机结合。其中,双向凝胶电泳和质谱技术是两大支柱技术。

#### 2.1 双向凝胶电泳法(2-DE)

利用蛋白质的不同性质可分离复杂的蛋白质样品,目前多利用蛋白质某两个性质的不同进行二维分离。双向电泳法是二维分离的经典技术,其基本原理是利用蛋白质分子的等电点和相对分子质量的不同进行分离。其双向电泳体系包括:第一向等电聚焦,以两性电解质载体形成一个连续而稳定的固相化 pH 梯度,由于蛋白质分子等电点不同,在偏离其等电点的位置带有电荷而在电场中移动<sup>[5]</sup>。第二向为十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳电泳,利用阴离子去垢剂 SDS 掩盖蛋白分子