

·综述·

脑红蛋白和细胞红蛋白:携氧蛋白质家族2个新成员

杨立涛, 刘爽, 于常海*

(北京大学神经科学研究所, 神经科学教育部重点实验室, 北京大学医学部神经生物学系, 北京 100083)

摘要 脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)和细胞红蛋白(cytoglobin, Cygb)是新发现的2个携氧蛋白家族的成员.脑红蛋白主要存在于脑中,而细胞红蛋白在全身各个组织都含有,它们和另外2个携氧蛋白——血红蛋白和肌红蛋白的同源性<25%,但它们在种属之间的同源性很高(>95%).脊椎动物脑红蛋白基因定位于14q24,细胞红蛋白基因定位于17q25,都含有4个外显子和3个内含子.2种蛋白在生理条件下含有6个配位键,不同于血红蛋白和肌红蛋白的5个配位键结构.这2种新蛋白和氧都具有很高的亲和力,在缺氧条件下其基因及蛋白表达都有明显的提升,对细胞的存活有一定保护作用.对于脑红蛋白和细胞红蛋白的功能研究,有助于更好地了解机体氧代谢和氧利用过程,并为临床在缺氧损伤时的治疗提供新的观点和途径.

关键词 脑红蛋白;细胞红蛋白;缺氧

中图分类号 Q219;Q71

Neuroglobin and Cytoglobin: Two New Members of Globin Family

YANG Li-Tao, LIU Shuang, YU Albert Cheung-Hoi*

(Neuroscience Research Institute, Key Laboratory of Neuroscience (Peking University), Ministry of Education, Department of Neurobiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083)

Abstract Neuroglobin and cytoglobin are two recently discovered members of the vertebrate globin family. Neuroglobin is predominantly expressed in the brain while cytoglobin is expressed in many different tissues. They share little amino acid sequence similarity with hemoglobin or myoglobin (<25%), but in human and mouse they are 95% identical. Neuroglobin gene is located on chromosome 14q24 and cytoglobin maps to chromosome 17q25. Both of them have four exons and three introns. They have a common feature of being hexacoordinated under deoxy conditions which is different from pentacoordinated structure of hemoglobin and myoglobin. These two new proteins have high oxygen affinity and are up-regulated under hypoxia conditions which suggested to be protective for cell survival. The study on neuroglobin and cytoglobin is important for our future understanding of brain oxygen metabolism and utilization. It will provide new sights and approaches for ischemic injury therapy.

Key words neuroglobin; cytoglobin; hypoxia

携氧蛋白是能够结合氧气或二氧化碳等气体的含铁血红素蛋白.目前,除了已知的血红蛋白(hemoglobin, Hg)和肌红蛋白(myoglobin, Mg)外,近来又新发现了另外2个携氧蛋白:脑红蛋白(neuroglobin, Ngb)和细胞红蛋白(cytoglobin, Cygb).脑红蛋白被认为主要分布在神经元中,在其它组织的内分泌腺也有少量分布;细胞红蛋白在所有检测到的组织细胞中几乎都有分布.由于这两种新发现的蛋白都能可逆地结合氧气,因此引起了人们极大的关注,为更深入地了解机体氧代谢机制提供了新的线索和依据.

收稿日期:2005-09-02,接收日期:2005-11-30

国家自然科学基金资助课题(No.30470543)北京市自然科学基金资助课题(No.7051004)

*联系人 Tel:010-82801166, Fax:010-82805066, E-mail: achy@bjmu.cn

Received: September 2, 2005; Accepted: November 30, 2005

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.30470543)

and Natural Science Foundation of Beijing (No.7051004)

* Corresponding author Tel: 010-82801166, Fax:010-82805066,

E-mail: achy@bjmu.cn

1 脑红蛋白和细胞红蛋白的基因克隆及晶体结构研究

1.1 携氧蛋白家族的结构特点

携氧蛋白含有一个铁卟啉环结构,可以可逆地结合氧或二氧化碳等气体.血红蛋白是最早发现的一类携氧蛋白,由4条多肽链组成——2条 α 链(每条 α 链含141个氨基酸残基)和2条 β 链(每条 β 链含146个氨基酸残基).在不和氧结合的状态下成五元环结构.血红蛋白主要存在于血液中,和氧气可逆的结合,负责将血液中的氧气输送到身体各个组织器官,为机体提供所需的能量.肌红蛋白是后来发现的另一类携氧蛋白,由一条盘曲的肽链与一个血红素辅基组成具有三级结构的球状蛋白质单体结构,与氧分离的状态下含5个配位键,易与氧气结合,主要定位于心肌和骨骼肌细胞的胞浆中.目前对于肌红蛋白的功能研究发现它并不是简单的贮存氧气^[1],还具有促进氧气进入线粒体、清除细胞内的一氧化氮和氧自由基、维持细胞内的稳态等功能^[2,3].

1.2 脑红蛋白和细胞红蛋白的结构研究

脑红蛋白和细胞红蛋白分别于2000年和2002年通过表达序列标签(expressed sequence tag, EST)被克隆^[4,5].脊椎动物脑红蛋白基因定位于染色体14q24,细胞红蛋白基因定位于17q25,都含有一个铁卟啉环结构,在与氧结合的序列上同血红蛋白和肌红蛋白高度保守,但它们之间的同源性并不高(<25%),种属之间的脑红蛋白、细胞红蛋白同源性极高(>95%).尽管脑红蛋白和细胞红蛋白都属于携氧蛋白家族成员,但它们同血红蛋白和肌红蛋白在结构上仍然有一些区别.在基因水平,脑红蛋白和细胞红蛋白含有4个外显子和3个内含子,不同于血红蛋白和肌红蛋白3个外显子2个内含子的结构.在蛋白结构上,脑红蛋白和细胞红蛋白同肌红蛋白相似是单体结构,但在生理状态下和卟啉环的4个吡咯基、氧及多肽链上的2个组氨酸(近端、远端)形成6个配位键结构,与氧结合时,远端的组氨酸被氧取代;人和小鼠的脑红蛋白含有151个氨基酸而细胞红蛋白含有190个氨基酸,与血红蛋白肌红蛋白(140~150个氨基酸)相比,在氨基末端和羧基末端各多出20个氨基酸.这些结构上的差异提示了携氧蛋白质在早期进化中的多样性和功能上的不同.对脑红蛋白、细胞红蛋白和肌红蛋白的序列进行种属间的比较发现,细胞红蛋白和血红蛋白含有长的保守的非编码序列,提示其可能为转录调控元件,已

有实验证明细胞红蛋白基因中含有保守的缺氧反应转录因子(hypoxia-responsive elements, HREs)结合位点,而在脑红蛋白和肌红蛋白中只在3'端非翻译区域发现了可由缺氧诱导的mRNA稳定表达,由此可见细胞红蛋白可能有更强的氧依赖调节能力^[6].

2 脑红蛋白和细胞红蛋白动力学及热力学研究

携氧动力学和热力学研究显示,脑红蛋白与氧的亲合力高于血红蛋白低于肌红蛋白,但不易解离,提示其与配体含有很高的内在亲和性.磁共振色谱分析表明,与氧或二氧化碳结合的脑红蛋白复合体和血红蛋白肌红蛋白相比更稳定^[7].细胞红蛋白与配体的亲合力要低于脑红蛋白,解离常数与其相似($k_{off} = 0.35$).由于含有6个配位键,脑红蛋白和细胞红蛋白在与氧的亲合力上显示出与其它携氧蛋白的不同,进而提示其在氧代谢情况下发挥不同的生理功能.近来有研究发现,细胞红蛋白在生理条件和不同的温度、pH下表现出酸碱波尔效应和温度依赖的氧化热函,而脑红蛋白和肌红蛋白与之相反,与氧结合表现出非pH依赖特性和放热特性,结果表明细胞红蛋白更可能参与需氧代谢过程^[8].但也有研究认为,脑红蛋白与氧的结合仅有很弱的温度依赖性^[9](Table 1).

Table 1 Comparison of neuroglobin and cytoglobin on gene, structure, dynamics and tissue distribution

	Neuroglobin	Cytoglobin
Identity with Hg	< 21 %	< 25 %
Identity in species	94 %	95.3 %
Molecular weight	17 kD	21 kD
Amino acid	151	190
Coordination	Hexa	Hexa
Gene sequence	Include 4 exons and 3 introns	Include 4 exons and 3 introns
Chromosome locus	14q24	17q25
Oxygen binding affinity	Higher than Hg	Higher than Hg but lower than Mg
Oxygen binding affinity influenced by pH and temperature	High	Low
Tissue distribution	Brain	All tissue

3 脑红蛋白和细胞红蛋白的组织及细胞定位研究

关于这2种新蛋白的组织及细胞定位也作了初

步研究,脑红蛋白主要在脑中表达,尤其额叶、丘脑下核和丘脑有大量表达^[4].在小脑,主要分布于蒲肯野细胞,脑干和脑桥网状结构及脑桥核中也有分布.视网膜中脑红蛋白的含量很高(约 100 $\mu\text{mol/L}$),是脑中的 100 倍^[10],一些内分泌组织如肾上腺和垂体中也有少量分布.细胞红蛋白在所有检测的组织中都有分布,尤其在结缔成纤维细胞、肝星形细胞、成软骨细胞等胶原含量丰富的细胞中含量很高,有人认其可能参与胶原的合成^[11].关于细胞红蛋白的亚细胞定位有一定的争议,虽然有人认为它主要分布于胞核^[12],但大部分人认为主要分布于胞浆中^[11,13].

4 脑红蛋白和细胞红蛋白的功能研究

4.1 脑红蛋白和细胞红蛋白初步的功能推测

目前,对脑红蛋白和细胞红蛋白的基因克隆、晶体结构、携氧动力学热力学特征已经有了很详细的研究,但对于其功能研究尚处于初步阶段.科学家对这两种新蛋白的功能给予了极大的关注,并根据血红蛋白和肌红蛋白的功能进行了很多推测^[14],认为其可能有类似于肌红蛋白的功能:1)促使氧气扩散进入线粒体.2)作为 NADH 氧化酶,在半需氧状态下促进糖酵解产物 ATP 的产生.这种功能可能存在于含有 6 个配位键的非共生植物的血红蛋白中(如玉米)^[15].3)作为氧气的感受器,参与信号转导途径.当氧气的浓度发生改变时,可以调节蛋白质的功能.6 个配位键的携氧蛋白质在和配体连接时可以发生很大的构象改变^[16,17],这样有利于触发下游调节因子的活动,从而更好的发挥其调节功能.4)具有酶的活性.与肌红蛋白类似,脑红蛋白和细胞红蛋白可能参与一氧化氮/氧气的化学调节,但在细胞水平尚无发现一氧化氮产物和脑红蛋白或细胞红蛋白表达之间存在明显关系的证据^[18].细胞红蛋白还显示出过氧化氢酶的活性,但其具体机制也不清楚^[19].

4.2 脑红蛋白功能及保护机制的研究

研究证实,在缺氧和缺血时脑红蛋白的表达明显提升,无论离体或在体模型都可以提高神经元的存活数目,而反义核苷酸阻断脑红蛋白的表达则降低神经元的存活数目,提示脑红蛋白在缺氧状态下对机体有保护作用,但其机制并不清楚.这种应激反应有可能由缺氧诱导因子所介导^[20].缺氧所诱导的脑红蛋白的表达可以被 MEK (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase) 抑制剂阻断;血红素可以诱导脑红蛋白的表达,但二者之

间的通路和机制是不同的^[21].脑红蛋白在视网膜中有大量表达,几乎是脑中含量的 100 倍,这同肌红蛋白在肌肉中的含量相当,这一发现提示脑红蛋白有可能为视网膜提供在生理状态下所需的氧气^[10].Wakasugi 等^[22]用表面等离子共振技术(surface plasmon resonance)的方法发现,氧化状态下(如缺氧状态下的氧化应激)的脑红蛋白可以和 G 蛋白 GDP 连接形式的 α 亚单位结合,作为鸟嘌呤核苷酸分离的抑制剂(GDI),抑制 GDP 向 GTP 的转化,并释放 $G_{\beta\gamma}$ 亚单位,从而有可能对神经元起保护作用.这一研究表明,脑红蛋白在信号转导通路中可能起到氧化应激感受器的作用.为了寻找与脑红蛋白相互作用的其它蛋白,他们又用酵母双杂交的方法在人脑 cDNA 文库中发现了与之相互作用的 flotillin-1,一种脂筏微结构域相关蛋白,这种蛋白在视网膜节细胞受损或再生时表达有明显提升,而脑红蛋白在视网膜中的含量比脑中高 100 倍,它们在视网膜中的相互作用有可能在缺氧或再灌注损伤(氧化应激)中共同发挥保护作用^[23].Wakasugi 等人用酵母双杂交的方法还发现了另一种与脑红蛋白相互作用的蛋白:胱抑素 C(cystatin C),一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,它被证明在神经干细胞的增殖中起重要作用^[24].脑红蛋白与胱抑素 C 的二聚体结合调节其在胞内的转运或分泌,从而可能对神经元的存活起到保护作用^[25].除了发现脑红蛋白在缺氧缺血条件下对神经元有保护作用外,还发现在缺氧条件下,脑中、肌肉、肝和心肌组织中的细胞红蛋白表达也有明显的提升,在 48 h 仍然很明显,并且这种提升是通过缺氧诱导因子 1(hypoxia induced factor-1, HIF-1)来调控,提示其也参与了细胞的氧化应激反应^[26].与细胞红蛋白相比,脑红蛋白在 48 h 缺氧条件下的提升不是很明显^[27],如果脑红蛋白在细胞中是通过有效的清除氧自由基而起到神经保护作用,那么它就不必有高水平的表达.

到目前为止,尽管有关脑红蛋白和细胞红蛋白的功能研究给我们提供了很多新的观点,但对于其机制的探讨仍然不是很明朗.究竟这两种新的携氧蛋白在氧代谢或其它方面发挥怎样的作用以及如何发挥其功能仍在进一步的研究中.

4.3 脑红蛋白在胶质细胞中的表达及初步功能研究

尽管脑红蛋白被认为是神经元所特有的,胶质细胞不含有.但是我们在原代培养的星形胶质细胞中用反转录 PCR(reverse transcription PCR)和实时定

量 PCR (real-time PCR) 的方法检测到了它的基因表达, 但含量明显低于在神经元中的表达. 用脑红蛋白的特异性抗体做免疫染色可以检测到脑红蛋白在原代星形胶质细胞中的蛋白表达, 在急性分离的星形胶质细胞也可以检测到它的蛋白表达^[28]. 通过免疫染色我们发现, 脑红蛋白在星形胶质细胞中的分布

随着细胞功能状态的不同而发生变化, 提示其分布和功能有一定联系, 呈动态的过程. 同时, 在缺血条件下, 用反义核苷酸抑制脑红蛋白的转录可以增加星形胶质细胞在缺血条件下凋亡的数量 (Fig. 1).

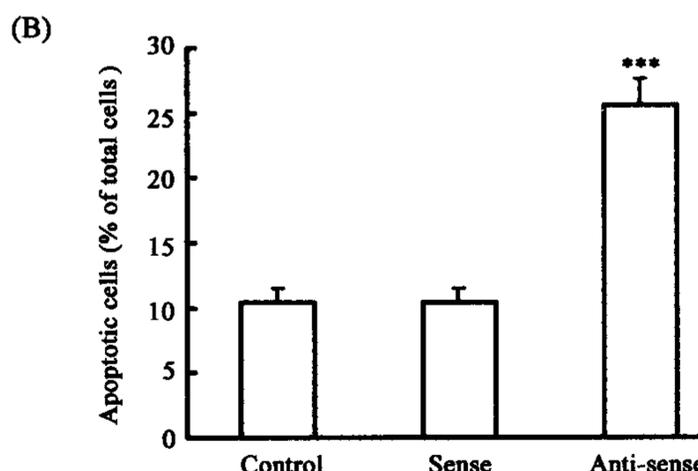


Fig. 1 Effect of Ngb anti-sense treatment on ischemia-induced apoptosis in astrocytes

(A) Primary cultures of astrocytes transfected with sense and antisense Ngb and then subjected to 5 hours of ischemia incubation. The cells were fixed immediately after ischemia and stained with Hoechst 33342 to identify highly condensed apoptotic nuclei (indicated by concaved arrowhead). (B) Statistical analyses showed that apoptotic cells significantly increased in cultures transfected with anti-sense Ngb compared to the control (without transfection) and sense groups. Data represented the mean \pm SEM from three independent results. *** $P < 0.01$ considered statistically significant by t test. (Chen et al. *Glia*, 2005, 50(2):182 ~ 186)

5 研究展望

大脑只占全身体积的 2% 但耗氧量却占全身的 20%. 我们有理由相信, 在大脑这样一个高耗氧量的器官, 氧气的传送不仅仅只依靠扩散来完成, 应该有更加有效的方式来协助氧的运输. 因此, 脑红蛋白的发现使我们对于氧的传送有了进一步的认识. 我们的实验进一步证明, 脑红蛋白不仅存在于神经元中, 而且在星形胶质细胞中也有表达, 并且在缺血条件下对细胞的存活有保护作用. 虽然脑红蛋白的含量在神经元要明显高于星形胶质细胞, 但是我们知道, 在脑中星形胶质细胞的数量几乎是神经元的 10 ~ 50 倍. 因此, 对于脑红蛋白在星形胶质细胞中的功能研究或许更有意义.

由于氧代谢一直是大家关注的对象, 对于脑红蛋白和细胞红蛋白这 2 种新发现的携氧蛋白, 其真正的功能和机制还需要更多的时间和投入来研究. 尤其是脑红蛋白, 由于其在脑中的特异性分布, 更能引起大家的关注. 脑中的氧代谢和机体的很多重要

疾病(如缺氧缺血性和神经退行性疾病)联系密切, 充分认识脑红蛋白在脑中的功能作用及其机制, 对于指导临床诊断治疗将会有很大的帮助. 因此, 用更多更有效的研究方法来研究这 2 种新蛋白的功能将会成为大家以后研究的热点, 为我们认识这 2 种新蛋白带来更多的线索, 从而为治疗缺氧损伤性疾病提供新的观点和途径.

参考文献 (References)

- 1 Wittenberg B A, Wittenberg J B. Transport of oxygen in muscle. *Annu Rev Physiol*, 1989, **51**: 857 ~ 878
- 2 Brunori M. Nitric oxide moves myoglobin centre stage. *Trends Biochem Sci*, 2001, **26**: 209 ~ 210
- 3 Fogel U, Merx M W, Godecke A, Decking U K, Schrader J. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 735 ~ 740
- 4 Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, 2000, **407**: 520 ~ 523
- 5 Burmester T, Ebner B, Weich B, Hankeln T. Cytooglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol*, 2002, **19**: 416 ~ 421

- 6 Wystub S, Ebner B, Fuchs C, Weich B, Burmester T, Hankeln T. Interspecies comparison of neuroglobin, cytoglobin and myoglobin: sequence evolution and candidate regulatory elements. *Cytogenet Genome Res*, 2004, **105**: 65 ~ 78
- 7 Couture M, Burmester T, Hankeln T, Rousseau D L. The hemeenvironment of mouse neuroglobin: evidence for the presence of two conformations of the heme pocket. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 36377 ~ 36382
- 8 Fago A, Hundahl C, Dewilde S, Gilany K, Moens L, Weber R E. Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance. *J Biol Chem*, 2004, **279**(43): 44417 ~ 44426
- 9 Uzan J, Dewilde S, Burmester T, Hankeln T, Moens L, Hamdane D, Marden M C, Kiger L. Neuroglobin and other hexacoordinated hemoglobins show a weak temperature dependence of oxygen binding. *Biophys J*, 2004, **87**: 1196 ~ 1204
- 10 Schmidt M, Giessl A, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, Burmester T. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 1932 ~ 1935
- 11 Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson J C, Nevo E, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Hankeln T, Burmester T. Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons that is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, 2004, **279**(9): 8063 ~ 8069
- 12 Geuens E, Brouns I, Flamez D, Dewilde S, Timmermans J P, Moens L. A globin in the nucleus! *J Biol Chem*, 2003, **278**: 30417 ~ 30420
- 13 Gillemans N, McMorrow T, Tewari R, Wai A W, Burgtorf C, Drabek D, Ventress N, Langeveld A, Higgs D, Tan-Un K, Grosveld F, Philipson S. Functional and comparative analysis of globin loci in pufferfish and humans. *Blood*, 2003, **101**(7): 2842 ~ 2849
- 14 Pesce A P, Bolognesi M, Bocedi A, Ascenzi P, Dewilde S, Moens L, Hankeln T, Burmester T. Neuroglobin and cytoglobin, fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO Rep*, 2002, **3**: 1146 ~ 1151
- 15 Sowa A W, Duff S M G, Guy P A, Hill R D. Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 10317 ~ 10321
- 16 Hargrove M S, Brucker E A, Stec B, Sarath G, Arredondo-Peter R, Klucas R V, Olson J S, Phillips G N Jr. Crystal structure of a nonsymbiotic plant hemoglobin. *Structure*, 2000, **8**(9): 1005 ~ 1014
- 17 Kriegl J M, Bhattacharyya A J, Nienhaus K, Deng P, Minkow O, Nienhaus G U. Ligand binding and protein dynamics in neuroglobin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 7992 ~ 7997
- 18 Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, Wystub S, Reuss M H, Burmester T, Hankeln T. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience*, 2002, **115**(3): 645 ~ 656
- 19 Kawada N, Kristensen D B, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, Yoshizato K. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 25318 ~ 25323
- 20 Sun Y, Jin K, Mao X O, Zhu Y, Greenberg D A. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 15306 ~ 15311
- 21 Zhu Y, Sun Y, Jin K, Greenberg D A. Hemin induces neuroglobin expression in neural cells. *Blood*, 2002, **100**: 2494 ~ 2498
- 22 Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 36505 ~ 36512
- 23 Wakasugi K, Nakano T, Kitatsuji C, Morishima I. Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **318**: 453 ~ 460
- 24 Taupin P, Ray J, Fischer W H, Suhr S T, Hakansson K, Grubb A, Gage F H. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, a novel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron*, 2000, **28**: 385 ~ 397
- 25 Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Association of human neuroglobin with Cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor. *Biochemistry*, 2004, **43**: 5119 ~ 5125
- 26 Fordel E, Geuens E, Dewilde S, Rottiers P, Carmeliet P, Grooten J, Moens L. Cytoglobin expression is upregulated in all tissues upon hypoxia: an in vitro and in vivo study by quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **319**: 342 ~ 348
- 27 Mammen P P, Shelton J M, Goetsch S C, Williams S C, Richardson J A, Garry M G, Garry D J. Neuroglobin, a novel member of the globin family, is expressed in focal regions of the brain. *J Histochem Cytochem*, 2002, **50**: 1591 ~ 1598
- 28 Chen X Q, Qin L Y, Zhang C G, Yang L T, Gao Z, Liu S, Lau L T, Fung Y W, Greenberg D A, Yu A C. The presence of neuroglobin in cultured astrocytes. *Glia*, 2005, **50**(2): 182 ~ 186