

基础研究

促红细胞生成素在大鼠脊髓缺血再灌注
损伤中的表达及其意义薛文¹, 孙正义¹, 全东和²

(1 兰州大学第二医院骨科研究所 730030 兰州市; 2 甘肃省甘南州人民医院骨科 730030)

【摘要】目的:观察促红细胞生成素(EPO)在大鼠脊髓缺血再灌注损伤(SCI)中的表达和重组人促红细胞生成素(rhuEPO)预处理对再灌注损伤脊髓神经细胞的作用。**方法:**将 Wister 大鼠分为正常组、假手术组、rhuEPO 处理组和生理盐水对照组; rhuEPO 处理组和生理盐水对照组于术前 3h 腹腔注射 rhuEPO 和生理盐水, 制备大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型。以免疫组化和 Western blot 法检测脊髓组织中 EPO 的表达变化; 以原位末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导 dUTP 标记法(TUNEL 法)检测细胞的凋亡情况。**结果:**EPO 在无损伤脊髓中即有少量的表达, SCI 后 8h 表达显著上调, 于 12、24h (12h 与 24h 组比较差异无显著性意义, $P>0.05$) 达高峰, 伤后 3d 表达逐渐下调, 5d 仍保持较高水平。rhuEPO 处理组 SCI 后 8h、12h 及 24h 时神经细胞凋亡水平明显低于生理盐水对照组, 差异有显著性意义($P<0.01$)。**结论:**在脊髓缺血再灌注损伤中 EPO 呈现时序性表达变化, 可能是机体内源性神经保护的机制之一; EPO 预处理能明显抑制 SCI 后神经细胞的凋亡。

【关键词】促红细胞生成素; 脊髓缺血; 再灌注损伤; 大鼠

中图分类号: R364.1, R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-05-0292-04

Expression and role of erythropoietin on the spinal cord ischemic reperfusion injury in adult rats/XUE Wen, SUN Zhengyi, QUAN Donghe//Chinese Journal of Spinal and Spinal Cord, 2005, 15(5): 292-295

【Abstract】Objective: To investigate the expression of erythropoietin (EPO) on spinal cord ischemic reperfusion injury (SCI) in rats, and the neuroprotection role of recombinant human erythropoietin (rhuEPO) administered before SCI. **Method:** Male rats were randomized into normal group, sham operation group, normal saline group and erythropoietin group. At 3 hours before SCI, saline and rhuEPO was injected into the abdominal cavity. The expression changes of EPO in spinal cord were detected through the adoption of western blot and immunohistochemistry, and the neural cells apoptosis was detected through the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) methods. **Result:** The expression of EPO was detected in non-injured spinal cord, significantly increased at 8h and peaked at 12, 24h after SCI, but appeared to decline after reperfusion on 3rdd, and remained significantly higher than that of the non-injured spinal cord after reperfusion on 5thd. RhuEPO significantly reduced the neural cells apoptosis in the injured spinal cord in comparison with that of control animal receiving saline at 8, 12, 24h after SCI ($P<0.01$). **Conclusion:** EPO was induced by SCI in rats, and changed in a time-depend manner, it may be one of endogenous nerve protective mechanisms. The administration of rhEPO significantly reduces the apoptosis of neural cells after SCI.

【Key words】 Erythropoietin; Spinal cord ischemia; reperfusion injury; Rat

【Author's address】 Institute of Orthopaedics, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, 730030, China

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是组织氧合状态的一种主要决定因素, EPO 通过结合细胞表面的特异性受体(EPOR)而发挥作用。以往认为 EPO 特异而专一地作用于造血细胞。有研究证

实^[1], 啮齿类动物和灵长类动物中枢神经系统(CNS)多种神经细胞表达 EPO 和 EPOR, 并通过自分泌和旁分泌的方式发挥神经营养作用; 在缺血缺氧条件下 EPO 表达显著上调发挥神经保护作用, 其保护机制为抗神经细胞凋亡、抗氧化、抗炎症和维持血管结构和功能正常。本实验通过建

立大鼠脊髓缺血再灌注损伤 (SCII) 模型, 观察 EPO 表达及神经细胞凋亡情况, 旨在揭示 EPO 在 SCII 中的神经保护作用, 为应用 EPO 防治脊髓损伤 (SCI) 提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组

健康封闭群 Wister 大鼠 95 只, 雄雌不拘, 体重 280~300g, 兰州大学实验动物中心标准动物饲养室提供。分为缺血再灌注模型组 (模型组, $n=50$)、重组人促红细胞生成素 (rhEPO) 治疗组 (治疗组, $n=25$)、假手术组 ($n=10$) 和对照组 ($n=10$)。

1.2 脊髓缺血再灌注损伤模型的建立及取材

采用 Zivin 等^[2]的方法建立脊髓缺血再灌注损伤模型。用质量浓度为 10g/L 的戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射麻醉, 自腹膜后间隙钝性分离暴露腹主动脉, 确定左肾动脉, 于左肾动脉入口处远端用 Scoville-Lewis 动脉夹完全夹闭腹主动脉, 阻断 45min 后开放血流。假手术组完成暴露腹主动脉 45min 即关腹, 对照组大鼠不手术。模型组于再灌注开始前 3h 经腹腔注射生理盐水 1ml/kg, 治疗组于再灌注开始前 3h 经腹腔注射 rhEPO 3000U/kg (日本麒麟公司产品)。模型组于再灌注 8h、12h、24h、3d 和 5d 五个时相点麻醉大鼠 (每个时相点各 10 只), 5 只常规 4% 多聚甲醛灌注后取 L2~L6 段脊髓, 固定, 冷冻保存, 进行 EPO 免疫组化检测和 TUNEL 标记; 5 只咬开椎板切取同节段脊髓, 液氮处理后超低温保存, 进行 Western blot 检测; 治疗组在相应时点灌注取材冷冻保存 (每个时相点 5 只), 进行 TUNEL 标记。对照组直接处死, 假手术组于术后 1d 处死, 收集同节段脊髓标本。

1.3 免疫组化检查

取冷冻脊髓连续制成厚 25 μ m 水平冠状切片, 间隔 100 μ m 取一个切片, 捞片法制作。按 SABC 免疫组化试剂盒说明书步骤进行, 抗 EPO 多克隆兔抗 1:200 稀释, DAB 显色 (武汉 BOSTER 公司)。EPO 免疫阳性细胞胞浆呈棕褐色或棕黄色着色。每张切片在 400 倍光镜下选 10 个不同视野计数免疫阳性细胞数。

1.4 Western blot 检测

取超低温保存的标本, 提取脊髓组织全细胞裂解液, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

分离蛋白 (30 μ g 总蛋白量/泳道); 全湿式电转法转移到硝酸纤维素膜上; 脱脂奶粉封闭非特异性蛋白; 加一抗 (抗 EPO 单克隆兔抗, 1:500, 武汉 BOSTER 公司) 和二抗 (碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 1:2000, Sigma 公司), 分别于 4 $^{\circ}$ C 和室温孵育 2h 和 1h, 每次孵育完毕后用 TBST 溶液 (含 0.05% Tween-20 的 TBS) 洗涤 10min $\times$ 3 次。BCIP/NBT 蔽光反应 5~8min, 至膜上出现棕褐色条带, 显色适度时用蒸馏水漂洗中止显色反应。

1.5 凋亡细胞原位末端标记法 (TUNEL) 检测

按原位凋亡检测试剂盒使用说明对脊髓组织冰冻切片进行染色 (TUNEL 法检测凋亡试剂盒, 为华美生物工程公司进口分装产品)。结果判断: 阳性细胞为棕黄色颗粒, 定位于细胞核。采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像分析系统进行图像半定量分析。以凋亡细胞核数估计凋亡细胞, 计算凋亡细胞指数 (AI), $AI = \text{凋亡细胞核数} / \text{总细胞核数}$ 。

1.6 统计方法

数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验和 one-Way ANOVA 检验; 多个率的比较采用 Pearson chi-square 检验。应用 Spss 10.0 统计软件分析。

2 结果

2.1 EPO 免疫组织化学检测结果

见表 1。在对照组和假手术组脊髓组织髓内血管内皮细胞和一些神经细胞有少量免疫阳性细胞; 模型组于再灌注 8h 时 EPO 表达迅速上调, 12、24h (12h 与 24h 组无明显差异 $P>0.05$) 达高峰, 3d、5d 表达逐渐降低, 与对照组和假手术组比较, 差异有显著性 ($P<0.01$)。EPO 免疫阳性细胞在

表 1 大鼠脊髓缺血再灌注不同时相脊髓组织中 EPO 免疫组化阳性细胞计数 ($\bar{x} \pm s$) (个/HP)

组别	n	EPO 免疫阳性细胞数
对照组	5	7.8 $\pm$ 1.5
假手术组	5	9.7 $\pm$ 1.8
模型组 8h	5	52.8 $\pm$ 6.7 ^{①②}
12h	5	97.4 $\pm$ 11.2 ^①
24h	5	83.4 $\pm$ 13.1 ^①
3d	5	34.7 $\pm$ 7.4 ^{①②}
5d	5	21.8 $\pm$ 5.2 ^{①②}

注: ①与对照组和假手术组比较 $P<0.01$; ②与 12h 组比较 $P<0.01$

再灌注早期(8~24h)主要定位于脊髓灰质前角、后角和中央管周围的神经元和髓内血管内皮细胞,呈点状分布于胞浆中和轴突起始部,而在脊髓白质表达不显著;再灌注后期(3~5d)脊髓白质、灰质的神经元和神经胶质细胞均可见到(图 1~5,后插图 VI)。

2.2 Western blot 检测结果

在硝酸纤维素膜上分子量为 33kD 的位置,对照组和假手术组未见条带,脊髓缺血再灌注 8h 组可见明显的棕色条带,再灌注 12h、24h 条带较强,3d、5d 条带逐渐减弱变模糊(图 6)。



图 6 大鼠脊髓缺血再灌注不同时相脊髓组织 EPO 表达变化(Western blot 法)(①对照组,②假手术组,③再灌注 8h 组,④再灌注 12h 组,⑤再灌注 24h 组,⑥再灌注 3d 组,⑦再灌注 5d 组)

2.3 TUNEL 标记结果

对照组和假手术组未见胞核着色;模型组在伤后 8h 即出现较多的阳性细胞,主要集中于脊髓灰质前角,以运动神经元为主,12h~24h 时(12h 与 24h 组比较无明显差异, $P>0.05$)达高峰,阳性细胞遍及白质及中央管周围(图 7,后插图 VI),伤后 3d 阳性细胞数缓慢下降,但至 5d 时仍持续在一较高水平,大多数为胶质细胞;阳性细胞核深染、浓缩;治疗组阳性细胞数明显减少(图 8,后插图 VI),与模型组 8、12、24h 时相点细胞凋亡率比较,差异有显著性意义($\chi^2=9.508, P<0.01$);3d 和 5d 时两组比较差异无显著性意义($P>0.05$,表 2)。

表 2 大鼠脊髓缺血再灌注损伤模型组和治疗组各时间点的细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s, \%$)

时相点	n	细胞凋亡率	
		模型组	治疗组
8h	5	26.5 $\pm$ 3.63 ^①	16.8 $\pm$ 4.61 ^②
12h	5	39.1 $\pm$ 9.35	21.8 $\pm$ 7.59 ^②
24h	5	36.2 $\pm$ 6.10	24.5 $\pm$ 5.63 ^②
3d	5	32.8 $\pm$ 5.74 ^①	26.3 $\pm$ 3.42 ^③
5d	5	29.8 $\pm$ 4.26 ^①	23.1 $\pm$ 1.32 ^③

注:①与同组 12h、24h 时相点比较 $P<0.05$;与模型组同一时间点比较② $P<0.01$,③ $P>0.05$

3 讨论

3.1 EPO 在大鼠脊髓缺血再灌注损伤中的表达

以往的研究表明,体外缺氧和体内缺血均可上调脑内 EPO 的表达。EPO 主要通过缺氧诱导低氧诱导因子-1(HIF-1)的表达来促进基因转录及蛋白的表达;此外胰岛素和胰岛素样生长因子同样可以刺激 EPO 的表达,这种刺激效应与组织缺氧无关,是通过激活酪氨酸激酶信号传导途径来实现的,并存在剂量依赖关系。

本实验观察到 EPO 在对照组和假手术组仅少量表达在髓内血管内皮细胞和一些神经胶质细胞;模型组脊髓整个灰质于再灌注 8h 明显上调,12~24h 达高峰,3d 后表达逐渐下调,5d 仍有一定水平的表达。EPO 的分布早期(8~24h)定位于脊髓灰质神经元和髓内血管内皮细胞;再灌注后期(3~5d)定位于白质、灰质的神经元和神经胶质细胞。随再灌注时间延长 EPO 表达逐渐下降,可能与脊髓缺血恢复有关,也可能与神经细胞发生坏死、凋亡和延迟性死亡逐渐增多有关。EPO 在脊髓缺血再灌注大鼠脊髓神经细胞内时序性的表达,表明 EPO 参与缺血缺氧继发性损伤,EPO 生成增多可能是机体生理性自我保护机制的一个重要组成部分。我们在相关实验中^[3]观察到 HIF-1 α 表达变化,再灌注 8h 表达上调,24h 达峰值,在伤后 3d 表达回落,5d 显著减少,揭示了 SCII 诱导 HIF-1 α 的表达。有关缺血时 HIF-1 α 通过对 EPO 的调控参与并促进了神经细胞的保护进程将另文报道。

3.2 EPO 在大鼠脊髓缺血再灌注损伤中抑制神经细胞凋亡作用及其作用机制

目前关于 EPO 对中枢神经系统缺血缺氧性损伤的保护机制尚不清楚。有学者认为通过激活 JAK-2 和 NF- κ B 信号传导通路,及加强两者之间的对话来实现的^[4];至于是激活 MAPK(mitogen activated protein kinase)通路、STAT5(signal transducer and activator of transcription)通路,还是 PI-3(phosphatidylinositol 3-kinase)通路参与 EPO 介导的信号传导,目前尚有分歧。最近有研究表明^[5],EPO 能上调抗凋亡基因 Bcl-XL 的表达;调节蛋白激酶 B 和 Caspase-1、3、8 的诱导,防止早期和迟发性神经元死亡^[6];抑制 iNOS 活性,减轻 NO 过度合成导致的神经毒性;阻断兴奋性氨基酸的毒性及增加神经元中一些抗氧化酶的活

性,减轻缺血损伤后的脂质过氧化反应^[7]。

rhEPO 含有与天然分离的 EPO 完全相同的氨基酸系列糖蛋白,且与天然 EPO 具有相同的生物学活性。rhEPO 与啮齿目动物 EPO 具有大约 80% 的同源性。本实验利用 TUNEL 标记检测观察到,模型组于再灌注 8h 凋亡率显著上调,在 12、24h 达高峰,随后缓慢降低,证实了细胞凋亡在脊髓缺血再灌注损伤的发生。EPO 预处理能明显抑制脊髓损伤后神经细胞的凋亡,在再灌注早期(8、12、24h 时)凋亡率明显较缺血再灌注组降低,与再灌注组比较差异有显著性意义;在再灌注晚期(3d、5d 时点)与缺血再灌注组凋亡率差异无显著性意义。表明腹腔注射外源性 EPO 能通过血脊髓屏障,增强神经细胞对再灌注损伤的耐受,有抗凋亡作用。我们同时观察到 rhEPO 能促进大鼠后肢运动的恢复。有些国外学者在离体和在体实验证实^[8-11],外源性 EPO 具有促进神经细胞的存活,介导神经细胞的缺氧耐受,抑制其凋亡发生。EPO 抗神经元凋亡作用是不依赖于神经胶质细胞的一种直接作用,外源性 EPO 是通过 EPOR 介导的转转运体而通过血脑屏障。Gorio 等^[12]用 Wistar 大鼠制成不同程度、不同节段的脊髓钳夹损伤模型,发现 rhEPO 不仅能明显提高大鼠脊髓损伤后后肢运动功能,而且还可以显著减轻脊髓的炎症反应,减少脊髓空洞的形成。Chong 等^[6]对体外培养的神经细胞损伤前 1h 给予 EPO 处理,获得了最大的保护作用。

我们认为急性脊髓缺血性损伤时新合成的内源性 EPO 有限,其神经保护作用明显不足,不能及时发挥神经保护作用;外源性 EPO 可以通过与机体组织 EPO 受体结合发挥同样的生物学作用,显著改善神经功能,通过体外提供 EPO 能为各种原因引起的脊髓压迫及预防胸腹主动脉手术中脊髓缺血提供新的治疗措施。本实验未对不同时间点、不同剂量的 EPO 处理进行研究,EPO 对神经保护限定剂量范围、抑制凋亡在时间和剂量之间的确切关系有待进一步的研究证实。

4 参考文献

1. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietin factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(5): 503-514.
2. Zivin JA, Saito HT. Reduction of neurological damage by a peptide segment of the amyloid beta/A4 protein precursor in a rabbit spinal cord ischemia model [J]. *Exp Neurol*, 1994, 129(2): 112-119.
3. 薛文, 孙正义, 张海鸿, 等. 低氧诱导因子-1 α 在大鼠脊髓缺血再灌注损伤中的表达 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(11): 1346-1348.
4. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak-2 and NF- κ B signalling cascades[J]. *Nature*, 2001, 412(9): 641-647.
5. Tong-Chun Wen, Yasutaka Sadamoto, Junya Tanaka, et al. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression [J]. *Neuroscience Research*, 2002, 67: 795-803.
6. Chong ZZ, Lin SH, Kang JQ, et al. Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase-1, 3, and 8 [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 71(5): 659-669.
7. Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, et al. Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain[J]. *Childs Nervous System*, 2003, 19(1): 19-22.
8. Vairano M, Russo CD, Pozzoli G, et al. Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro [J]. *Eur J Neurosci*, 2002, 16(4): 584-592.
9. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurological disability in experimental spinal cord ischemic injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(4): 2258-2263.
10. Kumral A, Ozer E, Yilmaz O, et al. Neuroprotective effects of erythropoietin on hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats[J]. *Biol Neonate*, 2003, 83(3): 224-228.
11. Prass K, Scharff A, Ruscher K, et al. Hypoxia-inducible stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin [J]. *Stroke*, 2003, 34: 1981-1986.
12. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14): 9450-9455.

(收稿日期: 2004-08-11 修回日期: 2005-03-04)

(英文编审 王忠植)

(本文编辑 卢庆霞)