

· 基础研究 ·

EPO 对大鼠脑缺血-再灌注后炎症损伤的保护作用

宁显忠, 赵德福[△]

(辽宁医学院附属第三医院神经内科, 辽宁锦州 121000)

摘要:目的 探讨促红细胞生成素(EPO)对大鼠脑缺血-再灌注的保护作用。方法 将 216 只雄性大鼠随机分为 3 组($n=72$):假手术组,模型组,EPO 干预组;每组再分为缺血-再灌注后 3、6、12、24、48 和 72 h 6 个亚组,每亚组大鼠各 12 只,采用线栓法制备一侧大脑中动脉缺血模型。模型组和 EPO 干预组缺血 2 h 后再灌注,EPO 干预组于缺血 2 h 后腹腔注射 EPO(3 000 U/kg),假手术组和模型组于同一时间点注射等量生理盐水,然后分别于上述 6 个时间点断头取材,标本分别用于免疫组化、Western blot 分析海马组织细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及血管细胞间黏附分子-1(VCAM-1)的表达。结果 与假手术组比较,模型组 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白的表达明显增多($P<0.05$);与模型组比较,EPO 干预组 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白的表达明显减少($P<0.05$)。结论 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白在大鼠脑缺血-再灌注后的炎症反应中起重要作用,EPO 对此过程具有抑制作用,从而发挥其神经保护作用。

关键词:促红细胞生成素;脑缺血-再灌注;胞间黏附分子-1;血管细胞间黏附分子-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)19-1959-03

Study on the protection action of erythropoietin to inflammation of focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

Ning Xianzhong, Zhao Defu[△]

(Department of Neurology, the Third Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

Abstract: Objective To study on inhibition and mechanism of inflammation of focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and explore the protective action of EPO to rats with ischemia-reperfusion injury. **Methods** 216 male SD rats were randomly divided into 3 groups($n=72$): sham-operated group, ischemia-reperfusion group and EPO treating group. Each group were further divided into 6 subgroups($n=12$): 3, 6, 12, 24, 36, 48 and 72 h after ischemia-reperfusion. Rats were made into the reversible focal cerebral ischemia model by occluding the middle cerebral artery. The Sham-operated group and ischemia-reperfusion group were reperfused after occluding the middle cerebral artery for 2 hours. The rats of EPO treating group accepted EPO(3 000 U/kg) after occluding the blood flow for 2 hours; While, the equal normal saline were injected to the sham-operated group and ischemia-reperfusion group. Expression of intercellular adhesion molecules1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule1 (VCAM-1) in hippocampal CA1 were observed by immunohistochemical staining and Western blot at the 6 time points after reperfusion. **Results** Contrast to the sham-operated group, the expression of ICAM-1 and VCAM-1 in hippocampal CA1 were significantly increased($P<0.05$); The expression of ICAM-1 and VCAM-1 were significantly decreased in EPO treating group in comparison to the ischemia-reperfusion group($P<0.05$). **Conclusion** ICAM-1 and VCAM-1 has a significant role in the inflammation of focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. EPO could play a neuroprotective action by inhibiting this inflammation.

Key words: erythropoietin; cerebral ischemia-reperfusion; intercellular adhesion molecules-1; vascular cell adhesion molecule-1

近年来,促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的神经保护作用得到越来越多的学者的认可,但对 EPO 发挥神经保护作用的具体机制和途径目前尚知之甚少。众所周知,以白细胞侵入为主要标志的炎症反应是造成脑缺血-再灌注损伤的特征性改变。其中炎症细胞因子诱发的黏附分子表达上调和由后者介导的白细胞与内皮细胞的相互作用,是炎症反应的关键因素^[1]。黏附分子当中比较重要的是细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecules1, ICAM-1)及血管细胞间黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule1, VCAM-1)的。脑缺血后多种炎性细胞因子诱导脑微血管内皮细胞表达 ICAM-1 和 VCAM-1,二者通过与白细胞上的相应受体结合,导致白细胞与内皮细胞黏附、游出,进而浸润到血管外脑实质,造成脑损伤。本研究通过验证 EPO 对诱发炎症反应的 ICAM-1 和 VCAM-1 是否发挥抑制作用为切入点,着重探讨 EPO 对脑缺血-再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 216 只,体质量 250~300 g,由辽宁医学院动物中心提供。

1.2 药品与试剂 注射用重组人 EPO(批号 A20101001)为成都地奥九泓制药厂产品,ICAM-1、VCAM-1 抗体(货号分别为 sc-1511 和 sc-8304)为美国 Santa Cruz 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 分组与给药 将实验大鼠随机分为以下 3 组:(1)EPO 干预组 72 只,缺血 2 h 后 EPO 腹腔注射,参照文献[2]选择 EPO 的有效剂量为 3 000 U/kg,用生理盐水溶解,浓度为 200 U/mL,给药后分别于再灌注 3、6、12、24、48 和 72 h 后取海马组织;(2)模型组 72 只,按模型标准制成大鼠脑缺血-再灌注模型,分别于缺血 2 h 后腹腔注射等量生理盐水,于再灌注 3、6、12、24、48 和 72 h 后取海马组织;(3)假手术组 72 只,只进行手术操作,不进行缺血-再灌注处理,于假手术 2 h 后腹腔注

表 1 各组大鼠不同时间点 VCAM-1 蛋白的表达量($\times 10^{-3}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	62±7	66±7	68±9	70±10	73±7	59±6
模型组	67±7	79±11 [△]	90±12 [△]	128±14 ^{△△}	132±13 ^{△△}	112±10 ^{△△}
EPO 干预组	63±6	74±12	78±10 ^{▲▲}	89±12 ^{▲▲}	101±11 ^{▲▲}	81±9 ^{▲▲}

[△]: $P < 0.05$, ^{△△}: $P < 0.01$, 与假手术组比较; ^{▲▲}: $P < 0.01$, 与模型组比较。

表 2 各组大鼠不同时间点 ICAM-1 蛋白的表达量($\times 10^{-3}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	114±12	119±11	114±9	120±13	119±15	107±10
模型组	122±14	155±16 ^{△△}	201±20 ^{△△}	242±24 ^{△△}	238±21 ^{△△}	212±19 ^{△△}
EPO 干预组	120±10	134±13 [▲]	165±16 ^{▲▲}	194±15 ^{▲▲}	190±17 ^{▲▲}	158±14 ^{▲▲}

^{△△}: $P < 0.01$, 与假手术组比较; [▲]: $P < 0.05$, ^{▲▲}: $P < 0.01$, 与模型组比较。

射等量生理盐水,分别于上述各时间点断头取海马组织。每个时间点为一个亚组,每亚组 12 只大鼠。

1.3.2 模型的制备 采用线栓法制作大鼠大脑中动脉阻塞模型。水合氯醛麻醉(3 mL/kg)大鼠,分离左侧颈总动脉,结扎其近心端,然后在颈总动脉上剪一个小口(约为动脉直径的 1/2),将充满肝素的动脉插管插入小口,用手术线结扎固定插管后,将长 6 cm 的渔线插入动脉插管直至大脑中动脉,脑缺血开始后将动脉插管拔出,把渔线和颈总动脉结扎在一起;2 h 后拔出鱼线,缺血-再灌注开始,以大鼠出现左侧霍纳氏征、右前肢伸展受限、活动时向右侧旋转为缺血-再灌注模型制备成功标志。模型组和 EPO 干预组中的 6 个亚组分别再灌注 3、6、12、24、48 和 72 h,假手术组 6 个亚组不进行缺血-再灌注处理。

1.4 标本制取与检测方法

1.4.1 免疫组化法检测海马区 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白的表达 每个亚组取大鼠 6 只,乌拉坦麻醉(5 mL/kg),灌注固定脑组织,断头取海马组织,将标本置于 4% 多聚甲醛液中固定,制成厚度为 5 μ m 的病理切片。取上述切片常规脱蜡,蒸馏水洗涤,3% 过氧化氢溶液处理 30 min,以去除内源性过氧化物酶,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次(每次 5 min);分别滴加适当稀释的兔抗大鼠 ICAM-1 一抗或兔抗大鼠 VCAM-1 抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次(每次 5 min);滴加辣根酶标记羊抗兔多聚体(PV6001),37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次(每次 5 min);二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,脱水,透明,中性树脂封片,镜下观察海马组织中 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白的表达情况。二者均主要于内皮细胞膜表面表达,呈棕黄色颗粒状。

1.4.2 Western blot 分析海马组织 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白的表达 取每组剩余 6 只大鼠,麻醉方法同上,取其海马组织迅速置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中冻存备用。Western blot 检测分为以下 6 步:(1)制备蛋白样品;(2)测定上清液蛋白含量;(3)十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳;(4)采用正电荷尼龙膜(PVDF)转移;(5)杂交;(6)显色分析,用 Gene Genius 凝胶图像系统分析各蛋白目的条带吸光度,用目的条带与 β -actin 条带吸光度的比值表示目的蛋白的含量。

1.5 统计学处理 应用 SPSS16.0 软件包进行统计学处理,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,方差齐时采用 LSD- q 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果 观察区域主要选择在大鼠海马组织

的 CA1 区,黏附分子的表达部位主要集中在血管内皮细胞表面。结果显示,假手术组血管内皮细胞表面有极少量 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白表达的阳性细胞;与假手术组比较,模型组 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达的阳性细胞于再灌注 6 h 开始逐渐增多,再灌注后 12~48 h 明显增多,以后有所减少;与模型组各时间点相比较,EPO 干预组 VCAM-1 的表达量从 12 h 开始减少,24~72 h 明显减少,而 ICAM-1 从 6 h 即开始减少,12~72 h 明显减少。

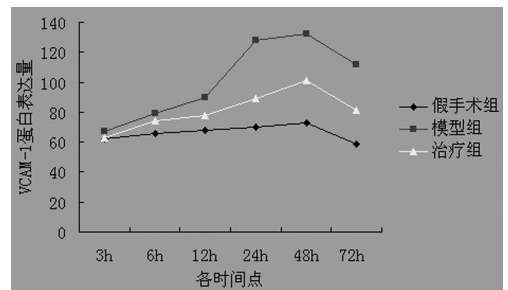


图 1 各组大鼠不同时间点 VCAM-1 蛋白的表达量($\times 10^{-3}$)

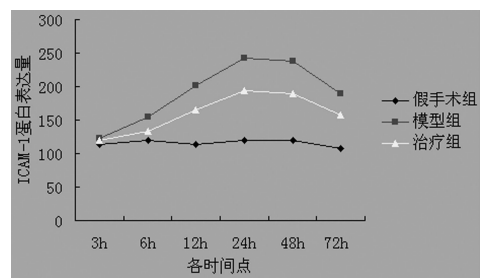


图 2 各组大鼠不同时间点 ICAM-1 蛋白的表达量($\times 10^{-3}$)

2.2 Western blot 检测结果 假手术组有极少量 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的表达。与假手术组比较,模型组再灌注 6 h VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白可见有少量表达,以后表达量逐渐增多,VCAM-1 的表达高峰出现在再灌注 24~48 h;而 ICAM-1 则在再灌注 12~48 h 一直持续较高,以后表达量逐渐减少。与模型组各时间点相比较,EPO 干预组 VCAM-1 的表达量从 12 h 开始减少,24~72 h 明显减少,而 ICAM-1 从 6 h 即开始减少,12~72 h 明显减少。见表 1、2、图 1、2。

3 讨论

近年来,对于 EPO 的神经保护作用的关注越来越多。但

关于 EPO 对脑缺血-再灌注后炎症损伤的抑制作用,尤其是对于诱导炎症反应的关键物质黏附分子的抑制作用,国内外鲜有报道。

本实验通过线栓法制作成年大鼠局灶性脑缺血-再灌注模型,观察 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白在脑缺血-再灌注损伤中的作用,以及 EPO 对此过程的抑制作用。研究结果显示,在大鼠局灶性脑缺血-再灌注 6 h,即有 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的少量表达,不论是阳性细胞数还是表达量都较假手术组有所增加,之后表达量逐渐增多,VCAM-1 的表达高峰出现在再灌注 24~48 h,而 ICAM-1 的表达则在再灌注 12~48 h 一直持续较高,以后表达量有所减少。需要指出的是,内皮细胞无论在未被激活还是被激活后表达的 ICAM-1 均高于 VCAM-1,并且 ICAM-1 在脑损伤后的上调表达要早于 VCAM-1,而其下降又稍晚于 VCAM-1。可见 ICAM-1 相对于 VCAM-1 容易表达且较稳定,也说明前者在脑损伤发生中起主要作用。

EPO 是由肾脏和胚胎肝脏产生的一种能促进红细胞生成的细胞因子,主要用于治疗各种原因所致的贫血。但近年的研究发现,在许多非造血细胞系如肾、心肌、平滑肌和神经原细胞中也存在 EPO 及其受体(erythropoietin receptor, EPOR)基因表达^[3]。动物实验和体外细胞培养已证实,EPO 对脑缺血具有神经保护作用^[4]。本实验于大鼠缺血后 2 h 给予 EPO 腹腔注射,研究结果显示,与模型组相比较,应用 EPO 后,EPO 干预组 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的阳性细胞数和蛋白表达量均有所下降。而且需要指出的是,ICAM-1 于用药后 6 h 即开始下降,而 VCAM-1 于用药后 12 h 才开始下降,表明在诱导炎症作用时作用相对较大的 ICAM-1 对 EPO 的反应也相对较 VCAM-1 敏感。由此可见,EPO 可以通过抑制 ICAM-1 和 VCAM-1 蛋白表达的上调(主要是 ICAM-1),实现对脑缺血-再灌注损伤后炎症损伤的抑制作用。

近几年来,关于 EPO 的神经保护作用研究方兴未艾,其机制除了抗炎作用以外,目前正在研究中的还有抗谷氨酸兴奋毒性^[5]、调节一氧化氮(NO)的合成^[6]、抗氧化作用、抗神经元凋亡^[7-8]、促进血管生成^[9]、促进神经元再生和神经营养作用等。其对脑血管的保护作用正逐渐成为临床和科研的新热点^[10]。尤其是近来的研究发现,脑缺血动物脑内可见 EPO 和 EPOR 表达^[11],外源性 EPO 可通过血脑屏障进入脑内^[12],为 EPO 的临床应用垫定了理论基础。因此,EPO 在脑缺血-再灌注损伤的应用方面有广阔的临床应用前景。

参考文献:

[1] O'Sullivan JB, Ryan KM, Harkin A, et al. Noradrenaline reuptake inhibitors inhibit expression of chemokines IP-

10 and RANTES and cell adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 in the CNS following a systemic inflammatory challenge[J]. *J Neuroimmunol*, 2010, 220(1/2):34-42.

[2] Li Y, Lu ZY, Keogh CL, et al. Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(5):1043-1054.

[3] Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: A manifold task[J]. *Physiology*, 2008, 23:263-274.

[4] Liu R, Suzuki A, Guo Z, et al. Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion in jury in vitro[J]. *J Neurochem*, 2006, 96(4):1101-1110.

[5] 侯红梅,董文斌.促红细胞生成素与脑保护[J]. *国外医学.神经病学神经外科学分册*, 2004, 31(5):494-497.

[6] Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11 Suppl 1:37-44.

[7] Wiese L, Hempel C, Penkowa M, et al. Recombinant human erythropoietin increases survival and reduces neuronal apoptosis in a murine model of cerebral malaria [J]. *Malar J*, 2008, 7(2):3-11.

[8] Liao ZB, Jiang GY, Tang ZH, et al. Erythropoietin can promote survival of cerebral cells by downregulating Bax gene after traumatic brain injury in rats[J]. *Neurol India*, 2009, 57(6):722-728.

[9] Kato S, Amano H, Ito Y, et al. Effect of erythropoietin on angiogenesis with the increased adhesion of platelets to the microvessels in the hind-limb ischemia model in mice [J]. *J Pharmacol Sci*, 2010, 112(2):167-175.

[10] Sharples EJ, Christoph T, Yaqoob MM. Novel applications of recombinant erythropoietin[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2006, 6(2):184-189.

[11] Kilic E, Kilic U, Soliz J, et al. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways [J]. *FASEB J*, 2005, 19(14):2026-2028.

[12] Eid T, Brines M. Recombinant human erythropoietin for neuroprotection: what is the evidence [J]. *Clin Breast Cancer*, 2002, 3 Suppl 3:S109-115.

(收稿日期:2011-09-19 修回日期:2012-02-06)

(上接第 1958 页)

Wang Y, Raffoul JJ, Che M, et al. Prostate Cancer treatment is enhanced by genistein in vitro and in vivo in a syngeneic orthotopic tumor model[J]. *Radiat Res*, 2006, 166(1 Pt 1):73-80.

[14] Oki T, Sowa Y, Hirose T, et al. Genistein induces Gadd45 gene and G2/M cell cycle arrest in the DU145 human prostate Cancer cell line[J]. *FEBS Lett*, 2004, 577(1/2):

55-59.

[15] Zhao JH, Arao Y, Sun SJ, et al. Oral administration of soy-derived genistin suppresses lipopolysaccharide-induced acute liver inflammation but does not induce thymic atrophy in the rat[J]. *Life Sci*, 2006, 78(8):812-819.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2012-01-06)