

· 基础研究 ·

## 促红细胞生成素和甲基泼尼松龙对大鼠急性脊髓损伤的疗效比较

占乐云, 方海滨<sup>△</sup>, 吕 恩

(三峡大学人民医院麻醉科, 湖北宜昌 443000)

**摘要:**目的 探讨促红细胞生成素(EPO)和甲基泼尼松龙(MP)对大鼠急性脊髓损伤(ASCI)的疗效。方法 按改良 Allen's 撞击法制作急性不完全性脊髓损伤的大鼠模型。将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组: EPO 组、MP 组和对照组, 每组 20 只, 在模型制作成功后 8 h、24 h、3 d、7 d 4 个时间点取脊髓标本。比较各组在各个时间点上的运动功能评分、凋亡细胞计数、脊髓病理改变等指标。结果 EPO 组和 MP 组在伤后 2、8 h 的运动功能评分和伤后 8、24 h 凋亡细胞计数比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但均优于对照组 ( $P < 0.01$ ); 在伤后 3、7 d 时, EPO 组的运动评分和凋亡细胞计数优于 MP 组 ( $P < 0.05$ ), 且均明显优于对照组 ( $P < 0.01$ )。结论 EPO 比 MP 的抗凋亡作用更强、更持久, 能显著减轻继发性脊髓损伤, 促进运动功能恢复。

**关键词:** 泼尼松龙; 脊髓损伤; 红细胞生成素; 细胞凋亡; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.26.027

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)26-2746-03

## Comparison of curative effects between erythropoietin and methylprednisolone for acute spinal cord injured rats

Zhan Leyun, Fang Haibin<sup>△</sup>, Lv En

(Department of Anesthesiology, People's Hospital, Sanxia University, Yichang, Hubei 443000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the neuroprotective effect of erythropoietin(EPO) and methylprednisolone(MP) for rat acute spinal cord injury(ASCI). **Methods** The incomplete ASCI rat model was established according to the improved Allen's method. 60 male rats were randomly divided into the EPO group, MP group and control group, 20 cases in each group. The samples of spinal cord were taken at the time points of 8 h, 24 h, 3 d and 7 d after spinal cord injury. The motor function scores, count of apoptosis cells and the pathological change of spinal cord were compared among the three groups at corresponding time points. **Results** There was no statistical difference in the average scores at 2, 8, 24 h after injury, and the count of apoptosis cells at 8, 24 h after injury between the EPO group and the MP group ( $P > 0.05$ ), but both of them were better than those in the control group ( $P < 0.01$ ). At 3, 7 d after injury, the motor function scores and count of apoptosis cells were superior to those in the MP group ( $P < 0.05$ ) and significantly superior to those in the control group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** EPO has stronger and more persistent anti-apoptosis effect, can significantly alleviate secondary spinal cord injury and promote recovery of motor function.

**Key words:** prednisolone; spinal cord injuries; erythropoietin; apoptosis; rats

目前, 大剂量甲基泼尼松龙(methylprednisolone, MP)冲击疗法是急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI)后药物治疗的标准参考方案。但研究表明, MP 的神经保护作用仍不理想, 而且不良反应明显, 包括感染、褥疮、消化道出血、深静脉血栓、糖尿病并发症、切口延期愈合等, 甚至可能危及患者的生命<sup>[1]</sup>。近年来, 大量研究提示促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)有神经细胞保护作用, 是一种极具潜力的神经系统治疗药物<sup>[2-3]</sup>。本实验通过对 ASCI 大鼠经 EPO 或 MP 治疗后的运动功能和脊髓细胞的凋亡程度进行比较, 探讨 EPO 治疗 ASCI 的效果, 为进一步研究提供动物实验依据。

## 1 材料与方

**1.1 材料** (1)实验动物: 60 只 SPF 级封闭群健康成年雄性 SD 大鼠, 体质量(270±25)g, 由同济医学院实验动物中心提供。(2)主要试剂: rhuEPO(益比奥)由沈阳三生制药股份有限公司生产; MP 琥珀酸钠注射液由辉瑞投资有限公司生产; TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术(TUNEL)染色试剂盒由武汉博士德公司提供;(3)主要仪器: 脊髓打击器由武汉大学人民医院实验中心提供; 显微镜照相仪购自日本 Olympus 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组** 将 60 只大鼠随机分为 3 组: EPO 组, MP

组和对照组, 每组 20 只, 在伤后 15 min, EPO 组、MP 组和对照组分别腹腔注射 rhuEPO(3 000 U/kg)、MP(50 mg/kg)和生理盐水(1 mL)。

**1.2.2 实验方法** 按改良 Allen's 撞击法制作急性不完全性脊髓损伤的大鼠模型。大鼠称质量后, 按 30 mg/kg 腹腔注射戊巴比妥钠, 麻醉起效后, 背部剪毛, 俯卧位固定于手术台上, 保持呼吸道通畅。10% 活力碘消毒, 铺洞巾。以 T<sub>8</sub> 棘突为中心取背部正中切口, 长约 4 cm, 用小止血钳咬除 T<sub>8-9</sub> 的棘突及全椎板, 充分暴露长约 0.6 cm 的脊髓, 保证硬脊膜完整。用直径 3.0 mm、质量 10 g 两端光滑圆溜的圆柱状金属棒在细玻璃管的引导下从 10 cm 高处垂直落下, 打击已经充分暴露的脊髓段中央, 致脊髓急性撞击伤, 致伤力为 100 gcf(10 g×10 cm)。若大鼠出现双后腿痉挛性伸直并有明显的尾巴扭动现象, 作为造模成功的标志(不成功者或硬脊膜破损者均弃去)。冷生理盐水冲洗伤口, 用脂肪组织充填暴露后的脊髓区。再次冲洗后, 逐层缝合肌肉、筋膜、皮肤。伤后 15 min 按各组要求腹腔注射相应的处理药物。术后予以标记, 置于恒温室精心饲养, 不限饮水及进食, 人工膀胱排尿每天 3 次, 直至恢复排尿功能。按 10 万 U/kg 肌肉注射青霉素, 每天 1 次。(1)在术后 2 h、8 h、24 h、3 d、7 d 5 个时间点上, 由两人各自严格按照 BBB(Basso Beattie Bresnaha)运动功能评分法对每只大鼠进行运动能

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: fanghaibin1981@qq.com。

力评分,在每张 TUNEL 染色的切片上脊髓左、右侧的前后角及侧角上各取一个高倍镜视野(HP)进行凋亡细胞计数(个/HP),取平均值。详细记录每只大鼠的在各时间点上的运动功能评分和凋亡细胞计数。(2)在 8 h、24 h、3 d、7 d 4 个时间点上,每组随机取 5 只大鼠,麻醉后剖胸,左心室-主动脉插管,先灌注生理盐水约 200 mL,冲洗至流出液清亮,再用 4%多聚甲醛(0.1 mol/L)约 300 mL 灌注,直至动物肢体僵硬,解剖椎管,完整取出以损伤段脊髓为中心约 1.0 cm 的脊髓节段,置于 4%中性多聚甲醛缓冲液内,固定 24 h。将固定好的脊髓节段常规石蜡包埋,在损伤中段连续取 2 片 5 μm 的切片,分别做 TUNEL 染色和 HE 染色。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析,用单向方差分析(one-way ANOVA)比较各组在各个时间点上的运动功能评分和凋亡细胞计数;对各个时间点上大鼠运动功能评分和损伤段脊髓凋亡细胞计数进行双变量相关分析(Bivariate Correlation Analysis),计算 Spearman 相关系数。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 各组大鼠 BBB 分级法运动功能评分比较** 在脊髓损伤后 2、8 h,各组之间运动评分比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );EPO 组和 MP 组在 24 h 的运动评分比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但均高于对照组评分( $P < 0.01$ );伤后 3、7 d 时,EPO 组评分最高,其次是 MP 组,而对照组评分最低( $P < 0.05$ ),见表 1。3 组大鼠在伤后 7 d 运动功能都不断提高,其中 EPO 组提高最快,恢复程度最高。

**表 1 各组大鼠 BBB 分级法运动功能评分比较( $\bar{x} \pm s$ ,分)**

组别	2 h ( $n_i=20$ )	8 h ( $n_i=20$ )	24 h ( $n_i=15$ )	3 d ( $n_i=10$ )	7 d ( $n_i=5$ )
对照组	1.6±0.68	5.6±1.28	6.8±1.29	9.7±2.01	12.2±1.92
MP 组	1.8±0.95	6.4±1.31	10.5±1.51 <sup>#</sup>	11.6±2.22 <sup>#</sup>	14.4±1.14 <sup>#</sup>
EPO 组	1.5±0.69	6.3±1.33	9.7±1.39 <sup>#</sup>	13.7±1.34 <sup>#△</sup>	17.0±1.58 <sup>#△</sup>

<sup>#</sup>: $P < 0.01$ ,与对照组比较;△: $P < 0.05$ ,与 MP 组比较。

**2.2 各组大鼠凋亡细胞计数比较** 在 8 h、24 h、3 d、7 d 4 个时间点上,EPO 组和 MP 组损伤段脊髓的凋亡细胞均明显少于对照组( $P < 0.01$ );EPO 组和 MP 组在伤后 8、24 h 的凋亡细胞计数比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );但是在伤后 3、7 d 时,EPO 组损伤段脊髓的凋亡细胞均显著少于 MP 组( $P < 0.05$ ),见表 2。各组在伤后 3 d 是细胞凋亡的高峰,其次是伤后 24 h,其中 EPO 组凋亡细胞计数最少。

**表 2 各组大鼠凋亡细胞计数( $\bar{x} \pm s$ , $n=5$ ,个/HP)**

组别	8 h	24 h	3 d	7 d
对照组	12.8±1.48	28.8±3.42	31.4±3.51	19.4±3.21
MP 组	7.4±1.14 <sup>#</sup>	15.4±3.05 <sup>#</sup>	24.6±2.88 <sup>#</sup>	13.2±2.28 <sup>#</sup>
EPO 组	7.0±0.71 <sup>#</sup>	13.6±2.88 <sup>#</sup>	18.2±1.92 <sup>#△</sup>	9.4±2.51 <sup>#△</sup>

<sup>#</sup>: $P < 0.01$ ,与对照组比较;△: $P < 0.05$ ,与 MP 组比较。

**2.3 各时间点上运动评分和凋亡细胞计数的相关性** 在各个时间点上,大鼠的运动评分和凋亡细胞计数呈负相关,凋亡细胞越少,则运动评分越高( $P < 0.05$ ),见表 3。

**2.4 各组大鼠损伤节段脊髓标本的 HE 和 TUNEL 染色** 各组病变最严重的都在伤后 24 h,其次是在伤后 3 d。(1)损伤节段脊髓标本的 HE 染色,对照组的病理改变最严重,脊髓组织,

尤其是后角水肿严重,有较多单核细胞浸润;脊髓前角正常的运动神经元数目明显减少,部分发生细胞核固缩,核裂解,神经细胞周围可见大量空泡形成(插 II 图 1)。其次是 MP 组,脊髓组织水肿,单核细胞浸润;脊髓前角正常的运动神经元数目减少,部分发生细胞核固缩,核裂解,神经细胞周围可见较多空泡形成(插 II 图 2)。程度最轻的是 EPO 组,脊髓组织水肿较轻,只有少量单核细胞浸润;脊髓前角正常的运动神经元数目较多,形态基本正常,核仁清晰,正常的细胞内夹杂有少量的神经细胞核固缩、深染,神经细胞周围可见散在的空泡形成(插 II 图 3)。(2)损伤节段脊髓标本的 TUNEL 染色,对照组见神经细胞和胶质细胞大量凋亡(插 II 图 4),MP 组凋亡细胞较少(插 II 图 5),EPO 组凋亡细胞最少,见插 II 图 6。

**表 3 运动评分和凋亡细胞计数的相关性( $\bar{x} \pm s$ , $n=5$ )**

项目	8 h	24 h	3 d	7 d
运动功能评分	7.1±1.36	9.4±1.84	10.6±2.06	14.5±2.50
凋亡细胞计数	9.0±2.94	19.3±7.60	24.7±6.17	14.0±4.94
r	-0.561	-0.842	-0.808	-0.864
P	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01

**3 讨 论**

脊柱骨折及椎体滑脱等造成的 ASCI,包括原发性损伤和继发性损伤。药物治疗是为了最大程度地减轻继发性损伤。现在认为,各种原因引起的大量神经细胞的凋亡是最重要的继发性损伤,直接影响到神经功能的恢复程度<sup>[4]</sup>。本实验结果发现,在各个时间点上,大鼠运动评分和凋亡细胞计数呈负相关(表 3),凋亡细胞越少,则运动评分越高;脊髓继发性损伤引起神经细胞凋亡的高峰时间在损伤后 24~72 h。在许多不同的体内外神经损伤研究中,如脑缺血<sup>[5]</sup>、新生儿缺血缺氧性脑病<sup>[6]</sup>、脊髓损伤等<sup>[7]</sup>,均发现 EPO 可能有抗神经元凋亡的功能。不同剂量 EPO 的神经细胞保护作用不完全相同,3 000 IU/kg 可能最接近最佳应用剂量<sup>[8-9]</sup>。本实验即采用单次 3 000 IU/kg 的 rhuEPO 处理 ASCI 大鼠,结果显示 EPO 的抗凋亡作用显著。

EPO 的生物效应可能是通过激活促红细胞生成素受体(Epo-R)并启动相应的信号传导途径,促进抗凋亡蛋白基因,如 Bcl-2、Bcl-xl 等表达<sup>[10-11]</sup>,抑制促凋亡蛋白基因,如 Bax、Bad、Bak、Mcl-2 等表达<sup>[12]</sup>。认为 EPO 的作用有:(1)能保护神经元免受兴奋性氨基酸的毒性作用<sup>[13]</sup>;(2)抗氧化作用,降低脂质过氧化反应,能增强髓过氧化物酶和 caspase-3 的活性<sup>[14]</sup>;(3)抑制星形胶质细胞的水通道蛋白 AQP4 的表达,减轻局部水肿<sup>[15]</sup>;(4)缓解血管痉挛;(5)促进血管生成作用;(6)促进神经生长因子(NGF)表达<sup>[16]</sup>。本实验结果表明,EPO 和 MP 都能减轻脊髓继发性损伤,促进运动功能恢复,但是 EPO 的保护作用更强、更持久。二者都是通过多种机制发挥神经保护作用的,但是各有侧重:EPO 主要是抑制神经细胞凋亡和增强神经细胞对缺血缺氧的耐受性;而 MP 主要是减轻炎症反应。本实验中,MP 组脊髓组织较对照组水肿程度显著减轻,单核细胞浸润轻,凋亡的神经细胞有所减少。

综上所述,提示 EPO 是一种极具潜力的神经系统治疗药物。EPO 治疗 ASCI 的最佳应用时机<sup>[17]</sup>、剂量、途径,以及远期疗效均有待进一步研究。EPO 能否长期应用及长期应用 EPO 对其他组织器官的影响,尤其是对血液系统的影响尚缺少充分的研究。

## 参考文献:

- [1] 孙天胜. 甲基泼尼松龙对急性脊髓损伤的治疗效果与存在的问题[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15(7): 389-391.
- [2] Sirén AL, Fasshauer T, Bartels C, et al. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system[J]. Neurotherapeutics, 2009, 6(1): 108-127.
- [3] Kwon BK, Okon E, Hillyer J, et al. A systematic review of non-invasive pharmacologic neuroprotective treatments for acute spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2011, 28(8): 1545-1588.
- [4] Moon YJ, Lee JY, Oh MS, et al. Inhibition of inflammation and oxidative stress by *Angelica dahuricae* radix extract decreases apoptotic cell death and improves functional recovery after spinal cord injury[J]. J Neurosci Res, 2012, 90(1): 243-256.
- [5] 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): 20-68.
- [6] Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, et al. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia-induced DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia[J]. Neurosci Lett, 2004, 366(1): 24-28.
- [7] Kap tanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, et al. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats; effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings[J]. Neurosurg Rev, 2004, 27(2): 113-120.
- [8] Cetin A, Nas K, Büyükbayram H, et al. The effects of systemically administered methylprednisolone and recombinant human erythropoietin after acute spinal cord compressive injury in rats[J]. Eur Spine J, 2006, 15(10): 1539-1544.
- [9] Kontogeorgakos VA, Voulgaris S, Korompilias AV, et al. The efficacy of erythropoietin on acute spinal cord injury. An experimental study on a rat model[J]. Arch Orthop Trauma Surg, 2009, 129(2): 189-194.
- [10] Kim MS, Seo YK, Park HJ, et al. The neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin via an anti-apoptotic mechanism on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats[J]. Korean J Pediatr, 2010, 53(10): 898-908.
- [11] Warren JS, Zhao Y, Yung R, et al. Recombinant human erythropoietin suppresses endothelial cell apoptosis and reduces the ratio of Bax to Bcl-2 proteins in the aortas of apolipoprotein E-deficient mice[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 57(4): 424-433.
- [12] Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an anti-apoptotic, tissue-protective cytokine[J]. Cell Death Differ, 2004, 11 Suppl 1: S37-44.
- [13] Won YJ, Yoo JY, Lee JH, et al. Erythropoietin is neuroprotective on GABAergic neurons against kainic acid-excitotoxicity in the rat spinal cell cultures[J]. Brain Res, 2007, 1154(18): 31-39.
- [14] Okutan O, Solaroglu I, Beskonakli E, et al. Recombinant human erythropoietin decreases myeloperoxidase and caspase-3 activity and improves early functional results after spinal cord injury in rats[J]. J Clin Neurosci, 2007, 14(4): 364-368.
- [15] Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, et al. Chronic erythropoietin-mediated effects on the expression of astrocyte markers in a rat model of contusive spinal cord injury[J]. Neuroscience, 2008, 151(2): 452-466.
- [16] Fumagalli F, Madaschi L, Brenna P, et al. Single exposure to erythropoietin modulates Nerve Growth Factor expression in the spinal cord following traumatic injury; comparison with methylprednisolone[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 578(1): 19-27.
- [17] Mann C, Lee JH, Liu J, et al. Delayed treatment of spinal cord injury with erythropoietin or darbepoetin—a lack of neuroprotective efficacy in a contusion model of cord injury[J]. Exp Neurol, 2008, 211(1): 34-40.
- (收稿日期: 2012-02-09 修回日期: 2012-05-19)
- (上接第 2743 页)
- cohort study[J]. Crit Care, 2006, 10(1): R37.
- [12] Kotanidou A, Karsaliakos P, Tzanela M, et al. Prognostic importance of increased plasma amino-terminal pro-brain natriuretic peptide levels in a large noncardiac, general intensive care unit population[J]. Shock, 2009, 31(4): 342-347.
- [13] Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective upregulation of cardiac brain natriuretic peptide at the transcriptional and translational levels by pro-inflammatory cytokines and by conditioned medium derived from mixed lymphocyte reactions via p38 MAP kinase[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 36(4): 505-513.
- [14] Rudiger A, Gasser S, Fischler M. Comparable increase of B-type natriuretic peptide and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients with severe sepsis, septic shock, and acute heart failure[J]. Crit Care Med, 2006, 34(8): 2140-2144.
- [15] 李召辉, 肖军, 李金泽, 等. 血浆 N 末端 B 型钠尿肽前体对重症患者预后的预测价值研究[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(3): 179-182.
- (收稿日期: 2012-01-09 修回日期: 2012-04-22)