

[文章编号] 1007-3949(2007)15-02-0097-04

• 实验研究 •

促红细胞生成素对大鼠脑缺血后神经元凋亡及热休克蛋白 27 和血管内皮生长因子表达的影响

朱 灵, 汤永红, 袁旭光, 王 浩

(南华大学附属第二医院神经内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 神经病学; 促红细胞生成素; 脑缺血; 细胞凋亡; 热休克蛋白 27; 血管内皮生长因子; 大鼠

[摘要] 目的 探讨促红细胞生成素对大鼠脑缺血的保护作用。方法 采用线栓法阻断大鼠一侧大脑中动脉制作大鼠局灶性缺血再灌注模型。促红细胞预处理组于缺血开始前 2 h 予腹腔注射促红细胞生成素 3 000 u/kg; 缺血再灌注组和假手术组在手术前 2 h 予腹腔注射等量生理盐水。再灌注 24 h 后进行细胞凋亡检测及热休克蛋白 27 和血管内皮生长因子免疫组织化学染色。结果 再灌注 24 h 后, 缺血再灌注组可见较多的 POD 阳性细胞(67.48 ± 11.17 个/高倍视野), 促红细胞生成素预处理组缺血区阳性细胞数目减少(45.25 ± 4.72 个/高倍视野, $P < 0.01$), 假手术组偶见个别阳性细胞, 正常组未见凋亡细胞; 与缺血再灌注组(25.60 ± 4.42 个/高倍视野)相比, 促红细胞生成素预处理组热休克蛋白 27 表达增加(67.56 ± 13.84 个/高倍视野, $P < 0.01$); 促红细胞生成素预处理组血管内皮生长因子表达较缺血再灌注组亦增加(74.90 ± 11.64 个/高倍视野比 40.14 ± 7.50 个/高倍视野, $P < 0.01$)。结论 促红细胞生成素预处理后可抑制缺血损伤后缺血侧皮层细胞凋亡, 其机制可能是通过上调热休克蛋白 27 和血管内皮生长因子基因表达而实现的。

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

Effect of Erythropoietin on Neuronal Apoptosis and Expression of Heat Shock Protein 27 and Vascular Endothelial Growth Factor After Rat Cerebral Ischemia

ZHU Ling, TANG Yong-Hong, YUAN Xu-Guang, and WANG Hao

(Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Erythropoietin; Cerebral Ischemia; Cell Apoptosis; Heat Shock Protein 27; Vascular Endothelial Growth Factor; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate protection of erythropoietin (EPO) on rat cerebral ischemia. **Methods** The model of focal cerebral ischemia reperfusion injury was made by occluding middle cerebral artery (MCA). At 2 hours before cerebral ischemia, EPO group received an intraperitoneal injection of rHuEPO (3 000 u/kg), while ischemia reperfusion group and sham operation group received same doses of saline. The brains were removed 24 hours after reperfusion. Apoptosis and expressions of heat shock protein 27 (HSP27) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected. **Results** After 24 hours of reperfusion, it was thus clear that ischemia reperfusion group (67.48 ± 11.17 cells/HP) had major POD masculine cells, EPO group (45.25 ± 4.72 cells/HP) was decreased, there was significant difference between the two groups ($P < 0.01$), no TUNEL positive cell was found in control group and sham operation group. Compared with ischemia reperfusion group (25.60 ± 4.42 cells/HP), the expression of HSP27 in EPO group was increased (67.56 ± 13.84 cells/HP, $P < 0.01$). About the expression of VEGF, there was significant difference between EPO group and ischemia reperfusion group (74.90 ± 11.64 cells/HP vs 40.14 ± 7.50 cells/HP, $P < 0.01$). **Conclusion** EPO pretreatment could inhibit apoptosis of cortical neurons after cerebral ischemia reperfusion injury, partially mediated by the up regulation of HSP27 and VEGF expression.

近来研究发现, 促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 是神经系统中一个新的信号转导分子^[1], 对神经系统具有广泛的促生长与保护作用^[2], 能明显减轻脑缺血再灌注损伤。但 EPO 预处理能否减轻实验大鼠脑缺血再灌注损伤及是否通过促进热休克蛋白 27 (heat shock protein 27, HSP27) 和血管内皮生长

因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达而起到保护作用, 目前国内外尚无文献报道。本实验应用大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 观察 EPO 预处理对脑缺血再灌注损伤所产生的保护作用及产生保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠 32 只, 清洁级, 体重 250~300

[收稿日期] 2006-09-30

[修回日期] 2007-02-10

[作者简介] 朱灵, 硕士研究生, 医师。通讯作者汤永红, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为脑血管病, E-mail 为 tang6246@tom.com。袁旭光, 硕士研究生, 主治医师。

g, 由南华大学实验动物中心提供; EPO 为沈阳三生制药股份公司生产; 原位细胞凋亡检测试剂盒、兔抗鼠 HSP27 多克隆抗体、兔抗鼠 VEGF 多克隆抗体及 SABC 试剂盒均购自武汉博士德公司; DAB 显色试剂盒购自福州迈新公司; 水合氯醛、PBS 及其它试剂均为国产分析纯级。

1.2 动物分组及模型建立

32 只大鼠随机分成四组: EPO 预处理组、缺血再灌注组(或称模型组)、假手术组和正常组, 每组 8 只。参照 Longa 等^[3] 颈外动脉线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型: 大鼠术前 24 h 禁食, 12 h 禁水, 10% 水合氯醛(3 mL/g)腹腔注射麻醉。仰卧位固定, 颈部正中偏右切口, 钝性分离胸锁乳突肌和胸骨舌骨肌, 暴露右颈总动脉(common carotid artery, CCA)与迷走神经, 游离右颈总动脉、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA), 结扎颈内动脉的颅外唯一分支翼腭动脉, 在距颈外动脉起始处 1 cm 结扎并电凝颈外动脉主干, 用无创动脉夹分别夹闭右颈总动脉近心端和颈内动脉远端, 在颈外动脉与颈内动脉分叉处置一丝线, 打一活结, 在颈外动脉残端 0.5 cm 处剪一小口, 将准备好的头端烧成光滑杵状的美因四号尼龙线(直径 0.2 mm)经颈外动脉插入颈内动脉, 将活结扎紧, 松开动脉夹, 将鱼线顺颈内动脉缓慢插入, 进入深度为 18.5 ± 0.5 cm。生理盐水冲洗, 关闭手术切口。切口外留 1 cm 左右长的鱼线, 再灌注时将鱼线向外拉出至颈内动脉颅外段即可, 手术过程中, 用灯泡保持肛温在 $36.5 \sim 37.5$ °C 之间。EPO 预处理组在缺血前 2 h 予腹腔注射 EPO(3 000 u/kg), 缺血再灌注组和假手术组在手术前 2 h 予腹腔注射等量生理盐水, 假手术组颈内动脉内插线深度 < 10 mm, 其操作步骤同缺血组。正常组大鼠不手术直接处死。其余 3 组予缺血后 24 h 处死。

1.3 标本采集与组织学检查

10% 水合氯醛过量麻醉大鼠后, 暴露心脏, 用 37 °C 生理盐水 200 mL 经心脏快速灌注的同时, 剪开右心耳, 冲洗去除血细胞, 再用 4 °C 多聚甲醛 200 mL 灌注固定后断头取脑, 经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜观察组织学变化。

1.4 原位细胞凋亡检测

脑标本切片常规脱蜡至水; 新鲜配制 3% H_2O_2 室温孵育 10 min; 标本加 0.01 mol/L TBS1:200 新鲜稀释蛋白激酶 K 37 °C 消化 10 min; 标本加标记缓冲液 20 mL/片, 37 °C 标记 2 h; 加封闭液 50 mL/片, 室温 30 min; 加生物素化抗地高辛抗体, 37 °C 反应 30 min;

加 SABC, 37 °C 反应 30 min; DAB 显色; 苏木素轻度复染, 脱水、透明、封片, 显微镜下观察。细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞, 即凋亡细胞。每张切片在缺血侧皮层计数 5 个高倍镜视野($400 \times$), 取平均值, 为该切片凋亡细胞数。

1.5 热休克蛋白 27 和血管内皮生长因子免疫组织化学染色

标本切片常规脱蜡至水; 3% H_2O_2 室温孵育 10 min 灭活内源性过氧化物酶; 0.01 mol/L 枸橼酸盐中行微波抗原修复 10 min 左右; 滴加 5% BSA 封闭液, 室温 20 min; 分别滴加兔抗大鼠 HSP27 多克隆抗体(1:10)和兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体(1:10), 4 °C 过夜; 滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 20 min; 滴加试剂 SABC, 37 °C 孵育 20 min; DAB 显色; 水洗、复染、封片、光镜下观察。空白对照实验用 PBS 代替 HSP27 抗体和 VEGF 抗体。HSP27 阳性细胞胞质和胞核中可见棕黄色颗粒, VEGF 阳性细胞胞质中可见棕黄色颗粒, 每张切片在缺血侧皮层计数 5 个高倍镜视野($400 \times$), 取平均值, 为该切片 HSP27 和 VEGF 阳性细胞数。

1.6 统计学处理

采用国际统计软件 SPSS13.0 处理数据, 所有结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两样本均数比较用配对 t 检验, 多个样本均数间的比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 病理形态学变化

缺血再灌注组大鼠缺血侧大脑半球较对侧明显肿胀, 大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)供血区苍白, 无光泽; EPO 预处理组损伤区范围变小, 肿胀较轻。脑组织切片 HE 染色显示: 正常组皮层神经细胞数量多, 胞质丰富, 高倍镜下可见这些神经细胞核大而圆, 有 1~2 个明显的核仁; 假手术组皮层神经细胞结构基本正常, 仅见个别细胞体积缩小, 核深染; 缺血再灌注组表现为神经元稀疏, 细胞间隙增大, 并可见大量神经细胞变性坏死, 表现为胞体皱缩, 核固缩深染, 核仁消失; 与缺血再灌注组比较, EPO 预处理组神经细胞存活数量增多, 损伤程度明显减轻(图 1)。

2.2 神经元凋亡检测结果

缺血再灌注组可见较多 POD 阳性细胞(67.48 ± 11.17 个/高倍视野), 阳性信号局限在细胞核内, 呈棕黄色颗粒, 且高倍镜下可见细胞核周质靠近胞膜处有数个散在深染的圆形颗粒状结构, 即凋亡小

体(图2)。EPO 组缺血区阳性细胞数目较缺血再灌注组减少(45.25 ± 4.72 个/高倍视野, $P < 0.01$)。假手术组偶见个别阳性细胞, 正常组未见凋亡细胞。

2.3 热休克蛋白 27 的表达

热休克蛋白 27 产物主要定位于胞质, 少数位于胞核内, 呈棕黄色颗粒。正常组和假手术组神经细

胞胞质和胞核中均可见少量的淡黄色颗粒, 两者间比较差异无显著性($P > 0.05$)。缺血再灌注组 HSP27 表达高于正常组和假手术组($P < 0.05$, 表 1)。在 EPO 预处理组中, 神经细胞胞质和胞核中棕黄色颗粒显著增多(图 3), 与缺血再灌注组相比, 差异有显著性($P < 0.01$)。

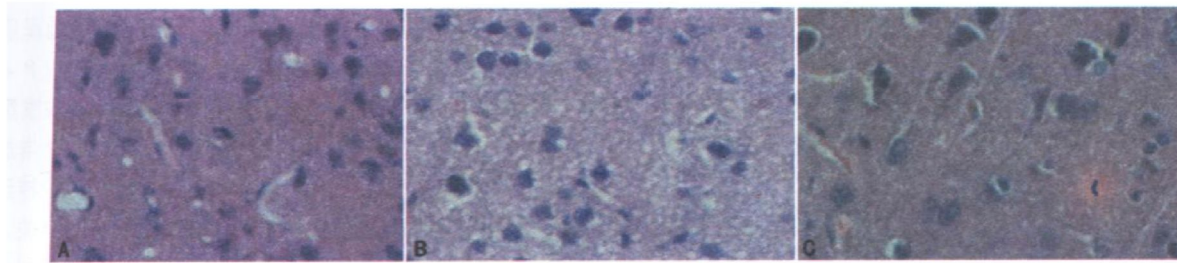


图 1. 大鼠脑组织切片 HE 染色 A 为正常组, B 为缺血再灌注组, C 为促进红细胞生成素预处理组。

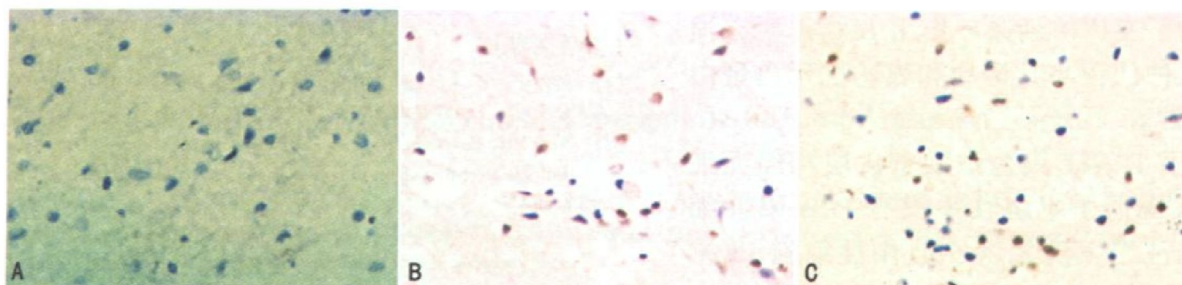


图 2. 细胞凋亡检测结果 A 为假手术组, B 为缺血再灌注组, C 为促进红细胞生成素预处理组。

2.4 血管内皮生长因子的表达

各组大鼠脑组织均可见 VEGF 表达的阳性细胞, 呈棕黄色表达于细胞质中。VEGF 在脑组织中广泛表达, 主要见于神经元、内皮细胞、胶质细胞和软脑膜细胞等。其中正常组和假手术组可见少量的棕黄色颗粒, 两者比较差异无显著性($P > 0.05$)。缺血再灌注组 VEGF 表达明显高于正常组和假手术组, 差异有显著性($P < 0.01$)。与缺血再灌注组比较, EPO 预处理组棕黄色颗粒显著增多($P < 0.01$, 表 1 和图 3)。

表 1. 大鼠局灶性脑缺血再灌注后热休克蛋白 27 和血管内皮生长因子的表达 ($\bar{x} \pm s$, 个/视野)

组别	例数	HSP27 阳性细胞数	VEGF 阳性细胞数
EPO 预处理组	8	67.56 ± 13.84^c	74.90 ± 11.64^c
缺血再灌注组	8	25.60 ± 4.42^a	40.14 ± 7.50^b
正常组	8	22.56 ± 4.54	23.82 ± 4.43
假手术组	8	22.94 ± 5.09	24.67 ± 5.94

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常组和假手术组相比; c 为 $P < 0.01$, 与缺血再灌注组相比。

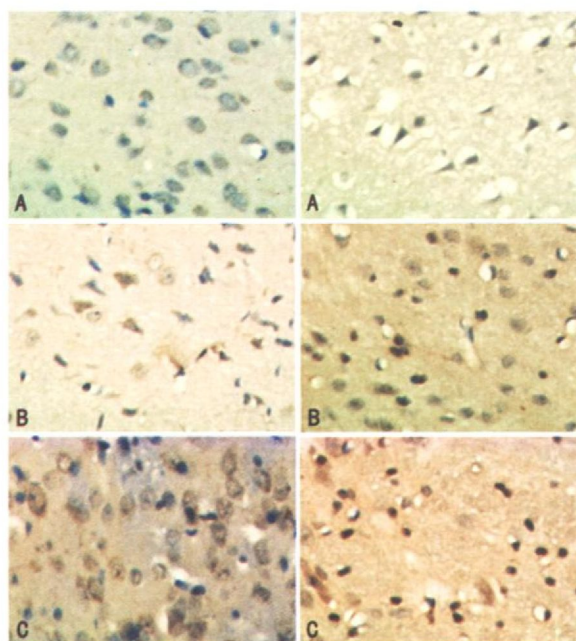


图 3. 热休克蛋白 27(左)和血管内皮生长因子(右)的表达 A 为假手术组, B 为缺血再灌注组, C 为促进红细胞生成素预处理组。

3 讨论

临床上 EPO 主要用于治疗各种原因所致的贫血,但近年研究表明中枢神经系统也有 EPO 及 EPO 受体表达,并且通过缺氧诱导因子 1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)控制 EPO 生成,脑源性 EPO 保护对缺氧损伤最敏感的细胞——神经元。EPO 的神经保护作用主要与抑制细胞凋亡^[4]、减少梗死面积^[5]、促进功能恢复^[6]、上调抗凋亡基因^[7]、抑制炎症反应^[8]和减轻一氧化氮介导的损伤及直接的抗过氧化效应^[9]等有关。

由于在致死性脑缺血/缺氧损伤发生后脑部可产生 EPO,所以 EPO 可能是一种脑缺血时进行预处理的介质^[10]。给予外源性 EPO 的体内实验证明,对于急性缺血性损伤,内源性 EPO 的神经保护作用明显不足,可能是因为大脑在脑缺血时不能产生足够的 EPO 或新合成潜伏期太长,以致不能及时发挥神经保护作用,为了发挥神经保护作用 EPO 需要在损伤之前给予,这种认识与其诱导和表达抗死亡蛋白的概念相一致^[10]。

本实验采用 TUNEL 染色法观察皮层神经元细胞凋亡情况,发现假手术组几乎没有 POD 阳性细胞,而缺血再灌注组发现大量 POD 阳性细胞, EPO 预处理组也可见到 POD 阳性细胞,但较缺血再灌注组明显减少。对缺血再灌注损伤侧皮层神经元的超微结构进行观察发现,假手术组神经元形态正常,缺血再灌注组存在典型的细胞凋亡改变,而 EPO 预处理组正常形态的神经元较缺血再灌注组多见,也可见到部分凋亡神经元,但是较缺血再灌注组少见。提示 EPO 预处理可保护缺血神经元。

血管内皮生长因子(VEGF)是高度特异的血管内皮细胞有丝分裂原,在脑缺血后半暗带低氧区,低氧激活 HIF-1 后促使 VEGF 和 VEGF 1 型受体表达, VEGF 2 型受体的基因转录同时也被诱导,刺激缺氧组织建立有效的侧支循环并恢复内皮细胞的完整性,发挥自身搭桥作用,诱导新生血管形成,并使新生血管从正常组织向半暗带及缺血中心区延伸,增加受累脑组织再灌注及供氧量,从而减轻心脑缺血再灌注损伤^[11,12]。

热休克蛋白 27(HSP27)是 p38 促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)代谢的终末产物,在应激条件下神经系统绝大多数器官、组织中都有 HSP27 表达。HSP27 和其他家族的热休

克蛋白一样,具有分子伴侣功能,它介导细胞蛋白质的正确装配和跨膜转运,从而稳定细胞的膜结构。缺血缺氧时,大部分诱导型 HSP 位于细胞核内,细胞恢复时则移入胞质,再次应激时重又转回细胞核内。我们推测 HSP27 的产生和较快移位是机体对缺血缺氧作出的快速反应,使迅速合成的 HSP27 移入胞质保护重要细胞器的功能。

本实验结果表明,局灶性脑缺血再灌注损伤后 24 h HSP27 和 VEGF 表达增加,而用 EPO 预处理后缺血脑组织 HSP27 和 VEGF 表达显著增加($P < 0.01$)。结果提示,在脑缺血再灌注损伤动物模型中,用 EPO 预处理能减少神经细胞凋亡,显著增加 HSP27 和 VEGF 表达,提示 EPO 预处理后减少神经细胞凋亡可能与其促进 HSP27 和 VEGF 表达有关。

总之,EPO 预处理后能够减少脑缺血侧皮层神经细胞的坏死和凋亡,促进缺血侧 HSP27 和 VEGF 的表达从而起到神经保护作用。

[参考文献]

- [1] 贾鲁宁,邹飞. 促红细胞生成素: 中枢神经系统中一个新的信号转导分子[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册, 2003, 23: 168-170.
- [2] Marti HH, Bernaudin M, Petri E, Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ischemia [J]. *Physiol Sci*, 2000, 15: 225-229.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20 (1): 84-91.
- [4] Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, Karkavelas G, Simeonidou C, Kaikri Astar A, et al. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia induced DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 366 (1): 24-28.
- [5] Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, Mackenzie ET, Petit E, Schumann Bard P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and vegf, in the adult mouse brain [J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 2002, 22 (4): 393-403.
- [6] Demers EJ, McPherson RJ, Juul SE. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxic ischemia [J]. *Pediatr Res*, 2005, 58 (2): 297-301.
- [7] Akcali KC, Dalgic A, Ucar A, Haj KB, Guven D. Expression of bcl-2 gene family during resection induced liver regeneration: comparison between hepatectomized and sham groups [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10 (2): 279-283.
- [8] Bernaudin M, Myriam HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, Mackenzie ET, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice [J]. *J Cerebr Blood Flow Metab*, 1999, 19 (6): 643-651.
- [9] Takadera T, Ohyashiki T. Prostaglandin E2 deteriorates N-methyl-D-aspartate receptor-mediated cytotoxicity possibly by activating EP2 receptors in cultured cortical neurons [J]. *Life Sci*, 2006, 78 (16): 1 878-883.
- [10] Dawson TM. Preconditioning mediated neuroprotection through erythropoietin [J]. *Lancet*, 2002, 359 (9301): 96-97.
- [11] Nagy Z, Simon L, Bori Z. Regulatory mechanisms in focal cerebral ischemia: new possibilities in neuroprotective therapy [J]. *Idoggygy Sz*, 2002, 55 (3-4): 73.
- [12] Zhang ZG, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angioneurins in focal cerebral ischemia [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12 (2): 6.

(此文编辑 许雪梅)