

脑缺血耐受大鼠缺氧诱导因子-1 α 和促红细胞生成素的表达*

赵仁亮¹ 王春霞² 孙忠玲¹

摘要 目的:探讨脑缺血预处理诱导脑缺血耐受形成中促红细胞生成素(EPO)及缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)mRNA 及蛋白表达的变化。**方法:**将 99 只 Wistar 大鼠随机分成假手术对照组 9 只、假手术+再缺血组 45 只、预缺血+再缺血组 45 只,后两组再随机分成 5 个亚组。线栓法阻塞大脑中动脉建立局灶性缺血预处理模型(预缺血 10min),分别在预缺血后 1d、3d、7d、14d、21d 进行再次缺血 2h 再灌注 22h,然后取脑检查。应用免疫组化方法检测 HIF-1 α 与 EPO 蛋白的表达,应用反转录聚合酶链式反应技术检测 EPOmRNA 和 HIF-1 α mRNA 的表达。**结果:**①与假手术组各对应亚组相比,缺血预处理组中的 1d、3d、7d 亚组 HIF-1 α 蛋白表达增高,3d、7d 亚组中 EPO 蛋白表达增高,差异有显著性意义($P<0.05$; $P<0.01$)。②与假手术组各对应亚组相比,缺血预处理组 3d、7d 亚组中 HIF-1 α mRNA 及 EPO mRNA 表达明显增高,差异有显著性意义($P<0.05$)。③EPO mRNA 表达与 HIF-1 α mRNA 表达呈显著正相关。**结论:**缺血预处理诱导了脑缺血耐受,预缺血诱导的内源性 HIF-1 α 及 EPO 表达增加参与脑缺血耐受形成的机制。

关键词 缺血耐受;缺血预处理;脑缺血;大鼠;缺氧诱导因子;促红细胞生成素

中图分类号: R493,R741 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-10-0881-04

Expression of hypoxia inducible factor-1 α and erythropoietin in the rat model of brain ischemic tolerance/ ZHAO Renliang,WANG Chunxia, SUN Zhongling//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2007,22 (10): 881—884

Abstract Objective:To investigate the expression of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and erythropoietin (EPO) in the rat model of brain ischemic tolerance induced by ischemic preconditioning (IP). **Method:** Ninety nine healthy wistar rats were randomly assigned into three groups for different preconditioning, the sham surgery group (SS+SS, n=9), the sham and middle cerebral artery occlusion group (SS+MCAO, n=45), and the ischemic preconditioning and MCAO group (IP+MCAO, n=45). The latter two groups were further divided into five subgroups respectively for different preconditioning-ischemia intervals. For ischemic preconditioning, the rats were given MCAO for 10min. On 1,3,7,14 and 21d after IP, the rats were given the second MCAO (or sham surgery) for 2h followed by 22h reperfusion. The protein of HIF-1 α and EPO were detected by method of immunohistochemistry. The expression of HIF-1 α mRNA and EPO mRNA were detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction. **Result:** ①Compared with each of the SS+MCAO subgroups, the expression of HIF-1 α protein in the 1d, 3d and 7d subgroups of IP+MCAO and the expression of EPO protein in the 3d and 7d subgroups of IP+MCAO were significantly higher ($P<0.05$, $P<0.01$). ②The expression of EPO mRNA and HIF-1 α mRNA in the 3d, 7d subgroups of IP+MCAO group increased distinctly compared with that of the SS+MCAO group ($P<0.05$). ③The expression of EPO mRNA were positively correlated with the expression of HIF-1 α mRNA ($r=0.737$, $P<0.01$). **Conclusion:** Endogenously produced HIF-1 α and EPO may be essential mediators of cerebral ischemic tolerance.

Author's address Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Shandong Qingdao, 266003

Key words ischemic tolerance; ischemic preconditioning; cerebral ischemia; rat; hypoxia inducible factor 1; erythropoietin

实验表明, 短暂性脑缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)对神经细胞起保护作用, 可诱导机体抵御其后发生的较严重的甚至致死性脑缺血事件, 减轻缺血组织的病变程度, 即诱发了脑的缺血耐受^[1-2], 但迄今脑缺血耐受的发生机制及诱发神经保护的最佳时间窗尚无定论。研究发现, 促红细胞生成

素(erythropoietin, EPO)可在中枢神经系统表达, 具

* 基金项目: 青岛市科技发展项目(No.05-1-NS-73)

1 青岛大学医学院附属医院神经内科, 266003

2 青岛市精神卫生中心

作者简介: 赵仁亮, 男, 副教授, 副主任医师

收稿日期: 2007-03-19

有神经保护作用; 脑源性 EPO 的产生与缺氧诱导的脑缺血耐受的形成相关^[3-4]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是一种普遍存在的氧敏感性转录调节因子, EPO 的表达受 HIF-1 α 的调控。本实验采用线栓法建立局灶性大鼠脑缺血预处理模型, 动态检测预处理后缺血再灌注不同时间窗 EPO 及 HIF-1 α mRNA 及蛋白的表达, 探讨 EPO 与 HIF-1 α 在脑缺血耐受中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 Wistar 大鼠 99 只, 体重 250—300g, 清洁级, 由华中科技大学同济医学院动物实验部提供。随机分成以下 3 组: 缺血预处理组 45 只: 预缺血 10min 后按不同的再灌注时间分为 5 个亚组, 分别于再灌注 1d、3d、7d、14d、21d 后给予 2h 大脑中动脉阻塞, 再灌注 22h 后处死。假手术组 45 只: 分 5 个亚组, 假手术代替预缺血 (即仅暴露颈总动脉及分叉处, 不插线阻断大脑中动脉), 在假手术后按前述不同时间点给予 2h 大脑中动脉阻塞, 再灌注 22h 后处死。对照组 9 只: 两次均为假手术, 即两次均仅给予暴露颈总动脉及分叉处。与以上两组的 1d 亚组同一时间处死。

1.2 预缺血及再缺血模型制备

采用由 Zea-Longa^[5]改进的大脑中动脉二次线栓法。预缺血 10min 后, 将线栓退出至 ECA 并埋于皮下, 完成缺血预处理。缺血预处理再灌注后, 在规定的的时间点再次麻醉大鼠, 拆开皮肤缝线, 剪开 ECA 近心端的结扎线, 将埋在皮下的线栓推进 18.5 $\pm$ 2mm, 再次阻断大脑中动脉造成大脑中动脉阻塞, 重新结扎 ECA 近心端, 缝合皮肤, 2h 后在无需麻醉 (如动物苏醒可用乙醚短暂麻醉) 的情况下将留在皮外的线栓抽出至 ECA, 形成第二次再灌注, 22h 后处死。动物清醒后观察大鼠的行为和神经症状, 以动物清醒后出现左前肢不能伸展、爬行时向左侧转圈并存活至规定时间点作为造模成功的标准。

1.3 免疫组化检测 HIF-1 α 与 EPO 蛋白

每组随机选取 4 只大鼠, 10% 水合氯醛麻醉后, 打开胸腔, 暴露心脏, 剪开心包, 找到主动脉, 使之游离并在其下方穿线, 灌注针头穿刺入主动脉后结扎穿线, 剪刀剪开右心耳, 先灌注生理盐水约 200ml, 待右心耳流出液体变得清亮、肺脏与肝脏因失血变白时, 换用 4% 多聚甲醛约 200ml 灌注固定, 待动物出现四肢剧烈抽搐、尾巴僵硬后, 断头取脑, 取前囟后 3—6mm 部分, 4% 多聚甲醛后固定 4—6h, 脱水、

透明、浸蜡、包埋、切片, 片厚 5 μ m。从上述切片中选取 5 张行免疫组化检测, 各组所取部位相同, 检测皮质区和海马区 HIF-1 α 与 EPO 的表达。对 HIF-1 α 与 EPO 的检测采用 SABC 免疫组织化学染色法。采用计算机图像分析软件进行图像分析, 测量免疫组化染色的平均光密度值 (MOD)。即用型 SABC 试剂盒、兔抗鼠 HIF-1 α 单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; 兔抗鼠 EPO 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.4 RT-PCR 检测 EPO mRNA 和 HIF-1 α mRNA

在再灌注后 22h 每组随机选取 5 只大鼠, 将动物断头取脑, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱约 5min, 剥取左侧大脑半球距离嗅球尖端 8—11mm 之间的额顶上部皮质, 称重后置于 RNAguard 液中, 并存放于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱。总 RNA 采用 Trizol 试剂提取 (具体步骤见说明书)。引物由上海生工生物工程技术公司合成。

EPO 引物:

上游序列 5'-ATTGCGACAGTCGCGTTCT-3',

下游序列 5'-GTATCCGCTTGAAGTGTTTCG-3',

扩增长度 395bp。

HIF-1 α 引物:

上游序列 5'-AAGTCTAGGGATGCAGCAC-3',

下游序列 5'-CAAGATCACCAGCATCTAG-3',

扩增长度 175bp。

β -actin 为内参照,

上游序列 5'-ACACTGTGCCCATCTAGGAGG-3',

下游序列 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3',

扩增长度 621bp。

QIAGEN Onestep RT-PCR Kit 进行反转录及 PCR 扩增。EPO 的 RT-PCR 反应条件: 50 $^{\circ}$ C 30min 反转录、95 $^{\circ}$ C 15min、94 $^{\circ}$ C 50s、58 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min 终延伸; HIF- α 和 β -actin 除分别进行 21 个循环、17 个循环外, 其余 RT-PCR 操作同 EPO。反应结束后, 分别取 3 μ L PCR 反应产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统成像, 用 Bio-Rad 图像分析系统软件进行吸光度容量定量分析, PCR 产物的相对量 = EPO (or HIF-1 α) 扩增产物的吸光度值/ β -actin 扩增产物的吸光度值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件包进行统计学处理, 所有数据采用均值 $\pm$ 标准差表示。各组同一时间点之间比较采用 *t* 检验, 组内不同时间点之间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 免疫组化检测 HIF-1 α 和 EPO 蛋白

正常对照组有较弱的 HIF-1 α 蛋白和 EPO 蛋白表达。缺血预处理组与假手术各组可见较多的 HIF-1 α 和 EPO 阳性表达细胞, 主要分布于皮质、海马、纹状体区的神经元和神经胶质细胞。光镜下细胞核或胞浆染色呈棕黄色。各组 HIF-1 α 蛋白表达结果见表 1、图 1(见前置彩色插页 8), 各组 EPO 蛋白表达结果见表 2、图 2(见前置彩色插页 8)。

2.2 RT-PCR 半定量分析

在额顶部上部皮质, 对照组 HIF-1 α mRNA 表达微弱, 偶见 EPO mRNA 少量表达。缺血预处理组

3d、7d 亚组脑组织 HIF-1 α mRNA 和 EPO mRNA 表达量高于假手术组之相应(见前置彩色插页 8)亚组($P<0.05$)。HIF-1 α mRNA、EPO mRNA 的表达分见表 3、表 4。缺血预处理组 RT-PCR 产物见图 3(见前置彩色插页 8), 假手术组 RT-PCR 产物见图 4(见前置彩色插页 8)。

2.3 相关分析

Pearson 相关分析显示, EPO mRNA 与 HIF-1 α mRNA 的表达变化呈明显正相关($r=0.737, P<0.01$)。

表 1 各组 HIF-1 α 蛋白表达的比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	HIF-1 α 平均光密度(MOD)				
	1d	3d	7d	14d	21d
假手术组	117.65 $\pm$ 5.60	119.33 $\pm$ 4.26	107.60 $\pm$ 3.89	112.48 $\pm$ 8.52	117.00 $\pm$ 8.33
缺血预处理组	125.93 $\pm$ 3.79 ^①	140.63 $\pm$ 4.64 ^{②③}	131.15 $\pm$ 2.74 ^{②③}	118.33 $\pm$ 7.10	119.58 $\pm$ 4.70

与假手术组比较, ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 缺血预处理组内比较, 3d、7d 亚组与 1d、14d、21d 亚组比较, ③ $P<0.05$

表 2 各组 EPO 蛋白表达的比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	EPO 平均光密度(MOD)				
	1d	3d	7d	14d	21d
假手术组	125.98 $\pm$ 4.31	126.33 $\pm$ 4.51	125.58 $\pm$ 6.18	127.30 $\pm$ 4.91	127.83 $\pm$ 6.50
缺血预处理组	135.20 $\pm$ 6.37	141.68 $\pm$ 3.29 ^{①②}	138.88 $\pm$ 2.59 ^{①②}	135.00 $\pm$ 5.97	136.33 $\pm$ 3.51

与假手术组比较, ① $P<0.05$; 缺血预处理组内比较, 3d、7d 亚组与 1d、14d、21d 亚组比较, ② $P<0.05$

表 3 额顶部上部皮质 HIF-1 α mRNA 的表达

($\bar{x}\pm s$)

组别	1d	3d	7d	14d	21d
假手术组	0.74 $\pm$ 0.14	0.71 $\pm$ 0.13	0.70 $\pm$ 0.10	0.69 $\pm$ 0.13	0.75 $\pm$ 0.15
缺血预处理组	0.74 $\pm$ 0.13	0.96 $\pm$ 0.20 ^{①②}	1.01 $\pm$ 0.25 ^{①②}	0.69 $\pm$ 0.10	0.71 $\pm$ 0.11

与假手术组比较, ① $P<0.05$; 缺血预处理组内比较, 3d、7d 亚组与 1d、14d、21d 亚组比较, ② $P<0.05$

表 4 额顶部上部皮质 EPO mRNA 的表达

($\bar{x}\pm s$)

组别	1d	3d	7d	14d	21d
假手术组	0.60 $\pm$ 0.09	0.62 $\pm$ 0.14	0.57 $\pm$ 0.11	0.64 $\pm$ 0.14	0.61 $\pm$ 0.11
缺血预处理组	0.62 $\pm$ 0.12	0.84 $\pm$ 0.08 ^{①②}	0.82 $\pm$ 0.12 ^{①②}	0.59 $\pm$ 0.10	0.61 $\pm$ 0.08

与假手术组比较, ① $P<0.05$; 缺血预处理组内比较, 3d、7d 亚组与 1d、14d、21d 亚组比较, ② $P<0.05$

3 讨论

研究表明, 缺血预处理的效果与其持续的时间有关, 预缺血时间过短不足以产生缺血耐受, 而时间过长则可引起神经损害, 即缺血预处理与其后诱导的缺血耐受作用之间存在着一个“剂量”反应曲线, 只有持续适当时间的短暂性脑缺血才能刺激机体发挥最大限度的神经保护作用^[6]。我们参照文献报道并经反复验证, 采用预缺血 10min 成功制作大鼠脑缺血耐受模型, 通过测定脑梗死体积来确定脑缺血耐受的产生, 结果显示 10min 的预缺血可以诱导其随后的脑缺血耐受^[7]。目前, 对预缺血诱导产生脑缺血耐受的最佳时间窗尚无定论, Chen 等^[8]研究显示, 分 3 次、每次 10min 的局灶性预缺血所诱导的脑缺血耐受最早出现于再灌注 2d 以后, 并可持续 5—7d, 我们的先期研究提示, 脑缺血耐受产生的最佳时间窗在 1—7d^[7], 与 Barone 等的观察结果基本一致^[9]。

HIF-1 与脑缺血关系密切, 在缺血/缺氧性脑损伤中发挥极其重要的作用。Sharp 等^[10]研究发现, 局灶性脑缺血发生 7.5h 后, mRNA 编码的 HIF-1 α 、葡萄

糖载体蛋白 1 及一些糖酵解酶在梗死周边区开始诱导出现, 19h 及 24h 时其表达被进一步上调, 可能由于半暗带的脑血流量下降, 减少了该区的氧供, 从而诱导 HIF-1 及其靶基因的产生。HIF-1 的激活有益于缺血组织的细胞存活, 可能与脑缺血预处理的保护机制有关。Bergeron 等^[11]研究也认为, 在急性局灶性脑缺血时 HIF-1 α 及相关基因表达上调促进了梗死灶周边血管网的重塑和糖酵解, 有助于缺血脑组织的存活。本研究显示, 缺血预处理组的 HIF-1 α mRNA 和蛋白自 3d 开始上调, 持续到 7d 后逐渐降低, 这与前述脑缺血耐受产生的时间窗基本吻合。提示预缺血可能通过上调 HIF-1 α 的表达和转录活性诱导脑缺血耐受。本研究还显示, HIF-1 α 蛋白主要表达于梗死周边区的缺血半暗带的神经元、神经胶质细胞以及部分血管内皮细胞管壁。由于半暗带脑血流量的减少降低了该区域氧的供应, 从而诱导对缺氧极其敏感的 HIF-1 α 的转录激活及相关靶基因的表达。Sharp 等^[12]研究发现, 在局灶性脑缺血中, HIF-1 α 表达区均出现血流量下降, 揭示脑缺血后

HIF-1 α 表达区域即是梗死周围慢性缺氧的区域。

EPO 最初被定义为受缺氧调节的造血生长因子,成人主要由肾脏分泌,调节血液中红细胞的生成。近来研究表明,在缺血、缺氧条件下,中枢神经系统可检测到脑源性 EPO 的表达,且有大量证据提示 EPO 具有神经活性^[13-14]。Dawson 等^[15]提出脑缺血预适应的效应可能是 EPO 介导的;Bernaudin 等^[16]研究发现,脑缺氧预适应的产生与脑源性 EPO 的表达密切相关,小鼠局灶性持续性脑缺血 12h,在梗死灶核心区未见 EPO 阳性细胞,12h 以后在梗死灶周边区可见 EPO 阳性神经元和星形胶质细胞,这与脑缺血耐受在时程上具有相关性^[13]。EPO 受体不仅可以在胶质细胞中检测到,而且在海马和皮质的神经细胞中发现^[17]。这些发现提示 EPO 作用于神经元通过一种旁分泌的方式,对局灶性和全脑梗死有保护作用。本实验结果显示,与假手术组比较,缺血预处理组在预缺血后 3d、7d 组的 EPO 蛋白表达增多,而相应的 1d、14d、21d 组之间比较无明显差别,证实 EPO 的表达变化与脑缺血耐受形成的时间基本一致(预缺血后 3—7d),提示 EPO 在脑缺血耐受中扮演了重要角色,10min 的预缺血可能通过 EPO 表达的分子机制参与了脑缺血耐受的产生。同时显示,各组中 EPO 蛋白表达主要分布在梗死周边区的神经元细胞、神经胶质细胞及少量血管内皮细胞,表明预缺血处理主要是通过梗死周边区的 EPO 表达上调,保护存活神经元,促进毛细血管再生,来参与脑缺血耐受的诱导。

研究表明,脑缺血时 EPO 的表达增加与 HIF-1 密切相关^[16],原因在于 EPO 为 HIF-1 的下游靶基因之一。在缺血缺氧条件下,脑组织局部很快出现 HIF-1, HIF-1 进入细胞核与 HIF-1 反应元件结合,启动 EPO 基因转录。但 HIF-1 α 并不是调控 EPO 生成的唯一因子,血管内皮生长因子等也可诱导 EPO 的生成。因此,脑缺血耐受形成中 EPO 表达的增加可能是多种因子作用的结果。

综上所述,在缺血预处理后诱发脑缺血耐受的相应时间窗内 EPO 和 HIF-1 α 的表达增加,提示 EPO 和 HIF-1 α 参与了脑缺血耐受形成的发生。

参考文献

[1] Blanco M, Lizasoain I, Sobrino T, et al. Ischemic preconditioning: a novel target for neuroprotective therapy [J]. Cerebrovasc

Dis, 2006, 21 (Suppl 2): 38—47.

- [2] Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, et al. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? [J]. Neurology, 2000, 54(11): 2089—2094.
- [3] Ruscher K, Freyer D, Karsch M, et al. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model [J]. J Neurosci, 2002, 22 (23): 10291—10301.
- [4] Prass K, Scharff A, Ruscher K, et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin [J]. Stroke, 2003, 34(8): 1981—1986.
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.
- [6] Chen J, Simon R. Ischemic tolerance in the brain [J]. Neurology, 1997, 48(2): 306—311.
- [7] 赵仁亮, 董瑞剑. 缺氧诱导因子-1 α 及促红细胞生成素在脑缺血耐受大鼠中的表达 [J]. 中国卒中杂志, 2007, 2(2): 102—107.
- [8] Chen J, Graham SH, Zhu RL, et al. Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1996, 16(4): 566—577.
- [9] Barone FC, White RF, Spera PA, et al. Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression [J]. Stroke, 1998, 29(9): 1937—1950.
- [10] Sharp FR, Ran R, Lu A, et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury [J]. Neuro Rx, 2004, 1(1): 26—35.
- [11] Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, et al. Role of hypoxia-inducible factors-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain [J]. Ann Neurol, 2000, 48(3): 285—296.
- [12] Sharp FR, Lu A, Tang Y, et al. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(7): 1011—1032.
- [13] 孙忠玲, 赵仁亮. 红细胞生成素对脑缺血损伤的保护作用 [J]. 国际脑血管病杂志, 2006, 14(5): 381—383.
- [14] Ferriero DM. Protecting neurons [J]. Epilepsia, 2005, 46(Suppl 7): 45—51.
- [15] Dawson TM. Preconditioning mediated neuroprotection through erythropoietin? [J]. The Lancet, 2002, 359(1): 96—97.
- [16] Bernaudin M, Nadelec AS, Divoux D, et al. 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 Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(4): 393—403.
- [17] Prass K, Scharff A, Ruscher K, et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin [J]. Stroke, 2003, 34(8): 1981—1986.