

· 基础研究 ·

促红细胞生成素对大鼠急性脊髓损伤后后肢功能及 NF- κ B 表达的影响赵 晔¹ 丁文元² 张 为² 李书奎¹

摘要 目的:探讨促红细胞生成素(EPO)对大鼠急性脊髓损伤后神经功能及 NF- κ B 表达的影响,为临床治疗急性脊髓损伤提供实验依据。**方法:**应用斜板试验、BBB 评分法、免疫组化方法对各组大鼠脊髓损伤后神经功能及脊髓组织内 NF- κ B 在各个时点表达变化进行观察,并进行比较。**结果:**两治疗组大鼠神经功能较损伤组明显提高($P<0.05$),MP 组较 EPO 组恢复缓慢($P<0.05$)。EPO 组有大量的 NF- κ B 表达,与损伤组比较无明显差异,MP 组 NF- κ B 表达明显低于 EPO 组及损伤组($P<0.05$)。**结论:**EPO 对大鼠急性脊髓损伤后 NF- κ B 表达无明显影响,对后肢体功能具有明显的改善作用,可有效促进神经功能恢复。

关键词 脊髓损伤;促红细胞生成素;NF- κ B;运动功能;甲基强的松龙

中图分类号: R49, R651.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-10-0904-04

The study of the effect of erythropoietin on motor function of hind limbs and the expression of NF- κ B after acute spinal cord injury in rats/ZHAO Ye, DING Wenyuan, ZHANG Wei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(10):904—907

Abstract Objective: To explore the effects of erythropoietin (EPO) on the progress of neural function's recovery and the expressions of NF- κ B in spinal cord after spinal cord injury (SCI) in rats, and provide experimental bases for clinical treatment of acute SCI. **Method:** 77 health mature male SD rats, weight (300±20)g, were randomized divided into four groups: normal control group, trauma model group (n=24), EPO treatment group, MP treatment group. The rat SCI model was established with Nystrom's method, the changes of neural functional recovery of rats of 4 groups were observed through tiltboard trail and BBB score method at different time points post-operation. The expression of NF- κ B were tested with immunohistochemistry technique. **Result:** The grade of nerve function was improved distinctly in two treatment groups, but EPO group was better than MP group. High level of NF- κ B expression could be detected after SCI in EPO group, with no difference with traumatic group. The expression of NF- κ B in MP group was higher than traumatic group and EPO group ($P<0.05$). **Conclusion:** There is a remarkable increase of NF- κ B expression in rats at early period after SCI while EPO has no significant effect on it. EPO can significantly improve the motor function of hind limbs in rats after SCI and accelerate recovery of neural function.

Author's address Dept. of Orthopaedics, The Central Hospital of Cangzhou, Hebei Province, 060001

Key words spinal cord injury; erythropoietin; NF- κ B; motor function; methylprednisolone

近来研究发现促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)除在造血系统方面的功效外,在中枢神经系统内也有广泛表达,大量研究证实重组 EPO(rhEPO)治疗缺血性脑病、脊髓缺血性损害等效果确切,对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)具有潜在的保护和治疗意义。核因子 κ B(nuclear factor, NF- κ B)是炎症反应的关键因子,脊髓损伤后短期内 NF- κ B 大量表达,特异性抑制其表达能够明显减弱脊髓组织炎症反应,但对于肢体功能改善与否争论不一。本实验主要观察 rhEPO 对于急性脊髓损伤大鼠后肢功能的影响及对 NF- κ B 表达的影响,并进一步探讨促红细胞生成素治疗急性脊髓损伤的疗效和可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组:选用相同条件下饲养的成年健康雄性 SD 大鼠 72 只,体重(300±20)g,由河北医科大学实验动物中心提供。随机分为 3 组:损伤组(n=24):损伤脊髓,使用生理盐水治疗;EPO 治疗组(n=24):损伤后使用 rhEPO 治疗;甲基强的松龙(methylprednisolone, MP)治疗组(n=24):损伤后使用 MP 治疗。

另取 5 只成年健康雄性 SD 大鼠,体重(300±20)g,作为空白对照组,仅切除椎板,不损伤脊髓,术

1 河北沧州市中心医院骨一科,060001

2 河北医科大学第三医院脊柱外科

作者简介:赵晔,男,硕士,住院医师

收稿日期:2007-02-25

后使用生理盐水治疗。

1.1.2 脊髓损伤模型的制备: 实验动物先在动物饲养室中适应 1 周, 1 周后观察动物均无异常表现, 精神、食欲良好。实验动物于术前 12h 禁食、水。采用 Nystrom 法^[1] 制备脊髓损伤模型。10% 水合氯醛 0.4ml/100g 腹腔注射麻醉后, 将大鼠俯卧固定于手术台上, 背部正中备皮, 无菌条件下进行背部中段正中切口, 以 T13 为中心, 显露 T12-L1 棘突、椎板及横突, 仔细咬除 T13 椎板及黄韧带, 暴露脊髓, 将 35g 自制标准重锤通过 2.5mm×5.0mm 弧形光滑金属垫片压迫于该段脊髓后正中, 时间为 5min, 致以中度脊髓损伤。术后每日人工挤压膀胱排尿 3 次至自主排尿。

1.2 给药方法

造模成功后, EPO 治疗组在伤后 15min 经尾静脉注射 rhEPO1000 U/kg BW (益比奥, 沈阳), MP 治疗组在伤后 15min 经尾静脉注射甲基强的松龙 30mg/kg BW (法玛西亚-普强公司产品), 空白对照组及损伤组经尾静脉推注生理盐水。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 大鼠后肢功能评价: 采用改良的 Rivlin 法^[2], 对脊髓损伤大鼠分别于术后 4h、8h、12h、1d、3d、5d、7d、14d 进行斜板倾斜角度的测定, 以观察大鼠的后肢功能恢复情况。

采用 BBB 评分法^[3], 分别于术后 4h、8h、12h、1d、3d、5d、7d、14d 由熟悉本实验评分标准的其他人员对评分进行测定并记录。

1.3.2 脊髓组织病理学观察: 术后各观测时间点进行功能评分后, 对各组大鼠麻醉下剖胸 (空白组于观察期末处死取材), 心脏插管, 灌注冰盐水约 200ml 冲洗 (至流出液澄清), 再用 4% 多聚甲醛缓冲液约 200ml 灌注固定, 解剖椎管取出损伤段脊髓, 再置于 4% 多聚甲醛液内进行后固定过夜, 脱水, 石蜡包埋, 取损伤中心部位约 5mm, 横切面以 5μm 厚度连续切片, HE 染色, 观察脊髓组织的形态、结构变化。

1.3.3 NF-κB 的免疫组化检测: 采用 SP 方法对所取标本进行免疫组化染色, 检测 NF-κB 的表达情况。SP 染色试剂盒购自北京中山公司, 按照说明进行操作, 以 PBS 代替一抗做阴性对照, 一抗工作浓度为 1:100。石蜡切片 5μm, 常规脱腊至水, 用 3% H₂O₂ 室温孵育 10min 灭活内源性过氧化物酶; 蒸馏水冲洗 3 次; 加入 1% BSA (正常小牛血清白蛋白) 室温封闭 20min; 滴加 1:50 稀释兔抗大鼠 NF-κBp65 单克隆抗体后 4℃ 过夜, PBS 冲洗 5min; 然后滴加生物素标记的羊抗兔 IgG 37℃ 1h, PBS 冲洗 5min; 滴

加 SP 复合物 37℃ 孵育 40min, PBS 冲洗 5min; 最后 DAB 显色, 苏木素复染 1min, 水洗, 1% 盐酸酒精分化, 脱水, 透明, 封固。

免疫阳性细胞呈棕黄色或棕褐色着色。每张切片在 400 倍光学显微镜下选 10 个不同视野, 采用全自动图像分析仪, HPIAS-2000 图像分析软件, 分别扫描记录阳性细胞的吸光度值, 取其平均值作为该切片的 NF-κB 相对含量。

1.4 统计学分析

应用 SPSS10.0 软件包进行统计处理, 各组数据采用均数±标准差表示, 行独立样本 *t* 检验对各组均数进行比较。

2 结果

实验期间损伤组大鼠死亡 1 只, EPO 治疗组死亡 1 只, MP 治疗组死亡 2 只, 空白对照组无死亡, 及时补充动物完成实验, 使每组实验动物保持一致。

2.1 组织学改变

空白组脊髓组织结构正常, 神经元形态完好, 尼氏小体清晰可见, 外周白质区轴突正常。损伤组表现为脊髓组织水肿、弥漫性出血, 囊腔及空泡形成, 神经元变性, 乃至消失, 尼氏小体分辨不清, 周围大量炎症细胞浸润, 瘢痕增生, 轴索退变, 轴索与髓鞘之间空隙加大。两治疗组组织破坏程度较轻, 炎症反应明显减弱, 其中 EPO 组较 MP 组神经元丰富, 结构清晰 (图 1, 见前置彩色插页 8)。

2.2 大鼠后肢功能评价

空白对照组大鼠神经功能稳定, 运动正常。损伤组大鼠双后肢软瘫、肌张力低、感觉丧失, 排尿需人工按压。术后 1d 出现后肢无运动或仅有关节轻度运动, 随着时间的延长逐渐开始恢复运动功能。两治疗组大鼠后肢神经功能较损伤组明显提高、恢复较快。其中, EPO 组较 MP 组恢复更早、更迅速 (表 1—2)。

2.3 NF-κB 免疫组化检测结果

空白对照组仅见极少量的 NF-κB 阳性细胞。损伤组大鼠伤后 4h NF-κB 已有明显表达, 12h 达最高峰 (图 2, 见前置彩色插页 8)。EPO 组伤后也显示有大量的 NF-κB 表达, 其余各时间点表达量与损伤组无明显差异 ($P>0.05$)。MP 组大鼠伤后也有明显的 NF-κB 表达, 但表达量明显低于损伤组及 EPO 组 ($P<0.05$) (表 3)。

3 讨论

EPO 是一种相对分子质量为 30000—39000 的糖蛋白, 能够增加血液红细胞数, 使血氧饱和度、血

表 1 各时间点的临界角度值 ($\bar{x} \pm s$)

时间点	空白对照组	损伤组	EPO 治疗组	MP 治疗组
	62.00±2.12			
伤后 1d		21.33±1.15	26.00±1.73	22.67±1.15
3d		23.33±1.53	30.00±2.00 ^①	27.00±2.00
5d		24.00±1.00	35.33±2.51 ^②	30.67±2.08 ^②
7d		27.33±2.52	44.33±3.06 ^②	33.00±1.73 ^{①④}
14d		30.00±3.00	51.00±1.73 ^②	35.67±1.15 ^{①④}

与损伤组相比:① $P<0.05$, ② $P<0.01$;与 EPO 组相比:③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$ 表 2 各时间点的 BBB 评分值 ($\bar{x} \pm s$)

时间点	空白对照组	损伤组	EPO 治疗组	MP 治疗组
	21			
伤后 1d		0.33±0.58	4.00±1.00 ^②	2.33±0.58 ^①
3d		2.33±1.15	8.67±0.58 ^②	3.33±1.53 ^{①④}
5d		4.00±1.00	11.33±1.15 ^②	5.33±1.53 ^{①④}
7d		6.33±1.15	16.00±1.00 ^②	9.67±0.58 ^{①④}
14d		8.67±0.58	18.00±1.00 ^②	13.67±1.15 ^{②④}

与损伤组相比:① $P<0.05$, ② $P<0.01$;与 EPO 组相比:③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$ 表 3 各时间点脊髓组织内 NF- κ B 表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

时间点	NF- κ B 阳性细胞吸光度 (%)			
	空白对照组	损伤组	EPO 治疗组	MP 治疗组
	4.85±0.04			
伤后 4h		30.09±0.53	29.44±0.45 ^①	22.12±0.30 ^②
8h		40.18±0.99	39.32±0.95	29.87±0.56 ^②
12h		55.69±0.55	54.43±0.63	42.95±1.01 ^②
1d		34.65±0.39	32.02±1.47	23.97±0.56 ^②
3d		22.48±0.52	21.54±0.43	11.14±0.26 ^②
5d		15.38±0.41	14.83±0.23	4.92±0.09 ^②
7d		4.93±0.05	4.97±0.08	4.90±0.09 ^①

与损伤组相比:① $P<0.05$, ② $P<0.01$

氧含量增加。近年来的研究表明,中枢神经系统中的星形胶质细胞、神经细胞、内皮细胞均能产生 EPO 和表达 EPO 受体, EPO 具有神经营养、神经保护和促进神经发育的作用。本研究应用的重组促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rHu-EPO) 自 1985 年问世以来,临床上已大量应用治疗贫血。它是一种通过基因重组 DNA 技术生产的、含有与天然分离的 EPO 完全相同氨基酸序列的糖蛋白,生物学活性也极为相似,并能够很好地通过血-脑脊液屏障发挥治疗作用。实验表明,促红细胞生成素对于不同类型的脊髓损伤均具有保护作用^[4-5]。本实验结果显示, EPO 能够有效改善脊髓损伤大鼠的后肢功能,减少神经组织病理改变,其效果优于 MP。

目前对 EPO 的神经保护机制尚未完全明确,但实验证实主要存在以下机制:①对循环的调节作用;②抗凋亡作用;^[6-7]③抑制炎症反应;^[8]④抑制兴奋性氨基酸介导的细胞毒作用;⑤神经营养作用;^[9]

自从 1986 年 Sen 和 Baltimore 首次发现 NF- κ B 以来,NF- κ B 被认为是普遍存在于细胞质中的一种快反应转录因子,它可以被许多刺激剂激活,激活的 NF- κ B 转入核内与靶基因启动子或增强子上的 B 基序结合,同时与其他的 DNA 结合蛋白一起共同调节这些基因的转录活性。NF- κ B 调节的蛋白包括:细胞因子、黏附分子、趋化因子、生长因子、免

疫受体、转录因子、氧化应激相关酶以及急性期蛋白等^[10]。所以,NF- κ B 参与多种生理或病理过程,如:炎症和免疫反应、某些疾病的病理过程、急性期反应、细胞凋亡、细胞周期控制与分化,以及对病毒感染的反应等。NF- κ B 广泛存在于大脑皮质海马、小脑突触和脊髓的神经元、神经胶质细胞与血管内皮细胞中。NF- κ B 的表达与中枢神经系统(CNS)的信号传导有关,活化的 NF- κ B 由轴突逆行性运输进入细胞核内发挥生物学作用,在 CNS 中起到信号转导作用^[11-12]。

脊髓损伤时,可激活胶质细胞、神经细胞、血管内皮细胞上的 NF- κ B,引起 NF- κ B 活化。一旦被激活,NF- κ B 早期即在转录水平调控一系列免疫、炎症相关基因的表达,诱导多种炎性因子^[13]。包括甲基强的松龙在内的多种治疗脊髓损伤的药物均对 NF- κ B 的表达起到了明显的抑制作用。人们越发认为抑制 NF- κ B 的活性表达及炎症反应成为治疗脊髓损伤的关键。但是,随着人们对 NF- κ B 的进一步深入研究,发现 NF- κ B 的活化并非单纯起到介导损伤的作用,其作用非常广泛,还具有抗凋亡的保护性作用。有研究表明,NF- κ B 活化又可介导细胞保护反应,诱导抗凋亡蛋白表达,包括 Bcl-2、Bcl-x、锰过氧化物歧化酶、钙结合蛋白等阻止凋亡,保护神经元,抵抗氧化和代谢损伤及因营养因子病理性减少引起的细胞死亡。所以,我们推测 SCI 后 NF- κ B 的活性表达是机体的一种反射性保护机制,尽管它会通过转录各种生物大分子加重损伤区域的炎症反应,早期抑制 NF- κ B 活性表达可以暂时性降低炎症反应,起到保护神经细胞的作用,但从长远看来,会导致损伤后期各种细胞凋亡数量的增加,脊髓神经细胞延迟性脱髓鞘变性,对神经功能恢复产生不利影响。

本实验设计的主要目的就是,结合后肢功能的变化,研究 EPO 对 SCI 后 NF- κ B 表达的影响,从分子水平进一步明确 NF- κ B 的变化情况,以此揭示 EPO 治疗 SCI 的可能机制。实验结果显示,EPO 及 MP 均能够促进 SCI 后大鼠的后肢功能恢复,但是 EPO 组治疗效果明显优于 MP 组。在 NF- κ B 表达情况方面,MP 明显抑制了其活性表达,表达量明显低于 EPO 组及损伤组,而 EPO 组并未对 NF- κ B 含量产生明显影响,变化与损伤组基本一致,由此可见抑制 NF- κ B 表达并未对肢体功能恢复产生有利影响,可见 EPO 并不同于 MP,它不是通过抑制 NF- κ B 表达来发挥神经保护作用的,由于 EPO 作用广泛复杂,推测这可能是 EPO 治疗 SCI 的重要机制之一。

本实验显示,EPO 对于脊髓损伤后肢体功能恢

复具有良好的治疗效果, 在治疗机制上与以往的治疗药物有所不同, EPO 对脊髓损伤后 NF- κ B 表达不产生明显影响, 这可能是 EPO 用于治疗脊髓损伤的重要机制之一。鉴于对 EPO 神经保护作用认识时间较短, 对慢性脊髓损伤(如: 脊髓型颈椎病等)及 SCI 后晚期脊髓功能修复方面的作用尚不明, 有待进一步研究。在有效治疗剂量方面也无确切报告, 虽然应用 EPO 可能会产生红细胞增多症、血压增高等不良反应, 但由于其神经保护作用明确, 已有学者呼吁将是 EPO 进入临床试验的时候了。

参考文献

- [1] Nystrom B, Berglund JE, Bergquist E. Methodological analysis of an experimental spinal cord compression model in the rat[J]. Acta Neurol Scand, 1998, 78(2): 460—463.
- [2] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat[J]. J Neurosurg, 1977, 47(4): 577—581.
- [3] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1—21.
- [4] Gorio A, Cokmen 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.
- [5] Kaptanoglu 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.
- [6] Siren A L, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(7): 4044—4049.
- [7] Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2258—2263.
- [8] Villa P, Bigini P, Mennini T, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis[J]. J Exp Med, 2003, 198(6): 971—975.
- [9] Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and Nf κ B signalling cascades[J]. Nature, 2001, 412(2): 641—647.
- [10] Nan L, Wu Y, Bardag-Gorce F, et al. The p105/50 NF- κ B pathway is essential for Mallory body formation[J]. Exp Mol Pathol, 2005, 78(3): 198—206.
- [11] Hewson QD, Lovat PE, Corazzari M, et al. The NF- κ B pathway mediates fenretinide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. Apoptosis, 2005, 10(3): 493—498.
- [12] Hu X, Nesic-Taylor O, Qiu J, et al. Activation of nuclear factor- κ B signaling pathway by interleukin-1 after hypoxia/ischemia in neonatal rat hippocampus and cortex[J]. J Neurochem, 2005, 93(1): 26—37.
- [13] Jimi E, Phillips RJ, Rincon M, et al. Identification of a novel blocker of I κ B kinase that enhances cellular apoptosis and inhibits cellular invasion through suppression of NF- κ B regulated gene products[J]. J Immunol, 2005, 174(11): 7383—7392.

广东省康复医学会、广东社会学会健康研究专业委员会 2007 年学术年会征文及会议通知

广东省康复医学会、广东社会学会健康研究专业委员会 2007 年学术年会定于 2007 年 11 月 23—25 日在广州举行。会议期间, 将邀请海内外知名的康复专家讲授国际最新的医疗及康复技术, 同时举办形式不同的学术交流, 组织国内外最新、最实用的多种康复器械和设备展, 供会议代表参观、选购。现将会议有关事宜通知如下:

一、会议主题: 关注社区医疗卫生服务, 拓展医院康复服务之路

二、会议形式: 专题报告、卫星会议、论文交流、专业设备展示

三、会议部分专题: ①我国社区卫生服务政策解读(北京市卫生局常务副局长 梁万年教授); ②社区康复在社区卫生服务工作中的作用(中国康复医学会副会长 卓大宏教授); ③香港社区医疗及社区康复(香港复康会项目总监 Sheila Purves 教授); ④关注社区居民生殖健康(《人之初》杂志社总编 董玉整教授); ⑤如何在社区开展作业治疗(国际作业治疗师联盟主席 Kit Sinclair 教授)。

四、征文内容: 凡与社区医疗、医院康复、社区康复有关的基础、临床、教育、管理等方面的文章均可投稿, 欢迎全国各省市及港、澳、台等地区的同行投稿!

五、征文要求: ①论文必须具有科学性、先进性和实用性, 未在公开发行人刊物上发表的文章。征文以 1000 字论文摘要为限, 格式按科技期刊的要求, 文责自负; 用 word 文档打印, 附个人简历, 包括作者姓名、工作单位、详细地址、邮编和通讯方式。欢迎通过电子邮件投递, 邮寄请附软盘。②论文截止日期: 2007 年 10 月 10 日, 以邮戳为准, 过期者不载入会议论文汇编。无文章参加会议者, 请与本会联系。③来稿请寄: 广东省广州市沿江西路 107 号(中山二院)广东省康复医学会, 邮编: 510120。E-mail: garm@vip.163.com, 联系人: 万秘书, 电话/传真: 020-81332880。