

面神经损伤后 rhEPO 对面运动神经元的保护作用

代喻兵¹ 骆文龙^{1,4} 陈红江² 聂江华³ 方黎¹ 赖晓霏¹ 李晶兢¹

摘要 目的:观察重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)对大鼠受损面神经的保护作用及对 Caspase-3 表达的影响。方法:75 只雌性大鼠随机分为 rhEPO 治疗组(n=25)、对照组(n=25)、假手术组(n=25),50 只大鼠建立左侧面神经干损伤动物模型,rhEPO 组大鼠致伤后即刻及每天腹腔内注射 rhEPO(5000U/kg),连续两周,对照组给予等量生理盐水。分别于第 3、7、14、21、28 天采用 Toluidine blue 染色计算面神经元存活率,TUNEL 检测细胞凋亡,免疫组化检测 Caspase-3 的表达。结果:从伤后第 7 天开始治疗组和对照组左侧面神经元存活率逐渐下降,每个时间点治疗组面神经元存活率明显高于对照组($P<0.05$);治疗组与对照组在伤后第 3 天未见 TUNEL 染色阳性细胞,对照组第 7 天见表达,第 14 天数量达高峰,治疗组在伤后第 7、14、21 天面神经元凋亡细胞数显著减少($P<0.05$);伤后第 3 天对照组见 Caspase-3 表达增加,第 14 天达高峰,第 28 天仍见少许表达,治疗组在各时间点 Caspase-3 表达均明显低于对照组($P<0.05$)。结论:rhEPO 对受损大鼠面神经元有保护作用;降低 Caspase-3 的表达、抑制细胞凋亡可能是 rhEPO 治疗创伤性面瘫的重要机制。

关键词 面神经;运动神经元;促红细胞生成素,重组;凋亡

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-06-0491-04

Neuroprotective effect of rhEPO on facial motoneurons after facial nerve injury in rats/DAI Yubing, LUO Wenlong, CHEN Hongjiang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(6):491-494

Abstract **Objective:** To observe the neuroprotective effect of rhEPO on injured facial motoneurons (FMNs) and its impact on the expression of Caspase-3. **Method:** The rat models of facial nerve injury were established by crushing main trunk of left facial nerve. Seventy-five female rats were randomly divided into 3 groups: rhEPO treatment group (treated with rhEPO 5000U/kg ip once a day following injury for two weeks, n=25), control group (treated with the same dose of normal saline ip once a day following injury for two weeks, n=25), sham operation group (n=25). Rats were sacrificed on the 3rd, 7th, 14th, 21st, 28th d after injury. The survival rates of FMNs after facial nerve injury were studied by Toluidine blue staining. The apoptotic cells of injured FMNs were detected by TUNEL staining. The expression of Caspase-3 were detected by immunohistochemistry method. **Result:** The survival rates of FMNs both in rhEPO treatment group and control group decreased gradually from the 7th d to 28th d, the survival rates of FMNs at each time point in rhEPO treatment group were significantly higher than that in control group ($P<0.05$). TUNEL-positive cell wasn't observed on the 3rd d after injury both in rhEPO treatment group and control group, but was noted on the 7th d after injury and its number peaked on the 14th d in control group. The apoptotic cell numbers in the rhEPO treatment group were significantly lower than that in control group from 7d to 21d ($P<0.05$). The expression of Caspase-3 increased 3d after injury and peaked at 14d in control group. The expression level of Caspase-3 in rhEPO treatment group was significantly lower than that in control group at each time point ($P<0.05$). **Conclusion:** rhEPO can effectively protect facial motoneurons and reduce the expression of Caspase-3 after facial nerve injury; inhibition of apoptosis and decreased expression of Caspase-3 by rhEPO may be an important mechanism for treatment of traumatic facial paralysis.

Author's address Department of Otorhinolaryngology-Head & Neck Surgery, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010

Key words facial nerve; motoneurons; erythropoietin; recombinant; apoptosis

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是控制红细胞生成的造血细胞因子,一直被用于治疗贫血,近期研究发现 EPO 是一种多功能的营养因子, EPO 及受体在神经系统有广泛表达, EPO 及重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)能抑制大鼠脊髓损伤和大脑创伤引起的运动神经元

1 重庆医科大学附属第二医院耳鼻喉-头颈外科, 重庆, 400010

2 重庆市第三人民医院耳鼻喉-头颈外科

3 重庆市长寿区人民医院放射科

4 通讯作者:骆文龙(重庆医科大学附属第二医院耳鼻喉-头颈外科, 400010)

作者简介:代喻兵,男,硕士,住院医师

收稿日期:2008-02-29

凋亡,并能改善运动功能^[1-2],发挥神经营养和保护作用。目前国内外研究 EPO 在神经损伤中的作用主要是针对中枢系统的,而在外周神经方面的研究实属罕见。本研究观察大鼠面神经损伤后 rhEPO 对面运动神经元的存活和 Caspase-3 表达的影响,以探讨 rhEPO 对创伤性面瘫的神经保护作用及可能机制,以求为外周神经损伤治疗提供新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

成年健康雌性 SD 大鼠 75 只,体重(220±10)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,应用随机数字表分为 3 组(n=25):rhEPO 治疗组、对照组、假手术组,每组均再随机分为损伤后 3、7、14、21、28d 组,每组 5 只大鼠。rhEPO 注射液为沈阳生产,国药准字 S20010001。实验试剂:甲苯胺蓝由 Sigma 公司生产、原位末端标记(TUNEL)凋亡检测试剂盒由罗氏公司生产、SP-9001 RABBITSP 免疫组织化学染色试剂盒由北京生产、一抗 Caspase3 (CPP32)Ab-4 由 NEOMARKERS 公司生产。

1.2 方法

用 10%水合氯醛 3.5ml/kg 大鼠腹腔注射麻醉,面神经损伤动物模型的建立参照任国山等^[3]和李雷激等^[4]建模方法并作改动,rhEPO 治疗组和对照组暴露左侧茎乳孔,游离面神经,于面神经出茎乳孔后刚发出耳后支的远端,用蚊式钳钳夹面神经干长约 2mm,力量为三扣,持续 60s,松开 30s,再钳夹 60s,手术显微镜观察面神经损伤程度均为束膜性神经中断,符合 Sunderland 损伤 IV 度;假手术组只暴露左侧茎乳孔而不损伤神经,缝合皮肤。按时间分批次制造模型,右侧为自身对照,各组大鼠标记后混合饲养。rhEPO 治疗组损伤后立即腹腔注射 rhEPO 5000U/kg,每天 1 次,连续 14d;对照组腹腔注射等量的生理盐水。

1.3 取材

用水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,采用经左心室插管,升主动脉快速灌注 37℃生理盐水 150ml 至肝脏变白,立即用 4℃ 4%多聚甲醛 PBS 液 350ml 灌注固定,先快后慢,直至动物四肢僵硬,开颅取脑干,以小脑桥延沟为中心,左右水平切取约 2mm 厚的脑组织块,放置于 4%的多聚甲醛中固定过夜,石蜡包埋后依据大鼠脑立体定位图谱^[5]定位面神经核横断面以 5μm 连续切片,每间隔 10 张取一张切片,共收集三套切片,每套均为 18 张切片,分别用于作甲苯胺蓝染色、Caspase-3 免疫组化及凋亡检测。

1.4 主要观察指标

①甲苯胺蓝染色:光学显微镜下面神经核团内存活神经元记数,得出左侧和右侧面神经核团内存活神经元之比,即左侧神经核团内存活神经元存活率;②原位末端染色检测凋亡细胞:光学显微镜下左侧面神经核团内存活神经细胞记数;③Caspase-3 免疫组化染色:测定左侧面神经核团光密度值。

1.4.1 甲苯胺蓝染色:脱蜡至水,0.3%甲苯胺蓝染色 10h,95%酒精稍洗,脱水,二甲苯透明封片。面运动神经元的记数方法:面神经元胞体直径大小约 20μm,尼氏体染色均匀,或胞核、核仁明显位于胞体中央者均在记数范围内,但因本实验中未损伤面神经耳后支,因此发出耳后支纤维的面神经核内侧亚核不属于分析范围。面神经核团内神经元(FMNs)在 Olympus 显微镜(×200)下进行。每只动物随机取 4 张切片计算左右两侧面神经核团中运动神经元的数目,得出运动神经元数目的左右侧之比。

1.4.2 TUNEL 检测:按照 TUNEL 凋亡细胞检测试剂盒说明书操作,随后 DAB 呈色,常规脱水、透明、封片,显微镜下观察每组中每只动物选 5 张切片,每张切片在伤侧面神经核计数 5 个高倍镜视野(×400),取平均值,为该切片凋亡细胞数。

1.4.3 Caspase-3 免疫组化检测:每只动物随机取 4 张切片按 SP 法进行免疫组化染色,一抗 1:200 比例稀释后滴加,DAB 染色,按照说明书步骤操作。阳性结果以胞浆或胞核内出现棕黄色染色为准。利用 Image pro plus 6.0 图像分析软件分析处理每张切片,计算左侧面神经元的平均光密度值(A)。

1.5 统计学分析

所有数据以均数±标准差表示,采用 SPSS12.0 统计软件进行分析,进行组间 *t* 检验分析。以 *P*<0.05 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大体观察

正常情况下,大鼠触须向前竖起并有节律性地拂动,能完全闭眼。损伤后所有动物进食、活动正常,伤后 1 周,两组动物左侧触须集中伸直并向后伸展呈倒伏状,完全不能拂动,无闭眼动作,呈现完全性面瘫。伤后第 18 天对照组动物左侧触须仍倒伏,轻微拂动,无闭眼动作,伤后第 28 天左侧触须部分倒伏,有节律性地拂动,动度和速度明显低于正常侧,不能完全闭眼。伤后第 14 天 rhEPO 治疗组动物左侧触须仍倒伏,轻微拂动,有上睑轻微闭眼动作,伤后第 28 天,触须向前恢复竖起,有节律性地拂动,动

度和速度接近正常侧,能完全闭眼。

2.2 甲苯胺蓝染色

大鼠的面神经核位于脑桥的腹外侧区, 正常面运动神经元胞体较大, 直径约 20—25 μm , 呈三角形或星型, 胞膜完整、光滑。胞核大、居中, 经甲苯胺蓝染色后呈淡蓝色, 核仁明显、居中呈紫蓝色, 胞质中见尼氏体染色均匀呈紫蓝色 (图 1A)。对照组和

rhEPO 治疗组伤后第 3 天均见细胞形态不规则, 核仁偏移。第 7 天后胞体体积变小, 染色加深, 胞核皱缩, 第 14 天后存活细胞数量逐渐减少, 对照组面神经元减少较治疗组明显 ($P<0.05$) (图 1B, 图 1C), 第 28 天细胞形态接近正常, 胞质染色较低, 核仁回归中位, 面神经元的存活情况见表 1。

2.3 TUNEL 染色检测

表 1 面神经损伤后不同时间点左侧面运动神经元的存活率

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

组别	鼠数	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
假手术组	25			99.04 $\pm$ 5.65		
对照组	25	96.53 $\pm$ 4.30	89.17 $\pm$ 2.24 ^①	79.23 $\pm$ 2.71 ^①	73.78 $\pm$ 1.81 ^①	70.64 $\pm$ 1.43 ^①
治疗组	25	96.04 $\pm$ 2.06	93.21 $\pm$ 1.39 ^{①②}	88.62 $\pm$ 1.75 ^{①②}	86.10 $\pm$ 1.49 ^{①②}	84.19 $\pm$ 1.07 ^{①②}

①与假手术组比较 $P<0.05$; ②与对照组比较 $P<0.05$

TUNEL 阳性细胞核被染成棕褐色, 假手术组左侧面神经核、对照组和 rhEPO 治疗组损伤后第 3 天均未见阳性表达。对照组第 7 天见 TUNEL 阳性表达, 于第 14 天达到高峰, 阳性细胞最多 (图 2), 于 28d 仍可见少量阳性细胞表达, rhEPO 治疗组和对照组

TUNEL 阳性表达时间变化一致, 但从第 7 天开始 rhEPO 治疗组较对照组表达水平低 ($P<0.05$), 表 2。

2.4 Caspase-3 免疫组化检测

Caspase-3 阳性表达为棕黄色。假手术组左侧面神经核未见 Caspase-3 阳性表达。对照组在第 3 天时见少量的表达, 于第 14 天达到高峰, 阳性细胞数量最多, 染色最深, 随后表达逐渐降低, rhEPO 治疗组和对照组 Caspase-3 阳性表达时间变化一致, 但表达水平 rhEPO 治疗组较对照组低 ($P<0.05$, 表 3)。

表 2 各组左侧面神经核 TUNEL 阳性细胞记数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	伤后不同时间点			
		第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
对照组	20	2.6 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 1.5	4.3 $\pm$ 1.7	1.3 $\pm$ 0.3
治疗组	20	1.7 $\pm$ 0.6 ^①	3.8 $\pm$ 1.2 ^①	2.1 $\pm$ 0.8 ^①	0.5 $\pm$ 0.2 ^①

①与对照组比较 $P<0.05$

表 3 各组 Caspase-3 平均光密度值比较

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

组别	鼠数	伤后不同时间点				
		第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
假手术组	25			0.08 $\pm$ 0.01		
对照组	25	0.14 $\pm$ 0.01 ^①	0.21 $\pm$ 0.01 ^①	0.30 $\pm$ 0.01 ^①	0.19 $\pm$ 0.01 ^①	0.17 $\pm$ 0.01 ^①
治疗组	25	0.12 $\pm$ 0.01 ^{①②}	0.15 $\pm$ 0.01 ^{①②}	0.22 $\pm$ 0.01 ^{①②}	0.14 $\pm$ 0.01 ^{①②}	0.10 $\pm$ 0.01 ^{①②}

①与假手术组比较 $P<0.05$; ②与对照组比较 $P<0.05$



图 1A 右侧正常面神经元胞体较大, 胞膜完整, 胞核淡蓝色, 胞质紫蓝色

(甲苯胺蓝染色, $\times 100$)



图 1B 面神经干伤后 14d, 对照组较假手术组左侧面神经元数量减少, 胞体体积变小, 胞浆浓缩, 染色加深

(甲苯胺蓝染色, $\times 100$)



图 1C 面神经干伤后 14d, 治疗组较对照组左侧面神经元数量增多, 神经元变性轻

(甲苯胺蓝染色, $\times 100$)



图 2A 面神经干伤后 14d, 对照组左侧面神经核内见较多 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞核

(DAB 显色, $\times 400$)



图 2B 面神经干伤后 14d, 治疗组左侧面神经核内 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞核较对照组减少

(DAB 显色, $\times 400$)

3 讨论

面神经损伤后的功能修复最主要取决于神经元的存活和轴突的延伸,其中神经元胞体的存活是前提。面神经损伤后,远端靶肌肉来源的神经营养因子向神经元胞体逆行性轴浆的转运发生障碍,神经元产生变性,赵莉等^[9]研究发现,大鼠面神经挤压伤后有一定程度上运动神经元死亡。凋亡是一个可调控的细胞死亡过程,参与了面神经损伤后运动神经元的死亡^[7]。现有诸多细胞因子,如神经生长因子、神经营养因子、肝细胞生长因子等通过抑制受损的面神经元凋亡,而发挥神经保护作用,但是目前仍未见上述细胞因子满意地运用于面神经损伤的临床治疗,因此有必要寻求新的药物治疗。

EPO 是一种大分子糖蛋白,以往认为不能穿过血脑屏障,目前证实 EPO 及 rhEPO 在无任何神经损伤的情况下能透过血脑屏障,并在神经损伤的情况下这种通透性将会增加^[8-9]。研究发现 EPO 在脑、脊髓的缺血、外伤等损伤中的作用并不依赖于红细胞的增加,而是通过抗凋亡直接发挥保护神经元的作用^[10]。成年大鼠视神经不完全伤后 rhEPO 连续行腹腔注射,发现明显的抑制视网膜神经节凋亡,促进视功能的恢复^[11]。

本实验研究采用大鼠面神经干挤压伤的方式建立创伤性面瘫动物模型,和临床中肿瘤压迫、外伤和医源性面神经损伤接近。甲苯胺蓝作神经元尼氏体染色显示左侧面运动神经元存活率随时间延长逐渐降低,伤后第 28 天面运动神经元存活率 70.64%,与赵莉等^[9]实验结果相符合。并且 TUNEL 技术检测到左侧面神经运动神经元有阳性细胞,提示严重的面神经干挤压伤存在面运动神经元凋亡,免疫组化检测面神经核内 Caspase-3 表达明显升高。实验中运用大剂量 rhEPO5000U/kg·d 干预面神经受损的大鼠,治疗组较对照组面神经元凋亡数量明显减少,从伤后 7d 开始较对照组面运动神经元存活率增高,尼氏体数量增加和分布均匀,伤后 28d 面运动神经元存活率为 84.19%,与对照组比较有显著统计学差异 ($P<0.05$),说明 rhEPO 对面神经干损伤后面神经元凋亡有明显抑制作用,起到保护面神经元的作用。治疗组较对照组面神经元 Caspase-3 表达明显受到抑制。本实验提示 rhEPO 治疗组面神经元凋亡、存活率与 Caspase-3 表达在时间上有一致性。Caspases 家族蛋白的激活是参加细胞凋亡的重要环节,而 Caspase-3 是半胱氨酸蛋白酶级联反应的必经通路,最终执行细胞凋亡^[12],Vanderluit 等^[13]也发现在面神经损伤后有 Caspase-3 的激活参与了面神经元的凋

亡,并通过敲除 Caspase-3 基因降低神经元死亡数量。rhEPO 可能是通过抑制 Caspase-3 酶不被激活,从而抑制凋亡信号转导抗细胞凋亡的作用。通过本实验研究,发现 rhEPO 对面神经损伤后面运动神经元有明显的保护作用,其主要机制与抑制 Caspase-3 表达、减少神经元凋亡有关。

EPO 最主要的作用是促进红细胞生成,长期、大量的用药将会导致红细胞压积增加、血液黏稠、血栓形成、高血压,甚至体内产生中和性抗 EPO 抗体,导致纯红细胞再生障碍性贫血。目前已研制出 EPO 缺乏唾液酸基的衍生物,无红细胞生成作用,但保留了 EPO 对神经作用的特点。EPO 的神经保护作用为外周是神经损伤修复提供了新的思路,能使其有广阔的研究和临床应用前景。EPO 在外周神经损伤中的保护和促进神经再生作用机制还有待进一步的研究,期待 EPO 或 EPO 的衍生物能成功地运用于临床治疗面瘫。

参考文献

- [1] Arishima Y, Setoguchi T, Yamaura I, et al. Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats[J]. *Spine*, 2006,31(21):2432—8.
- [2] Liao ZB, Zhi XG, Shi QH, et al. Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats [J]. *Eur J Neurol*, 2007,18. [Epub ahead of print]
- [3] 任国山,赵长义,张喜平,等.面神经在不同功能状态下所需神经元的定量分析[J]. *中国临床康复*, 2005,9(25):40—41.
- [4] 李雷激,骆文龙,伍宗惠,等.面神经损伤后面神经核中黏附分子 CD44 表达与穴位电针刺激的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007,11(27):5369—5373.
- [5] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社,1991.76—84.
- [6] 赵莉,关宿东,单增强,等. GDNF 基因体内转染对大鼠面神经损伤后的修复作用 [J]. *中国康复医学杂志*, 2007,22(9):785—786,789.
- [7] de Bilbao F, Dubois-Dauphin M. Time course of axotomy-induced apoptotic cell death in facial motoneurons of neonatal wild type and bcl-2 transgenic mice [J]. *Neuroscience*, 1996,71(4):1111—1119.
- [8] Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(19):10526—10531.
- [9] Juul SE, McPherson RJ, Farrell FX, et al. Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin[J]. *Biol Neonate*, 2004,85(2):138—44.
- [10] Grasso G, Sfacteria A, Meli F, et al. The role of erythropoietin in neuroprotection: therapeutic perspectives [J]. *Drug News Perspect*, 2007,20(5):315—320.
- [11] 牛建军,王一,曾玉晓,等.重组人促红细胞生成素对视神经不完全损伤后视网膜神经元的保护作用 [J]. *眼科新进展*, 2007,27(7):501—504.
- [12] Gupta S, Knowlton AA. HSP60, Bax, apoptosis and the heart [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(1):51—58.
- [13] Vanderluit JL, McPhail LT, Fernandes KJ, et al. Caspase-3 is activated following axotomy of neonatal facial motoneurons and caspase-3 gene deletion delays axotomy-induced cell death in rodents[J]. *Eur J Neurosci*, 2000,12(10):3469—3480.