

促红细胞生成素对大鼠创伤性脑损伤保护作用的研究

原睿智¹ 张新定^{1,2} 冯 伟¹ 韩 广¹ 韩彦明¹ 周旺宁¹ 程得均¹ 冯广才¹

摘要 目的:探讨促红细胞生成素(EPO)对大鼠创伤性脑损伤(TBI)后血脑屏障、脑水肿、脑损伤体积和血清神经元特异性烯醇化酶(NSE)的影响。方法:应用 Feeney 法制作大鼠创伤性脑损伤实验模型。选取 72 只成年 Wistar 大鼠,随机分成假手术组(24 只)、对照组(24 只)和 EPO 治疗组(24 只)。制模成功 48h 后通过测定脑组织伊文思兰(EB)含量观察血脑屏障(BBB)的破坏程度、干湿重法测脑水含量、TTC 染色法测定脑损伤体积。24h 时放免法测定血清 NSE 含量。结果:EPO 治疗组 BBB 破坏程度($67.3 \pm 13.1 \mu\text{g/g}$)与对照组($182.8 \pm 15.9 \mu\text{g/g}$)相比显著减轻($P < 0.01$)。EPO 治疗组脑水肿($80.6\% \pm 0.2\%$)较对照组($91.8\% \pm 0.6\%$)明显减轻($P < 0.01$)。EPO 治疗组脑损伤体积($17.9 \pm 4.0 \text{mm}^3$)较对照组($37.7 \pm 3.8 \text{mm}^3$)明显变小($P < 0.01$)。EPO 组血清 NSE 水平($6.28 \pm 3.37 \text{ng/ml}$)也较对照组($10.02 \pm 1.50 \text{ng/ml}$)显著降低($P < 0.05$)。结论:EPO 能维持血脑屏障的完整性,缩小脑损伤体积,减轻脑水肿和神经元的损害。

关键词 促红细胞生成素;创伤性脑损伤;血脑屏障;脑水肿;神经元特异性烯醇化酶

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-11-1025-03

The study of neuroprotection about erythropoietin on traumatic brain injury in rats/YUAN Ruizhi, ZHANG Xinding, FENG Wei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(11): 1025—1027

Abstract Objective: To explore the effectiveness of erythropoietin (EPO) administration on blood-brain barrier (BBB), brain edema, brain injury volume and NSE levels in serum after TBI in rats. **Method:** Experimental TBI was induced in rats by a weight-drop model. A total of 72 adult Wistar rats were divided into sham operation group ($n=24$), control group ($n=24$), EPO treatment group ($n=24$). Forty-eight hours after injury, extent of BBB breakdown, brain water content and injury volume were observed and 24 hours after injury neuron-specific enolase (NSE) in serum was measured. **Result:** BBB breakdown was lower in EPO group ($67.3 \pm 13.1 \mu\text{g/g}$) than that in control group ($182.8 \pm 15.9 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$). Brain edema reduced in EPO group ($80.6\% \pm 0.2\%$) compared with that in control group ($91.8\% \pm 0.6\%$, $P < 0.01$). EPO treatment ($17.9 \pm 4.0 \text{mm}^3$) reduced brain injury volume compared with that in control group ($37.7 \pm 3.8 \text{mm}^3$, $P < 0.01$). NSE levels in serum was lower in EPO group ($6.28 \pm 3.37 \text{ng/ml}$) than that in control group ($10.02 \pm 1.50 \text{ng/ml}$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Administration of EPO can keep the integrity of BBB, and reduce brain injury volume, brain edema and neuron damage.

Author's address Department of Neurosurgery, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, 730030

Key words erythropoietin; traumatic brain injury; blood-brain barrier; brain edema; neuron-specific enolase

创伤引起的原发性和继发性脑损伤是导致人们伤残和死亡的主要原因。尽管抗炎、抗凋亡、抗自由基等制剂具有脑保护作用,但是现在临床上还没有一种药物能完全阻止继发性的脑损害。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是由 165 个氨基酸组成的分子量为 34kD 糖蛋白,具有促进骨髓红系母细胞增殖和分化,调节红细胞的生成作用,目前临床上主要用于治疗肾功能不全引起的贫血。最近研究发现 EPO 及其受体(erythropoietin receptor, EPO-R)系统不仅以内分泌的形式存在于肾脏和骨髓内,它们还以自分泌或旁分泌的形式存在于神经系统、肌肉组织(骨骼肌、平滑肌、心肌)和生殖系统(睾丸和子宫)。国内外的研究证实,EPO 在缺血再灌注、缺血缺氧、蛛网膜下腔出血、脑梗死、癫痫、脊髓损伤等实验模型中具有神经保护功能^[1]。本研究应用 EPO 干

预大鼠创伤性脑损伤(tramaumatic brain injury, TBI)模型,评价 EPO 对 TBI 可能的神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组与模型建立

1.1.1 选取清洁级健康 Wistar 大鼠 72 只(兰州军区总医院动物中心),雌雄不限,重量 250—350g。随机分成假手术组 24 只、对照组 24 只、EPO 治疗组 24 只。造模成功治疗 24h 后每组取 6 只测定血清 NSE 含量。48h 后每组各取 6 只测定脑组织水含量、

1 兰州大学第二医院神经外科,兰州市,730030

2 通讯作者

作者简介:原睿智,男,在读硕士

收稿日期:2008-03-18

脑损伤体积和血脑屏障的完整性。

1.1.2 采用 Feeney 方法制作大鼠重度颅脑损伤模型^[2]。大鼠用 10%水合氯醛(300mg/kg, 3ml/kg)腹腔注射麻醉后, 俯卧固定于立体定位仪上, 矢状切开头皮, 显露右顶骨, 在人字缝前 2mm, 矢状缝右侧 2mm, 使用牙科钻钻出一小孔并扩大骨窗直径至 5mm。将中心粘有直径 3mm、高 4mm 圆柱体硬塑料板(直径 10mm、厚 5mm)放置于大鼠右侧头部顶叶, 其中心圆柱置于钻孔内。用 25g 砝码于 30cm 高度自由落下造成大鼠右侧重度颅脑损伤, 止血后缝合头皮。造模成功后 EPO 治疗组立即腹腔注射 rhEPO (5000U/kg), 于 24h 后再注射 1 次。对照组模型制作方法与 EPO 组相同, 但制模后仅腹腔注射等量生理盐水。假手术组仅用上述方法暴露硬膜但不致伤。

1.2 主要试剂和仪器

促红细胞生成素(华北制药金坦生物技术股份有限公司); KDC-2046 低温大容量离心机; 电子天平; 100℃恒温烘干箱; 伊文思蓝(西安沃尔森生物技术有限公司); 氯化-2,3,5-三苯基四氮唑溶液(2,3,5-triphenyltetrazolium Chloride, TTC)(西安沃尔森生物技术有限公司); 神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)试剂盒(北方生物技术研究); 自制落体打击器; 荧光分光光度计(日本产 Hitachi 650-60 型)。

1.3 实验方法及指标检测

1.3.1 血脑屏障破坏程度检测: 伊文思蓝(Evans Blue, EB)是一种分子量与血液中白蛋白相近的染料制剂, 可以与血液中的白蛋白结合, 常作为示踪剂检测血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的完整性。制模 48h 后 EPO 治疗组和对照组各取 6 只大鼠尾静脉注射 2%EB(3ml/kg)。体内循环 60min 后, 用生理盐水左心室灌注直到流出液变为清亮。参照 Baskawa MK^[3]的方法, 取损伤侧脑组织在分析天平上称其湿重, 将其放入匀浆器, 加 2ml 50%(w/v)三氯醋酸(TCA)匀浆液充分匀浆后, 将组织匀浆液 15000r/min 离心 20min, 取 1 ml 上清与 3 ml 无水乙醇混合, 在荧光分光光度计 Ex620 nm、Em680nm 的条件下进行比色, 依据其 OD 值计算出 EB 的浓度。校零标准品为 50%TCA 按 1:3 加入无水乙醇。使用校零标准品配制不同浓度(100—1000ng/ml)的 EB 测定其 OD 值, 以绘制出标准曲线(呈线性关系)。依据所测得浓度计算 BBB 对 EB 的通透率, 以每克湿重脑组织内所含 EB 量表示。

1.3.2 脑组织水含量测定: 采用干、湿重法, 各组大鼠制模 48h 后, 断头取脑, 取伤侧(各组均为右侧)大

脑半球脑组织标本, 电子天平称取湿重(室温 20—25℃, 湿度 70%—90%)将标本置于 100±2℃恒温干燥箱内烘干 24h 至恒重, 称取干重。

脑水含量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3.3 脑损伤体积测定: 参照 Mathews^[4]的方法各组大鼠制模 48h 后, 快速取出伤侧脑组织置于-20℃冰箱短暂冷冻后, 置于冰盘上操作。去掉嗅球、小脑和部分低位脑干, 剩余部分由前后冠状切成 1mm 组织片, 然后置于 2%TTC 染色溶液中 37℃避光温孵 30min。正常组织染成红色, 损伤组织呈白色。完全显色后标本于 4℃的 10%甲醛溶液溶液中固定 7d。TTC 染色的脑片以 CCD 数码相机(WV-CP-230, Panasonic)摄像后输入计算机, TTC 染色每一脑片的损伤面积乘以厚度, 并叠加每片数据后计算脑组织损伤体积。

1.3.4 血清 NSE 水平测定: 各组大鼠制模 24h 后各组取 6 只心脏采血, 用双抗体夹心法测定血清 NSE 含量。样品中的 NSE 与包被球上的 NSE 抗体结合, 再与 ¹²⁵I-抗 NSE 结合, 形成免疫复合物, 测定包被球的 CPM 值, 即可检测样品中的 NSE 含量。

1.4 统计学分析

应用 SPSS11.5 软件对数据进行处理, 计量数据以均数±标准差表示, 多个样本均数间的比较采用单因素方差分析, 多个样本均数间的多重比较采用 Dunnett-t 检验, $P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

制模 48h 后, 假手术组 EB 通过率最低。与对照组比较 EPO 治疗组伤侧脑组织 EB 的通过率显著降低, 差异具有显著性意义 ($P<0.01$)。干湿重法测得 EPO 治疗组和对照组伤侧脑组织含水量较假手术组明显升高($P<0.01$)。EPO 治疗组与对照组相比伤侧脑水含量明显降低, 有显著性差异 ($P<0.01$)。制模 48h 后 TTC 染色, 数据输入计算机得出对照组和 EPO 治疗组比假手术组较损伤体积明显增大 ($P<0.01$); EPO 治疗组损伤体积较对照组明显缩小, 差异有显著性($P<0.01$)。EPO 治疗组和对照组血清 NSE 含量较假手术组明显升高 ($P<0.01$), EPO 治疗组 NSE 含量较对照组明显较低($P<0.05$), 见表 1。

表 1 三组的 EB 通过率、脑组织水含量 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	EB 含量 ($\mu\text{g/g}$)	脑组织 水含量(%)	损伤体积 (mm^3)	NSE 含量 (ng/ml)
假手术组	6	12.6±1.2	71.1±0.2	0	2.35±0.64
对照组	6	182.8±15.9 ^①	91.8±0.6 ^①	37.7±3.8 ^①	10.02±1.50 ^①
EPO 治疗组	6	67.3±13.1 ^{①②}	80.6±0.2 ^{①②}	17.9±4.0 ^{①②}	6.28±3.37 ^{①②}

①与假手术组比较 $P<0.01$; ②与对照组比较 $P<0.01$; ③与对照组比较 $P<0.05$

3 讨论

脑外伤可引起认知功能、运动功能、意识和感觉的缺损或者丧失。其根本原因是神经元、神经胶质细胞、内皮细胞的水肿、变性、凋亡或死亡。目前国内外研究较多的神经保护剂种类较多, 但效果并非十分满意。尽管 EPO 在体内外的多种实验中具有保护脑损伤的作用, 但对于其在实验性创伤性脑损伤中的研究较少。Lu 等^[5]在脑外伤实验中证实了 EPO 具有增强神经元的再生和空间记忆的恢复。Ozturk 等^[6]在大鼠闭合性脑损伤实验中证实 EPO 能明显降低血清中丙二醛(多不饱和脂肪酸的主要终产物, 可以反映氧化应激水平)的含量和血清中 NO 的含量, 具有抗氧化应激的作用。本实验延续了国内外学者关于 EPO 在神经系统保护作用的研究, 证实了 EPO 对大鼠创伤性脑损伤具有保护作用, 体现在减轻脑组织水肿、维持血脑屏障的完整性、减小脑组织的损伤体积、降低神经元的损伤程度。

腹腔注射给药后 EPO 通过血脑屏障进入中枢神经系统的机制尚未完全清楚。但多数学者认为脑内毛细血管内皮细胞表达 EPO-R, EPO 与其受体结合可能是透过血脑屏障进入脑组织的主要原因, 而且 EPO 发挥神经保护作用也主要通过 EPO-R 起作用。EPO-R 属于 I 型细胞因子受体超家族。最新研究发现 EPO 的刺激造血和组织保护特性具有独立性, 即通过不同的信号转导途径发挥作用^[7]。EPO 介导神经保护作用的 EPO-R 与 GM-CSF、IL-3、IL-5 等受体具有相同的亚单位 CD131^[8]。

脑外伤造成的血脑屏障破坏是产生血管源性脑水肿的主要原因, 因此在外伤性脑水肿的研究中, BBB 功能是一个重要的指标。在我们的实验中 EPO 治疗组较对照组 EB 通过率明显较低, 证实了 EPO 具有维持血脑屏障完整性的作用。Martine-Estrada 等^[9]研究其机制可能是 EPO 通过降低内源性 NO 合酶和修复内皮细胞连接而降低 VEGF 诱导的血脑屏障破坏。Keogh 等^[10]研究还发现 EPO 具有减少内皮细胞的死亡和促进微血管的生成作用。

本实验证实了 EPO 治疗组与对照组相比能缩小脑损伤的体积。Wang 等^[11]研究其可能机制是通过促进脑内毛细血管内皮细胞的增殖和迁移, 为缺血细胞提供血流和营养物质, 维持其存活。Li 等^[12]也发现 EPO 可以促进血管生成的葡萄糖转换因子-1 和 5-溴基-2-脱氧尿嘧啶核苷含量增加; 上调血管内皮细胞中 EPO 受体表达; 还能上调血管生成素-2 和血管内皮细胞生长因子-1 表达。

脑水肿是颅脑外伤的主要并发症, 由其引起的

颅内压增高是脑外伤患者早期死亡的主要原因。目前的临床保守治疗主要通过高渗液体、利尿剂、碳酸酐酶抑制剂、肾上腺皮质激素治疗脑水肿, 使脑外伤的死亡率明显下降, 所以通过不同的途径治疗脑水肿仍然是国内外学者关注的焦点。Lee 等^[13]在 SD 大鼠实验性脑出血研究中使用 EPO5000U/d, 治疗 3 天, 与对照组相比, EPO 治疗组能明显减轻脑的水含量、脑组织萎缩以及减少血肿体积。其机制可能是减轻炎症性损伤, 抑制 TNF- α 和 Fas 及其配体, 抑制神经元凋亡。本实验也证实了 EPO 可以减轻创伤引起的脑水肿。

烯醇化酶(enolase)是细胞能量代谢活动中参与糖酵解过程的关键酶, 以二聚体形式存在于胞浆中, 由 α 、 β 、 γ 三种亚基组成 $\alpha\alpha$ 、 $\beta\beta$ 、 $\gamma\gamma$ 、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\gamma$ 五种同工酶, 其中 $\gamma\gamma$ 型烯醇化酶特异地存在于神经元和神经内分泌细胞中故命名为神经元特异性烯醇化酶。正常情况下 NSE 仅存在于神经元和神经内分泌细胞内, 所以脑脊液和血清中含量甚微。在神经元损伤后释放入脑脊液和血液中, 可以反映脑组织神经元的损伤程度^[14]。本实验测定脑损伤 24h 后 EPO 治疗组较对照组血清中 NSE 的含量明显降低, 说明 EPO 对神经元具有保护作用; 由于 NSE 释放入血首先需要通过血脑屏障, 所以也反映血脑屏障较完整。

本研究用可重复的实验模型证实了腹腔注射 EPO 能明显减轻 TBI 的损伤程度, 为 EPO 能早日应用临床治疗脑外伤提供了实验依据。虽然多种实验均证实 EPO 具有神经保护作用, 但是目前还存在像临床用药最佳时间窗、用药剂量以及增加血液黏滞度等问题, 需要进一步的实验及临床研究。

参考文献

- [1] Cherian L, Goodman JC, Robertson C. Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 322: 789—794.
- [2] Feeney DM, Boreson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: methodology and local effects of contusion in the rat[J]. Brain Res, 1981, 211: 67—77.
- [3] Baskawa MK, Dogan A, Rao AM, et al. Neuroprotective effects of citicoline on brain edema and blood-brain barrier breakdown after traumatic brain injury[J]. Neurosurg, 2000, 92: 448—452.
- [4] Mathews KS, McLaughlin DP, Ziabari LH, et al. Rapid quantification of ischaemic injury and cerebroprotection in brain slices using densitometric assessment of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride staining [J]. J Neurosci Methods, 2000, 102: 43—51.
- [5] Lu D, Mahmood A, Qu C, et al. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain

(下转 1034 页)