

·基础研究·

不同用药途径促红细胞生成素用于
治疗大鼠急性脊髓损伤的研究胡 杨¹ 郑启新^{1,2} 秦 文¹

摘要 目的:观察经不同给药途径给予重组人红细胞生成素(EPO)治疗脊髓损伤后大鼠神经功能行为,caspase-3表达以及凋亡的变化,探讨其脊髓保护的作用机制。方法:30只SD大鼠随机分成假手术组、对照组、蛛网膜下腔给药组(治疗A组)、尾静脉给药组(B组)、腹腔给药组(C组),每组6只。观察药物治疗前后大鼠的神经功能行为变化,应用HE染色观察神经元病理变化,免疫组化染色检测caspase-3表达,TUNEL法标记凋亡细胞;比较各组间差异。结果:HE,免疫组化染色示各EPO治疗组脊髓损伤程度小,神经元细胞破坏少;caspase-3在各时相点的表达明显降低,凋亡阳性细胞显著减少;大鼠神经功能恢复显著优于对照组,蛛网膜下腔给药组治疗效果优于其它组;尾静脉给药组与腹腔给药组治疗效果无显著性差异。结论:蛛网膜下腔给予EPO能显著下调caspase-3的表达,抑制脊髓神经细胞凋亡,对继发性脊髓损伤有保护作用,为最佳给药途径。

关键词 脊髓损伤;重组人红细胞生成素;caspase-3;凋亡

中图分类号:R493, R651.2 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-06-0512-03

Effect of rh-EPO injected in different approaches on spinal cord injury in rats/HU Yang, ZHENG Qixin, QIN Wen//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(6):512—514

Abstract Objective: To investigate the effect of rh-EPO on expression level of caspase-3 and apoptosis after spinal cord injury (SCI), and to explore its mechanism of neuroprotective effect and to discuss the difference of different approaches. **Method:** Thirty SD rats were divided into five groups by randomization: sham group, control group, rh-EPO injected in to subarachnoid space group (A), injected in to tail vein group (B) and injected in to abdominal cavity group (C). There were 6 rats in each group. The changes of nerve function were observed. The expression of caspase-3 was detected with immunohistochemistry and the apoptosis was labeled by TUNEL. The differences and effects of each group were compared. **Result:** In EPO cure group, HE staining pathological changes were mitigated than that in control group. The caspase-3 protein level was lower than that in control group. TUNEL-positive cells decreased significantly at the 14th d; the grade of nerve function improved distinctly. The effect of rh-EPO injected in to subarachnoid space group was better than that in other groups. There was no difference between group B and group C. **Conclusion:** EPO can inhibit the expression of caspase-3 and lessen neuronal and glial cell apoptosis in the rats after SCI, which may play a significant neuroprotective role in the secondary SCI. The effect of rh-EPO injected in to subarachnoid space group was the best.

Author's address Dept. of Orthopaedics, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Wuhan, 430022

Key words spinal cord injury; erythropoietin; caspase-3; apoptosis

急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI)为临床常见的严重创伤,因高致残率和高病死率一直成为医学研究的热点。甲基强的松龙是经临床证实能改善患者ASCI后神经功能并得到广泛应用的治疗脊髓损伤的药物,但由于时间窗以及并发症等问题,其临床应用受到很大限制^[1]。最近研究表明,促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)及其受体在中枢以及周围神经系统中均有广泛的表达,具有调节中枢神经系统发育、神经营养及神经保护作用^[2]。本实验通过比较经不同给药途径给予EPO治疗ASCI后大鼠神经功能行为,caspase-3表达以及凋亡的变化,探讨EPO防止脊髓继发性损伤的机制,为临床

应用提供指导。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雌性成年SD大鼠30只,购自同济医学院动物中心,体重200—250g,随机分为5组,每组6只。①假手术组,仅行椎板切除,不损伤脊髓,不给药;②对照组,损伤脊髓,不给药;③治疗A组,伤后立即经

1 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科,武汉,430022

2 通讯作者

作者简介:胡杨,男,医学硕士

收稿日期:2008-09-18

蛛网膜下腔给予 EPO 3000IU/kg。④治疗 B 组, 经尾静脉给予 EPO 3000IU/kg。⑤治疗 C 组, 经腹腔给予 EPO 3000IU/kg (rh-EPO 由沈阳三生制药股份有限公司提供)。

1.2 动物模型制作

采用改良 Allen's 打击法。将动物俯卧并固定于手术台, 背部剪毛, 3%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉。以大鼠 T9 为中心暴露硬脊膜, 用 5.0g 铜制重物在玻璃棒引导下从 8cm 高处垂直自由落下, 致伤能量 40gcf, 以大鼠尾巴痉挛摆动, 双下肢猛烈收缩为打击成功标志, 致中度脊髓损伤。

1.3 BBB 评分

参照 Basso 等^[3]提出的大鼠 SCI 后功能评判标准(Basso, Beattie, Bresnahan functional scale, BBB)评分法)分别在术后第 1 天, 3 天, 7 天, 14 天进行评分。将动物置于直径 1m² 的平面场地自由活动 4min, 评分时由两名熟悉 BBB 评分标准的非本组的实验人员观察, 记录动物后肢运动情况。

1.4 组织病理学检查

各组大鼠术后第 14 天处死, 行心脏灌注冰盐水及 4%多聚甲醛缓冲液, 取损伤段脊髓长约 1cm, 4%多聚甲醛缓冲液固定 24h, 脱水, 石蜡包埋, 行横切面 4μm 厚度连续切片。HE 染色, 观察各组脊髓组织水肿、变性坏死及炎性细胞浸润情况。

1.5 免疫组化染色及观察

术后各时间点各组标本随机选取 5 张切片做免疫组化染色。试剂盒为武汉博士德公司提供, 采用链霉亲和素-生物素化酶复合物(SABA)法, 按说明书操作。caspase-3 阳性细胞质呈棕黄色。显微镜高倍视野内计数染色阳性细胞, 计算阳性率。

1.6 凋亡细胞检测

采用原位末端标记法(TUNEL 法), 德国宝灵曼试剂盒, 具体方法参照说明书。各组标本选择 3 张切片, 镜下观察阳性标记的细胞数, 阳性标记的凋亡细胞核呈棕褐色。每张切片随机选取 5 个视野测定阳性细胞数及总细胞数, 计算出细胞凋亡指数(AI)。

1.7 统计学分析

所有数据采用 SPSS13.0 软件包分析, 所有参数用均数±标准差表示, 组间差异采用方差检验, $P < 0.05$ 具有显著性意义。

2 结果

2.1 BBB 评分

麻醉清醒后, 各实验组大鼠均出现完全性下肢瘫痪症状。脊髓损伤 24h 后各组实验动物神经功能

开始有所恢复, 第 3 天后神经功能进一步恢复, EPO 治疗 A 组运动功能评分明显优于其它组, 治疗 B 组运动功能与 C 组, 差异无显著性(见表 1)。

表 1 BBB 评分结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	18.50±1.52	20.33±0.82	20.67±0.52	21.00±0.00
对照组	0.33±0.52	3.33±1.03	6.83±1.47	11.83±1.84
治疗 A 组	3.67±1.03	8.50±1.05	11.67±1.21	17.83±1.72
治疗 B 组	2.50±0.55	6.83±1.17	9.67±1.75	15.50±1.87
治疗 C 组	2.17±0.75	6.50±1.38	9.17±1.72	15.17±1.47

2.2 光镜下组织形态学变化

假手术组神经元形态正常, 未见肿胀、坏死、空泡等改变。对照组见脊髓内大部分有坏死, 囊腔及空洞形成, 周围有炎性细胞浸润, 残存神经元肿胀成圆形、核固缩、碎裂, 灰白质交界消失。EPO 治疗组均较对照组病理改变轻。

2.3 caspase-3 免疫组化染色

caspase-3 免疫组化阳性染色为棕黄色, 阳性细胞以胶质细胞为主。假手术组未见或仅见少量阳性细胞, 脊髓损伤组大鼠在伤后均可见阳性表达细胞。EPO 治疗组 caspase-3 阳性细胞表达数显著低于对照组($P < 0.05$)。EPO 治疗 A 组 caspase-3 阳性细胞数与 B、C 组比较具有显著性差异, 治疗 B 组与 C 组 caspase-3 阳性细胞数无显著性意义(见表 2, 图 1—4, 见彩色插页)。

表 2 各组大鼠在第 14 天时 caspase-3 阳性率及凋亡指数 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	caspase-3 阳性率	凋亡指数
假手术组	2.48±0.24	1.92±0.17
对照组	27.75±2.92	37.64±5.76
治疗 A 组	20.25±2.88	24.52±2.56
治疗 B 组	23.82±2.67	28.12±2.69
治疗 C 组	24.06±2.36	29.05±2.16

2.4 TUNEL 阳性细胞计数

TUNEL 标记法阳性染色细胞胞核固缩, 呈棕褐色, 以少突胶质细胞为主。假手术组未见或见少数凋亡细胞, 脊髓损伤组大鼠在伤后出现凋亡细胞, EPO 治疗组凋亡指数均低于对照组, 差异具有显著性意义($P < 0.05$)(见表 2, 图 5—8, 见彩色插页)。

3 讨论

ASCI 包括原发性损伤和继发性损伤。原发性损伤不可逆, 无法对其进行有效的治疗。继发性损伤是指伤后几小时至几天脊髓损伤局部原来正常的组织发生自身破坏性病变, 其造成的损害超过原发性损伤^[4]。目前脊髓损伤的研究主要集中在脊髓损伤后脊髓内继发病理损伤的预防和逆转。EPO 是调节红细胞生成的糖蛋白, 最近的研究表明, EPO 是一种多

功能营养因子及神经保护因子,功能性的 EPO 受体(EPO-R)在多种组织和器官中都有表达,免疫组化显示 EPO 及 EPO-R 在大脑主要分布于海马及大脑皮质中的神经元和胶质细胞中,脊髓组织中主要分布于前角运动神经元和带髓鞘的轴突中。当人和鼠的大脑缺血或缺氧时,EPO-R 表达显著上调,发挥内源性神经保护作用^[5]。Gorio 等^[6]用 rHuEPO 治疗大鼠脊髓损伤时发现:脊髓损伤部位及其周边的炎性细胞数量明显下降,并伴随损伤后神经功能的明显恢复。郭新庆等^[7]研究表明,EPO 能上调肾上腺髓质素(AM)的表达,促进神经功能恢复。但是既往研究报道 EPO 治疗 SCI 均是经体循环给药,经蛛网膜下腔给予 EPO 治疗 SCI 尚未见报道,本实验观察大鼠急性脊髓损伤后经不同给药途径治疗效果的差异。

Caspase 家族在凋亡中起主要作用,其中 caspase-3 为关键的执行分子,在凋亡信号转导的许多途径中发挥功能,参与了脊髓损伤细胞凋亡的调节^[8]。本实验显示急性脊髓损伤后即刻给予 rh-EPO,各治疗组大鼠下肢神经运动功能随时间逐步改善,HE 染色可见 EPO 治疗组的脊髓损伤程度轻于对照组,免疫组化及 Tunel 染色表明治疗组 caspase-3 的表达和凋亡细胞计数明显低于对照组;表明 EPO 可促进神经功能恢复,抑制 caspase-3 的表达,减少细胞凋亡,对抗脊髓的继发性损伤。

通过本实验可以看出,蛛网膜下腔给予 EPO 治疗后大鼠神经功能恢复要显著优于其他组,原因可能是由于经蛛网膜下腔给药可迅速提高损伤局部 EPO 浓度,EPO 与 EPO-R 结合后启动一系列信号转导调节抗凋亡基因的转录,抑制凋亡,从而发挥其最大的脊髓保护效应。尽管有学者认为由于分子形状和蛋白结构的关系,EPO 并不能通过完整的血脑屏障,但是近年研究表明在大脑的毛细血管内皮细胞上有两种不同型的 EPO-R,该发现表明循环血中的 EPO 能通过这些受体介导转运至脑内。Brines 等^[9]报道在腹腔给予 5000IU/kg EPO 后 5h 免疫组化示大脑中可见 EPO 大量表达,表明 rH-EPO 可通过血脑屏障,且在神经损伤时这种通透性会增加。近期研究发现在脑缺血的动物模型中经体循环给予 rH-EPO 能明显减轻脑组织损伤,甚至在脑卒中后 6h 给药也有效^[10]。本实验研究表明,经静脉及腹腔给

药治疗 SCI 同样可以促进神经功能恢复,减轻脊髓继发性损伤,不过治疗效果较蛛网膜下腔给药稍差。这是因为经体循环给药,只有部分 EPO 可以透过血脑屏障,脊髓损伤部位 EPO 浓度要低于直接经蛛网膜下腔给药,且部分 EPO 与其它组织中 EPOR 结合,效价降低。本实验经各途径单次给予 3000IU/kg EPO,观察两周并未发现大鼠有任何不良反应,说明其具有较大的安全性。

综上所述,本实验对经各种途径给予 EPO 治疗 ASCI 做了初步的探索,蛛网膜下腔给予 EPO 治疗大鼠 ASCI 可显著促进神经功能恢复,抑制凋亡,为最佳给药途径。但是其对脊髓保护作用的时效-量效关系有待于深入研究。

参考文献

- [1] Bittorf T, Seiler J, Ludtke B, et al. Activation of STAT5 during EPO- directed suppression of apoptosis[J]. Cell Signal, 2000, 12: 23—30.
- [2] Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms [J]. Clin Neuropharmacol, 2001, 24: 254—64.
- [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—21.
- [4] Ramer MS, Harper GP, Bradbury EJ. Progress in spinal cord research—a refined strategy for the International Spinal Research Trust[J]. Spinal Cord, 2000, 38: 449—472.
- [5] Calvillo L, Latini R, Kajstura J, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia reperfusion injury and promotes beneficial remodeling [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 4802—4806.
- [6] Gorio A, Cokmen N, Erbayraktar S, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 9450—9455.
- [7] 郭新庆, 郑启新. 重组人红细胞生成素、甲泼尼龙对大鼠损伤脊髓中肾上腺髓质素表达的调控 [J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(6): 503—505.
- [8] 王金光, 郑启新, 赵铭, 等. 大鼠脊髓损伤后细胞凋亡及 Caspase-3、Fas 的表达和意义 [J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(4): 296—300.
- [9] Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood barrier to protect against experimental brain injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 10526—10531.
- [10] Cerami A, Brines ML, Ghezzi P, et al. Effects of epoetin- α on the central nervous system[J]. Semin Oncol, 2001, 28: 66—70.