

促红细胞生成素对大鼠脑出血炎症反应的抑制作用及机制*

石秋艳¹ 李 倩^{1,3} 姜进克¹ 刘 超¹ 孙惠芳¹ 何俊芳¹ 张国志²

摘要 目的: 研究实验性大鼠脑出血后血肿周围核因子- κ B (NF- κ B)及其抑制因子 κ B α (I κ B α)的表达,以及促红细胞生成素(EPO)对其干预作用,探讨 EPO 对出血性脑炎症反应的作用及机制。**方法:**将 126 只大鼠随机分为假手术组、脑出血组、EPO 干预组。每组各 42 只,分别为术后第 3、6、12、24、48、72 小时和第 7 天亚组,每亚组各 6 只。采用大鼠尾动脉自体不凝血 50 μ l 注入尾状核区建立脑出血模型,分别在不同时间点断头取脑,连续切片作 NF- κ B 及 I κ B α 免疫组化染色;观察各组各时间点 NF- κ B、I κ B α 蛋白的表达并分析比较。**结果:**脑出血第 6 小时后 NF- κ B 及 I κ B α 表达增高,第 24 小时明显增高,第 72 小时达到高峰,各时间点与假手术组比较差异均有显著性 ($P < 0.01$)。EPO 干预后 NF- κ B 表达明显降低,与脑出血组比较有显著性差异 ($P < 0.01$);经 EPO 干预后 I κ B α 表达显著增多,与脑出血组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。**结论:**脑出血周围 NF- κ B 及 I κ B α 表达均有增多,EPO 通过抑制 NF- κ B 表达、促进 I κ B α 表达抑制炎症反应从而起到神经保护作用。

关键词 脑出血;炎症反应;核因子 κ B;抑制因子 κ B α ;促红细胞生成素

中图分类号: R493, R743 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2009)-08-0727-04

The studies of depressant effects and mechanism of erythropoietin to inflammatory reaction in rats with intracerebral hemorrhage/SHI Qiuyan, LI Qian, JIANG Jinke, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(8): 727—730

Abstract Objective: To investigate the expressions of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p50 and inhibitory factor - κ B α (I κ B α) in the amph-hematoma of rats with experimental intracerebral hemorrhage and the effects of erythropoietin (EPO) on them, to study the depressant effects and mechanism of EPO to inflammatory reaction of intracerebral hemorrhage. **Method:** One hundred and twenty-six rats were randomly divided into 3 groups, i.e. sham operation group (SOG), intracerebral hemorrhage group (IHG) and EPO group (EPOG). There were forty-two rats in each group, and seven subsets respectively in this three groups, i.e. the 3rd, 6th, 12th, 24th, 48th and 72nd h and 7th d subsets six rats in each subset. Autologous blood 50 μ l were injected into the right caudate nucleus in rats to make an model of intracerebral hemorrhage and rats were decapitated to obtain brains in different time points. Then, serial sections were made and the expressions of NF- κ B p50 and I κ B α of these rats were detected with immunohistochemical assay and dependence assay in seven time points. **Result:** The expressions of NF- κ B p50 and I κ B α up-regulated at the 6th h after operation, up-regulated significantly on the 24th h, getting to the peak level on the 72nd h. Compared with SOG the expression of NF- κ B in IHG upregulated significantly ($P < 0.01$). The expression of NF- κ B in EPOG were lower than that in IHG ($P < 0.01$). The expression of I κ B α up-regulated obviously in the rats of EPOG ($P < 0.01$). **Conclusion:** The expressions of NF- κ B and I κ B α up-regulated in the amph-hematoma in rats with experimental intracerebral hemorrhage. EPO may possess potential neuro-protective effect through inhibiting the expression of NF- κ B and enhancing the expression of I κ B α to depressant inflammatory reaction.

Author's address Dept. of Neurology Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan, 063000

Key words intracerebral hemorrhage; inflammatory reaction; nuclear factor-Kappa B; inhibitory factor-Kappa B alpha; erythropoietin

近年来,脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)后的继发性损伤逐渐成为人们关注的焦点,研究表明脑出血后血肿周围组织继发性损伤与凝血酶的级联反应、炎症反应、自由基的级联反应等病理生理变化有关,尤其血肿周围组织的炎性反应与细胞因子的表达被认为是继发性损伤的主要原因之一,这一

* 基金项目:河北省卫生厅资助项目(08182)

1 华北煤炭医学院附属医院神经内科一病区,唐山,063000

2 华北煤炭医学院附属医院普外科

3 通讯作者

作者简介:石秋艳,女,教授,主任医师,硕士生导师

收稿日期:2008-12-10

点较缺血性脑损伤更为明显。核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一种多向性转录调节蛋白,活化的 NF- κ B 可单独与其他转录因子协同,对众多基因尤其是涉及炎症和免疫反应等方面的基因表达起关键性调控作用,在脑血管疾病后的炎症反应及细胞凋亡中起着中心环节的作用,而抑制因子 κ B α (inhibitory factor- κ B alpha, IkB α)是细胞内 NF- κ B 的主要抑制分子^[1],在 NF- κ B 活化的途径中起着最关键的分子开关作用。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一个调节血细胞生成的细胞因子。近年来,在中枢神经系统中也发现 EPO 及其受体的表达。EPO 作为一个新的神经保护因子,其神经保护作用已成为新的研究热点。本实验旨在研究促红细胞生成素对脑出血后血肿周围组织 NF- κ B 及 IkB α 的表达的影响,以探讨促红细胞生成素对脑出血后脑组织的神经保护作用及机制,为临床脑出血的治疗提供科学的实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

健康 SD 大鼠 126 只,体重(250 $\pm$ 30)g,雄性,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供;兔抗鼠 NF κ Bp50、IkappaB 多克隆抗体、二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德公司;重组人促红细胞生成素(rhEPO)购自上海克隆生物高技术有限公司(批号 20070930)。

1.2 动物分组

健康雄性 SD 大鼠 126 只,随机分为假手术组、脑出血组、脑出血 EPO 干预组。各组按时间动态分为术后第 3、6、12、24、48、72 小时、第 7 天 7 组,每组 6 只。脑出血 EPO 干预组大鼠于造模后立即经腹腔注射重组人促红细胞生成素(rhEPO 3000 U/kg),以后每 24h 腹腔注射相同剂量,其余组注射等量的生理盐水。分别在术后第 3、6、12、24、48、72 小时、第 7 天处死动物,取脑。

1.3 动物模型制备

参照杨宵鹏^[2]及德国学者 Deinsberger 等^[3]报道的方法。大鼠术前禁食 12h,10%水合氯醛(0.035ml/kg)腹腔内注射,麻醉后把头部及股部备皮,络合碘消毒后固定在立体定向仪上,头部正中切开皮肤,长约 15mm,3%双氧水剥蚀骨膜,暴露前后囟门,调节定向仪使前后囟在同一水平面上,于前囟前 0.2 mm,中线右侧旁开 3mm 处牙钻钻一直径约 1mm 的小孔,不伤及硬脑膜,露股动脉,用 40℃温水浸泡鼠尾数分钟,消毒后断尾抽取鼠尾血 50 μ l,将微量注

射器固定于立体定向仪上,自钻孔处垂直进针,深度 6mm,在 3—5min 内向大鼠尾状核内,不可垂直推注。只有旋转推注完毕,然后留针 10min,以免血液自针道反流。拔除后用医用骨蜡封闭骨孔,观察无出血后,缝合头部皮肤,加压包扎尾部。所有操作均在无菌条件下进行,术毕将大鼠放回笼中饲养,自由活动进食进水。假手术组除不注射自体血外,余操作同脑出血组。实验过程出现大鼠死亡及时补充。

1.4 标本制取

脑出血后不同时间点分别再次水合氯醛腹腔麻醉大鼠(0.035ml/kg),开胸,暴露心脏及主动脉,手术剪将左心室尖及右心房剪开,用事先磨好的钝头 50ml 注射器针头从左心室尖插入心室,并进入主动脉,动作轻柔,防止戳破心室及主动脉。将 37℃ 0.9%氯化钠水溶液从 50ml 注射器缓慢推入动物的体循环,约持续 3—5min(200ml)至右心房流出的液体基本无色,将灌流液换为 4%多聚甲醛磷酸缓冲液,继续灌流 5min(约 250ml),断头取脑,留大脑置于 4%多聚甲醛后固定 24h 以上。取出固定液中脑组织标本针孔后约 2mm,常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成 5 μ m 厚的脑组织切片分别进行 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.5 NF- κ B 及 IkB α 免疫组化染色

染色步骤:①切片常规脱蜡至水。②新鲜配制的 3% H_2O_2 室温 20min 灭活内源性酶。③微波修复抗原。④滴加封闭液 30min。⑤滴加 NF- κ B(IkB α)多克隆抗体 37℃反应 1h。⑥生物素化山羊抗兔二抗 37℃孵育 20min。⑦滴加链霉素抗生物素过氧化物酶溶液,37℃反应 30min,DAB 显色 5min。⑧苏木素复染 2—3min,水洗终止反应,分化后充分蓝化。⑨中性树胶封片。

1.6 免疫组化结果判断

光镜下(10 $\times$ 40)每只大鼠观察血肿区皮质 3 张脑片,每张脑片随机取 3 个不重叠视野,计数阳性细胞,以胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性细胞标准,共获 9 个数值,取均值为 1 只大鼠的结果。阴性对照 0.01 mol/L PBS 代替一抗进行试验。

1.7 统计学分析

使用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析,组间差异采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 常规 HE 染色

2.1.1 脑出血组:出血后 3h 即可见明显出血灶,灶周水肿,且可见炎症细胞浸润;24h 时尾状核处形成

明显的类椭圆形血肿, 血肿中心区可见分散的神经细胞, 血肿周边区水肿明显, 可见坏死神经细胞, 并有中性粒细胞浸润(见图 1, 2, 见彩色插页), 72h 组血肿周围及血肿区可见到有大量的炎症细胞浸润(见图 3, 见彩色插页); 出血后第 7 天, 出血灶大部分已吸收, 可见大小不等的空腔, 空腔边缘有少量红细胞, 灶周仍有多形核白细胞浸润(见图 4, 见彩色插页)。

2.1.2 EPO 干预组: 3h 血肿周围病理损伤情况与脑出血组类似, 24h 组血肿周围组织水肿有所减轻, 炎症细胞减少, 72h 组血肿周围组织坏死细胞、炎症细胞、凋亡细胞明显减少, 水肿明显减轻。

2.2 EPO 对 NF- κ B P50 蛋白表达的影响

脑出血 6h 后大鼠 NF- κ B P50 表达增高, 主要表达于胞浆, 胞核仅有少量表达; 24h 后大鼠 NF- κ B P50 表达明显增高, 广泛表达于血肿周围组织、远区皮质海马等部位, 并有核移位现象(见图 5), 与

6h 后比较有显著性差异($P<0.01$); 72h NF- κ B P50 表达达到高峰, 之后逐渐衰减。假手术组手术侧灶道周围组织可见少量 NF- κ B P50 阳性细胞(见图 6), 且主要位于细胞浆, 各时间点比较无统计学差异($P>0.05$)。脑出血组各时间点与假手术组比较有显著性差异($P<0.01$)。经 EPO 干预后 NF- κ B P50 表达明显降低, 脑出血组、EPO 组两组比较有显著性差异($P<0.05, P<0.01$), EPO 组 NF- κ B P50 表达仍高于假手术组, 差异有显著性($P<0.01$), 见表 1。

2.3 EPO 对 I κ B α 蛋白表达的影响

假手术组大鼠脑组织有 I κ B α 阳性表达, 位于神经元、神经胶质细胞及血管内皮中, 脑出血后各时间点与假手术组比较, I κ B α 表达量均增多, 差异有显著性($P<0.01$); 经 EPO 干预后 I κ B α 表达显著增多, 见图 7。脑出血组、EPO 组两组比较有显著性差异($P<0.05, P<0.01$), 见表 2。

表 1 不同时间点各组脑出血大鼠脑皮质内 NF- κ B 免疫组化阳性细胞数

($n=6, \bar{x} \pm s$, 个)

组别	第 3 小时	第 6 小时	第 12 小时	第 24 小时	第 48 小时	第 72 小时	第 7 天
假手术组	4.28 $\pm$ 0.15 ^③	4.74 $\pm$ 0.20 ^③	4.95 $\pm$ 0.21 ^③	4.96 $\pm$ 0.22 ^③	6.19 $\pm$ 0.40 ^③	6.08 $\pm$ 0.44 ^③	5.10 $\pm$ 0.75 ^③
脑出血组	18.28 $\pm$ 1.38	27.34 $\pm$ 1.80	32.38 $\pm$ 1.83	67.25 $\pm$ 1.65	86.87 $\pm$ 2.83	98.70 $\pm$ 2.17	36.45 $\pm$ 2.04
EPO 干预组	16.69 $\pm$ 0.60 ^①	21.90 $\pm$ 2.47 ^②	22.74 $\pm$ 2.31 ^②	28.91 $\pm$ 1.65 ^②	31.98 $\pm$ 2.13 ^②	43.85 $\pm$ 2.30 ^②	21.52 $\pm$ 0.95 ^②

相同时间点 EPO 干预组与脑出血组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 相同时间点各组与假手术组比较: ③ $P<0.01$

表 2 不同时间点各组脑出血大鼠脑内皮质 I κ B α 免疫组化阳性细胞数

($n=6, \bar{x} \pm s$, 个)

组别	第 3 小时	第 6 小时	第 12 小时	第 24 小时	第 48 小时	第 72 小时	第 7 天
假手术组	37.06 $\pm$ 1.22 ^③	39.53 $\pm$ 1.36 ^③	38.91 $\pm$ 0.65 ^③	37.40 $\pm$ 0.96 ^③	35.64 $\pm$ 0.95 ^③	36.55 $\pm$ 0.91 ^③	33.44 $\pm$ 1.12 ^③
脑出血组	75.03 $\pm$ 1.23	85.37 $\pm$ 1.63	94.77 $\pm$ 1.58	129.46 $\pm$ 3.02	156.73 $\pm$ 2.80	210.10 $\pm$ 1.85	52.40 $\pm$ 2.23
EPO 干预组	77.85 $\pm$ 1.63 ^②	87.99 $\pm$ 1.28 ^①	102.64 $\pm$ 1.72 ^②	159.60 $\pm$ 2.15 ^②	198.59 $\pm$ 2.79 ^②	249.19 $\pm$ 3.10 ^②	58.80 $\pm$ 1.36

相同时间点 EPO 干预组与脑出血组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 相同时间点各组与假手术组比较: ③ $P<0.01$

3 讨论

EPO 是一种糖蛋白激素, 相对分子质量为 34000。血浆中存在的 EPO 由 165 个氨基酸组成, 糖基化程度很高, 糖基成分主要是唾液酸。EPO 通过其受体 EPOR 发挥作用^[6], EPOR 属于细胞因子超家族成员(包括 IL-2, IL-6, 生长激素受体), 是由 508 个氨基酸残基组成的跨膜蛋白。近年大量研究表明, EPO 及其受体(EPOR)在人和啮齿类动物的大脑中广泛存在, 主要分布于海马及大脑皮质中的神经元和神经胶质细胞中。EPO 是神经系统中一个新的信号转导分子, 通过与 EPOR 结合在脑内发挥旁分泌的作用, 在任何由脑缺血造成氧浓度降低的情况下, EPO 的生成量成倍增加, 并通过降低神经元对缺氧缺血的敏感性, 增强神经元的存活能力, 促进神经祖细胞的增殖、抑制凋亡和控制炎症反应^[9]。本研究应用的 rhEPO 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, 并已被证明能通过血-脑屏障^[5]。

NF- κ B 是一种具有广泛生物学功能的重要的多向性转录因子, 在信号传导通路中起枢纽作用^[7]。在静息状态下, NF- κ B 与其抑制因子 I κ B α 结合成复合物存在于细胞浆中, 没有生物活性, 在诸如缺血缺氧、病毒感染、机械损伤、放射线照射等应激条件下, I κ B α 发生磷酸化后降解, 释放出游离的 NF- κ B, NF- κ B 被激活并转移到细胞核内, 介导 Bcl-x_s 的大量表达, 并能诱导 P53、C-myc 基因的表达, 这些基因最终在细胞凋亡中发挥重要作用, 是神经细胞死亡的途径之一^[8-9]。NF- κ B 的下游靶基因还有白细胞介素-1 β (IL-1 β) 及尿激酶型纤维蛋白酶原激活剂(uPA) 以及 MMP-9 启动子; IL-1 β 作为一种重要的前炎症因子, 刺激中性粒细胞和单核细胞的产生, 加剧炎症反应; MMP-9 降解毛细血管基底膜胶原成分, 引起血管源性脑水肿, 微血管受损后, 中性粒细胞、巨噬细胞从受损血管溢出, 释放炎症介质, 加剧

炎症反应^[10]。NF- κ B 广泛存在于中枢神经系统,与脑损伤、脑血管病关系密切。I κ B α 和 NF- κ B 结合后,干扰转录信号,阻止 NF- κ B 进入核内发挥作用;I κ B α 还可干扰核内的 NF- κ B 与特定 DNA 序列结合,并解离已形成的 NF- κ B-DNA 复合物,终止 NF- κ B 的持续作用^[9]。

本实验通过腹腔给药,因在急性脑出血后脑内缺血缺氧环境下,大脑内毛细血管内皮细胞大量表达 EPOR, rhEPO 与 EPOR 结合后通过胞饮的形式使 rhEPO 通过血脑屏障,发挥作用^[11-12]。实验发现,在实验性大鼠脑出血后第 3 小时即可见 NF- κ B 活化,血肿周围出现大量阳性细胞,第 72 小时达到高峰,此后 NF- κ B 的激活逐渐衰减,第 7 天时迅速下降,但其活性仍为第 3 小时的 2 倍多,显示在脑出血后 NF- κ B 亦被激活,这种持续性的活化可能参与脑出血后炎症反应所致脑损伤的病理生理过程,加重了脑损伤。NF- κ B 的抑制剂 I κ B α 在脑出血组大鼠脑内的变化趋势与 NF- κ B 基本一致,提示机体自身通过上调 I κ B α 使已活化的 NF- κ B 失活,从而阻断脑损伤的进一步加重,促进神经功能恢复。EPO 干预组 NF- κ B 的阳性细胞数明显低于脑出血组,而 I κ B α 阳性细胞数明显高于脑出血组,本研究结果证实,EPO 正是通过抑制 NF- κ B 表达促进 I κ B α 表达以减少 NF- κ B 的下游靶基因 IL-1 β 、uPA、MMP-9 的活化,从而控制持续性炎症反应,以减轻脑水肿,起到神经保护作用。

参考文献

[1] 陈立杰,王锐. I κ B α 对 NF- κ B 的抑制作用在脑缺血中的意义

[J].国际脑血管病杂志,2006,14 (6):462—464.

- [2] 李慧,娄季宇,杨霄鹏. 实验性脑出血动物模型[J].中国实用神经疾病杂志,2007,10(2):152—153.
- [3] Deinsberger W, Vogel J, Fuchs C, et al. Fibrinolysis and aspiration of experimental intracerebral hematoma reduces the volume of ischemic brain in rats[J].Neurol Res,1999,21(5):517—523.
- [4] Schumacker PT. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) [J].Crit Care Med, 2005, 33 (12 supply) :423—425.
- [5] 王凤英,黄良国,蒋国红,等.rHuEPO 对大鼠脑出血病理变化及神经细胞凋亡的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25(3): 299—305.
- [6] 王岩松,姚猛,董大明,等. 促红细胞生成素(EPO)的神经保护作用[J].中华神经外科杂志,2005,21(7):445—448.
- [7] Marumo T, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor - κ B and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells[J]. Diabetes,1999,48(5):1131—1137.
- [8] Sanz O,Acarrin L,Gonzales B,et al.NF- κ B expression following traumatic brain injury to the immature rat brain[J]. Neurosci Res,2002,67(6):772—780.
- [9] 李红玲,赵鹏飞,袁正华,等. 脑出血周围组织细胞凋亡与 bcl-2 及 bax 蛋白表达的关系[J].中国康复医学杂志,2007,22(3):222—224.
- [10] 吴鹤,丛玉玮,戚基萍,等.鼠大脑内出血后脑组织 MMP-9、NF- κ B 表达的实验研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报,2008,42(1):7—10.
- [11] 赵晔,丁文元,张为,等.促红细胞生成素对大鼠急性脊髓损伤后肢功能及 NF- κ B 表达的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2007,22(10):904—342.
- [12] 原睿智,张新定,冯伟,等.促红细胞生成素对大鼠创伤性脑损伤保护作用的研究[J].中国康复医学杂志,2008,23(11):1025—1027.

第三届全国门诊实用疼痛注射及神经阻滞技术新进展高级培训班的通知

由中华医学会继续教育部和首都医科大学宣武医院疼痛诊疗中心主办的国家级继续教育项目 [编号:2009-04-11-098]—“第三届全国门诊实用疼痛注射及神经阻滞技术新进展高级培训班”定于 2009 年 10 月 20—25 日在北京举办。

学习班邀请我国著名疼痛学专家严相默、倪家骧、安建雄、岳剑宁、武百山、戈晓东、马骏、何明伟等专家教授结合自己长期的临床经验,通过大量图片和现场录像进行专题讲解。本次学习班将专门设立小型专题讨论会,给学员提供与专家面对面交流的机会。并将为部分优秀学员提供宣武医院疼痛科门诊和病房现场观摩。学员可获得学习班讲座汇编和国家级继续教育学分 10 分。

会议日期:2009 年 10 月 20 日报到(全日),10 月 21 日—25 日;会议地点:京都紫禁城饭店(北京宣武区广安门南街 48 号)费用:会务费:1080 元,住宿费:130 元/床/天/人,由学员单位报销。报名:可通过电子邮件、手机短信报名,如需纸质通知请与我们联系。报名截止日期 2009 年 10 月 15 日。北京市宣武区长椿街 45 号首都医科大学宣武医院疼痛诊疗科,杨惠婕。邮编:100053。电话:010-83198161/010-63175890(传真)/13911907383。e-mail: yanghuijie@vip.sina.com。北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“门诊疼痛会议”,梁鸿;邮编:100710;电话:杨桂芳,010-88820399/51798200;梁鸿,010-85158402。E-mail: jxjy@vip.163.com,短信报名:13611002300(请注明会议名称、地点、工作单位、邮编、姓名及人数)。