

重组人促红细胞生成素对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障内皮屏障抗原及通透性的影响

Effects of rhEPO on endothelial barrier antigen expression and blood-brain barrier permeability after brain ischemia reperfusion injury in rats

刘式威^{1*}, 刘政华², 吕霞², 杨桂蓉³, 刘志刚¹, 尹岭⁴

1. 解放军 211 医院神经内科, 哈尔滨 150080

2. 解放军 65426 部队医院, 哈尔滨 150086

3. 哈尔滨香坊区民生社区卫生服务中心, 哈尔滨 150040

4. 解放军总医院神经信息中心, 北京 100837

[关键词] 重组人促红细胞生成素; 脑缺血; 再灌注损伤; 血脑屏障

[中图分类号] R 743.31

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2011)07-0802-03

重组人促红细胞生成素(rhEPO)通过降低过氧化反应水平、减少神经元的坏死和凋亡、促进新生血管再生、缓解血管痉挛、抑制炎症反应及调节神经递质等机制,对中枢神经系统具有保护作用^[1]。内皮屏障抗原(EBA)是一种膜蛋白,在血脑屏障内皮细胞特异性表达。Ghabriel 等^[2]认为 EBA 为血脑屏障内皮细胞紧密连接的主要成分,是观测血脑屏障屏障功能完整性的可靠指标。我们的前期研究表明,EBA 减少可作为脑缺血性血脑屏障损伤的一个敏感和特异标志物^[3]。内源性示踪剂 fibrinogen 为人正常血浆蛋白成分,对细胞无毒性作用,不受浓度、电荷及巨噬细胞的影响,更接近于在体情况,能真实、准确地反映血管通透状态。本研究利用 EBA 和 fibrinogen 作为观测指标,研究 rhEPO 对脑缺血再灌注损伤后血脑屏障 EBA 和通透性的影响,以揭示 rhEPO 对血脑屏障的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂 健康雄性 SD 大鼠 30 只,清洁级,体质量 230~250 g,由哈尔滨医科大学附属二院动物实验中心提供。rhEPO(沈阳三生制药股份有限公司),小鼠抗大鼠 EBA 单克隆抗体(Sigma 公司),兔抗鼠 fibrinogen 多克隆抗体(Sigma 公司),SABC 免疫组化试剂盒(北京友谊中联生物科技有限公司),DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,上海化学试剂公司)。

1.2 实验分组 30 只大鼠随机分成 rhEPO 治疗组、缺血再灌注组和假手术组 3 组,每组 10 只。所有大鼠均参照 Longa

线栓法^[4]建立大鼠局灶性脑缺血 2 h 再灌注 24 h 损伤模型,假手术组不结扎动脉。rhEPO 治疗组于缺血同时腹腔注射 rhEPO(3 000 U/kg),缺血再灌注组和假手术组缺血同时腹腔注射等量生理盐水。

1.3 冰冻切片制备 再灌注 24 h 后麻醉大鼠,断头取脑,弃去嗅脑与小脑,立即放入小冻存管中,投入液氮罐中速冻,OCT 包埋。用冷冻切片机把大脑组织以 2 mm 间距冠状切成 7 片,其中第 4 片再次冠状切片,片厚 10 μ m,连续取 2 张,其中 1 张行 EBA,1 张行 fibrinogen 免疫组化染色。然后把剩余 7 片脑片进行 TTC 染色。

1.4 TTC 染色 7 片脑片置于 2% TTC 磷酸盐缓冲液中,37℃避光温浴 30 min。TTC 被线粒体过氧化氢酶还原,可使正常脑组织染色呈红色,梗死组织呈白色。染色完成后,将切片移入盛有 10%甲醛溶液的避光器皿中固定 24 h。索尼 DSC-F828 型数码相机对每一脑片进行摄影并存入计算机内,用 Scion Image Beta 4.02 for windows 图像分析软件(Scion image 公司开发)对脑片缺血侧进行面积计算,所有脑片梗死面积之和乘以脑片厚度即为梗死体积(mm^3)。

1.5 免疫组化染色 按 SABC 法进行,一抗(EBA,1:400; fibrinogen,1:1 000)4℃孵育过夜,二抗滴加生物素结合的羊抗兔、鼠抗鼠 IgG,DAB 氧化酶法显色,苏木精复染,脱水、透明、封片,光镜观察。每张切片在 100 倍光镜下随机选取 5 个缺血半暗带视野区域,用 MIAS 医学图像分析软件计算免疫反应阳性细胞数。

1.6 统计学处理 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验进行统计学处理,检验水平(α)为 0.05。

[收稿日期] 2011-02-13

[接受日期] 2011-02-15

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划,2004CB720302)。Supported by National Key Basic Research Projects (“973” Program, 2004CB720302)。

[作者简介] 刘式威,博士,副主任医师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0451-83852416, E-mail: abcd9622@163.com

2 结 果

缺血再灌注组 EBA 表达数最低,假手术组 EBA 表达数最高,rhEPO 治疗组虽然较假手术组降低($P<0.01$),但较缺血再灌注组明显增加($P<0.01$)。缺血再灌注组 fibrino-

gen 表达数最高,rhEPO 治疗组虽然可见 fibrinogen 表达,但较缺血再灌注组减少($P<0.01$)。缺血再灌注组梗死体积最大,rhEPO 治疗组梗死体积与缺血再灌注组比较差异有统计学意义($P<0.01$),假手术组未见梗死。

见图 1。

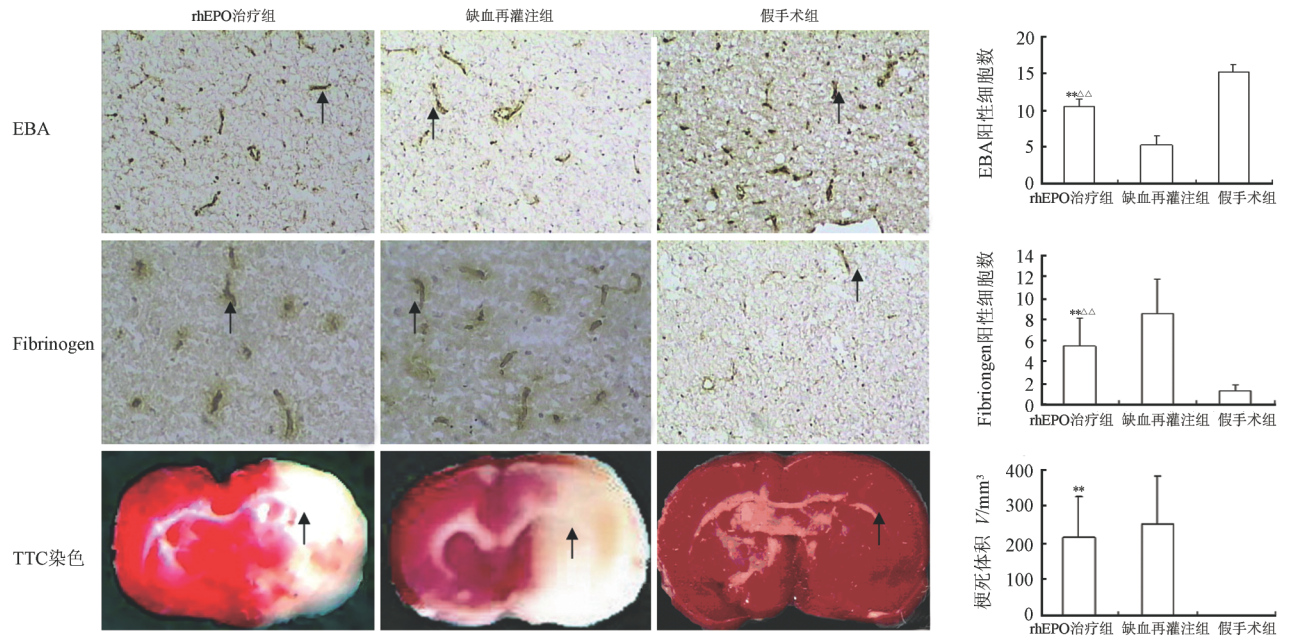


图 1 rhEPO 治疗组、缺血再灌注组和假手术组 EBA 的表达

内皮屏障抗原(EBA)表达(↑), original magnification: $\times 100$; Fibrinogen 表达(↑), original magnification: $\times 100$. TTC 染色: rhEPO 治疗组和缺血再灌注组缺血坏死区域表现为白色(↑),假手术组正常(↑). * $P<0.01$ 与缺血再灌注组比较; $\triangle P<0.01$ 与假手术组比较. $n=10$, $\bar{x}\pm s$

3 讨 论

脑缺血再灌注损伤是在脑缺血的基础上恢复血流后,脑组织的损伤反而加重的现象。目前,对脑缺血再灌注损伤的防治措施还相当有限,故各国学者一直在寻求更多更有效的治疗药物。近年来许多国内外文献报道 rhEPO 不仅具有促进造血祖细胞增殖分化的作用,而且对缺血缺氧性脑损伤大脑具有神经保护作用,其作用机制可能包括抗谷氨酸兴奋毒性^[6]、调节 NO 合成^[6]、抗氧化作用^[7]、抗炎作用^[8]、抗神经元凋亡^[9]、促进血管生成、促进神经元再生和神经营养作用等。

在脑缺血引起中枢神经病变的病理过程中,血脑屏障破坏是重要的标志。通过研究 rhEPO 对血脑屏障的影响,可以揭示 rhEPO 对中枢神经保护作用的血管机制。王社军等^[10]研究认为血脑屏障通透性改变与缺血后再灌注的时间密切相关,缺血再灌注 3 h,血脑屏障通透性开始增加;再灌注 6~12 h,通透性逐渐增加;再灌注 24 h,通透性明显增加,且达高峰;待再灌注 72 h 及 120 h,通透性又逐渐减小。为此本研究主要选取缺血再灌注 24 h 作为时间观测点,利用 EBA 和 fibrinogen 免疫组化染色检测 rhEPO 对血脑屏障 EBA 表达和通透性的影响,结果显示 rhEPO 治疗组 EBA 表达较缺血再

灌注组显著增加,fibrinogen 表达明显减少,梗塞体积明显缩小。结果说明 rhEPO 能显著增加 EBA 表达,减少内源性示踪剂 fibrinogen 的外渗,对血脑屏障具有保护作用。同时,本实验还证实 rhEPO 治疗能够缩小脑梗死体积,推测 rhEPO 可能通过直接或间接途径作用于血脑屏障内皮细胞,保护血脑屏障,从而实现对外周神经的保护,具体机制尚需进一步研究。

总之,本实验从血脑屏障角度证实 rhEPO 对大鼠脑缺血再灌注损伤的中枢神经具有保护作用,为临床应用 rhEPO 治疗缺血性脑血管病提供了依据。

[参 考 文 献]

[1] Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage[J]. Acta Paediatr Suppl, 2002, 91: 36-42.

[2] Ghabriel M N, Zhu C, Leigh C. Electron microscope study of blood-brain barrier opening induced by immunological targeting of the endothelial barrier antigen[J]. Brain Res, 2002, 934: 140-151.

[3] 刘式威, 刘政华, 吕霞, 刘志刚, 尹岭. 脑缺血再灌注损伤对大鼠血脑屏障内皮屏障抗原及通透性的影响[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31: 1258-1260.

- Liu S W, Liu Z H, Lv X, Liu Z G, Yin L. Effects of ischemia/reperfusion injury on endothelial barrier antigen expression and blood-brain barrier permeability in rats[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31: 1258-1260.
- [4] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.
- [5] Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 39469-39475.
- [6] Kilic E, Kilic U, Soliz J, Bassetti C L, Gassmann M, Hermann D M. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways[J]. FASEB J, 2005, 19: 2026-2028.
- [7] Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, Dede S, Haberal A, Beskonakli E, et al. Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain[J]. Childs Nerv Syst, 2003, 19: 19-22.
- [8] Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, et al. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis[J]. J Exp Med, 2003, 198: 971-975.
- [9] Mintzer M Z, Correia C J, Strain E C. A dose-effect study of repeated administration of buprenorphine/naloxone on performance in opioid-dependent volunteers[J]. Drug Alcohol Depend, 2004, 74: 205-209.
- [10] 王社军, 杜长生, 唐红, 李钟铭, 冯兴军, 张欣健, 等. 大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的改变[J]. 武警医学, 2005, 16: 745-747.

[本文编辑] 孙岩