

论著·实验研究

促红细胞生成素对新生大鼠感染性脑损伤后神经细胞增生与凋亡的影响

徐发林¹ 郭佳佳¹ 庄方莉² 张彦华¹ 王彩红¹ 安蕊¹

(1. 郑州大学第三附属医院新生儿科, 河南 郑州 450052; 2. 许昌市中心医院新生儿科, 河南 许昌 461000)

[摘要] 目的 研究促红细胞生成素(EPO)对新生大鼠感染性脑损伤后神经细胞增生与凋亡的影响。

方法 2日龄新生大鼠26只随机分为3组: 对照组(腹腔注入等量生理盐水)、脂多糖(LPS)组(腹腔注入0.6 mg/kg LPS)及EPO干预组(腹腔注入0.6 mg/kg LPS + 5000 U/kg EPO), 各组均连续注药5 d, 同时腹腔注射5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)(50 mg/kg, Qd, 连续5 d), 最后1次用药24 h后采用免疫组化方法检测脑组织海马齿状回颗粒下层BrdU和活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达情况。**结果** EPO干预组、LPS组脑组织海马齿状回单位面积内神经细胞数均显著低于对照组($P < 0.05$), 但EPO干预组与LPS组比较差异无统计学意义。EPO干预组BrdU阳性表达较LPS组显著增多(51 ± 9 vs 29 ± 6), 但仍较对照组(67 ± 12)减少($P < 0.05$)。EPO干预组活化的Caspase-3阳性表达较LPS组显著减少(27.9 ± 1.5 vs 34.0 ± 1.3), 但仍多于对照组(21.0 ± 1.7), 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** EPO可促进感染性新生大鼠脑损伤后海马区新生神经细胞的增生并减轻神经细胞的凋亡。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(3): 290-294]

[关键词] 促红细胞生成素; 5-溴脱氧尿嘧啶核苷; 活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3; 新生大鼠

Effects of erythropoietin on neuronal proliferation and apoptosis in neonatal rats after infection-induced brain injury

XU Fa-Lin, GUO Jia-Jia, ZHUANG Fang-Li, ZHANG Yan-Hua, WANG Cai-Hong, AN Rui. Department of Neonatology, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: xufalin72@126.com)

Abstract: Objective To investigate the effects of erythropoietin (EPO) on the neuronal proliferation and apoptosis in neonatal rats after infection-induced brain injury and the neuroprotective mechanism of EPO in neonatal rats with infection-induced brain injury. **Methods** Twenty-six two-day-old neonatal rats were randomly divided into 3 groups: control group (intraperitoneally given an equal volume of normal saline), lipopolysaccharide (LPS) group (intraperitoneally given LPS 0.6 mg/kg), and EPO group (intraperitoneally given LPS 0.6 mg/kg and EPO 5000 U/kg). These groups were injected with respective drugs for 5 consecutive days. Meanwhile, each group was intraperitoneally injected with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (50 mg/kg) once a day for 5 consecutive days. The expression of BrdU and cleaved Caspase-3 in the hippocampal dentate gyrus was detected by immunohistochemistry at 24 hours after the last injection. **Results** The number of neuronal cells in the hippocampal dentate gyrus in the LPS and EPO groups was significantly greater than in the control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the LPS and EPO groups. The EPO group had a significantly higher number of BrdU-positive cells in the subgranular zone of hippocampal dentate gyrus than the LPS group (51 ± 9 vs 29 ± 6 ; $P < 0.05$), but a significantly lower number of BrdU-positive cells than the control group (51 ± 9 vs 67 ± 12 ; $P < 0.05$). The EPO group had a significantly lower number of cleaved Caspase-3-positive cells in the subgranular zone of hippocampal dentate gyrus than the LPS group (27.9 ± 1.5 vs 34.0 ± 1.3 ; $P < 0.05$), but a significantly higher number of cleaved Caspase-3-positive cells than the control group (27.9 ± 1.5 vs 21.0 ± 1.7 ; $P < 0.05$). **Conclusions** EPO can promote hippocampal neuronal proliferation and reduce neuronal apoptosis in neonatal rats after infection-induced brain injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(3): 290-294]

Key words: Erythropoietin; BrdU; Cleaved Caspase-3; Neonatal rats

[收稿日期] 2013-07-21; [接受日期] 2014-01-08

[基金项目] 徐发林, 男, 博士, 副教授。

[作者简介] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(13A320664); 河南省高等学校青年骨干教师资助计划(2012ggjs-015)。

新生儿脑损伤是新生儿期最常见、最严重的疾病之一，是导致新生儿死亡和儿童致残的常见原因^[1]。随着新法复苏技术的普及以及产科分娩技术水平的提高，新生儿窒息的发生率明显下降^[2]，但新生儿脑损伤及其后遗症的发生率未见降低，却有增加的趋势，其原因可能与近年来早产儿的出生率大幅增加，而亚低温治疗等早期干预方案仅适合于足月新生儿脑损伤，早产儿脑损伤目前尚无公认有效的治疗措施有关^[3-5]。围生期感染是导致早产及早产儿脑损伤的重要原因，其机制可能与细胞因子、免疫反应、兴奋性氨基酸等介导的神经细胞凋亡有关。近年来，随着对促红细胞生成素（erythropoietin, EPO）功能的进一步探索和认识，EPO在脑损伤的保护作用方面也逐渐引起人们关注，但其机制尚未完全明确。本研究采用细菌脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）诱导法建立新生鼠脑损伤模型^[6]，采用新生细胞标记物-5-溴脱氧尿嘧啶核苷（BrdU）及细胞凋亡标志物-活化的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（Caspase-3），探讨EPO对新生大鼠感染性脑损伤后神经干细胞发生区域—海马齿状回颗粒下层神经细胞增生与凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗大鼠活化的Caspase-3多克隆抗体和兔抗大鼠BrdU多克隆抗体及两步法免疫组化试剂盒（SV002）均购于北京博奥森生物技术有限公司，DAB显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司，重组人EPO及重组人EPO空白对照品（仅含同等分量的辅料成分）（cEPO）均由成都地奥集团提供。

1.2 实验动物及分组

26只清洁级2日龄（P2）Sprague-Dawley（SD）新生大鼠[许可证号：SCXK（豫）2010-0002]由河南省实验动物中心提供，雌雄不限，体重 6.9 ± 0.4 g。在光照-黑暗各交替12 h条件下，由母鼠自由喂养，采用随机数字表法随机分成对照组（8只，腹腔注射等容积的生理盐水+等容积的EPO空白对照品）、LPS组（9只，0.6 mg/kg LPS+等容积的EPO空白对照品）及EPO干预组（9只，0.6 mg/kg LPS+5000 U/kg EPO）3组，各组均连

续注射5 d（即P2~P6）。通过连续腹腔注射5 d LPS（0.6 mg/kg）建立生后感染导致新生鼠脑损伤模型^[6]。各组新生大鼠同时腹腔注射50 mg/kg的BrdU，每日1次，连续注射5 d，并于最后1次注药后24 h（即P7）称重，灌注取脑，采用苏木素-伊红（HE）染色法计数海马齿状回单位面积神经细胞数，应用免疫组化法检测脑组织海马齿状回颗粒下层BrdU和活化Caspase-3蛋白的表达情况。

1.3 标本制作

3组新生大鼠于最后一次用药后24 h（P7），采用乙醚吸入麻醉，取仰卧位，剑突下呈V字形剪开皮肤，剪断两侧胸廓暴露心脏，右心耳处剪口，将连有头皮针的注射器刺入心尖处；生理盐水灌注，再用4%多聚甲醛灌注至躯体变硬苍白，打开颅腔快速剥取脑组织，浸泡固定于4%多聚甲醛中48 h，梯度酒精脱水和二甲苯透明，石蜡包埋。以海马部位为标志，冠状位连续切片，每隔20张留取1张，切片厚度为5 μ m，烤片后备用。

1.4 BrdU及活化Caspase-3免疫组织化学法

石蜡切片常规二甲苯脱蜡，梯度酒精水化，蒸馏水洗3次后，枸橼酸钠微波加热修复8 min（中高火3 min+低火5 min），冷却后蒸馏水洗2次，滴加3%过氧化氢温育10 min，蒸馏水、PBS各冲洗2遍，加封闭血清温育10 min，甩干分别滴加一抗（兔抗大鼠BrdU或兔抗大鼠活化的Caspase-3，1:50），37℃温浴1 h，4℃过夜。其中BrdU染色时，在滴加封闭血清及一抗前，需使DNA变性，即加2 M HCl，37℃30 min，滴加0.1 M 硼酸盐缓冲液（pH 8.5），10 min，PBS洗3次，各5 min。PBS冲洗后滴加生物素化二抗37℃温育30 min，PBS洗3次，DAB显色2~3 min，苏木素复染6~8 s，盐酸酒精分化，自来水冲洗，脱水、透明、中性树胶封片。PBS代替一抗作阴性对照。

1.5 HE染色

石蜡切片脱蜡，梯度酒精水化，滴加苏木精液染色2 min；蒸馏水洗1 min，盐酸酒精分化，蒸馏水洗2~3 s，滴加伊红溶液染色2 min；脱水、透明、封片。

1.6 细胞计数

采用Biosens Digital Imaging Systems V1.6分析系统进行细胞计数。随机计数每张切片海马齿状回部位5个100 μ m $\times$ 100 μ m面积内神经细胞数并

计算其均值，每一动物取5张切片再取均值，作为该动物海马齿状回单位面积内神经细胞数量（个/mm²）。每一动物取5张切片，计数每张切片相同视野下海马齿状回颗粒下层 BrdU 与活化 Caspase-3 的阳性细胞数，取其均值作为该动物 BrdU 和活化 Caspase-3 阳性细胞数，阳性细胞均表现为细胞核呈深棕色染色。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计学分析，计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组资料间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组新生大鼠体重比较

各组新生大鼠在 P2 时，体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；P7 时，各组新生大鼠体重差异明显，EPO 干预组和 LPS 组均低于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；但 EPO 干预组与 LPS 组比较

差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组脑组织海马齿状回神经细胞数的比较

HE 染色显示对照组海马齿状回细胞排列整齐、层次清晰；LPS 组细胞界限不清、层次紊乱，细胞数目减少；EPO 干预组较 LPS 感染组细胞层次清晰。EPO 干预组、LPS 组脑组织海马齿状回单位面积内神经细胞数均低于对照组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，但 EPO 干预组与 LPS 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表 2。

2.3 各组脑组织 BrdU 及活化 Caspase-3 表达水平的比较

海马齿状回颗粒下层 BrdU 阳性细胞和活化 Caspase-3 阳性细胞表现为细胞核呈深棕色染色。各组新生大鼠脑组织中均可见 BrdU 阳性细胞，其数量 3 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。EPO 干预组 BrdU 阳性细胞数较 LPS 组增多，但仍较对照组减少 ($P < 0.05$)。各组新生大鼠脑组织均可见活化 Caspase-3 阳性细胞，EPO 干预组活化的 Caspase-3 阳性细胞数较 LPS 组减少，但仍多于对照组 ($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

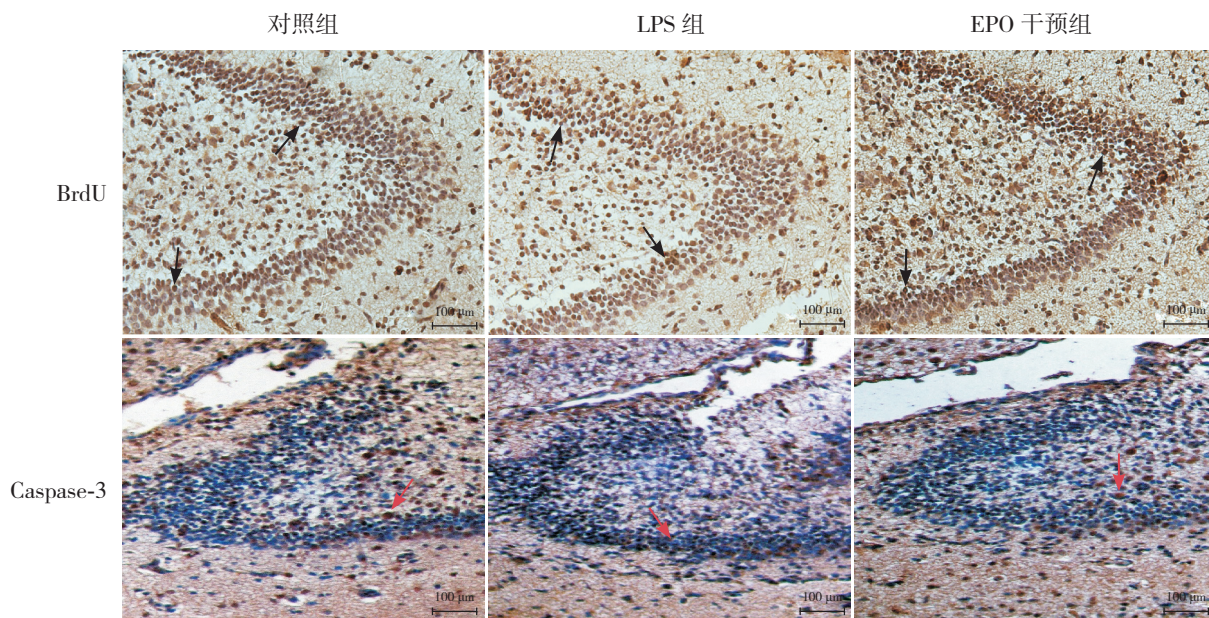


图1 各组新生大鼠海马齿状回颗粒下层 BrdU 及活化 Caspase-3 的阳性表达 (×400) EPO 干预组大鼠大脑海马齿状回颗粒下层 BrdU 表达较 LPS 组明显增多，但较对照组减少，BrdU 阳性细胞胞核呈棕褐色（黑色箭头所示）。EPO 干预组大鼠大脑海马齿状回颗粒下层活化 Caspase-3 的表达较 LPS 组减少，但仍多于对照组，活化 Caspase-3 阳性细胞表现为胞核呈深棕色（红色箭头所示）。

表 1 各组新生大鼠不同日龄体重变化的比较 ($\bar{x} \pm s$, g)

组别	例数	P2	P7
对照组	8	6.9 ± 0.3	13.3 ± 0.9
LPS 组	9	6.9 ± 0.5	11.4 ± 0.8 ^a
EPO 干预组	9	7.0 ± 0.4	11.4 ± 1.1 ^a
<i>F</i> 值		0.076	12.057
<i>P</i> 值		0.927	<0.001

注: a 为与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各组脑组织 BrdU、活化 Caspase-3 阳性细胞及神经细胞数的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BrdU	活化 Caspase-3	神经细胞数 (个/mm ²)
对照组	8	67 ± 12	21.0 ± 1.7	4 111 ± 857
LPS 组	9	29 ± 6 ^a	34.0 ± 1.3 ^a	3 078 ± 574 ^a
EPO 干预组	9	51 ± 9 ^{a,b}	27.9 ± 1.5 ^{a,b}	3 278 ± 502 ^a
<i>F</i> 值		26.345	193.02	6.167
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	0.007

注: a 为与对照组比较, $P < 0.05$; b 为与 LPS 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

围生期感染是导致早产及早产儿脑损伤的重要原因, 感染所致早产儿脑损伤防治的研究越来越引起人们的关注。早产儿脑损伤与中枢神经系统对疾病的易感性、感染诱发的固有免疫应答、全身性暴露于细菌感染而引起的脑组织炎症反应有关^[7]。目前, LPS 致脑损伤法是新生鼠出生后感染性脑损伤的常用动物模型^[8-9], 简单易行, 故本研究采用 2 日龄新生鼠连续 5 d 腹腔注射 0.6 mg/kg LPS 制成出生后感染性脑损伤的动物模型^[6], 探讨 EPO 对感染性新生大鼠脑损伤的保护作用及其相关机制。

EPO 是一种多功能细胞因子, 除具有促进未成熟前体红细胞增生作用外, 近年来研究发现脑组织内可见 EPO 表达, 且其与神经干细胞的增生、分化以及存活有关^[10]。在损伤和应激因素作用下, 脑组织内源性 EPO 短暂性表达增加作为神经营养因子减轻脑损伤程度或作为免疫调节因子及干细胞增生刺激因子促进脑组织的结构与功能重建^[11]。由于损伤后脑组织结构与功能的重建是一个慢性过程, 脑组织内需维持较高 EPO 水平以促进脑功能恢复; 然而, 外源性 EPO 是大分子物质, 能否通过血脑屏障成为关注焦点。动物实验及人体试验证实外源性 EPO 能透过血脑屏障进入脑组织, 对脑损伤有保护作用, 显示出较好的应用前景^[12-13]。

外源性 EPO 干预可起到神经保护作用, 这已在许多研究中证实。Kumral 等^[14]采用新生大鼠缺氧缺血性脑损伤 (HIBD) 模型发现模型制备成功后即刻腹腔注射小剂量 EPO 可以减少脑损伤的体积, 减少神经细胞凋亡数目, 说明 EPO 对 HIBD 有保护作用, 其机制之一可能为减少神经细胞凋亡。Shen 等^[15]通过建立孕鼠宫内感染模型发现, 新生大鼠生后立即给予 3000~5000 IU/kg 的 EPO 对感染所致少突胶质细胞损伤、反应性星形胶质化以及轴突损伤有保护作用, 可减轻神经纤维的损伤。Mizuno 等^[16]采用 3 日龄新生鼠脑室周围白质软化 (PVL) 模型发现, 在缺氧缺血 (HI) 前 15 min 给予小剂量 rhEPO 能有效保护 HI 后脑损伤。上述研究^[14-16]均表明 EPO 对脑损伤有保护作用。故本研究主要探讨 EPO 对感染性新生大鼠脑损伤后神经细胞增生与凋亡的影响, 为 EPO 治疗感染性脑损伤提供理论依据。

BrdU 是 DNA 前体胸腺嘧啶核苷类似物, 对处于 S 期细胞通过竞争方式掺入 DNA 单链, 通过免疫组化及免疫荧光技术可观察 S 期细胞分布, 故可用来鉴定新生细胞及其增殖情况^[17]。在中枢神经系统内, 神经干细胞能不断分裂出新生神经细胞, 而海马齿状回颗粒下层, 则是脑组织中主要的神经细胞增生区域之一, 且终身保持生成新生神经细胞能力。本研究发现, EPO 干预组海马齿状回颗粒下层 BrdU 的表达少于对照组, 但较 LPS 组明显增多, 提示 EPO 可促进感染性脑损伤新生大鼠海马区新生神经细胞的增生。活化 Caspase-3 是程序性细胞死亡的关键执行者, 且在调控病理性细胞凋亡中起关键作用, 是细胞凋亡的典型标志物。本研究发现 EPO 干预组活化 Caspase-3 的表达较 LPS 组减少, 但仍高于对照组, 提示 EPO 可减少感染性脑损伤新生大鼠海马神经细胞的凋亡。本研究发现 EPO 干预组与 LPS 组 P2、P7 时体重差异无统计学意义, 提示 EPO 对体格生长发育无明显影响。感染后海马齿状回神经细胞数较对照组减少, EPO 干预后并未发现能明显增加海马齿状回总神经细胞数量, 其原因可能与本研究仅采用 HE 染色, 而未对神经细胞进行特殊染色, 不易针对海马齿状回分子层、颗粒层、多形细胞层等进行分层计数有关。此外, 我们仅研究了海马齿状回颗粒下层的细胞增生情况, 并未探讨其分化

情况, 这些新生细胞是进一步分化为神经元还是神经胶质细胞, 尚需进一步探讨。

总之, EPO 可减轻感染性脑损伤新生大鼠海马齿状回神经细胞的凋亡、促进神经细胞的增生, 可能为 EPO 对感染脑损伤的神经保护作用机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, et al. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care[J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(4): 372-382.
- [2] Han W, Song J, Liu A, et al. Trends in live births in the past 20 years in Zhengzhou, China [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2011, 90(4): 332-337.
- [3] Rutherford M, Ramenghi LA, Edwards AD, et al. Assessment of brain tissue injury after moderate hypothermia in neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy: a nested substudy of a randomised controlled trial [J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(1): 39-45.
- [4] 张鹏, 程国强. 亚低温治疗新生儿缺氧缺血性脑病的研究进展 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(10): 918-922.
- [5] 刘敬, 杨于嘉, 封志纯. “早产儿脑损伤诊断与防治专家共识”解读 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(12): 885-887.
- [6] 徐发林, 庄方莉, 白琼丹, 等. 细菌脂多糖对不同成熟度新生小鼠脑发育的影响 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2012, 27(8): 611-613.
- [7] Mallard C, Wang X. Infection-induced vulnerability of perinatal brain injury [J]. *Neurol Res Int*, 2012, 2012: 102153.
- [8] Graf AE, Haines KM, Pierson CR, et al. Perinatal inflammation results in decreased oligodendrocyte numbers in adulthood[J]. *Life Sci*, 2014, 94(2): 164-171.
- [9] Du X, Fleiss B, Li H, et al. Systemic stimulation of TLR2 impairs neonatal mouse brain development[J]. *PloS One*, 2011, 6(5): e19583.
- [10] Neubauer AP, Voss W, Wachtendorf M, et al. Erythropoietin improves neurodevelopmental outcome of extremely preterm infants[J]. *Ann Neurol*, 2010, 67(5): 657-666.
- [11] Fan X, Heijnen CJ, van der Kooij MA, et al. Beneficial effect of erythropoietin on sensorimotor function and white matter after hypoxia-ischemia in neonatal mice[J]. *Pediatr Res*, 2011, 69(1): 56-61.
- [12] Zhu C, Kang W, Xu F, et al. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Pediatrics*, 2009, 124(2): e218-226.
- [13] Chen H, Spagnoli F, Burris M, et al. Nanoerythropoietin is 10-times more effective than regular erythropoietin in neuroprotection in a neonatal rat model of hypoxia and ischemia[J]. *Stroke*, 2012, 43(3): 884-887.
- [14] Kumral A, Uysal N, Tugyan K, et al. Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2004, 153(1): 77-86.
- [15] Shen Y, Yu HM, Yuan TM, et al. Erythropoietin attenuates white matter damage, proinflammatory cytokine and chemokine induction in developing rat brain after intra-uterine infection[J]. *Neuropathology*, 2009, 29(5): 528-535.
- [16] Mizuno K, Hida H, Masuda T, et al. Pretreatment with low doses of erythropoietin ameliorates brain damage in periventricular leukomalacia by targeting late oligodendrocyte progenitors: a rat model[J]. *Neonatology*, 2008, 94(4): 255-266.
- [17] Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation[J]. *Brain Res Rev*, 2007, 53(1): 198-214.

(本文编辑: 王晓莉)