

论著 · 实验研究

宫内窘迫大鼠脑组织促红细胞生成素及其受体的表达

张志敏 田兆方 李玉红 赵赛

(南京医科大学附属淮安第一医院新生儿科, 江苏 淮安 223300)

[摘要] 目的 观察促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)及其受体(EPOR)在宫内窘迫大鼠生后脑组织的动态表达规律,并探讨其意义。方法 采用结扎足月妊娠待产时母鼠双侧子宫动脉10 min 后行剖宫产制作新生大鼠宫内窘迫的模型作为实验组,研究新生大鼠生后不同时间点(0 h、2 h、6 h、12 h、24 h、48 h、3 d 和7 d)脑组织 EPO 及 EPOR 的动态表达情况,并同时检测血清 EPO 的水平。未结扎双侧子宫动脉的剖宫产新生大鼠作为对照组。结果 与对照组相比,实验组 EPO 蛋白和 mRNA 的表达在 2 h、6 h、12 h 等 3 个时间点明显增强(均 $P < 0.05$);EPOR 蛋白和 mRNA 的表达在 2 h、6 h、12 h、24 h、48 h、3 d 等 6 个时间点均明显增加(均 $P < 0.05$)。实验组血清 EPO 水平在生后 2 h 高于对照组,差异有统计学意义($t = 2.52, P = 0.02$)。结论 宫内窘迫新生大鼠生后脑组织 EPO 和 EPOR 在短期内迅速增加,而且 EPOR 高表达持续时间较 EPO 长。这一发现为外源性 EPO 治疗胎儿宫内窘迫致新生儿脑损伤提供了有力依据。 [中国当代儿科杂志,2011,13(11):912-916]

[关键词] 促红细胞生成素;促红细胞生成素受体;脑;宫内窘迫;新生大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)11-0912-05

Expression of erythropoietin and its receptor in the brain of newborn rats suffering from fetal distress

ZHANG Zhi-Min, TIAN Zhao-Fang, LI Yu-Hong, ZHAO Sai. Department of Pediatrics, Huai'an First Hospital Affiliated Nanjing Medical University, Huai'an 223300, China (Tian Z-F, Email: lyh0729@163.com)

Abstract: Objective To study the expression of erythropoietin (EPO) and its receptor (EPOR) in the brain of newborn rats suffering fetal distress. **Methods** A model of fetal distress was prepared by ligating bilateral uterine arteries of the rats with full-term pregnancy for 10 minutes before cesarean sections. The expression levels of EPO and EPOR in the brain of newborn rats were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot at 0, 2, 6, 12, 24, 48, 72 hrs and 7 days after birth. Serum EPO levels were measured using ELISA simultaneously. The newborn rats born by cesarean sections which were not subjected to uterine artery ligation were used as the control group. **Results** The expression of EPO protein and mRNA in brain tissues in the fetal distress group increased significantly compared with the control group 2, 6 and 12 hrs after birth ($P < 0.05$). The expression of EPOR protein and mRNA in brain tissues in the fetal distress group increased significantly compared with the control group 2, 6, 12, 24 and 48 hrs, and 3 days after birth ($P < 0.05$). Serum EPO levels in the fetal distress group were significantly higher than in the control group 2 hrs after birth. **Conclusions** The EPO and EPOR levels in the brain increase quickly after birth in newborn rats suffering from fetal distress. The EPOR is high expressed for a longer time than EPO. This can provide a basis for the treatment of neonatal brain damage induced by fetal distress by exogenous EPO.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (11):912-916]
Key words: Erythropoietin; Erythropoietin receptor; Brain; Fetal distress; Newborn rats

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是临床上常用的造血生长因子,其生物作用主要是通过相应靶细胞膜表面受体(erythropoietin receptor, EPOR)介导的^[1]。近年来其对新生动物缺氧缺血性脑损伤的保护作用已得到众多研究的证实^[2-4],但对于新生动物缺氧缺血性脑损伤后脑组织 EPO 及 EPOR 表达变化规律仍研究较少。本研究采用结扎足月妊娠待产母鼠双侧子宫动脉方法制作新生大鼠

[收稿日期]2011-06-11;[修回日期]2011-08-01
[作者简介]张志敏,女,硕士研究生。
[通信作者]田兆方,主任医师。

宫内窘迫的模型,以模拟新生儿窒息的临床过程,通过观察宫内窘迫大鼠生后脑组织 EPO 及 EPOR 表达变化规律,并与血清 EPO 水平相比较,从而探讨 EPO 及 EPOR 在预测宫内窘迫致脑损伤中的价值及外源性 EPO 治疗新生动物缺氧缺血性脑损伤的最佳时间窗。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Trizol(美国 Invitrogen 公司);RT-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 公司);ELISA 试剂盒(深圳晶美公司);CY-100 数字测氧仪(浙江省建德市利达仪器厂)。所有引物由上海生物工程公司合成。

1.2 实验动物分组及模型的制作

取江苏省实验动物中心妊娠足月待产 Sprague-Dawley (SD)大鼠,参考文献^[5]及本课题组前期的实验结果,采用结扎双侧子宫动脉,完全阻断血供 10 min 的方法建立围产期缺氧缺血性脑损伤动物模型,然后行剖宫产术娩出胎鼠,立即清除胎鼠口鼻分泌物,人工刺激呼吸,吸纯氧,使胎鼠迅速建立自主呼吸,上述操作过程在环境温度 30 ~ 32℃ 下进行。选取成活的新生鼠(实验组),按照随机的原则在出生后 0 h、2 h、6 h、12 h、24 h、48 h、3 d 和 7 d 等时间点各处死 10 只,同时于对应时间点选取相同数量的同期未结扎双侧子宫动脉的剖腹产新生鼠作为对照组。

1.3 标本取材及检测

1.3.1 标本采集 在出生后各时间点取对照组和脑损伤组各 10 只断头取脑;采用内眦静脉放血法留取静脉血后,迅速切取 5 mm 脑皮质,预冷生理盐水洗去血迹,从中间切开分为两份,一份迅速称重,加入多去污剂裂解缓冲液(100 mg/mL 裂解液)于裂解器内匀浆,匀浆液高速低温离心(15000 g, 15 min)后取上清液,分装, - 70℃ 保存。另一份保存在 Eppendorf 管中,存于 - 80℃ 冰箱,用于 RT-PCR 检测。同时在生后 3 d 时各选取 8 只动物,将全部脑组织放入 10% 多聚甲醛固定液中固定 48 h,石蜡包埋,于大脑皮层、海马、丘脑和小脑层面行水平方向切片,切片厚度为 6 μm,苏木精-伊红(HE)染色。

1.3.2 Western blot 检测脑组织 EPO 和 EPOR 蛋白表达 取前述上清测蛋白浓度,加上样缓冲液并于沸水中煮沸 5 min 后以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,然后把胶上的蛋白电转移到醋酸纤维素膜上,5% 无脂奶粉封闭,与待测蛋白的特异性抗体(稀释度均为 1:500)孵育杂交,4℃ 过夜洗膜后,

再加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,洗膜后进行显色,曝光于 X 线胶片上,利用图像分析系统计算目的蛋白条带灰度值与内参灰度值的比值,以代表目的蛋白的相对表达量。

1.3.3 RT-PCR 检测脑组织 EPO 及 EPOR mRNA 的表达 应用 Trizol 试剂常规一步法提取脑组织总标本总 mRNA。EPO 引物序列:上游 5'-CTCA-GAAGGAATTGATGTCTG-3',下游 5'-TCACGCCAAC-CCTCCACCAC-3',PCR 产物长度为 225 bp。EPOR 引物序列:上游 5'-CGCTACCACCGCATCATCCA-3',下游 5'-ATCCCAAGCCCAGAGAATGA-3',PCR 产物长度为 482 bp。GAPDH 引物序列:上游 5'-ATG-CATCCTGCACCAC-CAAC-3',下游 5'-TGGAGAAAC-CTGCCAAGTAT-3',PCR 产物长度为 320 bp。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,在凝胶成像系统中分别计算 EPO mRNA、EPOR mRNA 与 GAPDH 的灰度比值,即代表 EPO mRNA、EPOR mRNA 值。

1.3.4 病理学检测脑组织情况 按文献^[6]方法对脑组织进行病理学评分。每个动物的脑组织分别切取 4 张切片,每张切片观察不重叠的 10 个视野,分别记录病理学评分的值,4 张切片的平均值即代表该动物脑组织的病理学评分。

1.3.5 ELISA 法检测血清 EPO 浓度 血清 EPO 浓度的检测采用 ELISA 法,严格按照试剂盒要求进行操作。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件进行,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用样本均数的 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑组织病理学检测结果

随着生后存活时间的延长,实验组可见典型的缺氧缺血性脑损伤改变,大脑皮质的锥体细胞及海马颗粒细胞层表现为细胞体缩小,变成三角形,胞浆呈均匀的嗜伊红染色,胞核浓缩深染,结构消失,神经胶质细胞周围水肿,间隙增大形成多发的水肿灶及坏死灶,并伴有出血。同时可见小胶质细胞浸润增多,而对照组无上述变化(图 1)。其中 72 h 时间点两组间脑损伤病理学评分差异有统计学意义,实验组高于对照组(2.16 ± 1.22 vs 0.56 ± 0.43; *t* = 3.91, *P* = 0.001)。

2.2 血清 EPO 水平

ELISA 检测结果显示在 2 h 点实验组血清 EPO 水

平明显高于对照组,差异有统计学意义($t = 2.52$, $P = 0.021$),其余时间点差异均无统计学意义。见表1。

表1 两组 EPO 及 EPO mRNA 的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	脑 EPO		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	脑 EPO mRNA		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	血清 EPO(ng/ml)		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	对照组	实验组			对照组	实验组			对照组	实验组		
0 h	0.052 ± 0.023	0.051 ± 0.021	0.10	0.920	0.120 ± 0.051	0.123 ± 0.053	0.13	0.899	1.12 ± 0.33	1.08 ± 0.32	0.28	0.786
2 h	0.054 ± 0.025	0.123 ± 0.053	3.72	0.002	0.121 ± 0.053	0.181 ± 0.062	2.33	0.032	1.09 ± 0.32	1.55 ± 0.48	2.52	0.021
6 h	0.055 ± 0.019	0.145 ± 0.068	4.03	0.001	0.128 ± 0.049	0.196 ± 0.071	2.49	0.023	1.12 ± 0.35	1.11 ± 0.34	0.07	0.949
12 h	0.058 ± 0.022	0.095 ± 0.024	3.59	0.002	0.135 ± 0.025	0.175 ± 0.054	2.13	0.048	1.08 ± 0.30	1.05 ± 0.26	0.24	0.814
24 h	0.061 ± 0.020	0.062 ± 0.022	0.11	0.917	0.130 ± 0.050	0.129 ± 0.049	0.05	0.965	1.20 ± 0.40	1.21 ± 0.38	0.06	0.955
48 h	0.063 ± 0.030	0.065 ± 0.028	0.15	0.879	0.134 ± 0.056	0.131 ± 0.055	0.12	0.905	1.19 ± 0.41	1.20 ± 0.42	0.05	0.958
72 h	0.065 ± 0.031	0.067 ± 0.027	0.15	0.879	0.139 ± 0.062	0.141 ± 0.068	0.07	0.946	1.24 ± 0.41	1.22 ± 0.39	0.06	0.956
7 d	0.072 ± 0.035	0.075 ± 0.036	0.19	0.852	0.149 ± 0.065	0.152 ± 0.071	0.10	0.923	1.27 ± 0.63	1.25 ± 0.54	0.08	0.940

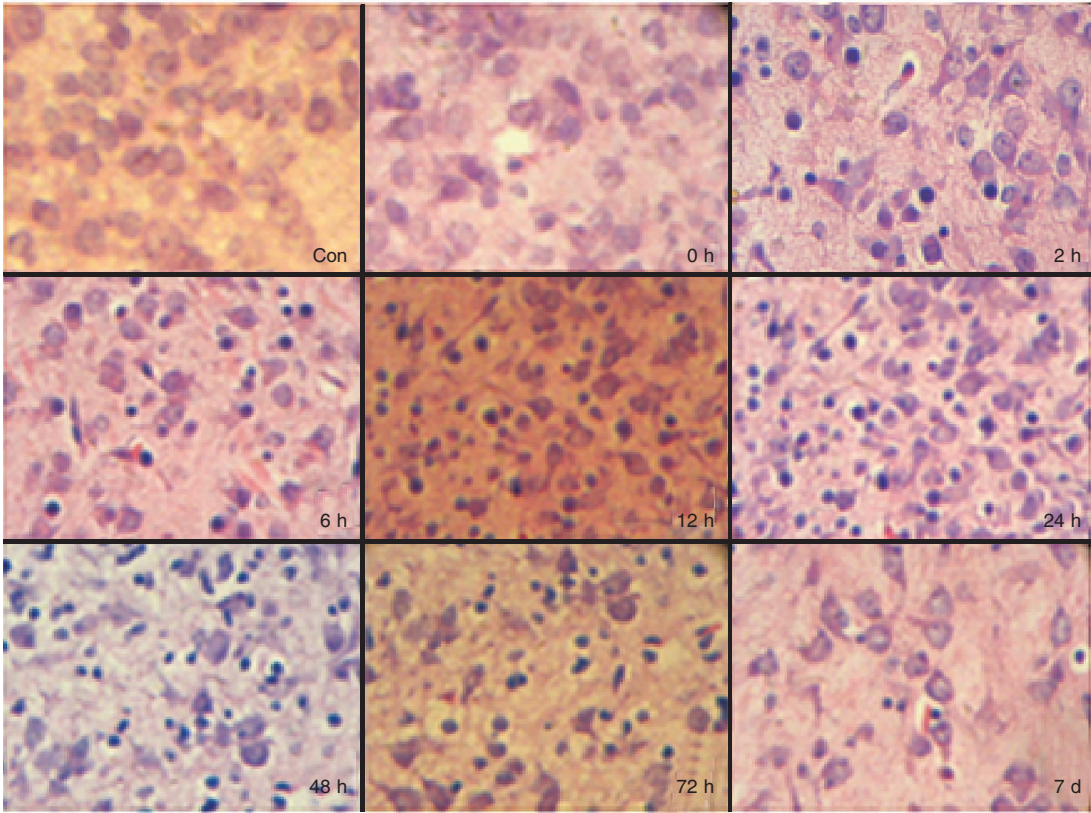


图1 不同时间点脑组织病理形态(HE染色,×200) 对照组(Con)脑组织形态正常。实验组0 h可见部分神经元肿胀,胞浆空泡化;2 h及以后组均可见神经元变形、变性,胞体变窄皱缩、核深染固缩、坏死。实验组小胶质细胞数目从6 h逐渐增多,12 h、24 h达高峰,48 h稍有减少,72 h明显减少,7 d可见神经元及小胶质细胞数目减少。

2.3 脑组织 EPO 和 EPO mRNA 的表达

与对照组相比,实验组在2 h、6 h及12 h等3个时间点 EPO 及 EPO mRNA 水平均显著增加,而其余5个时间点两组间差异无统计学意义。见表1。图2~3。

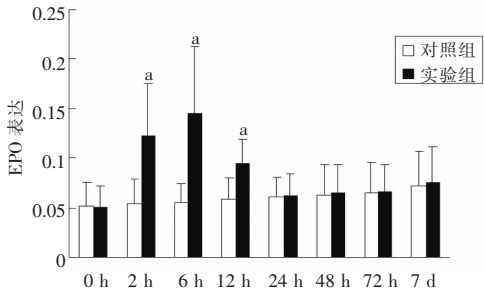


图2 不同时间点脑组织 EPO 表达($n = 10$) a:与同时点对照组相比, $P < 0.05$

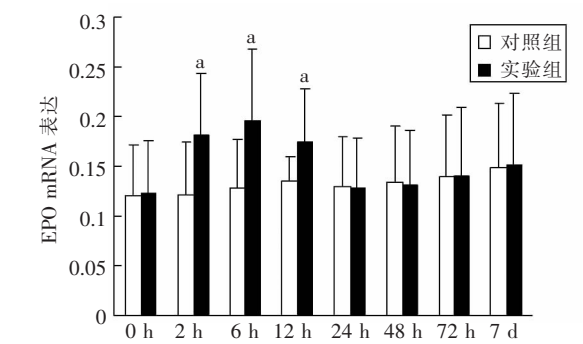


图3 不同时间点脑组织 EPO mRNA 表达 (n = 10)
a: 与同时时间点对照组相比, P < 0.05

2.4 脑组织 EPOR 和 EPOR mRNA 表达

与对照组相比,实验组在 2 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 等 6 个时间点 EPOR 及 EPOR mRNA 均显著增加,仅 0 h 及 7 d 时两组间差异无统计学意义。见表 2,图 4~5。

2.5 相关性分析

各时间点血清 EPO 与脑组织 EPO 水平无相关性。72 h 血清 EPO 水平与脑组织损伤评分;脑组织 EPO 水平与脑组织损伤评分及脑组织 EPOR 表达量之间均无明显相关性。

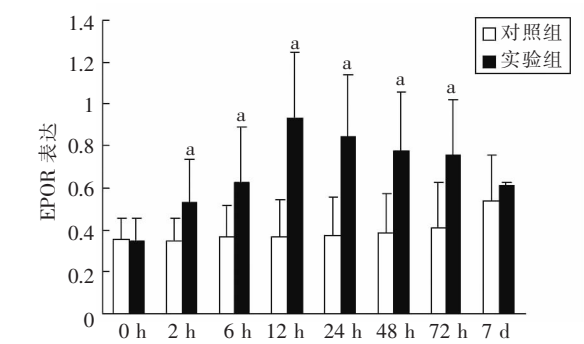


图4 不同时间点脑组织 EPOR 表达 (n = 10) a: 与同时时间点对照组相比, P < 0.05

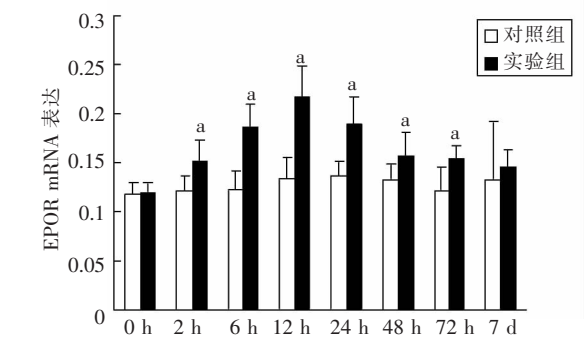


图5 不同时间点脑组织 EPOR mRNA 表达 (n = 10)
a: 与同时时间点对照组相比, P < 0.05

表 2 两组脑组织 EPOR 及 EPOR mRNA 的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	脑 EPOR		t 值	P 值	脑 EPOR mRNA		t 值	P 值
	对照组	实验组			对照组	实验组		
0 h	0.352 ± 0.103	0.345 ± 0.112	0.15	0.8860	0.118 ± 0.012	0.119 ± 0.011	0.19	0.8482
2 h	0.348 ± 0.105	0.527 ± 0.213	2.38	0.0284	0.121 ± 0.015	0.152 ± 0.021	3.80	0.0013
6 h	0.364 ± 0.156	0.627 ± 0.265	2.70	0.0145	0.123 ± 0.019	0.187 ± 0.022	6.96	<0.001
12 h	0.368 ± 0.172	0.932 ± 0.317	4.95	0.0001	0.134 ± 0.021	0.217 ± 0.031	7.01	<0.001
24 h	0.370 ± 0.186	0.845 ± 0.298	4.28	0.0005	0.136 ± 0.015	0.189 ± 0.029	5.13	0.0001
48 h	0.382 ± 0.191	0.778 ± 0.279	3.70	0.0016	0.132 ± 0.016	0.157 ± 0.024	2.74	0.0134
72 h	0.412 ± 0.211	0.754 ± 0.268	3.17	0.0053	0.121 ± 0.025	0.154 ± 0.013	3.70	0.0016
7 d	0.533 ± 0.223	0.612 ± 0.014	0.47	0.4694	0.132 ± 0.060	0.146 ± 0.017	2.01	0.0596

3 讨论

本组研究采用结扎足月妊娠待产母鼠双侧子宫动脉方法制作新生大鼠宫内窘迫的模型,并以生后 72 h 时间点的脑组织病理评分作为评价指标,结果发现 72 h 组脑组织病理呈现典型的缺氧缺血性改变,脑组织损伤评分较对照组明显增高,证明本组实验模型取得成功,这与文献的报道相一致^[5]。

为了评价宫内缺氧的程度,国内外针对 EPO 展开了众多的研究,有报道正常妊娠妇女在妊娠期的最后几个星期羊水中 EPO 浓度并没有升高^[7];缺血状态需持续 3~4 h 才能引起血中 EPO 水平升高,考

虑 EPO 水平升高是体内激素合成的结果,而不是体内储存的 EPO 的快速释放^[8]。近足月的鼠胎和羊胎在中度及重度缺氧的条件下血浆中的 EPO 于 2~3 h 开始升高^[9];Teramo 等^[10]认为慢性宫内缺氧死亡的胎儿羊水中 EPO 浓度仍有升高,而严重脐带扭转或胎盘早剥导致的急性缺氧死亡的胎儿羊水中 EPO 却未升高,因此利用羊水 EPO 监测可以判断新生儿死于急性或慢性缺氧。本研究表明宫内窘迫的新生大鼠血浆中 EPO 水平只在生后短期内升高,而后迅速恢复至正常水平,这与文献报道的不相一致;本研究中血清 EPO 水平与脑组织 EPO 水平无相关性,脑组织 EPO 与 EPOR 及脑组织损伤评分等均也未见明显相关性,具体的原因还有待于进一步探讨。

正常情况下脑组织有微弱的 EPO 及其受体的表达,神经元和胶质细胞可能是脑组织内源性 EPO 的来源,它们以旁分泌方式作用于 EPOR,参与调节神经细胞的活动^[1]。EPO 的生物学效应是通过激活特异性 EPOR 并启动相应的信号传导途径来实现的,主要有 STAT5 途径、MAPK 途径、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)途径。另外,EPO 可通过介导内皮细胞一氧化氮合成酶(NOS)的转录和活化,增加 NO 的生物利用率,并通过 Bcl-2 和 Bcl-XL 发挥抗凋亡作用^[11]。EPO 作为一种新型的多功能神经保护剂,具有明显的神经营养、神经保护和促进神经生长发育的作用等^[4]。本研究发现宫内窘迫大鼠生后脑组织 EPO 和 EPOR 在短期内迅速增加,这可能与脑组织启动内源性保护机制有关^[12]。而此后二者的表达呈现不同的规律,EPO 在 24 h 内恢复至正常水平,而 EPOR 的表达在较长时间内(7 d)持续维持较高的水平,这可能是外源性应用 EPO 保护缺氧缺血性脑损伤的分子学基础^[13-14]。因 EPO 具有通过血脑屏障的优势,如腹腔注射 EPO,可通过受损的血脑屏障在 6 h 内到达脑缺血部位^[15];早期给予大剂量重组 EPO 可减少围生儿脑损伤和改善神经发育^[16]。这些均可能与脑损伤后受体表达水平增加有关。但近期有研究表明,EPO 还能通过非 EPOR 途径产生脑保护作用^[17]。

综上所述,本研究发现宫内窘迫新生大鼠生后脑组织 EPO 和 EPOR 在短期内迅速增加,而且 EPOR 持续高表达,这为 EPO 及其新型衍生物治疗胎儿宫内窘迫致新生儿脑损伤提供了有力依据。

[参 考 文 献]

- [1] Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor[J]. Eur J Clin Invest, 2003, 33(10): 891-896.
- [2] 丁璐, 吴本清, 黄进洁, 刘智屏, 陈丽. 促红细胞生成素对新生大鼠高氧肺损伤细胞凋亡的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(7): 576-579.
- [3] 陈晓晴, 许华, 罗小平, 黎萍. 促红细胞生成素对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织存活素表达及神经细胞凋亡的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(2): 91-93.
- [4] van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Combination of deferoxamine and erythropoietin: therapy for hypoxia-ischemia-induced brain injury in the neonatal rat? [J]. Neurosci Lett, 2009, 451(2): 109-113.
- [5] 薄涛, 严超英, 霍淑芳, 李巍. 结扎孕鼠双侧子宫动脉复制围产期缺氧缺血性脑损伤动物模型[J]. 中风与神经疾病杂志, 2001, 18(1): 18-19.
- [6] Dereski MO, Chopp M, Knight RA, Rodolosi LC, Garcia JH. The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat[J]. Acta Neuropathol, 1993, 85(3): 327-333.
- [7] Marzo F, Lavorgna A, Coluzzi G, Santucci E, Tarantino F, Rio T, et al. Erythropoietin in heart and vessels: focus on transcription and signalling pathways [J]. J Thromb Thrombolysis, 2008, 26(3): 183-187.
- [8] Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(9): 1775-1793.
- [9] Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart [J]. J Clin Invest, 2003, 112(7): 999-1007.
- [10] Teramo KA, Widness JA. Increased fetal plasma and amniotic fluid erythropoietin concentrations: markers of intrauterine hypoxia [J]. Neonatology, 2009, 95(2): 105-106.
- [11] Kumral A, Genc S, Ozer E, Yilmaz O, Gokmen N, Koroglu TF, et al. Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. Biol Neonate, 2006, 89(3): 205-210.
- [12] Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system [J]. Brain Res, 2004, 1000(1-2): 19-31.
- [13] Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration [J]. Stroke, 2005, 36(8): 1672-1678.
- [14] Kumral A, Uysal N, Tugyan K, Sonmez A, Yilmaz O, Gokmen N, 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] Uzüm G, Sarper Diler A, Bahcekapili N, Ziya Ziyhan Y. Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol induced seizures [J]. Life Sci, 2006, 78(22): 2571-2576.
- [16] Fauchère JC, Dame C, Vonthein R, Koller B, Arri S, Wolf M, et al. An approach to using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants [J]. Pediatrics, 2008, 122(2): 375-382.
- [17] Xiong Y, Mahmood A, Qu C, Kazmi H, Zhang ZG, Noguchi CT, et al. Erythropoietin improves histological and functional outcomes after traumatic brain injury in mice in the absence of the neural erythropoietin receptor [J]. J Neurotrauma, 2010, 27(1): 205-215.

(本文编辑:王庆红)