

. 实验研究 .

重组人促红细胞生成素对大鼠颅脑损伤后 Survivin 表达的影响

雷鹏 彭龙锋 张兴超

【摘要】 目的 观察重组人促红细胞生成素(r-HuEPO)对大鼠颅脑损伤后伤侧脑组织核因子- κ B(NF- κ B)和 Survivin 表达的影响,探讨其脑保护机制。方法 选取 78 只健康雄性 Wistar 大鼠,随机分为假手术组(6 只)、颅脑损伤对照组(36 只)及 r-HuEPO 治疗组(36 只)。采用自由落体法建立大鼠颅脑损伤模型,应用 Epics XL 流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并应用免疫组织化学 SP 法检测 Survivin 和 NF- κ B 表达的变化。结果 与假手术组相比,颅脑损伤对照组的细胞凋亡率及 Survivin、NF- κ B 的表达水平明显升高($P<0.01$);与颅脑损伤对照组相比,r-HuEPO 治疗组除在伤后 6 h 和 7 d 外,其它各时相点的细胞凋亡率均明显降低($P<0.05$),且在伤后 1、2、3、5d 的 Survivin 表达及伤后各时间点的 NF- κ B 表达均较明显升高($P<0.05$)。结论 r-HuEPO 可促进 NF- κ B 及抗凋亡因子 Survivin 的表达而减少颅脑损伤后的细胞凋亡,发挥脑保护作用。

【关键词】 重组人促红细胞生成素;颅脑损伤;Survivin;核因子- κ B;凋亡

【文章编号】 1009-153(2007)06-0350-04 **【文献标识码】** A **【中图分类号】** Q 786; R 651.1+5

Effect of Recombinant Human Erythropoietin on Survivin Expression in Brain Tissues after Traumatic Brain Injury in Rats

LEI Peng, PENG Long-feng, ZHANG Xing-chao. Department of Neurosurgery, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command, PLA, Lanzhou Gansu 730050, China

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of recombinant human erythropoietin (r-HuEpo) on the expression of survivin after traumatic brain injury (TBI) in rats and the mechanisms of neuro-protection by r-HuEPO. **Methods** Seventy-eight adult Wistar rats were randomly divided into sham operation group ($n=6$), TBI group ($n=36$) and r-HuEPO group ($n=36$). The experimental TBI model was established by Feeney's method. The injured cerebral cortexes tissues were obtained 1 day after sham operation in sham operation group and 6 hours and 1, 2, 3, 5 and 7 days after the TBI in TBI and r-HuEPO groups for determining apoptosis of cells by Epics XL Flow Cytometer and the expressions of surviving and NF- κ B proteins by immunochemical method. **Results** Compared to the sham operation group, the number of apoptotic cells and survivin, NF- κ B immunopositive cells were significantly increased in the injured brain 3, 5 and 7 days after TBI ($P<0.01$). R-HuEPO significantly increased the expression of survivin and NF- κ B ($P<0.05$), and decreased significantly the apoptotic rates of cells compared to TBI group($P<0.05$). **Conclusion** The expression of NF- κ B increased by r-HuEPO might be one of the mechanisms in regulating survivin level, inhibiting neuronal apoptosis in the injury cortex.

【Key Words】 Recombinant human erythropoietin (r-HuEPO); Brain injury; Survivin; NF- κ B; Apoptosis

Survivin 是近来新发现的一种凋亡抑制基因,在正常成人组织中不表达,而在颅脑损伤后高表达^[1]。重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, r-HuEPO)在颅脑损伤后具有神经保护作用,但其机制尚不清楚^[2]。本研究观察 r-HuEPO 对损伤后伤侧脑组织核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)、Survivin 的表达以及对细胞凋亡的影响,以探讨其发挥神经保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 Epics XL 流式细胞仪 (美国

Becman-Coulter 公司), BI-2000 图像分析系统(成都泰盟科技有限公司), r-HuEPO (北京四环生物制药有限公司, 批号 S20020045), NF- κ B P65 单克隆抗体(鼠抗)、Survivin 多克隆抗体(兔抗)为 Santa Cruz 公司产品, SP 试剂盒(抗鼠和抗兔 IgG)和 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验动物及分组 选取由甘肃省中医学院动物实验中心提供, 动物质量合格证号为 SCXK (甘)

基金项目: 全军十一五医学基金资助(06G032)

作者单位: 兰州军区兰州总医院神经外科(甘肃兰州, 730050)

2004-007 的 78 只健康雄性 Wistar 大鼠, SPF 级, 体重(260±20)g, 随机分为假手术组(6 只)、颅脑损伤对照组(36 只)及颅脑损伤后 r-HuEPO 治疗组(36 只)。

1.3 动物模型的建立 采用 Feeney 法制作颅脑损伤模型^[1]。实验动物用戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 头部固定于立体定向仪上, 沿中线切开头皮, 剥离骨膜, 暴露右顶骨, 用牙科钻在冠状缝后 1.5 mm、中线旁 2.5 mm 处钻孔并扩大为一直径 5 mm 骨窗, 保持硬膜完整。用 40 g 砝码于 25 cm 高处沿外周导管坠落, 致右顶叶脑挫裂伤, 硬膜外置明胶海绵止血, 骨蜡封闭骨窗, 缝合头皮。假手术组除不打击外, 其它步骤同上。r-HuEPO 治疗组于颅脑损伤后立即经腹腔注射 r-HuEPO 3 000 IU/kg。假手术组在伤后 1 d, 其余两组在伤后 6 h 及 1、2、3、5、7 d 分别断头取脑, 每时间点各 6 只。

1.4 免疫组织化学技术检测 Survivin、NF-κB 表达 选取假手术右顶叶相对正常脑组织及其余两组损伤灶处具有完整皮层的组织, 常规石蜡包埋, 冠状面连续切片, 片厚 10 μm。采用免疫组化 SP 法检测三组大鼠所取脑组织在不同时间点 Survivin 和 NF-κB 的表达情况。在光镜下观察 Survivin 和 NF-κB 免疫反应的结果, 并采用 BI-2000 图像分析系统进行图像定量分析。Survivin 和 NF-κB 免疫组化染色标记强度用光密度(optical density, OD)值表示, 比较各组 OD 值的差异。

1.5 流式细胞仪检测神经细胞凋亡 取假手术组右顶叶相对正常脑组织及其余两组损伤灶处新鲜脑组织约 100~150 mg, 于 PBS 液中匀浆, 匀浆后组织用 400 目筛网过滤, 滤液放离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗两次, 再加 70% 的乙醇固定, 4 ℃过夜。次日离心去上清液, PBS 洗一次, 加 1 ml PI 染液(浓度为 50 μg/ml, 含生理盐水 32.4 ml, PI 2.5 mg, Rnase 0.5 mg, Triton-X-100 0.25 ml, 枸橼酸钠 50 mg, 加蒸馏水至 50 ml), 4 ℃避光条件下染色 30 min。应用 Epics XL 流式细胞仪记录氩离子激发光波长 488 nm 处红色荧光, 每个样本计数 10 000 个细胞, 以细胞

凋亡的百分率作为检测指标。

1.6 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。one-way ANOVA 进行组间比较, 用最小显著差法作两两比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 神经细胞凋亡率的变化 颅脑损伤对照组神经细胞凋亡率较假手术组增高, 伤后 2 d 达高峰, 此后逐渐下降, 但直至伤后 7 d 仍显著高于对照组水平 ($P < 0.01$)。r-HuEPO 治疗组除在伤后 6 h 和 7 d 外其它各时相点的细胞凋亡率均较颅脑损伤对照组明显降低 ($P < 0.05$) (见表 1)。

2.2 Survivin 和 NF-κB 表达的变化 Survivin 和 NF-κB 阳性染色定位于胞浆和(或)核膜, 呈黄色(见图 1, 2)。颅脑损伤后 3 d 在伤侧脑组织中可见 Survivin 少量表达, 7 d 达高峰, 与假手术组比较颅脑损伤对照组在 3 d、5 d、7 d 时 Survivin 的表达均明显升高 ($P < 0.01$); r-HuEPO 治疗组伤后 1 d 即见 Survivin 的高表达, 之后随着时间延长, 其表达明显增加, 5 d 时达高峰, 与颅脑损伤对照组相比, 在伤后 1 d、2 d、3 d、5 d 时 Survivin 的表达显著升高 ($P < 0.01$) (见图 3)。NF-κB 在伤后 6 h 即明显表达, 1 d 达高峰, 后逐渐下降, 7 d 时仍显著高于假手术组 ($P < 0.01$); r-HuEPO 治疗组各时间点伤侧脑组织 NF-κB 的表达较颅脑损伤对照组均明显升高 ($P < 0.05$) (见图 4)。

3 讨论

创伤性颅脑损伤是临床常见的致死性疾病之一, 其病理生理机制非常复杂, 对人类健康危害极大^[4, 5]。近年来有证据^[6]表明, 与颅脑损伤有关的细胞凋亡促进了继发性脑损害的发展, 导致病人预后不良。因此, 抗神经细胞凋亡成为创伤性颅脑损伤救治的重要方面。

近年来研究^[7, 8]证实, 促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是中枢神经系统内源性细胞因子, 通过神经元和胶质细胞的旁分泌作用, 作用于神经元 E-

附表 各组脑组织神经细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$, %)

组别	6 h	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
假手术组		2.06±0.53				
颅脑损伤对照组	10.96±1.24*	15.90±1.41*	22.76±1.86*	17.12±1.51*	16.42±1.07*	14.48±0.54*
r-HuEPO 治疗组	9.46±1.30	13.00±0.73 ^Δ	19.14±0.88 ^Δ	14.78±0.83 ^Δ	12.78±0.79 ^Δ	12.34±1.22

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与颅脑损伤对照组比较, $\Delta P < 0.05$

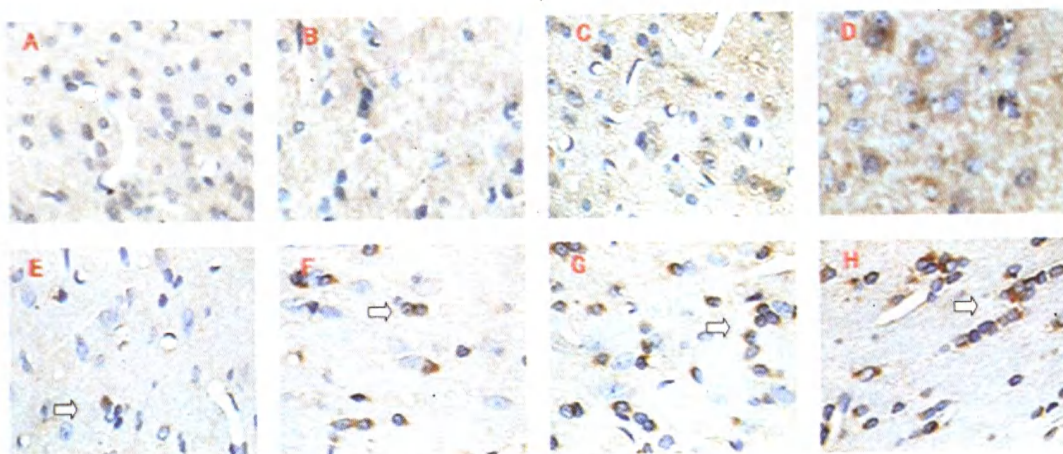


图1 颅脑损伤后 Survivin 表达的变化(SP,×400)

A~D 分别为对照组颅脑损伤后 1、3、5、7 d 伤侧脑组织 Survivin 表达的变化;E~H 分别为 r-HuEPO 治疗组相应时间点 Survivin 表达(↑示)的变化

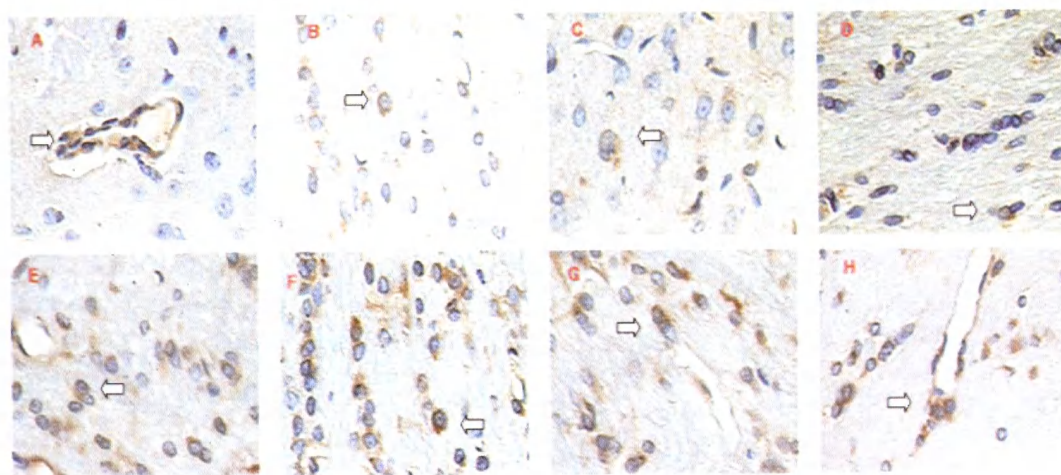


图2 颅脑损伤后 NF-κB 表达的变化(SP,×400)

A~D 分别为对照组颅脑损伤后 6 h 及 1、5、7 d 伤侧脑组织 NF-κB 表达(↑示)的变化;E~H 分别为 r-HuEPO 治疗组相应时间点 NF-κB 表达(↑示)的变化

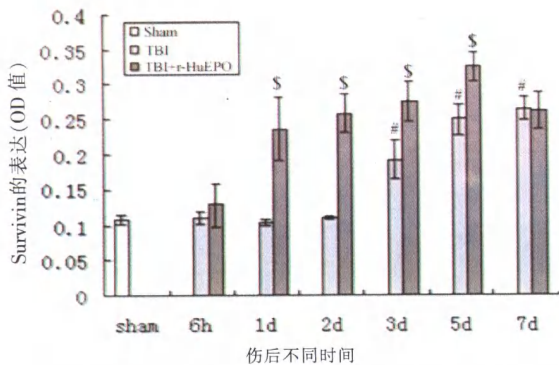


图3 各组大鼠伤侧脑组织 Survivin 表达的变化与假手术组比较,# P<0.01;与损伤对照组比较,\$ P<0.01

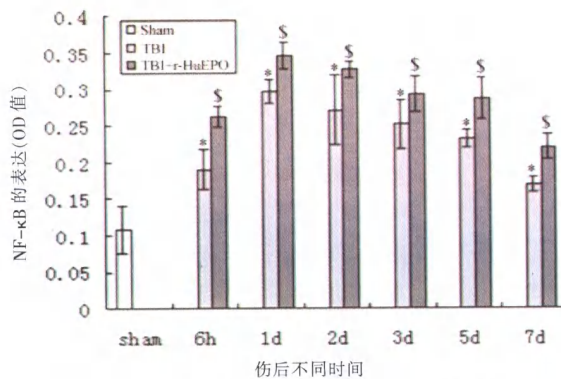


图4 各组大鼠伤侧脑组织 NF-κB 表达的变化与假手术组比较,* P<0.01;与损伤对照组比较,\$ P<0.05

PO受体,发挥神经保护和神经营养作用,而外源性的EPO在颅脑损伤情况下可以透过血-脑屏障对抗神经细胞凋亡起到脑保护作用。Yatsiv等^[2]报道在大鼠闭合性颅脑损伤后应用EPO可明显减少神经细胞凋亡和炎性反应,促进运动、认知功能的恢复。Kumral等^[9]研究发现EPO可以下调促凋亡基因bax和DP5的表达,减少细胞凋亡,从而发挥脑保护作用。但EPO是否可以通过上调Survivin的表达而发挥神经保护作用,国内外报道甚少。笔者通过本实验观察r-HuEPO对颅脑损伤后神经细胞Survivin和NF- κ B表达的影响,探讨其作用机制,为EPO的临床应用提供依据。

Survivin是凋亡抑制蛋白家族中的一个新成员,它是用效应细胞蛋白酶受体-1 cDNA从人类基因组库的杂交筛选中将其分离出来的,位于染色体17q25,其蛋白含有142个氨基酸。Survivin在正常分化成熟组织中不表达,而在大多数肿瘤组织及颅脑损伤组织中存在高表达,并发挥抗凋亡、调节细胞周期的作用^[1,10]。NF- κ B信号转导通路是参与细胞凋亡调控的重要信号系统,其上调可促进脑内大量抗细胞凋亡因子的表达,且参与颅脑损伤后编码炎性分子基因的转录^[11]。

本实验发现r-HuEPO治疗组Survivin的表达在颅脑损伤后早期就出现,且其表达峰值时间早于颅脑损伤对照组,与颅脑损伤对照组相比,在伤后1d、2d、3d、5d时,Survivin的表达水平显著升高($P < 0.01$),且细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$)。r-HuEPO治疗组各时间点伤侧脑组织NF- κ B的表达较颅脑损伤对照组均明显升高($P < 0.01$),且持续高水平表达,这说明r-HuEPO与其受体结合后可引起NF- κ B磷酸化,使NF- κ B活化并向核内易位,增加抗凋亡因子Survivin的合成和分泌,从而阻断细胞凋亡的过程,发挥脑保护作用。但NF- κ B活化又能促使许多促炎因子的基因表达,促进颅脑损伤后炎症反应进程,从而加重了颅脑损伤后的继发性脑损害^[12]。尽管如此,r-HuEPO对于颅脑损伤仍有治疗作用,但如何应用r-HuEPO来调节NF- κ B活性的动态平衡,使其尽可能发挥对颅脑损伤有利的作用,仍需进一步研究。

参考文献

1 Johnson EA, Svetlov SI, Wang KK, *et al*. Cell-specific DNA fragmentation may be attenuated by a surviving-de-

- pendent mechanism after traumatic brain injury in rats [J]. *Exp Brain Res*, 2005, 167(1): 17~26.
- 2 Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, *et al*. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury [J]. *FASEB J*, 2005, 19(12): 1701~1703.
- 3 江基尧,朱诚,罗其中. 现代颅脑损伤学[M]. 上海:第二军医大学出版社,2004. 417~419.
- 4 雷鹏,田立桩,王钰,等. 特重型颅脑损伤的综合救治[J]. *中华创伤杂志*, 2005, 21(7): 541~543.
- 5 雷鹏. 把握重型颅脑创伤救治的关键点[J]. *创伤外科杂志*, 2006, 8(5): 385~387.
- 6 Marciano PC, Brettschneider J, Manduchi E, *et al*. Neuron-specific mRNA complexity responses during hippocampal apoptosis after traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 2004, 24: 2866~2876.
- 7 Hasselblatt M, Ehrenreich H, Siren AL. The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease [J]. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2006, 18(2): 132~138.
- 8 兰海涛,张庆俊. 重组人促红细胞生成素对大鼠局灶性脑缺血再灌注炎症损伤的保护作用[J]. *中华神经外科*, 2006, 22(1): 51~54.
- 9 Kumral A, Genc S, Ozer E, *et al*. Erythropoietin downregulates bax and DP5 proapoptotic gene expression in neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Biol Neonate*, 2006, 89(3): 205~210.
- 10 Van Houdt WJ, Haviv YS, Lu B, *et al*. The human survivin promoter: a novel transcriptional targeting strategy for treatment of glioma [J]. *J Neurosurg*, 2006, 104: 583~592.
- 11 Sompol P, Xu Y, Ittarat W, *et al*. NF-kappa B-associated MnSOD induction protects against beta-amyloid-induced neuronal apoptosis [J]. *J Mol Neurosci*, 2006, 29(3): 279~288.
- 12 Williams AJ, Dave JR, Tortella FC. Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappa B (NF-kappa B), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration [J]. *Neurochem Int*, 2006, 49(2): 106~112.

(2006-12-19 收稿, 2007-03-13 修回)