

引用本文:王超,姜红春,刘丹.促红细胞生成素对低出生体质量新生大鼠缺氧缺血后脑神经细胞凋亡的影响[J].安徽医药,2021,25(10):1925-1928.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.10.004.

◇ 药学研究 ◇



促红细胞生成素对低出生体质量新生大鼠缺氧缺血后脑神经细胞凋亡的影响

王超,姜红春,刘丹

作者单位:衡水市人民医院新生儿科,河北 衡水 053000

摘要: **目的** 探究促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)对低出生体质量(low birth weight, LBW)新生大鼠缺氧缺血后脑神经细胞凋亡的影响。**方法** 2019年1—8月,选取自广东省医学实验动物中心购买的80只LBW新生大鼠以随机数字表法分为空白对照组、模型组、低剂量EPO组、高剂量EPO组,每组各20只;除空白对照组外,各组大鼠均采用结扎左侧颈总动脉并吸入80 mL/L氧气2 h制作为新生大鼠制成缺氧缺血性脑损伤(hypoxic ischemic brain damage, HIBD)动物模型;低剂量EPO组和高剂量EPO组于造模前、造模后7 d连续腹腔注射EPO($2\,500\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $5\,000\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),空白对照组和模型组腹腔注射等量的生理盐水;完成给药后24 h处死大鼠,使用HE染色法检测大鼠大脑皮层改变情况;使用TUNEL法检测大鼠神经细胞凋亡情况;使用蛋白质印迹法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X(Bax)蛋白表达情况;使用流式细胞仪检测大鼠脑神经细胞凋亡情况。**结果** HE染色结果显示,空白对照组大鼠大脑皮层细胞密集、排列有序,层次清晰、分明;模型组大鼠大脑皮层细胞明显肿胀坏死、空化、间隙增宽;低剂量EPO组大鼠大脑皮层细胞轻度水肿、排列较为稀疏;高剂量EPO组大鼠大脑皮层空白间隙增宽不明显、细胞层次较为分明、有序;TUNEL法结果显示,空白对照组、模型组、低剂量EPO组、高剂量EPO组大鼠神经细胞凋亡率分别为 $(10.21\pm 2.00)\%$ 、 $(65.85\pm 10.48)\%$ 、 $(40.32\pm 5.22)\%$ 、 $(20.79\pm 2.33)\%$,相比空白对照组,模型组神经细胞凋亡率、Bax、Caspase-3、Caspase-9蛋白相对表达量显著升高,Bcl-2蛋白相对表达量显著降低($P<0.05$);相比模型组使用EPO处理各组神经细胞凋亡率、Bax、Caspase-3、Caspase-9蛋白相对表达量显著降低,且高剂量EPO组低于低剂量EPO组($P<0.05$),Bcl-2蛋白相对表达量显著升高,且高剂量EPO组高于低剂量EPO组($P<0.05$)。**结论** EPO可以通过抑制凋亡蛋白的表达并促进抑凋亡蛋白的表达,保护LBW新生大鼠缺氧缺血后脑神经细胞。

关键词: 缺氧缺血,脑; 促红细胞生成素; 低出生体质量; 新生大鼠; 脑神经细胞; 细胞凋亡

Effects of erythropoietin on apoptosis of brain nerve cells in neonatal rats with low birth weight after hypoxia-ischemia

WANG Chao, JIANG Hongchun, LIU Dan

Author Affiliation: Department of Neonatology, Hengshui People's Hospital, Hengshui, Hebei 053000, China

Abstract: **Objective** To explore the effects of erythropoietin (EPO) on apoptosis of brain nerve cells in neonatal rats with low birth weight (LBW) after hypoxia-ischemia. **Methods** According to random grouping method, 80 neonatal rats with LBW purchased from Guangdong Medical Laboratory Animal Center in January 2019 to January 2019 were collected and assigned into blank control group, model group, low-dose EPO group and high-dose EPO group, 20 cases in each group. Except blank control group, left common carotid artery ligation and inhalation of 80 mL/L oxygen (2 h) were conducted to prepare neonatal rats of hypoxic ischemic brain damage (HIBD) models in the other group. Before and at 7 d after modeling, low-dose and high-dose EPO groups were given continuous intraperitoneal injection of EPO ($2\,500\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, $5\,000\text{ IU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), while blank control group and model group were intraperitoneally injected with the same volume of normal saline. At 24 h after administration, rats were sacrificed. The cerebral cortex changes were detected by HE staining. The apoptosis of nerve cells was detected by TUNEL. The expressions of cysteine proteinase-3 (Caspase-3), cysteine proteinase-9 (Caspase-9), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) were detected by Western blotting. The apoptosis of brain nerve cells was detected by flow cytometry. **Results** HE staining results showed that cerebral cortex cells were dense and well-arranged in blank control group, with clear and distinct nuance. The cerebral cortex cells in model group showed significant swelling, necrosis and cavitation, gap was widened. The cerebral cortex cells in low-dose EPO group showed mild edema. And their arrangement was relatively sparse. The gap whitening of cerebral cortex was not significant in high-dose EPO group. And cell nuance was relatively distinct and ordered. TUNEL results showed apoptosis rates of brain nerve cells in blank control group, model group, low-dose EPO group and high-dose EPO group were $(10.21\pm 2.00)\%$, $(65.85\pm 10.48)\%$, $(40.32\pm 5.22)\%$ and $(20.79\pm 2.33)\%$, respectively. Compared

with blank control group, apoptosis rate of nerve cells, relative expression levels of Bax, Caspase-3 and Caspase-9 were significantly increased in model group, while relative expression level of Bcl-2 was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with model group, apoptosis rate of nerve cells, relative expression levels of Bax, Caspase-3 and Caspase-9 were significantly decreased in all groups treated with EPO. The above indexes in high-dose EPO group were lower than those in low-dose EPO group ($P<0.05$). The relative expression level of Bcl-2 was significantly increased. And the above index in high-dose EPO group was higher than that in low-dose EPO group ($P<0.05$). **Conclusion** EPO can protect brain nerve cells of LBW neonatal rats after hypoxia-ischemia by inhibiting expression of apoptosis proteins and promoting expression of anti-apoptosis proteins.

Key words: Hypoxia-ischemia, brain; Erythropoietin; Low birth weight; Neonatal rat; Brain nerve cell; Apoptosis

在儿童早期防治成人期疾病已经成为世界范围的热点和趋势,新生儿体质量过低可能会导致缺氧缺血性脑病(HIE)^[1]。HIE是在围生期窒息引起的脑血流减少导致的脑损伤。目前我国新生儿HIE发病率高达3%~10%,虽然因地区不同而不同,但由此引起的行为障碍严重影响我国人口素质的提高^[2]。促红细胞生成素(EPO)作为一种能够调节血细胞生成的细胞因子,目前可以由人工合成与天然相同氨基酸序列的糖蛋白^[3-4],其能缓解脑部损伤,降低相关凋亡蛋白的合成保护HIE病人的脑神经细胞^[5]。但目前关于EPO对缺氧缺血后脑神经细胞凋亡的影响机制尚不能完全统一。2019年1—8月进行本研究,旨在观察EPO对低出生体质量新生大鼠缺氧缺血后脑神经细胞凋亡的影响,以期了解为临床研发HIE新药提供数据资料。

1 材料与方法

1.1 材料 低出生体质量(LBW)新生SD大鼠80只,SPF级,体质量(4.0 ± 0.2)g,购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2018-0002]。饲养温度20~25℃,相对湿度50%~65%,本研究符合一般动物实验伦理学原则。

1.2 药物与试剂 EPO(纯度>99.9%)购自上海凯茂生物医药有限公司;TUNEL细胞凋亡检测试剂盒购自Roche公司;中性福尔马林、酒精、二甲苯购自天津科密欧有限公司;B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)抗体(货号sc-7382,批号20190201)、Bcl-2相关X(Bax)抗体(货号sc-7480,批号20190301)购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)(1:500,货号201872169)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)(货号2018630258)购自武汉华联科有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)、HRP羊抗鼠IgG等二抗购自美国Thermo公司;Annexin V-FITC/PI试剂盒购于杭州四季青生物工程材料有限公司;PVDF膜、ECL发光液购自美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 分组及模型建立^[6] 将80只大鼠适应性喂养1周后,以随机数字表法选20只为空白对照组,

将余下大鼠采用结扎左侧颈总动脉并吸入80 mL/L氧气2 h制作新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)动物模型。具体操作如下:让大鼠吸入乙醚,消毒后从颈左侧切口,分离左侧颈总动脉结扎左侧颈总动脉,缝合皮肤。2 h后放置于缺氧舱内,通入氧体积分数为80 mL/L持续2 h,待大鼠苏醒后返回母鼠身旁哺乳喂养。

1.3.2 药物干预 完成大鼠模型建立后,低剂量EPO组和高剂量EPO组大鼠分别腹腔注射EPO,注射剂量分别为2 500 IU/kg和5 000 IU/kg,每日一次,连续注射7 d,模型组和空白对照组分别同时间注射等量生理盐水。药物使用剂量参考梁增红研究^[7]。

1.3.3 检测项目 HE染色:将实验大鼠的脑组织经甲醛固定,乙醛脱水处理制备石蜡标本,采用LD-66实验室切片机(长沙益广制药机械公司)进行4 μm厚切片,HE染色后采用SG-51型正置型金相显微镜(上海光学仪器厂)在400倍光镜观察肾小球结构。

TUNEL法检测大鼠神经细胞凋亡:取各组大鼠脑组织切片,按照TUNEL试剂盒说明要求书操作,DAB显色后二甲苯固定,晾干,荧光封片剂封片。荧光显微镜下观察结果:凋亡指数(%)=阳性细胞/总细胞×100%。

Western blotting 检测蛋白表达水平:取大鼠脑组织,消化后、提取总蛋白,转移至PVDF膜,经脱脂奶粉封闭,加入Caspase-3、Caspase-9、Bax、Bcl-2等一抗孵育过夜,加入HRP标记二抗,孵育2 h,将β-actin作为内参蛋白,ECL化学发光试剂显色,在凝胶成像系统(色列DNR公司)检测分析蛋白条带。

流式细胞仪检测大鼠后脑神经细胞凋亡:取大鼠脑组织,剪刀剪碎后制成细胞悬液,4℃离心5 min收集细胞;加入100 μL Binding Buffer重悬,加入5 μL Annexin V-FITC/PI工作液混匀;室温避光孵育15 min,采用MoFlo XDP型流式细胞仪(赛默飞世尔科技有限公司)检测大鼠后脑组织细胞凋亡情况。

1.4 统计学方法 采用SPSS 22.0分析数据,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验; $P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

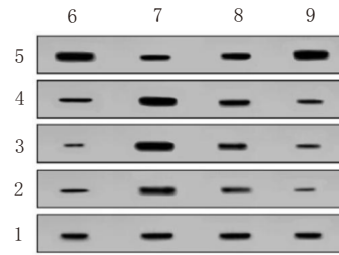
2 结果

2.1 HE 染色观察神经细胞凋亡 空白对照组中,神经细胞密集、排列有序,层次清晰、分明;模型组中,神经细胞明显肿胀坏死、空化、间隙增宽、大量细胞丢失且排列稀疏;低剂量 EPO 组中,部分细胞轻度水肿、空化、排列稀疏;高剂量 EPO 组中,少量细胞出现水肿、间隙增宽不明显、细胞层次较为分明,排列有序。见图 1A。

2.2 TUNEL 法检测大鼠神经细胞凋亡 空白对照组中,神经细胞无凋亡;模型组中,神经细胞大部分出现凋亡;低剂量 EPO 组中,部分神经细胞出现凋亡,高剂量 EPO 组中,少量神经细胞出现凋亡,见图 1B。空白对照组、模型组、低剂量 EPO 组、高剂量 EPO 组大鼠神经细胞凋亡率分别为 $(10.21 \pm 2.00)\%$ 、 $(65.85 \pm 10.48)\%$ 、 $(40.32 \pm 5.22)\%$ 、 $(20.79 \pm 2.33)\%$, 相比空白对照组,模型组大鼠神经细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$);相比模型组,低剂量 EPO 组大鼠神经细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$);相比低剂量 EPO 组,高剂量 EPO 组大鼠神经细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 凋亡相关蛋白表达 相比空白对照组,模型组大鼠脑组织 Bcl-2 蛋白相对表达量显著降低, Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白相对表达量显著升高 ($P < 0.05$);相比模型组,低剂量 EPO 组大鼠脑组织 Bcl-2 蛋白相对表达量显著升高, Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$);相比低剂量 EPO 组,高剂量 EPO 组大鼠脑组织 Bcl-2 蛋白相对表达量显著升高, Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$)。见图 2、表 1。

2.4 流式细胞仪检测大鼠后脑神经细胞凋亡 空白对照组、模型组、低剂量 EPO 组、高剂量 EPO 组大鼠后脑神经细胞凋亡率分别为 $(5.32 \pm 0.87)\%$ 、 $(22.36 \pm 4.52)\%$ 、 $(15.23 \pm 2.12)\%$ 、 $(10.36 \pm 1.98)\%$, 相比空白对照组,模型组大鼠脑组织神经细胞凋亡比例与正在凋亡的脑组织神经细胞显著升高 ($P < 0.05$);相比模型组,低剂量 EPO 组大鼠脑组织神经细胞凋亡比例与正在凋亡的脑组织神经细胞显著降低 ($P < 0.05$);相比低剂量 EPO 组,高剂量 EPO 组大鼠脑组织神经细胞凋亡比例与正在凋亡的脑组



注:1— β -肌动蛋白;2—半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9;3—半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3;4—Bcl-2 相关 X;5—B 淋巴细胞瘤-2;6—空白对照组;7—模型组;8—低剂量促红细胞生成素组;9—高剂量促红细胞生成素组。

图 2 各组小鼠凋亡相关蛋白表达 (Western blotting 检测)

表 1 各组小鼠凋亡相关蛋白表达 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	Bcl-2	Bax	Caspase-3	Caspase-9
空白对照组	20	1.70 ± 0.21	0.49 ± 0.10	0.25 ± 0.07	0.40 ± 0.08
模型组	20	0.61 ± 0.21^{①}	1.55 ± 0.15^{①}	1.80 ± 0.24^{①}	1.54 ± 0.20^{①}
低剂量 EPO 组	20	1.02 ± 0.15^{①②}	1.02 ± 0.16^{①②}	1.21 ± 0.10^{①②}	1.03 ± 0.15^{①②}
高剂量 EPO 组	20	1.69 ± 0.22^{①②③}	0.81 ± 0.12^{①②③}	0.75 ± 0.11^{①②③}	0.31 ± 0.04^{①②③}
F 值		143.893	218.805	412.632	377.82
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000

注: Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白, Bax 为 Bcl-2 相关 X 蛋白, Caspase-3 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 蛋白, Caspase-9 为半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 蛋白。

①与空白对照组相比, $P < 0.05$ 。②与模型组相比, $P < 0.05$ 。③与低剂量 EPO 组相比, $P < 0.05$ 。

织神经细胞显著降低 ($P < 0.05$)。见图 3。

3 讨论

EPO 是一种调节血细胞生成的细胞因子,具有促进红系祖细胞分为红细胞使得红细胞数量增加,加强机体对养分的利用,同时 EPO 还具有非造血功能,是一种具有抗凋亡活性的细胞因子^[8]。可有效缓解缺血缺氧导致的脑损伤。李晶晶等^[9]研究表明 EPO 可以与 EPOR 的同源二聚体结合调节造血反应,对缺血后的脑组织有一定的保护效果。目前临床上将 EPO 作为肾性贫血的常规用药,同时目前已有较多的研究证实 EPO 具有神经保护作用。

本研究通过 HE 染色观察脑组织神经细胞发现,

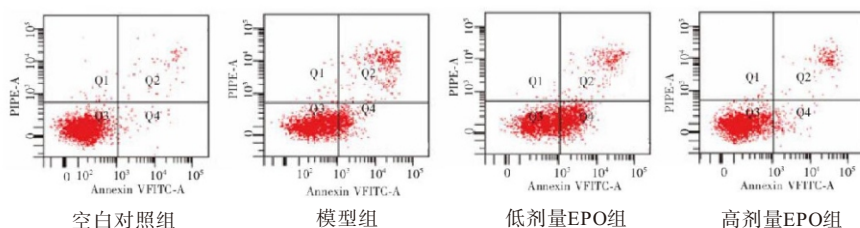


图 3 流式细胞仪检测大鼠后脑神经细胞凋亡

模型组大鼠神经细胞明显肿胀坏死、空化、间隙增宽、大量细胞丢失且排列稀疏;使用EPO处理后的各组大鼠部分细胞轻度水肿、间隙增宽不明显、细胞层次较为分明,排列有序,提示EPO对于改善大鼠神经细胞水肿现象具有十分积极的作用。同时本研究检测了大鼠神经细胞凋亡情况发现,相比模型组,使用EPO处理后的各组大鼠脑神经细胞的凋亡率显著下降,说明EPO对于抑制脑神经细胞的凋亡也具有十分积极的作用。鞠飞等^[10]研究报道,EPO对于缺血血压后神经损伤具有一定程度的抑制作用,与本研究结论类似。一方面,EPO可以有效激活细胞内的钙离子通道,减轻谷氨酸毒性,促进血管生成,从而增加大鼠脑内缺血区的血流量及氧合作用;另一方面,EPO可阻止自由基释放,影响神经递质的释放和抗炎作用,从而对中枢和外周神经系统起到神经保护作用。

研究显示,细胞凋亡过程可受到多种基因的调控,而Caspase家族基因,如Caspase-3、Caspase-9是常见的细胞凋亡调控基因之一^[11-12]。Caspase-9是线粒体凋亡途径的关键蛋白酶,其作为启动子,处于激活的顶端,可参与启动细胞程序性死亡,Caspase-3则是凋亡的主要执行者^[13-14]。Bcl-2家族基因也可以调控细胞的凋亡,其中最常见的包括Bcl-2和Bax^[15]。Bax是凋亡基因,可以促进细胞凋亡;Bcl-2则是抑凋亡基因,能够抑制多种细胞毒因素所引发的细胞死亡,表现出抑制细胞凋亡的作用^[16]。张晶等^[17]指出,EPO可以通过抑制脑神经细胞的凋亡来发挥神经保护作用,抑制新生大鼠脑组织中凋亡相关因子的表达。本研究在LBW新生HIBD大鼠中发现了类似的结论,结果显示,相比模型组,流式细胞仪检测EPO处理后组大鼠脑组织神经细胞凋亡比例与正在凋亡的脑组织神经细胞显著降低。同时流式细胞仪检测结果显示,使用EPO处理后组大鼠脑组织神经细胞凋亡细胞显著减少,同时正在凋亡与即将凋亡的细胞百分比也显著减少。这可能是因为,EPO能够作用于凋亡相关基因,从而实现对细胞凋亡相关蛋白表达的调节,最终达到抑制脑神经细胞凋亡的目的。

综上所述,EPO对于LBW新生大鼠缺氧缺血后脑神经细胞具有一定的保护作用,其机制可能与抑制凋亡蛋白的表达并促进抑凋亡蛋白的表达有关。但因EPO抑制新生大鼠缺氧后神经细胞的凋亡涉及的信号通路较多,在后续的实验中将进一步探讨信号通路在保护新生大鼠缺氧后神经细胞的凋亡的作用机制。

(本文图1见插图10-1)

参考文献

- [1] 刘芳,翟所迪. 1,6-二磷酸果糖治疗新生儿缺氧缺血性脑病的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2005, 5(9): 696-701.
- [2] 何桐爱. 高压氧综合治疗新生儿缺氧缺血性脑病的观察[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(34): 4783-4784.
- [3] 黄启丽,任静,谢燕媚,等. 重组人促红细胞生成素对新生大鼠高体积分数氧肺损伤细胞炎症的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(5): 383-388.
- [4] CARELLI S, GIALONGO T, VIAGGI C, et al. Recovery from experimental parkinsonism by intrastriatal application of erythropoietin or EPO-releasing neural precursors[J]. Neuropharmacology, 2017, 119: 76-90.
- [5] 荆春平,朱丽华. 促红细胞生成素干预早产儿脑损伤机制的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(7): 1500-1506.
- [6] 陈晓晴,许华,罗小平,等. 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.
- [7] 梁增红. 促红细胞生成素对新生大鼠缺氧缺血性脑病保护作用的研究[D]. 新乡: 新乡医学院, 2013.
- [8] 张晶,张承英. 抗EPO抗体特性、分类及其相关纯红细胞再生障碍性贫血的发病机制及诊治进展[J]. 武警医学, 2018, 29(12): 1169-1172.
- [9] 李晶晶,伍超,柯慧,等. 肾虚免疫低下大鼠EPO的变化及右归饮与外源性EPO的逆转作用[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1246-1257.
- [10] 鞠飞,张斯佳,王荣亮,等. 促红细胞生成素对中年小鼠脑缺血后神经新生的影响[J]. 生命科学仪器, 2018, 16(1): 32-37.
- [11] 周文旭,方堃,谭湘淑,等. 甲氨蝶呤对类风湿性关节炎大鼠滑膜细胞凋亡基因调控的实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2018, 47(4): 411-413, 416.
- [12] LU W, LU T, WEI X. Downregulation of DNMT3a expression increases miR-182-induced apoptosis of ovarian cancer through caspase-3 and caspase-9-mediated apoptosis and DNA damage response[J]. Oncology Reports, 2016, 36(6): 3597-3604.
- [13] 万超,朱小虎,程宇核,等. 内热针疗法对膝关节炎大鼠软骨细胞凋亡及Caspase-3和Caspase-9表达的影响[J]. 中国针灸, 2019, 39(4): 409-416.
- [14] TAIBI N, DUPONT J, BOUGUERMOUH Z, et al. Expression of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) in ovine testis (Ovis aries): in vivo regulation by nutritional state[J]. Anim Reprod Sci, 2017, 178: 9-22.
- [15] 李娅,张睿智,杨华林,等. 高压氧预处理对急性减压所致的大鼠肺组织细胞凋亡及Bcl-2/Bax表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(3): 401-404.
- [16] 范宗静,吴旻,唐杰,等. 缺血再灌注损伤人心脏微血管内皮细胞凋亡基因Bcl-2、Bax的表达及黄芪多糖干预研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5603-5606.
- [17] 张晶,董燕,胡宝玲,等. 3种神经细胞保护措施对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织Fas/FasL表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2019, 26(1): 11-15.

(收稿日期:2019-11-04,修回日期:2020-01-02)