文章编号:1000-5404(2007)23-2243-04

论著

促红细胞生成素及其受体在脑外伤后的表达及意义

廖正步[1],支兴刚[1],石全红[1],朱 继[1],刘北忠[2],钟 梁[2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院神经外科,[2]医学检验系,重庆 400016)

提 要:目的 观察促红细胞生成素(EPO)及其受体(EPOR)在急性重型脑外伤后大脑皮质内的动态表达规律,并探讨其意义。**方法** 将130只Wistar大鼠分为3组:正常组10只、对照组60只(仅行开颅术)和脑损伤组60只(Feeney法)。分别在伤后5、12、24 h及3、5、7 d断头取脑。采用RT-PCR、免疫荧光法检测EPO和EPOR的mRNA及蛋白的表达。**结果** 正常组和对照组各时间点有微量EPO及EPOR的表达,脑损伤组在伤后5 h见少量EPO mRNA和蛋白的表达,12 h和24 h表达升高,至3 d(mRNA 0.691±0.035,免疫阳性细胞78.4±6.32)达到高峰,5 d时下降,7 d时降至正常水平。而EPOR mRNA和蛋白在伤后5 h见少量表达,12 h时表达升高,至24 h(mRNA 0.736±0.017,免疫阳性细胞70.2±6.31)达到高峰,3 d(mRNA 0.641±0.027,免疫阳性细胞74.8±5.49)、5 d(mRNA 0.656±0.011,免疫阳性细胞69.5±7.21)和7 d(mRNA 0.771±0.017,免疫阳性细胞70.2±6.59)时仍维持在高表达水平,未见减弱。**结论** 大鼠急性重型颅脑损伤后大脑皮质内EPO短暂升高,而EPOR持续高水平表达且呈时间依赖性,提示颅脑损伤后外源性EPO能与持续高表达的EPOR结合产生神经保护作用。

关键词: 颅脑损伤;促红细胞生成素;促红细胞生成素受体;神经保护;免疫荧光;激光共聚焦显微镜
中图法分类号: R341; R361; R651.15 **文献标识码:** A

Expression of erythropoietin and its receptor in adult rat brain after acute traumatic brain injury

LIAO Zheng-bu[1], ZHI Xing-gang[1], SHI Quan-hong[1], ZHU Ji[1], LIU Bei-zhong[2], ZHONG Liang[2] ([1]Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, [2]Department of Medical Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of erythropoietin (EPO) and its receptor (EPOR) in adult rat brain after acute traumatic brain injury. **Methods** One hundred and thirty Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group ($n=10$), sham operation group ($n=60$) and brain injury group ($n=60$). The sham operation group and brain injury group were further randomly divided into 6 subgroups respectively according to different time points for sacrifice of the animals (5 h, 12 h, 24 h, 3 d, 5 d, 7 d). The expressions of EPO and EPOR at different time points were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunofluorescence staining. **Results** EPO and its receptor mRNA expressed in normal control group and sham operation group at each time point were just a small amount. RT-PCR and immunofluorescence stain revealed EPO mRNA and protein expressions sharply increased at 12 h, peaked at 3 d, gradually declined to 5 d, returned to normal level at 7 d. EPOR mRNA and protein expressions in brain injury group began to increase at 12 h after injury, peaked at 24 h, sustained to 7 d. **Conclusion** EPOR expression was significantly upregulated at least for 6 days after acute traumatic brain injury, while EPO mRNA and its protein were only shortly elevated. The protective mechanism of EPO on central nerve is possibly related to the markedly increased expression of erythropoietin receptor after traumatic brain injury.

Key words: traumatic brain injury; erythropoietin; erythropoietin receptor; neuroprotection; immunofluorescence; confocal laser scanning microscopy

作者简介: 廖正步(1976-),男,重庆市人,博士研究生,医师,主要从事颅脑损伤分子生物学方面的研究。电话:13098763718,E-mail:stonebu8@yahoo.com.cn
收稿日期: 2007-04-24;**修回日期:** 2007-08-25

促红细胞生成素(erythropoietin,EPO)的基本功能为促进红细胞生成[1]。最近研究表明,EPO 对颅脑损伤有明显的保护作用。其生物作用是通过相应靶细胞膜表面受体(erythropoietin receptor,EPOR)介导的[2];但目前对急性颅脑损伤后大脑皮质内 EPO 及 EPOR 表达变化规律仍少见文献报道。本研究采用 Feeney 法制作大鼠急性重型颅脑损伤模型,旨在探讨急性颅脑损伤后 EPO 及 EPOR 表达动态变化规律,为外源性 EPO 治疗颅脑损伤寻找理论依据和最佳时间。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

反转录试剂盒(RTS,美国 Promega 公司);*Taq*-DNA 聚合酶(美国 Promega 公司);聚合酶链反应(PCR)标记物(大连宝生物制品公司);EPO 兔抗鼠多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);EPOR 羊抗鼠多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 实验动物分组及模型的制作

1.2.1 实验动物与分组 健康 Wistar 大鼠 130 只,雄性,体质量 200~250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。动物分组:正常组 10 只、对照组 60 只和脑损伤组 60 只,根据处死时间,分为 5、12、24 h 和 3、5、7 d 6 个时相点,每个时相点对照组和脑损伤组各处死 10 只大鼠。

1.2.2 颅脑损伤模型制备 脑损伤组 60 只,采用 Feeney 法制备自由落体脑损伤模型:大鼠用 3% 戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔注射麻醉后,俯卧位固定。消毒后于矢状正中线切开头皮、骨膜,分离骨膜,于右侧顶部,前囟后 2 mm 中线旁开 2 mm,作一直径约 4 mm 的骨窗,保持硬膜完整。将其置于自由落体底部,40 g 砝码沿 25 cm 高处滑下,撞击于右顶骨窗之硬膜上。致伤面积 6~8 mm^2,致伤力 1 000 g/cm,下陷深度约 2 mm。对照组 60 只,只做一直径约为 4 mm 的颅骨骨窗,不作头颅打击。大鼠于手术后 2~8 h 均恢复进食。

1.3 标本取材

1.3.1 RT-PCR 标本取材 分别在术后 5、12、24 h 和 3、5、7 d,取对照组和脑损伤组各 5 只断头取脑;正常组 5 只在脑损伤组第 7 天时同时取脑。取以损伤灶为中心前后 5 mm 的大脑皮质,保存在 Eppendorf 管中,存于 -80 ℃冰箱,用于 RT-PCR 检测。

1.3.2 免疫荧光标本取材 分别于术后 5、12、24 h 和 3、5、7 d,取对照组和脑损伤组各 5 只断头取脑;正常组 5 只在脑损伤组第 7 天时同时取脑。以 1.5% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(30 mg/kg),左心室插管后,剪开右心耳,先灌注等渗盐水 200 ml,再灌注体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液 500 ml,然后切取以损伤灶为中心前后 5 mm 的大脑冠状切面,4% 的多聚甲醛溶液固定 24 h 后,做冷冻连续切片,并行免疫荧光染色。

1.4 RT-PCR 检测 EPO 及 EPOR mRNA 的表达

用 Trizol 试剂(美国 Gibco 公司)提取细胞的总 RNA,经紫外分光光度计测定波长为 260、280 nm 吸光度值的比值 $D(260)/D(280)$,-80 ℃保存备用。引物设计:在 GenBank 中查出 EPO 和 EPOR 基因及内参照基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的 mRNA 序列,用软件 PrimerPremier 5.0 在其阅读框内设计引物。所用引物序列均由上海生工生物工程公司合成。EPO 引物序列:上游:5′-CTCAGAAGGAATTGATGTCG-3′,下游:5′-TCACGCCAACCCTCCACCAC-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′-ATGCATCCTGCACCACCAAC-3′,下游:5′-TGGAGAAACCTGCCAAGTAT-3′,PCR 产物长度为 320 bp。以抽提的总 RNA 为模板,加入浓度为 10.0 mmol/L 的上下游引物,用 RT-PCR 法将总 RNA 逆转录成 cDNA,然后以逆转录产物为模板,以 GAPDH 为内参照进行 PCR 扩增。EPO 的 PCR 扩增条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,58 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,共循环 30 次,最后 72 ℃再延伸 10 min。EPOR 的 PCR 扩增条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 55 s,共循环 30 次,最后 72 ℃再延伸 10 min。PCR 反应体系中,省去 cDNA 者作为阴性对照。PCR 扩增反应结束后,分别取出 10 μl PCR 产物,在 2% 琼脂糖凝胶电泳凝胶成像系统成像,用 LabWorks 4.0 凝胶成像及分析系统分析 EPO 及 EPOR 与 β-actin 的吸光度值。各组 EPO/β-actin 和 EPOR/β-actin 吸光度值为 EPO 和 EPOR 的表达水平。

1.5 免疫荧光染色观察 EPO 及 EPOR 在皮质内的表达及分布情况

取每例冰冻切片各 5 片,经 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次×10 min 后,加入含 30 mg/L Triton X-100 的 PBS 30 min(室温);经山羊血清孵育 2 h(室温)后;再经兔抗大鼠 EPO 及 EPOR 多抗(1∶200,Sigma)孵育 12 h(4 ℃);经 FITC 标记的山羊抗兔(1∶200,Sigma) IgG 抗血清室温孵育 2 h(避光)。常规甘油与 PBS(1∶1)的混合液封片。每步骤后均用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)充分洗涤。用 PBS 代替一抗作阴性对照。在激光共聚焦显微镜下观察各组切片 EPO 及 EPOR 蛋白变化。采用图像分析软件(LSM;Zeiss,Oberkocn,Germany)对图像进行数字化分析,在设定的图像框面积下,测定高倍视野(×400)下各组 EPO 及 EPOR 蛋白阳性细胞数。

1.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行组间比较的单因素方差分析。

2 结 果

2.1 EPO mRNA 及 EPOR mRNA 的 RT-PCR 结果

2.1.1 EPO mRNA 的 RT-PCR 结果 对照组和脑损伤组 EPO 基因和内参照 GAPDH 基因的 RT-PCR 扩增产物的片段分别为 257、320 bp,结果均与预期相符,内参照基因扩增产物均

明显可见；在正常组中，EPO mRNA 有微量表达。对照组在各时相点均有微量 EPO mRNA 表达，与正常组比较变化无显著性差异（$P>0.05$）。脑损伤组伤后 5 h 见 EPO mRNA 少量表达，12、24 h 有明显表达，至 3 d 达到高峰，5 d 开始下降，与对照组比较有显著性差异（$P<0.05$）；第 7 天恢复到正常水平与对照组比较无统计学差异（$P>0.05$），见表 1。

2.1.2　EPOR mRNA 的 RT-PCR 结果　对照组和脑损伤组 EPOR 基因和内参照 GAPDH 基因的 RT-PCR 扩增产物分别为 485、320 bp，结果均与预期相符，内参照基因扩增产物均明显可见；在正常组中，EPOR mRNA 有微量表达。对照组在各时相点均有微量 EPOR mRNA 表达，与正常组比较变化无显著性差异（$P>0.05$）。脑损伤组伤后 5 h 见 EPOR mRNA 少量表达，12 h 有明显表达，至 24 h 达到高峰，3、5 d 和 7 d 时仍维持在高表达水平，与对照组比较有显著性差异（$P<0.05$）；24 h、3 d、5 d 和 7 d 无显著性差异（$P>0.05$），见表 1。

表 1　大鼠急性重型颅脑损伤后不同时相点大脑皮质中 EPO mRNA、EPOR mRNA 表达量（$n=5, \bar{x}\pm s$）

术后时间	对照组		脑损伤组	
	EPO	EPOR	EPO	EPOR
5 h	0.116 ±0.024	0.097 ±0.014	0.142 ±0.013	0.132 ±0.014
12 h	0.125 ±0.019	0.103 ±0.009	0.327 ±0.022[a]	0.327 ±0.020[a]
24 h	0.109 ±0.009	0.201 ±0.017	0.374 ±0.016[a]	0.736 ±0.017[a]
3 d	0.215 ±0.021	0.148 ±0.013	0.491 ±0.035[a]	0.641 ±0.027[a]
5 d	0.189 ±0.031	0.182 ±0.020	0.339 ±0.027[a]	0.656 ±0.011[a]
7 d	0.171 ±0.026	0.196 ±0.024	0.131 ±0.018	0.771 ±0.017[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.2　EPO 及 EPOR 免疫荧光结果

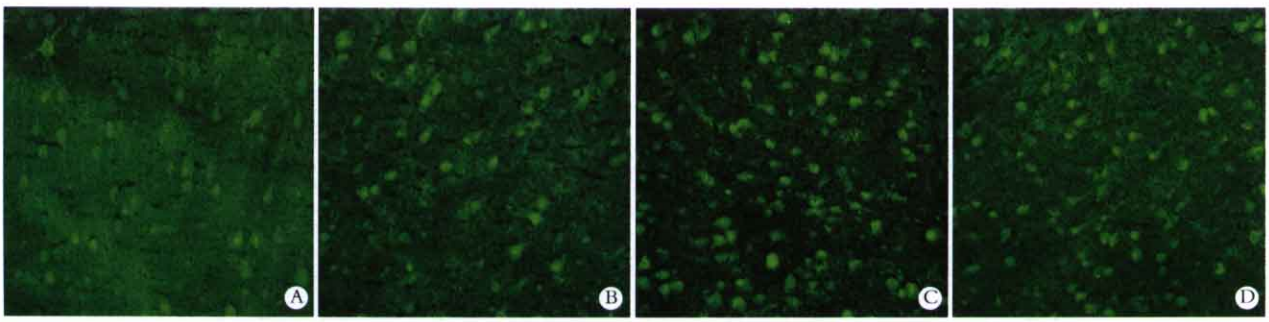
2.2.1　EPO 免疫荧光结果　EPO 蛋白染色阳性细胞主要分布在损伤侧和健侧皮质的细胞质中，呈绿色荧光。正常组和对照组有少量的 EPO 阳性细胞，主要表达于少突胶质细胞、神经元中，两者之间无显著性差异（$P>0.05$）。脑损伤组在伤后 5、12 h 增强不明显，24 h 表达增强，3 d 左右达高峰，第 5 天逐渐下降，较对照组明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。第 7 天恢复到正常水平，与对照组相比，差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图 1、表 2。

2.2.2　EPOR 免疫荧光结果　EPOR 阳性反应显色位于神经元和胶质细胞膜及细胞质中，呈绿色荧光。正常组和对照组大脑皮质神经元和胶质细胞有少量 EPOR 蛋白表达主要分布于大脑皮质；对照组与正常组比较无显著性差异（$P>0.05$）。而脑损伤组：在伤后 5、12 h 增强不明显，1 d 后表达明显增加，荧光亮度增强，在伤后第 3、5、7 天 EPOR 均持续高表达；损伤侧和健侧大脑皮质表达都较丰富，与对照组比较有显著性差异（$P<0.05$）。见图 2、表 2。

表 2　大鼠急性重型颅脑损伤后不同时相点大脑皮质中 EPO 及 EPOR 免疫荧光阳性细胞计数（$n=5, \bar{x}\pm s$）

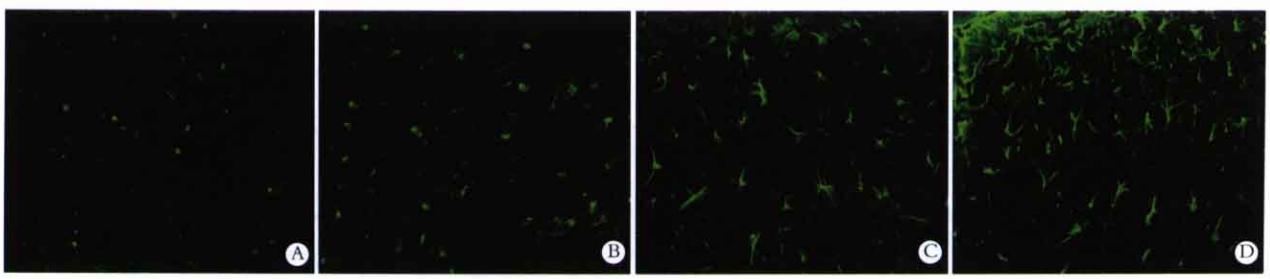
术后时间	对照组		脑损伤组	
	EPO	EPOR	EPO	EPOR
5 h	25.0 ±4.6	25.4 ±5.5	22.2 ±2.6	25.6 ±5.9
12 h	24.2 ±3.6	24.4 ±2.4	33.2 ±5.3	38.8 ±5.5
24 h	27.4 ±4.6	25.2 ±3.7	40.6 ±5.9[a]	70.2 ±6.3[a]
3 d	23.2 ±3.1	27.8 ±5.3	78.4 ±6.3[a]	74.8 ±5.5[a]
5 d	25.8 ±5.1	25.3 ±3.2	49.2 ±6.2[a]	69.5 ±7.2[a]
7 d	24.5 ±4.6	26.3 ±4.6	21.4 ±6.4	70.2 ±6.6[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较



A：5 h；B：12 h；C：3 d；D：5 d

图 1　大鼠急性重型颅脑损伤后不同时相点 EPO 在大脑皮质损伤周边区的表达　（免疫荧光 ×400）



A：5 h；B：12 h；C：3 d；D：5 d

图 2　大鼠急性重型颅脑损伤后不同时相点 EPOR 在大脑皮质损伤周边区的表达　（免疫荧光 ×400）

3 讨论

EPO是一种糖蛋白[1]，而EPO及EPOR在病理条件下对神经系统具有明显的保护作用[3]。实验证明在脑和脊髓缺血、外伤、炎症及其他代谢障碍时，EPO采用旁分泌的形式作用其受体[2]，提高神经元的存活能力。Kilic等[4]利用高表达EPO的转基因鼠制作大脑动脉缺血模型，发现该转基因鼠较野生型鼠梗死面积缩小84%。Sun等[5]对出生后7 d的大鼠采用单侧颈动脉结扎术，在术后3 d内每天给予EPO治疗，用实时荧光定量PCR技术检测梗死周边区白介素-1β表达变化，发现EPO治疗组能明显抑制白介素-1β增加，从而抑制脑缺血中的炎症反应，明显促进神经功能恢复。梁淑欣等[6]研究发现在大鼠视网膜缺血再灌注模型中，外源性EPO有助于防止视网膜神经节细胞的凋亡。von-Wussow等[7]发现在鼠的高颅压模型中当脑灌注压高于平均动脉压10 min时，外周血中的EPO含量明显增加，从而提示外伤后颅内压升高时可能通过内源性EPO分泌增加起到神经细胞的保护作用。本实验结果显示，大鼠急性颅脑损伤后，在mRNA水平、细胞水平都有内源性EPO的表达升高；伤后5 h见EPO mRNA少量表达，与对照组和正常组比较无显著性差异，12、24 h时有明显表达，至3 d时达到高峰，5 d时开始下降，与对照组和正常组比较有显著性差异，第7天恢复到正常水平，与对照组比较无统计学差异。免疫荧光法进一步证实：EPO阳性蛋白亦于相应时间点表达于损伤组大鼠大脑皮质中，其蛋白表达随时间变化的规律迟于mRNA水平。但除神经元胞体外，EPO还大量表达于少突胶质细胞，主要是在胞体的细胞质中。在颅脑损伤后24 h表达增强，3 d左右阳性细胞数达高峰，在第5天逐渐下降，第7天恢复到正常水平；从而提示在重型颅脑损伤后，EPO表达水平增高也发挥着内源性神经保护作用。

EPO的生物作用是通过相应EPOR介导的[8]，本实验旨在研究急性重型颅脑损伤后EPOR的分布及其随时间变化的规律，有助于我们明确EPOR在脑损伤后的生物学效应[9]，并为寻找最佳时间给予外源性EPO提供理论依据。我们研究发现，大鼠急性颅脑损伤后，在mRNA水平、细胞水平都有短暂内源性EPO的表达；而EPOR在mRNA、蛋白以及细胞水平表达却显著升高，说明颅脑外伤后EPO和EPOR的表达并不一致。EPO在外伤后第3天达高峰，第7天恢复到正常水平，而EPOR mRNA在伤后5 h有少量表达，12 h有明显表达，至24 h达到高峰，与对照组比较有显著性差异；3、5 d和7 d时仍维持在高表达水平。免疫荧光法提示急性重型颅脑损伤后EPOR蛋白阳性反应显色位于细胞膜及细胞质，在神经元及胶质细胞的胞体及轴突中有表达。脑损伤1 d后表达明显增加，荧光亮度增强，在伤后第3、5、7天EPOR均高表达，损伤侧及健侧大脑皮质神经元及胶质细胞的胞体与轴突表达较明显。体外培养的神经细胞在缺血、缺氧情况下，星形胶质细胞和神经元的EPOR表达迅速上调，并在伤后1个月内持续高表达。急性缺血性损伤发生后，血管、神经元和星形细胞表达EPOR上调，可维持18 d以上[8]。Gocht等[10]将无脊椎动物蚱蜢传入神经纤维阻断，并诱导大量EPOR在中间神经元显著表达，且直接浸润到相连的神经纤维网和临近的神经节中，抑制神经元凋亡和促进神经元再生。这提示在颅脑损伤后，特别是在EPOR大量表达时，给予外源性EPO可能发挥比较理想的神经保护作用。EPO在脑缺血模型中的神经保护机制与长时程激活ERK-1/-2、Akt、JNK-1/-2和Bcl-XL信号通路有关[4]，从而稳定线粒体膜电位，抑制细胞色素C释放[2]，减轻细胞脂质过氧化反应、防止细胞凋亡等。

综上所述，在急性重型颅脑损伤后，EPO在急性期内有短暂性升高，并很快回到基础水平；而EPOR在急性期伤后24 h可呈持续高水平表达。故在颅脑损伤早期，应用外源性EPO对神经系统有保护作用。

参考文献：

[1] Marti H H. Erythropoietin and the hypoxic brain[J]. J Exp Biol, 2004, 207(Pt 18): 3233-3242.

[2] Ruscher K, Freyer D, Karsch M, *et al*. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an *in vitro* model[J]. J Neurosci, 2002, 22(23): 10291-10301.

[3] Jelkmann W. Effects of erythropoietin on brain function[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2005, 6(1): 65-79.

[4] Kilic E, Kilic U, Soliz J, *et al*. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways[J]. FASEB J, 2005, 19(14): 2026-2028.

[5] Sun Y, Calvert J W, Zhang J H. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration[J]. Stroke, 2005, 36(8): 1672-1678.

[6] 梁淑欣，谢汉平，曾玉晓，等. 重组人促细胞生成素对大鼠视网膜缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报，2006，28(17)：1775-1777.

[7] von-Wussow U, Klaus J, Pagel H. Is the renal production of erythropoietin controlled by the brain stem? [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 289(1): E82-E86.

[8] Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, *et al*. Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection[J]. Clin Sci (Lond), 2002, 103(3): 275-282.

[9] 娄季宇，曾志磊，杨霄鹏. 不同剂量促红细胞生成素对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(2)：316-318.

[10] Gocht D, Sargin D, Sperling S, *et al*. Expression and function of erythropoietin and its receptor in invertebrate nervous systems[C]. G ttingen: G ttingen Meeting of the German Neuroscience Society, 2007, T3-6A.

（编辑 张大春）