文章编号:1000-5404(2009)15-1453-05

论著

重组人红细胞生成素对癫痫持续状态大鼠海马 p-Akt 和 XIAP 的影响

史志勤[1],王维平[1],于江华[2],郭 力[1],蒋国会[3],王海祥[1],范亚林[1] ([1]河北医科大学第二医院神经内科,石家庄 050000;[2]北京天坛医院神经介入科,北京 100050;[3]重庆市涪陵中心医院神经内科,重庆 408000)

摘 要:目的 观察重组人红细胞生成素(recombinant human EPO,rHuEPO)对戊四氮(Pentylenetetrazol,PTZ)点燃的癫痫持续状态(status epilepticus,SE)的SD大鼠海马神经元磷酸化蛋白激酶B(p-PKB/ p-Akt)和X-连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibtor of apoptosis protein, XIAP)表达的影响,应用磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidyl inositol 3 kinase, PI3K)抑制剂LY294002进一步探讨rHuEPO作用的可能机制。**方法** 采用PTZ制作大鼠SE模型,将点燃后的大鼠随机分为PTZ组(PTZ + NS)、rHuEPO组(PTZ + rHuEPO)、LY294002组(PTZ + LY294002 + rHuEPO)、LY294002溶剂二甲基亚砜(DMSO)对照组(PTZ + DMSO + rHuEPO),正常对照组腹腔注射生理盐水(n = 35)。观察大鼠行为学和脑电图的改变;TUNEL法检测海马神经细胞的凋亡情况;免疫组织化学法观察p-Akt、XIAP的表达;RT-PCR法检测各组大鼠海马XIAP mRNA的表达;Western blot法检测各组大鼠海马Akt、p-Akt蛋白的表达。**结果** 正常对照组仅见少量凋亡细胞,p-Akt和XIAP阳性细胞、p-Akt蛋白、XIAP mRNA均有少量表达;PTZ组与rHuEPO组、LY294002组、LY294002溶剂DMSO对照组比较,p-Akt和XIAP阳性细胞数、p-Akt蛋白表达及XIAP mRNA表达均减少($P < 0.05$),凋亡细胞数增加($P < 0.05$);rHuEPO组、LY294002溶剂DMSO对照组与LY294002组比较,p-Akt和XIAP阳性细胞数、p-Akt蛋白表达及XIAP mRNA表达均增加($P < 0.05$),凋亡细胞数减少($P < 0.05$)。**结论** rHuEPO在SE模型中活化了PI3K/Akt,提高p-Akt蛋白的表达,进而对线粒体凋亡途径的相关调控因子XIAP的表达进行了调控,从而介导线粒体凋亡途经,发挥抗凋亡、促存活的神经保护作用。

关键词: 癫痫持续状态;重组人红细胞生成素;磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B;X-连锁凋亡抑制蛋白
中图法分类号: R338.26;R749.1;R977.1 **文献标识码:** A

Effects of rHuEPO on p-Akt and XIAP expressions in hippocampus of statural epilepticus rats

SHI Zhi-qin[1], WANG Wei-ping[1], YU Jiang-hua[2], GUO Li[1], JIANG Guo-hui[3], WANG Hai-xiang[1], FAN Ya-lin[1] ([1]Department of Neurology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000; [2]Department of Interventional Neuroradiology, Beijing Tiantan Hospital, Beijing 100050; [3]Department of Neurology, Fuling Central Hospital, Chongqing 408000, China)

Abstract: Objective To observe the effects of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) on the expressions of p-Akt and XIAP in hippocampus of statural epilepticus SD rats and the influence of LY294002, the inhibitor phosphatidyl inositol 3 kinase. **Methods** SD rats were divided into normal control group (normal saline, NS), PTZ group (PTZ), rHuEPO group (PTZ + rHuEPO), LY294002 group (PTZ + LY294002 + rHuEPO), DMSO control group (PTZ + DMSO + rHuEPO). Changes of behavior and EEG recordings were observed. The apoptotic neurons of the hippocampal region were detected by TUNEL method. The expressions of p-Akt and XIAP were detected by immunohistochemical method. The expression of XIAP mRNA located in the hippocampus was detected by RT-PCR. The expressions of Akt and p-Akt protein were determined by Western blot. **Results** A small quantity of apoptotic neurons and p-Akt and XIAP positive neurons but low expressions of protein p-Akt and XIAP mRNA were found in the normal control group. Decreased p-Akt and XIAP positive cells and the expressions of protein p-Akt and XIAP mRNA but increased apoptotic neurons were

基金项目: 河北省自然科学基金(C2007000852);河北省科技攻关项目(07276101D-21)
Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2007000852) and the Key Sci & Tech Project of Hebei Province (07276101D-21)
作者简介: 史志勤,女,河北省衡水市人,博士研究生,主治医师,主要从事癫痫疾病方面的研究。E-mail:hsszq123@163.com
通信作者: 王维平,E-mail:ldh_wwp_lcy@163.com
收稿日期: 2008-10-16;**修回日期:** 2008-12-09

found in the PTZ group as compared with those in the rHuEPO group, LY294002 group and DMSO control group ($P<0.05$). Increased p-Akt and XIAP positive cells and expressions of protein p-Akt and XIAP mRNA but decreased apoptotic neurons were found in rHuEPO group and DMSO control group as compared with those in the LY294002 group ($P<0.05$). **Conclusion** rHuEPO could activate the signal delivery systems of PI3K/Akt in the SE model and increase the expression of p-Akt protein, and hence mediate the approach for chondriosome apoptosis and neuroprotective effect in anti-apoptosis and enhancement of neuron survival though the regulation of the expression of XIAP, the apoptosis related regulating factors.

Key words: statual epilepticus; recombinant human EPO; PI3K/Akt; XIAP

近期研究表明红细胞生成素(erythropoietin,EPO)是一种能被选择转运的大分子物质,可通过一种特殊的可饱和转运机制透过血脑屏障,神经胶质细胞、神经元和内皮细胞均有 EPO 及其特异性受体的表达。脑缺血、新生儿缺血缺氧性脑病、脊髓损伤、闭合性脑外伤等实验中, EPO 均具有神经保护功能[1-3]。EPO 在神经系统中的具体机制正在进一步的探索中,而且 EPO 在癫痫中对神经细胞是否具有保护作用研究甚少。本实验使用戊四氮点燃大鼠 SE 模型研究 rhuEPO 的作用,并通过抑制 PI3K/Akt 途径探讨 rhuEPO 可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠 298 只,由河北省实验动物中心提供。实验起始体质量(220 ± 20)g,12 h 光亮/黑暗条件,22 ~ 25 ℃ 环境温度,各组动物混合饲养。

1.2 主要实验试剂及器材

PTZ、LY294002 购自美国 Sigma 公司;rHuEPO (重组人红细胞生成素,济脉欣)购自华北制药金坦生物技术股份有限公司;原位细胞凋亡检测试剂盒购自美国 ROCHE 公司;DMSO、兔抗 Akt 多克隆抗体、兔抗 p- Akt(Thr-308)多克隆抗体购自Santa Cruz 公司;兔抗 XIAP 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(Novagen);TRIzol(Invitrogen);RT-PCR 反转录及扩增试剂(Promega 公司),引物(上海生工生物技术有限公司)。

脑电图机(日本 Neu- rofax 7314F);立体定向仪(日本 Narishige SR-6N);病理图像分析仪系统(Olympus 显微镜,病理图像分析软件由北京航空航天大学图像中心制造);Western blot 远红外荧光扫描成像系统(Odyssey);PCR 仪(Eppendorf);凝胶扫描分析系统(Syngene 公司)。

1.3 方法

1.3.1 癫痫持续状态(status epileptics, SE)模型制备及实验分组 健康成年雄性 SD 大鼠 298 只,将大鼠按随机数字表法分组。参照文献[4]方法建立动物模型:PTZ 20 mg/kg 大鼠腹腔注射,然后每 10 min 注射 10 mg/kg,直至达到 SE。大鼠惊厥的行为表现采用 Racine 六级评价标准,Ⅳ、Ⅴ级发作即为全身性惊厥大发作,持续 30 min 及以上者为 SE。制模过程中因长时间持续的强直惊厥而死亡或不符合模型要求的大鼠,予以剔除并随机补充。筛选补充后获得合格动物 175 只,分为 5 组:正常对照组(NS)、PTZ 组(PTZ + NS)、rHuEPO 组(PTZ + rHuEPO)、LY294002 组(PTZ + LY294002 + rHuEPO)、LY294002 溶剂 DMSO 对照组(PTZ + DMSO + rHuEPO),每组 35 只动物。

1.3.2 给药 PTZ 组:腹腔注射 PTZ 点燃 SE 发作后30 min,腹腔注射生理盐水;rHuEPO 组:腹腔注射 PTZ 点燃 SE 发作后 30 min, 腹腔注射 rHuEPO 5 000 U/kg[5]; LY294002 组:LY294002 溶于 DMSO 中,浓度为 10 μg/5 μl, 给药体积 5 μl,腹腔注射 PTZ 点燃 SE 发作后 10 min,脑室注射给予 5 μl LY294002, SE 发作后 30 min 腹腔注射 rHuEPO 5 000 U/kg; LY294002 溶剂 DMSO 对照组:腹腔注射 PTZ 点燃 SE 发作后 10 min,脑室注射给予 5 μl DMSO,SE 发作后 30 min 腹腔注射 rHuEPO 5 000 U/kg;正常对照组:腹腔注射相同体积、次数的生理盐水。

1.3.3 大鼠侧脑室立体定位及注射给药 根据 George Paxions 的《The Rat Brain in StereotaxicCoordinates》图谱定位(坐标为前囟后 0.8 mm,矢状缝旁开 1.5 mm,硬脑膜下 3.8 mm),LY294002 组、LY294002 溶剂 DMSO 对照组行脑室注射。缓慢拔针后观察动物行为学表现。

1.3.4 大鼠行为学观察及脑电图(EEG)描记 大鼠行为学观察:于腹腔注射药物后观察 2 h,记录各组大鼠癫痫发作情况。脑电图描记:每组大鼠随机选取 5 只进行 EEG 描记。用 10% 水合氯醛 35 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,然后固定于立体定位仪上,暴露颅骨。采取左右皮质、左右海马 4 个电极建立 8 个导联。皮质电极:前囟中点向前 2 mm,中线旁开 2 mm,深 2 mm;海马电极:前囟中点向后 3.8 mm,中线旁开 2.4 mm,深 3.8 mm。牙钻钻孔,插入电极,用立体定位仪上的电极夹固定,鼻尖为参考电极。设定纸速 30 mm/s,灵敏度 20 μV/mm,时间常数 0.1,滤波 15 Hz。待大鼠清醒后开始根据不同的模型进行相应的 EEG 描记。

1.3.5 海马组织学观察

1.3.5.1 标本制作 大鼠在 SE 后 24 h 过量麻醉,开胸后经左心室行主动脉插管,连接灌注系统,剪开右心耳,作为灌注液流出口。用 0.9% 生理盐水约 500 ml 和 4% 多聚甲醛 500 ml 先后灌流固定,开颅取脑,在视交叉和乳头体处垂直横断脑组织,将含有海马的中段脑组织(含脑室注射部位在内)置于 4% 多

聚甲醛溶液中,4 ℃ 24 h。常规脱水、透明、石蜡包埋。冠状连续切片,切至出现海马组织,每片厚度为 5 μm,分别进行 TUNEL 染色和免疫组化染色。

1.3.5.2　海马组织病理学观察　①TUNEL 染色:使用原位凋亡检测试剂盒进行检测,计数海马区凋亡细胞数。②免疫组化染色:采用 S-P 法。在切片中分别加 p-Akt(Thr-308)、XIAP 等一抗,4 ℃过夜,然后依次加入生物素标记的二抗、辣根过氧化酶标记的链霉卵白素工作液,DAB 显色,苏木精复染。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。检测海马区神经细胞 p-Akt、XIAP 蛋白表达。TUNEL 染色和免疫组化染色每一标本分别取 3 张切片,每张切片在海马区随机取 10 个位置不重复的视野,分别计数染色阳性细胞数(以断面上有细胞核者为准),取 3 张切片的均值作为该标本结果,以该组 10 例样本均值作为该组实验结果。

1.3.6　RT-PCR 检测　每组大鼠各取 10 只,迅速分离海马,Trizol(Invitrogen 公司)提取海马总 RNA,测定其浓度及纯度。每个样品取 2 μg RNA 反转录合成 cDNA,再各取 1 μl cDNA 进行 PCR 扩增。引物序列:XIAP 上游:5′-GGCCAGACTATGCCCATTTA-3′,下游:5′-CGAAGAAGCAGTTGGGAAAG-3′,扩增长度 171 bp;β-actin 上游:5′-GCCATGTACGTAGCCATCCA-3′,下游:5′-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3′,扩增长度为 375 bp。引物由上海生工生物工程技术公司合成。PCR 反应条件为:XIAP:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,34 个循环,72 ℃延伸 10 min。取 RT-PCR 产物 5 μl 行琼脂糖凝胶电泳,UVP 凝胶成像系统扫描定量电泳条带的灰度,以 XIAP/β-actin 表示产物的相对含量,凝胶图像分析系统分析结果。半定量结果重复分析 5 次,取平均值进行统计分析。

1.3.7　Western blot 检测　每组大鼠各取 10 只,快速分离海马,提取总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。取 50 μg 蛋白 95 ℃ ~ 98 ℃变性 5 min,以非连续的 Tris-SDS 聚丙烯酰凝胶垂直平板电泳电转印到硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,多克隆兔抗 Akt 抗体(1∶200)、多克隆兔抗 p- Akt (Thr-308)抗体(1∶200),4 ℃孵育过夜。TPBS 漂洗 5 次 ×5 min,羊抗兔 IgG 荧光抗体(1∶3 000)室温孵育 1 h,TPBS 漂洗 4 次 ×10 min,PBS 漂洗 1 次 ×10 min,荧光扫描成像系统扫描并测定目标带单位密度,与 β-actin(1∶800)单位密度值相比后行统计分析。结果重复分析 5 次,取平均值进行统计分析。

1.4　统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,组间比较采用 q 检验。

2　结果

2.1　大鼠行为学改变

接受 PTZ 注射的大鼠共 263 只,98 只应用 30 mg/kg、100 只应用 40 mg/kg、65 只应用 50 mg/kg PTZ 即开始出现惊厥,主要表现为肌阵挛。随着 PTZ 每 10 min 注射 1 次,很快出现四肢抽搐,进入全面性强直收缩阶段的大鼠失去姿势控制,前、后肢伸肌强烈收缩,并伴有呼吸抑制,口周发绀,持续数分钟不等,强直阶段过后出现全面性强直-阵挛惊厥,大鼠 SE 持续时间在 30 min 以上。制模过程中 99 只因长时间持续的强直惊厥而死亡,死亡率约为 38%,24 只不符合模型要求,均予以剔除并随机补充。

2.2　脑电图变化

正常对照组大鼠脑电图以 α、β 波,散在 θ 波即基础波为主,无明显节律;PTZ 组大鼠在基础波的背景上阵发出现大量高幅尖波、棘波、棘慢复合波、尖慢复合波;rHuEPO 组、LY294002 组和 LY294002 溶剂 DMSO 对照组大鼠痫性放电明显受到抑制,棘波、尖波、棘-慢复合波、尖-慢复合波等痫性发作减少或波幅降低;rHuEPO 组、LY294002 溶剂 DMSO 对照组较 LY294002 组癫痫样放电明显减少。

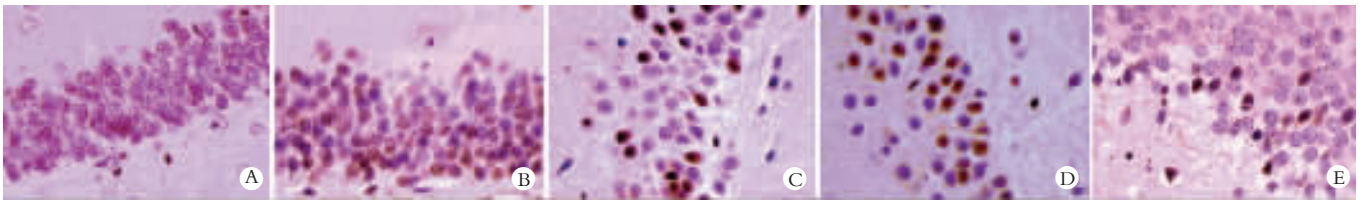
2.3　TUNEL 染色结果

从图 1、表 1 中可见,光镜下细胞核呈棕黄色表现者为 TUNEL 染色阳性细胞,即凋亡细胞。正常对照组仅见少量凋亡细胞,其余 4 组中,凋亡细胞在大脑海马区均有不同程度的分布,正常对照组与 PTZ 组、rHuEPO 组、LY294002 组、LY294002 溶剂 DMSO 组相比凋亡细胞数目明显减少($P < 0.01$);PTZ 组凋亡细胞数目明显增加,核固缩呈圆形或不规则形;高倍镜下可见染色质深染聚集成块或碎裂,核边聚等,符合凋亡细胞形态变化;rHuEPO 组、LY294002 组、LY294002 溶剂 DMSO 组凋亡细胞数目与 PTZ 组相比减少的更为显著($P < 0.05$);rHuEPO 组、LY294002 溶剂 DMSO 组与 LY294002 组比较凋亡细胞数目明显减少($P < 0.05$);LY294002 溶剂 DMSO 组凋亡细胞数目虽多于 rHuEPO 组,但与 rHuEPO 组相比无显著性差异($P > 0.05$)。

表 1　各组海马区凋亡细胞计数及 p- Akt、XIAP 阳性细胞计数($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	凋亡细胞数	p- Akt	XIAP
正常对照组	7.23 ± 1.05	21.41 ± 1.20	13.94 ± 1.51
PTZ 组	26.72 ± 3.53[a]	26.57 ± 2.46[a]	18.87 ± 2.65[a]
rHuEPO 组	16.59 ± 1.12[abc]	54.81 ± 5.08[abc]	34.73 ± 3.92[abc]
LY294002 组	21.08 ± 2.67[ab]	33.07 ± 4.87[ab]	25.17 ± 2.02[ab]
LY294002 溶剂 DMSO 对照组	17.47 ± 1.86[abc]	52.35 ± 4.63[abc]	31. 29 ± 2.79[abc]

a:$P < 0.01$,与正常对照组比较;b:$P < 0.05$,PTZ 组比较;c:$P < 0.05$,与 LY294002 组比较



A:正常对照组;B:PTZ 组;C:rHuEPO 组;D:LY294002 组;E:LY294002 溶剂 DMSO 对照组

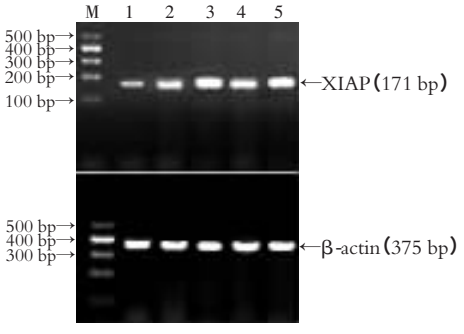
图 1　各组大鼠海马组织细胞凋亡的检测　(TUNEL ×400)

2.4 免疫组化染色结果

海马区 p-Akt、XIAP 蛋白的表达(表 1):有棕黄着色者即为阳性细胞,阳性信号主要位于细胞质,细胞膜和细胞核也有少量阳性信号。正常对照组偶可见棕黄色颗粒散在分布 rHuEPO 于核膜周围的细胞质中;与正常对照组相比,PTZ 组、rHuEPO 组、LY294002 组、LY294002 溶剂 DMSO 组 p-Akt、XIAP 的阳性细胞数均显著增多,并且在胞核中也开始出现阳性信号,差异具有统计学意义($P < 0.01$);rHuEPO 组、LY294002 组、LY294002 溶剂 DMSO 组 p-Akt、XIAP 的阳性细胞数均较 PTZ 组明显增多,差异具有统计学意义($P < 0.05$);rHuEPO 组、LY294002 溶剂 DMSO 组 p-Akt、XIAP 的阳性细胞数也均多于 LY294002 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);rHuEPO 组 p-Akt、XIAP 的阳性细胞数增多较 LY294002 溶剂 DMSO 组不明显($P > 0.05$)。

2.5 RT-PCR 测定大鼠海马 XIAP mRNA 的表达

从图 2 中可见,正常对照组 XIAP mRNA(0.41 ± 0.06)有微弱表达;PTZ 组、rHuEPO 组、LY294002 组、LY294002 溶剂 DMSO 组 XIAP mRNA 的表达均较正常对照组显著上调($P < 0.01$);rHuEPO 组、LY294002 组、LY294002 溶剂 DMSO 组 XIAPmRNA 的表达均较 PTZ 组(0.65 ± 0.07)明显上调($P < 0.05$);rHuEPO 组、LY294002 溶剂 DMSO 组 XIAP mRNA 的表达较 LY294002 组(0.83 ± 0.04)明显上调($P < 0.05$);rHuEPO 组 XIAP mRNA(1.09 ± 0.11)的表达较 LY294002 溶剂 DMSO 组(1.01 ± 0.05)虽有所上调,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。

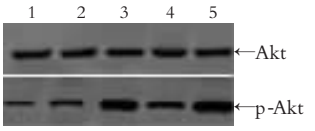


M:标准; 1: 正常对照组; 2: PTZ 组; 3: rHuEPO 组;4: LY294002 组; 5: LY294002 溶剂 DMSO 对照组

图 2 大鼠海马 XIAP mRNA 表达

2.6 Western blot 结果

正常对照组 p-Akt 的表达水平明显低于 PTZ 组、rHuEPO 组、LY294002 组、LY294002 溶剂 DMSO 组($P < 0.05$);PTZ 组 p-Akt 的表达水平较 rHuEPO 组、LY294002 组、LY294002 溶剂 DMSO 组均明显下调($P < 0.05$);rHuEPO 组、LY294002 溶剂 DMSO 组 p-Akt 的表达水平也均高于 LY294002 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);rHuEPO 组 p-Akt 的表达水平虽多于 LY294002 溶剂 DMSO 组,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。rHuEPO、LY294002 对 AKT 没有明显的影响,各实验组 AKT 的表达水平无显著性差异($P > 0.05$,图 3)。



1: 正常对照组;2: PTZ 组;3: rHuEPO 组;4: LY294002 组; 5: LY294002 溶剂 DMSO 对照组

图 3 大鼠海马 AKT 和 p-AKT 蛋白的表达

3 讨论

PTZ 是 γ-氨基丁酸(GABA)受体的拮抗剂,对氯离子通道活性有显著影响,从而使神经元过度兴奋,引起癫痫发作。PTZ 无神经毒性作用,可引起与人类极为相似的行为及神经病理的改变[6]。本实验采用 PTZ 点燃方法制作癫痫模型,成功率和发作形式与国内外报道基本一致。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,其产物可直接或间接激活 Akt。有研究表明,EPO 引起 Akt 的磷酸化是依赖于 PI3K 和 Jak2 的激活,活化的 Jak2 可磷酸化 EPO-R 苏氨酸位点,使其与 PI3K 的调节亚单位结合。目前认为 Akt 是 PI3K 直接的下游底物,而且由于应用 PI3K 的抑制剂可以阻断 Akt 的激活,故观察 p-Akt 的表达,可以推断 PI3K/Akt 通路的激活情况。

近期在大鼠局部脑缺血、大脑皮质外伤等[7,8]许多动物模型中均被证实 EPO 腹腔注射后可以通过血脑脊液屏障,同时还具有脑保护作用。本研究观察到:rHuEPO 的干预可明显减少海马神经元的凋亡,免疫组化和 Western blot 结果也提示 rHuEPO 显著提高海马神经元内 p-Akt 的水平,Yano 等[9]的实验证实 p-Akt 对神经元有一定保护作用。故根据本实验结果推测 rHuEPO 在大鼠癫痫持续状态可能具有神经保护作用。LY294002 是靶向 PI3K 的催化亚基 p110 的高度选择性、竞争性抑制剂。rHuEPO 干预前给予 LY294002 进行阻断,明显减弱了 rHuEPO 的这些保护作用,进一步提示了 rHuEPO 激活了重要的存活通路 PI3K/Akt 途径,与提高 Akt 的活性有关,PI3K/Akt 途径可能是 rHuEPO 发挥神经保护作用的途径之一。与 Kilic 等[10]在局灶性脑缺血的研究结果相一致。

凋亡抑制蛋白(inhibitors of apoptosis, IAPs)是细胞内一类独特的抗凋亡蛋白家族,XIAP 是 IAP 家族里最强有力的 caspase 抑制物。Dan 等[11]研究发现,Akt 可以磷酸化 XIAP 的 Ser87 位点,XIAP 被 Akt 磷酸化后保护 XIAP 免于泛素化和降解,且 XIAP 的自动泛素化也被 Akt 抑制, 增强其稳定性和细胞内水平,从而发挥抑制凋亡作用。XIAP 是 Akt 新的下游信号传递者,在 Akt 的抑制凋亡作用中发挥重要影响。失去 Akt 磷酸化位点的突变 XIAP 在细胞中很快降解,并加

快了细胞凋亡。

本研究发现,在 PTZ 点燃 SE 后激活了抗凋亡蛋白 XIAP 及 XIAP mRNA 在海马神经元中的表达;rHuEPO 干预后上调了 XIAP、XIAP mRNA 的表达,减少了神经元的凋亡,提示:rHuEPO 可以调控 XIAP 的表达,借以发挥抗凋亡的神经保护作用。有实验证明,EPO 也能够通过 JAK/STAT 信号、PKC、NF-κB 等[12,13]途径发挥保护作用。故本实验用 PI3K 抑制剂 LY294002 进一步验证 rHuEPO 对 XIAP 的调控是否通过了 PI3K/Akt 通路。结果显示给予 LY294002 进行阻断后,增加了海马神经元的凋亡,海马神经元内 XIAP、XIAP mRNA 表达显著减少,进一步佐证了 rHuEPO 通过 PI3K/Akt 途径对线粒体凋亡途经的相关调控因子 XIAP 进行了调控,进而介导线粒体凋亡途经,PI3K/Akt 途径是 rHuEPO 发挥神经保护作用的途径之一。但是 Akt 活化后是通过直接磷酸化 XIAP 的 Ser87 位点,还是通过 Akt-IIK-NF-κB-XIAP 途径,亦或是通过 Caspase-9 和第二个线粒体源性 caspase 激活剂(second mitochondrial derived Activa-tor of caspase, Smac/DIABLO)在 XIAP 发挥作用时起到了主要的调节作用等还有待进一步实验验证。

参考文献:

[1] Spandou E, Soubasi V, Papoutsopoulou S, *et al*. Erythropoietin prevents hypoxia/ischemia-induced DNA fragmentation in an experimental model of perinatal asphyxia[J]. Neurosci Lett, 2004,366(1): 24 - 28.

[2] Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, *et al*. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings[J]. Neurosurg Rev, 2004,27(2): 113 - 120.

[3] 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.

[4] Motte J E, da-Silva-Fernandes M J, Marescaux C, *et al*. Effects of pentylenetetrazol-induced status epilepticus on c-Fos and HSP72 immunoreactivity in the immature rat brain[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1997,50(1 - 2):79 - 84.

[5] Nadam J, Navarro F,Sanchez P, *et al*. Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus[J]. Neurobiol Dis, 2007,25(2):412 - 426.

[6] Qu H, Eloqayli H, Sonnewald U. Pentylenetetrazole affects metabolism of astrocytes in culture[J]. J Neurosci Res, 2005,79(1 - 2):48 - 54.

[7] Cherian L,Goodman J C,Robertson C. Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther,2007, 322(2): 789 - 794.

[8] Brines M L, Ghezzi P, Keenan S, *et al*. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(19):10526 - 10531.

[9] Yano S, Morioka M, Fukunaga K, *et al*. Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampu[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(4): 351 - 360.

[10] 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.

[11] Dan H C, Sun M, Kaneko S, *et al*. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)[J]. J Biol Chem, 2004, 279(7): 5405 - 5412.

[12] Rafiee P, Shi Y, Su J, *et al*. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways[J]. Basic Res Cardiol, 2005, 100(3): 187 - 197.

[13] Xu B, Dong G H, Liu H, *et al*. Recombinant human erythropoietin pretreatment attenuates myocardial infarct size: a possible mechanism involves heat shock Protein 70 and attenuation of nuclear factor-kappaB[J]. Ann Clin Lab Sci, 2005, 35(2):161 - 168.

(编辑　吴培红)

《军医大学学报》(英文版)欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由 3 所军医大学和南方医科大学共同主办的、国内外公开发行的综合性医学学术类英文期刊,是中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中文科技期刊数据库、中国期刊网、万方数据库、重庆维普数据库。从 2007 年开始,本刊电子版由全球著名的科技出版集团爱思唯尔(Elsevier)负责海外发行,全文已进入 ScienceDirect 全文数据库,期刊网址 http://www.elsevier.com/locate/jmcpla。国内统一刊号:CN31 - 1002/R,国际标准刊号:ISSN 1000 - 1948。双月刊。设有论著、技术与方法、个案报道、交流等栏目。若无彩图,无需缴纳版面费;亦不收取审稿费;无稿酬。投稿要求:中(或大摘要)、英文稿各 1 份,照片提供 3 份。电子投稿 E-mail:gangela@mail.tmmu.com.cn。照片需以附件形式单独提供 JPG 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。

联系地址:重庆市沙坪坝区高滩岩第三军医大学学报编辑部(400038)　　**电话**:(023)68752782