短篇论著

文章编号:1000-5404(2011)17-1878-03

rhEPO对糖尿病大鼠内皮屏障抗原EBA及血脑屏障通透性的影响

刘式威[1],刘政华[2],吕 霞[2],杨桂蓉[3],刘志刚[1],尹 岭[4] (150086 哈尔滨,解放军211医院神经内科[1];150080 哈尔滨,解放军65426部队医院外科所[2];150087 哈尔滨,哈尔滨香坊区民生社区卫生服务中心[3];100837 北京,解放军总医院神经信息中心[4])

[摘要] **目的** 研究重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin,rhEPO)对糖尿病大鼠血脑屏障(BBB)通透性和内皮屏障抗原(endothelial barrier antigen,EBA)表达的影响。**方法** 30只雄性SD大鼠分成rhEPO治疗组、糖尿病组和正常对照组。rhEPO治疗组、糖尿病组用链脲霉素(streptozotocin,50 mg/kg)静脉一次性注射制备糖尿病模型。rhEPO治疗组于模型制备同时rhEPO(3 000 U/kg),皮下注射,3次/周,疗程4个月。糖尿病组和正常对照组皮下注射等量生理盐水。4个月后均取额叶皮层。用免疫组织化学(IHC)的方法检测微血管内皮细胞EBA及微血管周围纤维蛋白原(fibrinogen)表达。**结果** IHC染色显示rhEPO治疗组、糖尿病组和正常对照组EBA阳性微血管数分别为(10.30±1.17)、(7.30±1.14)和(13.20±1.33),rhEPO治疗组EBA阳性微血管数与正常对照组比较明显减少($P<0.01$),而rhEPO治疗组与糖尿病组比较EBA阳性微血管数显著增加($P<0.01$);rhEPO治疗组、糖尿病组和正常对照组fibrinogen阳性微血管数分别为(5.52±2.54)、(7.60±3.11)和(1.30±0.46),rhEPO治疗组与糖尿病组比较fibrinogen阳性微血管数显著减少($P<0.01$)。**结论** rhEPO治疗可明显增加糖尿病大鼠血脑屏障EBA表达,减少fibrinogen外渗,减少BBB通透性,对糖尿病大鼠血脑屏障具有保护作用。

[关键词] 重组人促红细胞生成素;血脑屏障;糖尿病;内皮屏障抗原;免疫组织化学

[中图法分类号] R322.81; R587.1; R977.9 [文献标志码] A

血脑屏障破坏在糖尿病引发的中枢神经系统损害中起到至关重要的作用[1]。最近研究发现血脑屏障内皮细胞存在1种特异性标记物-内皮屏障抗原(endothelial barrier antigen,EBA),EBA减少可作为血脑屏障损伤的1个敏感和特异性标记物[2]。通过检测EBA表达数量的变化,可准确反映疾病对血脑屏障的破坏,以及药物对血脑屏障的保护作用。近年来大量研究表明重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin,rhEPO)具有很好的神经保护作用[3]。本实验运用血脑屏障EBA及内源性通透性示踪剂纤维蛋白原(fibrinogen)作为标记物,研究rhEPO对糖尿病大鼠血脑屏障的保护作用,旨在为临床应用rhEPO治疗糖尿病中枢神经系统并发症提供基础理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

30只体质量190~200 g健康雄性SD大鼠(北京医科大学医学部医学实验动物科学部提供),并在SPF环境下饲养。分为rhEPO治疗组、糖尿病组和正常对照组,每组10只。

1.2 糖尿病大鼠模型制备[4]

禁食12 h,以50 mg/kg 1次尾静脉注射链脲菌素(streptozotocin),建立糖尿病模型。注射STZ后3 d检测血糖,尿糖试纸检测尿糖。血糖>13.7 mmol/L,尿糖定性持续在+++以上造模成功。大鼠造模成功后常规饲养4个月,每周测1次尿糖及体质量,隔周测血糖,并观察大鼠一般状态。rhEPO治疗组于模型制备同时给予rhEPO(3 000 U/kg),皮下注射,3次/周,疗程4个月。糖尿病组和正常对照组皮下注射等量生理盐水。

1.3 标本制作

4个月时所有大鼠10%的水合氯醛按350 mg/kg麻醉,麻醉成功后取一部分额叶皮层速冻,冰冻切片,片厚10 μm,连续取2张,分别行EBA、fibrinogen免疫组化染色。

1.4 免疫组化染色

采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶方法(SABC法)检测大鼠额叶皮层EBA和fibrinogen的表达水平,具体操作步骤参照说明书。

1.5 阳性细胞计数及统计学分析

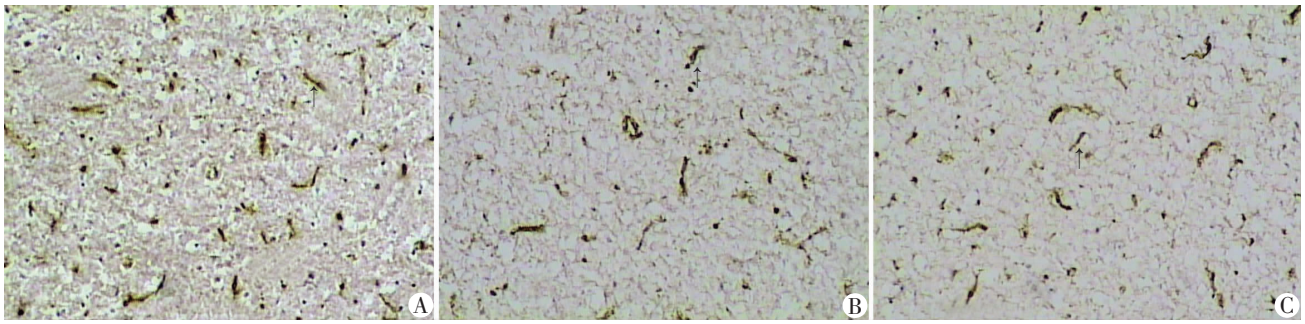
每张切片在100倍光镜下用MIAS-2000医学图像分析软件计算免疫反应阳性血管数。数据以$\bar{x}\pm s$表示,行t检验。

2 结果

2.1 各组EBA免疫组化染色结果

rhEPO治疗组:各组EBA阳性微血管免疫组化染色均为棕色,形态为弧形。正常对照组染色最浓,糖尿病组染色最淡。计数10只大鼠切片,EBA阳性微血管数,6~12(10.30±1.17)个。糖尿病组:计数10只大鼠切片,EBA阳性微血管数5~10(7.30±1.14)个。正常对照组:计数10只大鼠切片,EBA阳性微血管数7~15(13.20±1.33)个。rhEPO治疗组EBA阳性微血管数虽然比正常对照组低,但比糖尿病组显著增加,各组差异有统计学意义($P<0.01$)。见图1。

[通信作者] 刘式威,E-mail:abcd9622@163.com



A:rhEPO 治疗组;B:糖尿病组;C:正常对照组 ↑:EBA

图1 各组额叶皮层 EBA 表达 (ICH×100)



A:rhEPO 治疗组;B:糖尿病组;C:正常对照组 ↑: fibrinogen

图2 各组额叶皮层微血管周围 fibrinogen 表达 (ICH×100)

2.2 各组 fibrinogen 免疫组化染色结果

rhEPO 治疗组:各组 fibrinogen 阳性微血管免疫组化染色均为棕色,形态为圆形、椭圆形或弧形。正常对照组染色最淡,糖尿病组染色最浓。计数 10 只大鼠切片,fibrinogen 阳性微血管数 3~7(5.52±2.54)个。糖尿病组:计数 10 只大鼠切片,fibrinogen 阳性微血管数 4~9(7.60±3.11)个。正常对照组:计数 10 只大鼠切片,可见微量 fibrinogen 表达,fibrinogen 阳性微血管数 0~3(1.30±0.46)个。rhEPO 治疗组 fibrinogen 阳性微血管数虽然比正常对照组增多,但比糖尿病组显著减少,各组差异有统计学意义($P<0.01$)。见图 2。

3 讨论

目前糖尿病中枢神经系统损害的发病机制仍不明确,糖尿病导致的微血管病变被认为是重要发病机制之一[5]。但以往多侧重于形态学研究,最近研究发现血脑屏障内皮细胞存在一种特异标记物-EBA,它在血脑屏障内皮细胞特异性表达。Ghabriel 等[6]认为 EBA 为血脑屏障内皮细胞紧密连接的主要成分,是观测血脑屏障功能完整性的可靠指标。尹岭等[7]首次利用 EBA、fibrinogen 作为观测指标,研究了糖尿病对大鼠血脑屏障的影响,证实糖尿病可引起 EBA 减少,血脑屏障通透性增加。从分子角度揭示了糖尿病通过微血管改变,造成中枢神经的损害。

EPO 是由肾脏和胚胎肝脏产生的一种能促进红细胞生成的细胞因子。在临床上广泛应用 rhEPO 治疗多种原因所致的贫血,并取得了很好的效果。最近,在脑及其他组织特别是发育中组织的非造血作用引起了临床和科研的极大兴趣,尤其是其对神经组织的保护功能已成为诸多学者的研究热点[8]。本实验利用 EBA 观测指标,从分子水平研究 rhEPO 对糖尿病大鼠血脑屏障的影响。

本研究结果显示,rhEPO 治疗组 EBA 表达数较糖尿病组显著增加,fibrinogen 表达明显减少。说明 rhEPO 治疗能显著增加 EBA 表达,减少内源性示踪剂 fibrinogen 的外渗,降低血脑屏障通透性,对血脑屏障具有保护作用。而尹岭等[7]实验证实糖尿病能减少 EBA 表达,增加内源性示踪剂 fibrinogen 的外渗,增加血脑屏障通透性,对血脑屏障具有破坏作用。推测 rhEPO 可能通过抗谷氨酸兴奋毒性[9]、调节 NO 的合成[10]、抗氧化作用[11]、抗炎作用[12]、抗神经元凋亡[13]、促进血管生成[14]、促进神经元再生和神经营养[15]等机制,作用于血脑屏障内皮细胞紧密连接成分,增加紧密连接点或使紧密连接更加牢固,通过保护血脑屏障这一血管因素从而实现对中枢神经的保护,具体机制需今后进一步研究。本实验为临床应用 rhEPO 治疗糖尿病中枢神经系统并发症,提供了基础理论支持。

参考文献：

[1] 杨积平，吴晶，洪浩. 白藜芦醇对糖尿病小鼠血脑屏障上P-糖蛋白表达和转运功能的影响[J]. 安徽医药，2009，13(5)：483－485.

[2] 刘式威，刘政华，吕霞，等. 脑缺血再灌注损伤对大鼠血脑屏障内皮屏障抗原及通透性的影响[J]. 第二军医大学学报，2010，31(11)：1258－1260.

[3] 陈婷方，侯冰，任长虹，等. 红细胞生成素：一种新的神经保护剂[J]. 军事医学科学院院刊，2008，10(5)：464－467.

[4] 李菊芬，陈海翎，邓丽丽. 辛伐他汀和卡托普利对糖尿病大鼠血流动力学和心功能的影响[J]. 军医进修学院学报，2011，32(2)：174－176，180.

[5] 黄萍. 糖尿病微血管病变患者糖化血红蛋白与血液流变学研究[J]. 中国实用医药，2010，5(11)：77－79.

[6] N-Ghabriel M，J-Lu J，Tadros R，*et al*. A narrow time-window for access to the brain by exogenous protein after immunological targeting of a blood-brain barrier antigen[J]. J Comp Pathol，2004，131(1)：52－60.

[7] 尹岭，刘式威，吕霞，等. 实验性糖尿病大鼠内皮屏障抗原表达和血脑屏障通透性变化[J]. 中华神经科杂志，2007，40(1)：47－49.

[8] 任丁，吴云虎，王凯华. 促红细胞生成素治疗95例急性脑梗死的临床研究[J]. 中国实用神经疾病杂志，2010，13(3)：38－39.

[9] 叶世武，汤永红，李赟. 促红细胞生成素对脑缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 国际神经病学神经外科学杂志，2009，36(5)：391－394.

[10] 周铁柱，王薇，胡晓颖，等. rhEPO对局灶性脑缺血再灌注脑损伤保护机制的研究[J]. 中国老年学杂志，2010，30(9)：1255－1256.

[11] 赵舒武，高英茂，汪涛，等. 促红细胞生成素对神经干细胞缺氧性损伤保护作用的实验研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，2008，17(3)：293－297.

[12] 陶维元，文芳，姚汉云，等. 促红细胞生成素与炎性细胞因子在脑瘫发病中的作用[J]. 中国康复理论与实践，2008，14(1)：62－64.

[13] 洪青青，张博，杨景武，等. EPO对大鼠面神经损伤后面神经核Bcl-2表达和神经元凋亡的影响[J]. 中国现代医药杂志，2010，12(6)：5－7.

[14] 石秋艳，孙惠芳，姜进克，等. 实验性脑出血大鼠血肿周围VEGF、bFGF表达及血管新生的动态变化及重组人促红细胞生成素对其干预作用的研究[J]. 中风与神经疾病杂志，2010，27(4)：299－303.

[15] 王晓斌，宁显忠，王晓强，等. 不同频次腹腔注射促红细胞生成素对脑缺血急性期大鼠海马神经元保护作用的比较[J]. 中风与神经疾病杂志，2010，27(7)：594－598.

（**收稿**：2011-03-20；**修回**：2011-05-03）

（编辑　王小寒）

短篇论著

文章编号：1000-5404(2011)17-1880-03

根除幽门螺杆菌治疗特发性血小板减少性紫癜的Meta分析

靳蕊蕊[1]，席亚明[1]，晁　荣[1]，陈　彻[2]　（730000 兰州，兰州大学第一医院血液科，血液学研究所[1]；730000 兰州，甘肃省中医学院临床医学系[2]）

［**摘要**］ **目的**　评价根除幽门螺杆菌治疗特发性血小板减少性紫癜的临床疗效。**方法**　检索1998年1月至2010年10月PubMed、EMbase、CNKI、维普中文科技期刊数据库等，纳入有关抗Hp方案治疗ITP的RCT。按Meta分析方法提取有效数据，用RevMan5.0.24软件对结局指标进行Meta分析。**结果**　共纳入11个RCT，包括605例患者。Meta分析结果显示：实验组的总有效率高于对照组[$OR=3.96$，95% $CI(2.52,6.23)$，$P<0.000\ 01$]；实验组治疗3、6个月后血小板升高程度高于对照组，差异有统计学意义（$P<0.000\ 01$）；实验组的复发率低于对照组[$OR=0.21$，95% $CI(0.09,0.46)$，$P=0.000\ 01$]。**结论**　抗Hp治疗ITP可提高治疗有效率，并能降低复发率，可作为治疗ITP有效可行的方法。

［**关键词**］ 特发性血小板减少性紫癜；幽门螺杆菌；Meta分析

［**中图法分类号**］ R554.605；R378　　［**文献标志码**］ A

特发性血小板减少性紫癜（idiopathic thrombocytopenic purpura，ITP）是一因血小板免疫性破坏导致外周血中血小板减少的出血性疾病[1]。近年来，多项研究显示幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*，*Hp*）感染与ITP的发病密切相关，对Hp阳性的ITP患者加用抗Hp治疗可提高疗效，但也有文献报道并不能提高疗效[2]，因此抗Hp治疗Hp阳性的ITP是否有效仍待进一步研究。本研究对其疗效进行Meta分析，以为临床应用提供参考。

1　资料与方法

1.1　文献检索

以“helicobacter pylori AND idiopathic thrombocytopenic purpura”检索1998年1月至2010年10月在PubMed、EMbase等数据库发表的文献；以“幽门螺杆菌 AND 特发性血小板减少性紫癜”检索1998年1月至2010年10月中国学术期刊网全文数

［**通信作者**］ 席亚明，电话：(0931)8625200，E-mail：xiyaming02@163.com