促红细胞生成素对兔局灶性脑缺血皮质区神经肽 Y 表达的影响

熊云彪,杨承勇,黄生炫,王 超,杨 恒,司书喜,刘窗溪 (贵州省人民医院神经外科,贵州 贵阳 550002)

[摘 要] **目的** 探讨促红细胞生成素(EPO)对兔局灶性脑缺血皮质区神经肽 Y(NPY)表达的影响。**方法** 成年健康新西兰兔 42 只,雌雄不限,以开颅法建立大脑中动脉闭塞脑缺血模型,随机分为脑缺血组(18 只)、EPO 干预组(18 只)和假手术组(6 只),前两组又根据缺血时间分 6 h、12 h 和 24 h 组,分别用免疫组织化学及图像分析法检测脑缺血皮质区 NPY 的表达改变。**结果** 与假手术组相比,脑缺血组、EPO 干预组缺血侧皮质 NPY 阳性细胞数量随缺血时间延长显著增多($P<0.05$)。与 EPO 干预组比较,脑缺血 6 h 组 NPY 阳性细胞数量未见明显改变。脑缺血 12 h($P<0.05$)、24 h($P<0.01$)组,缺血侧皮质区 NPY 阳性细胞数量增多更为明显。**结论** EPO 通过抑制局灶性脑缺血皮质区 NPY 的表达,可能是其实现对缺血缺氧脑组织保护作用的机制之一。

[关键词] 脑缺血;促红细胞生成素;神经肽 Y;兔

[中图分类号] R743.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)02-0145-03

Effects of erythropoietin on expression of neuropeptide Y in focal cerebral ischemic cortex area of rabbit

XIONG Yun-biao, YANG Cheng-yong, HUANG Sheng-xuan, WANG Chao, YANG Heng, SI Shu-xi, LIU Chuang-xi (Department of Neurosurgery, the People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang Guizhou 550002, China)

Abstract: Objective To study the effect of erythropoietin(EPO) on the expression of neuropeptide Y(NPY) after focal cerebral ischemic cortex in rabbit. **Methods** 42 New Zealand adult rabbits were randomly divided into ischemic group ($n=18$), erythropoietin-treated group ($n=18$) and sham-operation group ($n=6$). The former 2 groups were divided into subgroups according to ischemia time after 6 h, 12 h, 24 h. The expression of NPY were measured by immunohistochemistry and image analysis in each group. **Results** Comparing with the sham-operation group, the number of NPY positive-cells increased obviously in other 2 groups ($P<0.05$) as the ischemic time expanding. Comparing with erythropoietin-treated group, there was no significant differences in the number of NPY positives-cells of 6 h subgroup. But the number of positives cells increased in 12 h subgroup ($P<0.05$) and 24 h subgroup($P<0.01$). **Conclusion** EPO has protective effect against cerebral ischemia injury in rabbits, which may be related to inhibit the expression of NPY.

Keywords: cerebral ischemic; erythropoietin; neuropeptide Y; rabbit

急性脑血管病变又称脑卒中,是一种常见的致死性和致残性疾病,与心脏病和恶性肿瘤共同构成人类三大致死疾病。新近研究发现,神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)不仅与高血压形成有关,而且与急性脑梗死缺血-复流过程中神经元损伤、变性、程序性凋亡的病理发生发展过程密切相关[1-3]。近年来的体内外实验研究均证实了促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)对脑缺血后神经元功能的恢复具有重要的保护作用[4]。但 EPO 对神经元的具体保护机制尚未被揭示,有关脑缺血 EPO 干预后脑组织内 NPY 含量改变的关系研究更是甚少。因而,本实验通过建立兔局灶性脑缺血模型,研究在 EPO 干预下家兔脑缺血损伤不同时间段 NPY 的表达变化,为中枢神经系统损伤后修复机制及治疗策略的研究提供实验基础。

DOI:10.11659/jjssx.1672-5042.201302009

[基金项目] 贵州省科学技术基金,黔科合计合省[2005]4002 号

[通讯作者] 刘窗溪,E-mail:lcx5933152@sina.com

[收稿日期] 2012-12-28 [修回日期] 2013-01-18

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性新西兰兔 42 只,体质量 2.0~2.5 kg,由贵阳医学院动物实验中心提供。随机分为脑缺血组(18 只)、EPO 干预组(18 只)和假手术组(6 只),其中脑缺血组和 EPO 干预组又根据手术后取材时间的不同分 6 h、12 h、24 h 组。假手术组于术后 24 h 取材。

1.2 药品及试剂

重组人红细胞生成素注射液(recombinant human erythropoietin, rHuEPO,商品名:环尔博),北京四环生物工程制品厂生产,产品批号:20090406。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的制备及处理 采用开颅法[5]制作大脑中动脉(MCA)缺血的模型:取新西兰兔 1 只行腹腔注射麻醉。麻醉平稳后俯卧位固定于手术台上。在手术显微镜下于左眶上缘做切口,依次切开头皮,在左颞顶骨开取骨窗暴露左侧大脑半球,找到位于嗅束及大脑下静脉之间的一段大脑中动脉(MCA),将吸有 50% $FeCl_3$ 小片定量滤纸敷在 MCA 上,持续 30 min 后去掉滤纸。用生理盐水冲洗局部组织,逐层缝合后,回笼

饲养。观察动物有无偏瘫症状。假手术组不用 $FeCl_3$ 滤纸覆盖。EPO 干预组术后 30 min 予 457 IU/kg EPO 腹腔内注射。根据 Zea Longa 评分法选择成功的动物模型。神经功能评分：无神经功能缺损症状，活动正常为 0 分；不能完全伸展对侧前爪为 1 分；行走时向偏瘫侧转圈为 2 分；向偏瘫侧倾倒为 3 分；不能自行行走，意识丧失为 4 分。本实验选取的动物模型均为 1～3 分。成功的动物模型分别于术后 6、12、24 h 取脑缺血组和 EPO 干预组脑组织标本，假手术组于术后 24 h 取脑组织，多聚甲醛液固定，常规石蜡包埋，制成 4 mm 厚的连续切片，每例每个观察指标均观察 3 张切片以上。

1.3.2 染色方法 HE 染色按常规操作步骤进行；免疫组织化学 SABC 法染色，显示 NPY 阳性细胞。主要步骤为：切片常规化蜡至水，10% H_2O_2 10 min，正常山羊血清（1∶50）封闭 20 min，滴加 NPY 抗血清（1∶1 000）（SIGMA 公司提供），4 ℃过夜，羊抗兔 IgG（1∶100）37 ℃孵育 20 min，SABC 复合物（1∶100）37 ℃孵育 20 min，DAB 显色，苏木精复染细胞核，中性树胶封片。方法对照：PBS 缓冲液代替特异性抗血清，余步骤同上。

1.3.3 图像分析 随机选取假手术组、脑缺血和 EPO 干预组脑组织切片各 5 张，在 40 倍物镜下，每张切片随机选取 5 个视野，分别计数每个视野内有核 NPY 阳性细胞数。

1.3.4 统计学处理 应用 SPSS 11.5 软件包对实验数据进行单因素方差分析，统计学处理。实验数据用平均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。$P<0.05$ 差异具有显著性。

2 结果

2.1 HE 染色光镜观察

假手术组：大脑皮质区神经细胞形态、结构正常，胞浆丰富、均匀，核圆形或类圆形，核仁明显（图 1a）

脑缺血组：多数神经细胞形态不完整，胞浆内尼氏体分解，核浆分界不清，细胞核固缩，染色较深，核仁不清，细胞周围中重度水肿（图 1b）。

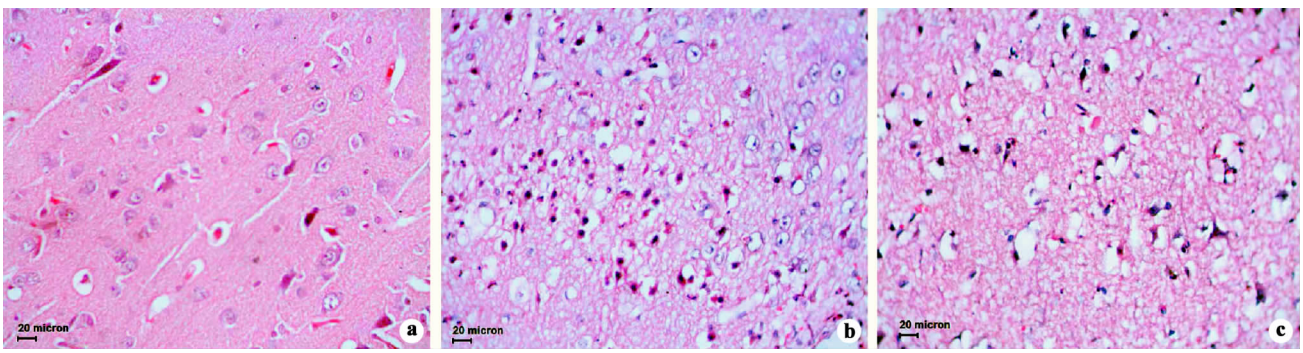
EPO 干预组：部分神经细胞结构欠完整、尼氏体分解，细胞核固缩，部分核浆分界及细胞核尚可辨认，核仁不清，细胞周围中度水肿（图 1c）。

2.2 免疫组织化学 SABC 法光镜观察

免疫组织化学染色结果显示：假手术组大脑皮质 NPY 阳性细胞数量较少，棕黄色的阳性反应产物表达在胞质内（图 2a）。方法对照切片未见阳性反应细胞。缺血后 6 h，脑缺血组、EPO 干预组缺血侧皮质 NPY 阳性细胞数量较假手术组增多（图 2b）；脑缺血组、EPO 干预组 NPY 阳性细胞数量随缺血时间延长显著增多，免疫染色较深。与脑缺血组相比，EPO 干预组 NPY 阳性细胞数量于缺血后 12、24 h 有所下降（图 2c～f），但均多于假手术组。

2.3 图像分析

脑缺血 6 h 后，单纯脑缺血与 EPO 干预家兔大脑皮质 NPY 阳性细胞数量与假手术组相比均有所增多（$P<0.05$），且随缺血时间延长，阳性细胞数量呈现逐渐上升趋势（$P<0.05$）。脑缺血 12 h 后，EPO 干预组 NPY 阳性细胞数量较脑缺血组有所减少（$P<0.05$），缺血 24 h 后 2 组细胞数量变化更加明显（$P<0.01$），见表 1。



a：假手术组 24 h；b：脑缺血组 24 h；c：EPO 干预组 24 h。

图 1 家兔脑皮质区 HE 染色（×400）

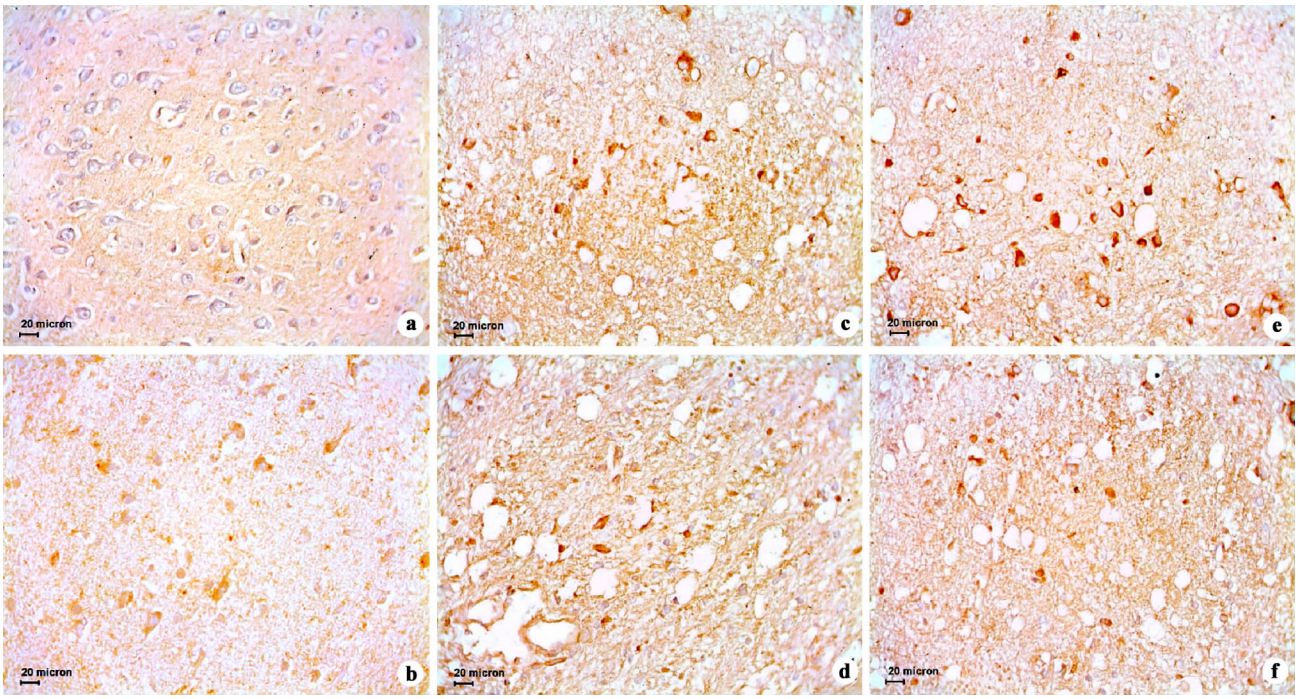
表 1 大脑皮质 NPY 有核阳性细胞数比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	6 h	12 h	24 h
假手术组	6	0	0	3.16 ± 1.73
脑缺血组	18	8.81 ± 1.02	15.70 ± 1.25 *	19.31 ± 1.61 *△
EPO 干预组	18	7.84 ± 1.31	11.24 ± 2.46 *△	13.02 ± 4.35 *#▲

*：与假手术组 6 h、脑缺血组 6 h、EPO 干预组 6 h 比较，$P<0.05$；#：与脑缺血组 12 h、EPO 干预组 12 h 比较，$P<0.05$；△：与脑缺血组 12 h 比较，$P<0.05$；▲：与脑缺血组 24 h 比较，$P<0.01$

3 讨论

NPY 由 36 个氨基酸组成，属胰多肽家族，主要分布于中枢神经系统及外周器官，具有广泛的生物学活性。研究显示 NPY 对脑血管有较强的收缩作用，在体内的缩血管效应可使局部脑血流减少 50%[6]。老年短暂性脑缺血发作患者血清 NPY 水平显著高于正常人[7]。Yu 等[8]对 450 例脑缺血中风患者 NPY 基因分析表明在 NPY 启动子区域 C 端等位基因-399 T/C 多态现象对于缺血性发作是一种独立的危险因子，提示 NPY 可能参与脑中风的病理学机制。本实验通过建立



a:假手术组 24 h;b:脑缺血组 6 h;c:脑缺血组 12 h;d:EPO 干预组 12 h;e:脑缺血组 24 h;f: EPO 干预组 24 h

图 2 家兔脑皮质区 NPY 阳性细胞（SABC 法 ×400）

家兔大脑中动脉闭塞脑缺血模型,研究缺血侧皮质区脑组织内 NPY 的表达情况,结果显示随脑缺血时间延长,NPY 表达逐渐增高。这与上述学者的研究结果类似。推测是由于脑缺血缺氧,交感 - 儿茶酚胺系统兴奋, 使副交感神经释放 NPY 增加。增多的 NPY 可能通过以下途径参与缺血性脑损伤的病理过程:①不断刺激血管收缩,进一步降低脑血流,加重缺血性脑损伤;②通过激活神经元型一氧化氮合酶(NOS)产生 NO 增多 ,加重缺血半暗带区的代谢紊乱[9]。

EPO 是一种主要由肾脏分泌的糖蛋白, 是一种造血细胞生长因子,主要用于治疗多种原因所致的贫血,在调节红细胞生成的过程中起着重要作用。EPO 及其受体在人类和啮齿类动物脑组织中广泛表达,通过自分泌或旁分泌方式对神经细胞发挥内源性保护作用。近年来的动物实验和体外细胞培养研究均证实 EPO 对脑缺血具有神经保护作用[10-11]。本实验中,脑缺血组家兔缺血侧皮质多数神经细胞变性坏死,形态不完整,胞浆内尼氏体分解,核浆分界不清,细胞核固缩,细胞周围中重度水肿,EPO 干预后,脑组织水肿减轻,变性坏死的神经细胞明显减少。这些结果表明 EPO 可以抑制细胞凋亡的发生,并能减轻脑组织水肿,与上述研究结果一致。

结果显示 EPO 治疗后家兔缺血侧皮质区 NPY 表达有所降低,提示 EPO 对缺血缺氧脑组织的保护作用可能与 NPY 的表达有关。关于 EPO 神经保护作用的具体机制目前尚不清楚,秦川等[12]研究表明 EPO 预处理在心肌 H/R 损伤中具有显著的抗氧化作用。有研究显示 EPO 可使神经元内诱导型 NOS 水平降低,并通过抑制 NO 介导的自由基产生或拮抗其毒性,从而发挥抗氧化作用。NPY 则通过激活 NOS 使 NO 增多,加重脑缺血损伤。但 EPO 是否通过调节 NO 这一途径间接调节 NPY 的含量还需进一步深入研究。有关 EPO 与 NPY 的关系研究甚少,Kondo 等[13]研究癫痫发作模型大鼠 EPO 的作用时发现无论是内源性还是外源性 EPO 均可以调节癫痫发作的严重程度并保护海马区神经元,其可能机制包括阻断海马区致癫痫细胞的形成和调节 NPY 的释放。Gebhard 等[14]研究证实暴露于 CO 中的去肾神经大鼠其 EPO 分泌显著增高,且增高效应能被 NPY 阻断。提示在 CO 暴露情况下,与肾神经相关的 EPO 分泌增多的反应可能通过 NPY 受体途径。因此我们推测,脑缺血后 EPO 调节 NPY 的释放可能是其神经保护作用机制之一。

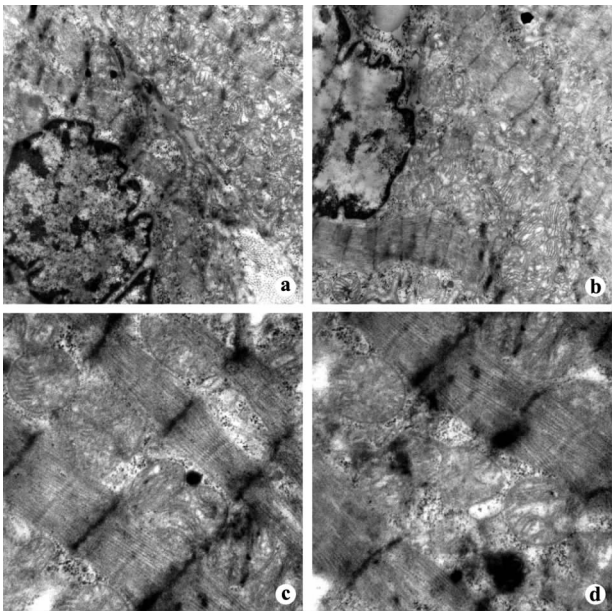
[参考文献]

[1] Duszczyk M, Ziembowicz A, Gadamski R, et al. Changes in the NPY immunoreactivity in gerbil hippocampus after hypoxic and ischemic precon ditioning [J]. Neuropeptides, 2009, 43(1): 31 - 39.

[2] 杨海林,孙树林,徐淑珍. 74 例缺血性脑血管病诊断治疗分析[J]. 局解手术学杂志,2007,16(3):184.

[3] Smiałowska M, Domin H, Zieba B, et al. Neuroprotective effects of neuropeptide Y-Y2 and Y5 receptor agonists in vitro and in vivo[J]. Neuropeptides, 2009, 43(3): 235 - 249.

（下转第 150 页）



a:转机前(A 组);b:转机前(B 组);c:A 组(单次灌注);d:B 组(多次灌注)

图 1 2 组患者心肌超微结构电镜观察(×40 000)

血管通透性增加,加重心肌水肿,而且更易产生明显的高钾血症[1]。此外,如使用晶体停搏液,则大量晶体液有可能进入 CPB,使血球压积进一步降低,加重术后肾脏负担[2]。

研究显示当心脏停跳后心脏的氧耗可降低 50%,心室减压可降低心脏 40% 的氧耗,低温只能降低 8%~10% 的氧耗[3]。常温心脏停搏后其需氧量较工作心脏减少 90%,而低温仅减少另外 5% 的氧需[4]。在未成熟心脏缺血的研究中显示,只要心脏保持停搏并处于低温环境就能提供足够的保护。因此,许多学者认为对未成熟心肌增加心脏停跳液的灌注次数,不能提供更好的保护作用,反而使心肌机械功能恢复较差,甚至是有害的[2]。这说明单次灌注在临床中是可行的。

本研究结果显示冷晶体停搏液单次灌注和多次灌注患者术后心钠素、降钙素基因相关钛、内皮素、心肌酶均较术前明显增高,但两者比较无统计学意义。2 组患者心肌超微结构破坏程度也无明显差异。由此可见,对于主动脉阻断时间在 60 min 以内且无心电活动的手术,单次灌注与多次灌注停跳液对心肌具有同样的保护效果。但单次灌注操作简单,缩短了主动脉阻断和体外循环时间,避免了多次灌注出现的高血钾、晶体液过多,血液稀释等不良反应,避免加重术后心脏和肾脏负担,有利于维持机体内环境稳定,可减少并发症的发生。由于本研究对象均是相对简单的先心病例,且主动脉阻段时间均在 60 min 以内,对复杂先心病和阻断时间较长病例的心肌保护尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Williams WG, Rebeyka IM, Tibshirani RJ, et al. Warm induction blood cardioplegia in the infant: A technique to avoid rapid cooling myocardial contmcture[J]. J Thor Cardiovasc Surg, 1990, 100(6): 896 - 901.

[2] 洗艳冰,黄伟明,朱艳玲,等. 心脏手术中单次灌注停搏液对心肌保护的效果[J]. 中国体外循环杂志,2006,4(2):100 - 102.

[3] 龙 村. 体外循环学[M]. 北京:人民军医出版社,2004:476 - 479.

[4] 文其祥. 聚焦老年心脏手术体外循环的临床实践[J]. 中国体外循环杂志,2004,2(2):65 - 67.

(编辑:兰阳军)

(上接第 147 页)

[4] Chatagner A, Hüppi PS, Ha-Vinh Leuchter R, et al. Erythropoietin and neuroprotection [J]. Arch Pediatr, 2010, 17 (S3): 78 - 84.

[5] 刘 健,李 祥,李健龙,等. 氯化铁致兔大脑中动脉脑缺血模型的建立[J]. 中华实验外科杂志,2001,(4):382.

[6] Sperk G, Hamilton T, Colmers WF. Neuropeptide Y in the dentate gyrus [J]. Prog Brain Res, 2007, 163: 285 - 297.

[7] 王 英,周武娟. 老年短暂性脑缺血发作与 hs-CRP 和 NPY 关系的探讨[J]. 放射免疫学杂志,2011,24(1):31 - 32.

[8] Yu JT, Yu NN, Gao SS, et al. Neuropeptide Y polymorphisms and ischemic stroke in Chinese population [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(3 - 4): 242 - 245.

[9] 谭 峰,顾 卫,万赛英,等. 环维黄杨星 D 对高血压大鼠脑缺血再灌注神经肽 mRNA 表达的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志[J]. 2008, 10(11): 852 - 855.

[10] Jerndal M, Forsberg K, Sena ES, et al. A systematic review and meta-analysis of erythropoietin in experimental stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(5): 961 - 968.

[11] 史志勤,王维平,于江华,等. 重组人红细胞生成素对癫痫持续状态大鼠海马 p2Akt 和 XIAP 的影响[J]. 第三军医大学学报,2009,31(1):1453 - 1457.

[12] 秦 川,肖颖彬,陈 林,等. 促红细胞生成素预处理在大鼠心肌缺氧复氧损伤中的抗氧化效应[J]. 局解手术学杂志,2011,20(1):71 - 73.

[13] Kondo A, Shingo T, Yasuhara T, et al. Erythropoietin exerts anti-epileptic effects with the suppression of aberrant new cell formation in the dentate gyrus and upregulation of neuropeptide Y in seizure model of rats[J]. Brain Res, 2009, 1296: 127 - 136.

[14] Gebhard C, Petroktistis F, Zhang H, et al. Role of renal nerves and salt intake on erythropoietin secretion in rats following carbon monoxide exposure[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 319(1): 111 - 116.

(编辑:周小林)