

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:51 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.013.html>

EPO 治疗对大鼠脊髓损伤后脊髓运动功能恢复的实验研究

王康康¹ 张 辉¹ 方 晓¹ 王少滨² 李小波¹ 刘 杰¹ 尹宗生¹

摘要 目的 探讨人重组促红细胞生成素(rh-EPO)在大鼠脊髓损伤(SCI)后运动功能恢复中的作用。方法 选取30只200~230 g成年雄性SD大鼠,随机分为假手术(Sham)组、脊髓损伤(SCI)组和EPO组,每组10只。Sham组仅行椎板切除术,不伤及脊髓。SCI组和EPO组行椎板切除及脊髓打击术。术后EPO组腹腔注射rh-EPO,SCI组和Sham组采用相同剂量的生理盐水。应用BBB评分评估大鼠术后第1、3、7、14天的后肢运动功能恢复情况。HE染色观察术后第14天脊髓形态学变化;免疫荧光测定新生神经元的增殖情况。结果 术后第1、3天SCI组和EPO组之间BBB评分差异无统计学意义;术后第7、14天EPO组BBB评分明显高于SCI组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。SCI组可见大量胶质瘢痕、

空洞形成和炎性细胞浸润;EPO组上述改变较SCI组减轻。Sham组、SCI组和EPO组新增殖神经元数目逐渐增多,各組间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 大剂量rh-EPO的治疗可减轻脊髓内炎症反应、刺激脊髓新生神经元的增殖和促进大鼠SCI后后肢运动功能的恢复。

关键词 脊髓损伤;促红细胞生成素;神经元;大鼠

中图分类号 R 651.21

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)12-1776-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.013

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是骨科较常见的损伤,对于患者而言是一个毁灭性的打击,对于医疗系统而言需要长期高昂的支出^[1],目前尚无有效的治疗方案。研究^[2]显示人重组促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rh-EPO)对神经系统具有保护作用,但具体机制尚不清楚。急性SCI后的神经生发对其肌力的恢复是至关重要的,而SCI预后不良的原因之一就是神经元死亡过多和新增殖的神经元过少。SCI后的炎症反应破坏脊髓

2016-07-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171173);安徽省自然科学基金(编号:11040606Q25)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

²安徽医科大学第四附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:王康康,男,硕士研究生;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-

mail: yinzongsheng1961@sina.com

Human umbilical cord stem cell transplantation to treat myocardial infarction: an experimental study

Wu Kaihong, Xu Fei, Sun Jian, et al

(Dept of Cardiothoracic Surgery, Nanjing Children's Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210008)

Abstract **Objective** To investigate the therapeutic effects and mechanisms of human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarction model. **Methods** Myocardial infarction was induced by using left anterior descending coronary artery, the experimental rats were randomly divided into transplantation group(5×10^6 cells) and phosphate buffered saline(PBS) control group. Cardiac function was assessed by echocardiography 4 weeks after cell transplantation. Immunofluorescence was performed to investigate the survival of transplanted cells, the difference of secretion of cytokines and capillary density. **Results** A statistically significant improvement of cardiac function was observed in the transplantation group compared with the control group 4 weeks after transplantation. Histological examination revealed that the transplanted cells survived and engrafted in the infarcted myocardium. Cell treatment contributed to the secretion of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Similarly, capillary density increased in transplantation group compared with the control group. **Conclusion** Transplantation of human umbilical cord derived stem cells contributes to cardiac function recovery through secretion of growth factors and angiogenesis.

Key words stem cells; transplantation; myocardial infarction; paracrine

内的微环境,是造成二次损伤的关键,而有效地改善微环境是研究损伤后神经生发的关键因素^[3]。李小波等^[4]等证实 EPO 可以促进脊髓源性的神经干细胞增殖和向神经元方向分化。然而,目前国内外未见在大鼠 SCI 模型中 rh-EPO 对新生神经元增殖作用的相关研究。该实验通过建立成年大鼠 SCI 打击模型,探讨 rh-EPO 对 SCI 后的可能作用,为临床治疗 SCI 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30 只成年雄性 SD 大鼠,SPF 级,200~230 g,购自安徽省实验动物中心。安徽医科大学动物实验中心饲养,饲养条件为(22±2)℃,昼夜周期 12 h/12 h。随机数字表法分为假手术(Sham)组、SCI 组和 EPO 组,每组 10 只。

1.2 SCI 动物模型制备 参考已经成功建立的 SCI 动物模型制作方法^[5],30 只大鼠用水合氯醛腹腔麻醉后背部剪毛,固定大鼠在手术台上,取俯卧位,消毒铺巾,定位以 T10 棘突为中心作长约 4 cm 的正中切口,暴露上下棘突及椎板。用特制血管钳咬除 T10 棘突及两侧椎板,暴露硬脊膜,用自制改良的 Allen 装置致 T10 脊髓急性损伤,损伤力度为 25 gcf(10 g 金属棒在玻璃管引导下从 2.5 cm 高处落下,打击硬膜表面的垫片)。Sham 组仅行椎板切除术,不伤及脊髓。SCI 组和 EPO 组行椎板切除及脊髓打击术。术后 EPO 组连续 7 d 腹腔注射 5 000 U/kg 的 rh-EPO,SCI 组和 Sham 组以相同剂量的生理盐水代替 rh-EPO。连续 3 d 应用青霉素钠,每天 3 次人工排尿,直至大鼠膀胱恢复自主排尿(图 1)。

1.3 主要试剂和抗体 rh-EPO 购自上海麒麟生物公司;大鼠抗微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2,MAP-2)抗体购自美国 Santa Cruz 公司;5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxy uridine,BRDU)购自美国 Sigma 公司;进口羊血清工作液、二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 BBB 评分 参照 Basso et al^[6]提出的大鼠脊髓损伤后功能评判标准(Basso Beattie Bresnahan functional scale, BBB)评分法,评分由两名非本组但熟悉 BBB 评分标准的研究人员分别观察,于术后第 1、3、7、14 天进行评分,记录动物后肢运动情况。

1.5 HE 染色 各组大鼠术后第 14 天处死,常规方法制作冰冻切片,冰冻切片烤干后进行染色,染色步骤如下:0.01 mmol/L PBS 冲洗 3~5 min,自来水冲洗数秒;苏木精染色 3~5 min,自来水冲洗;1%盐

酸乙醇分化 3~5 s;于碱水中反蓝 20 s;伊红染色 10~20 s 后自来水洗;梯度脱水,二甲苯透明后用中性树胶封片;显微镜下观察损伤区组织变化。

1.6 免疫荧光染色 待冰冻切片完成后即在每组各取 3 张切片行荧光检测,步骤如下:切片依次经 0.01 mmol/L PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min;0.3% TritonR X-100 漂洗 30 min;0.01 mmol/L PBS 液漂洗 3 次,每次 5 min;10% 山羊血清 37℃ 封闭 1 h;倾去血清,加一抗,4℃ 过夜;37℃ 复温 40 min,0.01 mmol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;加二抗,避光黑盒 37℃ 孵育 40 min;避光 DAPI 孵育 10~15 min;0.01 mmol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;加淬灭剂,封片后在荧光显微镜下观察新增殖神经元;每块组织取 3 张切片,每张切片选择脊髓损伤的部位并取其平均值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,首先进行正态性检验,符合正态分布计量资料采取 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数的比较采用单因素方差分析;两组间差异性比较,方差齐性者采用 LSD 检验,方差不齐则采用 Dunnett *t* 检验。不符合正态分布计量资料采取中位数百分位数法表示的 95% 置信区间 [$M(P_{2.5} \sim P_{97.5})$] 表示,两两比较采用秩和检验。

2 结果

2.1 BBB 评分 术后第 1、3 天 SCI 组与 EPO 组 BBB 评分差异无统计学意义(第 1 天 SCI 组与 EPO 组数据不符合正态分布,使用秩和检验方法进行比较, $P > 0.05$)。术后第 7 天 EPO 组 BBB 评分明显高于 SCI 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),术后第 14 天 EPO 组 BBB 评分明显高于 SCI 组($P < 0.01$),见表 1。SCI 组和 EPO 组 BBB 评分随着时间的延长均增加,而 EPO 组 BBB 评分随着时间的延长,增加更快,并在第 7 天后与 SCI 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 大鼠在不同时间点 BBB 评分(分 $n=10$ $\bar{x} \pm s$)

时间	Sham 组	SCI 组	EPO 组	F 值
第 1 天	16.80 ± 0.79	0(0~2)*	0(0~2)*	—
第 3 天	17.80 ± 1.40	2.50 ± 1.27*	2.70 ± 0.95*	517.32
第 7 天	18.80 ± 1.62	7.50 ± 1.27*	9.30 ± 1.57*#	165.33
第 14 天	19.20 ± 1.62	9.60 ± 1.17*	11.80 ± 1.14*#	143.47

与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 SCI 组比较: # $P < 0.05$

2.2 HE 染色 Sham 组无明显炎性细胞浸润、胶

质细胞增生、胶质瘢痕及空洞形成(图2A); SCI组可见大量胶质瘢痕、空洞形成和炎性细胞浸润(图2B); EPO组可见炎症细胞减少、瘢痕和空洞较SCI组减小(图2C)。

2.3 免疫荧光观测新增殖的神经元 倒置荧光显微镜下观察 Sham组、SCI组和EPO组新增殖的神经元细胞荧光染色结果显示,被Hoechst 33258标记的细胞核显示为蓝色,被MAP-2抗体标记的神经干细胞显示为绿色,被BRDU标记的新增殖细胞显示为红色,MAP-2与BRDU染色重合在细胞核上,表明有新增殖的神经元表达。因Sham组数据不符合正态分布,故使用秩和检验方法对SCI组和Sham组进行统计学比较,显示SCI组新增殖的神经元(3.22 ± 2.22)明显多于Sham组[1(0~2)],差异有统计学意义($P < 0.01$); EPO组新增殖的神经元数目(5.56 ± 1.23)较SCI组(3.22 ± 2.22)数目明显增加($F = 47.90, P < 0.01$)。各组间比较差异有统计学意义($F = 47.90, P < 0.01$)。见图3。

3 讨论

急性SCI的损伤过程主要有机械性损伤和继发性损伤。目前多数治疗研究集中在继发性损伤,且继发性损伤治疗的研究主要集中在减轻炎症反应和促进新生神经元增殖方面。已有研究^[7-8]证实EPO在脑中对这两方面均有作用。EPO作用于红细胞的机制主要是和细胞膜上的受体(EPOR)相结合,交联形成二聚体,导致相关的JAK2酪氨酸激酶自

身磷酸化,进一步引发下游信号转导通路,发挥生物学效应^[9]。EPO除刺激红细胞前体细胞增殖分化外,还对神经系统发挥保护作用^[2,7-8,10]。朱丽华等^[11]证明EPO可促进早产鼠脑室周围白质损伤模型中的血管新生反应。在脑组织的研究中神经发生往往出现在血管生发之后,血管生发为神经元的新生提供了良好的平台。Iwai et al^[12]也发现EPO在治疗新生大鼠缺血低氧性疾病时可促进新生神经元的增殖和改善神经功能。作为EPO的重组形态, rh-EPO的理化生物学特性与EPO无差别。Grieco et al^[13]证明大剂量rh-EPO能够很好地透过血脑屏障发挥作用,为外源性EPO治疗SCI提供了可行性。

研究^[4]证实成体大鼠脊髓组织分离培养可获得神经干细胞(NSCs),在rh-EPO作用下,可能通过激活EPO/EPOR信号通路,促进NSCs向神经元方向分化。由于rh-EPO在治疗SCI时有保护作用,故本实验以成体大鼠SCI模型为研究对象,采用连续7 d大剂量rh-EPO治疗SCI,探讨rh-EPO在对SCI后炎症反应、神经元的增殖和后肢运动功能恢复中的可能作用。本研究显示大鼠在第7天和第14天的BBB评分均明显高于SCI组,并随术后时间的延长而增高。同时术后第14天脊髓的形态学改变也显示rh-EPO对大鼠SCI后的炎症有明显减轻作用,这与研究^[7-8]结果相同。另外本研究还表明在大鼠SCI模型后14 d脊髓组织中有神经元的新生,且经rh-EPO治疗后,新生的神经元进一步增多,与研究^[2,12]结果相同。神经元死亡包括细胞凋亡和炎症

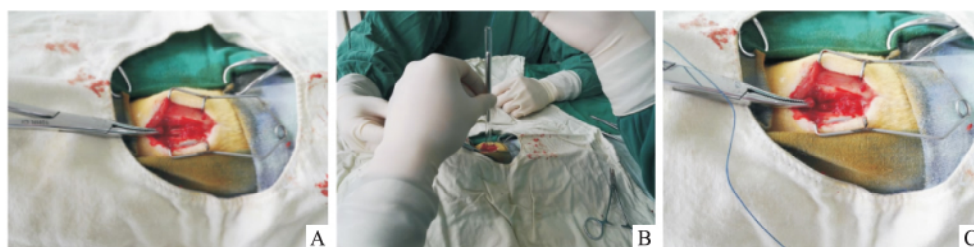


图1 大鼠脊髓损伤模型示意图

A: 暴露 T10 脊髓硬脊膜; B: SCI 打击模型建立; C: 打击后脊髓充血

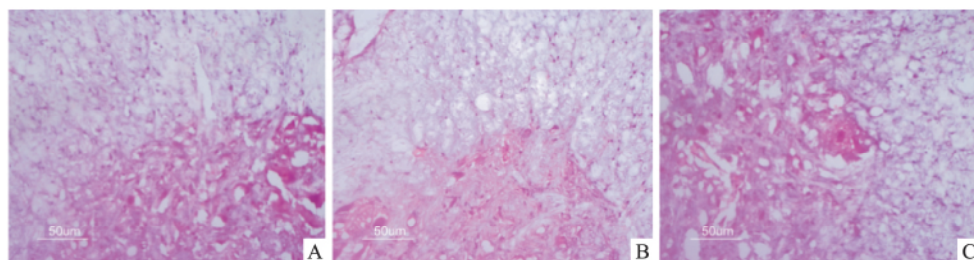


图2 各组 HE 染色 ×100

A: Sham 组; B: SCI 组; C: EPO 组

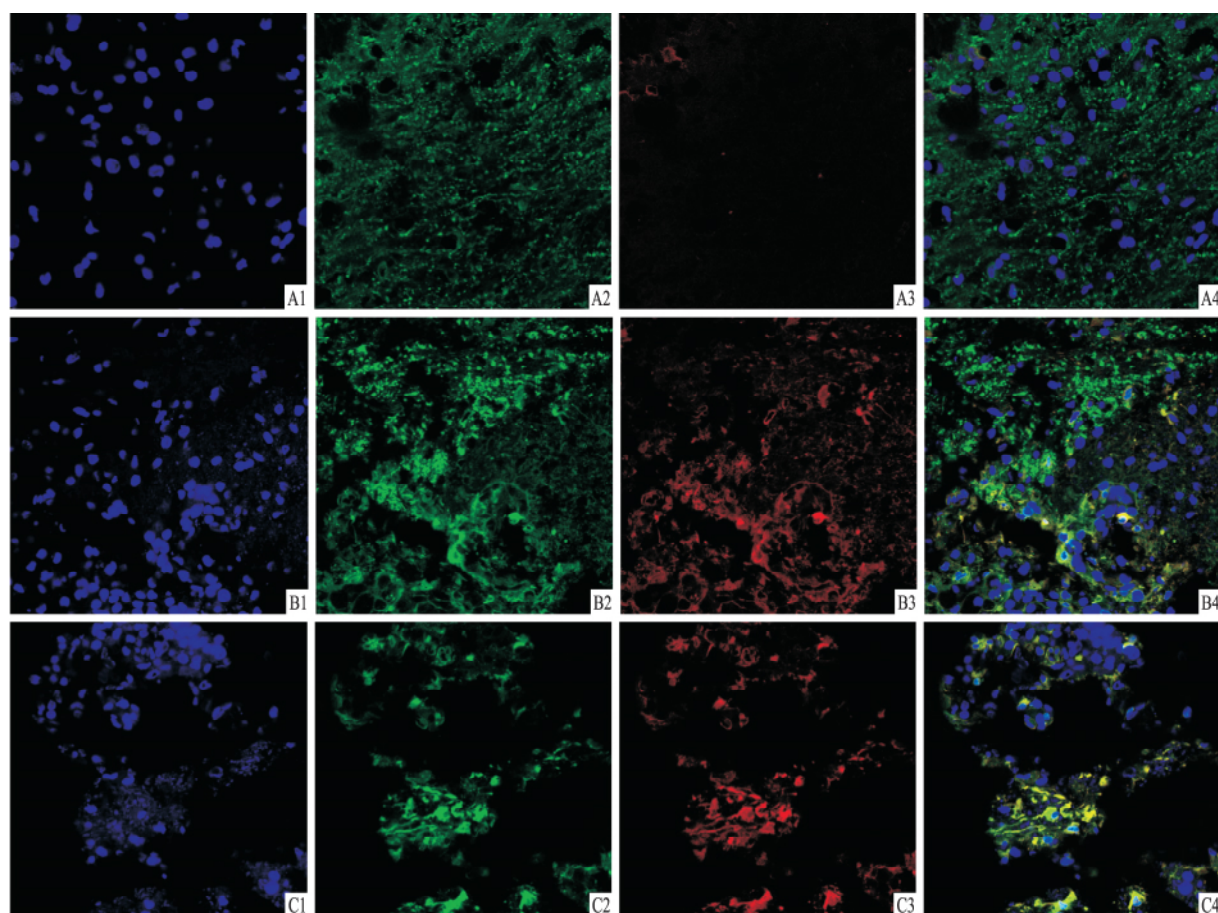


图3 显微镜观测新增殖的神经元 ×200

A: Sham 组; B: SCI 组; C: EPO 组; 1: Hoechst 33258 标记细胞核; 2: MAP-2 标记的神经元; 3: BRDU 标记的新增殖细胞; 4: 合成图像

坏死两种方式。神经元凋亡系神经元在一定病理性生理条件下由基因控制的程序性死亡。rh-EPO 已被证实可通过抑制 SCI 后神经细胞的凋亡, 从而对脊髓起保护作用^[1]。SCI 中神经元的进行性坏死系非协调性炎症反应造成细胞毒性物质的持续释放所致。在 SCI 中, 炎症反应通常不能使损伤修复, 而是随着损伤的发展, 脊髓内的组织和细胞进行性坏死。本研究显示 rh-EPO 治疗可减轻脊髓内炎症反应。研究^[14-15]证实在大鼠脑缺血模型中 rh-EPO 可降低缺血后的脑组织和血清中 IL-1 β 、TNF- α 的表达, 并通过抑制脑中 NF- κ B 表达和促进 I κ B α 表达从而减轻炎症反应, 起到神经保护作用。Zhang et al^[7] 在 EPO 治疗大鼠自身免疫性脑脊髓炎实验中发现, 炎症反应较对照组明显减轻, 神经功能恢复得到明显改善。而 EPO 在 SCI 中的抗炎作用机制尚不完全清楚。

本研究表明 rh-EPO 在 SCI 后不仅可减轻脊髓内炎症反应, 还可促进新生神经元的增殖。可能机制为: rh-EPO 通过激活 NSCs 的 EPO/EPOR 通路,

引起 EPOR 表达上调, 进而影响了成体大鼠脊髓 NSCs 的分化过程, 使其向神经元方向分化^[4]; rh-EPO 通过激活星形胶质细胞和神经元细胞等的 EPO/EPOR 通路使其合成 BDNF、PDNF 等因子, 间接促进成体大鼠脊髓 NSCs 向神经元分化^[8-11]; 通过抑制损伤后炎症反应, 改善损伤后的脊髓内微环境, 从而促进神经元细胞的增殖^[7-8]。但 rh-EPO 是通过何种路径减轻 SCI 后炎症反应及促进新生神经元增殖目前尚不清楚, 具体作用机制有待于进一步探讨。

综上所述, 连续 7 d 大剂量腹腔注射 rh-EPO 可减轻脊髓内炎症反应、促进新生神经元增殖, 这可能是大剂量 rh-EPO 治疗促进大鼠 SCI 后运动功能恢复的原因之一, 具体的作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Matis G K, Birbilis T A. Erythropoietin in spinal cord injury [J]. *Eur Spine J*, 2009, 18(3): 314-23.
- [2] Xu F, Yu Z Y, Ding L et al. Experimental studies of erythropoietin

- protection following traumatic brain injury in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2012, 4(6): 977–82.
- [3] Burdick J A, Nunjak-Novakovic G. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation [J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(2): 205–19.
- [4] 李小波, 张辉, 王少滨, 等. 促红细胞生成素对脊髓源性神经干细胞分化能力的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(1): 14–7.
- [5] 祖波, 尹宗生, 张辉. 急性脊髓挫伤性模型的制备及观察 [J]. *第四军医大学学报*, 2007, 28(14): 1264–7.
- [6] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection [J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2): 244–56.
- [7] Zhang J, Li Y, Cui Y, et al. Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice [J]. *Brain Res*, 2005, 1034(1–2): 34–9.
- [8] Agnello D, Bigini P, Villa P, et al. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Brain Res*, 2002, 952(1): 128–34.
- [9] Tanaka T, Nangaku M. Recent advances and clinical application of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents [J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(9): 1068–73.
- [10] Grasso G, Sfacteria A, Passalacqua M, et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression after experimental spinal cord injury encourages therapy by exogenous erythropoietin [J]. *Neurosurgery*, 2005, 56(4): 821–7.
- [11] 朱丽华, 施燕, 王诗雨, 等. 人重组促红细胞生成素对早产儿脑室周围白质损伤模型鼠脑血管生成的影响 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2015, 30(9): 698–701.
- [12] Iwai M, Stetler R A, Xing J, et al. Enhanced oligodendrogenesis and recovery of neurological function by erythropoietin after neonatal hypoxic/ischemic brain injury [J]. *Stroke*, 2010, 41(5): 1032–7.
- [13] Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(14): 9450–5.
- [14] 周志强, 赵立波, 王凤英, 等. rhEPO 抑制大鼠脑出血后炎症反应与增强 LIVIN 的表达 [J]. *重庆医学*, 2009, 38(9): 1067–70.
- [15] 石秋艳, 李倩, 姜进克, 等. 促红细胞生成素对大鼠脑出血炎症反应的抑制作用及机制 [J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(8): 727–30.

Erythropoietin treatment improves motor functional recovery in spinal cord injury rats

Wang Kangkang, Zhang Hui, Fang Xiao, et al

(*Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract Objective To investigate the effect of recombinant human erythropoietin (rh-EPO) on the recovery of spinal motor function in rats with spinal cord injury (SCI). **Methods** 30 SD rats were randomly divided into sham operation (Sham) group, SCI group and EPO treatment group, 10 rats in each group. The rats in Sham group only underwent laminectomy. SCI group and EPO treatment group were subjected to laminectomy resection and bunion of spinal cord. The rats in EPO treatment group were treated by intraperitoneal injection of rh-EPO after surgery immediately. The rats in SCI group and Sham group were treated with the same dose of normal saline. The motor function recovery of 1, 3, 7, 14 days after spinal cord injury was evaluated by BBB score. The morphology of the spinal cord was observed by HE staining. The proliferation of newborn neurons was determined by immunohistochemistry. **Results** The statistic difference of BBB score between SCI group and EPO treatment group in 1 day, 3 days was not statistically significant. It was found that the 7 days' and 14 days' BBB scores in EPO treatment group were significantly higher than that in SCI group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). HE staining results showed that there were glial scar, cavity formation and inflammatory cells infiltration in the SCI group, and the pathological changes in the EPO treatment group were lighter than those in the SCI group. Immunofluorescence results showed that the numbers of new proliferating neurons in the Sham group, the SCI group and the EPO group were gradually increased, there were significant differences among all groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Treatment with high dose of rh-EPO can reduce the inflammatory response in spinal cord, stimulate the proliferation of newborn neurons in the spinal cord and promote the recovery of motor function after spinal cord injury in rats.

Key words spinal cord injury; erythropoietin; neurons; rats