

. 实验研究 .

# 促红细胞生成素对大鼠蛛网膜下腔出血后血管痉挛的防治作用

熊 平 唐晓平

**【摘要】目的** 探讨促红细胞生成素(EPO)对大鼠蛛网膜下腔出血(SAH)后脑血管痉挛(CVS)的影响及其机制。**方法** 将60只成年SD大鼠随机分为正常组(6只)、假手术组(18只)、SAH组(18只)、EPO组(18只);假手术组、SAH组合EPO组根据取材时间有分为1、3、7 d三亚组,每亚组6只。采用枕大池二次注血法建立SAH模型。EPO组建模成功后30 min内腹腔注射EPO(3 000 IU/kg, 1次/d)。建模成功后1、3、7 d采用取材基底动脉行HE染色测量基底动脉管径及管壁厚度,采用免疫组化检测基底动脉血管壁核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)及内皮细胞型一氧化氮合酶(eNOS)的表达。**结果** SAH后1、3、7 d,假手术组基底动脉管径、管壁厚度、NF- $\kappa$ B和eNOS表达水平与正常组无统计学差异( $P>0.05$ );与假手术组相比,SAH组各时间点基底动脉管径均明显减小( $P<0.05$ ),管壁厚度均明显增加( $P<0.05$ ),NF- $\kappa$ B表达水平均明显增加( $P<0.05$ ),eNOS表达水平均明显降低( $P<0.05$ );与SAH组相比,EPO组基底动脉管径、管壁厚度均明显改善( $P<0.05$ ),NF- $\kappa$ B表达水平均明显降低( $P<0.05$ ),eNOS表达水平均明显增加。**结论** EPO能够显著改善大鼠SAH后CVS,机制可能是通过上调eNOS的表达、抑制NF- $\kappa$ B的表达来实现的。

**【关键词】** 蛛网膜下腔出血;脑血管痉挛;促红细胞生成素;核转录因子- $\kappa$ B;内皮细胞型一氧化氮合酶;大鼠

**【文章编号】** 1009-153X(2018)04-0254-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743.9

## Preventive and therapeutic effects of erythropoietin on cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats

XIONG Ping, TANG Xiao-ping. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of erythropoietin (EPO) on the cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage (SAH) and its mechanism in rats. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into normal (n=6), SAH (n=18), sham operation (n=18) and treatment groups (n=18). Each rat received intraperitoneal injection of EPO (3000IU/kg) within 30 minutes after SAH in the treatment group and 1 day. Each rat in sham and SAH groups received the intraperitoneal injection of isovolumic physiologic saline once a day. Six rats were sacrificed respectively 1, 3 and 7 days after establishment of SAH model in SAH, sham and EPO treatment groups. The rats in sham group were sacrificed at 1 day, 3 days and 7 days after successful modeling in order to take basilar arteries. The basilar artery spasm was observed after hematoxylin-eosin staining. The expressions of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the walls of the basilar arteries were detected by immunohistochemical technique in all the groups 1, 3 and 7 days after SAH. **Results** The diameters of the basilar arteries were significantly bigger in normal and sham operation groups than that in the EPO treatment group ( $P<0.05$ ), which was significantly bigger than that in the SAH group 1, 3 and 7 days after SAH ( $P<0.05$ ). The basilar arteries walls were significantly thicker in SAH group than that in the EPO treatment group ( $P<0.05$ ), which was significantly thicker than those in the normal and sham operation groups 1, 3 and 7 days after SAH ( $P<0.05$ ). The levels of eNOS expressions were significantly higher in the normal and sham operation groups than that in EPO treatment group ( $P<0.05$ ), which was significantly higher than that in the SAH group 1, 3 and 7 days after SAH ( $P<0.05$ ). The level of NF- $\kappa$ B expressions were significantly lower in the normal and sham operation groups than that in EPO treatment group ( $P<0.05$ ), which was significantly lower than that in SAH group 1, 3 and 7 days after SAH ( $P<0.05$ ). **Conclusions** That EPO relieves cerebral vasospasm after SAH may be achieved by upregulating the expression of eNOS and inhibiting the expression of NF- $\kappa$ B in the vessel walls in the rats.

**【Key words】** Subarachnoid hemorrhage; Cerebral vasospasm; NF- $\kappa$ B; eNOS; EPO; Expression

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)具有较高的病死率和致残率,最主要的原因

颅内动脉瘤破裂,约占85%<sup>[1]</sup>。脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是SAH高病死率和高致残率的主要原因之一。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)能够改善CVS,具体机制不十分清楚。核转录因子- $\kappa$ B(nuclear-transcription factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)及内皮细胞型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide

synthase,eNOS)在CVS发生过程中起重要作用。本研究探讨EPO改善CVS与NF-κB、eNOS的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 将60只SD大鼠随机分为正常组(6只)、假手术组(18只)、SAH组(18只)、EPO组(18只);假手术组、SAH组合EPO组根据取材时间有分为1、3、7 d三亚组,每亚组6只。

1.2 实验动物模型的建立 采用枕大池二次注血法建立SAH模型,假手术组穿刺成功后则注入等量生理盐水。正常组不予任何处理。EPO组建模成功后腹腔注射EPO(3 000 IU/kg,1次/d),直到处死动物。

1.3 标本采集 建模成功后1、3、7 d采用4%多聚甲醛灌注固定,并快速断头取脑组织,将脑桥段组织(包含基底动脉)置于4%多聚甲醛中,做好标记,置于4℃冰箱中固定24 h。24 h后制作蜡块(包埋的方向是将血管纵轴与切片时的刀面垂直)并切片,厚度为4 μm。

1.4 HE 染色 HE染色成功后,测量基底动脉的直径及管壁厚度,为减少误差计算出校正直径及校正血管壁厚度。校正直径=[(最长内径×最短内径)1/2];校正血管壁厚度=[(最长外径-最长内径)+(最短外径-最短内径)]/4。

1.5 免疫组化染色 采用二步法进行免疫组化染色。抗体选用英国Abcam公司的鼠抗NF-κB、eNOS单克隆抗体,阳性表达为在细胞质及细胞核找到棕色或棕黄色颗粒。采用双盲的方法由两位病理科医师在光学显微镜下观察两种抗体的阳性表达。在高倍镜下选5个视野,分别计算NF-κB染色阳性细胞占有细胞的百分比,后取平均值作为其表达的阳性百分比。在病理图像分析系统测定eNOS阳性染色面积,积分光密度值(integrated optical density, IOD),然后计算出平均光密度值。平均观密度值=IOD/阳性染色面积。

1.6 统计学方法 用SPSS 19.0软件进行分析,定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基底动脉血管壁的病理学变化 正常组与假手术组基底动脉内膜及外膜管壁平整,内弹力膜未见明显皱褶、断裂,平滑肌细胞排列规整,无炎症细胞浸润;SAH组管壁厚度增加,内膜皱褶加深,内见炎症细胞浸润,EPO组改变较SAH组程度轻(图1)。

2.2 基底动脉管径及管壁厚度变化 SAH后1、3、7 d,假手术组基底动脉管径、管壁厚度与正常组无统计学差异( $P>0.05$ ),SAH组各时间点基底动脉管径较假手术组均明显减小( $P<0.05$ ),而管壁厚度均明显增加( $P<0.05$ );EPO组基底动脉管径、管壁厚度较SAH组均明显改善( $P<0.05$ )。见表1、2。

2.3 基底动脉NF-κB的表达变化 SAH后1、3、7 d,假手术组基底动脉NF-κB的表达水平与正常组无统计学差异( $P>0.05$ ),SAH组各时间点基底动脉NF-κB的表达水平较假手术组均明显增加( $P<0.05$ );EPO组基底动脉NF-κB的表达水平较SAH组均明显降低( $P<0.05$ )。见表3、图2。

2.4 基底动脉eNOS的IOD变化 SAH后1、3、7 d,假手术组基底动脉eNOS的IOD与正常组无统计学差异( $P>0.05$ ),SAH组各时间点基底动脉eNOS的IOD

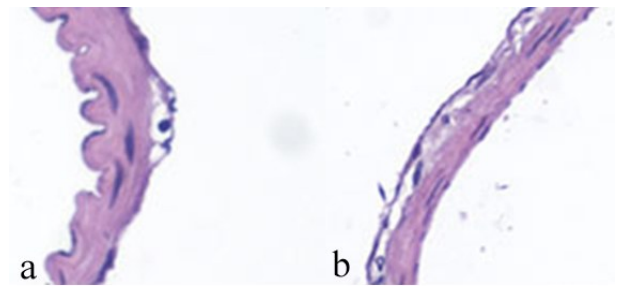


图1 大鼠SAH后3 d基底动脉HE染色表现(×200)  
a. SAH组;b. EPO组;SAH. 蛛网膜下腔出血;EPO. 红细胞生成素

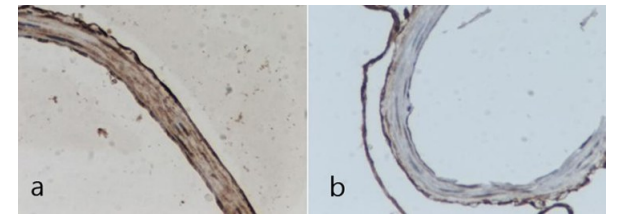


图2 大鼠SAH后7 d基底动脉NF-κB免疫组化染色(×400)  
a. SAH组,血管壁NF-κB表达较强;b. EPO组,血管壁NF-κB表达减弱;SAH. 蛛网膜下腔出血;EPO. 红细胞生成素

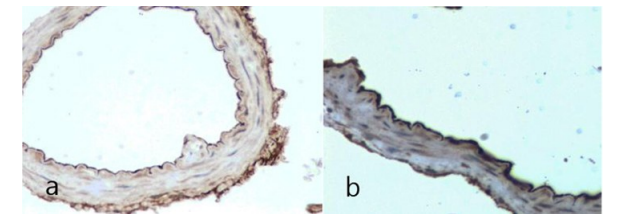


图3 大鼠SAH后7 d基底动脉eNOS免疫组化染色(×400)  
a. SAH组,血管壁eNOS表达较弱;b. EPO组,血管壁eNOS表达增强;SAH. 蛛网膜下腔出血;EPO. 红细胞生成素;eNOS. 内皮细胞型一氧化氮合酶

表 1 各组大鼠基底动脉校正直径比较(μm)

组别	评估时间		
	SAH 后 1 d	SAH 后 3 d	SAH 后 7 d
正常组	263.15±19.59		
假手术组	256.71±21.59	253.38±17.48	253.14±20.50
SAH 组	212.08±19.17*	200.60±21.85*	135.61±26.85*
EPO 组	241.40±20.24**	221.30±15.61**	230.31±11.75**

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与 SAH 组相应值比, $\#P<0.05$ ;SAH.蛛网膜下腔出血;EPO.促红细胞生成素

表 2 各组大鼠基底动脉管壁厚度比较(μm)

组别	评估时间		
	SAH 后 1 d	SAH 后 3 d	SAH 后 7 d
正常组	9.23±1.32		
假手术组	9.65±0.69	9.72±0.8	9.82±0.92
SAH 组	12.82±1.93*	19.13±1.65*	23.63±2.13*
EPO 组	10.28±1.10**	16.23±1.41**	11.70±1.73**

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与 SAH 组相应值比, $\#P<0.05$ ;SAH.蛛网膜下腔出血;EPO.促红细胞生成素

表 3 各组大鼠基底动脉管壁 NF-κB 表达阳性率比较

组别	评估时间		
	SAH 后 1 d	SAH 后 3 d	SAH 后 7 d
正常组	7.4±0.79		
假手术组	6.92±1.00	6.95±1.07	6.78±1.23
SAH 组	17.12±3.32*	21.93±3.95*	30.25±3.03*
EPO 组	12.58±3.40**	9.78±2.20**	20.98±3.74**

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与 SAH 组相应值比, $\#P<0.05$ ;SAH.蛛网膜下腔出血;EPO.促红细胞生成素;NF-κB.核转录因子-κB

表 4 各组大鼠基底动脉管壁 eNOS 表达平均光密度值

组别	评估时间		
	SAH 后 1 d	SAH 后 3 d	SAH 后 7 d
正常组	0.350±0.707		
假手术组	0.345±0.589	0.333±0.445	0.341±0.679
SAH 组	0.185±0.367*	0.213±0.196*	0.211±0.331*
EPO 组	0.243±0.459**	0.270±0.260**	0.283±0.408**

注:与假手术组相应值比,\* $P<0.05$ ;与 SAH 组相应值比, $\#P<0.05$ ;SAH.蛛网膜下腔出血;EPO.促红细胞生成素;eNOS.内皮细胞型一氧化氮合酶

较假手术组均明显减少( $P<0.05$ );EPO 组基底动脉 eNOS 的 IOD 较 SAH 组均明显增加( $P<0.05$ )。见表 4、图 3。

3 讨论

SAH 后发生迟发性 CVS 的机制目前为止还不是十分明确,多因素共同作用是公认的可能机制。目前公认的可能机制有<sup>[2-5]</sup>:①血液进入蛛网膜下腔引起纤维蛋白溶解,从而导致多种血管活性物质的释放,如儿茶酚胺、血管紧张素等;②SAH 后自由基大量生成,主要为氧自由基,打破了自由基产生和清除的动态平衡;③血管舒张因子调节失衡导致 CVS,其中一氧化氮(nitric oxide, NO)是生物体内调节血管舒张的重要体液调节因子,而 NO 的合成主要由 eNOS 来调控,因此 eNOS 的表达情况在迟发性 CVS 中有着重要作用;④SAH 后导致血管内皮细胞发生凋亡导致 CVS;⑤免疫炎症反应导致 CVS, NF-κB 在机体在免疫炎症反应中发挥着关键性的调节作用;⑥血管壁的结构和功能障碍。

目前有研究表明 EPO 及其受体在神经元、海马细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞和血管内皮细胞中均有表达<sup>[6,7]</sup>,在中枢神经系统疾病中起重要作用。其药理作用主要包括:①促进红细胞的生成;②抗神经元凋亡<sup>[8]</sup>;③调节循环、促进血管生成<sup>[9]</sup>;④抗炎症<sup>[10]</sup>;⑤调节神经质。目前,EPO 在癌症性贫血<sup>[11]</sup>、肾性贫血<sup>[12]</sup>的治疗上已取得了较好的临床效果。最近研究发现 EPO 在 SAH 中也具有脑保护作用,能够改善 CVS,具体的作用机制目前还不清楚。

NF-κB 是一种多效转录因子。目前发现其激活机制主要有两种<sup>[13,14]</sup>:①SAH 后肿瘤坏死因子-α 等细胞因子激活 NF-κB 诱导激酶激活 NF-κB;②直接刺激活化 NF-κB 诱导激酶激活 NF-κB。本研究表明 SAH 后基底动脉 NF-κB 的表达显著增加,EPO 干预后其表达显著减弱,CVS 缓解,表明 EPO 缓解 CVS 可能是抑制 NF-κB 的表达来实现的。

研究表明 NO 在 SAH 后 CVS 中发挥着重要的作用<sup>[15,16]</sup>。eNOS 广泛分布于血管内皮细胞<sup>[17]</sup>,是 NO 合成的关键酶。本研究发现 SAH 后,血管内皮细胞 eNOS 表达显著减弱,而 EPO 干预后其表达显著增加,说明 EPO 缓解基底动脉 CVS 可能是通过上调 eNOS 的表达,从而使 NO 合成增加。

综上所述,我们的实验结果表明,EPO 能够显著改善大鼠 SAH 后 CVS,其机制可能与抑制 NF-κB、增强 eNOS 的表达有关。

## 【参考文献】

- [1] Van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid hemorrhage: diagnosis, causes and management [J]. Brain, 2001, 124(2): 249–278.
- [2] Sun Q, Wang F, Li W, *et al.* Glycyrrhizic acid confers neuroprotection after subarachnoid hemorrhage via inhibition of high mobility group box-1 protein: a hypothesis for novel therapy of subarachnoid hemorrhage [J]. Med Hypotheses, 2013, 81 (4): 681–685.
- [3] Lei Q, Li S, Zheng R, *et al.* Endothelin-1 expression and alterations of cerebral microcirculation after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Neuroradiology, 2015, 57(1): 63–70.
- [4] Kiser TH. Cerebral vasospasm in critically ill patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: does the evidence support the ever-growing list of potential pharmacotherapy interventions [J]? Hosp Pharm, 2014, 49(10): 923–941.
- [5] Ramesh SS, Prasanthi A, Bhat DI, *et al.* Correlation between plasma total nitric oxide levels and cerebral vasospasm and clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage in Indian population [J]. J Neurosci Rural Pract, 2014, 5(1): 22–27.
- [6] Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2001, 60(4): 386–392.
- [7] Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system [J]. Brain Res, 2004, 1000(1–2): 19–31.
- [8] Zhou TF, Yu JG. Recombinant human erythropoietin attenuates neuronal apoptosis and cognitive defects via JAK2/STAT3 signaling in experimental endotoxemia [J]. J Surg Res, 2013, 183(1): 304–312.
- [9] Xiong Y, Mahmood A, Zhang Y, *et al.* Effects of posttraumatic carbamylated erythropoietin therapy on reducing lesion volume and hippocampal cell loss, enhancing angiogenesis and neurogenesis, and improving functional outcome in rats following traumatic brain injury [J]. J Neurosurg, 2011, 114(2): 549–559.
- [10] Bond WS, Rex TS. Evidence that erythropoietin modulates neuroinflammation through differential action on neurons, astrocytes, and microglia [J]. Front Immunol, 2014, 5: 523–531.
- [11] Hiradfar A, Banihosseinian M. The efficacy of recombinant human erythropoietin in treatment chemotherapy induced anemia in children diagnosed with a solid cancer [J]. Iran J Ped Hematol Oncol, 2014, 4(4): 151–159.
- [12] Nezu M, Souma T, Yamamoto M. Renal erythropoietin-producing cells and kidney disease [J]. Nihon Rinsho, 2014, 72(9): 1691–1700.
- [13] Liu F, Xia Y, Parker AS, *et al.* IKK biology [J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 239–253.
- [14] Ghosh S, Hayden MS. Celebrating 25 years of NF- $\kappa$ B research [J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 5–13.
- [15] Sehba F, Bederson J. Nitric oxide in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Acta Neurochir Suppl, 2011, 110 (1): 99–103.
- [16] Attia MS, Lass E, Loch MR. Nitric oxide synthases: three pieces to the puzzle [J]. Acta Neurochir Suppl, 2015, 120: 131–135.
- [17] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J, 2012, 33(7): 829–837.

(2017-10-20 收稿, 2018-02-20 修回)