四川大学学报(医学版)
J Sichuan Univ (Med Sci Edi) 2012; 43(5):687 - 689

不同剂量重组人促红细胞生成素在宫内缺血缺氧环境中透过胎盘屏障及血脑屏障的通透性*

马玉姗[1],周 俊[2],柳 慧[1],杜 宇[1],林雪梅[1△]

1.四川大学华西第二医院 麻醉科(成都 610041);2.四川大学华西口腔医院 麻醉科(成都 610041)

【摘要】 **目的** 探讨不同剂量重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)在宫内缺血缺氧时透过胎盘屏障及胎鼠血脑屏障的通透性。**方法** 孕19 d(孕晚期)SD大鼠,分为3组:rhEPO治疗组(Treat组)、假手术对照组(Sham组)和生理盐水缺血对照组(I/R组)。Treat组和I/R组制备宫内缺血缺氧模型,Sham组只进行开关腹手术。Treat组和Sham组根据注射rhEPO的剂量不同各自再分为3组,分别在宫内缺血缺氧处理或开关腹手术前30 min经孕鼠尾静脉注射^{125}I标记的rhEPO 2500 U/kg、5000 U/kg、7500 U/kg,I/R组在宫内缺血缺氧处理前30 min经尾静脉注入生理盐水。均于缺血缺氧处理或开关腹手术后24 h取胎盘、羊水及胎鼠脑、肝、心、肺和肾,检测并比较各组织中^{125}I-rhEPO的放射比活性。**结果** Treat组和Sham组胎盘、羊水及胎鼠各组织中均能检测到^{125}I-rhEPO的分布。^{125}I-rhEPO在胎盘、羊水及胎鼠各组织中的分布均随rhEPO注射剂量的增加而增加。在各剂量组中,Treat组胎鼠各组织中的^{125}I-rhEPO含量均高于Sham组($P<0.05$)。**结论** 在宫内缺血缺氧环境下,胎盘屏障及胎鼠血脑屏障对外源性rhEPO的通透性增加。

【关键词】 重组人促红细胞生成素 缺血缺氧 胎盘屏障 血脑屏障 通透性

Erythropoietin through the Placenta Barrier and Fetal Blood-Brain Barrier with Transient Uteroplacental Ischemia

MA Yu-shan[1], *ZHOU Jun*[2], *LIU Hui*[1], *DU Yu*[1], *LIN Xue-mei*[1△]. 1. *Department of Anesthesia, West China Second Hospital, Sichuan University*, Chengdu 610041, China; 2. *Department of Anesthesia, West China Stomatological Hospital, Sichuan University*, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: lxm0301@gmail.com

【**Abstract**】 **Objective** To observe the permeability of recombinant human erythropoietin through placenta barrier and fetal blood-brain barrier after transient uteroplacental ischemia. **Methods** Rats on days 19 of pregnancy were divided into rhEPO treated group, ischemia-reperfusion group and sham-operated group. Fetal ischemia in rhEPO treated group and ischemia-reperfusion group was induced by bilateral occlusion of the utero-ovarian artery for 20 minutes. Different dosage of ^{125}I-rhEPO (2500 U/kg, 5000 U/kg, 7500 U/kg) was injected into the rats through caudal veins 30 min before injury in rhEPO treated group and sham-operated group. Saline was administered intravenously 30 min before the induction of hypoxic-ischemic injury in ischemia-reperfusion group. The amniotic fluid, placenta and fetal organs including brain, liver, heart, lung and kidney were collected to measure the radioactivity at 24h after injury. **Results** ^{125}I-rhEPO was detected in amniotic fluid, placenta and fetal organs. The radioactivity of ^{125}I-rhEPO in these tissues increased gradually with the increased dose injected in rhEPO treated group and sham-operated group. There were significant differences in the radioactivity of ^{125}I-rhEPO between rhEPO treated group and sham-operated group ($P<0.05$). **Conclusion** The permeability of rhEPO through placental barrier and blood-brain barrier increased under the condition of fetal ischemia and hypoxia.

【**Key words**】 Recombinant human erythropoietin Hypoxia-ischemia Placental barrier Blood brain barrier Permeability

围产期缺血缺氧性脑病(hypoxia-ischemic encephalopathy,HIE)是由围产期窒息所致脑的缺血缺氧性损伤,是围产期危害最大的常见病之一。重度窒息患儿常遗留严重神经系统功能障碍,甚至造成围产儿死亡[1]。临床上90%的缺血缺氧性脑损伤发生在宫内和生产时,因此对宫内窘迫进行早期干预,对预防宫内缺血缺氧性脑损伤具有重要的临床意义。

重组人促红细胞生成素(recombiant human erythropoietin,rhEPO)是一种通过重组DNA技术生成的具有与天然EPO完全相同氨基酸序列和生物活性的糖蛋白[2]。大量研究证实,rhEPO除了具有造血活性外,还具有广泛的组织保护活性,尤其是

* 四川省科技厅项目(No. 2008JY0028-1)资助

△ 通讯作者, E-mail: lxm0301@gmail.com

对中枢神经系统的保护作用更是备受关注。然而目前有关 rhEPO 与胚胎期脑损伤关系的研究很少。我们的前期研究已证实 rhEPO 能在宫内缺血缺氧时通过胎盘屏障进入胎鼠体内[3],本研究旨在探讨胎盘屏障及胎鼠血脑屏障对外源性 rhEPO 的通透性与 rhEPO 剂量之间的关系,为进一步研究外源性 rhEPO 对围产期缺血缺氧性脑损伤的保护作用提供重要依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 *实验动物* SD 大鼠(220～250 g)购自四川省动物中心,以标准大鼠颗粒饲料喂养,室温 22 ℃,相对湿度 85%。

1.1.2 *实验试剂* rhEPO 购自上海普欣生物技术有限公司,纯度>98%,生物活性 1.2×10^5 U/mg,−20 ℃冰箱保存。$Na^{125}I$ 购自北京原子高科核技术应用股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *妊娠确定* 取无交配史 SD 大鼠,于发情期前 1 d 晚上将雌、雄大鼠按 2∶1 比例合笼,次日晨 8∶00 作阴道拭子涂片,以显微镜下检出精子之日定为受孕第 1 d。提出单笼饲养至孕 19 d 备用。

1.2.2 *宫内缺血缺氧模型的制备* 参照 Tanaka 等[4]的方法制备模型。以 1%戊巴比妥钠(0.0033 mL/g)行腹腔注射麻醉,常规备皮、消毒、铺巾,选下腹正中切口暴露双侧子宫卵巢动脉。用 4 个微小动脉夹分别夹住双侧子宫卵巢动脉 20 min 以造成宫内缺血缺氧状态。在钳夹过程中不断更换覆盖于子宫和腹部上的温生理盐水纱布,并用烤灯加热保持局部温度在 37 ℃左右。20 min 后拆除动脉夹,恢复血供,逐层关腹。

1.2.3 *动物分组* 将 14 只孕 19 d SD 大鼠分为 3 组:治疗组(Treat 组)、假手术对照组(Sham 组)和生理盐水缺血对照组(I/R 组)。Treat 组和 Sham 组根据注射 rhEPO 的剂量不同各自再分为 3 组,即 2500 U/kg 组、5000 U/kg 组和 7500 U/kg 组。总共为 7 组,每组 2 只孕鼠。Treat 组在制备宫内缺血缺氧模型前 30 min 经孕鼠尾静脉分别注入 ^{125}I-rhEPO 2500 U/kg、5000 U/kg、7500 U/kg,并于缺血再灌注 24 h 时取标本。Sham 组只进行开关腹手术,不钳夹子宫动脉,在手术前 30 min 经尾静脉分别注入 ^{125}I-rhEPO 2500 U/kg、5000 U/kg、7500 U/kg,并于手术后 24 h 取标本,以检测正常情况下 rhEPO 对胎盘屏障的通透性。I/R 组在制备宫内缺血缺氧模型前 30 min 经孕鼠尾静脉注入生理盐水,于缺血再灌注 24 h 时取标本。

1.2.4 *rhEPO 的放射性 ^{125}I 标记* 于反应管中加入 rhEPO 溶液 20 μL 和 $Na^{125}I$ 18 μL,混匀。再加入 1 mg/mL 新配制的氯胺 T 溶液 10 μL,0.25 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)补足反应体积到 100 μL 混匀开始反应,反应时间 90 s,加入偏重亚硫酸钠溶液 100 μL 和 1% KI 溶液 100 μL 终止反应。用层析柱(Sephadex G-50)分离纯化,收集蛋白峰待用,盐峰及沾染废物放置衰变处理。

1.2.5 *组织放射活性测定* 每只孕鼠取 5 只胎鼠作检测,每组共 10 只胎鼠($n=10$)。留取羊水、胎盘、脑、肝、心、肺和肾,用电子天平称组织湿重(g),并在 γ 计数仪上测定各组织的放射比活性。以 pg/g (1CPM=0.002510 pg) 表示 ^{125}I-rhEPO 在组织中的相对含量。

1.2.6 *统计学方法* 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用两因素析因设计方差分析。因素 A 为组别因素,有 2 水平,水平 1=Treat 组;水平 2=Sham 组;因素 B 为剂量因素,有 3 水平,分别为 2500 U/kg、5000 U/kg 和 7500 U/kg。$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 ^{125}I-rhEPO 在胎盘屏障中的通透性

不同剂量 ^{125}I-rhEPO 经孕鼠尾静脉注射后 24 h,胎盘、羊水及胎鼠各组织中 ^{125}I-rhEPO 放射比活性分布见附表。在 rhEPO 治疗组和假手术对照组中,胎盘、羊水及胎鼠各组织中的放射比活性均随 ^{125}I-rhEPO 剂量的增加而相应增加($P<0.05$)。rhEPO 治疗组胎盘、羊水及胎鼠各组织中的 ^{125}I-rhEPO 含量均高于相应剂量的假手术对照组。当 rhEPO 剂量为 7500 U/kg 时,rhEPO 治疗组和假手术对照组中各组织间差异均有统计学意义($P<0.05$)。生理盐水缺血对照组仅能测得极少量放射活性,为检测仪器的本底值,故未纳入附表进行比较。

组织之间进行相互比较,胎盘中 ^{125}I-rhEPO 含量最多。胎盘与其它组织相比,在各剂量组差异均有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 ^{125}I-rhEPO 在胎鼠血脑屏障中的通透性

胎鼠脑组织内的 ^{125}I-rhEPO 含量少于胎鼠其他组织,差异有统计学意义($P<0.01$)。在 rhEPO 治疗组和假手术对照组中,^{125}I-rhEPO 在胎鼠脑组织

中的分布随 rhEPO 注射剂量的增加而增加（$P<0.05$）。rhEPO 治疗组中各剂量组胎鼠脑组织内的 ^{125}I-rhEPO 含量均明显高于相应剂量假手术对照组，差异均有统计学意义（$P<0.01$）。

附表　胎盘、羊水和胎鼠各重要器官组织中 ^{125}I-rhEPO 放射活性分布（pg/g，$\bar{x}\pm s$）

Table　^{125}I-rhEPO radioactivity distribution in placenta, amniotic fluid and tissues of vital organs in fetal rats (pg/g, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Brain	Liver	Heart	Lung	Kidney	Amniotic fluid	Placenta
Treat								
2500 U/kg	10	5.34±1.36*,▲	14.79±1.89*	16.66±4.45	13.88±3.11	21.11±2.81*	20.16±3.97*	120.67±14.76*,▲
5000 U/kg	10	9.76±2.89*,▲,#	24.25±4.42*,#	31.20±8.54*,#	22.59±6.88#	35.43±6.06*,#	37.26±3.94*,#	211.76±18.93*,▲,#
7500 U/kg	10	15.97±2.21*,▲,#	37.49±7.16*,#	46.17±6.60*,#	35.90±6.15*,#	54.65±7.82*,#	56.88±8.96*,#	374.65±36.39*,▲,#
Sham								
2500 U/kg	10	3.98±1.10▲	11.44±1.25	13.80±2.59	10.66±4.32	16.11±2.23	15.59±2.96	89.01±11.25▲
5000 U/kg	10	6.41±2.42▲,#	19.14±4.55#	20.76±5.50#	21.59±7.21#	24.74±3.81#	26.40±4.17#	154.99±22.78▲,#
7500 U/kg	10	8.68±2.20▲,#	27.79±5.11#	29.25±4.65#	29.80±5.51#	35.41±5.52#	36.10±4.25#	223.22±38.00▲,#

* $P<0.05$, vs. Sham group; ▲ $P<0.01$, vs. the other tissues in the same group; # $P<0.05$, vs. former concentration

3　讨论

内源性 EPO 是体内促进红细胞生成的主要细胞因子，其作用机制可能为 EPO 抑制了骨髓中红系祖细胞的凋亡[5]。近年来，有关 EPO 对非造血系统尤其是神经系统的保护作用倍受关注。EPO 及其受体在脑缺血缺氧损伤时表达上调，提示 EPO 可能具有内源性神经保护作用。但在脑损伤时内源性 EPO 数量不足或不能很快生成，只有加入外源性 EPO 才能很好地发挥神经保护作用和治疗作用[6]。目前，rhEPO 被认为是最有前途的防治新生儿缺血缺氧性脑损伤的药物[7]。

胎盘是联系母体与胎儿的重要器官，胎盘屏障不仅是胎儿所需营养物质转运的必经通道，更能有效阻止母体血中的某些有害物质进入胎儿体内。胚胎在第 10～12 周形成完整胎盘，以后胎盘屏障中结缔组织随着胎儿的发育逐渐减少，毛细血管数目增加，胎盘屏障逐渐变薄，胎盘屏障通透性逐渐增强，至孕晚期通透性最强[8]。我们在前期研究中已证实，^{125}I-rhEPO 能通过胎鼠胎盘屏障，且在宫内缺血缺氧状态下其通透性增加。在本次实验中我们选择孕晚期大鼠，通过测定 ^{125}I-rhEPO 在胎盘、羊水及胎鼠各组织中的放射比活性，进一步证实 ^{125}I-rhEPO 能够以剂量依赖的方式通过胎盘屏障。

Banks 等[9]利用放射性标记的方法观察 EPO 在血脑屏障中的通透性，发现 EPO 可经细胞外途径方式通过血脑屏障，静脉注射后 3 h 在脑组织中达到高峰。通过对比放射性标记的鼠和人 EPO 在血浆和脑组织中的稳定性，他们发现放射性标记的人 EPO 在血浆和脑组织中的稳定性是 24 h，放射性标记的鼠 EPO 是 8 h。因此我们在实验中选用重组人促红细胞生成素，并在 24 h 时测量组织中的 ^{125}I-rhEPO 放射比活性。本实验结果显示，在胎鼠各组织中脑组织 ^{125}I-rhEPO 含量最少，说明血液和脑组织之间的屏障系统，即血脑屏障具有一定的保护作用。当中枢神经系统受到有害因素侵袭时，如脑缺血缺氧损伤、炎症、肿瘤、外伤等，该屏障可能会被破坏并引起局部或广泛的血脑屏障通透性增加，使正常状态下不能通过的物质通过血脑屏障[10]。本研究结果显示，Treat 组脑组织中 ^{125}I-rhEPO 含量均高于相同剂量 Sham 组，说明在宫内缺血缺氧状态下，外源性 rhEPO 可经由胎鼠血脑屏障。Statler 等[11]采用 7 日龄新生鼠建立缺氧缺血模型，通过腹腔和皮下注射 rhEPO（0，250 U/kg，2500 U/kg，5000 U/kg），采用 ELISA 测量血浆和脑组织 rhEPO 的浓度，结果证实全身注射 rhEPO 以剂量依赖的方式通过血脑屏障。我们采用宫内缺血缺氧模型，经尾静脉注射不同剂量 rhEPO（2500 U/kg，5000 U/kg，7500 U/kg），发现 rhEPO 对胎盘屏障和胎鼠血脑屏障的通透性同样具有剂量依赖性，即随 rhEPO 剂量的增加而增加。其机制可能与以下因素有关：胎盘屏障中各种特殊受体、载体的存在，rhEPO 相对分子质量大小，rhEPO 分子表面所带电荷及胎盘屏障母体面与胎儿面浓度梯度等。

本研究首次经动物实验证明 rhEPO 可以剂量依赖的方式通过胎盘屏障及胎鼠血脑屏障，且在宫内缺血缺氧状态下通透性增加，为今后 rhEPO 应用于宫内窘迫的早期干预提供了重要依据。

参　考　文　献

1　Verklan MT. The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy. J Perinat Neonatal Nurs, 2009; 23(1): 59-68.

2　Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, *et al*. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci USA, 2000; 97(19): 10526-10531.

3　周　俊，马玉姗，林雪梅等. 外源性重组人促红细胞生成素在宫内缺血缺氧环境中对胎盘屏障通透性的实验研究. 四川大学学报（医学版），2010；41(3)：445-447.　（下转第 724 页）

响小。本研究中 MRI 检查对胎儿 CNS 和脑中线结构的诊断符合率达 100%。但 MRI 也有其局限性：① MRI 检查在胎儿孕周上的限制。如孕周过小，因胎儿体积小和胎动频繁可致一些较细小的结构，如视神经、胼胝体、前连合、下丘脑、脊髓及神经根等难以显示；随着孕周增加，胎儿体积增大和胎动减少将使得胎儿解剖结构的显示愈加清晰。加之安全性问题，目前国内外学者大多推荐妊娠中孕后行胎儿 MRI 检查[11,12]。② MRI 检查费用高，且操作较为费时、不能实时观察、不宜复查随访观察，都使其临床应用受到限制。

综上，本研究通过分析胎儿 CNS 的超声和 MRI 图像，并将两种检查结果与随访结果进行对比分析，结果显示：超声和 MRI 都可用于胎儿中枢神经系统和脑中线结构检查；超声具有 100%的敏感性，是胎儿的首选检查；MRI 诊断符合率 100%，对于超声可疑异常胎儿(尤其是脑中线可疑异常病例)进行 MRI 检查可明显提高诊断准确率，是胎儿脑中线结构病变的重要补充。

参 考 文 献

1 李胜利. 胎儿畸形产前超声诊断学. 第 1 版. 北京：人民军医出版社，2004：123-168.

2 Baker PN, Johnson IR, Harvey PR, *et al*. A three-year follow-up children imaged in utero with echo-planar magnetic resonance. Am J Obstet Gynecol, 1994; 170(1 Pt 1): 32-33.

3 De Wilde JP, Rivers AW, Price DL, *et al*. A review of the current use of magnetic resonance imaging in pregnancy and safety implications for the fetus. Prog Biophys Mol Biol, 2005; 87(2-3): 335-353.

4 Magin RL, Lee JK, Klintsova A, *et al*. Biological effect of long-duration high-field (4T) MRI on growth and development in the mouse. J Magn Reson Imaging, 2000; 12(1): 140-149.

5 Vadeyar SH, Moore RJ, Strachan BK, *et al*. Effect of fetal magnetic resonance imaging on fetal heart rate patterns. Am J Obstet Gynecol, 2000; 182(3): 666-669.

6 Mevissen M, Buntenkotter S, Loscher W. Effect of static and time varying magnetic field on reproduction and fetal development in rats. Teratology, 1994; 50(3): 229-237.

7 刘彦英，陈 青，许少兰等. 中、晚孕胎儿颅脑横切面组合在畸形筛查中的应用. 中国医学影像技术，2011；27(1)：143-146.

8 Tamara TC, Jodi SD, Richard CA, *et al*. Central nervous system findings on fetal magnetic resonance imaging and outcomes in children with spina bifida. Obstet Gynecol, 2010; 116(2 Pt 1): 323-329.

9 Gupta P, Sharma R, Kumar S, *et al*. Role of MRI in fetal abdominal cystic masses detected on prenatal sonography. Arch Gynecol Obstet, 2010; 281(3): 519-526.

10 Hosny IA, Elghawabi HS. Ultrafast MRI of the fetus: an increasingly important tool in prenatal diagnosis of congenital anomalies. Magn Reso Imaging, 2010; 28(10): 1431-1439.

11 Huisman TA, Martin E, Kubik-Huch R, *et al*. Fetal magnetic resonance imaging of the brain: technical considerations and normal brain development. Eur Radiol, 2002; 12(8): 1941-1951.

12 Huisman TA, Wisser J, Martin E, *et al*. Fetal magnetic resonance imaging of the central nervous system: a pictorial essay. Eur Radiol, 2002; 12(8): 1952-1961.

(2012－02－20 收稿，2012－05－21 修回)

编辑 吕 熙

(上接第 689 页)

4 Tanaka M, Natori M, Ishimoto H, *et al*. Experimental growth retardation produced by transient period of uteroplacental ischemia in pregnant Sprague-Dawley rats. Am J Obstet Gynecol, 1994; 171(5): 1231-1234.

5 Koury MJ, Bondurant MC. The molecular mechanism of erythropoietin action. Eur J Biochem, 1992; 210(3): 649-663.

6 Chong ZZ, Lin SH, Kang JQ, *et al*. Erythropoietin prevent early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. J Neurosci Res, 2003; 71(5): 659-669.

7 Sola A, Wen TC, Hamrick SE, *et al*. Potential for protection and repair following injury to the developing brain: a role for erythropoietin. Pediatr Res, 2005; 57(5): 110-117.

8 胡晓红，栾 佐，屈素清等. 碱性成纤维细胞生长因子对胎盘屏障通透性的实验研究. 第二军医大学学报，2001；22(7)：677-679.

9 Banks WA, Jumbe NL, Farrell CL, *et al*. Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. Eur J Pharmacol, 2004; 505(1-3): 93-101.

10 Kaur C, Ling EA. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. Curr Neurovasc Res, 2008; 5(1): 71-81.

11 Statler PA, McPherson RJ, Bauer LA, *et al*. Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats. Pediatr Res, 2007; 61(6): 671-675.

(2012－03－21 收稿，2012－05－25 修回)

编辑 汤 洁