

促红细胞生成素预处理对视网膜神经元缺氧性损伤的保护作用

刘夫玲,牛膺筠,王红云,赵颖,曲虹

(青岛大学医学院附属医院眼科,山东 青岛 266003)

中国图书分类号: R-332; R 322.91; R 329.2; R 338.8; R 348; R 845.22; R 977.9

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2007)02-0228-06

摘要:目的 研究缺氧对培养大鼠视网膜神经元的影响及促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)预处理的保护作用。方法 取体外原代培养 3 d 的大鼠视网膜神经元,利用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的连二亚硫酸钠消除培养基中的氧合并培养基质缺糖持续 6 h,导致神经元缺氧性损伤。采用免疫组化染色技术检测了 EPO 受体在原代培养视网膜神经元的表达,乳酸脱氢酶(LDH)释放率作为评价损伤的指标, TUNEL 染色检测视网膜神经元的凋亡,并进行形态学观察。结果 原代培养的大鼠视网膜神经元正常下可见 EPOR 的弱阳性表达,表达部位定位于神经元的胞体和突起,缺氧后 EPOR 的表达明显增加;神经元 LDH 释放率和凋亡百分率增加;在损伤前加入浓度 $2.5 \sim 40 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 rhEPO 均可有效抑制 LDH 释放 ($P < 0.05$)。TUNEL 结果显示 rhEPO 预处理能抑制神经元的凋亡,明显改善细胞缺氧性损伤的形态学变化。结论 EPO 预处理对神经元的缺氧损伤具有保护作用,且具有浓度和时间依赖性。

关键词:促红细胞生成素(EPO);缺氧;视网膜;神经元;细胞培养

视网膜组织的缺氧性疾病在临床中常见,对缺氧后视网膜神经元损伤机制的探讨以及寻求有效的治疗措施是当前临床上急需解决的问题之一。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种主要影响红细胞生成的体液因子,随着在神经元及星形胶质细胞内发现 EPO 及其受体(erythropoietin receptors, EPOR),越来越多的资料显示, EPO 在中枢神经系统缺氧、缺血性脑损伤和培养的神经元细胞中发挥抗细胞凋亡、抗自由基、抗氧化并具有神经营养作用,从而又被当成一种重要的神经营养因子^[1,2]。重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)含有与天然分离的 EPO 完全相同氨

收稿日期: 2006-08-05, 修回日期: 2006-10-10

基金项目: 山东省科技攻关项目基金资助(No 2004GGB14112)

作者简介: 刘夫玲(1972-),女,博士生, E-mail: fulingl216@sina.com;

牛膺筠(1945-),女,教授,博士生导师,研究方向:玻璃体视网膜疾病和眼肿瘤,通讯作者, E-mail: niuyingjun@yahoo.com.cn

基酸序列的糖蛋白,与天然 EPO 具有相同的生物学活性。为研究 rhEPO 对体外培养的视网膜神经元缺氧所致损伤是否有神经保护作用,本文通过建立原代培养的大鼠视网膜神经元缺氧模型,从细胞形态学、LDH 释放量及细胞凋亡等形态学和生化指标,观察 rhEPO 对视网膜缺氧损伤的保护作用,探索该药治疗视网膜缺氧性损伤的价值,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 孕 16~18 d 的 Wistar 大鼠(青岛市实验动物和动物实验中心提供),取出生 1~3 d 胎鼠做视网膜神经元的原代培养。

1.2 试剂和仪器 高糖型 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]、胰蛋白酶、多聚赖氨酸(Sigma 公司);LDH 试剂盒(南京建成生物工程研究所);EPOR 兔抗鼠多克隆抗体(H-194, 美国 Santa Cruz 公司);SP9001 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒(北京中山生物技术有限公司);细胞凋亡检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);rhEPO(沈阳三生制药股份有限公司, $4000 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$, 生产批号: S19980072);倒置相差显微镜(BH-NCB, Olympus, 日本);二氧化碳培养箱(SHELL LAB, TC2323, USA);722 型分光光度计(上海第三分析仪器厂);DG3022A 酶联免疫检测仪(南京电子管厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠视网膜神经元的原代培养 取出生 1~3 d 胎鼠 4~6 只,浸入体积分数为 70% 乙醇中 5 min 溺死并消毒,无菌下剥出眼球,去除球周筋膜组织,在 D-hanks 溶液中漂洗 2 次,沿角巩膜缘后 0.5 mm 环形剪开,将眼前节组织和玻璃体去除,解剖显微镜下仔细分离视网膜并收集于离心管中,加入 0.125% 的胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的复合消化液 1 ml, 37 °C 水浴消化 25 min (其间摇动离心管 2~3 次),加入少许含血清的 DMEM 培养基(10% 胎牛血清 + 90% DMEM + $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺 + 青霉素 $1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ + 链霉素 $1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.2~7.4)终止消化,400 目不锈钢筛网过滤,收集滤过的

细胞悬液, $1\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min, 吸去上清液, 再次加含血清的 DMEM 培养基, 用巴氏吸管轻轻吹打制成单细胞悬液, 细胞计数后以 $2 \times 10^9 \cdot L^{-1}$ 接种于事先用 0.1% 多聚赖氨酸包被过夜的培养板, 置于 5% 的二氧化碳培养箱培养。24 h 后更换含 5-溴-2-脱氧尿苷 ($20\ \mu g \cdot L^{-1}$, Sigma, USA) 的培养液, 以抑制非神经元细胞生长, 以后每 2~3 d 半量换液 1 次, 每天在倒置显微镜观察细胞的形态学特征。

1.3.2 培养的视网膜神经元免疫组织化学检测 EPOR 的表达 将培养 3 d 视网膜神经元取出, 经 4% 多聚甲醛固定 20 min 后, 用抗 EPOR 多克隆抗体按 1:100 稀释, 并按 SP 法进行免疫组织化学染色, 二氨基联苯胺显色, 苏木精复染, 脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜下观察并照像。同时用 PBS 替代第一抗体作为阴性对照。

1.3.3 视网膜神经元缺氧损伤和 rhEPO 处理 取培养 3 d 的大鼠视网膜神经元分为 3 组: 正常组: 正常换 DMEM 液培养; 缺氧组: 换以含连二亚硫酸钠 ($Na_2S_2O_4$) 的无糖 Earles 液 ($mmol \cdot L^{-1}$): NaCl 143, KCl 15.4, $CaCl_2$ 1.8, $MgSO_4$ 1.0, NaH_2PO_4 1.0, HEPES 2.4, pH 7.2, $Na_2S_2O_4$ (终浓度为 $1.0\ mmol \cdot L^{-1}$) 消除培养基中的氧合并培养基质缺糖, 导致神经元缺氧性损伤, 培养 6 h 后换以 DMEM 培养基后继续培养。rhEPO 预处理组: 分别在缺氧损伤前 0、12、24、48 h 将 rhEPO 加入培养基, 其余处理同缺氧组; rhEPO 终浓度分别以 2.5、5、10、20、40 $kU \cdot L^{-1}$ 。各组继续培养 24 h 后终止培养, 测定培养液中 LDH 释放率变化情况。

1.3.4 LDH 释放率检测细胞损伤程度 分别收集培养液 0.1 ml, 加入 1 ml 含 70% 乳酸钠基质液和 0.2 mg 的辅酶 充分反应, 在碱性条件下用 2,4-二硝基苯肼显色, 在 440 nm 读取吸光度。用同样的方法测定相应细胞裂解液中总的乳酸脱氢酶 (LDH), 用培养液中 LDH 活性与相应细胞 LDH 总活性的比值来表示 LDH 释放率。

1.3.5 脱氧核糖核酸末端标记方法 (TUNEL) 检测细胞凋亡 将视网膜细胞用 DMEM 培养液调整合适细胞浓度, 以 5×10^5 个 \cdot 孔⁻¹ 的密度接种于 24 孔培养板中 (孔底有包被多聚赖氨酸的盖玻片), 加入 rhEPO 终浓度为 $40\ kU \cdot L^{-1}$ 。分别将缺氧组和 rhEPO 预处理组后的大鼠视网膜神经元入 37、5% 的 CO_2 培养箱中培养 6、12、24、48 h, 离心收集细胞, 磷酸盐缓冲液洗涤, 备检测细胞凋亡。

具体步骤: 用 4% 多聚甲醛固定液室温下固定

20 min, 用 0.1% Triton-X 100/PBS 10 min 以增加细胞膜通透性, 0.3% H_2O_2 处理 30 min 除去内源性过氧化物酶, 加新鲜配制的 $30\ mg \cdot L^{-1}$ 蛋白酶 K 消化 10 min, PBS 洗 3 次后, 加末端脱氧核糖核酸转移酶 (TdT) 及生物素化的 dUTP, 37 $^{\circ}C$ 2 h, 封闭液作用 10 min, 与辣根酶标记的链亲和素孵育 30 min, 经 PBS 洗 2 次后, DAB 显色、苏木精复染, 脱水、透明、封片, 光镜下观察并照像。阴性对照: 未加末端脱氧核糖核酸转移酶 TdT。阳性对照: 固定后的细胞样品 Dnase I 使之产生 DNA 链缺口。凋亡阳性细胞为细胞核呈黄色或棕黄色着色为凋亡细胞阳性染色。每组取 2 张切片, 在 200 倍镜下, 随机计数 10 个相邻视野 ($0.16\ mm^2$ 视野) 中 TUNEL 染色阳性神经元数目和总细胞数, 取其平均值, 计算凋亡细胞所占比例。凋亡细胞 % = 凋亡细胞数 / 同视野细胞总数 $\times 100\ %$ 。

1.4 统计学分析 使用统计分析软件 SPSS 11.0, 采用单因素方差分析和 t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 rhEPO 对培养视网膜神经元缺氧损伤在形态学方面的影响 正常的大鼠视网膜神经元培养 3 d 后, 镜下观察细胞清晰可见, 细胞胞体饱满, 多数胞体呈锥形或类圆形, 光晕明显, 突起细长, 相互联系呈网络状 (Fig 1)。缺氧组缺糖损伤后的细胞完全失去光泽, 光晕消失, 突起断裂收缩, 胞体皱缩成球形, 突起断裂, 网络消失, 不少细胞破裂死亡, 并出现悬浮死细胞 (Fig 2)。而给予 rhEPO 预处理后大部分细胞胞膜完整, 胞周光晕明显, 较多细胞突起尚存 (Fig 3), 而且在损伤前 0~48 h 加入药物均能明显改善细胞缺氧性损伤的形态学变化。

2.2 EPO 受体 (EPOR) 对培养视网膜神经元的表达 SP 免疫组化染色显示免疫阳性反应物呈棕褐色, 背景着色很浅, 特异性强。正常视网膜神经元可见 EPOR 的阳性表达, 但较弱, 在缺氧后 EPOR 的表达明显增加, 位于视网膜神经元的胞体和突起 (Fig 4)。阴性对照 (省去一抗) 未见明显的棕色阳性染色 (Fig 5)。

2.3 rhEPO 对培养神经元 LDH 释放率的影响

2.3.1 rhEPO 不同浓度对培养视网膜神经元 LDH 释放率的影响 将缺氧组神经元的 LDH 释放率作为 100%, rhEPO 预处理组的 LDH 释放率与之比较, 绘制 LDH 释放率曲线。终浓度分别以 2.5、5、10、20、40 $kU \cdot L^{-1}$ 的 rhEPO 加入培养基后, LDH 释放率分别为 92.5%、84.6%、50.7%、43.5%、41.7%, 和缺氧组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 各

给药组间比较,差异也具有统计学意义 ($F = 3.943, P < 0.01$)说明不同浓度的 rhEPO 均能有效抑制视网膜神经元 LDH 释放,具有浓度依赖性。如 Fig 6 所示。

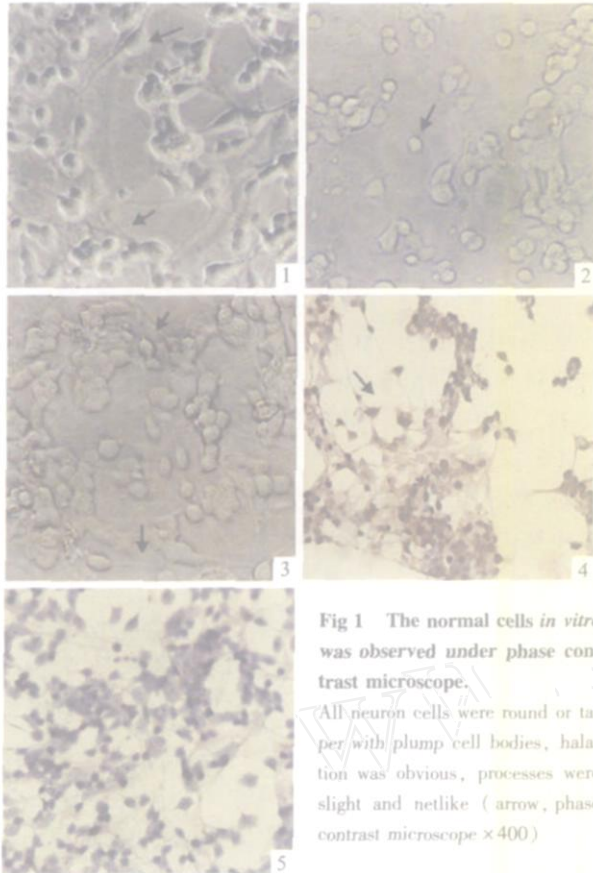


Fig 1 The normal cells *in vitro* was observed under phase contrast microscope. All neuron cells were round or taper with plump cell bodies, halation was obvious, processes were slight and netlike (arrow, phase contrast microscope $\times 400$)

Fig 2 Retina neuron cells of hypoxia group were wrinkled and processes were ruptured, networks disappeared, the died cells were suspended (phase contrast microscope $\times 400$)

Fig 3 The retina neuron cells of hypoxia group were integrity, most cell kept processes (arrow, phase contrast microscope $\times 400$)

Fig 4 SP immunohistochemistry detected that hypoxia retina neuron cells expressed EPOR protein, which was brown lied in cell body and processes (SP $\times 200$)

Fig 5 The negative comparison of immunohistochemistry just showed light background color (SP $\times 200$)

2.3.2 rhEPO 不同作用时间对培养神经元 LDH 释放率的影响 实验表明,在缺氧损伤前不同时间加入 rhEPO ($40 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 LDH 释放率明显低于缺氧组 (hypoxia), 具有时间依赖性 ($F = 2.968, P < 0.05$), 而且 24 h 和 48 h 作用最明显, 表明在损伤前 0 ~ 48 h rhEPO 预处理对缺氧损伤有保护作用。如 Fig 7 所示。

2.4 rhEPO 对培养视网膜神经元凋亡率的影响 在光学显微镜下, TUNEL 法染色的凋亡神经元细胞核内呈现棕色颗粒沉着。正常组视网膜神经元中 TUNEL 阳性颗粒少见 (Fig 8), 缺氧组可见大量

TUNEL 染色阳性的细胞, 细胞浓缩变圆, 核内出现棕黄色颗粒 (Fig 9)。而经 rhEPO 处理后 TUNEL 阳性细胞数明显减少 (Fig 10)。与正常组比较, 缺氧后 6, 12, 24, 48 h, 前者细胞凋亡率明显高于后者 ($P < 0.01$); 与缺氧组比较, 经 rhEPO 处理后细胞凋亡率均下降 ($P < 0.01$), 说明 rhEPO 预处理明显抑制缺氧后视网膜神经元的凋亡如 Tab 1 所示。

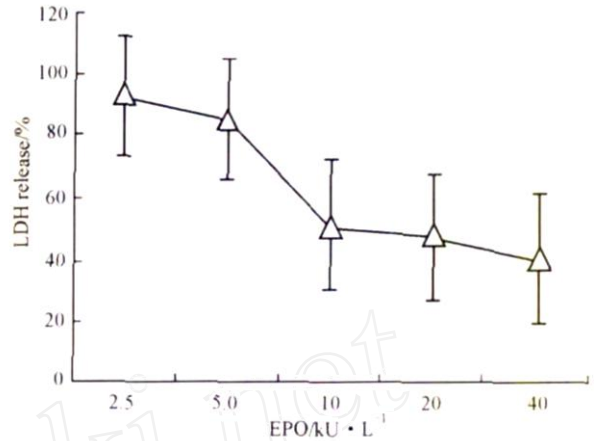


Fig 6 The affection of rhEPO different concentrations on the releasing quantity of LDH

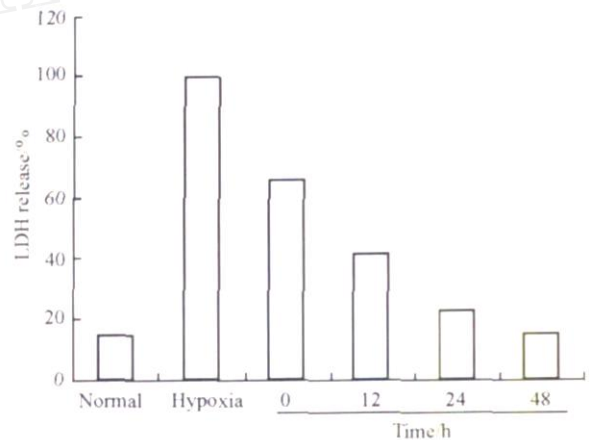


Fig 7 The affection of rhEPO different time on the releasing quantity of LDH

3 讨论

缺氧所致的视网膜损伤如视网膜中央动脉阻塞, 高血压视网膜病变, 糖尿病视网膜病变, 视网膜静脉周围炎等眼科常见疾病, 严重威胁着人类的健康, 目前尚无有效的治疗措施。现公认的体外培养细胞缺氧合并培养基缺糖能造成拟体内缺氧的模型, 缺氧常用的方法主要有: 物理性缺氧 (给孵育细胞充以氮气和二氧化碳混合气体以去氧)、化学性缺氧 (在培养基质中加入连二亚硫酸钠等氧清除剂或氰化物、抗霉素等呼吸链阻断剂)。本实验采用了化学性缺氧, 根据文献报道的方法^[3]在缺乏葡萄糖的培养液中加入终浓度 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的耗氧剂

Tab 1 The affection of rhEPO different time following pretreatment on the percentage of apoptosis

Group	6h	12h	24h	48h
Control	8.47 ± 1.01	8.49 ± 1.21	8.52 ± 1.16	8.57 ± 1.25
Hypoxia	21.15 ± 3.46 ^{##}	30.15 ± 3.68 ^{##}	38.15 ± 4.48 ^{##}	35.15 ± 4.41 ^{##}
rhEPO pretreatment	12.33 ± 3.04 ^{**}	20.33 ± 3.16 ^{**}	17.33 ± 3.24 ^{**}	16.48 ± 3.27 ^{**}

^{##} $P < 0.01$ vs control; ^{**} $P < 0.01$ vs hypoxia

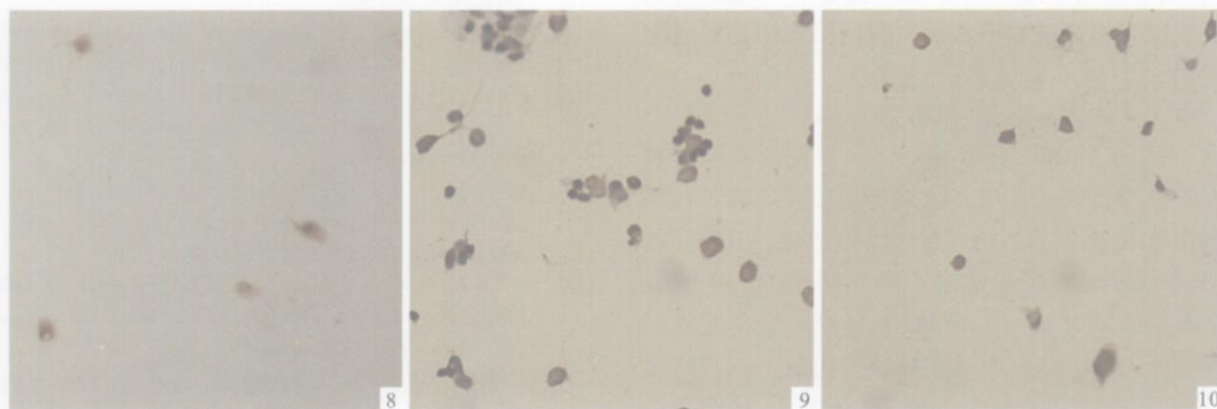


Fig 8 In the retina neuron cells of normal group, there were a few TUNEL positive cells, which were brown grain pigmentation (TUNEL \times 400) Fig 9 In the retina neuron cells of hypoxia group, there were a great lot of TUNEL positive condensed cells (TUNEL \times 400) Fig 10 In the retina neuron cells of rhEPO pretreatment group, the number of TUNEL positive cells decreased (TUNEL \times 400)

连二亚硫酸钠培养 6 h,造成细胞缺氧性损伤。连二亚硫酸钠合并缺糖所致的损伤方法起效较快、操作简单、比呼吸链阻断剂使用安全,为制作缺血模型和用于药物评估的有利方法。

3.1 EPO 及其受体 EPOR 的表达及神经保护作用

EPO 是一种糖蛋白激素,分子量约 34 ku^[4]。传统上认为 EPO 是一种血细胞因子,然而近年来许多研究表明 EPO 在缺氧缺血时对中枢神经系统的保护作用,而且 EPO 和促红细胞生成素受体 (EPOR) 在多种细胞因子联合作用下,对神经系统发育具有调节和抗细胞凋亡的功能。实验证明,在胚胎和成年鼠、猴和人的脑组织中都能检出 EPO 和 EPOR 的 mRNA,而且广泛分布于海马和大脑皮质中^[5]。缺氧、缺血可以导致 EPOR 的表达上调,并能保护神经元,提高神经的存活能力^[6]。Juul 等^[7]在对人胚胎的研究中发现 EPOR 表达于人的胚胎视网膜。

除造血细胞外, EPO 对中枢神经系统的损伤后的生存、修复及预后有明显保护作用。Celik 等^[8]通过对兔短暂性脑和脊髓缺血模型的检测,证明外源性 EPO 能够通过血脑、血脊髓屏障并保护这些运动神经元,对脑、脊髓缺血的急性及延迟损伤均有保护作用。Bemaudin 等^[9]通过海马神经元和皮质神经元等体外神经元培养进一步证明,在缺氧、谷氨酸或红藻氨酸 (兴奋性毒素) 中毒、血清缺乏等多种代谢性应激中, EPO 均有明显的神经元保护作用。此

外, Csete 等^[10]证明 EPO 对鼠多巴胺能神经增殖、分化、维持有明显的神经营养功效,并与 EPOR 在成年鼠中枢神经系统神经元中的表达相关。

我们采用免疫组化染色技术检测了 EPOR 对培养视网膜神经元的表达,发现正常视网膜神经元可见 EPOR 的弱阳性表达,表达部位定位于神经元的胞体和突起,缺氧后 EPOR 的表达明显增加,推测 EPOR 可能反映视网膜的一种内源性保护机制,缺氧后机体的自我调节系统通过 EPOR 表达的的上调,从而可能促进 EPO 的神经保护作用,以此来拮抗缺氧性视网膜的损伤。这一实验发现为下一部外源性应用 rhEPO 治疗视网膜缺氧缺血性损伤奠定了理论和实验基础。

3.2 rhEPO 对视网膜神经元的神经保护作用

rhEPO 是一种通过使用重组 DNA 技术生产的、含有与天然分离的 EPO 完全相同氨基酸序列的糖蛋白^[11];已证明 rhEPO 同时具有促红细胞生成和神经保护功能。最近国外也有报道^[12]全身给予 rhEPO 治疗光损伤性视网膜变性或遗传性视网膜色素变性,发现对视网膜感光细胞有明显的保护作用。Junk 等^[13]发现在急性视网膜缺血再灌注损伤动物模型中缺血上调了视网膜 EPOR mRNA 的表达,在缺血前 24 h 预处理或缺血时立即腹腔注射 rhEPO 有助于视网膜功能的恢复,而缺血后用 rhEPO 无效,提示 EPO 通过抗凋亡机制对急性视网膜缺血 /

再灌注损伤具有神经保护作用,外源性全身应用 rhEPO 可以挽救损伤的神经元。本课题组曾通过光损伤方法建立小鼠视网膜感光细胞退行性变性动物模型,采用形态学观察、TUNEL 原位细胞凋亡荧光等检测手段观察 rhEPO 对视网膜感光细胞的保护作用,结果表明小鼠 rhEPO 腹腔注射后可通过有效抑制视网膜感光细胞凋亡而对视网膜光损伤具有保护作用^[14]。

本文从细胞形态学、LDH 释放率以及细胞凋亡指标,观察了 rhEPO 对体外原代培养大鼠视网膜神经元缺氧损伤保护作用。结果显示缺氧导致了神经细胞形态出现损伤性改变,与此相适应,LDH 释放率增加,说明缺氧的确造成了神经元的损伤;而浓度在 $2.5 \sim 40 \text{ KU} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 rhEPO 预处理有效抑制视网膜神经元 LDH 释放,而且在缺氧损伤前不同时间加入 rhEPO 的 LDH 释放率不同,24 h 和 48 h 作用最明显, rhEPO 预处理对缺氧损伤有保护作用,而且具有浓度和时间依赖性。同时, TUNEL 染色结果显示,正常的视网膜神经元中少见凋亡细胞,而缺氧损伤可见大量神经元的凋亡,细胞浓缩变圆, rhEPO 预处理组的凋亡细胞百分率约为对照组的 50%, 和对对照组比较明显减少,这说明 rhEPO 预处理能提高神经元的活力,明显抑制缺氧后视网膜神经元的凋亡,对神经元的缺氧损伤具有保护作用。

4 展望

尽管迄今为止尚未发现临床证实有效的神经保护剂,但神经保护治疗一直是研究的热点。鉴于众多研究发现,结合我们的实验结果,证实 EPO 对中枢神经系统的缺血具有神经保护和神经营养作用, EPO 可能被用来安全地治疗视网膜和中枢神经损伤,虽然其作用机制尚未完全阐明,但这些实验结果给临床神经保护治疗提供了一个新的选择。

参考文献:

- [1] Buemi M, Cavallaro E, Flocari F, et al Erythropoietin and the brain: from neurodevelopment to neuroprotection[J]. *Clin Sci*, 2002, **103**: 275 - 82
- [2] Eid T, Brines M. Recombinant human erythropoietin for neuropro-

tection: what is the evidence[J]? *Clin Breast Cancer*, 2002, **3**: 109 - 15.

- [3] 刘娜,左萍萍,周帆,等.连二亚硫酸钠致 PC12 和 NG108-15 细胞拟缺血损伤研究[J]. *中国药理学通报*, 1998, **14** (6): 525 - 9.
- [3] Liu N, Zuo P P, Zhou F, et al Researches on an ischemical model of PC12 and NG108-15 cell lines[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 1998, **14** (6): 525 - 9.
- [4] Choi D, Kim M, Park J. Erythropoietin: physico-and biochemical analysis[J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, **687**: 189 - 99.
- [5] Marti H H, Wenger R H, Rivas L A, et al Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain[J]. *Eur J Neurosci*, 1996, **8**: 666 - 76.
- [6] Bemaudin M, Bellail A, Marti H H, et al Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain[J]. *Glia*, 2000, **30**: 271 - 8.
- [7] Juul S E, Anderson D K, Li Y, et al Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system[J]. *Pediatr Res*, 1998, **43**: 40 - 9.
- [8] Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (4): 2258 - 63.
- [9] Bemaudin M, Marti H H, Roussel S, et al A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1999, **19** (6): 643 - 51.
- [10] Csete M, Rodriguez L, Wilcox M, et al Erythropoietin receptor is expressed on adult rat dopaminergic neurons and erythropoietin is neurotrophic in cultured dopaminergic neuroblasts[J]. *Neurosci Lett*, 2004, **359** (1 - 2): 124 - 6.
- [11] 董群,田亚非.重组人红细胞生成素对维持性血液透析患者抗感染免疫功能的影响[J]. *中国药理学通报*, 2000, **16** (2): 218 - 20.
- [11] Dong Q, Tian Y F. Effects of recombinant human erythropoietin on the anti-infection immunological functions of patients with maintained hemodialysis[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2000, **16** (2): 218 - 20.
- [12] Rex T S, Alibocca M, Domenici L, et al Systemic but not intraocular Epo gene transfer protects the retina from light-and genetic-induced degeneration[J]. *Mol Ther*, 2004, **10**: 855 - 61.
- [13] Junk A K, Mammis A, Savitz S I, et al Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 10659 - 64.
- [14] 王红云,牛膺筠,王培嵩,等.重组人促红细胞生成素对小鼠视网膜光损伤的保护作用[J]. *中华眼科杂志*, 2005, **41**: 434 - 8.
- [14] Wang H Y, Niu Y J, Wang P S, et al Erythropoietin administration protects retina against light-induced retinal degeneration[J]. *Chin J Ophthalmol*, 2005, **41**: 434 - 8.

Protective effects of recombinant human erythropoietin (EPO) on rat retinal neurons hypoxia injuries

LU Fu-ling, NIU Ying-jun, WANG Hong-yun, ZHAO Ying, QU Hong

(Dept of Ophthalmology, Affiliated Hospital, Qingdao University Medical College, Qingdao Shandong 266003, China)

Abstract: **Aim** To study the protective effects of recombinant human erythropoietin (rhEPO) pretreatment on rat retinal neurons injuries induced by defect of oxy-

genation/glucose *in vitro* **Methods** The rat retinal neurons were cultured for 3 d, and placed in the environment of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and glucose de-

赖氨酰谷氨酸二肽的抗肿瘤活性研究

谭婵媛,张昕,姜银凤,张冬梅,陈钧辉

(南京大学生物化学系医药生物技术国家重点实验室,江苏南京 210093)

中国图书分类号: R 329.24; R 341.6; R 73-351; R 977.6; R 979.1

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2007)02-0233-04

摘要:目的 研究二肽 Lys-Glu (Vibn)的抗肿瘤活性。方法 用液相法人工合成了抗肿瘤二肽 Vibn,分子量为 275.3。用细胞计数法和 MTT法测定 Vibn对人肠癌 LOVO,人胃癌 MKN45和人肝癌 QGY7703 3种肿瘤细胞生长的抑制作用,以及对人体正常细胞生长的影响;并对其进行了体内实验。结果 Vibn对体外培养的 LOVO, MKN45和 QGY7703细胞具有剂量依赖性抑制作用,但对人正常白细胞无明显抑制作用。体内抑瘤实验表明, Vibn对小鼠肝癌 H22的生长有抑制作用,有效剂量为 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,当使用高剂量 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,对小鼠移植性肿瘤肝癌 H22的抑瘤率达 0.60以上,且具有剂效关系。结论 Vibn具有明显的体外、体内抗肿瘤活性。

关键词: Vibn; Lys-Glu; 液相合肽; 抗肿瘤活性

2000年 Khavinson等^[1]发现 Lys-Glu二肽 (Vibn)能抑制小鼠自发性肿瘤的生长并且延长小鼠的寿命。随后又报道,它对 CBA小鼠的体重、食物消耗及动情周期无明显影响,但能减少自发性

收稿日期: 2006-08-20,修回日期: 2006-11-12

基金项目: 南京大学应用开发基金资助项目

作者简介: 谭婵媛 (1980-),女,硕士生,研究方向: 抗肿瘤药物, Tel: 025-83592331, E-mail: tty69@126.com;

陈钧辉 (1943-),女,教授,研究方向: 细胞凋亡、信号转导与抗肿瘤药物, 通讯作者, Tel/Fax: 025-83592331, E-mail: jhchen@nju.edu.cn

fection for 6 h to induce neuronal cells hypoxia injury. The expression of erythropoietin receptor (EPOR) was analyzed by immunohistochemistry, the releasing quantity of LDH was determined as index of neuronal cells injury. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated UTP nick end labeling (TUNEL) assay demonstrated the neuron apoptosis induced by hypoxia. After being treated with rhEPO, the protective effects of the drug on neuronal cells injury and apoptosis were observed. **Results** Cultured rat cortical neurons expressed EPOR faintly, located in the neuron body and neurites. Induction of hypoxia caused a dramatic in-

肺腺瘤发生率^[2]。它的长期使用是安全的,并不会在动物生长过程中引起不良影响,可作为老年病症的预防^[3]。Vibn在衰老过程中还能对消化酶的活性产生积极作用^[4]。对膀胱粘膜中肿瘤的早期发作也具有抑制作用,且在一定程度上能保护小鼠胸腺和脾^[5,6]。目前发现其能活化衰老细胞染色体的染色质^[7],能调节核糖体的形成、装配^[8]。Vibn还能在下丘脑细胞中调节白介素 2 (L-2)基因的表达^[9]。近年来对 Lys-Glu二肽的研究均表明它有助于衰老问题的研究。我们用液相的方法合成了 Lys-Glu,并研究了它的体外体内抗肿瘤活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品试剂 各种合肽单体 (上海吉尔生化有限公司), 硅胶 (Kieselgel 60G, 西德 Merck公司), RPMI 1640培养基 (HyClone公司), 灭活小牛血清 (上海微科公司), MTT (Gibco公司), 胰蛋白酶 (Sigma公司), 人淋巴细胞分离液 (中国医学科学院生物工程医学研究所), 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器 R-201 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司), 酶联免疫检测仪 (TECAN, 奥地利), 96孔培养板 (Costar), 24孔培养板 (Costar), CO₂ 培养箱 (Thermo, 美国), 血球计数板, 倒置显微镜 (Coic XDS-1B, 重庆光学仪器厂), 质谱仪 (LQTM, Finnigan, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 Vibn液相合成及鉴定 采取液相合肽的方

crease of EPOR expression, the releasing quantity of LDH and apoptosis increased markedly after hypoxia injuries. Being treated with rhEPO ($2.5 \sim 40 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$) the hypoxia injuries of neuronal cells relieved effectively. TUNEL assay indicated the apoptosis lowered markedly after rhEPO pretreatment. **Conclusion** EPO pretreatment could effectively protect the neuronal cells from injuries induced by hypoxia which was positively related to the time and dosage.

Key words: erythropoietin (EPO); hypoxia; retinal; neurons; cell culture