

外源性重组人促红细胞生成素对胎鼠缺血缺氧性 脑损伤后神经细胞凋亡的影响*

马玉姗¹, 周俊², 柳惠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 探讨重组人促红细胞生成素(rhEPO)对胎鼠缺血缺氧性脑损伤后神经细胞凋亡的影响及可能机制。**方法** 将20只孕19 d的SD大鼠分为rhEPO治疗组(rhEPO组)、生理盐水缺血对照组(I/R组)和假手术对照组(Sham组)。不同剂量rhEPO治疗组和生理盐水缺血对照组采用钳夹双侧子宫卵巢动脉20 min制备宫内缺血缺氧模型,并于宫内缺血前30 min分别经尾静脉给予2500、5000、7500 U/kg rhEPO或1 mL生理盐水,假手术对照组术前30 min经尾静脉注射1 mL生理盐水后只进行开关腹手术。术后24 h取胎鼠观察宫内活胎数,取脑组织,采用免疫组化方法检测活化的Caspase-3蛋白的表达,并通过末端脱氧核糖核苷酸转移酶缺口标记(TUNEL)法观察脑神经元凋亡情况。**结果** 与I/R组比较,Treat组胎鼠死亡率下降($P<0.05$)。I/R组海马区可见大量Caspase-3表达阳性细胞。rhEPO组与I/R组比较,Caspase-3蛋白表达明显减弱。rhEPO组中,Caspase-3蛋白的表达随rhEPO剂量的增加呈现减弱趋势,各组间比较差异有统计学意义($P<0.01$)。不同剂量rhEPO组细胞凋亡数均较I/R组减少($P<0.01$)。各剂量组间比较,2500 U/kg组凋亡细胞数高于5000 U/kg和7500 U/kg组($P<0.01$),而5000 U/kg与7500 U/kg两组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** rhEPO预处理,可抑制胎鼠宫内缺血缺氧后的神经细胞凋亡,对缺血缺氧性脑损伤具有一定的保护作用。

【关键词】 重组人促红细胞生成素 缺血缺氧 凋亡 神经保护

Effect of Recombinant Human Erythropoietin on Apoptosis of Neural Cells in Fetal Rats after Intrauterine Hypoxic-ischemic Injury MA Yu-shan¹, ZHOU Jun², LIU Hui¹, DU Yu¹, LIN Xue-mei^{1△}. 1. Department of Anesthesia, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Anesthesia, West China of Stomatological Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: lxm0301@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of recombine human erythropoietin (rhEPO) on apoptosis of neural cells in fetal rats after intrauterine hypoxic-ischemic injury. **Methods** Twenty SD rats on 19 days of pregnancy were divided into rhEPO (2500 U/kg, 5000 U/kg, 7500 U/kg) treated groups, ischemia-reperfusion (I/R) group and sham-operated group (4 rats in each group). Intrauterine hypoxic-ischemic injury of fetal rat was induced by bilateral occlusion of utero-ovarian artery for 20 min. rhEPO was injected into the rats in rhEPO treated group through the caudal vein 30 min before hypoxic-ischemic injury while saline was used in the other two groups. There was no hypoxic-ischemic injury in sham-operated group. The death rate of fetal rats was evaluated at 24 h after the operation, and then the brain samples of fetal rats were harvested. The expression of Caspase-3 protein was observed by immunohistochemistry. Neuroapoptosis was measured by TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) staining. **Results** Death rates of fetal rats in rhEPO treated groups decreased compared with the I/R group ($P<0.05$). Compared with the I/R group, there was less expression of copious Caspase-3 in rhEPO treated group ($P<0.01$). The expression of Caspase-3 was decreased in the rhEPO treated groups with the increase of rhEPO dose ($P<0.01$). Compared with the I/R group, the death rate of fetal rats in rhEPO treated groups decreased ($P<0.05$), the number of apoptosis cells also decreased obviously ($P<0.01$). The anti-apoptosis effect of 5000 U/kg rhEPO was similar to 7500 U/kg rhEPO, but better than 2500 U/kg rhEPO ($P<0.01$). **Conclusion** rhEPO can inhibit the apoptosis of fetal rat brain cells after intrauterine hypoxic-ischemic injury.

【Key words】 Recombinant human erythropoietin Hypoxic-ischemic Apoptosis Neuroprotective

新生儿缺血缺氧性脑病(HIE)是小儿最严重的

神经系统疾病之一,其中大多数是由于孕晚期及分娩时胎儿宫内窒息所致。重度窒息患儿常遗留严重神经系统功能障碍,如脑瘫、癫痫、智力低下等^[1],为患儿家庭及社会造成极大负担。因此,研究胎儿宫

* 四川省科技厅项目(No. 2008JY0028-1)资助

△ 通讯作者, E-mail: lxm0301@gmail.com

内缺血性脑损伤的机制及防治方法具有重要的临床意义。

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种多功能性的细胞因子,除了可以促进红细胞生成外,还具有广泛的组织保护活性。其中,EPO对中枢神经系统的保护作用受到了临床和科研工作者的广泛关注。近年来的研究发现,在脑缺血缺氧性损伤时,血脑屏障受到破坏而通透性增加,全身注射大剂量重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)可部分通过血脑屏障而对脑损伤产生保护作用^[2]。然而目前有关 rhEPO 与胚胎期脑损伤关系的研究很少,尚无确切证据证明外源性 rhEPO 能通过胎盘屏障及胎儿血脑屏障,对胚胎期脑缺血缺氧性损伤发挥保护作用。在前期研究中,我们已证实 rhEPO 在胎鼠宫内缺血缺氧的条件下可以通过胎盘屏障和胎鼠血脑屏障到达胎鼠脑内^[3]。本次实验我们进一步观察了 rhEPO 在宫内缺血缺氧的条件下对胎鼠脑组织神经细胞凋亡的影响,为临床应用 rhEPO 对胎儿宫内窘迫进行早期干预提供理论依据。

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,饲养条件为室温 22℃,相对湿度 85%。

1.1.2 主要药品和试剂 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。Caspase-3 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。原位凋亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 妊娠确定及动物分组 无交配史 SD 大鼠,于发情期将雌、雄鼠按 2:1 比例于前一天晚合笼,次日清晨 8 时做阴道拭子涂片,以显微镜下检出精子之日定为受孕第 1 d。将 20 只 19 d 孕 SD 大鼠分为 3 组:rhEPO 治疗组(rhEPO 组, $n=12$)、生理盐水缺血对照组(I/R 组, $n=4$)及假手术对照组(Sham 组, $n=4$);rhEPO 组再根据 rhEPO 剂量分为 2500、5000、7500 U/kg 3 组,每组 4 只孕鼠。

1.2.2 宫内缺血缺氧模型的制备及分组处理 rhEPO 组于手术前 30 min 经尾静脉分别注射 rhEPO 2500、5000、7500 U/kg。I/R 组和假手术组于手术前 30 min 经尾静脉注射生理盐水 1 mL。

rhEPO 组和 I/R 组参照 Tanaka 等^[4]的方法制备宫内缺血缺氧模型。孕 19 d 大鼠以 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,常规消毒铺巾,于下腹部做正中切口,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 后拆除动脉夹以恢复血供,并逐层关腹。假手术组只进行开关腹手术,不钳夹子宫卵巢动脉。各组均于手术后 24 h 取标本。

1.3 检测指标

1.3.1 大体观察 于术后 24 h 以 1%戊巴比妥钠对孕鼠行腹腔麻醉,开腹并暴露双侧子宫,观察宫腔内的活胎数,计算胎鼠死亡率。剖出胎鼠并观察存活新生鼠皮肤颜色、四肢运动等情况;然后迅速将胎鼠断头取脑,观察脑组织的病理变化。

1.3.2 免疫组织化学染色检测 Caspase-3 在胎鼠脑组织中的表达 每组取 10 只胎鼠,采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(strept avidin peroxidase, SP)法检测胎鼠脑组织海马 CA1/CA3 区 Caspase-3 的表达。将脑组织切片置于 60℃烤片 1 h,常规脱蜡脱水,3% H_2O_2 -蒸馏水(1:10)中室温处理 10 min,灭活内源性过氧化物酶。加入稀释的 Caspase-3 抗体(浓度 1:400),4℃过夜。用 PBS 替代一抗,设立阴性对照。滴加二抗(生物素化山羊抗兔 IgG),37℃孵育 30 min。DAB 显色,苏木素轻度复染,经二甲苯透明后中性树胶封片。胞浆或细胞膜上有棕黄色颗粒沉着为 Caspase-3 染色阳性。用 Image pro plus 4.5 软件对免疫组化染色图像进行分析,测定海马 CA1/CA3 区 Caspase-3 表达的面积光密度(OD)值。每只胎鼠随机采集 5 个视野(400×),取其平均值进行比较。

1.3.3 末端脱氧核苷酸转移酶缺口标记(TUNEL)染色检测胎鼠脑神经元凋亡 每组取 10 只胎鼠,胎鼠脑组织切片常规脱蜡脱水,用 20 μg/L 蛋白酶 K 溶于 10 mmol/L Tris-HCl 液中(pH7.4~8.0),室温孵育 20 min。滴加 50 μL TUNEL 反应混合液,在湿盒中 37℃孵育 60 min。滴加 50 μL 碱性磷酸酶(AP),在湿盒中 37℃孵育 40 min。加入 50~100 μL AP-Red,室温孵育 30 min。苏木素复染 2 min,脱水、透明、封片。典型的 TUNEL 染色阳性细胞核着色呈鲜红色,阴性细胞核为蓝色。每只胎鼠随机选取 5 个视野(400×),计数 TUNEL 染色阳性细胞,取其平均值进行比较。

1.4 统计学方法

所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数比较采用单因素方差分析,计数资料采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组胎鼠大体情况比较

各组胎鼠死亡率见表 1。Sham 组无胎鼠死亡,剖宫产鼠皮肤红润,四肢运动良好,能建立自主呼吸。观察脑组织未见脑膜血管扩张、脑组织肿胀及出血等。I/R 组可见部分胎鼠死亡,存活鼠外观与 Sham 组无明显差别,但四肢张力较差。脑组织可见脑膜血管扩张,脑组织水肿、出血等发生。Treat 组与 I/R 组比较,胎鼠死亡率下降,其中 5000 U/kg 组和 7500 U/kg 组胎鼠死亡率与 I/R 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组胎鼠死亡率

Table 1 Death rate of fetal rats in each group

Group	Fetal rats (n)	Death (case)	Death rate (%)
I/R	38	9	23.68
rhEPO 2500 U/kg	43	5	11.63
rhEPO 5000 U/kg	41	2	4.88*
rhEPO 7500 U/kg	38	1	2.63*
Sham	42	0	0.00*

* $P < 0.05$, vs. I/R group

Treat 组中各剂量组脑组织充血、水肿等病理改变均较 I/R 组有所减轻。

2.2 胎鼠脑组织中 Caspase-3 表达情况

见表 2,图 1~图 3。I/R 组海马区可见大量 Caspase-3 表达阳性细胞。各剂量 rhEPO 组与 I/R 组相比较,海马区 Caspase-3 蛋白的表达减弱,Caspase-3 表达的 IOD 值减小,差异有统计学意义($P < 0.01$)。Sham 组海马区未见 Caspase-3 蛋白阳性表达。rhEPO 组中,Caspase-3 蛋白的表达随 rhEPO 剂量的增加呈现减弱趋势,各组间比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 胎鼠脑神经细胞凋亡情况

I/R 组(图 4)与各剂量 rhEPO 组(图 5)海马区均可观察到较多凋亡的神经细胞存在,Sham 组海马区可看到少量 TUNEL 染色阳性细胞,可能为胎鼠发育过程中脑细胞生理性凋亡(图 6)。rhEPO 组海马区凋亡神经细胞少于 I/R 组,rhEPO 组中各剂量组与 I/R 组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。2500 U/kg 组与 5000 U/kg 组及 7500 U/kg 组间比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 5000 U/kg 和 7500 U/kg 组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

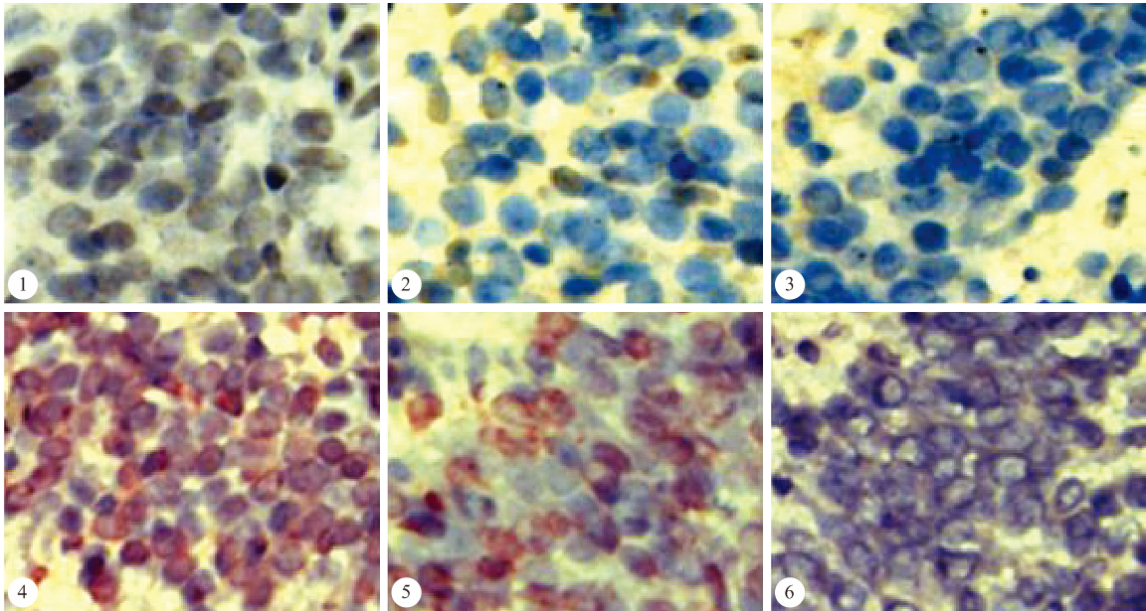


图 1 I/R 组 Caspase-3 蛋白的表达。SP ×400

图 2 rhEPO 5000 U/kg 组 Caspase-3 蛋白的表达。SP ×400

图 3 Sham 组 Caspase-3 蛋白的表达。SP ×400

图 4 I/R 组海马区凋亡细胞。TUNEL ×400

图 5 rhEPO 5000 U/kg 组海马区凋亡细胞。TUNEL ×400

图 6 Sham 组海马区凋亡细胞。TUNEL ×400

Fig 1 Expression of Caspase-3 protein in I/R group. SP ×400

Fig 2 Expression of Caspase-3 protein in rhEPO 5000 U/kg group. SP ×400

Fig 3 Expression of Caspase-3 protein in Sham group. SP ×400

Fig 4 Apoptosis cells in the fetal rat hippocampus in I/R group. TUNEL ×400

Fig 5 Apoptosis cells in the fetal rat hippocampus in rhEPO 5000 U/kg group. TUNEL ×400

Fig 6 Apoptosis cells in the fetal rat hippocampus in Sham group. TUNEL ×400

表 2 各组 Caspase-3 表达的积分光密度值 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Integrated optical density (IOD) value of Caspase-3 expression in each group ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Caspase-3 protein
I/R	10	0.19±0.04
rhEPO 2500 U/kg	10	0.15±0.03*
rhEPO 5000 U/kg	10	0.13±0.02*·#
rhEPO 7500 U/kg	10	0.10±0.03*·#·△
Sham	10	0.00±0.00▲

* $P<0.01$, vs. I/R group; # $P<0.05$, vs. rhEPO 2500 U/kg group; △ $P<0.05$, vs. rhEPO 5000 U/kg group; ▲ $P<0.05$, vs. other groups

表 3 各组胎鼠海马区 TUNEL 阳性细胞数 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 TUNEL-positive cells in the fetal rat hippocampus in each group ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Positive cells (/HP)
I/R	10	27.2±5.51
rhEPO 2500 U/kg	10	21.8±5.03*
rhEPO 5000 U/kg	10	14.5±3.31*·#
rhEPO 7500 U/kg	10	12.6±2.32*·#
Sham	10	2.6±1.65▲

* $P<0.01$, vs. I/R group; # $P<0.05$, vs. rhEPO 2500 U/kg group; ▲ $P<0.05$, vs. other groups

3 讨论

胎儿宫内窘迫是由胎盘循环骤然下降造成的急性缺血缺氧性损害,是导致围产儿死亡的重要原因。本次实验我们采取钳夹双侧子宫卵巢动脉的方式,很好地模拟了孕期胎儿胎盘循环骤然下降甚至中断、母体病理状态缓解后胎盘再灌注的过程。本实验结果显示,钳夹子宫卵巢动脉所致胎鼠宫内缺血缺氧模型可引起胎鼠脑膜血管扩张,脑组织水肿、出血等病理变化。假手术对照组无胎鼠死亡,缺血再灌注后 24 h,I/R 组胎鼠死亡率为 23.68%。rhEPO 治疗组胎鼠死亡率明显下降,其中 5000 U/kg 组和 7500 U/k 组与 I/R 组比较差异有统计学意义,脑组织水肿、出血等病理变化也明显减轻。2500 U/kg 组胎鼠死亡率与 I/R 组比较差异无统计学意义。说明全身注射大剂量 rhEPO 进行缺血前预处理,对缺血缺氧性脑损伤有保护作用。

研究表明,脑缺血再灌注后尽管血流恢复,但组织损伤仍在进展,缺血后的脑损伤不仅与细胞坏死有关,而且与细胞凋亡关系密切^[5],正是神经元的凋亡促进了缺血性损伤的扩大。因此有效抑制神经元的凋亡对缺血性脑病的治疗意义重大。凋亡特征性的表现包括细胞膜活化,细胞皱缩,核染色质浓缩,DNA 断裂,最终形成由细胞膜包裹的凋亡小体,凋

亡小体很快被其他细胞所吞噬,这一过程大约经历 30~60 min。在脑损伤初期,如何维持神经细胞存活,减少神经细胞丢失是一个非常重要的问题。

EPO 及其受体(EPOR)在人类和啮齿类动物的大脑中广泛存在,主要分布于大脑皮层和海马区域的神经元及神经胶质细胞中^[6]。大量研究证明,低氧和缺血均可导致 EPO 及 EPOR 表达上调。Yu 等^[7]的研究发现,无 EPOR 表达的小鼠胚胎发育受到明显抑制,表现为神经母细胞减少,凋亡细胞增多;在体外胚胎皮层细胞培养中,无 EPOR 表达的细胞增殖分化明显减少,对低氧的敏感性显著增高,在缺氧 24 h 后,无 EPOR 表达的皮质细胞全部死亡;而在正常表达 EPOR 的皮质细胞培养液中加入 EPO 可使存活细胞数增加,凋亡细胞减少。McPherson 等^[8]的研究显示,大剂量应用 rhEPO 可减少新生鼠缺血缺氧性脑损伤引起的黑质神经元丢失,改善脑损伤所致的生长发育迟缓及学习障碍。上述研究说明 EPO 及其受体对中枢神经系统的发育意义重大,并对发育脑有神经保护作用。

过去认为 EPO 为生物大分子且有高度糖基化结构,不能透过正常血脑屏障。虽然有研究证明, rhEPO 单剂量脑室内注射,可显著降低新生大鼠缺血缺氧脑损伤模型中脑梗塞面积和神经元的凋亡,但 rhEPO 脑室内注射在临床上并不实用,所以能否通过血脑屏障成为 rhEPO 能否作为神经治疗药物的关键。随着研究的深入,人们发现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,血脑屏障受到破坏而引起局部或广泛的通透性增加,可使正常状态下不能通过的物质通过血脑屏障^[9]。Statler 等^[10]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 可以剂量依赖的方式通过血脑屏障。我们在前期实验中,通过放射性标记的方式也已证明 rhEPO 可以通过胎盘屏障及胎鼠血脑屏障^[3],与 Statler 等的研究一致。

脑不同区域对缺血缺氧性损伤的敏感性不同,其中大脑皮层及海马神经元对缺血缺氧性损伤最为敏感。我们在实验中发现假手术组海马区有少量 TUNEL 阳性细胞,可能为胚胎发育过程中的生理性凋亡。而 I/R 组在钳夹子宫卵巢动脉造成胎鼠宫内缺血缺氧后 24 h 胎鼠海马回出现大量凋亡细胞。各剂量 rhEPO 治疗组 TUNEL 阳性细胞较 I/R

组均减少,说明 rhEPO 可抑制缺血缺氧诱导的神经细胞凋亡。在 rhEPO 治疗组中,5000 U/kg 组和 7500 U/kg 组的凋亡细胞数少于 2500 U/kg 组,差异有统计学意义。而 5000 U/kg 组凋亡细胞数虽较 7500 U/kg 组多,但组间比较差异无统计学意义。有报道称,大剂量 EPO 可使血管反应性下降,血压升高,血液黏度增加,甚至血栓形成^[11],因此关于 rhEPO 用于治疗宫内缺血缺氧性脑损伤的最适剂量仍需进一步研究。

Caspase 家族是一类与细胞凋亡密切相关的蛋白酶家族。Caspase 在凋亡信号的作用下首先激活启动型 Caspase 引发 Caspase 级联反应(Caspase Cascade),然后通过活化的执行型 Caspase 裂解特异性底物导致细胞凋亡。其中 Caspase-3 是凋亡过程中最重要的蛋白酶,是多种细胞死亡受体介导凋亡途径的共同下游效应部分,是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路。Caspase-3 激活诱导神经细胞凋亡对中枢神经系统的影响包括两个方面:一方面参与神经系统发育,通过诱导凋亡保证神经细胞定向分化和组织构型;另一方面参与神经系统损伤,在脑缺氧、缺血、炎症等多种致凋亡因素作用下,Caspase-3 被激活并诱导有重要功能的神经元凋亡,导致脑损伤及后遗症^[12]。因此检测组织和细胞中活化 Caspase-3 的表达是研究受损脑组织细胞凋亡的一种重要方法。我们的研究结果显示,I/R 组和 rhEPO 治疗组均有 Caspase-3 蛋白表达,而假手术组则未观察到 Caspase-3 蛋白阳性表达。rhEPO 治疗组在缺血前给予不同剂量 rhEPO 预处理后,胚胎海马区 Caspase-3 表达的积分光密度值低于 I/R 组($P<0.01$)。rhEPO 治疗组中,Caspase-3 蛋白的表达随 rhEPO 剂量的增加呈现减弱趋势,各组间比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。说明 rhEPO 抑制了宫内缺血缺氧引起的 Caspase-3 蛋白表达,从而抑制了海马神经元的凋亡,起到了神经保护作用。

本次实验初步研究了 rhEPO 在胎鼠宫内缺血缺氧的情况下对胎鼠神经细胞凋亡的影响。研究结果表明,rhEPO 缺血前预处理可明显抑制促凋亡蛋白 Caspase-3 的表达,减少神经细胞的凋亡,对缺血缺氧性脑损伤有明显的保护作用。但本次研究仅观

察了缺血缺氧处理后 24 h 胎鼠神经细胞凋亡的变化。在下一步的工作中,我们将就 rhEPO 预处理对胎鼠宫内缺血缺氧后不同时间的作用做进一步研究。综上,rhEPO 可能成为预防和治疗围产期缺血缺氧性脑病的一种新药物。

参 考 文 献

- 1 Verklan MT. The chilling details: hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Perinat Neonat Nurs*,2009;23(1):59-68.
- 2 McPherson RJ, Juul SE. Recent trends in erythropoietin-mediated neuroprotection. *Int J Dev Neurosci*,2008;26(1):103-111.
- 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.
- 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 Blomgren K, Leist M, Groc L. Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis*,2007;12(5):993-1010.
- 6 Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin as a novel neuroprotectant. *Restor Neurol Neurosci*,2004;22(2):105-119.
- 7 Yu X, Shacka JJ, Eells JB, *et al.* Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development*,2002;129(2):505-516.
- 8 McPherson RJ, Demers EJ, Juul SE. Safety of high-dose recombinant erythropoietin in a neonatal rat model. *Neonatology*,2007;91(1):36-43.
- 9 Kaur C, Ling EA. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res*,2008;5(1):71-81.
- 10 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.
- 11 Gassmann M, Heinicke K, Soliz J, *et al.* Non-erythroid functions of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol*,2003;543:323-330.
- 12 Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol*,2008;414:13-21.

(2012-05-14 收稿,2012-09-06 修回)

编辑 吕熙