

探讨重组促红细胞生成素药理作用的评价方法

向环英¹ 杨朝令² 马增煌¹ 陈云鹏³

[摘要] 目的:探讨重组人促红细胞生成素(rhEPO)对小鼠药理作用的评价方法。方法:煌焦油蓝染色法计数网织红细胞的数量;自动血细胞分析仪分析平均血红蛋白(MCH)的含量。结果:小鼠年龄对结果影响较大,90 d 以上的小鼠测定结果较稳定;通过比较小鼠肝脏、脾脏及血液的网织红细胞的数量发现,脾脏对红细胞生成素最敏感;红细胞 MCH 的含量可以间接反应机体内促红细胞生成素的治疗效果。结论:小鼠体内促红细胞生成素的治疗效果可以通过网织红细胞计数和体外 MCH 的含量来判断。

[关键词] 促红细胞生成素;网织红细胞;煌焦油蓝;平均血红蛋白

[中图分类号] R555 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1004-2806(2012)10-0640-03

Evaluation methods of recombinant human erythropoietin pharmacological action

XIANG Huanying¹ YANG Chaoling² MA Zenghuang¹ CHEN Yunpeng³

(¹ Huangshi Center for Clinical Laboratory, Huangshi, 435000, China; ² Medical School, Huangshi Institute of Technology; ³ Huangshi Health Hospital)

Corresponding author: YANG Chaoling, E-mail: xhy3956311@163.com

Abstract Objective: To explore the evaluation methods of recombinant human erythropoietin pharmacological action for jimpy mice. **Method:** Reticulocyte quantity was counted with brilliant cresol blue staining method. MCH level was analyzed by blood cell counter. **Result:** Jimpy mice age had greater impact on the results. The result of above 90 days was stable. Comparison of Jimpy mice liver, spleen and blood reticulocyte number, spleen was the most sensitive. MCH could indirectly reflect the therapeutic efficacy of rhEPO. **Conclusion:** The therapeutic efficacy of rhEPO could be judged with reticulocyte quantity and MCH.

Key words erythropoietin; reticulocyte; brilliant cresol blue; Mean corpuscular hemoglobin

1985 年人类首次通过基因克隆及重组技术生成了重组人促红细胞生成素(rhEPO)。1989 年成为美国 FDA 批准,首个用于治疗慢性肾功能不全相关贫血治疗性药物,其治疗效果甚佳。然而,对于非肾性贫血来说,其疗效的评价一直存在分歧。由于该药物还对人体运动方面有很好促进血氧饱和度的功效,因此,临床上对其的检测方法的构建也在不断进行探讨^[1]。本研究通过对外周血液及靶器官的红细胞生成指标的比较,利用小鼠作为动物模型来筛选简单易行的检测方法,作为 rhEPO 疗效的诊断标准,为临床提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

小鼠由武汉大学医学院实验动物学部提供,选用 30、60、90 及 120 d 小鼠 4 组共 80 只,小鼠经本实验室饲养 1 周后,腹腔注射生理盐水 0.2 ml 作为对照组,注射 rhEPO 100 U 作为实验组,4 d 后收集 2 组小鼠血液红细胞、肝脏红细胞及脾脏红细胞进行试验。

1.2 主要药品和试剂

rhEPO 注射液[沈阳三生制药股份有限公司生产,生产批号:国药准字(2009)沈三生 s-01 号],血细胞稀释液(生产批号:20110217,济南兰洁生物技术有限公司),灿烂甲酚蓝(sigma 台湾贝索公司),无菌生理盐水。

1.3 器材设备

1800I 自动细胞计数仪, kx-221 自动细胞计数仪,光学显微镜,分类计数器,玻片。

1.4 方法

1.4.1 红细胞的收集与准备 小鼠颈部取血 0.5 ml 于抗凝管中混匀,作为实验的血液样本。另将断颈处死的小鼠打开腹腔,取出肝脏和脾脏于细胞稀释液中浸泡,用手术剪刀分别将相应脏器剪成小碎片,收集洗液并调成 $5 \times 10^9/L$ 的细胞悬液备用。

1.4.2 网织红细胞血片的制作与计数 取血液液体 50 μl 与灿烂甲酚蓝染液 1:1 混匀,室温染色 15 min,制作血膜片后自然干燥,显微镜下观察计数^[2]。

1.4.3 样本红细胞计数与 Hb 值的检测 调节血细胞分析仪为最佳状态,取血液、血细胞液样本按仪器正常操作规程,计数红细胞及血红蛋白项。

¹ 黄石市临检中心(湖北黄石,435000)

² 黄石理工学院医学院

³ 黄石爱康医院

通信作者:杨朝令, E-mail: xhy3956311@163.com

1.5 统计学分析

采用方差分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组小鼠血液中网织红细胞计数

通过观察 4 组小鼠外周网织红细胞发现,90 d 小鼠与 120 d 小鼠的外周网织红细胞差异无统计学意义($P > 0.05$),而 30、60 和 90 d 差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见图 1。

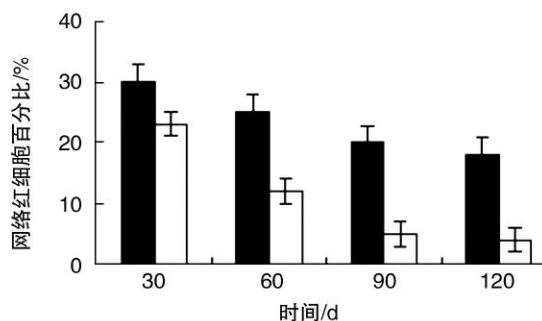


图 1 4 组小鼠含对照组与实验组的网织红细胞结果 (黑柱为实验组,白色柱为对照组,以下图表同)

2.2 小鼠体内肝、脾、血中网织红细胞计数的分析

将小鼠的血液、脾脏、肝脏分 3 组进行对照组与实验组的网织红细胞分别统计,结果见图 2。有报道指出,人骨髓造血越活跃,网织红细胞越多,一般来说骨髓的网织红细胞比外周血约高 3 倍。本实验通过对 90 d 小鼠连续肌内注射 EPO 4 d 发现,小鼠外周的网织红细胞明显低于肝脏和脾脏的网织红细胞。这可能与肝脏和脾脏能参与机体造血有关。EPO 作为一种糖蛋白激素,目前知道由肾脏和肝脏分泌,而其主要的靶器官有骨髓、肝脏和脾脏。本实验结果与此理论是一致的。本实验结果还显示,肝脏中的网织红细胞的百分比(60%)也低于脾脏(80%),所有的盐水对照组与 EPO 肌内注射组差异均有统计学意义。

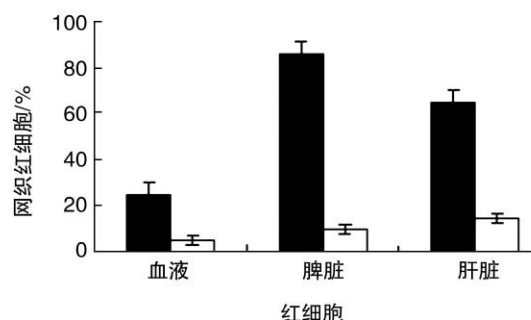


图 2 小鼠的液、脾脏、肝脏实验组对照组网织红细胞

2.3 比较小鼠体内平均血红蛋白的含量

将小鼠的血液、脾脏、肝脏分 3 组进行对照组与实验组的红细胞平均血红蛋白含量(MCH)分别

统计,结果见图 3。人均 MCH 主要用于贫血的鉴别^[6]。它是由细胞计数仪自动计数后,根据 Hb 和 RBC 的数量计算而来。本实验通过计数 RBC 为 $5 \times 10^9/L$ 的血液发现,肌肉注射 EPO 组小鼠体内未成熟红细胞最集中的脾脏和肝脏,MCH 的值较低,与外周血液的 18 pg 差异有统计学意义,而脾脏和肝脏组差异无统计学意义。这也间接的说明,网织红细胞中的血红蛋白含量与成熟红细胞的血红蛋白含量不同,其功能强弱也可能不同。

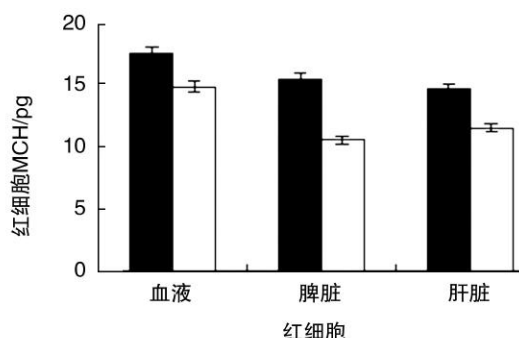


图 3 小鼠的血液、脾脏、肝脏分对照组与实验组的红细胞 MCH 含量

3 讨论

EPO 是哺乳动物调节红细胞生成的主要调控因子,体内的 EPO 的含量也与运动、pH 值以及年龄等因素有关^[3]。它不但可以增加靶器官网织红细胞数量,还能促进网织红细胞更快进入外周。外周网织红细胞是介于晚幼红细胞和成熟红细胞之间的细胞,因其细胞质内尚存留嗜碱物质 RNA,经煌焦油蓝或新亚甲蓝活体染色法染色后成颗粒或成线。该细胞比成熟红细胞稍大。人外周网织红细胞计数通常用来判断骨髓红细胞系统的造血情况,或用来鉴定外周血液中贫血的程度^[4]。由于外周网织红细胞的数量与哺乳动物年龄及物种有关^[5],只有确定了外周网织红细胞的基础值,才可以客观评价 EPO 药物效应。

EPO 是由肾皮质的成纤维细胞、肝脏细胞和巨噬细胞生成。促红细胞生成素对各种不同的细胞发挥多种作用,其调节被认为是依赖于血氧的反馈机制。EPO 的转录因子,缺氧诱导因子(HIFs)在有氧状态下被羟基化且被蛋白酶所分解^[7]。早期学者认为^[8],EPO 作为一种巨大的糖蛋白不能透过血脑屏障(blood brain barrier, BBB),很难在神经系统发挥作用。最近研究表明^[9]:EPO 是一种能被选择转运的大分子物质,可通过一种特殊的可饱和转运机制透过 BBB,静脉注射的 rhEPO 也可通过 BBB 发挥多种保护作用^[10]。目前,EPO 的生物活性包括在肿瘤治疗中的贫血、运动过程中提高

2.2 RHD 基因外显子检测

3 名女性的 RHD 基因外显子 D1、D2~7、D9/1227G、D10、270A、1227A 均无阳性条带出现。

2.3 RhD 抗 D 抗体的检测效价结果

4 年 RhD 抗 D 抗体的检测效价结果见表 1。

表 1 4 年 IgG 抗 D 效价检测结果

序号	年龄 /岁	ABO 血型	Rh 表型	2007 年	2008 年	2010 年	2011 年
1	39	A	ccdee			1:32	1:128
2	50	O	ccdee		1:16	1:16	1:64
3	38	A	ccdee	1:32	1:16	1:8	1:32

3 讨论

现在已知 RhD 血型的表型抗原与其基因并非完全一致,RhD 阴性的 D 基因分子结构主要有 3 种类型:D 基因的全缺失、D 基因和 CE 基因的融合重排、有 D 基因而无 D 抗原表达。何种 RhD 基因型能够产生抗 D 是我们所关心的。

本文所观察的 3 份标本均来自健康女性无偿献血者,在第 1 次献血时血清学筛查及吸收放散检测的结果是 RhD 阴性,表型均为 ccdee 且有 RhD 抗体。采用 PCR-SSP 方法对标本的 RHD 基因 D1、D2~7、D9/1227、D10、del270A、del1227A 进行扩增分型。结果显示外显子 D1、D2~7、D9/1227、

D10 及针对 Del 的 270A、1227A 均无阳性条带出现,应该是完整的 RHD 基因全部缺失。有关抗 D 抗体在体内长期存在的情况,则极少有报道。本文对有抗 D 存在的此 3 名女性献血者进行了几年的抗 D 跟踪随访,抗 D 的效价检测情况见表 1。关于 3 名女性的免疫史,经了解例 1 于 1993 年 1 月曾因病治疗输 A 型血 400 ml,由于当时没有对献血者普遍检查 RhD,且中国人 RhD 阴性的比例在 0.33%^[1]左右,故输入 RhD 阳性血的可能性是很大的。例 3 于 1992 年生育第 1 胎时就发生了 HDN,由于条件所限未对引起 HDN 的血型进行分析。2010 年检查 RhD 效价后的下半年有意外流产史。例 2 免疫史不详。由 2~4 年的效价检测情况再结合 3 人的免疫史来看,RhD 抗体一经产生将长期存在于体内。

本文对近年来产生抗 D 的 3 位表型为 RhD 阴性无偿献血者的 D 基因进行了分析,同时对抗 D 在体内的情况进行了初步的检测。从中可以看出产生 D 抗体的表型为 RhD 阴性的人,其 D 基因是完全缺失的;D 抗体一经产生将长期存在于体内。

参考文献

[1] 郑凌,刘衍春,刘毅,等.24 万献血者 ABO、Rh 血型调查分析[J].现代诊断与治疗,2006,17(6):379-379.
(收稿日期:2012-05-15)

2000,14:135-138.

[5] 刘志贤,李剑鸿,曾建武.例新生儿网织红细胞计数参考范围的探讨[J].生物医学工程与临床,2008,6(12):487-489.

[6] 周建中.红细胞参数在缺铁性贫血诊断中的应用评价[J].国际检验医学杂志,2006,32(7):805-806.

[7] JELKMANN W. Erythropoietin after a century of research:younger than ever[J].Eur J Haematol,2007,78:183-205.

[8] HIRAKATA H,YAO H,OSATO S,et al. CBF and oxygen metabolism in hemodialysis patients:effects of anemia correction with recombinant human EPO[J].Am J Physiol,1992,262:737-743.

[9] BRINES M,GHEZZI P,KEENAN S,et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury[J].Proc Natl Acad Sci,2000,97:526-531.

[10] ERBAYRAKTAR S,GRASSO G,SFACTERIA A,et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo[J].Proc Natl Acad Sci,2003,100:741-746.

(收稿日期:2012-03-02)

(上接第 641 页)

血氧饱和度以及各种充血性心力衰竭等方面发挥其作用。尽管 EPO 的治疗是多方面的,然而评价指标一直未被确定,本实验通过对不同年龄组小鼠的网织红细胞数量观察发现成年的小鼠对 EPO 的作用稳定,网织红细胞计数的指标很敏感。作为更早期的指标,本实验可以建议在相应的靶器官,如超过 50%即有诊治意义。作为长期监测红细胞的指标,本实验的数据支持 MCH,这是因为未成熟红细胞由靶器官到达外周成熟约需要一周时间甚至更长,这种监测的意义远远高于免疫学检测方面的定量技术。本实验通过网织红细胞计数和 MCH 这种双相互补分析,可以为临床上 EPO 药物功效提供科学的依据。

参考文献

[1] SCHMIDT W,BIERMANN B,WINCENBACH P,et al. Int[J].Sports Med,2000,2:133-138.

[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:130-132.

[3] 王彬,宓捷波,常文保,等. EPO 检测技术的研究进展[J].化学进展,2005,15(2):117-122.

[4] BREYMANN C. Bailliere's. Clin Endocrinol Metab,