

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

血紅生成素與缺氧相關因子在急性與慢性水腦症之基因表現

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-251-

執行期間：92年08月01日至93年10月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：郭夢菲

計畫參與人員：吳寬墩, 李育龍

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 30 日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

## 血紅生成素與缺氧相關因子在 急性與慢性水腦症之基因表現

計畫類別：個別型計畫      整合型計畫  
計畫編號：NSC92 - 2314 - B - 002 - 251  
執行期間：92 年 8 月 1 日至 93 年 10 月 31 日

計畫主持人：郭夢菲  
共同主持人：吳寬墩  
計畫參與人員：李育龍

執行單位：台大醫學院外科

中 華 民 國九十三年十一月三十日

## 中文摘要

關鍵詞：水腦症、血紅生成素、血管內膜生長素、缺氧引發因子

水腦症是小兒神經外科最常見的疾病，其特徵是由於腦脊髓液(cerebrospinal fluid, CSF)分泌過多、CSF通路受阻、或吸收不良而造成腦室變大。水腦症會造成腦室旁之白質及大腦皮質之病理變化。上述病理變化除了導因於腦部代謝性之異常外，CSF之機械性壓迫及其間接引起之腦部缺血，一直被認為是水腦症引起神經性損傷的主要因素。

過去的研究顯示腦部缺氧、缺血時會引起血紅生成素與血管內膜生長素等缺氧引發因子基因之表現。血紅生成素被認為具有神經保護的作用。我們假設在水腦症的狀態下腦壓升高壓迫腦室旁組織與腦內血管會減少腦部之氧氣供應，而引起血紅生成素與血管內膜生長素等缺氧引發因子基因之轉錄。本研究應用RT-PCR、Western blot analysis等方法，研究實驗性水腦症大腦各部位血紅生成素與其他缺氧引發因子之變化。本計劃的目的如下：

- 一、在水腦的狀態下，血紅生成素與其他缺氧引發相關因子基因在腦組織之轉錄有無改變。
- 二、在水腦時，血紅生成素與其他缺氧引發因子基因在腦組織之分佈與表現與缺氧狀態的腦有何差異。是否靠近腦室的組織變化較大或者易受缺氧傷害的部位變化較大
- 三、血紅生成素與其他缺氧引發因子基因之表現與腦壓高低有無關聯。
- 四、血紅生成素與其他缺氧引發因子基因之表現在產生水腦的不同時間點有無差異。
- 五、在水腦接受分流後，血紅生成素與其他缺氧引發因子基因在CSF與腦組織之轉錄有無改變。

## 英文摘要

Keywords: Hydrocephalus; Hypoxia-inducible factor, Erythropoietin, Vascular endothelial growth factor

Hydrocephalus is the most common disease in pediatric neurosurgery. It is caused by increased production of cerebrospinal fluid (CSF), blockage of CSF pathway, or impaired absorption of CSF. The abnormal accumulation of CSF in the brain during hydrocephalus will have effects to the brain not only from mechanical compression and metabolic disturbance, but also from vascular compromise, which will impair the cerebral oxygen supply.

It is known that hypoxia induces transcription of erythropoietin (EPO) and other hypoxia-inducible genes, such as vascular endothelial growth factor (VEGF). It is hypothesized that the increased intracranial pressure (IICP) during hydrocephalus changes the expression of EPO and other hypoxia-inducible genes. Using RT-PCR and Western blot analysis, the aims of this study are as follows:

1. The expression of EPO and other hypoxia-inducible genes in the brain tissue during hydrocephalus
2. The location of EPO and other hypoxia-inducible genes in the brain tissue during hydrocephalus (Is it different with the results of other studies in the hypoxic brain)
3. The relationship between the intracranial pressure and the expression of EPO and other hypoxia-inducible genes
4. The chronological changes of expression of EPO and other hypoxia-inducible genes in different stages of hydrocephalus
5. The treatment effect (CSF diversion) to the expression of EPO and other hypoxia-inducible genes

## 前言

哺乳動物因應缺氧會有系統性 (systemic) 局部性 (local) 與細胞 (cellular) 三種層次的反應 (Marti & Risau, 1998)。系統性的反應像是呼吸排氣量之增加、造血增加。細胞性的反應像是分解醣類的酵素活化起來以增加ATP之產生。至於血管內膜生長素 (VEGF) 之產生則是因應缺氧而出現的一種局部性反應。

過去研究發現VEGF mRNA依照含量的多寡存在於肺、腎、心、肝、腦、睪丸等器官 (Marti et al, 1996; Monacci et al, 1993)。與物種 (鼠、鼯鼠、豬、人) 無關。雖然正常腦部VEGF之含量並不高, 但Marti & Risau (1998) 將鼯鼠暴露在6% O<sub>2</sub>的環境下6小時, 腦中VEGF mRNA增加了4倍。顯示在病態狀況下VEGF mRNA的量會比正常狀態下多。而在正常狀態下, VEGF在腦中的glial cell含量很少, 在choroid plexus之上皮細胞與小腦含量較多, 嗅球的含量也很高。在缺氧的狀態下, glial cell之VEGF表現大量增加, 而且在hippocampus與dentate gyrus之神經元也測得到; 相反的, choroid plexus之上皮細胞表現減少。也就是說原本有VEGF表現的上皮細胞, 在缺氧時並無特別反應; 但是在需要以血管新生來代償缺氧性傷害的細胞, 其VEGF之表現反而大量增加, 與過去的觀念符合-----在慢性缺氧或缺血下 (例如: 心肌梗塞、下肢缺血、腦血管梗塞等), VEGF會被引發出來。VEGF在腦部除了有血管新生的作用還會增加腦血管的通透性 (Thomas, 1996; Hippenstiel et al, 1998)。Hayashi等人 (1997) 在鼠腦局部注射VEGF, 藉由其血管新生的作用, 增加腦部之氧氣供應得以減少缺血性的腦損傷。然而VEGF會造成腦水腫及血腦屏障的破壞而使顱內壓更高。Van Bruggen等人 (1999) 發

現投予VEGF的拮抗劑可以減少鼠腦部缺血/再灌流後引起之腦水腫及組織傷害。因此VEGF對腦部具有保護作用也有加重傷害之作用。在中樞神經系統，VEGF被認為有neurogenesis、neural guidance的作用，並且有串聯neurons與glial cells交互作用的功能。

多數組織包括腦部在各種刺激下，像是缺氧狀態都可能活化血紅生成素（erythropoietin, EPO）基因的表現。Lewczuk等人（2000）證實在缺氧狀態下海馬迴的神經細胞培養會表現出EPO與EPO mRNA。基因的表現。在in vivo的研究，Sirén與Ehrenreich（2001）發現將鼠類暴露在8%的氧氣下，海馬迴會表現出EPO與EPO mRNA；在貧血性的壓力下腦部有EPO的基因表現（Chin et al, 2000）；在中大腦動脈栓塞後，在缺血邊緣也有EPO的基因表現（Sadamoto et al, 1998）。EPO被認為具有神經保護與腦組織重新架構的作用（Bernaudin et al, 1999），尤其是在發生腦缺血的狀態。

缺氧引發因子（hypoxia inducible factor, HIF）是一種轉錄因子，它在缺氧細胞可以結合在EPO基因的3'-enhancer。HIF是一個heterodimer由alpha與beta次單位組成（HIF-1 $\alpha$  and HIF-1 $\beta$ ）HIF在缺氧組織中普遍存在且會被活化起來。除了EPO之外，VEGF, inducible nitric oxide synthase (iNOS), heme oxygenase-1 (HO-1), 與 tyrosine hydroxylase (TH)等分子也都含有HIF的功能區，因此HIF可說是缺氧基因表現的一個global regulator。

過去EPO/VEGF/HIF等與缺氧有關的因子與腦部相關的研究大都著重於hypoxemic hypoxia（讓實驗動物呼吸6-8% O<sub>2</sub>）functional anemia（讓實驗動物呼吸0.1% CO; Digicaylioglu et al, 1995）與腦部缺血（cerebral ischemia）等病態時引起的腦部變化（Kietzmann et al, 2001）；至於VEGF在水腦症的相關研究並不像在缺血性腦損傷的研究多。

水腦症是小兒神經外科最常見的疾病，其特徵是由於腦脊髓液（cerebrospinal fluid, CSF）分泌過多、CSF通路受阻、或吸收不良而造成腦室變大。水腦症會造成腦室旁之白質及大腦皮質之病理變化。上述病理變化除了導因於腦部代謝性之異常外，CSF之機械性壓迫及其間接引起之腦部缺血灌流減少，腦部氧氣供應減少，一直被認為是水腦症引起神經性損傷的主要因素。我們假設在水腦症的狀態下腦壓升高壓迫腦室旁組織與腦內血管會減少腦部之氧氣供應，而引起EPO與VEGF等缺氧相關因子基因之轉錄。

Koehne等人（2002）研究兒童水腦症CSF中VEGF與EPO之變化，他們發現VEGF有明顯的升高，EPO之平均值也有升高的現象。然而，作者坦承人體研究所可能遭遇的困難，像是水腦症患者的CSF都是術中由腦室直接抽取，而對照組的CSF則由脊髓穿刺取得；再者水腦症患者都在病患全身麻醉的狀態下取得CSF，而對照組的CSF則在患者清醒的狀態下取得；取得CSF的時間點無法掌控（如腦壓、腦灌流壓、同時存在不同但可能相關的疾病等等）；而且水腦的人體研究不可能取得腦組織。種種的限制使得動物實驗成為研究水腦症的主要方式。

我們假設在水腦症的狀態下腦壓升高壓迫腦室旁組織與腦內血管會減少腦部之氧氣供應，而引起血紅生成素與血管內膜生長素等缺氧相關因子基因之轉

錄。本研究應用RT-PCR、Western blot analysis等方法，研究實驗性水腦症與大腦各部位EPO與其他缺氧引發因子之變化。

## 文獻探討 (References)

1. Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR (1999) Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci* 11: 4159-4170
2. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E (1999) A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb blood flow metab* 19: 643-651
3. Chin K, Yu X, Beleslin-Cokic B, Liu C, Shen K, Mohrenweiser HW, Noguchi CT (2000) Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 81: 29-42
4. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Bauer C, Gassmann M (1995) Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3717-3720
5. Hayashi T, Abe K, Suzuki H, Itoyama Y (1997) Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 28:2039-2044
6. Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, Risau W, Clauss M, and Suttorp N (1998) VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 274:L678-L684
7. Kietzmann T, Knabe W, Schmidt-Kastner R (2001) Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251:170-178
8. Koehne P, Hochhaus F, Felderhoff-Mueser U, Ring-Mrozik E, Obladen M, Bühner C (2002) Vascular endothelial growth factor and erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus. *Child's Nerv Syst* 18:137-141
9. Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Sirén AL, Ehrenreich H (2000) Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport* 11: 3485-3488
10. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, Straumann U, Digicaylioglu M, Henn V, Tonekawa Y, Bauer C, Gassmann M (1996) Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 8: 666-676
11. Marti HH & Risau W (1998) Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15809-15814

12. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH (1993) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 264:995-1002
13. Robert B, Zhao X, Abrahamson DR (2000) Coexpression of neuropilin-1, and VEGF164 in developing and mature mouse kidney glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F275-F282
14. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R (1998) Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 253:26-32
15. Sirén AL & Ehrenreich H (2001) Erythropoietin-a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251:179-184
16. Thomas K (1996) Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 271:603-606
17. Van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Berlai R, Williams SP, van Lookeren Campagne M, Ferrara N (1999) VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after Ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest* 104:1613-1620
18. Wenger RH, Marti HH, Schuerer-Maly CC, Kvietikova L, Bauer C, Gassmann M, Maly FE (1996) Hypoxic induction of gene expression in chronic granulomatous disease- derived B-cell lines: oxygen sensing is independent of the cytochrome b558-containing nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Blood* 87:756-761
19. Wu KD, Lee WS, Wey J, Bungard D, Lytton J (1995) Localization and quantitation of endoplasmic reticulum Ca-ATPase isoform transcripts. *Am J Physiol* 269: C775-C784
20. Wu KD, Chen YM, Chu TS, Chueh SC, Wu MS, Hsieh BS (2001) Expression and localization of human dopamine D2 and D4 receptor mRNA in the adrenal gland, Aldosterone-producing adenoma and pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4460-4467

## 研究方法 (Subjects and Methods)

### 1. 實驗動物部份：

- A. 飼養與管理：依台大醫學院實驗動物管理委員會規定進行。
- B. 引發水腫 (Cisterna magna injection) :rats 以腹腔內注射 8% chloral hydrate 溶液 ( 0.5 cc/100g ) 麻醉，在顱頸交界處以碘酒消毒，並在顯微鏡之指引下以 0.05 cc 25% 無菌 kaolin 溶液 ( sham-operated rats 注入等量 saline solution )

注入 cisterna magna，縫合傷口，一般在注射後一週會產生急性水腦症，在注射後四週會產生慢性水腦症。未產生水腦之動物或因腦壓過高而死亡者則由實驗中去除。

**C. 測定腦壓：**不同組之動物在預定之時間（如：acute hydrocephalus group 在注射 kaolin 溶液一週後；chronic hydrocephalus group 在注射 kaolin 溶液四週後）先以 8% chloral hydrate (0.5cc/100g) 麻醉，以立體定位儀固定頭部，在頭部中線作一直線切口，將頭皮向兩側掀開，以 bregma (冠狀縫與矢狀縫交點) 當零點，由 bregma 向外側 2mm，向後 1mm，在顱骨上鑽一個小洞，以 fiberoptic ICP (intracranial pressure) monitor 插入腦組織中測量腦壓。

**D. CSF分流：**需作CSF分流的動物，依上述測定腦壓的步驟進行。以立體定位方式在顱骨上鑽洞後，將引流管置入腦室中，插入深度為3-4mm即可取得CSF。作CSF分流處置的動物，先量引流前腦壓，再開始引流至腦壓正常為止（過去本實驗室之數據約在2-3cmH<sub>2</sub>O左右）

**E. 動物犧牲：**實驗結束，以 pentobarbital 腹腔注射 (200mg/kg) 將實驗動物犧牲。迅速將實驗動物斷頭，分離出腦部各部位：額葉皮質、顳葉皮質、紋狀體、海馬迴、視丘、小腦皮質，置入液態氮內，存於-80 備用，供進一步研究分析。

2. **動物分組：**將實驗動物分為四大組(八小組)，每小組至少各25隻(包括死亡、RNA extraction、Western blot analysis, etc)：

**Sham-operated group：**rats於3週大時接受0.05ml sterile saline注射入cisterna magna，一週 (for acute) 或四週 (for chronic) 後進行下一步實驗。

- a. Sham for acute hydrocephalus (4週大, 4w/o rats)
- b. Sham for chronic hydrocephalus (7週大, 7w/o rats)

**Acute hydrocephalus group：**rats於3週大時接受0.05ml sterile 25% kaolin溶液注射入cisterna magna，一週後進行下一步實驗。

- a. Acute hydrocephalus with CSF diversion.
- b. Acute hydrocephalus without CSF diversion.

**Chronic hydrocephalus group：**rats於3週大時接受0.05ml sterile 25% kaolin溶液注射入cisterna magna，四週後進行下一步實驗。

- a. Chronic hydrocephalus with CSF diversion.
- b. Chronic hydrocephalus without CSF diversion.

### 3. 實驗室步驟：

#### A. mRNA of erythropoietin and other hypoxia-related molecules

Total RNA was extracted by the acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform method. The mRNA of erythropoietin (EPO), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hypoxia inducible factor (HIF) was been examined in different parts of the brain by the RT-PCR. The method had been previously described [Wu et al., 1995, 2001]. Briefly, total RNA was been purified from



different parts of the brain with the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method.

Ten to twenty microgram of total RNA was been fractionated on a 1% agarose gel, photographed and checked the RNA quality. The mRNA was examined by the RT-PCR. The mRNA of EPO, VEGF, and HIF-1  $\alpha$  examined in the RT-PCR used corresponding specific primers and was been confirmed the accuracy by DNA sequence analysis.

Primers:

HIF-1 $\alpha$  up : tctgttatgaggctcaccatc 21 mer

HIF-1 $\alpha$  down : ccggcttgtaggtacatt 20 mer

VEGF up : cactggaccctggctttactgc 22 mer

VEGF down : gttttgacccttccttcctc 24 mer

EPO up : ctccccacgcctcatt 17 mer

EPO down : cccgtgtacagcttcagttt 20 mer

## **B. RT-PCR**

Five micrograms of the RNA were reverse-transcribed (RT) to first strand cDNA using MMLV reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega). Polymerase chain reaction (PCR) for rat EPO, VEGF, and HIF-1  $\alpha$  mRNA was performed by adding 3 $\mu$ l (150 ng) of the first-strand cDNA in a total of 15  $\mu$ l containing 20 mmol/L Tris-HCL, 50 mmol/L KCL, 1.33 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ mol/L dNTPs, 33 pmoles of each primer, and 1.5 U DNA polymerase. The parameters for rapid cycle DNA amplifications were initial denaturation at 96 $^{\circ}$ C for five minutes, then thirty seconds at 94 $^{\circ}$ C, thirty seconds of annealing at 55 $^{\circ}$ C, and one minutes at 72 $^{\circ}$ C for 30 cycles, followed by a final extension at 72 $^{\circ}$ C for 10 minutes. The amplified products were resolved in 5% polyacrylamide gels. The gels were stained with ethidium bromide and photographed.

## **C. Western blot analysis**

40mg of protein were loaded on SDS-polyacrylamide gels of different percentages corresponding to the molecular weight of the target proteins. After electrophoresis, the proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by electroblotting. For immunodetection, membranes were probed with primary antibody followed by incubation with peroxidase-conjugated secondary antibodies or followed by incubation with biotinylated secondary antibody and then transferred to VECTASTAIN<sup>®</sup> *Elite* ABC kit (VECTOR). Bands were visualized by the enhanced chemiluminescence (ECL) system (PerkinElmer<sup>™</sup>).

## 結果 (Results)

實驗的結果顯示(參下面附圖)

### 1. HIF-1 $\alpha$ (Hypoxia-inducible factor):

Acute hydrocephalus: Hippocampus (HC): H>HD=C

Thalamus (Th) H>HD>C

Chronic hydrocephalus: HC: C>H=HD

Striatum (ST): H>C>HD

### 2. HIF-1 $\alpha$ mRNA:

Acute hydrocephalus: TH: H>HD=C

HC: H>C=HD

Chronic hydrocephalus: No change

### 3. EPO:

Acute hydrocephalus: HC: H>C=HD

ST: C=HD>H

TH: H>C>HD

Chronic hydrocephalus: HC: H=HD>C

ST: no change

TH: no change

### 4. EPO mRNA: Fail to identify

### 5. VEGF: Fail to identify

### 6. VEGF mRNA:

Acute hydrocephalus: HC: C>H>HD

ST: H>HD>C

TH: H=HD>C

Chronic hydrocephalus: no change

**討論( Discussion ) and 計劃成果自評( 研究內容與原計劃相符程度、  
達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值 )**

我們的研究發現水腦症確實會造成缺氧相關因子基因在腦組織轉錄之改變。

急性水腦時 hippocampus 與 thalamus 之 HIF-1 $\alpha$  及 HIF-1 $\alpha$  mRNA 有明顯增加且經過 CSF 引流後有部份恢復。EPO 亦有相同變化，EPO mRNA 則以現有之方法無法測出。VEGF mRNA 在 striatum 與 thalamus 之變化與 HIF-1 $\alpha$  及 HIF-1 $\alpha$  mRNA 相同，hippocampus 之 VEGF mRNA 則在急性水腦時反而下降。VEGF 以現有之方法無法測出。

慢性水腦時，缺氧相關因子基因在腦組織轉錄之變化不大，只有 striatum 內之 HIF-1 $\alpha$  在水腦時有上升，hippocampus 內之 HIF-1 $\alpha$  在水腦時下降。此外 hippocampus 內之 EPO 在慢性水腦時上升。而且 CSF 引流並無法恢復。

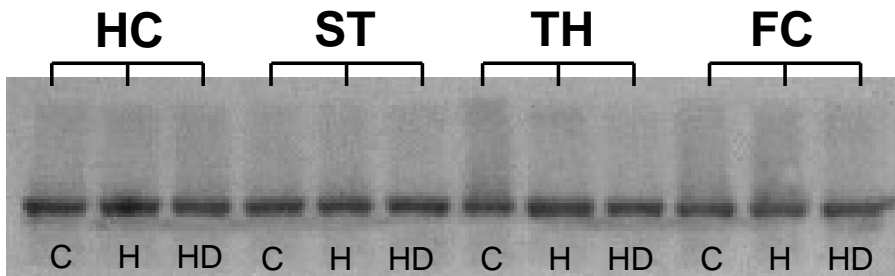
實驗結果顯示：

- 一、在水腦的狀態下，缺氧相關因子基因在腦組織之轉錄有改變。
- 二、在水腦時，缺氧相關因子基因在靠近腦室的組織與易受缺氧傷害的海馬迴變化較皮質大。
- 三、缺氧相關因子基因之表現主要出現在急性水腦的狀態。
- 四、在水腦接受分流後，缺氧相關因子基因在腦組織之轉錄有部份恢復。

EPO mRNA與VEGF在本實驗嘗試數種primer與抗體仍無法測出殊為可惜。  
未來如有新的抗體發展出來再研究。

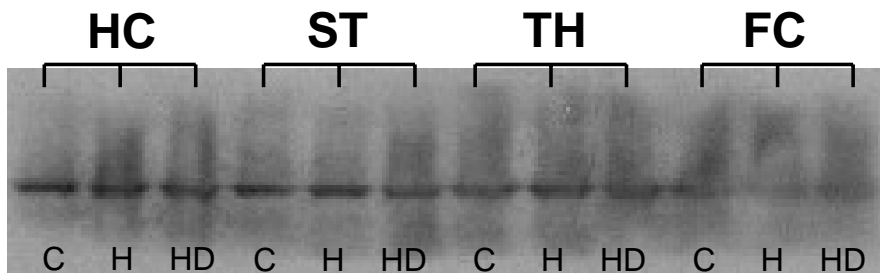
# HIF-1 $\alpha$

## Acute Hydrocephalus



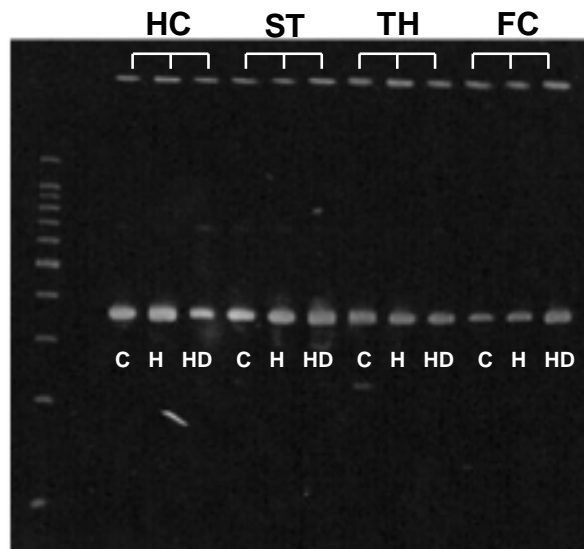
# HIF-1 $\alpha$

## Chronic Hydrocephalus



# HIF-1 $\alpha$ mRNA

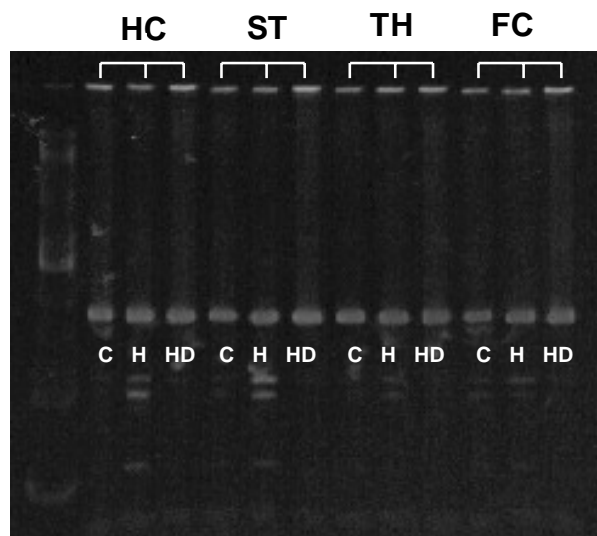
## Acute Hydrocephalus



# HIF-1 $\alpha$ mRNA

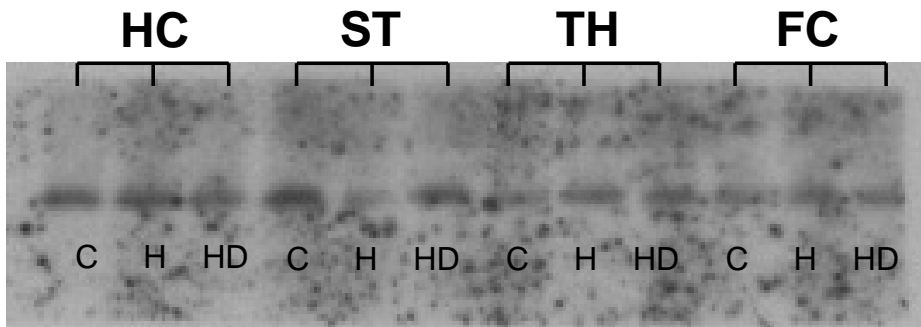
## Chronic Hydrocephalus

(no change)



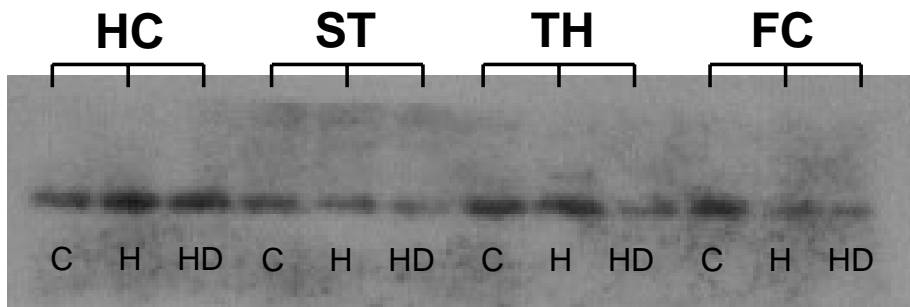
# EPO

## Acute Hydrocephalus



# EPO

## Chronic Hydrocephalus



VEGF mRNA  
Acute Hydrocephalus

