

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-07-0604-03

## 大鼠脑出血后血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶 9 的表达及七叶皂苷钠的影响

许宏伟, 何双英, 张 乐, 杨期东, 刘晓英, 莫丹衡, 杨秀娟

(中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 神经病学; 脑出血; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶 9; 七叶皂苷钠

[摘要] 目的 探讨血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶 9 在脑出血后的作用及七叶皂苷钠的影响。方法 85 只大鼠随机分为脑出血模型组(20)、治疗组 A(20)、治疗组 B(20)、假手术组(20)和正常对照组(5), 采用胶原酶复制大鼠基底节区脑内血肿模型, 通过免疫组织化学动态测定不同时间点(6 h、24 h、48 h 和 96 h)鼠脑内血肿周围脑组织中血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶 9 的表达; 并同时检测七叶皂苷钠干预后两者在相应时间点的动态变化。结果 血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶 9 在脑出血模型组出血后 6 h 表达明显增加, 分别为  $12.67 \pm 1.50$  和  $9.27 \pm 1.28$ , 24~96 h 显著增加且均处于高峰( $P < 0.01$ ); 在出血后 6~96 h 两者的表达呈正相关, 相关系数为 0.479( $P < 0.01$ )。在七叶皂苷钠治疗组血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶 9 的表达量明显受到抑制(特别是治疗 B 组抑制效果更明显), 量效关系呈负相关其决定系数分别为 0.107 和 0.083。结论 1. 脑出血后血管内皮生长因子的表达水平提高可能有协同诱导基质金属蛋白酶 9 的表达作用。2. 七叶皂苷钠可能通过抑制基质金属蛋白酶 9 和血管内皮生长因子的相关途径发挥抗脑水肿作用。

[中图分类号] R74

[文献标识码] A

## The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinase-9 in Rats with Intercerebral Hemorrhage and the Response to Sodium Aescinate

XU Hong-Wei, HE Shuang-Ying, ZHANG Le, YANG Qi-Dong, LIU Xiao-Ying, MO Dan-Heng, and YANG Xiur-Juan

(Department of Neurology, Xiangya Hospital, Zhongnan University, Changsha 410008)

[KEY WORDS] Neurology; Intracerebral Hemorrhage (ICH); Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF); Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9); Sodium Aescinate

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in rat brain tissue in the border zone of the hematoma and explore the relationship among the expression of VEGF, MMP-9 and sodium aescinate after intracerebral hemorrhage (ICH). **Methods** 85 healthy SD rats were divided randomly for: intracerebral hemorrhage model group (20), sodium aescinate treatment group A (20), sodium aescinate treatment group B (20), sham-operated group (20) and, normal control group (5). Rat model of ICH was established by injection of physiological saline containing collagenase into the right caudate nucleus. Before and after interfered with sodium aescinate, the immunohistochemical methods were used to examine the expression of VEGF, MMP-9 in rat brain tissue at 6 h, 24 h, 48 h, and 96 h on ICH respectively. **Results** The amount of VEGF and MMP-9 were markedly increased at 6 h, respectively  $12.67 \pm 1.50$  and  $9.27 \pm 1.28$  and reached the highest on 24~96 h in the border zone after ICH ( $P < 0.01$ ). There was a positive correlation with the expression of VEGF and MMP-9 after 6~96 h on ICH, coefficient correlation is 0.479 ( $P < 0.01$ ). The expression of VEGF and MMP-9 were inhibited transparently in sodium aescinate treatment group A and sodium aescinate treatment group B, especially in the latter and there was a negative dose-effect relationship, coefficient of determination is 0.107 and 0.083. **Conclusions** 1. The upregulated expression of VEGF might induce the expression of MMP-9 in the border zone after ICH in rats. 2. The anti-cerebral edema effects of sodium aescinate maybe related to change of the suppression of VEGF and MMP-9.

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是近年发现的一种特异性内皮细胞有丝分裂原,是迄今已知最强的促血管生长因子,由多

种正常细胞产生和分泌,特异性作用于 VEGF 受体而实现其生物学效应<sup>[1]</sup>,也是目前国内外研究的热点。VEGF 在脑缺血后的损伤作用已得到证实<sup>[2]</sup>,关于 VEGF 是否在脑出血(intracerebral hemorrhage)后同样具有损伤作用及七叶皂苷钠对其是否有影响,国内外未见报道。为此,我们采用实验性大鼠模型,检测了脑出血后 VEGF 的表达变化及其与基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的相关性,

[收稿日期] 2005-10-17

[修回日期] 2006-07-15

[作者简介] 许宏伟,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事脑血管病的基础和临床研究,联系电话 0731-4327024 或 13017391526, E-mail 为 xhw\_xiangya@sina.com。何双英,硕士研究生,主要从事脑血管病研究,联系电话为 13975806089, E-mail 为 heshuangying@hotmail.com。张乐,博士,主治医师,主要从事脑血管病基础和临床研究,联系电话为 13973187150, E-mail 为 zldzld@163.com。

并采用七叶皂苷钠干预,旨在深入探讨脑出血后 VEGF 和 MMP-9 的表达规律及可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组及处理

85 只体重 200~250 g 的健康 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、假手术组、治疗组 A 及治疗组 B, 对照组 5 只, 其它每组 20 只。对照组普通饲养, 自动饮水, 不再作任何处理; 模型组动物复制脑出血模型后, 普通饲养, 生理盐水 1 mL/d 腹腔注射; 假手术组动物在右苍白球注射 2 mL 灭菌生理盐水后, 普通饲养, 生理盐水 1 mL/d 腹腔注射; 治疗组 A 动物复制脑出血模型 4 h 后, 用七叶皂苷钠(山东绿叶制药有限公司) 5 mg/(kg·d) 溶解于 1 mL 生理盐水中腹腔注射; 治疗组 B 动物复制脑出血模型 4 h 后, 用七叶皂苷钠 10 mg/(kg·d) 腹腔注射。

### 1.2 大鼠脑出血模型的制备

参考文献[3], 于前囟后 1.4 mm, 矢状缝右侧旁开 3.2 mm 处开骨窗, 用微量进样器向苍白球(进针深度为 5.6 mm) 注入 2  $\mu$ L 含 0.4 IU 型胶原酶(美国 Sigma 公司)的生理盐水以 0.5  $\mu$ L/min 的速度注入, 留针 5 min, 缓慢拔针, 制成脑出血模型。

### 1.3 血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶 9 的表达测定

分别于术后 6 h、24 h、48 h 和 96 h 麻醉动物, 经主动脉 4% 多聚甲醛灌注后, 取出脑组织放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后制作石蜡切片。用免疫组织化学染色检测 VEGF 和 MMP-9 的表达(试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供)。取连续组织切片在同一强度及放大倍数下观察, 采用阳性细胞计数法。每只大鼠每个指标选一张脑切片在 400 倍光镜下随机选取血肿周围的 3 个互不重叠视野, 共计 15 个视野, 计数每个视野的该指标阳性细胞数, 取均数为该指标阳性细胞数。

### 1.4 免疫组织化学染色法

常规对脑组织石蜡切片脱蜡后用 3% 过氧化氢蒸馏水洗 3 次并进行热修复抗原。首先, 滴加正常山羊血清封闭液 37  $^{\circ}$ C 20 min; 第二次, 滴加稀释的一抗(兔抗 VEGF 或兔抗 MMP-9, 对照组用 PBS 代替) 37  $^{\circ}$ C 60 min 后 4  $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗涤; 第三次, 滴加生物素化山羊抗兔 IgG 37  $^{\circ}$ C 20 min 后 PBS 洗涤; 最后, 滴加试剂 SABC 37  $^{\circ}$ C 20 min PBS 洗涤后用 DAB 显色, 脱水、透明、封片。采用 HPIAS-1000 高清晰彩色病理图象分析系统进行图象分析。胞质染成黄色

的细胞为阳性细胞, 其显色分为 4 级: 阴性不着色, 弱阳性显淡棕黄色, 中等阳性着色介于至强阳性之间, 强阳性显深棕黄色。

### 1.5 统计方法

各指标均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS10.0 统计软件包进行 ANOVA 检验、 $q$  检验、 $t$  检验及双尾 Pearson's 相关分析。

## 2 结果

### 2.1 血管内皮生长因子的表达

对照和假手术组可见极少量 VEGF 的表达。模型组各时点出现大量棕黄色 VEGF 阳性染色细胞, 着色部位主要为细胞浆, 术后 24~96 h 均处于高峰期(第 6 h VEGF 阳性染色细胞数显著低于其它各时间点,  $P < 0.01$ ; 24、48、96 h 相互比较差异无显著性,  $P > 0.05$ )。其阳性表达细胞可能包括神经元、内皮细胞、中性粒细胞等。七叶皂苷钠可明显抑制 VEGF 的表达( $P < 0.01$ ), 治疗组 B 的抑制程度更明显(除 24 h 反而有升高外)( $P < 0.01$ ); 且存在一定量效关系, 呈负相关, 在 6~96 h, 相关方程为  $Y = 11.217 - 0.327X$  ( $Y$  代表细胞数,  $X$  代表治疗量,  $R^2 = 0.107$ ), 治疗量越大, 阳性细胞数越少(表 1)。

表 1. 各组大鼠脑出血后血肿周围脑组织中血管内皮生长因子表达(阳性细胞数,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

分 组	第 6 h	第 24 h	第 48 h	第 96 h
对照组	2.73 $\pm$ 1.03			
假手术组	2.80 $\pm$ 1.21	2.93 $\pm$ 1.33	2.87 $\pm$ 1.19	2.87 $\pm$ 1.13
模型组	12.67 $\pm$ 1.50 <sup>b</sup>	16.00 $\pm$ 1.31 <sup>b</sup>	15.87 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>	15.13 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>
治疗组 A	9.67 $\pm$ 0.82 <sup>bd</sup>	7.80 $\pm$ 1.01 <sup>bd</sup>	10.13 $\pm$ 0.83 <sup>bd</sup>	12.13 $\pm$ 1.64 <sup>bd</sup>
治疗组 B	9.33 $\pm$ 0.82 <sup>bdf</sup>	10.07 $\pm$ 1.10 <sup>bdf</sup>	9.33 $\pm$ 0.62 <sup>bdf</sup>	5.87 $\pm$ 0.74 <sup>bdf</sup>

b 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; d 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; f 为  $P < 0.01$ , 与治疗组 A 比较。

### 2.2 基质金属蛋白酶 9 的表达

正常及假手术组均无 MMP-9 免疫反应。模型组及治疗组在术后 6 h 即出现棕黄色 MMP-9 阳性染色细胞, 可能来源于微血管内皮细胞、胶质细胞、中性粒细胞等。模型组在 24~48 h 达高峰, 以后逐渐下降(24 h 及 48 h MMP-9 阳性细胞数显著高于 6 及 96 h 的阳性细胞数,  $P < 0.05$ ; 且 24 与 48 h 比较差异无显著性,  $P > 0.05$ )。治疗组从 24 h 起 MMP-9 阳性细胞数明显少于模型组( $P < 0.01$ ), 且 A 和 B 两治疗组间存在负相关量效关系, 在 6~96 h, 相关方程为  $Y = 8.53 - 0.288X$  ( $Y$  代表细胞数,  $X$  代表治疗量,  $R^2 = 0.083$ ), 治疗量越大, 阳性细胞数越少(表 2)。

表 2. 各组大鼠脑出血后血肿周围脑组织中基质金属蛋白酶 9 的表达(阳性细胞数,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=15$ )

分 组	第 6 h	第 24 h	第 48 h	第 96 h
对照组	0			
假手术组	0	0	0	0
模型组	9.27 $\pm$ 1.28 <sup>b</sup>	12.40 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	11.40 $\pm$ 2.10 <sup>b</sup>	9.93 $\pm$ 1.67 <sup>b</sup>
治疗组 A	9.07 $\pm$ 1.39 <sup>d</sup>	8.47 $\pm$ 1.46 <sup>d</sup>	5.47 $\pm$ 0.52 <sup>d</sup>	4.27 $\pm$ 0.59 <sup>d</sup>
治疗组 B	8.47 $\pm$ 1.25 <sup>d</sup>	8.00 $\pm$ 0.76 <sup>d</sup>	3.00 $\pm$ 0.85 <sup>d</sup>	0.93 $\pm$ 0.88 <sup>d</sup>

b 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较; d 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; f 为  $P < 0.01$ , 与治疗组 A 比较。

## 2.3 血肿周围脑组织中血管内皮生长因子与基质金属蛋白酶 9 的相互关系

Pearson's 相关分析发现, 脑出血后 VEGF 表达与 MMP-9 表达呈正相关, 相关系数为 0.479 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

血管内皮生长因子又称血管通透因子, 是一种具有肝素活性的生长因子。因其特异性促进内皮细胞增殖, 参与血管生长, 并增加血管通透性, 在胚胎发育、伤口愈合、炎症、肿瘤和缺血缺氧等多种生理病理过程中均发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。多种细胞, 如巨噬细胞、成纤维细胞、胶质细胞、神经元、内皮细胞和肿瘤细胞等能表达 VEGF 且在正常人组织中 VEGF 呈低水平表达, 而在缺血性心肌细胞和肿瘤细胞中呈高水平表达。那么, VEGF 在缺血性脑组织中会有变化吗? Lennmyr F 等<sup>[5]</sup>发现 VEGF 在脑缺血周边区 24 h 达高峰, 持续到第 7 天, 表达细胞主要为小神经胶质细胞和巨噬细胞, 这提示脑组织缺血时 VEGF 的表达增加。同时发现脑组织含水量增加, 富含Ⅲ型胶原的脑血管床基膜的破坏, 提示 VEGF 在缺血早期有增加血脑屏障通透性的作用。由此推测 VEGF 与缺血再灌注后血脑屏障开放, 脑水肿形成有关, 引起缺血性脑损伤。在脑出血中 VEGF 是否具有损伤作用呢? 已知脑出血后血肿压迫周围脑组织和小血管, 组织细胞缺血缺氧, 理论上同样可激活血管内皮生长因子/抗血管内皮生长因子系统, 使 VEGF 的表达增加。本研究发现, VEGF 的表达水平在正常和假手术组中表达很少, 而在模型组出血后 VEGF 的表达明显增加, 在 24~96 h 达高峰。此结果与文献<sup>[5]</sup>的报道基本相符, 表明脑出血后 VEGF 参与了脑损伤的过程, 其中 VEGF 表达在 24~96 h

达高峰, 这一结果与脑组织出血后损伤、水肿及炎症反应最严重的时期相吻合, 进一步说明了 VEGF 在影响脑出血的病理生理过程中居重要地位。另外在出血后 24~96 h VEGF 的表达量与 MMP-9 的表达在 24~48 h 达高峰, 与脑含水量呈正相关, 提示其可能促进了出血后血管源性脑水肿的形成, 此结论与文献报道<sup>[6]</sup>有一致性。由此推测脑出血后 VEGF 表达增加可能作为媒介之一诱导了脑内 MMP-9 的表达, 从而影响到血脑屏障通透性和脑水肿的变化, 其确切内在作用机制目前尚不清楚, 可能为: VEGF 刺激内皮细胞产生基质降解蛋白酶类, 特别是 MMP-9, 降解微血管基底膜和细胞外基质, 破坏血管壁的完整性, 从而发生脑水肿和出血后的缺血。

七叶皂苷钠是三萜皂苷的钠盐, 是从中国药典收藏的中药婆罗子的干燥成熟果实中提取的, 具有消肿、抗炎等类激素样作用<sup>[7]</sup>。本研究同时采用七叶皂苷钠进行干预, 发现治疗组的 VEGF 表达明显受到抑制; 且存在一定的量效关系。由于 VEGF 与 MMP-9 关系密切, VEGF 在脑出血后继发性脑损伤中扮演了一个关键性的角色, 结合 MMP-9 在脑出血后血管源性脑水肿形成中所起的作用; 我们可推测七叶皂苷钠可能包括通过对 VEGF 表达的抑制在内的多种途径来稳定血脑屏障通透性、恢复毛细血管正常通透性、控制炎症, 发挥其抗脑出血后脑水肿的作用。

## [参考文献]

- [1] Heep A, Stoffel-Wagner B, Bartmann P, Benseler S, Schaller C, Groneck P, et al. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta are highly expressed in the cerebrospinal fluid of premature infants with posthemorrhagic hydrocephalus [J]. *Pediatr Res*, 2004, **56** (5): 768-774
- [2] Kimura R, Nakase H, Tamaki R, Sakaki T. Vascular endothelial growth factor antagonist reduces brain edema formation and venous infarction [J]. *Stroke*, 2005, **36** (6): 1 259-263
- [3] Rosenberg GA, Navratil MJ. (S)-emopamil reduces brain edema from collagenase induced hemorrhage in rats [J]. *Stroke*, 1994, **25** (10): 2 067-071
- [4] 王杰松, 芮耀城, 李铁军, 张黎, 邱彦, 杨鹏远. 血管内皮生长因子对内皮细胞产生基质金属蛋白酶 2 的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (7): 603-605
- [5] Lennmyr F, Terent A, Syvanen AC, Barbany C. Vascular endothelial growth factor gene expression in middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2005, **49** (4): 488-493
- [6] Koehne P, Hochhaus F, Felderhoff-Mueser U, Ring-Mrozik E, Obladen M, Burker C. Vascular endothelial growth factor and erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus [J]. *Childs Nerv Syst*, 2002, **18** (3-4): 137-141
- [7] 樊东升. 七叶皂苷钠的药与作用及其在神经科的临床应用[J]. *中华医学信息导报*, 2003, **6** (12): 19

(此文编辑 胡必利)