

血管内皮生长因子在动脉粥样硬化缺血性脑卒中模型大鼠脑组织中的表达

皇甫斌, 段虎斌, 刘跃亭, 夏添, 贾志亮

(山西医科大学第一医院神经外科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 缺血性脑卒中; 动脉粥样硬化; 血管内皮生长因子

[摘要] **目的** 探讨动脉粥样硬化基础上缺血性脑卒中模型大鼠脑组织中血管内皮生长因子表达规律及意义。**方法** 大鼠被随机分为对照组和模型组,后者制备动脉粥样硬化大鼠模型,然后再被分为动脉粥样硬化模型假手术组、动脉粥样硬化模型持续缺血 0.5、6、12、24 h 组,运用逆转录聚合酶链式反应技术检测血管内皮生长因子 mRNA 表达及免疫组织化学法检测血管内皮生长因子蛋白表达及变化。**结果** 各动脉粥样硬化模型组与对照组比较血管内皮生长因子表达有明显升高($P < 0.05$),各持续缺血组与假手术组比较血管内皮生长因子基因及蛋白表达均有明显升高($P < 0.05$),并随时间发生规律性变化,其中血管内皮生长因子的基因及其蛋白产物在持续缺血 6 h 组均达到峰值。**结论** 机体长期存在动脉粥样硬化基础病变对缺血性脑卒中脑组织血管内皮生长因子基因及其蛋白产物的表达有正向调控作用,缺血后可随时间变化。本实验结果可为动脉粥样硬化基础上缺血性脑卒中的发生、发展、治疗及预后估计提供一定的理论基础。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

The Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression after Cerebral Ischemia Stroke in Atherosclerotic Rats Model

HUANG FU-Bin, DUAN Hu-Bin, LIU Yue-Ting, XIA Tian, and JIA Zhi-Liang

(Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Cerebral Ischemia Stroke; Atherosclerosis; Vascular Endothelial Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression after cerebral ischemia stroke in atherosclerotic rats model. **Methods** Rats were randomly divided into control group and model group, and then the latter, established into the atherosclerotic rats model, were randomly divided into five groups: atherosclerosis (As)-sham, As rat model with sustained ischemia (As-SI) 0.5, 6, 12, 24 h. The cerebral tissues were analyzed with the level of VEGF mRNA by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the level of VEGF protein by immunohistochemical method. **Results** To compare each type of rat model groups with control, and compare four-time-points rat model groups with As-sham, the formers were significantly up-regulated ($P < 0.05$), and changed regularly with the four-time points, among which VEGF mRNA and its protein productions had reached the peak in As-SI 6 h group. **Conclusions** The present study showed that atherosclerotic disease had some positive effects on the expression of VEGF gene and its outcomes during cerebral ischemia stroke happened, and changed with the four-time points. Meanwhile, it had provided a theory to evaluate the occurrence, development, treatment and prognosis of cerebral ischemia stroke complicated by atherosclerotic disease.

缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke, CIS)是 脑卒中的常见类型,约占全部脑卒中的80%,为全

[收稿日期] 2011-09-05

[基金项目] 山西省自然科学基金青年科技研究基金项目(2010021034-4)

[作者简介] 皇甫斌,硕士研究生,医师,研究方向为颅内疾病的内窥镜治疗和功能神经外科,E-mail 为 huangpubin@163.com。段虎斌,硕士,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向为颅脑创伤、脑卒中基础与临床,E-mail 为 duanhubin@126.com。通讯作者刘跃亭,硕士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为颅内疾病的内窥镜治疗和功能神经外科,E-mail 为 13703514702@163.com。

球致残性疾病的主要病因以及第二大死亡原因。流行病学及动物实验等资料显示, CIS 存在多种危险因素, 如性别、年龄、高血压、心脏病、糖尿病、吸烟、高脂血症等^[1,2]。近年来的研究表明, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)已成为 CIS 发病的独立因素, 二者之间有密切相关性^[3]。由于其病理生理过程较单纯缺血性脑卒中更复杂, 机制尚不十分明了, 在临床上难以做到迅速、有效的诊断和治疗。研究表明, 在单纯缺血性脑卒中时, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达明显上调, 与缺血性脑卒中有相关关系^[4], 通过研究 VEGF 的表达规律与动脉粥样硬化、缺血性脑卒中三者的相关性, 可以对动脉粥样硬化基础上缺血性脑卒中的病理生理机制有更深入的了解, 更符合临床实际情况。本实验使用动脉粥样硬化基础上缺血性脑卒中大鼠模型对 VEGF 及其基因的表达及变化规律进行研究, 在国内外实验研究中尚未见到类似报道。本研究结果可为缺血性脑血管病基础研究、实验诊断等提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年雄性 Wistar 大鼠 48 只, 体重 250 ~ 280 g (购自山西医科大学实验动物中心), 按随机数字法分为对照组(Control)、模型组(共 40 只), As 模型建立后又随机分为 As 模型假手术组(As-sham)、As 模型持续缺血(As rat model with sustained ischemia, As-SI)0.5、6、12、24 h 组, 每组 8 只。丙基硫氧嘧啶购自上海朝晖药业有限公司, 批号: 080902; 猪胆盐购自苏州东吴医用生化制品厂, 批号: 0101; 胆固醇购自上海政翔化学试剂研究所(第二军医大学校办企业), 批号: 980106; 猪油为市售食用猪油。

1.2 模型建立

1.2.1 大鼠动脉粥样硬化模型建立 对照组给予基础饲料, As 模型组均给予高脂饲料(2% 胆固醇、0.2% 猪胆盐、0.2% 丙基硫氧嘧啶、10% 猪油、87.6% 基础饲料)喂养, 自由饮水, 定期给予瓜子、杂食等以增强抵抗力。喂食量为每只每天 30 ~ 40 g, 并观察饮水、体重、外观、活动, 整个试验周期为 6 个月^[5]。

1.2.2 动脉粥样硬化基础上缺血性脑卒中模型建立 参考 Takeshi 等^[6]方法制作双侧颈总动脉(2VO)结扎模型。实验前动物禁食 8 h, 自由饮水, 称重, 10% 水合氯醛 0.3 mL/kg 进行腹腔注射麻醉,

仰卧位, 固定, 沿颈中线切开, 分离出双侧颈总动脉。(1)对照组及 As 模型假手术组: 仅作双侧颈总动脉分离, 不结扎; (2)As 模型持续缺血组: 采用外科 3-0 尼龙线永久结扎双侧颈总动脉, 动物苏醒后进行神经病学评分, 判定手术是否成功。

1.3 神经病学评分

评分标准参照 Neurological Severity Scores (NSS) 评分法^[7]。(1)运动试验: 提尾试验 3 分; 置地行走试验 3 分; (2)感觉试验 2 分; (3)平衡木试验 6 分; (4)反射消失与异常运动 4 分。最高分 18 分。13 ~ 18 分: 严重损伤; 7 ~ 12 分: 中度损伤; 1 ~ 6 分: 轻度损伤。

1.4 逆转录聚合酶链式反应检测脑组织血管内皮生长因子 mRNA 表达

快速分离出脑组织置于冰台上, 取其前半部分组织约 150 mg, 按 Trizol 试剂盒说明书提取组织总 RNA; 应用 PrimerDesign 软件设计引物。VEGF 引物: 上游序列 5'-GCCCTGAGTCAAGAGGACAG-3', 下游序列 5'-CAGGCTCCTGATTCTTCCAG-3', 扩增片段长 170 bp; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物: 上游序列 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3', 下游序列 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGGA-3', 扩增片段长 307 bp。逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)的反应条件为 94°C 20 s, 56°C 20 s, 72°C 20 s, 反应 32 个循环。采用 2.5% 琼脂糖电泳观察聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)产物, 将电泳后的琼脂糖凝胶板置于图像系统处理分析, 获得目的基因和 GAPDH 的吸光度值, 以 GAPDH 的吸光度值作为内参照, 计算出目的基因与 GAPDH 基因之间的比值, 作为 VEGF mRNA 表达的水平。

1.5 免疫组织化学法检测脑组织血管内皮生长因子表达

将“1.4”项 RT-PCR 中剩余的后半部分脑组织浸入中性福尔马林中固定, 蜡块包埋。制作石蜡切片, 常规脱蜡至水, 抗原热修复, 正常山羊血清封闭。滴加适当比例稀释的一抗(按 1:200 稀释, 北京博奥森生物技术有限公司, bs-1313R), 4°C 湿盒过夜, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)漂洗, 滴加生物素化二抗工作液, 37°C 孵育, PBS 漂洗, 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37°C 孵育, PBS 漂洗, DAB 显色, 常规复染, 二甲苯透明, 封片。

1.6 图像分析

应用 Image-Pro-Plus 6.0 分析 RT-PCR 结果,

VEGF mRNA 表达水平均以平均灰度值表示。采用 MIAS-2000 图像分析系统进行定量分析,记录免疫组化结果中的平均光密度值。

1.7 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料结果以均数 \pm 标准差表示。采用单因素方差分析,满足方差分析条件时组间多重比较采用 LSD-t 法;如果不满足,则采用 Dunnett's T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠主动脉根部组织学改变

实验 6 个月后,大鼠主动脉根部 HE 染色显示,对照组血管内皮完整,中膜可见梭形平滑肌细胞,弹力纤维层结构清晰完整;模型组病变部位血管内皮明显增厚,连续性中断,脂质斑块形成,胆固醇结晶沉积,可见大量堆积的泡沫细胞,中膜平滑肌增厚,弹力纤维断裂,外膜变薄,出现典型 As 病理改变。由此表明,通过长期饲喂高脂饲料的方法可建立成熟大鼠 As 模型(图 1)。

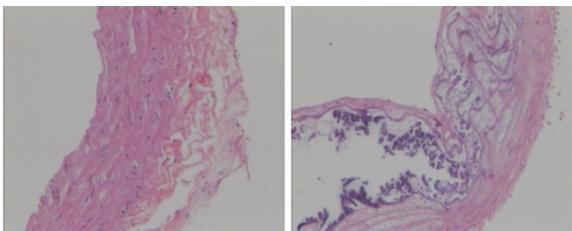


图 1. 大鼠主动脉根部(HE 染色, $\times 50$) 左为对照组,右为模型组。

Figure 1. The root of rat aorta(HE staining, $\times 50$)

2.2 逆转录聚合酶链式反应检测脑组织血管内皮生长因子 mRNA 的表达结果

各 As 模型组与对照组比较,VEGF mRNA 表达均有显著统计学差异($P < 0.05$),各 As 模型持续缺血组与 As 模型假手术组比较均有统计学差异($P < 0.05$),缺血不同时间点组间均有统计学差异($P < 0.05$)(表 1)。

2.3 免疫组织化学法检测脑组织血管内皮生长因子的表达结果

对照组大鼠脑组织 VEGF 免疫组化染色阳性颗粒在皮质和海马区仅有微量表达;各 As 模型组与对照组比较 VEGF 表达均有统计学差异($P < 0.05$);As-SI 0.5 h、6 h、12 h 组与 As-sham 组比较有显著统

计学差异($P < 0.05$),As-SI 24 h 组与 As-SI 0.5 h 组、As-SI 12 h 组比较未见明显统计学差异($P > 0.05$)。模型组阳性表达广泛分布于双侧大脑皮质、脑微血管周围及海马区细胞,阳性颗粒存在于细胞浆,也有少量存在于细胞核周围(表 2 和图 2)。

表 1. 动脉粥样硬化模型大鼠缺血性脑卒中后 VEGF mRNA 表达变化

Table 1. The change of VEGF mRNA expression after cerebral ischemia stroke in atherosclerotic rats model

分 组	n	VEGF mRNA 平均灰度值($\bar{x} \pm s$)
对照组	8	0.38 \pm 0.020
As-sham 组	8	0.46 \pm 0.027 ^a
As-SI 0.5 h 组	8	0.80 \pm 0.030 ^{ab}
As-SI 6 h 组	8	0.91 \pm 0.047 ^{abc}
As-SI 12 h 组	8	0.84 \pm 0.051 ^{abcd}
As-SI 24 h 组	8	0.72 \pm 0.053 ^{abcde}

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 As-sham 组比较;c 为 $P < 0.05$,与 As-SI 0.5 h 组比较;d 为 $P < 0.05$,与 As-SI 6 h 组比较;e 为 $P < 0.05$,与 As-SI 12 h 组比较。

表 2. 动脉粥样硬化模型大鼠缺血性脑卒中后 VEGF 蛋白表达变化

Table 2. The change of VEGF expression after cerebral ischemia stroke in atherosclerotic rats model

分 组	n	VEGF 蛋白平均光密度值($\bar{x} \pm s$)
对照组	8	0.14 \pm 0.009
As-sham 组	8	0.16 \pm 0.008 ^a
As-SI 0.5 h 组	8	0.22 \pm 0.030 ^{ab}
As-SI 6 h 组	8	0.35 \pm 0.043 ^{abc}
As-SI 12 h 组	8	0.29 \pm 0.002 ^{abcd}
As-SI 24 h 组	8	0.26 \pm 0.018 ^{abd}

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 As-sham 组比较;c 为 $P < 0.05$,与 As-SI 0.5 h 组比较;d 为 $P < 0.05$,与 As-SI 6 h 组比较。

3 讨 论

血管内皮生长因子是一类以游离形式广泛存在于机体各器官、组织的生物活性物质,在中枢神经系统中主要由星形胶质细胞产生和分泌,主要作用于血管内皮细胞,与其特异性受体共同参与正常或病理状态下血管的生长,内皮细胞存活和增殖,增加血管通透性、血管重建及神经元再生^[8,9]。目前认为动脉粥样硬化是一种炎症性疾病,由多种炎症细胞

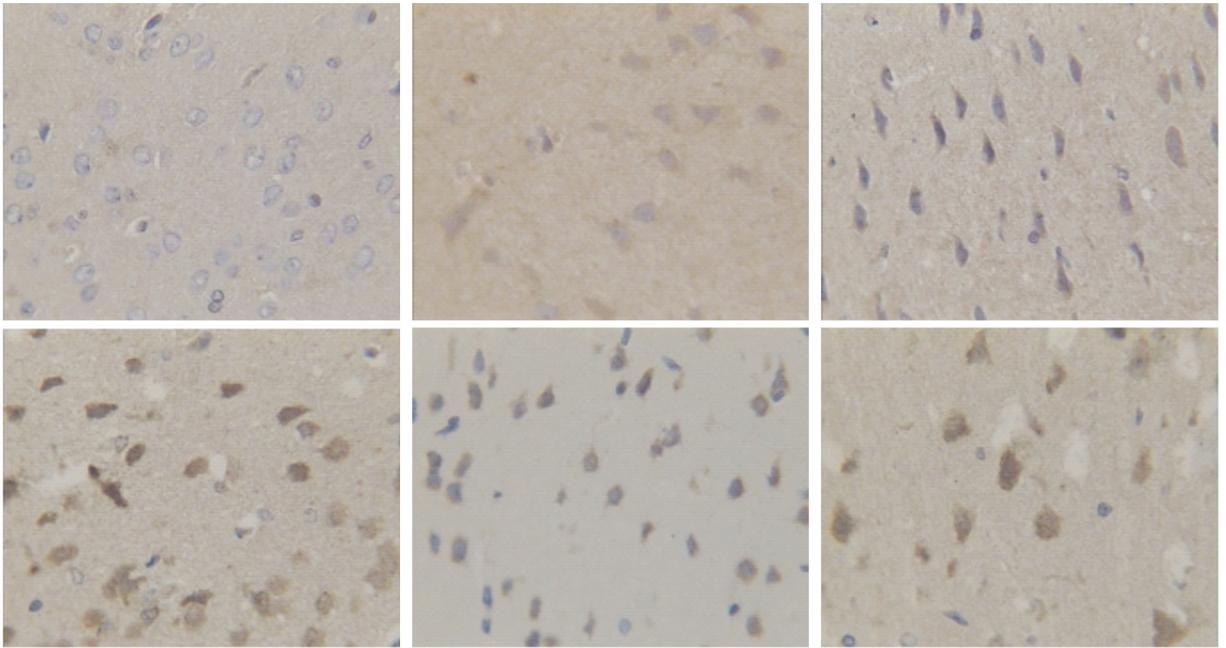


图 2. 大鼠脑组织 VEGF 免疫组织化学染色 ($\times 250$) 从左向右、从上到下分别为对照组、As 模型假手术组、As 模型持续缺血 0.5 h、6 h、12 h、24 h 组。

Figure 2. VEGF immunohistochemistry in rat brain

和炎症介质参与的复杂的病理生理反应。它们形成的炎症微环境对 VEGF 的表达都有显著影响并与炎症细胞共同参与炎症过程^[9-11]。在缺血性脑卒中急性期 VEGF 表达增高,其作用于血管内皮细胞后增加血管内皮细胞的通透性,同时协同炎症因子促使炎症细胞向缺血区域移动,并诱导新生血管向缺血缺氧区域生长,恢复该区域的供血^[4]。

本实验对动脉粥样硬化基础上缺血性脑组织 VEGF 的表达规律进行了初步研究,各 As 模型持续缺血组脑组织中的 VEGF mRNA 及蛋白含量均有明显增加,依据 As-SI 0.5 h、6 h、12 h、24 h 四组 VEGF mRNA 及蛋白含量的均值可以推断,在各时相上呈现规律性变化,即 0.5 h 开始升高,至 6 h 达到高峰,12、24 h 后下降但仍较基线水平高。结果显示,在 As 模型大鼠脑卒中急性期 VEGF mRNA 及蛋白含量表达明显增加,并随时间迁延而发生规律性变化。与 Pichiule P 研究小组^[4]的报道比较,VEGF mRNA 及蛋白含量峰值提前至发病后 6 h,这可能与动脉粥样硬化所形成全身炎症反应有关。长期的炎症反应以及缺血缺氧性损伤均可破坏血脑屏障,并引起星形胶质细胞及血管内皮细胞 VEGF 基因活跃表达。在动脉粥样硬化基础上发生缺血缺氧时 VEGF 基因的表达时间及水平较无炎症反应存在时表达时间更短、表达水平更高,这说明动脉粥样硬化对缺血性脑卒中时 VEGF 基因及其蛋白产物的表达有正向调控作用。

近年来,有人用 VEGF 蛋白治疗急性局部脑卒中模型大鼠,从组织学到行为学都有一定疗效,但 VEGF 蛋白治疗仍有许多缺陷,尚需进一步可行性研究。另外还有药物治疗,如白藜芦醇、胸腺素 α 、脂氧素 A 等,以及骨髓干细胞及 VEGF 基因修饰人骨髓间充质干细胞疗法、基因沉默疗法等^[12-15]。深入研究 VEGF 基因及其蛋白在急性缺血期和慢性期的表达规律,可为动脉粥样硬化基础上缺血性脑卒中的发生、发展、治疗及预后估计提供理论基础。

[参考文献]

- [1] Katsiki N, Ntaios G, Vemmos K. Stroke, obesity and gender: a review of the literature[J]. *Maturitas*, 2011, 69(3): 239-243.
- [2] Gan XM, Xu YH, Liu L, et al. Predicting the incidence risk of ischemic stroke in a hospital population of southern China: a classification tree analysis [J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2011, 306(1-2): 108-114.
- [3] Nicolaides AN, Kakkos SK, Kyriacou E, et al. Asymptomatic internal carotid artery stenosis and cerebrovascular risk stratification[J]. *Journal of Vascular Surgery*, 2010, 52(6): 1 486-496.
- [4] Pichiule P, Agani F, Chaves JC, et al. HIF-1 α and VEGF expression after transient global cerebral ischemia[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2003, 530: 611-617.
- [5] 郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 等. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(5): 465-469.
- [6] Matsuda T, Abe T, Wu JL, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α DNA induced angiogenesis in a rat cerebral ischemia model[J]. *Neural Res*, 2005, 27(5): 503-508.

- [7] Chen JL, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stem cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1 005-011.
- [8] Wang YQ, Cui HR, Yang SZ, et al. VEGF enhance cortical newborn neurons and their neurite development in adult rat brain after cerebral ischemia [J]. *Neurochemistry International*, 2009, 55(7): 629-636.
- [9] Akesson A, Herman A, Wiginton D, et al. Endothelial cell activation in a VEGF-A gradient: Relevance to cell fate decisions[J]. *Microvascular Research*, 2010, 80(1): 65-74.
- [10] Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 317-325.
- [11] Chakrabarti S, Rizvi M, Morin K, et al. The role of CD40L and VEGF in the modulation of angiogenesis and inflammation[J]. *Vascular Pharmacology*, 2010, 53(3-4): 130-137.
- [12] Ye XH, Wub Y, Guo PP, et al. Lipoxin A4 analogue protects brain and reduces inflammation in a rat model of focal cerebral ischemia reperfusion[J]. *Brain Research*, 2010, 1323: 174-183.
- [13] Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Álvarez-Grech J, et al. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats[J]. *Neuroscience*, 2011, 175: 394-405.
- [14] Fasanaro P, Greco S, Ivan M, et al. microRNA: Emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2010, 125(1): 92-104.
- [15] 陈样新, 罗年桑, 王晓俏, 等. 脂氧素 A4 抑制单核巨噬细胞源性树突状细胞的分化及成熟[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(5): 409-412.
- (此文编辑 曾学清)