

大鼠脑缺血再灌注后血清中血管内皮生长因子与神经元凋亡的研究

纳冬梅¹ 孙 强² 曹 坪¹ 张 宏¹ 徐 波¹

(1 深圳市蛇口人民医院神经科 广东 深圳 518052 ; 2 深圳市第六人民医院 广东 深圳 518052)

摘要 目的:通过检测 SD 大鼠脑缺血再灌注模型血清中血管内皮生长因子(VEGF)与神经元凋亡动态表达变化的关系,以探讨两者之间的相关性。方法:将 40 只大鼠随机分为 8 组:对照组、假手术组和脑缺血 30 min 再灌注 12 h 组、1d 组、3 d 组、5d 组、7d 组、及 14 d 组,每组 5 只。采用 ELISA 双抗夹心法检测大鼠血清中血管内皮生长因子、原位细胞凋亡 TUNEL 法检测脑组织中的凋亡神经细胞数。结果:再灌注 12h、1d、3 d、5d、7d 及 14 d 大鼠血清 VEGF 表达和凋亡神经元百分比的变化均为负相关性(均为 $P<0.05$)。结论:在脑缺血再灌注大鼠模型中,缺血诱导使 VEGF 的表达发生变化,VEGF 通过直接或间接的途径抑制神经元凋亡。

关键词 血管内皮生长因子;凋亡;脑缺血;大鼠

中图分类号:Q95-3 R743 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)10-1847-04

Relation Between Vascular Endothelial Growth Factor in Sera and Neuronal Apoptosis after Cerebral Ischemic Reperfusion in Rats

NA Dong-mei¹, SUN Qiang², CAO Ping¹, ZHANG Hong¹, XU Bo¹

(1 The department of neurosurgery of Shenzhen shekou people's hospital, Shen zhen, Guang dong, 518052 ;

2 The department of neurosurgery of Shenzhen sixth people's hospital Shen zhen, Guang dong, 518052)

ABSTRACT Objective: To investigate the interrelation ship between the dynamic changes of VEGF and neuronal apoptosis after Cerebral Ischemic Reperfusion in SD Rats. **Methods:** A total of forty SD rats were randomly divided into eight different groups ($n=5$): controls group, sham-operation group, cerebral ischemia for 30 min and reperfusion for 12 hour (I/R12h group), 1 day (I/R1d group), 3 day (I/R3d group), 5 day (I/R5d group), 7 day (I/R7d group), and 14 day (I/R14d group). By using ELISA method the VEGF were measured, the apoptosis of neurons was examined by TUNEL. **Results:** The expression of VEGF has a negative correlation ($P<0.05$) with neurons apoptosis reperfusion for 12hour, 1day, 3 day, 5day, 7day and 14day after Cerebral Ischemic Reperfusion. **Conclusions:** VEGF mediated by cerebral ischemia inhibits the apoptosis of neurons in rats after cerebral ischemic reperfusion.

Key words: R245 vascular endothelial growth factor; apoptosis; cerebral ischemia; rat

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)10-1847-04

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是在胚胎发生和创伤愈合过程中启动血管形成的一个高度特异的有丝分裂原,最近有研究^[1]表明它具有神经保护作用,但 VEGF 对神经保护的确切机制及最佳时间窗尚无定论,本研究通过建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型,动态检测缺血再灌注后不同时间点 VEGF 的浓度与神经元凋亡的变化,为缺血性脑血管病的临床研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD(Sprague Dawley)大鼠(购自中山大学动物实验中心,合格证号 2004A089)40 只,鼠龄 3-4 个月,体质量 (220-260)g,不分雌雄,随机分为 8 组:对照组、假手术组、模型组各 5 组缺血(ischemia, I) 30 min,分别再灌注(perfusion, R)

12h (I/R12h 组)、1d(I/R1d 组)、3 d(I/R3d 组)、5d(I/R5d 组)、7d(I/R7d 组)、及 14 d(I/R14d 组),每组 5 只。

1.2 实验方法

1.2.1 模型的制备 参照文献^[2]。手术动物术前 12h 禁食,自由饮水,麻醉,颈部正中切口,分离并结扎右侧颈外动脉,仔细分离颈内动脉,不结扎翼颞突动脉,颈内动脉远端放置微型动脉夹,在颈外动脉靠近分叉处以头皮针穿刺的方式导入端口打磨光滑,头端涂有硅油的尼龙线(标准直径 0.235mm),去掉动脉夹,在直视情况下缓慢推进尼龙线至其入颅,线栓至有阻力时(入颅长度为 1.85 ± 0.05 cm),将渔线连同颈总动脉一起结扎,缺血 30 min,造模成功标准为:右侧出现 Honer 征,苏醒后出现左前肢屈曲、内收,左侧转圈,或向左侧倾倒。造模成功的大鼠放开颈外动脉扎线,将留在外的线栓拔出 1cm,使得大脑中动脉得以再通。假手术组:只是暴露颈内动脉,不进行插线。各组动物术中均用白炽灯照射使其肛温维持在 $(37.0\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 左右,术后单笼饲养。对照组:不给予任何处理。

1.2.2 抽取血清及制作脑组织切片法 各组大鼠在规定时间内

作者简介 纳冬梅(1963-),女,硕士,研究方向:神经内科脑血管

疾病方向 电话:0755-26866176

(收稿日期 2011-02-02 接受日期 2011-02-26)

内, 3.6%水合氯醛(1 mL/100g)腹腔注射麻醉各组大鼠后, 仰卧固定, 剪开肋骨, 暴露胸腔, 用 5 mL 注射器左心室抽取血液 2mL, 置于真空采血管(不加抗凝剂)中, 室温下静置 30 min 后, 1 000 r / min 离心 20 min, 取上清液 0.5 mL, 移入消毒并硅化的 0.5 mL Ep 管中, 置于 -80℃ 冰箱中保存; 后断头取缺血侧脑组织, 假手术组和对照组在相应位置取材。将切好的脑片固定于同一固定液中 4h, 常规脱水, 透明, 浸蜡和石蜡包埋。每个蜡块切 25 片张切片 (厚 4μm), 隔 4 张取 1 张, 共取 5 张切片待用。

1.2.3 检测方法

1.2.3.1 ELISA 法检测 VEGF 试剂盒购自上海丰翔生物 血清标本于室温下待测, 将标准品定比稀释, 充分混匀, 酶标板的各孔依次编号, 将 VEGF 单克隆抗体包被酶标板, 每孔加入 50μL 样本稀释液, 再加入标准品和待测标本 50μL, 所有标本均设双孔检测, 以稀释液作为空白对照, 严格按照说明书操作, 加终止液后 15 分钟内, 450nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值), 以 VEGF 标准品质量浓度为横坐标, 相应的光密度值为纵坐标作图, 根据待测酶标仪测定的标本的光密度值在直线上算出相应的 VEGF 质量浓度。

1.2.3.2 TUNEL 法检测凋亡细胞 TUNEL 凋亡检测试剂盒为美国 ROCHE 公司产品, 实验步骤严格按说明书操作。光学显微镜(400 倍)下观察结果, 细胞核中有棕黄色颗粒者即为凋亡

细胞, 计算凋亡百分比, 每张切片随机取 4 个视野。
1.2.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计学软件对数据进行分析, 实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$ 表示), 不同时间点凋亡神经元百分比和血清中的 VEGF 质量浓度的总体比较采用双因素方差分析, 组间的两两比较采用 SNK-q 检验, 各组凋亡神经元百分比与血清 VEGF 质量浓度的相关分析及其与再灌注时间的关系采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF 与凋亡神经元的检测结果

对照组、假手术组血清中 VEGF 差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), VEGF 在再灌注 12h 较对照组明显增高 ($P < 0.05$), 持续至 7d 达到峰值, 14d 组中下降, 较 7d 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 对照组、假手术组凋亡神经元百分比差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 在再灌注 12h 后凋亡神经元百分比 ((3.5 ± 0.58)%) 较对照组、假手术组差异没有统计学意义 ($P > 0.05$), 1d 组凋亡神经元百分比升高 (达峰值 $(22.6 \pm 2.97)\%$), 较假手术组有统计学意义 ($P < 0.05$), 此后凋亡神经元百分比开始持续减少 (到 14d 达到 $(7.2 \pm 1.48)\%$), 较上个时间点均为 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。(见表 1)。

表 1 再灌注组不同时间点 VEGF 表达与凋亡神经元百分比的变化($n=5, \bar{x} \pm s$)
Table 1 Changes of the VEGF expression and percent of TUNEL-positive cells after ischemic-reperfusion($n=5, \bar{x} \pm s$)

Group	VEGF(pg/ml)	F value	P value	Apoptotic nerve %	F value	P value
Control	48.4± 1.74	***696	***0.00006	2.9± 0.74	#0.68	#0.43
Shamoperation	49.8± 2.39	*95.5	*0.0003	3.3± 0.83	###196	###0.00057
I/R12h group	65.8± 2.77	**141	**0.0006	3.5± 0.58	**2.15	**0.18
I/R1d group	66.6± 3.65	**101	**0.0005	22.6± 2.97	**207	**0.0005
I/R3d group	78.4± 2.7	**436	**0.00009	20.8± 2.49	**237	**0.0004
I/R5d group	80.2± 5.8	**138	**0.0007	16± 4.00	##5.19	##0.052
I/R7d group	85.2± 2.59	#505	#0.00008	13.1± 2.19	##27	##0.01
I/R14d group	77.2± 3.27	***18.4	***0.003	7.2± 1.48	###110	###0.0008

*:Compared with I/R12h group, **:compared with control group, ***:compared withI/R7d group , #:Compared with shamoperationgroup, ##:compared withI/R3d group, ###:compared withI/R1d group

2.2 各组血清 VEGF 表达和凋亡神经元百分比的相关性分析

再灌注 12h、1d、3 d、5d、7d 及 14 d 大鼠血清 VEGF 表达和凋亡神经元百分比的变化均有负相关性 (均为 $P < 0.05$) : 12h 组 VEGF 与细胞凋亡相关度为 $P=0.015$ ($r = -0.946$) ; 1d 组 VEGF 与细胞凋亡的相关度为 $P=0.016$ ($r = -0.943$) ; I/R3d 组 VEGF 与细胞凋亡的相关度为 $P=0.013$ ($r = -0.951$) ; 5d 组 VEGF 与细胞凋亡的相关度为 $P=0.024$ ($r = -0.926$) ; 7d 组 VEGF 与细胞凋亡的相关度为 $P=0.012$ ($r = -0.952$) ; 14d 组 VEGF 与细胞凋亡的相关度为 $P=0.018$ ($r = -0.938$) (见图 1-6)。

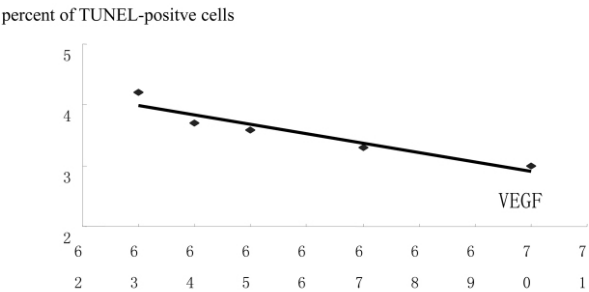
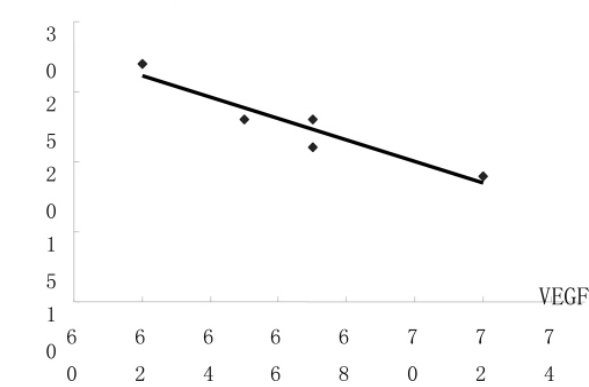
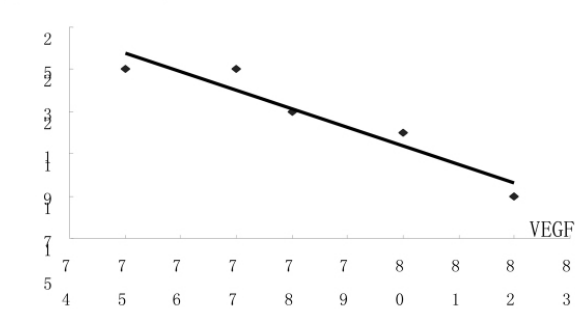


图 1 I/R12h 组 VEGF 与细胞凋亡的相关性分析($r = -0.946, P=0.015$)
Fig.1 The correlation of VEGF level in serum and cells apoptosis of I/R12h group ($r = -0.946, P=0.015$)

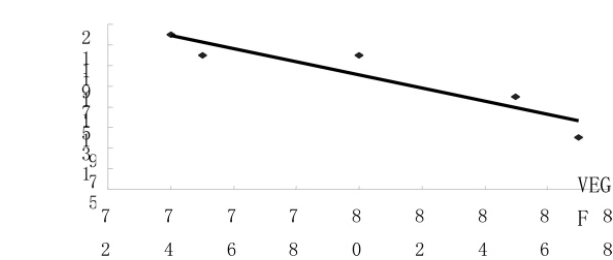
percent of TUNEL-positive cells

图2 I/R1d组 VEGF与细胞凋亡的相关性分析($r = -0.943, P = 0.016$)Fig.2 The correlation of VEGF level in serum and cells apoptosis of I/R1d group ($r = -0.943, P = 0.016$)

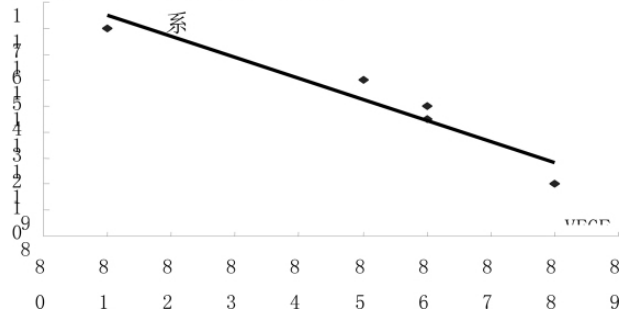
percent of TUNEL-positive cells

图3 I/R3d组 VEGF与细胞凋亡的相关性分析($r = -0.951, P = 0.013$)Fig.3 The correlation of VEGF level in serum and cells apoptosis of I/R3d group ($r = -0.951, P = 0.013$)

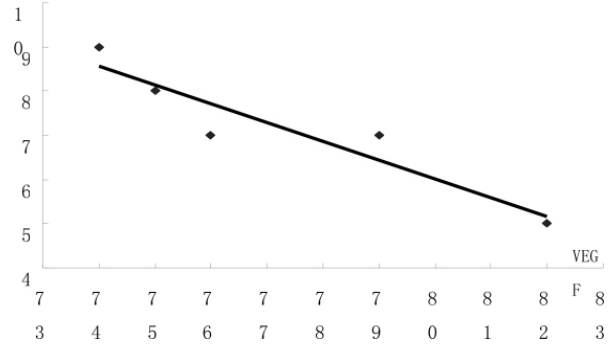
percent of TUNEL-positive cells

图4 I/R5d组 VEGF与细胞凋亡的相关性分析($r = -0.926, P = 0.024$)Fig.4 The correlation of VEGF level in serum and cells apoptosis of I/R5d group ($r = -0.926, P = 0.024$)

percent of TUNEL-positive cells

图5 I/R7d组 VEGF与细胞凋亡的相关性分析($r = -0.952, P = 0.012$)Fig.5 The correlation of VEGF level in serum and cells apoptosis of I/R7d group ($r = -0.952, P = 0.012$)

percent of TUNEL-positive cells

图6 I/R14d组 VEGF与细胞凋亡的相关性分析($r = -0.938, P = 0.018$)Fig.6 The correlation of VEGF level in serum and cells apoptosis of I/R14d group ($r = -0.938, P = 0.018$)

3 讨论

缺血性脑中风是目前严重威胁人类健康的疾病之一,其发病率及致死率相当高,尽管近十几年来对脑缺血机制进行了大量研究,但因其机制极为复杂,缺乏有效的干预手段,故预后极差。血管内皮生长因子又称血管渗透因子,是一类促进血管再生,增加血管通透性的细胞因子,VEGF的表达受许多因素的调控,缺血或低氧是诱导 VEGF 表达的最主要的因素^[3],研究^[4-6]表明脑缺血后,VEGF 不仅通过促进血管内皮细胞增殖和迁移参与血管生成,其在神经保护和神经发生等方面也发挥了重要作用。本研究针对缺血性脑中风而制作了大鼠的脑缺血再灌注模型,探讨血管内皮生长因子在缺血再灌注中的神经保护作用。

本研究检测 VEGF 的结果显示:对照组、假手术组血清中 VEGF 差异没有统计学意义($P > 0.05$),所有大鼠缺血再灌注后血清 VEGF 含量均较对照组增高,在再灌注 12h 较对照组即明显增高($P < 0.05$),持续至 7d 达到峰值,14d 组中下降,较 7d 组差异有统计学意义($P < 0.05$),据此认为由于防御和应激反应触发或启动 VEGF 的产生,而再灌注后血清中 VEGF 的异常升高主要来自于脑缺血后脑组织组织释放 VEGF 到血清中,而非源自其他组织,VEGF 的变化随着再灌注时间呈动态变化则表明侧支循环的建立,脑血供得到改善后 VEGF 的产生逐渐减少。凋亡神经元的检测结果为:对照组、假手术组凋亡神经元百分比差异没有统计学意义($P > 0.05$),在再灌注 12h 后凋亡神经元百分比比较对照组、假手术组差异没有统计学意义($P > 0.05$),1d 组凋亡神经元百分比升高,较假手术组有统计学意义($P < 0.05$),此后凋亡神经元百分比开始持续降低,由于脑缺血后神经元的凋亡发生是一个多环节调控过程,而神经元凋亡是脑缺血再灌注后迟发性神经元死亡的基本形式,本实验结果结合 Abbatea^[7-9]等的研究结果认为:在缺血性脑损伤半暗带低氧区的早期,低氧激活低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的表达,激活的 HIF-1 α 诱导 VEGF 及其受体水平表达增加,可对神经元产生直接保护作用,从而减少缺血缺氧对神经元的损害;VEGF 与其受体结合后,促使微血管内皮细胞增殖、迁移,促使新血管生成,改善局部血供,并保护内皮细胞不发生程序性死亡,通过直接或间接抑制神经细胞凋亡而保护神经元。

本研究对再灌注组不同时间点 VEGF 表达与凋亡神经元

百分比变化做了相关性分析后表明:再灌注 12h、1d、3 d、5d、7d 及 14 d 大鼠血清 VEGF 表达和凋亡神经元百分比的变化均呈负相关关系($P < 0.05$),脑缺血后 VEGF 表达的增加可能是一种代偿性保护机制,另外有研究证实,VEGF 还可刺激轴索生长,减少缺氧和兴奋性氨基酸所诱导的神经元死亡等直接促神经发生和保护神经元^[10-13]。

本研究中但值得注意的是:VEGF 值在再灌注 12 h 时显著提高,说明这可能是微循环重建的一个关键时期,有利于新生血管的形成,从而对改善缺血组织微循环,恢复缺血神经元的血供有重要意义;再灌注 12 h 凋亡神经元还没检测到有显著的变化($P > 0.05$),估计由于凋亡的程序性和检测手段的原因,致使检测到的结果具有滞后性,在 1 天后,已经造成显著性神经元凋亡($P < 0.05$),VEGF 对神经元的直接和间接的保护作用是值得肯定的,但是在缺乏外源性干预的情况下,内源性 VEGF 的启动需要复杂的程序与时间,而且含量相对于机体的需要极为有限,所以在缺血再灌注 1 天内开始及时、持续应用外源性 VEGF 来增加再灌注损伤过程中 VEGF 的浓度,从而改善缺血组织微循环,减轻神经元损伤程度,以直接或间接的途径促进神经元修复,可以最大程度的减少脑损伤,但 VEGF 抑制神经元凋亡的相关机制、应用外源性 VEGF 的给药方式、途径及达到梗死灶的最佳时间窗有待进一步深入研究确定。

参考文献(References)

- [1] Obrenovitch TP. Molecular physiology of preconditioning-Induced brain tolerance to ischemia[J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(1): 211-247
- [2] 张荣媛,张宏伟,尚爱加.大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型制备及行为学评价标准的改进[J].*军医进修学院学报*,2008,10, 29(5):422-423
Zhang Rong-yuan,Zhang Hong-wei,Shang ai-jia.Development of the middle cerebral artery occlusion model and behavioral assessment improvement [J].*Academic Journal of PLA Postgraduate Medical School*, 2008,10, 29(5):422-423
- [3] TIYYAGURA S R, HONEY S P. Left ventricular remodeling after

myocardial infarction: past, present, and future [J]. *Mt Sinai J Med*, 2006 (6):840-851

- [4] Rosenstein JM, Mani N, Khaibulina A, et al. Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor on organotypic cortical explants and primary cortical neuron. *Neurosci*, 2003, 23(25): 11036-11044
- [5] 戴睿,曾秋棠,吴辉文.法舒地尔对急性心肌梗死大鼠心肌的保护作用[J].*临床心血管病杂志*,2008,24(7):537-539
Dai Rui,Zeng Qiu-tang,Wu Hui-wen.Fasudil protects the myocardium in rats with acute myocardial infarction [J]. *Journal of Clinical Cardiology*,2008,24(7):537-539
- [6] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*, 2003, 111(12): 1843-1851
- [7] Abbate A, Salloum F N, Vecellio E, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin 1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2008, 117(20):2670-2683
- [8] Manoonkitiwongsa PS, Schultz RL, McCreery DB, et al. Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(6): 693-702
- [9] Tisdall MM, Smith M. Cerebral microdialysis: research technique or clinical tool[J]. *Br J of Anaesthesia*, 2006, 97(1):18-25
- [10] Hillered L, Vespa PM, Hovda DA. Translational neurochemical research in acute human brain injury: the current status and potential future for cerebral microdialysis[J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(1):3-41
- [11] Singhal A, Baker AJ, Hare GMT, et al. Association between cerebrospinal fluid interleukin-6 concentrations and outcome after severe human traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma*, 2002, 19(8): 929-937
- [12] Kalablikis P, Papazoglou K, Gouriots D, et al. Correlation between serum IL-6 and CRP levels and severity of head injury in children[J]. *Intensive Care Med*, 1999, 25(3): 288-292
- [13] Hattori K, Lee H, Hum PD, et al. Cognitive deficits after focal cerebral ischemia in mice[J]. *Stroke*, 2000, 31 : 1939-1944

(上接第 1846 页)

- [12] Togel F, Weiss K, Yang Y, et al. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury [J]. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 2007, 292: F1626-1635
- [13] Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature Ovarian failure[J]. *Obstet Gynecol*, 1986, 67:604-606
- [14] Kalantaridou SN, Davis SR and Nelson LM. Premature ovarian failure[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1998, 27:989-1006
- [15] Taylor AE. Systemic adversities of ovarian failure [J]. *Soc Gynecol Investig*, 2001, 8:S7-S9
- [16] Groff A A, Covington S N, Halverson L R, et al. Assessing the emotional needs of women with spontaneous premature ovarian failure[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(6):1734-1741
- [17] Compston JE. Sex steroids and bone [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 419-447
- [18] Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, et al. Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer's disease in older women: the Cache County Study[J]. *JAMA*, 2002, 288:2123-2129
- [19] Liu Y, Ding J, Bush TL, et al. Relative androgen excess and increased cardiovascular risk after menopause: a hypothesized relation[J]. *Am J Epidemiol* 2001, 154:489-494
- [20] Ovarian cancer. Atlanta: American Cancer Society, 2006 (<http://documents.cancer.org/114.00/114.00.pdf>)
- [21] Dawn B, Bolli R. Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment [J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100:494-503
- [22] Zangi L, Margalit R, Reich ZS, et al. Direct imaging of immune rejection and memory induction by allogeneic mesenchymal stromal cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(11):2865-2874
- [23] Anonymous. 4-Vinylcyclohexene [J]. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 1994, 60:347-359
- [24] Chan K, Lu R, Chang JC, et al. NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 13943-13948