

VEGF 对大鼠脑缺血再灌注损伤的预防作用及其机制研究 *

蒋 易¹ 沈桢巍¹ 雷 撼² 马少林¹ 白建文^{3△}

(1 同济大学附属东方医院重症医学科 上海 200120 ;

2 同济大学附属东方医院呼吸内科 上海 200120 3 同济大学附属东方医院急诊内科 上海 200120)

摘要 目的:研究局灶性脑缺血再灌注后细胞凋亡、HSP70 蛋白表达时空规律以及外源 VEGF 及 VEGF 抗体对它们的影响,探讨 VEGF 对缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。方法 采用原位末端标记 (TUNEL)、免疫组化方法 研究局灶性脑缺血再灌注后细胞凋亡数及 HSP70 蛋白表达时空分布,采用脑表面使用 VEGF 及侧脑室注射 VEGF 抗体,观察内外源 VEGF 对它们的影响。结果:VEGF 抗体能显著增加缺血侧脑组织凋亡细胞数(再灌注 12h-7d)及 HSP70 表达量(再灌注 1-3d),而外源 VEGF 因子能显著减少同侧脑组织凋亡细胞(再灌注全程)及 HSP70 表达量(再灌注 1-3d)。结论:VEGF 因子可抑制缺血脑组织细胞凋亡及 HSP70 表达量,提示 VEGF 参与保护缺血性脑损伤。

关键词 血管内皮生长因子 热休克蛋白 70 脑缺血再灌注损伤

中图分类号 Q95-3 R743 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)27-5251-04

The Neuroprotective Effect of VEGF on Ischemia-Reperfusion Cerebral Injury in Rats*

JIANG Yi¹, SHEN Zhen-wei¹, LEI Han², MA Shao-lin¹, BAI Jian-wen^{3△}

(1 Department of The Intensive Care Unit, East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China

2 Department of Respiratory Medicine, East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China

3 Department of Emergency Medicine, East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China)

ABSTRACT Objective: To explore the implications of HSP70 and apoptosis in rat brain following ischemia-reperfusion and to study the neuroprotective effect of VEGF on ischemia-reperfusion cerebral injury in rats. **Methods:** HSP70 protein and apoptosis cells were detected by immunohistochemistry and TUNEL methods in ischemia-reperfusion rat brain. Simultaneously, the effect of exogenous VEGF protein and VEGF antibody was observed. **Results:** TUNEL and immunohistochemical analysis for HSP70 showed an amelioration of stainings at 24 and 72 hours after reperfusion with VEGF treatment, which indicated reduction of neuronal damage. On the contrary, application of VEGF antibody produced reverse results as compared with cases with VEGF treatment after reperfusion. **Conclusion:** Treatment with topical VEGF application significantly reduced ischemic brain damage, while antagonism of VEGF enhanced ischemic-reperfusion-related brain injury.

Key words: VEGF; TUNEL; HSP-70; Cerebral ischemia-reperfusion injury

Chinese Library Classification: Q95-3, R743 **Document code :** A

Article ID: 1673-6273(2012)27-5251-04

前言

大量研究表明,VEGF 及其家族成员能特异地促进血管内皮细胞的分裂、增殖及迁移,从而有效地促进缺血组织侧支循环地建立,VEGF 可能在缺血再灌注脑损伤中发挥明显保护作用,其保护机制有待深入探讨。本研究拟采用颅内应用 VEGF 抗体及重组 VEGF 因子的方法,通过免疫组化、TUNEL 法及计算机分析系统,分别观察两者对大鼠缺血再灌注脑组织凋亡细胞数、热休克蛋白 70(HSP70)表达量及梗死体积的影响,以求探讨 VEGF 保护缺血性脑损伤的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康成年 SD 大鼠,体重(250±30)g,雄性(由复旦大学上海医学院实验动物中心提供)。按随机分组原则分成:正常组、假手术组、缺血再灌注组,缺血再灌注组根据不同时程分为缺血 90 min 再灌注 0 h、12 h、1 d、3 d、7 d 组,并根据干预方法不同又分为 VEGF 抗体组和 VEGF 因子组,前者设免疫对照组(免 IgG),后者设生理盐水对照组。每组各 10 只大鼠(其中 2 只用于测梗死体积)。

1.2 dMCAO 局灶性脑缺血模型的制备

SD 大鼠,250±30 g,雄性,周龄为 11-12 周,5%氟烷(Isoflurane)诱导麻醉,1-2%氟烷(Isoflurane)维持麻醉,压缩空

* 基金项目 浦东新区社发局课题(PW2005A-10)

作者简介 蒋易(1977-)男,主治医师,医学硕士,主要研究方向:重症患者缺血器官再灌注损伤机制及再灌注保护研究

△通讯作者:白建文(1960-)女,主任医师,医学博士 E-mail: jiangyidffy@126.com

(收稿日期 2012-05-07 接受日期 2012-05-31)

气与氧气的比例为 80/20。参照改良 Zea Longa 方法^[1,2]。颈部正中切口,分离双侧颈总动脉,穿线待用。动物置右侧卧位,于左耳与左眼间做一横切口,切开并分离颞部肌肉,高速钻头磨去大部分颞骨,咬骨钳打开骨窗约 2 mm²,暴露脑膜,挑开脑膜,暴露 MCA,动物置仰卧位,微血管夹夹闭双侧 CCA,动物置右侧卧位,25 mA 电流电凝 MCA,微血管剪剪断 MCA。止血缝合颞部肌肉,皮肤。半小时后放开 CCA 血管夹,即制作成功 dMCAO 局灶性脑缺血模型。

1.3 给药方法

VEGF 抗体(北京邦定,进口分装)采用侧脑室注射法。时间为缺血后 15 min(即再灌注前 75 min),免 VEGF IgG 多抗剂量为 1 μg,溶于生理盐水 10 μL,对照组使用含等量免 IgG 的生理盐水 10 μL,侧脑室注射方法如下:完成 MCAO 手术后,将麻醉大鼠固定在脑立体定位仪上,以前囟后 0.8mm,中线旁 1.4 mm,硬膜下 4.0 mm 为注射点,10μL 微量注射器垂直向下注射,注射持续时间为 1 h。VEGF 因子(Sigma)在缺血后 15 min 于缺血侧 MCA 供血区脑表面给药,其步骤参考 Hayashill^[8]法。

1.4 细胞凋亡检测

细胞凋亡检测试剂盒购自上海前尘生物科技有限公司,细胞凋亡检测操作按说明书进行。切片常规脱蜡,标本片加 TBS 1:200 新鲜稀释 Proteinase K 37℃ 消化 10 min, TBS 洗涤 2 min×3 次,37℃ 标记 2 h,用封闭液 1:100 稀释生物素化抗地高辛抗体,50μL/片加至标本片上,置样品于湿盒中,37℃ 反应 30min, TBS 洗 2min×3 次,再用封闭液 1:100 稀释 SABC(不能用封闭液稀释),取 1 mL 封闭液加 SABC 10 μL,混匀后加至切片,37℃ 反应 30 min, TBS 洗 5 min×4 次, DAB 显色,水洗,苏木素轻度复染, TBS 洗,蒸馏水洗,脱水,透明,封片,显微镜观

察。

1.5 HSP70 免疫组化染色

采用 SABC 法,试剂盒购自上海前尘生物科技有限公司。石蜡切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢 37℃ 孵育 10 min,蒸馏水洗 3 次;正常山羊血清封闭液室温 20 min;一级抗体兔抗鼠 HSP70 单抗 (Sigma, 1:200)4℃ 过夜,0.1M PBS 洗涤 2 min×3 次;生物素化山羊抗小鼠 IgG 抗体, SABC 37℃ 20 min,0.1M PBS 洗涤 5 min×4 次, DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜观察。阴性对照以 PBS 替代一抗,其余操作步骤不变。

1.6 统计学分析

所得数据资料以($\bar{x} \pm S$)表示,采用 SAS 统计软件包分析数据(组内各时间点比较用方差分析,组间同一时间点比较用配对 t 检验),以 P<0.05 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 凋亡细胞检测结果

正常组、假手术组及缺血再灌注各组缺血侧脑组织未检测到凋亡细胞,缺血 90 min(再灌注 0 h)缺血侧脑组织可检测到少量凋亡细胞,再灌注 12 h 凋亡细胞明显增多(P<0.05),至再灌注 3 d 达峰值(P<0.01),再灌注 7 d 已明显减少(P<0.05)。VEGF 抗体在缺血再灌注 12 h-3 d 能显著增加缺血侧脑组织凋亡细胞数(与同一时程的免疫对照组比较,P<0.05 或 P<0.01); VEGF 因子在缺血 90min 再灌注全程均显著减少同侧脑组织凋亡细胞(与同一时程的生理盐水组比较,P<0.05 或 P<0.01)(见表 1)。

表 1 大鼠缺血侧皮层凋亡细胞计数结果

Table 1 The counting results of rats cortical apoptosis cell after unilateral

	VEGF 抗体处理后凋亡细胞数		VEGF 因子处理后凋亡细胞数	
	The number of apoptotic cells after treatment with VEGF antibody		The number of apoptotic cells after treatment with VEGF factor	
	IgG	VEGF 抗体 VEGF antibody	生理盐水 Physiological saline	VEGF 抗体 VEGF antibody
R0h	23.7± 1.25	26.8± 3.32	24.4± 4.56	22.8± 2.65
R12h	32.6± 7.95a	41.8± 5.32c	32.8± 3.99 a	27.6± 3.42b
R1d	65.2± 2.92aa	74.1± 6.59c	66.1± 11.53 aa	55.8± 6.89bb
R3d	74.5± 3.37aa	79.8± 5.12c	75.2± 8.96 aa	60.6± 7.98bb
R7d	32.9± 6.12a	35.7± 6.09	31.8± 6.95 a	27.6± 1.76b

注:R 代表"再灌注组"(以下同) a 与同种处理方法 R0h 组比较 P<0.05 aa 与同种处理方法 R0h 组比较 P<0.01; b 与同时程生理盐水组比较 P<0.05 bb 与同时程生理盐水组比较 P<0.01 p 与同时 IgG 组比较 P<0.05。

Note: "R" stands for "HIR" (herein after the same): a compared with control group P<0.05; aa compared with control group P<0.01; b compared with time course of saline group, P<0.05; bb compared with time course of saline group, P<0.01; c compared with time course of IgG group, P<0.05.

2.2 HSP70 免疫组化结果

正常、假手术组及缺血再灌注各组缺血侧脑组织未检测到 HSP70,给予 IgG 的大鼠缺血 90 min 再灌注 0 h 缺血侧脑组织可观察到少量 HSP70,再灌注 12 h 后 HSP70 表达明显增强(P<0.05),1 d 达峰值(P<0.01),3 d 已有所下降。给予 VEGF 抗体大鼠在再灌注 1-3 d 能明显增加缺血侧脑组织 HSP70 表达

量(与同一时程的免疫对照组比较,P<0.05)。给予生理盐水的大鼠缺血 90 min 后,再灌注 12 小时 HSP70 的表达即上升,1 d 达峰值,3 d 时已有所下降,而 VEGF 因子在缺血 90 min 再灌注 1-3 d 显著减少同侧脑组织 HSP70 表达量(与同一时程的生理盐水组比较,P<0.05 或 P<0.01)(见表 2、表 3)。

表 2 HSP70 蛋白阳性细胞数
Table 2 The protein positive cells of HSP70

	VEGF-Ab		VEGF	
	IgG	VEGF-Ab	生理盐水 Saline	VEGF
R0h	65.7± 2.96	67.3± 3.85	68.9± 3.97	62.9± 8.42
R12h	72.4± 12.1 ^a	84.8± 5.98	83.6± 8.65 ^a	74.9± 6.59
R1d	122.6± 14.76 ^{aa}	143.8± 21.82 ^c	123.9± 7.85 ^{aa}	114.6± 11.84 ^b
R3d	105.5± 18.36 ^{aa}	134.9± 8.58 ^c	106.7± 12.96 ^{aa}	86.8± 10.45 ^{bb}
R7d	75.23± 3.74	78.6± 6.79	76.9± 7.93	72.9± 7.95

注 :a 与同种处理方法 R0h 组比较 P<0.05 ꞑa 与同种处理方法 R0h 组比较 P<0.01 ꞑ 与同时程生理盐水组比较 P<0.05 ꞑb 与同时程生理盐水组比较 P<0.01 ꞑ 与同时 IgG 组比较 P<0.05 ꞑc 与同时 IgG 组比较 P<0.01。
Note: a compared with control group P < 0.05; aa compared with control group P < 0.01; b compared with time course of saline group, P < 0.05; b compared with time course of saline group, P < 0.01; c compared with time course of IgG group, P < 0.05; c c compared with time course of IgG group, P < 0.01.

表 3 HSP70 蛋白吸光度
Table 3 The absorbance of HSP70protein

	VEGF-Ab		VEGF	
	IgG	VEGF-Ab	生理盐水 Saline	VEGF
R0h	0.1284± 0.0032	0.1324± 0.0172	0.1424± 0.0127	0.1327± 0.0138
R12h	0.1472± 0.0421 ^a	0.1725± 0.0162	0.1624± 0.0187 ^a	0.1528± 0.0157
R1d	0.2426± 0.012 ^{1aa}	0.2725± 0.0112 ^c	0.2142± 0.0217 ^{aa}	0.2621± 0.0171 ^b
R3d	0.1873± 0.0091 ^{aa}	0.2125± 0.0214 ^c	0.1825± 0.0228 ^{aa}	0.1633± 0.0167 ^{bb}
R7d	0.1257± 0.0142	0.1274± 0.0152	0.1324± 0.0136	0.1366± 0.0109

注 :a 与对照组比较 P<0.05 ꞑa 与对照组组比较 P<0.01 ꞑ 与同时程生理盐水组比较 P<0.05 ꞑb 与同时程生理盐水组比较 P<0.01 ꞑ 与同时 IgG 组比较 P<0.05 ꞑ c 与同时 IgG 组比较 P<0.01
Note: a compared with control group P < 0.05; aa compared with control group P < 0.01; b compared with time course of saline group, P < 0.05; b compared with time course of saline group, P < 0.01; c compared with time course of IgG group, P < 0.05; c c compared with time course of IgG group, P < 0.01.

3 讨论

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor , VEGF)是直接作用于血管内皮细胞的促血管生长因子 ,是生理和病理状态下新血管形成的重要调节者 ,且有研究表明其对神经细胞有直接营养及保护功能 ,并可促进神经元的产生^[3]。在脑缺血发生后 ,VEGF 能诱导新生血管形成 ,并使新生血管从正常组织向半暗带及缺血中心区延伸 ,增加受累脑组织再灌注及供氧量 ,从而减轻心脑血管缺血再灌注损伤^[4,5]。热休克蛋白(Heat Shock Protein ,HSP)是应激反应蛋白家族的成员 ,能够增加细胞对各种应激刺激的抵抗力 ,使神经元免受兴奋性氨基酸的毒性损伤 ,HSP70 在各种生理及病理条件下参与维持多种蛋白质分子构型及稳定性、提高机体的抗应激能力^[6]。中枢神经系统多种疾病均诱导 HSP70 表达上调 ,且其诱导量与应激源强度、组织损伤程度成一定比例^[7] ,HSP70 对缺血神经元可能发挥一定保护作用。

研究人员发现 ,组织器官(如心、脑)受缺血、缺氧刺激后发

生血管增殖 ,其间有许多生长因子参与。VEGF 还能促使内皮再生、抑制内膜增厚、防止再狭窄及恢复内皮依赖性功能 ,从而减轻心脑血管缺血再灌注损伤。近年来 ,VEGF 已成功应用于治疗人体肢体及冠脉缺血^[8-11] ,而对于脑缺血的治疗研究尚处于初步探索阶段。Zhang 等^[12]发现外源性 VEGF 也可诱导脑组织血管生成 ,并能显著加快神经功能恢复。在研究 VEGF 的保护机制时 ,人们首先观察到外源 VEGF 对缺血区神经元和内皮细胞具有直接保护作用^[13-15]。后来又发现外源 VEGF 也能通过促血管生成而间接保护缺血脑组织^[16]。Sun^[17]最近指出 VEGF 的血管生成作用、神经保护作用、神经再生作用贯穿脑缺血缺氧的整个过程 ,在急性期 ,发挥直接神经保护作用以减轻缺血缺氧性损害 ,而神经再生和血管生成则有利于脑损伤的长期修复。Harrigan^[18] 对短暂性大脑中动脉阻塞后大鼠脑内注入外源性 VEGF 发现可以减少脑梗死面积和脑水肿 ,表明 VEGF 对脑缺血有直接保护作用。

本实验采用原位识别凋亡细胞的 TUNEL 法 ,即用末端转移酶标记双股 DNA 断裂末端来特异标记核 DNA 片段 ,研究

了脑缺血再灌注 7d 的细胞凋亡, 结果发现脑缺血能诱导细胞发生凋亡, 与其他人的研究结论基本一致^[19], 提示细胞凋亡是评价缺血性脑损伤较为敏感、可靠的指标。采用 VEGF 抗体阻断内源性 VEGF 作用和注入外源 VEGF 因子的方法, 从两方面观察 VEGF 与细胞凋亡的关系, 发现 VEGF 能抑制因缺血诱导的细胞凋亡, 体外实验也发现 VEGF 能预防因缺氧所致的神经元凋亡^[20], 据此推测 VEGF 通过抑制神经元凋亡而参与保护缺血性脑损伤。另外实验观察到 HSP70 在缺血再灌注一周内表达上调, 阻断内源性 VEGF 后, HSP70 表达增加, 而外源性 VEGF 在相同再灌注时程使 HSP70 免疫反应性下降, 也提示 VEGF 可能对缺血再灌注脑组织起保护作用, 从而使反映神经元损伤程度的 HSP70 含量下降。综上所述, 我们认为内外源 VEGF 可通过抑制缺血脑组织细胞凋亡及 HSP70 表达, 而参与保护缺血性再灌注脑损伤。

参考文献(References)

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84
- [2] 王春霞, 刘春风, 包士尧. 大鼠局灶缺血再灌注模型改良后的实验研究[J]. *苏州医学院学报*, 1999, 19: 124
Wang Chun-xia, Liu Chun-feng, Bao Shi-yao. The study of focal cerebral ischemia reperfusion model after improved [J]. *Journal of Suzhou Medical College*, 1999, 19: 124
- [3] Jin K, Zhu Y, Sun Y, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(18): 11946-11950
- [4] Nagy Z, Simon L, Bori Z. Regulatory mechanisms in focal cerebral ischemia. New Possibilities in neuroprotective therapy [J]. *Ideggyogy Sz*, 2002, 55(3-4): 73-85
- [5] Zhang Z G, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(2): 62-66
- [6] 张荣, 周范民. 热休克蛋白与缺血性脑损伤[J]. *国外医学神经病学神经外科学分册*, 1996, 23: 57
Zhang Rong, Zhou Fan-min. Ischemic brain injury and heat shock protein [J]. *Foreign Medical Sciences Section on Neurology & Neurosurgery*, 1996, 23: 57
- [7] Gonzalez MF, Shiraishi K, Hisanaga K, et al. Heat shock proteins as markers of neural injury [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1989, 6(1): 93-100
- [8] Carmeliet P, Collen D. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 902: 249-262
- [9] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects [J]. *Circ Res*, 2000, 86(12): 1198-1202
- [10] Baumgartner I, Rauh G, Pieczek A, et al. Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor [J]. *Ann Intern Med*, 2000, 132(11): 880-884
- [11] 栗世方, 王任直, 李桂林. 血管内皮生长因子治疗脑缺血实验研究进展[J]. *中国医学科学院学报*, 2005, 27(1): 115-119
Li Shi-fang, Wang Ren-zhi, Li Gui-lin. Recent Advance in Experimental Study of Cerebral Ischemia Treated by Vascular Endothelial Growth Factor [J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2005, 27(1): 115-119
- [12] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(7): 829-838
- [13] Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(18): 10242-10247
- [14] Wagatsuma A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 298(1-2): 151-159
- [15] Lebherz C, von Degenfeld G, Karl A, et al. Therapeutic angiogenesis arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion [J]. *Endothelium*, 2003, 10(4-5): 257-265
- [16] Marti HJ, Bemaudin M, Bellall A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia [J]. *Am J Pathol*, 2000, 56(3): 965-976
- [17] Shen F, Fan Y, Su H, et al. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia-regulated VEGF gene transfer promotes angiogenesis following focal cerebral ischemia in mice [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(1): 30-39
- [18] Harrigan MR, Ennis SR, Sullivan SE, et al. Effects of intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor on cerebral blood flow, edema, and infarct volume [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2003, 145(1): 49-53
- [19] Li Y, Chopp M, Jiang N, et al. Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(7): 1252-1257; discussion 1257-1258
- [20] Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(18): 10242-10247

(上接第 5203 页)

- [19] Leo GJ, De Leede JE, Humphries AC. Novel Controlled-Release Lemna-Derived IFN- α 2b (Locteron): Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Tolerability in a Phase I Clinical Trial [J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2008, 28(2): 2-6
- [20] Wei GB, Glenda JP, Laurie KM, et al. The release profiles and bioactivity of parathyroid hormone from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(2): 345-352