文章编号:1000-5404(2009)07-0581-04

论著

蜕皮甾酮对局灶性脑缺血大鼠血管生成的影响

罗春霞[1],陈康宁[1],冯 华[2], 鲁开智[3], 李露斯[1] (第三军医大学西南医院:[1]神经内科,[2]神经外科,全军神经系统疾病微创诊治专科中心,[3]麻醉科, 重庆 400038)

摘 要:目的 观察蜕皮甾酮(ecdysterone,EDS)对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)蛋白表达、血管生成及神经功能恢复的影响。**方法** 应用大脑中动脉线栓法(middle cerebral artery occlusion,MCAO)建立大鼠局灶性脑缺血模型。大鼠随机分为正常对照组、缺血对照组、药物干预组。干预组于 MCAO 术后 2 h,应用 EDS(20 mg·kg^{-1}·d^{-1})腹腔直接注射,连续给药 7 d。分别于术后 7、14、21 d 免疫组织化学观察脑组织 VEGF 蛋白表达及微血管密度的变化,采用神经功能缺损评分(neurologic severity scores,NSS)量表对神经功能进行评分。**结果** 干预组大鼠 VEGF 蛋白表达在 7 d 和 14 d 时均高于缺血对照组,7 d 时差异有显著性($P<0.01$)。微血管密度在各观察时相点均较缺血对照组明显增高,差异有显著性($P<0.05$)。干预组大鼠从第 14 天开始其 NSS 评分与缺血对照组相比显著降低($P<0.05$),第 21 天与缺血对照组相比,神经功能改善更为明显($P<0.01$)。**结论** 蜕皮甾酮能诱导大鼠局灶性脑缺血后 VEGF 表达增高,促进血管生成,显著促进脑缺血后神经功能的恢复。

关键词:蜕皮甾酮;局灶性脑缺血;血管内皮生长因子;血管生成;神经功能
中图法分类号:R282.74; R285.5; R743.31 **文献标识码**:A

Ecdysterone induces angiogenesis and protects neurologic function after focal cerebral ischemia in rats

LUO Chun-xia[1], CHEN Kang-ning[1], FENG Hua[2], LU Kai-zhi[3], LI Lu-si[1] ([1]Department of Neurology, [2]Department of Neurosurgery, [3]Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of ecdysterone (EDS) on the level of VEGF protein in the brain, angiogenesis and neurologic function after focal cerebral ischemia in rats. **Methods** Rat with focal cerebral ischemia were established by occluding their middle cerebral artery. The established rats ($n=36$) were randomly and equally divided into EDS treatment group and ischemia group. EDS (20 mg·kg^{-1}·d^{-1} for 7 d) was intraperitoneally injected into the rats of EDS treatment group 2 h after operation, and the animal of ischemia group received an intraperitoneal injection of the same solvent as in EDS group. Another 6 rats served as normal control. Rats were sacrificed in 7, 14 and 21 d after operation, and the VEGF protein level and microvessel density (MVD) was detected with immunohistochemical methods and analyzed quantitatively with image system. Effect of EDS on neurologic recovery following brain ischemia were assessed using the neurologic severity scores (NSS). **Results** VEGF expression was not seen in normal control, and was higher in ischemia group than in the EDS treatment group at day 7 and 14, but the significant difference was only observed at day 7 ($P<0.01$). VEGF expression was disappeared at day 21 in ischemia group. EDS treatment group had significantly higher MVD than in the ischemia group at all time points. NSS results indicated middle cerebral artery occlusion led significant neurologic impairment and subsequently certain degrees of autogenous recovery were observed. Recovery of these indices was significantly better in the EDS treatment group than in ischemia group at day 7 ($P<0.05$) and 14 ($P<0.01$). **Conclusion** EDS can definitely induce VEGF expression and angiogenesis in areas around ischemic brain regions in rats with focal cerebral ischemia, and promote neurologic recovery following the injury.

Key words: ecdysterone; focal cerebral ischemia; vascular endothelial growth factor; angiogenesis; neurologic function

基金项目:国家自然科学基金(30500662,30800354)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500662,30800354)

作者简介:罗春霞,女,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事缺血性脑血管病的基础与临床方面的研究,发表论文 10 余篇。E-mail:luochx@sina.com
通信作者:李露斯,电话:(023)68773070

收稿日期:2008-08-07;**修回日期**:2008-09-22

既往研究发现,脑缺血后缺血半暗带区的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达增强,通过促血管生成及神经保护,改善损伤的神经功能[1]。提高内源性 VEGF 合成及分泌的药物或方法可能成为治疗缺血性脑血管病的新途径。蜕皮甾酮(ecdysterone,EDS)是一种昆虫蜕皮活性的天然甾体化合物,是祖国传统医学药材牛膝的活性成分。研究表明,蜕皮甾酮通过刺激缺血心肌组织分泌 VEGF,发挥心肌保护作用[2]。本研究采用大脑中动脉闭塞模型,观察 EDS 对局灶性脑缺血后 VEGF 的表达、血管生成及神经功能恢复的影响,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选用健康成年 SD 大鼠 44 只,体质量(250 ± 30)g,雌雄不拘,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,兔抗人Ⅷ因子多克隆抗体及 S-P 免疫组化染色试剂盒购自北京中杉公司。蜕皮甾酮(纯度为 99.99%)由中国科学院昆明植物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 局灶性脑缺血模型的建立 采用大脑中动脉线栓法(middle cerebral artery occlusion,MCAO)建立局灶性脑缺血模型。麻醉清醒后按 5 分制评分标准进行评分:0 分,无神经系统症状;1 分,不能完全伸展对侧前爪;2 分,爬行时转圈;3 分,向对侧倾倒;4 分,不能自行行走,意识丧失。评分为 1 ~ 3 分的入选。

1.2.2 分组及给药 随机数字表法将大鼠分成缺血对照组和药物干预组,每组 18 只。若大鼠死亡,随机补充,以保证每组的样本量。药物干预组:MCAO 术后 2 h,于腹腔直接注射蜕皮甾酮 20 mg/kg,1 次/d,连续给药 7 d;缺血对照组:MCAO 术后 2 h,于腹腔直接注射等剂量溶剂,注射时间及次数同药物干预组。正常对照组(N 组):取正常大鼠 6 只,不进行手术也不给予药物。

1.2.3 TTC 染色 另取动物 2 只于 MCAO 术后 48 h 行 TTC 染色:大鼠深麻醉后迅速断头取脑,将脑组织置于 -20 ℃冰箱快速冷冻 15 min 后,由前向后间隔 2 mm 作大脑连续冠状切片,置 2% TTC(生理盐水配置,pH 值 7.4 ~ 7.6)中 37 ℃避光恒温孵育 30 min,进行染色观察脑梗死灶呈色情况。

1.2.4 取材及切片制备 将缺血对照组、药物干预组于术后 7、14、21 d 以 4% 多聚甲醛 PBS 溶液左心室灌注固定后,根据 TTC 染色的结果,将大鼠脑从额极起间隔 2 mm 冠状切成 7 部分,取距额极 4 ~ 6 mm 部分,常规石蜡包埋,从距额极 6 mm 冠状切面连续切片,片厚 6 μm,备用。

1.2.5 免疫组化染色及图像分析 从每只大鼠切片中随机抽取 5 张,采用 S-P 法,按试剂盒说明进行 VEGF 蛋白在缺血周边脑组织的表达的检测。一抗:兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体,工作浓度 1∶100,DAB 显色,二甲苯透明,脱水,中性树脂封固,以细胞质染成棕褐色为阳性细胞。染色结果由 Leica-MD20 图像分析仪处理,用图像分析软件对 VEGF 免疫反应阳性细胞作灰度值测定。PBS 代替抗体作阴性对照。阳性对照用已知的阳性片。

1.2.6 微血管密度测定 参考 Weidner 等的方法,Ⅷ因子免疫组织化学法计数缺血周边脑组织的微血管密度(microvessel density, MVD),Ⅷ因子阳性产物呈棕黄色细颗粒状,定位于血管内皮细胞膜及细胞质。光镜下先以 100 倍视野选择染色清楚的微血管密集区(新生血管热点区),然后在 400 倍视野下计数。每张切片选择 3 个不重复视野进行微血管计数,求其均数,作为微血管密度值。凡标记清晰,与背景明显有别的内皮细胞(包括单个内皮细胞着色)或内皮细胞群者作为一个计数单位(相互分离的内皮细胞、内皮细胞簇、内皮细胞条索均按 1 个血管计数),不以是否形成血管管腔或管腔内有无红细胞作为计数单位,凡管腔 >8 个红细胞大小,带有肌层的血管不计算在内。

1.2.7 神经功能测定 采用神经功能缺损量表(neurologic severity scores,NSS),对大鼠行运动(肌肉状态、异常动作)、感觉(视觉、触觉、平衡觉)和反射检查。当不能正确完成某项任务或所试的反射消失时则得分。分值越高说明神经功能损伤越重。干预组和对照组大鼠(各 6 只),分别于 MCAO 术前,术后 1、7、14、21 d 行功能测定,由对实验分组不知情的人进行。

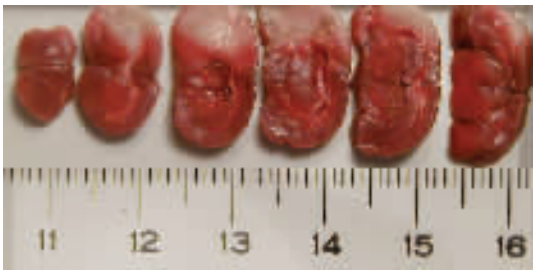
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件,组间资料两两比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 TTC 染色结果

大鼠大脑中动脉闭塞后,缺血侧鼠脑肿胀,有明确的梗死灶形成:主要位于同侧额顶叶皮质及尾状核与壳核外侧部,呈苍白色,与 MCA 支配的脑区域一致,未缺血部分呈红色,证实模型制作成功。见图 1。



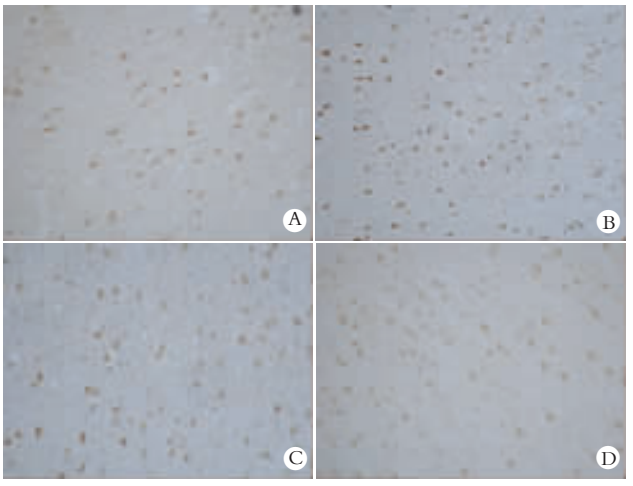
从左至右分别为由额极至枕部间隔 2 mm 连续切片

图 1 MCAO 术后 48 h 缺血对照组 TTC 染色观察

2.2 VEGF 的表达变化

VEGF 免疫组织化学染色结果见图 2。用图像分析软件对 VEGF 免疫反应阳性细胞作灰度值测定,灰度值越小,代表染色物越深,含抗原含量越高。正常组大鼠脑内未见阳性表达。缺

血对照组脑缺血后 VEGF 蛋白表达在 7 d(121.43 ± 14.05)时最高,14 d(140.86 ± 15.02)时已开始减少,21 d 时消失;主要分布于缺血周边神经元的细胞质部分,内皮细胞、胶质细胞中亦有表达。干预组 VEGF 蛋白表达变化趋势和缺血对照组一致,但反应更强烈,分布范围更广,在 7 d (97.57 ± 11.47)和 14 d(135.71 ± 11.19)时表达均高于缺血对照组,7 d 时有非常显著的差异($P<0.01$)。21 d 消失。

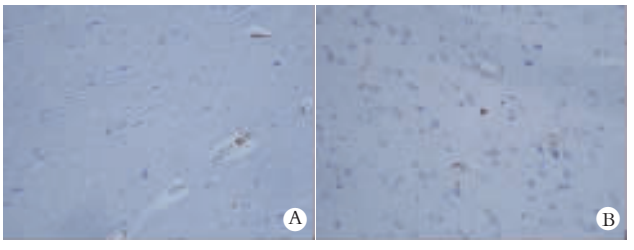


A: 缺血对照组术后 7 d; B: 药物干预组术后 7 d; C: 缺血对照组术后 14 d; D: 药物干预组术后 14 d

图 2　各组 MCAO 术后不同时相点顶叶 VEGF 免疫组织化学染色结果　(S-P × 400)

2.3　微血管密度测定

大鼠脑缺血后缺血周边区微血管增生,可见大量 Ⅷ 因子标记的棕色的单个内皮细胞散在分布或呈细条索排列。缺血对照组脑缺血后微血管密度增高,术后 7 d 达高峰,21 d 时略有下降。蜕皮甾酮干预组术后 7 d 微血管明显增生(图 3),术后 14 d 微血管增生达高峰,在术后 21 d 皮层 MVD 仍可维持在较高水平。各时间点干预组 MVD 值均显著高于缺血对照组($P<0.01$),见表 1。



A: 缺血对照组; B: 药物干预组

图 3　2 组 MCAO 术后 7 d Ⅷ因子免疫组化染色结果(标记 MVD)　(S-P × 400)

表 1　2 组微血管密度测定结果(个/400 倍视野)

组别	MCAO 术前	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
缺血对照组	8.33 ± 1.51	18.83 ± 2.32[a]	18.33 ± 2.07[a]	16.67 ± 2.47[a]
药物干预组	8.33 ± 1.51	23.83 ± 3.19[ab]	30.83 ± 4.07[ac]	29.33 ± 3.56[ac]

a: $P<0.01$, 与术前比较; b: $P<0.05$, c: $P<0.01$, 与缺血对照组比较

2.4　神经功能缺损评分

MCAO 术前,NSS 评分两组间无统计学差异;MCAO 术后 1 d,干预组与缺血对照组大鼠均出现严重的神经功能缺损,干预组略好于缺血对照组,但两组无明显差异。随着时间的延长,两组大鼠神经功能均有所改善,干预组大鼠从第 14 天开始其 NSS 评分与对照组相比显著降低($P<0.05$),第 21 天与对照组相比,神经功能改善更为明显($P<0.01$),见表 2。

表 2　2 组不同时间点 NSS 量表评分结果

组别	术前	术后 1 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
缺血对照组	0	9.83 ± 0.98	7.67 ± 1.21	6.50 ± 1.05[b]	4.83 ± 0.98[b]
药物干预组	0	9.67 ± 1.37	6.33 ± 1.03[a]	4.33 ± 0.52[bc]	2.71 ± 0.75[bd]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与术后 1 d 比较; c: $P<0.05$, d: $P<0.01$, 与缺血对照组比较

3　讨论

VEGF 作为一种重要的多功能因子,不但能够促进内皮细胞增殖,发挥直接的神经保护和神经营养作用,而且可以促进新生神经元的产生[3]。大量的研究表明无论是在脑缺血动物模型还是在脑中风患者的脑内, 内源性 VEGF 含量均显著增加[4,5]。本研究也证实脑缺血后缺血周围脑组织出现 VEGF 阳性表达,主要分布在神经元细胞质;VEGF 蛋白表达在 7 d 时最高,14 d 时已开始减少,21 d 时消失。脑缺血后给予 VEGF 抗体或反义核苷酸可增加脑梗死灶体积[6],这表明内源性 VEGF 对缺血损伤脑具有保护效应。此外,外源性给予 VEGF 也可减轻缺血性神经元的损伤[7,8]。VEGF 参与了缺血再灌注性脑损伤的病理发展和修复过程。脑缺血发生后,梗死周边区由于缺血缺氧,引起反应性的 VEGF 蛋白表达水平上升,通过保护受损神经元以及促进侧支循环的建立而改善缺血症状。这为缺血性脑血管病的治疗提供了一个新的思路:直接引入外源性 VEGF 或间接通过药物及其他治疗手段促进 VEGF 合成及分泌有可能有助于促进缺血缺氧后组织的修复及神经功能的改善。

蜕皮甾酮是一种昆虫蜕皮活性的天然甾体化合物,在动植物界广泛存在,是祖国传统医学药材牛膝的活性成分[9],具有多种药理活性。已有研究发现:蜕皮甾酮通过刺激缺血心肌组织分泌 VEGF 促进大鼠缺血区侧支循环建立和心肌再血管化,增加毛细血管密度,增加冠状动脉血流量,发挥心肌保护作用。离体实验也发现,不论在常氧状态或是在缺氧状态下,EDS 均有刺激增强静脉内皮细胞和心肌细胞表达 VEGF 的作用[10]。本实验免疫组化结果显示,VEGF 主要在神经

元表达,部分内皮细胞、胶质细胞中亦有表达。蜕皮甾酮干预组脑梗死周边区 VEGF 表达明显增高,与单纯缺血组相比差异有统计学意义($P<0.01$)。以上结果表明蜕皮甾酮也能促进神经细胞、脑血管内皮细胞 VEGF 的表达及分泌。关于 EDS 对 VEGF 表达影响的机制,目前尚不清楚。我们推测可能与 EDS 作用于昆虫的机制一样[11],是由于影响核内遗传物质的转录和翻译而增强了蛋白的合成,如调节即刻早期基因表达,增加 VEGF 基因转录率或增加 VEGF mRNA 稳定性等。具体通过怎样的信号通路,与哪些转录因子有关,有待进一步研究。

本实验采用 NSS 量表精确的评定 2 组大鼠脑缺血后损伤神经功能恢复的情况。结果发现:脑缺血损伤后,随着时间的延长,2 组大鼠神经功能均有所改善,干预组大鼠从第 14 天开始其 NSS 评分与对照组相比显著降低($P<0.05$),第 21 天与对照组相比,神经功能改善更为明显。这表明蜕皮甾酮在上调 VEGF 表达的同时,也促进了局灶性脑缺血大鼠神经功能的恢复。这一结果为临床治疗脑缺血提供了新的思路。结合前述研究结果,我们认为本实验中神经功能的改善是通过多种机制实现的:蜕皮甾酮通过促进神经细胞及内皮细胞 VEGF 的表达及分泌,通过自分泌及旁分泌 2 种途径特异地作用于内皮细胞上的受体,促进大鼠脑缺血周边区血管生成,改善缺血区的微灌注,提供营养供给和物质交换,加速坏死组织的清除和促进神经修复及再生。此外,VEGF 还有促进 NO 释放的作用[12],可通过直接扩张血管改善缺血区的血液循环。蜕皮甾酮促进了缺血区的 VEGF 表达,VEGF 可通过减轻缺血神经元的 DNA 损伤[13],促进钾通道蛋白 Kv1.2 的表达[14]以及抑制外向整流钾通道电流发挥神经保护作用[15],通过促进轴突生长、神经元和胶质细胞增殖发挥直接的神经修复和再生作用。

以上结果表明脑缺血后予以蜕皮甾酮干预能够诱导内源性 VEGF 表达增加,促进血管生成,显著改善脑缺血后大鼠神经功能损伤,有效地发挥治疗作用,其药理作用、给药方法值得进一步研究。

参考文献:

[1] Namiecinska M, Marciniak K, Nowak J Z. VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2005,59:573 - 583.

[2] 晋 军,黄 岚,祝善俊,等. VEGF 在大鼠心肌梗死急性期表达的意义及蜕皮甾酮的促侧支循环作用[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2002, 10(3): 158 - 161.

[3] Sun Y, Jin K, Xie L, *et al*. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. J Clin Invest,2003,111(12):1843 - 1851.

[4] Slevin M, Krupinski J, Slowik A, *et al*. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2000,31(8):1863 - 1870.

[5] 刘亢丁,宫 萍,吴 江,等. 实验性局灶性脑缺血不同脑区 VEGF、VEGFR-1、2 表达及意义[J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(4): 332 - 333.

[6] Bao W L, Lu S D, Wang H, *et al*. Intraventricular vascular endothelial growth factor antibody increases infarct volume following transient cerebral ischemia[J]. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1999, 20(4):313 - 318.

[7] Wang Y, Galvan V, Gorostiza O, *et al*. Vascular endothelial growth factor improves recovery of sensorimotor and cognitive deficits after focal cerebral ischemia in the rat[J]. Brain Res, 2006, 1115(1):186 - 193.

[8] Zhu W, Mao Y, Zhou L F. Reduction of neural and vascular damage by transplantation of VEGF-secreting neural stem cells after cerebral ischemia[J]. Acta Neurochir Suppl, 2005,95:393 - 397.

[9] Li J, Qi H, Qi L W, *et al*. Simultaneous determination of main phytoecdysones and triterpenoids in radix achyranthis bidentatae by high-performance liquid chromatography with diode array-evaporative light scattering detectors and mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2007, 596(2):264 - 272.

[10] 晋 军,黄 岚,祝善俊,等. 蜕皮甾酮对内皮细胞凋亡保护作用的研究[J]. 中国药理学通报,2001,17(5):546 - 548.

[11] Park H H, Park C, Kim K S, *et al*. Effects of 20-hydroxyecdysone and serotonin on neurite growth and survival rate of antennal lobe neurons in pupal stage of the silk moth Bombyx mori *in vitro*[J]. Zoolog Sci, 2003,20(2):111 - 119.

[12] Fagan S C, Hess D C, Hohnadel E J, *et al*. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2004, 35(9): 2220 - 2225.

[13] Jin K, Mao X O, Batteur S P, *et al*. Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor[J]. Neuroscience, 2001, 108(2): 351 - 358.

[14] Qiu M H, Zhang R, Sun F Y. Enhancement of ischemia-induced tyrosine phosphorylation of Kv1.2 by vascular endothelial growth factor *via* activation of phosphatidylinositol 3-kinase[J]. J Neurochem, 2003, 87(6): 1509 - 1517.

[15] Xu J Y, Zheng P, Shen D H, *et al*. Vascular endothelial growth factor inhibits outward delayed-rectifier potassium currents in acutely isolated hippocampal neurons[J]. Neuroscience, 2003, 118(1):59 - 67.

(编辑 栗 嘉)