文章编号:1000-5404(2010)07-0647-04

论著

VEGF动员内源性EPCs促进MCAO/R小鼠神经功能恢复

杨瑞瑞[1],谢 鹏[1],程 焱[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科[1];300070 天津,天津医科大学总医院神经内科[2])

[摘要] 目的 观察局灶性脑缺血再灌注模型(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)小鼠外周循环中血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的数量变化,并应用血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)动员小鼠自体骨髓中的EPCs,观察脑梗死小鼠的神经功能恢复情况。**方法** 以MCAO/R小鼠为研究对象,通过腹腔注射VEGF动员体内的EPCs(每日1次,持续1周),在动员过程中的第1、4、7天进行神经功能评分,然后从内眦静脉采血,使用流式细胞仪检测MCAO/R组及MCAO/R+VEGF组小鼠外周血中EPCs的数量;并断头取脑,对脑组织TTC染色后计算并比较小鼠脑梗死体积的变化。**结果** MCAO/R+VEGF组在动员过程中,外周血中的EPCs在给药第1天开始增加,第4天达到高峰并持续到第7天;并且在这3个时间点上,MCAO/R+VEGF组与其他两组比较均具有统计学意义($P<0.01$)。神经功能评分:MCAO/R+VEGF组在动员后神经功能评分值持续降低,且该组在给药第4天及第7天的评分较同时间点的MCAO/R组降低($P<0.05$)。脑梗死体积:MCAO/R+VEGF组在给药后梗死灶体积逐渐缩小,且该组在给药第4天及第7天的梗死灶体积较同时间点的MCAO/R组显著缩小($P<0.01$)。**结论** 应用VEGF能显著动员MCAO/R模型小鼠骨髓中的EPCs,被动员的EPCs能够增强出生后的血管新生,达到缩小梗死灶,促进神经功能恢复。

[关键词] 局灶性脑缺血再灌注模型;血管内皮祖细胞;血管内皮生长因子
[中图法分类号] R743.31; R329.2; R977.6 **[文献标志码]** A

VEGF mobilizes endothelial progenitor cells to attenuate brain infarction in middle cerebral artery occlusion/reperfusion mice

Yang Ruirui[1], Xie Peng[1], Cheng Yan[2] ([1] Department of Neurology, First Afflitated Hospital, Congqing Medical University, Chongqing, 400016; [2] Department of Neurology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin, 300070, China)

[Abstract] Objective To observe the change of the number of endothelial progenitor cells (EPCs) in peripheral circulation after acute middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) and to evaluate the therapeutic effect of VEGF through mobilizing bone marrow-derived EPCs in treatment of mouse brain infarction after acute MCAO/R. **Methods** Totally 36 mice were randomized into MCAO/R+VEGF group, MCAO/R group and sham operation group. MCAO/R mice model was established according Longa's method. VEGF [3.3 ng/(g·d), for 7 d] was injected intraperitoneally to the mice of MCAO/R+VEGF group to mobilize bone marrow-derived EPCs. The other 2 group received an injection of normal saline. At days 1, 4, 7 during mobilization, neurological functions were evaluated and blood samples were taken from angular vein. Then the number of EPCs in peripheral circulation in MCAO/R group and MCAO/R+VEGF group was detected by flow cytometry. Mice were decapitated and brains sliced and stained with triphenyltetrazolium chloride (TTC) to calculate infarct volume using specific image analyzing system. Infarct volumes were calculated and compared among groups. **Results** The number of EPCs in MCAO/R+VEGF group began to increase at day 1 after treatment, and peaked at day 4 and sustained to day 7, which was significantly larger than those in MCAO/R group and sham operation group at every time point ($P<0.01$). Neurological functions were improved significantly in both MCAO/R+VEGF group and MCAO/R group at day 7 compared with those at day 4 respectively ($P<0.05$), and the functions were improved significantly as early as 4 d after operation in MCAO/R+VEGF group compared with that at 1 day after operation ($P<0.05$). There was significant difference when neurological functions were compared between MCAO/R+VEGF group and MCAO/R group at day 4 and day 7 respectively ($P<0.05$). After VEGF treatment, infarct volume was decreased significantly in MCAO/R+VEGF

[基金项目] 天津市科技发展计划(06YFSZSF01700)
[通信作者] 程 焱,E-mail:cylfl@sohu.com

group at day 4 compared with that at day 1 ($P<0.01$), and with the volumes of MCAO/R group at the 2 time points ($P<0.01$). Significant difference was seen when infarct volumes were compared between MCAO/R + VEGF group and MCAO/R group at day 4 and day 7 respectively ($P<0.01$), and infarct volume in MCAO/R + VEGF group was smaller than that in MCAO/R group. **Conclusion** Bone barrow-derived EPCs can be mobilized by VEGF to help the recovery of injury in acute MCAO/R mice. The mobilized EPCs can increase angiogenesis to decrease infarction area and treat brain infarction.

[Key words] middle cerebral artery occlusion/reperfusion; endothelial progenitor cells; vascular endothelial growth factor

Supported by the Project of Science and Technology Development Plan of Tianjin(06YFSZSF01700). Corresponding author: Cheng Yan, E-mail: cylfl@sohu.com

血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是一类能循环、增殖并分化为血管内皮细胞[1],但尚未表达成熟血管内皮细胞表型,也未形成血管的前体细胞。未分化的EPCs呈圆形,主要依靠细胞表面标志来识别,目前CD34被认为是用来识别EPCs的特异性标记。成人EPCs主要存在于骨髓,且处于不同的分化阶段,在生理状态下外周血液中EPCs的数量很少。脑卒中等内源性因素及血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等外源性因素对EPCs有动员作用。Asahara等[2]通过实验最先发现了VEGF能非常有效地动员内皮祖细胞。近年来,许多国内外学者致力于研究EPCs作为一种新的方法应用于临床治疗缺血性脑血管病。

本实验通过观察小鼠缺血再灌注模型外周血EPCs的变化来了解脑缺血时EPCs的表达情况。同时,以VEGF为动员剂,增加EPCs在外周的表达,观察脑梗死小鼠的神经结构与功能恢复情况,为EPCs在脑缺血中的应用提供临床证据,也为缺血性脑血管病的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物分组

流式细胞仪(FACSCalibur型, 美国BD公司),数码照相机(日本Canon公司),人类重组VEGF165(英国PeproTech公司),藻红蛋白(PE)标记的大鼠抗小鼠CD34单克隆抗体(Caltag Laboratories, CA),2,3,5-氯化三苯基四氮唑(美国Sigma公司),红细胞裂解液(中国晶美生物工程有限公司),10%的水合氯醛、1%的多聚甲醛等。

2月龄雌性C57BL/6(H-2^b)小鼠,体质量35~40 g(天津医科大学实验动物中心提供)。完全随机分成3组($n=12$):①假手术组,暴露同侧颈动脉,不栓塞;②MCAO/R组,小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型组;③MCAO/R + VEGF组,小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后,给予生理盐水稀释的VEGF腹腔内注射,动员EPCs。

1.2 动员方法

苏醒后左侧眼睑低垂或右侧肢体瘫痪的小鼠为栓塞成功者。①选用12只栓塞成功者作为MCAO/R + VEGF组,每只小鼠腹腔注射VEGF 3.3 ng/(g·d),持续动员7 d;②另外12只栓塞成功者作为MCAO/R组进行实验,亦在1周内每日腹腔注射等量生理盐水;③假手术组亦同时在1周内每日腹腔注射等量生理盐水。

1.3 神经功能缺失体征评分

参照Zeal longa等的5分制评分标准,分别在缺血再灌注术后第1、4、7天,小鼠被处死之前进行评分:0分,无神经损伤症状;1分,不能完全伸展对侧前爪;2分,向外侧转圈;3分,向对侧倾倒;4分,不能自行行走意识丧失。累计1分以上即为成功模型,可以入选本实验。

1.4 TTC染色法计算小鼠脑组织梗死的体积

制作MCAO/R模型后第1、4、7天先后颈椎脱臼处死小鼠,断头取出脑组织,以矢状缝后人字行分叉点为起始标记点,行冠状切片,每片厚2 mm,置于2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)中,在37 ℃下避光染色30 min,正常脑组织被染成红色,坏死组织不着色。再用体积分数10%的福尔马林固定后使用数码相机照相,使用Image-Pro- Plus Analysis Software计算机图像分析系统计算脑梗死体积(采用梗死率表示梗死体积)。

梗死率 = 微梗死体积/总体积 × 100% = (S1 + S2 + S3 + ….SN) H/(S1 总 + S2 总 + ….. SN 总)H,其中S表示每片的梗死面积,H表示每片厚度。

1.5 流式细胞仪检测小鼠外周血中的EPCs表面抗原

制作MCAO/R模型后第1、4、7天从内眦静脉中采血100 μl,采用肝素抗凝,PBS 1~2 ml洗2遍,弃去上清,加入NS 100 μl重悬细胞,加入荧光标记抗体0.2 μl,避光4 ℃孵育30 min;另有一管细胞不加抗体,作为阴性对照,PBS 1 ml洗2遍,离心3 min(1 500 r/min),弃上清,以去除未结合的荧光抗体,加入1%多聚甲醛0.8 ml,上机检测。采用Cell Quest软件,在上机前用荧光塑料微球调定机器的荧光变异系数(cofficient of variation, *CV*)值小于4%,上机后获取检测细胞5 000~10 000个,存入计算机中待分析。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 小鼠外周循环中EPCs的流式细胞术检测

采用流式细胞仪检测外周循环中的$CD34^+$阳性率,具体结果见表1、图1。以$CD34^+$阳性率反映外周循环中EPCs的数量。

MCAO/R + VEGF 组在给药第 1 天小鼠外周血中的 EPCs 就表现显著增加趋势,第 4 天 EPCs 的数量达到高峰,其增加趋势持续到第 7 天。MCAO/R + VEGF 组小鼠在给药后第 1、4、7 天外周循环中 EPCs 的数量显著高于假手术组及 MCAO/R 组($P<0.01$)。

表 1　动员后不同时间 3 组小鼠外周循环中的 CD34$^+$ 阳性率比较($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第 1 天	第 4 天	第 7 天
假手术组	0.203 ±0.010	0.198 ±0.010	0.201 ±0.011
MCAO/R 组	1.820 ±0.320	0.806 ±0.199	0.338 ±0.046
MCAO/R + VEGF 组	3.070 ±0.280[a]	4.708 ±0.436[a]	2.871 ±0.252[a]

a :$P<0.01$,分别与假手术组及 MCAO/R 组比较

2.2　小鼠的神经功能缺失体征评分

假手术组小鼠活动正常,无神经功能缺损症状,神经功能评分为 0 分;MCAO/R 组小鼠在术后的第 7 天评分较术后第 4 天低($P<0.05$);MCAO/R + VEGF 组小鼠在动员的 1 周内神经功能缺失体征逐渐减轻,神经功能评分有明显下降趋势,在动员后第 4 天较第 1、7 天评分值均明显降低($P<0.05$)。MCAO/R + VEGF 组在给药第 4 天及第 7 天的神经功能评分较同时间点的 MCAO/R 组有显著降低($P<0.05$,表 2)。

表 2　动员后不同时间 3 组小鼠神经功能评分比较($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

组别	第 1 天	第 4 天	第 7 天
假手术组	0	0	0
MCAO/R 组	3.25 ±0.71	2.88 ±0.64	1.75 ±0.46[c]
MCAO/R + VEGF 组	3.13 ±0.64	2.00 ±0.54[ab]	1.00 ±0.58[ac]

a:$P<0.05$,与 MCAO/R 组比较;b: $P<0.05$,与第 1 天比较;c:$P<0.05$,与第 4 天比较

2.3　小鼠脑组织 TTC 染色后计算梗死灶的体积

MCAO/R + VEGF 组小鼠在给药第 4、7 天较第 1 天梗死灶体积明显缩小($P<0.01$),且 MCAO/R + VEGF 组在给药第 4、7 天的梗死灶体积较同时间点的 MCAO/R 组有显著降低($P<0.01$,表 3、图 2)。

表 3　动员后不同时间 3 组小鼠脑梗死率的比较(%, $n=12$, $\bar{x}\pm s$)

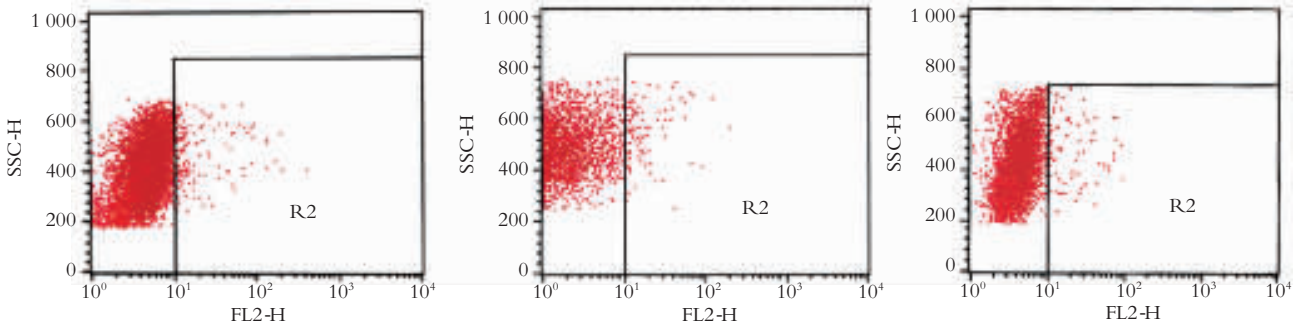
组别	第 1 天	第 4 天	第 7 天
假手术组	0	0	0
MCAO/R 组	38.4 ±2.0	21.7 ±2.4[b]	11.6 ±2.3[c]
MCAO/R + VEGF 组	34.5 ±2.9	12.7 ±1.7[ab]	5.2 ±1.4[ac]

a:$P<0.05$,与 MCAO/R 组比较;b:$P<0.01$,与第 1 天比较;c:$P<0.01$,与第 4 天比较

3　讨论

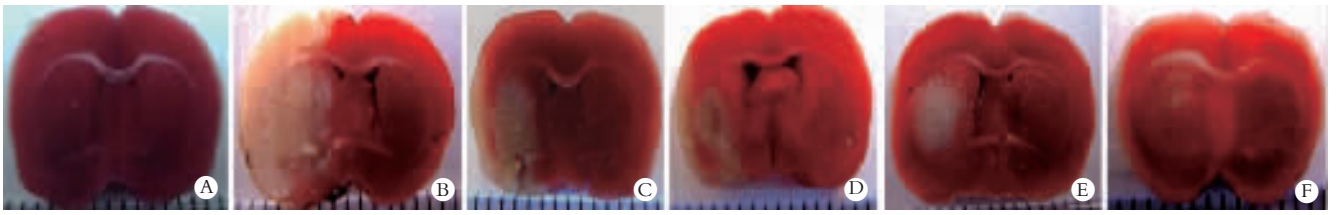
1963 年 Stump 等首次报道血液中可能存在内皮细胞。Asahara 等[1]从外周血中分离出 CD34$^+$ 及 flk-1$^+$ 的单个核细胞,实验显示这些细胞在体外能分化为内皮细胞,在体内能参与成年动物的新血管形成,具有内皮祖细胞的特征。目前在寻找血管内皮祖细胞特异性标志方面又有了新的进展,将同时具有 CD34、AC133、VEGFR2 3 种表面标志的细胞称为早期的功能性血管 EPCs[3]。本实验采用 CD34 作为 EPCs 表面标志来标记在小鼠外周循环中的 EPCs,新鲜 CD34$^+$ 单个核细胞基本不表达内皮细胞的特异性分子标志,故循环中的 CD34$^+$ 内皮细胞主要为内皮祖细胞。

VEGF 能引起小静脉对血液中大分子物质通透性的蛋白质[4]。人体细胞(包括巨噬细胞、平滑肌细胞、



A: 第 1 天;B: 第 4 天;C: 第 7 天

图 1　FCM 检测 MCAO/R + VEGF 组小鼠动员后外周血中的 CD34$^+$ 细胞



A: 假手术组;B: MCAO/R 组第 1 天;C: MCAO/R 组第 4 天;D: MCAO/R + VEGF 组第 4 天;E: MCAO/R 组第 7 天;F: MCAO/R + VEGF 组第 7 天

图 2　动员后不同时间 3 组小鼠脑梗死 TTC 染色

内皮细胞以及肿瘤细胞等)分泌4种VEGF多肽,分别由206、189、165、121个氨基酸残基组成,多数组织以VEGF165表达为主。赵刚等[5]应用人血管内皮细胞生长因子165(hVEGF165)成功转染了EPCs,促进了EPCs的迁移、黏附和增殖。Yang等[6]通过实验证实了经鼻给予VEGF可直接进入脑内促进脑缺血再灌注模型大鼠梗死灶周围的血管新生。本实验以hVEGF165为动员剂,增加MCAO/R模型小鼠EPCs在外周的表达,观察脑梗死小鼠的神经结构与功能恢复情况。

外周循环中的EPCs对内源性因素的动员作用表现正相效应。在小鼠后肢缺血模型中,静脉注入Dil荧光标记的人$CD34^+$细胞归巢至缺血部位并整合进约13.4%的新生血管内膜上,而兔的自体$CD34^+$细胞移植中可见约9.7%的新生血管内膜为Dil标记细胞[7]。Takahashi等[8]在小鼠和兔的肢体缺血模型中发现肢体缺血可引起内皮祖细胞的动员、增加外周血内皮祖细胞数量,如同时给予粒巨噬细胞集落刺激因子,则内皮祖细胞数量进一步增加,缺血肢体的血管再生过程明显改善,证实外周血循环中的内皮祖细胞可同时受内源性和外源性因素的调控。本实验我们以MCAO/R模型小鼠为对象,研究急性脑缺血再灌注损伤作为内源性因素对骨髓中EPCs的动员作用,即在缺血缺氧的病理情况外周循环中EPCs数量的变化。通过MCAO/R模型组与正常组的比较,我们发现急性脑缺血再灌注损伤对骨髓EPCs确实有动员作用。在制作MCAO/R模型第1天,小鼠外周循环中EPCs的数量明显增加,但第4天较第1天血液中EPCs的数量有所下降,第7天其数量下降更为明显,分析与随着手术时间的延长,小鼠的机体逐渐恢复,对骨髓中EPCs动员作用逐渐减弱有关。

Galimi等[9]对正常中枢神经系统,包括脑、脊髓、视网膜、血管内皮与骨髓来源的EPCs之间的关系作了长期的观察,没有发现骨髓来源的细胞表现血管内皮细胞的表型,但是却表达单核细胞和小胶质细胞的表面标志,而且与血管内皮关系密切,提示在无损伤的中枢神经系统,EPCs未参与形成血管内皮细胞,但是对于血管结构的维持起积极的作用。Ghani等[10]临床研究揭示了脑血管患者EPCs的变化,发现卒中患者EPCs的数量较正常对照组有明显的下降,以急性卒中患者更为严重。EPCs的水平与Framingham心血管危险指数负相关。这说明EPCs在卒中的病理生理过程中起重要作用。脑梗死发生后,在缺血部位存在新血管形成。Hess等[11]将表达绿色荧光蛋白的雄性转基因小鼠骨髓细胞移植给雌性小鼠,发现脑缺血后7、14 d,骨髓来源的细胞能整合进缺血区血管系统并表达血管内皮细胞的标志,而在第24小时却仅有少量的细胞整合。

本研究表明,患者VEGF干预的MCAO/R模型小鼠的脑梗死灶体积较未干预模型小鼠明显缩小,其神经功能评分有明显下降,说明VEGF对小鼠的脑梗死有治疗作用。可能机制是VEGF动员小鼠骨髓内的EPCs,使外周循环中EPCs的数量增加,从而可能增强脑组织缺血区的血管新生、改善脑缺血局部的血流灌注,促进小鼠缺血性半暗带的恢复,缩小梗死灶的体积,促进神经功能恢复。

参考文献:

[1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[2] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, *et al*. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. EMBO J, 1999, 18(14): 3964-3972.

[3] Gehling U M, Ergun S, Schunmacher U, *et al*. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells[J]. Blood, 2000, 95(10): 3106-3112.

[4] Semenza G L. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance[J]. J Clin Invest, 2001, 108(1): 39-40.

[5] 赵刚, 黄岚, 宋耀明, 等. 血管内皮生长因子基因修饰内皮祖细胞对内膜损伤血管修复的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 427-430.

[6] Yang J P, Liu H J, Cheng S M, *et al*. Direct transport of VEGF from the nasal cavity to brain[J]. Neurosci Lett, 2009, 449(2): 108-111.

[7] Gill M, Dias S, Hattori K, *et al*. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+) AC133(+) endothelial precursor cells[J]. Circ Res, 2001, 88(2): 167-174.

[8] Takahashi T, Kalka C, Masuda H, *et al*. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization[J]. Nat Med, 1999, 5(4): 434-438.

[9] Galimi F, Summers R G, van-Praag H, *et al*. A role for bone marrow-derived cells in the vasculature of non-injured CNS[J]. Blood, 2005, 105(6): 2400-2402.

[10] Ghani U, Shuaib A, Salam A, *et al*. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease[J]. Stroke, 2005, 36(1): 151-153.

[11] Hess D C, Hill W D, Martin-Studdard A, *et al*. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells After stroke[J]. Stroke, 2002, 33(5): 1362-1368.

(**收稿**:2009-10-10;**修回**:2009-11-19)

(编辑 龙 亮)