论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0778-05

不同外源性途径干预血管新生对脑缺血模型大鼠神经功能缺失修复的影响

齐志国[1],梁红梅[2],朱晓峰[3],谢 鹏[1] (400016 重庆,重庆医科大学第一附属医院神经内科[1];156100 黑龙江 富锦,黑龙江省富锦市中心医院超声科[2];154002 黑龙江 佳木斯,佳木斯大学[3])

[摘要] 目的 探讨脑缺血区血管新生和神经功能缺失修复的关系以及选择较理想的外源性干预途径增加脑缺血区血管新生。**方法** 选择240只SD大鼠分为假手术组、缺血对照组、缺血加VEGF腹腔注射组、缺血加血管内皮祖细胞移植组和缺血加血管内皮因子单克隆抗体组,在1、3、7、14、30、60 d观察各组脑缺血及周边区的血管密度和大鼠的电生理指标(体感诱发电位和运动诱发电位)及行为学(感觉损伤移交实验、轮转跑步机运动功能测定和mNSS改良神经功能评分)。**结果** 缺血加VEGF腹腔注射组、缺血加血管内皮祖细胞移植组的新生血管密度除1 d外其他各时间点均高于缺血对照组($P<0.05$),缺血加血管内皮因子单克隆抗体组在后5个时间点新生血管密度小于缺血对照组($P<0.05$)。缺血加VEGF腹腔注射组、缺血加血管内皮祖细胞移植组和缺血加血管内皮因子单克隆抗体组在7 d后体感诱发电位和运动诱发电位与缺血对照组有统计学差异($P<0.05$)。与缺血对照组相比,缺血加VEGF腹腔注射组、缺血加血管内皮祖细胞移植组和缺血加血管内皮因子单克隆抗体组在3 d后行为学评分有统计学差异($P<0.05$)。**结论** 通过外源性干预脑缺血模型大鼠缺血区血管新生,可以影响神经功能缺失的修复;且单次移植血管内皮祖细胞与VEGF多次注射用药可以达到相同的效果。

[关键词] 脑缺血;血管新生;神经功能

[中图法分类号] R363.27;R364.33;R743.31 **[文献标志码]** A

Different exogenous interventions in angiogenesis to repair neurological deficits in cerebral ischemia rats

Qi Zhiguo[1], Liang Hongmei[2], Zhu Xiaofeng[3], Xie Peng[1] ([1]Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Ultrasonography, Central Hospital of Fujin City, Fujin, Heilongjiang Province, 156100; [3]Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang Province, 154002, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between angiogenesis and ischemic neurological deficit repair through exogenous interventions, and investigate optimal intervention routes for angiogenesis in cerebral ischemia rats. **Methods** Totally 240 SD rats were randomly divided into sham operation group, ischemic control group, ischemia and vascular endothelial growth factor (VEGF) group [1 653.3 ng/(g·d), i.p., for 10 d], ischemia and endothelial progenitor cell transplantation (EPCs) group (2×10^{10}/L, 10 μl), ischemia and anti-VEGF monoclonal antibody group [3 mg/(kg·d), i.p., for 10 d]. Cerebral microvessel density, somatosensory evoked potentials (SEP) and motor evoked potentials (MEP) and behavior were observed in 1, 3, 7, 14, 30 and 60 d after injury. **Results** New blood vessel density of ischemia and VEGF group, ischemia and EPCs group were significantly higher than ischemic control group in all time points besides 1 d after injury ($P<0.05$). On the contrary, ischemia and anti-VEGF group was lower than ischemic control group in posterior 5 time points ($P<0.05$). SEP and MEP of ischemic control group and ischemia and VEGF group, ischemia and EPCs group, ischemic and anti-VEGF group had statistically significant differences from ischemic control group after 7 d ($P<0.05$). Behavior was significantly different among all groups after 3 d ($P<0.05$). **Conclusion** Exogenous intervention in cerebral ischemia rats with ischemic angiogenesis can affect repair of neurological deficits. And VEGF therapy through multiple injections and a single transplanted endothelial progenitor cells can receive similar results.

[Key words] cerebral ischemia; angiogenesis; nerve function

Supported by the National Key Basic Research Development Program (973 Program, 2009CB008300). Corresponding author: Xie Peng, Tel: 86-23-68485490, E-mail: xiepeng58@21cn.com

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2009CB008300)

[通信作者] 谢 鹏,电话:(023)68485490,E-mail:xiepeng58@21cn.com

缺血性脑梗死后的神经功能修复与梗死后神经元损伤和血管再生密功相关,其也成为研究的热点之一,缺血区新生血管形成是神经元的再生和修复的物质基础。研究表明[1,2],当脑缺血发生时,缺血侧半球血管新生增加,这些增加的血管可能来自于脑血管内皮细胞的增殖形成的新生毛细血管。目前脑梗死后治疗性血管新生的研究只处于动物实验的水平。有对血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)[3]和血管内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)在脑缺血性疾病中对血管新生的研究报道,但对外源性干预脑缺血区血管新生对神经神经功能缺失修复和相关研究还少见报道。本实验通过不同外源性途径干预大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠脑缺血区血管新生,观察不同时间点大鼠行为学及电生理变化,以发现血管新生和神经功能恢复的关系以及各种干预的有效性,为治疗性血管干预在脑缺血的临床应用提供相关证据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 动物分组 成年雄性SD大鼠240只(由重庆医科大学实验动物中心提供,符合国家级动物标准),体质量250~350 g。遵循完全随机原则,分为假手术组(sham-operated组)、缺血对照组(MCAO组)、缺血加VEGF腹腔注射组(MCAO + VEGF组)、缺血加血管内皮祖细胞移植组(MCAO + EPCs组)、缺血加血管内皮因子单克隆抗体组(MCAO + anti-VEGF组),各组又下设1、3、7、14、30、60 d 6个时间点,每时间点8只。

1.1.2 主要试剂与设备 CD31、CD34单克隆抗体(Sigma,美国),重组VEGF165、血管内皮因子单克隆抗体(anti-VEGF)(PeproTech, 英国),二氧化碳培养箱(SANYO,日本),SXP-1C手术显微镜(上海医疗器械股份有限公司,上海),RM6240C多道生理信号采集系统(成都仪器厂,成都)。

1.2 MCAO模型的制备

大鼠麻醉取右侧卧位,从左侧外耳道至外眦连线中前1/3处切开,暴露颅骨,钻孔并切开硬脑膜,暴露左侧大脑中动脉;用10-0缝线结扎大脑中动脉。缝合颞肌和皮肤。假手术模型:只暴露左侧大脑中动脉,不予结扎。

1.3 药物干预措施

MCAO + VEGF组和MCAO + anti-VEGF组分别选择造模成功的大鼠腹腔注射重组VEGF165 3.3 ng/(g·d)和anti-VEGF 3 mg/(kg·d),除3、7 d处死大鼠外,其余各时间点连续注射10 d。

1.4 EPCs的体外分离、培养和鉴定及移植

参照王肃生等[4]方法,抽取SD大鼠动脉血10~15 ml,培养EPCs 10 d,甲醇固定2次,每次20 min,牛血清工作液封闭非特异性抗原30 min,分别加入兔抗大鼠CD31、CD34(1∶50),37 ℃孵育2 h,滴加二抗,37 ℃孵育20 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,DAB显色,充分冲洗,苏木精复染后梯度脱水,二甲苯封片,上镜观察鉴定阳性细胞率。将培养10 d的EPCs消化分离溶解于磷酸盐缓冲液中,细胞浓度调整为2×10^{10}/L。立体定位移入缺血半暗带区(前囟后0.5 mm,矢状缝右旁开3.5 mm)[5],移植速度0.5 μl/min,移入量10 μl。

1.5 脑缺血区血管密度(MVD)检测

大鼠处死后取缺血半暗区及假手术组相同区域,固定后,石蜡包埋切片,抗原微波热修复,CD34一抗,37 ℃孵育过夜;滴加生物素标记的二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液;DAB染色,苏木精复染细胞核,封片以PBS代替一抗作阴性对照。结果判断:利用BPIAS-1000彩色病理图文分析系统进行图像处理。微血管密度测定采用统计场面密度:即阳性目标面积/统计场总面积,为减少误差,每个组织切片随机选5个视野,测量其微血管密度,取其平均值。

1.6 大鼠运动诱发电位(MEP)和体感诱发电位(SEP)的测定

电极埋植:10%水合氯醛(400 mg/kg)麻醉,矢状正中切口,颅骨钻孔(前囟后1 mm,旁开3 mm),安放螺旋电极,骨蜡封闭,缝合头皮。MEP电极放置:刺激电极-伤侧皮层(A-1、L-3),记录电极-对侧前臂伸肌,参考电极-前额,刺激量为10 V;SEP电极放置:刺激电极-健侧正中神经前肢正中神经,记录电极-伤侧皮层(A-1、L-3),参考电极-前额,刺激量为0.8 mA,2 Hz,重复200次。观察指标主要是相对潜伏期和相对波幅。

1.7 大鼠行为学检测

1.7.1 感觉损伤移交实验[6] 选择113.1 mm^2的单面胶纸作为双侧触觉刺激物,训练时程5次/d,记录每次从前肢去掉刺激物的时间,10 s内去除刺激物作为入选MCAO造模标准,在造模后1、3、7、14 d和28 d只记录偏瘫侧前肢去掉粘贴物的时间。

1.7.2 轮转跑步机运动功能测定[7,8] 将大鼠放置于轮转跑步机的转盘上,速度由4 r/min缓慢提升至40 r/min,记录大鼠在转盘所停留的时间。掉下转轮或抓住转轮连续2圈旋转不跑时结束实验,训练时程5次/d。造模前测定基础值,造模后各时间点记录5次。

1.7.3 mNSS改良神经功能评分 利用Chen等[9,10]改良神经功能评分法评定各时间点造模大鼠神经功能改变情况,0分为正常,18分为最高功能障碍。

1.8 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件处理,组间比较行单因素方差分析。

2 结果

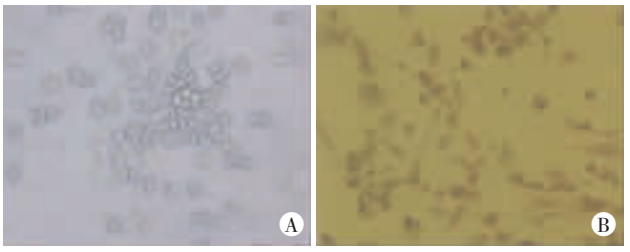
2.1 EPCs培养与移植结果

体外培养的EPCs呈梭形,贴壁生长线样排列,10 d时CD31和CD34免疫组化阳性细胞达90%以上。移入缺血半暗带的EPCs 3 d时增殖和迁移明显,7 d可见其索状排列和管状排列,14 d时增殖下降(图1)。

2.2 脑缺血周边区血管密度检测

MCAO组1 d时MVD较低,3 d时开始增高,14 d达高峰,30 d时有所下降。MCAO + VEGF组和MCAO + EPCs组除第1天外,其他各时间点均高于MCAO组($P<0.05$, $P<0.01$),

MVD 高峰期 MCAO + VEGF 组出现在 14 d,MCAO + EPCs 组出现在 7 d,二者高峰期持续到 30 d,60 d 时血管密度仍高于假手术组和 MCAO 组($P<0.05$)。MCAO + anti-VEGF 组除第 1 天外,其他各时间点均显著低于 MCAO 组($P<0.01$)。见表 1、图 2。



A:培养 10 d 内皮祖细胞(相差显微镜);B:培养 10 d CD34 阳性细胞(SABC)

图 1 EPCs 培养与鉴定结果 (×200)

2.3 大鼠运动诱发电位和体感诱发电位的测定

大鼠的 MEP 主要为两正相波组成,第 1 个波叫直接波又称 D 波,第 2 个波叫间接波或 I 波,实验观察 I 波的潜伏期和波幅变化。MCAO 组各时间点 MEP 潜伏期大于假手术组,波幅小于假手术组($P<0.01$),MCAO + VEGF 组和 MCAO + EPCs 组的 MEP 潜伏期与波幅在 1 d 和 3 d 时与 MCAO 组无统计学差异($P>0.05$),在以后各时间点波幅大于 MCAO 组,潜伏期小于 MACO 组($P<0.05$,$P<0.01$);而 MCAO + anti-VEGF 组在 7 d 后 MEP 潜伏期大于 MCAO 组,波幅小于 MCAO 组($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 2。

大鼠 SEP 由一些正相波和负相波组成,如 P1、N1、P2、N2。本实验观察的是 P1 潜伏期和 P1 ~ N1 的波幅。MCAO 组各时间点(60 d 波幅除外)SEP 潜伏期大于假手术组,波幅小于假手术组($P<0.01$);MCAO + VEGF 组和 MCAO + EPCs 组的 SEP 波幅在 7、14 d 和 30 d 时大于 MCAO 组,潜伏期小于 MACO 组($P<0.05$,$P<0.01$);而 MCAO + anti-VEGF 组在 7 d 后 SEP 潜伏期大于 MCAO 组($P<0.05$,$P<0.01$),波幅小于 MCAO 组($P<0.01$)。见表 3。

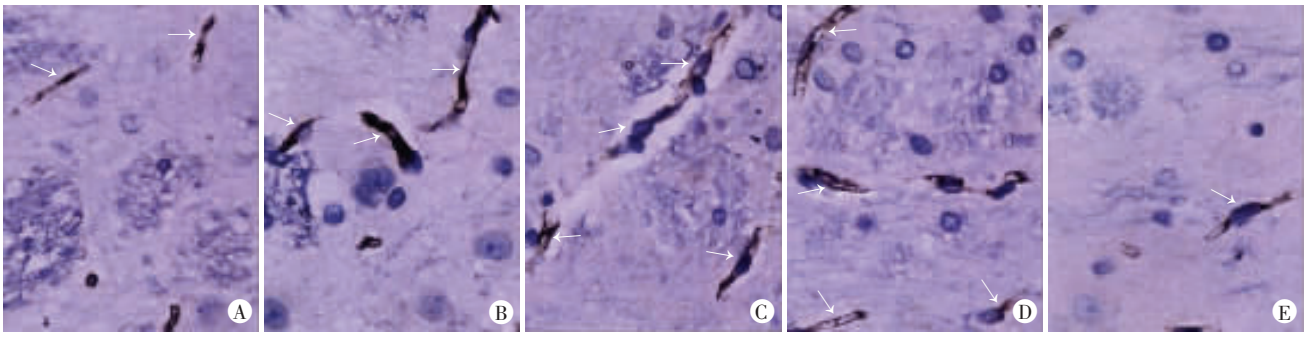
2.4 大鼠行为学检测

MCAO 组在各时间点感觉损伤移交实验时间明显长于假手术组,而跑步测定时间短于假手术组,mNSS 评分大于假手术组($P<0.05$,$P<0.01$);MCAO + VEGF 组和 MCAO + EPCs 组 3 项行为学检测在 3 d 后各时间点与 MCAO 组有统计学差异($P<0.05$,$P<0.01$);MCAO + anti-VEGF 组在 14 d 后感觉损伤移交实验时间长于 MCAO 组($P<0.05$),3 d 跑步测定时间短于 MCAO 组($P<0.05$),mNSS 评分大于 MCAO 组($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 4 ~ 6。

表 1 不同时间点各组大鼠的脑缺血周边区血管密度(%,$\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
假手术组	0.64 ±0.11	0.63 ±0.09	0.65 ±0.14	0.63 ±0.08	0.64 ±0.09	0.62 ±0.04
MCAO 组	0.28 ±0.08^{b}	0.62 ±0.21	0.77 ±0.15^{a}	0.85 ±0.14^{b}	0.67 ±0.06	0.64 ±0.11
MCAO + VEGF 组	0.27 ±0.04^{b}	0.70 ±0.15^{ac}	0.83 ±0.22^{bc}	0.94 ±0.17^{bc}	0.90 ±0.16^{bd}	0.75 ±0.12^{ac}
MCAO + EPCs 组	0.28 ±0.09^{b}	0.79 ±0.09^{bc}	0.95 ±0.16^{bd}	0.94 ±0.15^{bd}	0.93 ±0.13^{bd}	0.78 ±0.08^{ac}
MCAO + anti-VEGF 组	0.28 ±0.05^{b}	0.30 ±0.01^{bd}	0.53 ±0.01^{ad}	0.42 ±0.08^{bd}	0.31 ±0.08^{bd}	0.27 ±0.05^{bd}

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 MCAO 组比较



↑:阳性细胞聚集处 A:假手术组;B:MCAO 组;C:MCAO + VEGF 组;D:MCAO + EPCs 组;E:MCAO + anti-VEGF 组

图 2 14 d 时大鼠皮层缺血周边区 CD34 的表达 (S-P ×200)

表 2 各组各时间点大鼠 MEP 的潜伏期(ms)与波幅(μV)($\bar{x}\pm s$,$n=8$)

组别		1 d	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
假手术组	潜伏期	1.70 ±0.03	1.72 ±0.04	1.68 ±0.01	1.74 ±0.08	1.77 ±0.05	1.72 ±0.06
	波幅	60.54 ±2.15	61.08 ±0.79	59.24 ±1.98	60.87 ±2.48	58.97 ±0.94	60.55 ±1.38
MCAO 组	潜伏期	15.04 ±0.84^{b}	13.54 ±0.68^{b}	10.32 ±0.92^{b}	8.34 ±0.64^{b}	5.89 ±0.91^{b}	4.32 ±0.35^{b}
	波幅	9.86 ±0.62^{b}	13.54 ±1.64^{b}	15.51 ±3.39^{b}	19.71 ±2.83^{b}	27.14 ±4.47^{b}	42.36 ±8.21^{b}
MCAO + VEGF 组	潜伏期	15.28 ±0.81^{b}	12.63 ±0.77^{b}	6.24 ±0.68^{bd}	5.48 ±0.62^{bc}	4.12 ±0.59^{bc}	2.60 ±0.18^{ad}
	波幅	10.28 ±1.51^{b}	14.14 ±1.13^{b}	26.35 ±7.71^{bd}	30.55 ±6.27^{bd}	45.16 ±6.57^{bd}	52.54 ±6.68^{ac}
MCAO + EPCs 组	潜伏期	14.75 ±0.43^{b}	12.68 ±0.95^{b}	6.32 ±0.57^{bd}	5.07 ±0.63^{bd}	3.68 ±0.38^{bd}	2.04 ±0.17^{ad}
	波幅	11.24 ±0.95^{b}	14.88 ±1.72^{b}	28.54 ±2.85^{bd}	33.42 ±3.91^{bd}	43.88 ±7.29^{bd}	52.61 ±4.46^{ad}
MCAO + anti-VEGF 组	潜伏期	15.06 ±0.95^{b}	13.57 ±0.99^{b}	13.24 ±0.59^{bc}	12.76 ±064^{bd}	9.41 ±0.52^{bd}	7.64 ±0.87^{bd}
	波幅	9.64 ±1.13^{b}	13.06 ±0.97^{b}	15.21 ±2.13^{bc}	17.31 ±2.65^{bc}	20.14 ±1.66^{bd}	33.34 ±4.46^{bd}

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 MCAO 组比较

表3 各组各时间点大鼠SEP的P1波峰潜伏期(ms)与P1~N1波幅(μV)($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别		1 d	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
假手术组	潜伏期	15.54±0.88	15.82±0.59	14.97±0.99	16.01±0.54	15.40±0.62	15.71±0.87
	波幅	53.27±1.14	54.33±0.71	52.63±0.58	54.47±0.51	53.34±0.95	52.39±0.77
MCAO组	潜伏期	31.24±2.57^{b}	27.30±4.44^{b}	25.13±1.77^{b}	21.32±4.17^{b}	20.34±2.55^{b}	18.34±2.10
	波幅	5.61±0.84^{b}	5.81±0.64^{b}	11.55±1.38^{b}	20.06±3.82^{b}	42.56±3.39^{bc}	53.34±5.57
MCAO+VEGF组	潜伏期	30.57±5.40^{b}	26.41±3.14^{b}	22.21±3.31^{bc}	18.54±2.35^{ac}	17.18±1.28^{bd}	16.49±2.12^{ac}
	波幅	5.24±0.93^{b}	12.15±1.16^{bd}	22.87±5.71^{bd}	42.37±5.21^{bd}	53.37±4.66^{d}	54.16±3.83
MCAO+EPCs组	潜伏期	29.37±3.95^{b}	27.33±1.96^{b}	21.08±4.16^{bc}	19.23±3.35^{bc}	18.21±1.92^{bc}	17.23±1.25^{ac}
	波幅	5.71±0.31^{b}	6.42±0.82^{bd}	23.19±1.89^{bd}	38.51±4.26^{bd}	52.94±6.18^{d}	55.09±3.71
MCAO+anti-VEGF组	潜伏期	32.51±5.93^{b}	29.23±5.58^{b}	27.54±2.71^{bc}	26.53±5.41^{bd}	22.76±3.47^{bc}	22.01±1.53^{bd}
	波幅	5.21±0.64^{b}	5.24±1.15^{b}	6.34±0.33^{bd}	15.32±1.42^{bd}	27.16±2.06^{bd}	31.07±3.18^{bd}

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与MCAO组比较

表4 各组各时间点大鼠感觉损伤移交实验(s, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
假手术组	4.31±0.04	5.06±0.03	4.19±0.01	5.11±0.03	4.99±0.02	4.76±0.02
MCAO组	181.09±7.31^{b}	163.57±7.96^{b}	158.26±10.15^{b}	105.34±4.39^{b}	63.77±1.21^{b}	13.30±2.66^{b}
MCAO+VEGF组	179.65±9.97^{b}	159.35±10.36^{b}	110.61±11.15^{bc}	58.67±3.52^{bd}	15.58±1.20^{bd}	6.87±0.39^{ac}
MCAO+EPCs组	178.35±12.18^{b}	138.21±9.31^{bc}	97.24±6.95^{bd}	60.12±5.91^{bd}	18.89±3.37^{bd}	8.35±0.75^{bd}
MCAO+anti-VEGF组	176.95±13.38^{b}	168.29±9.76^{b}	168.38±8.84^{b}	140.72±7.90^{bc}	95.84±13.71^{bd}	43.16±1.93^{bd}

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与MCAO组比较

表5 各组各时间点大鼠跑步测定实验(s, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
假手术组	298.19±11.26	244.38±8.57	267.08±10.82	285.34±2.99	288.67±8.81	300.14±11.60
MCAO+组	30.55±2.21^{b}	95.57±6.54^{a}	137.35±11.33^{b}	155.21±9.94^{b}	199.24±22.04^{b}	222.24±18.51^{a}
MCAO+VEGF组	28.56±2.14^{b}	91.22±5.12^{b}	161.28±12.56^{bc}	204.17±10.54^{ad}	250.19±9.96^{ad}	289.26±9.96^{c}
MCAO+EPCs组	31.05±5.31^{b}	121.55±7.39^{bd}	188.29±20.94^{bd}	230.61±11.84^{ad}	243.69±15.82^{bd}	263.31±12.15^{ac}
MCAO+anti-VEGF组	29.66±2.07^{b}	50.11±6.83^{bd}	103.38±5.57^{bc}	140.77±7.88^{bc}	155.24±9.76^{bc}	177.26±5.24^{bd}

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与MCAO组比较

表6 各组各时间点大鼠mNSS改良神经功能评分($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	30 d	60 d
假手术组	0.01±0.00	0.05±0.01	0.02±0.00	0.04±0.01	0.00±0.00	0.02±0.01
MCAO组	12.33±0.64^{b}	9.63±0.02^{b}	7.71±0.93^{b}	5.31±0.49^{b}	3.64±0.04^{b}	1.24±0.01^{b}
MCAO+VEGF组	11.37±0.92^{b}	8.22±0.11^{bc}	5.24±0.06^{bd}	2.31±0.35^{bd}	1.54±0.02^{bd}	0.62±0.01^{bc}
MCAO+EPCs组	12.94±0.71^{b}	8.06±0.19^{bd}	4.82±0.15^{bd}	2.11±0.42^{bd}	1.81±0.05^{bd}	0.82±0.01^{bc}
MCAO+anti-VEGF组	11.44±0.07^{b}	10.35±0.85^{bc}	9.67±0.38^{bd}	8.21±0.48^{bd}	8.17±0.09^{bd}	3.01±0.05^{bd}

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与MCAO组比较

3 讨论

在缺血性疾病中,缺血组织机能改善依赖于新生血管的重建,促进新血管形成同样可能减轻缺血性脑损伤。已有实验证实在脑缺血患者中,缺血侧半球微血管密度较病灶对侧明显增多,且半暗带区微血管数量与卒中患者的生存时间可能存在正相关性,但是目前还没有直接证据表明新血管生成减轻了组织损伤[11]。本实验结果显示,缺血后大鼠的脑缺血半暗区在3 d时出现血管新生增加,且随时间增加血管新生增加明显,14 d时达到高峰,利用VEGF和EPCs干预的脑缺血模型大鼠的新生血管明显高于MCAO组,且行为学和电生理也显示其神经功能缺损恢复好于MCAO组,而MCAO+anti-VEGF组减少脑缺血半暗区血管的新生,神经功能缺损恢复较差。这提示在脑缺血发生后促进缺血区血管新生,可以加速脑缺血后神经功能缺损的恢复。

VEGF是血管新生过程中关键性介质,脑梗死发生后血清中VEGF明显增加[12],而脑缺血区VEGF及其受体表达与血管内皮细胞的增殖情况一致[13]。曾有研究表明,将重组人VEGF165注射到大鼠局灶性栓塞模型中,48 h可见缺血区血管新生明显增加[12]。这与本实验的结果相似,而且血管新生的发生主要在3 d后,在14 d达到高峰,这说明外源性血源新生的干预要在早期实施。1997年Asahara等[14]首次证明成熟个体的循环外周血中存在能分化为血管内皮细胞的前体细胞。现在研究证明,循环中EPCs在局部缺血的刺激下向局部迁移,参与局部的血管发生。本实验将培养后的EPCs注入到MCAO模型大鼠的缺血半暗区后发现血管新生增加,且在7 d即达到血管发生高峰,且持续到60 d,这可以说明一次性的EPCs定向移植即可以达到增加指定缺血区的血管新生。抗VEGF165是一种选择性的VEGF抑制剂,可以通过抑制VEGF作用,从而减少血管新生。本实验也可以看到抗VEGF165干预脑缺血后缺血半暗区血管新生减少。

行为学可以反应大鼠的感觉和运动功能的状态,

改良的 mNSS 可评分可以更全面地了解大鼠的行为变化。诱发电位是评价感觉运动功能比较客观、灵敏的方法,被广泛应用于神经功能的评价[15,16]。在本实验中可看到,利用促进血管生成的干预方法可以加快缺血模型大鼠行为学和电生理各项指标的恢复,这可以说明脑缺血时缺血及周边区的血管新生有利于神经功能的恢复。这可能是血管新生的增加,改善了受损神经元的小生境,建立有效的"血管神经单元"[17],有利于神经再生的发生[18],同时也减少了神经元的凋亡发生[19],从而加速了神经功能的恢复。

在脑部,VEGF 被认为是瘤周血管源性脑水肿的主要介质[20]。在局灶性脑缺血后不久,就出现血管通透屏障的渗漏,继发脑水肿,VEGF 表达高峰出现在缺血后血管源性脑水肿最重的时期,故 VEGF 高表达与血脑屏障开放、脑水肿形成有重要联系。有研究发现,在脑梗死后超早期给予外源性 VEGF 会引起血脑屏障的通透性增加,增加脑组织水肿、增加脑梗死后的出血转换[2]。也有研究发现[12],VEGF 作用结果与剂量有密切关系,并且局部高浓度的 VEGF 可能诱导血管过度生成和血管瘤形成。因此何时、如何干预脑缺血患者的血管新生,控制理想的 VEGF 浓度,减少其副作用,以达到有利于神经功能恢复的 VEGF/VEGFR 系统激活状态,需进一步研究,但可以肯定地说,在全身应用 VEGF 时不可避免地会促进成瘤性和肿瘤转移等副反应。EPCs 可以在自体外周血中提取并可以成功培养增殖,定向移入缺血半暗区可以减少其全身效应。移植后可向缺血区定向迁移且在参与血管新生的同时,在局部分泌神经营养因子,这些因子能诱导新神经元形成[21],从而加速了脑缺血后神经功能的恢复。在本实验中我们发现脑缺血发生后一次性 EPCs 的移植即可达到多次 VEGF 注射用药的效果,且较早地出现血管密度高峰,这可以说,EPCs 移植治疗脑缺血性疾病其可靠性更强。

从本实验我们可以看出,在发生缺血性脑血管病时,给予血管新生的干预是有必要的,但选择何种干预方法,何时干预还有必要进一步研究,但自体 EPCs 定向移植可能是一种较为理想的方法。

参考文献:

[1] Manoonkitiwongsa P S, Jackson-Friedman C, McMillan P J, *et al*. Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(10): 1223-1231.

[2] Zhang Z G, 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.

[3] Harrigan M R, Ennis S R, Sullivan S E, *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.

[4] 王肃生, 冀航, 梁刚, 等. 鼠外周血内皮祖细胞体外培养鉴定与诱导分化[J]. 中国美容整形外科杂志, 2007, 18(3): 237-239.

[5] 杨东波, 李永利, 杨立庄, 等. 神经干细胞脑室内移植治疗大鼠脑缺血的实验研究[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2006, 11(1): 27-29.

[6] Chen J, Li Y, Wang L, *et al*. Caspase inhibition by Z-VAD increases the survival of grafted bone marrow cells and improves functional outcome after MCAO in rats[J]. J Neurol Sci, 2002, 199(1/2): 17-24.

[7] Honma T, Honmou O, Lihoshi S, *et al*. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat[J]. Exp Neurol, 2006, 199(1): 56-66.

[8] Iihoshi S, Honmou O, Houkin K, *et al*. A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats[J]. Brain Res, 2004, 1007(1/2): 1-9.

[9] Chen J, Li Y, Zhang R, *et al*. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis[J]. Brain Res, 2004, 1005(1/2): 21-28.

[10] Zhang J, Li Y, Chen J, *et al*. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells[J]. Brain Res, 2004, 1030(1): 19-27.

[11] 吴以岭. 血管保护——脑梗死治疗的新靶点[J]. 疑难病杂志, 2006, 5(5): 356-358.

[12] 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.

[13] Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, *et al*. VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct[J]. Storke, 1996, 27(10): 1865-1873.

[14] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, *et al*. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization[J]. Circ Res, 1999, 85(3): 221-228.

[15] Dyer R S. The use of sensory evoked potentials in toxicology[J]. Fundam Appl Toxiol, 1985, 5(1): 24-40.

[16] Vanicky I, Ondrejcak T, Ondrejcakova M, *et al*. Long-term changes in spinal cord evoked potentials after compression spinal cord injury in the rat[J]. Cell Mol Neuorbiol, 2006, 26(7/8): 1521-1539.

[17] Sun F Y, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor[J]. J Neorusci Res, 2005, 79(1/2): 180-184.

[18] 谭新杰, 胡长林, 蔡文琴, 等. 成年大鼠局灶性脑梗死后齿状回神经元前体细胞的发生研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(15): 1575-1577.

[19] 富奇志, 齐志国, 朱晓峰, 等. 血管内皮祖细胞对共同植入缺血再灌注模型大鼠脑内的神经干细胞增殖、凋亡和血管形成的调节[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6): 511-515.

[20] 于冬梅, 阎晓初, 郭德玉, 等. VEGF 和 nm23 蛋白在膀胱移行细胞癌中表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(21): 2180-2182.

[21] 胡越, 蒋莉, 张晓萍. 持续惊厥后海马神经营养因子表达及其影响因素[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1663-1666.

(**收稿**:2009-10-18;**修回**:2009-11-10)

(编辑 王 红)