文章编号:1000-5404(2011)02-0137-04

论著

血管内皮生长因子在蛛网膜下腔出血大鼠早期脑损伤中的作用机制

田艳霞[1],李 冉[1],高俊玲[1],刘 江[2],张宇新[2],崔建忠[3],秦 川[4],姚亚琳[5] (063009 河北 唐山,华北煤炭医学院:组织学与胚胎学教研室[1],解剖学教研室[2];063000 河北 唐山,唐山工人医院神经外科[3];100021 北京,中国医学科学院医学实验动物研究所[4];067000 河北 承德,承德医学院附属医院康复科[5])

【摘要】 **目的** 探讨血管内皮生长因子(VEGF)在蛛网膜下腔出血(SAH)后早期脑损伤中的分子机制。**方法** 采用非开颅血管内穿线法制备大鼠SAH模型,108只大鼠按随机数字表法分为正常对照组($n=36$)、假手术组($n=36$)、模型组($n=36$),术后行神经功能评分,分别在伤后12、24、48 h 3个时相点取脑组织标本,HE染色及电镜观察右侧海马CA1区组织学变化,采用免疫组织化学法、免疫印迹法检测VEGF的表达,TUNEL法检测凋亡细胞表达。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠神经功能评分均显著降低($P<0.05$),神经细胞内细胞器、轴索及毛细血管等超微结构明显受损,存活数目明显降低。模型组(12、24、48 h)大鼠VEGF阳性反应均有不同程度增强($P<0.05$),随出血时间延长(12、24、48 h),凋亡细胞增多($P<0.05$),并于48 h达高峰。SAH 12~48 h海马区VEGF与TUNEL表达呈正相关($r=0.847$, $P<0.01$)。**结论** SAH后VEGF高表达可促进神经细胞凋亡,参与SAH后早期脑损伤的病理进程。

【关键词】 蛛网膜下腔出血;血管内皮生长因子;细胞凋亡
【中图法分类号】 R363.27;R742.02;R743.35 **【文献标志码】** A

Role of VEGF in earlier injured brain of rats after subarachnoid hemorrhage and underlying mechanism

Tian Yanxia[1], Li Ran[1], Gao Junling[1], Liu Jiang[2], Zhang Yuxin[2], Cui Jianzhong[3], Qin Chuan[4], Yao Yalin[5] ([1]Department of Histology and Embryology, [2]Department of Anatomy, North China Coal Medical College, Tangshan, Hebei Province, 063009; [3]Department of Neurosurgery, Worker's Hospital, Tangshan, Hebei Province, 063000; [4]Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing, 100021; [5]Department of Physiatry, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei Province, 067000, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the molecular mechanism of vascular endothelial growth factor (VEGF) for early brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH). **Methods** A total of 90 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups, control group ($n=30$), sham operation group ($n=30$), and SAH group ($n=30$). SAH model was established by endovascular perforation without opening cranium, and then neurological score was determined. At different time points (12, 24, and 48 h) after operation, the tissues of hippocampus CA1 area were sampled. The histopathological changes of cerebral tissue were observed by HE staining, and ultrastructural changes by electron microscopy. The expression of VEGF were determined by immunohistochemical staining and Western blot analysis. The apoptosis of nerve cell were detected by TUNEL. **Results** In SAH group, the neurological function scores were significantly lower ($P<0.05$). The axons and capillaries in SAH group were obviously damaged, the living neurons were much lesser than in sham group, the VEGF level was significantly enhanced ($P<0.05$), and a lot of apoptosis cells were observed and their number reached a peak at 48 h ($P<0.05$). The expression of VEGF was positively correlated with the TUNEL positive cells after SAH ($r=0.847$, $P<0.01$). **Conclusion** VEGF contributes to early brain injury, and the increased expression of VEGF in hippocampal CA1 may induce neuronal apoptosis following SAH.

【Key words】 subarachnoid hemorrhage; vascular endothelial growth factor; apoptosis

Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2009001247), the Key Project of Department of Education of Hebei Province (ZH200803) and the Opening Fund of Key Laboratory of Comparative Medicine for Human Diseases of Ministry of Health (ZDS200801). Corresponding author: Gao Junling, E-mail: junlinggao@163.com

【基金项目】 河北省自然科学基金(C2009001247);河北省教育厅重点课题(ZH200803);卫生部人类疾病比较医学重点实验室开放课题(ZDS200801)
【通信作者】 高俊玲,E-mail:junlinggao@163.com

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后神经细胞凋亡在其病理机制中起重要作用[1-2],严重影响SAH患者的预后[3]。研究证实,SAH后血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在血性脑脊液和脑组织中的浓度升高,目前国内研究多集中于VEGF通过调控新生血管的形成对脑损伤后的神经保护作用[4],对于其在SAH中的损伤机制甚少报道。出血后VEGF的表达有何意义,是否参与神经细胞凋亡而促进其病理进程,目前尚无一致意见。本实验利用SAH大鼠模型,对出血后VEGF表达的时相变化与神经细胞凋亡的关联进行研究,旨在探讨SAH早期脑损伤中的分子机制,以期为临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

大鼠VEGF单克隆抗体(Santa Cruz公司),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/兔抗小鼠IgG (Sigma公司),预染蛋白Marker(灏洋生物),TUNEL试剂盒(Roche公司)。

1.2 实验动物和分组

健康雄性SD大鼠[北京维通利华动物中心,动物合格证号SCXK(京)2002-2003]108只,6月龄,体质量310~320 g,按随机数字表法分为3组:正常对照组36只;假手术组36只,SAH模型组36只,各组分为12、24、48 h 3个时相点。每组15只用于HE和免疫组织化学显色,15只提取脑组织匀浆用于免疫印迹法分析,另6只用于透射电镜检测。

1.3 SAH模型的制备

参照文献[5]的方法并略作改良,手术显微镜下,自大鼠右侧颈外动脉经颈内动脉导入直径0.236 mm单纤维尼龙线,至ACA与MCA的分叉处,刺破动脉壁,总进入长度为(18.0±0.5)mm。假手术组将尼龙线只送至ACA与MCA分叉处,稍感阻力即停止继续插入,并迅速退出尼龙线,结扎ECA的断端并缝合皮肤,单笼饲养。

1.4 神经功能检测评分

参照文献[6]方法并改进,每天1次。神经功能检测总分为3~21分。其中运动功能检测0~12分,感觉功能检测3~9分。

1.5 组织学检查

3组动物分别于SAH后12、24、48 h再次麻醉开胸,70 mmHg压力下经左心室灌注等渗盐水至流出液体清亮,4%多聚甲醛PBS(pH 7.2~7.4)缓冲液250 ml灌注,断头取脑,在两耳极连线前6 mm、后10 mm处,分别冠状切开脑组织,入4%多聚甲醛后固定室温2 h,入4 ℃ 20 %蔗糖磷酸盐缓冲液,应用恒冷箱切片机连续冠状切片,片厚20 μm。切片行HE染色,光镜下(×400)观察出血侧皮质区病理改变。

1.6 脑组织超微结构观察

各时间点将动物快速断头取脑,冰台上分离大脑皮质,取右侧海马区组织并切成1 mm ×1 mm ×1 mm组织块,40 ml/L戊二醛固定,0.1 mol/L二甲砷酸缓冲液冲洗2遍,再经10 ml/L四氧化锇固定,冲洗后逐级丙酮脱水,环氧树脂浸透,包埋,超薄切片,醋酸铀枸橼酸铅双重染色,透射电镜观察脑组织超微结构的变化。

1.7 免疫组织化学显色

切片用3% H_2O_2去离子水孵育5~15 min,蒸馏水冲洗,PBS浸泡5 min,滴加正常血清室温15 min,封闭非特异性抗原,滴加一抗VEGF(1∶200)4 ℃过夜,PBS冲洗,滴加二抗室温15 min,PBS冲洗,滴加SP室温反应15 min,DAB显色。CMIAS真彩色医学图像分析系统进行光密度测定,计算切片标本的平均光密度值。

1.8 免疫印迹法半定量分析

各时间点将动物快速断头取脑,分离右侧海马置于4 ℃预冷的全细胞裂解液0.6 ml冰水浴中匀浆,12 000 r/min 4 ℃离心5 min,取上清液。以考马斯亮蓝G250结合法蛋白定量,-80 ℃保存备用。取15 μg蛋白样本加入2×SDS凝胶加样缓冲液,煮沸5 min,6 000 r/min离心3 min,取上清液上样,电泳后将凝胶上的蛋白转移至PVDF膜,转膜后室温下封闭2 h,将PVDF膜放入杂交袋,分别加入一抗(VEGF,1∶800稀释)4 ℃过夜,加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG (1∶1 500稀释)和预染蛋白Marker,室温下振荡孵育1 h,滤膜漂洗后加入DAB显色。结果经计算机扫描后,自动图像分析系统进行半定量分析,在同一条件下测定目标条带整合光密度值,计算出各组样品目标条带与内参(β-actin)的整合光密度比值。

1.9 TUNEL法检测细胞凋亡

石蜡切片常规脱蜡至水。滴加蛋白酶K胃蛋白酶复合消化液1滴,4 ℃消化30 min,洗涤后滴加TUNEL标记反应混合液20 μl,阴性对照只加等量核苷酸反应液不含酶,37 ℃孵育1 h,滴加POD-转化液20 μl,37 ℃孵育30 min,DAB显色。细胞核中有黄褐色颗粒者为凋亡细胞。所有切片于光镜下(×200)随机计数阳性细胞数。

1.10 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示,使用SPSS 12.0统计软件,组间比较采用单因素方差分析及LSD-t检验,两指标间相关性用简单相关分析。

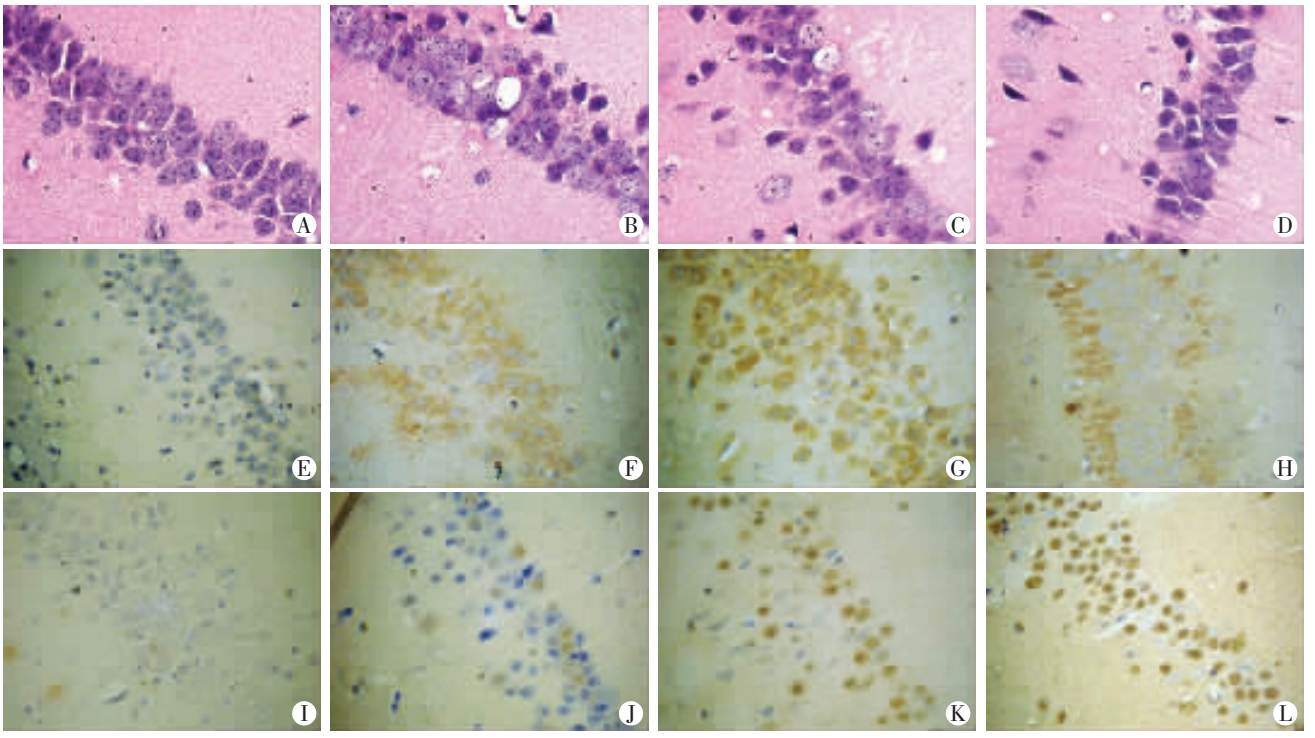
2 结果

2.1 神经功能评分检测

SAH术后大鼠术侧对侧的面部触觉、胡须触觉与耳后皮肤触觉等局部感觉受损;攀爬能力、平衡能力与本体感觉等均下降。双前肢伸直不对称,部分大鼠提尾令其前行时向左侧倾斜。与假手术组比较[(21.00±0.00)分],模型组[24、48 h分别为(6.59±1.89)、(6.53±1.86)分]小鼠神经功能评分均显著降低($P<0.05$)。

2.2 SAH对不同时间点海马CA1区神经元形态学的影响

假手术组海马CA1区神经元排列整齐,结构完整,核仁及尼氏体清楚。模型组12 h出现少量变性坏死神经元,部分细胞肿胀,24 h肿胀神经元减少,部分细胞皱缩,细胞周间隙增大,



A、E、I：假手术组；B、F、J：模型组 12 h；C、G、K：模型组 24 h；D、H、L：模型组 48 h

图 1　SAH 后海马区脑组织切片 HE 染色(A～D)、VEGF 免疫组化染色(E～H)及 TUNEL 染色(I～L)观察　(×400)

呈杆状或三角形外观，48 h 变性神经元进一步增多，部分神经元细胞核固缩深染，突起明显深染变长，存活神经元数目明显减少。SAH 模型组 12、24、48 h 存活神经元数目分别为对照组的 61%、58%、51%($P<0.05$，图 1A～D)。

2.3　脑组织超微结构变化

假手术组神经元内可见正常细胞器。模型组神经元高尔基体扩张呈泡状，多聚核糖体解聚，高度肿胀、线粒体嵴断裂或空泡化，双膜结构模糊或外膜破裂、消失，细胞器稀疏，细胞不同程度固缩，细胞质、细胞核电子密度增高，轴索变性、断裂。血管内皮细胞肿胀，基膜松散甚至分离。

2.4　SAH 对不同时间点海马 CA1 区 VEGF 免疫反应阳性细胞和凋亡细胞的影响

假手术组偶见 VEGF 免疫反应阳性细胞和凋亡细胞。与假手术组相比，模型组 12 h 可见大量细胞质表达的 VEGF 免疫反应阳性细胞，24 h 达高峰，48 h 显著降低，但仍高于基础水平($P<0.05$，图 1E～H，表 1)；模型组 12 h 可见散在分布的凋亡细胞，核呈棕黄色，染色不均或染色质聚集，呈深棕色颗粒状，48 h 达高峰($P<0.05$，图 1I～L，表 1)。

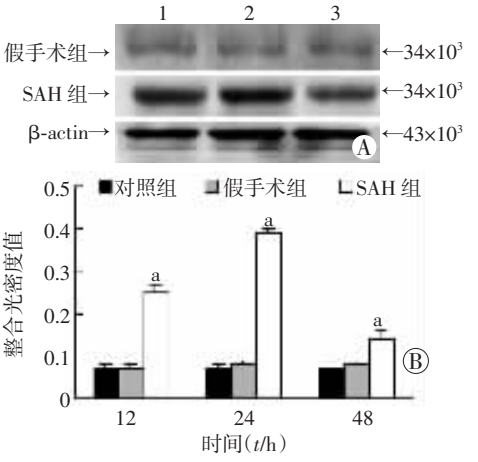
表 1　大鼠 SAH 后各时间点海马区 VEGF 光密度值及凋亡细胞数分析($n=6$，$\bar{x}\pm s$)

组别	VEGF			凋亡细胞数		
	12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
对照组	0.09±0.12[a]	0.10±0.08[a]	0.09±0.17[a]	1.29±0.03[a]	1.31±0.03[a]	1.32±0.13[a]
假手术组	0.10±0.15[a]	0.10±0.09[a]	0.10±0.10[a]	1.30±0.03[a]	1.33±0.12[a]	1.35±0.10[a]
SAH 组	0.47±0.14	0.81±0.08	0.26±0.13	11.25±0.01	33.66±0.67	58.17±0.17

a：$P<0.05$，与 SAH 组比较

2.5　SAH 对不同时间点海马 CA1 区 VEGF 蛋白的影响

在预染蛋白标准约 34 000 处，可见 VEGF 特异性蛋白条带，蛋白免疫印迹法与免疫组织化学法检测结果一致。正常对照组及假手术组仅有微量 VEGF 表达。模型组 12 h 其条带整合光密度值明显增加，24 h 达高峰，48 h 显著降低，但仍高于基础水平($P<0.05$，图 2)。



A：定性分析　1：12 h；2：24 h；3：48 h；B：定量分析

a：$P<0.05$，与对照组比较

图 2　Western blot 检测 SAH 后不同时间点 VEGF 蛋白在各组海马 CA1 区的表达

2.6　相关性分析

术后 12～24 h 海马 CA1 区 VEGF 表达与凋亡细胞数呈正相关($r=0.847$，$P<0.01$)。

3　讨论

VEGF 不仅能够促进血管内皮细胞的生成，而且

在脑损伤的发生、发展中可能起着重要作用。研究证实出血后VEGF在血性脑脊液中的浓度和在脑组织中的表达均有增强[7]，可导致血-脑屏障(blood-brain barrier,BBB)渗透性增加,BBB的功能异常导致脑水肿,并且造成颅内压(intracranial pressure,ICP)升高和微循环改变[8],促成SAH后早期脑损伤,阻断VEGF与受体结合1 d后脑水肿减轻[9]。本实验中正常对照组及假手术组脑组织中偶见VEGF的表达。Harrigan等[10]对鼠神经胚胎发育中VEGF表达的研究表明,神经胚胎形成过程中VEGF在时间或空间上均有高表达,诱导新生毛细血管的生成,而在神经胚胎发育成熟后,血管形成停滞,VEGF表达极低。本研究发现SAH 12 h脑组织中即有大量VEGF表达,48 h仍高于基础水平,3组大鼠神经功能评分存在显著差异,TUNEL染色阳性细胞增加,提示在病理情况下,这些分子学改变可引起神经功能缺陷,随着VEGF长时程激活,其持久的表达可能促进了神经细胞凋亡的发生。

本实验结果证实,实验性SAH后神经细胞凋亡与早期脑损伤的形成有密切联系,其机制之一可能是VEGF过度激活参与了SAH病理进程。在犬注血SAH模型中,Zubkov等[11]观察到注血后第3天内皮细胞开始出现核染色体边集浓缩、胞膜芽生出泡和细胞质浓缩等凋亡样改变,并且上述病理改变的程度和范围与脑血管损伤程度和时程相一致,提示凋亡在SAH病理过程中起重要作用。本实验中术后12～48 h VEGF免疫反应阳性细胞数和凋亡细胞数相关分析显示二者呈高度正相关,由此推论本次实验条件下,VEGF的激活可导致细胞凋亡。VEGF的表达高峰(24 h)早于TUNEL阳性标记高峰(48 h),说明VEGF激活的发生和出现时间早于凋亡,它是凋亡前细胞破坏的酶释放过程,提示应用此指标可以预测和检测凋亡发生的时间和程度。VEGF迅速活化、持续性激活的特征提示,动力学和时程变化可能是影响细胞状态的主要因素,提示控制诱发因素、减短VEGF活化时间是抑制凋亡发生的关键。

本实验从TUNEL染色阳性细胞出现到SAH 48 h,在大脑的一定区域(CA1区)凋亡存在并渐呈上升趋势,证明SAH导致的细胞凋亡有明显的空间和时间性。这种特性与SAH后VEGF激活态的变化有何联系,VEGF在其后触发神经细胞凋亡的进程中究竟发挥了怎样的转导功能？研究显示出血后VEGF及其受体的激活可以导致丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)系统中的3个亚族发生磷酸化,通过转导通路参与细胞的凋亡。Zhou等[12]认为SAH后血管壁的细胞凋亡和在此基础上出现的血管壁增生及构建,可能与脑血管痉挛的发生和持续有关。本实验表明在SAH早期脑损伤的病理条件下,VEGF水平的过量表达,可能直接或通过转导通路间接参与神经细胞凋亡的进程[13]。

目前对于SAH的基础研究局限于迟发性血管痉挛和继发性损害等方面,我们的实验显示,出血后早期脑损伤在SAH进展过程中的作用不可忽视,控制其分子通路上游启动子具有重要意义。

参考文献：

[1] Shantikumar S, Grant P J, Catto A J, *et al*. Elevated C-reactive protein and long-term mortality after ischaemic stroke: relationship with markers of endothelial cell and platelet activation[J]. Stroke, 2009, 40(3): 977-979.

[2] Guo Z, Sun X, He Z, *et al*. Role of matrix metalloproteinase-9 in apoptosis of hippocampal neurons in rats during early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. Neurol Sci, 2010, 31(2): 143-149.

[3] Sugawara T, Jadhav V, Ayer R, *et al*. Thrombin inhibition by argatroban ameliorates early brain injury and improves neurological outcomes after experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Stroke, 2009, 40(4): 1530-1532.

[4] 王立新, 尹瑞雪, 孙景波. 通心络对脑缺血再灌注损伤后神经巢蛋白及VEGF表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(12): 2131-2135.

[5] Gao J, Wang H, Sheng H, *et al*. A novel apoE-derived therapeutic reduces vasospasm and improves outcome in a murine model of subarachnoid hemorrhage[J]. Neurocrit Care, 2006, 4(1): 25-31.

[6] Dunn L T, Stewart E, Murray G D, *et al*. The influence of apolipoprotein E genotype on outcome after spontaneous subarachnoid hemorrhage: a preliminary study[J]. Neurosurgery, 2001, 48(5): 1006-1010.

[7] Borel C O, McKee A, Parra A, *et al*. Possible role for vascular cell proliferation in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2003, 34(2): 427-433.

[8] Gupta R, Crago E A, Gallek M, *et al*. Reduced ipsilateral hemispheric cerebral blood flow at admission is predictive of vasospasm with infarction after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Neurocrit Care, 2008, 9(1): 27-30.

[9] Gerstner E R, Duda D G, di-Tomaso E, *et al*. VEGF inhibitors in the treatment of cerebral edema in patients with brain cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(4): 229-236.

[10] 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.

[11] Zubkov A Y, Ogihara K, Bernanke D H, *et al*. Apoptosis of endothelial cells in vessels affected by cerebral vasospasm[J]. Surg Neurol, 2000, 53(3): 260-266.

[12] Zhou C, Yamaguchi M, Colohan A R, *et al*. Role of p53 and apoptosis in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2005, 25(5): 572-582.

[13] 李冉, 秦川, 高俊玲. VEGF/ERK通路在蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛中的作用及机制探讨[J]. 现代预防医学, 2010, 37(12): 2292-2293, 2297.

(收稿 2010-09-08 修回 2010-10-15)
(编辑 张 维)