基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0020-03

血管生长素对大鼠脑缺血再灌注细胞凋亡的影响

赵亚锋[1,2],郭淮莲[1],程 敏[1]

(1.北京大学人民医院神经内科,北京 100044;2.北京大学首钢医院神经内科,北京 100043)

【摘 要】目的:观察腹腔注射重组人血管生长素(Recombinant human angiogenin,rhANG)对脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带区凋亡细胞数目的影响。方法:大鼠大脑中动脉栓塞2h再灌注72h制作脑缺血再灌注模型。大鼠分为假手术组、脑缺血对照组、rhANG腹腔注射组(15ng/100g体重)。采用凋亡细胞DNA原位末端标记法(TUNEL)检测凋亡细胞。结果:rhANG腹腔注射组与脑缺血对照组相比缺血半暗带区凋亡细胞数目差异无显著性($P>0.05$)。脑缺血对照组及rhANG腹腔注射组大鼠脑内缺血侧凋亡细胞数目明显多于非缺血侧。结论:腹腔注射rhANG(15ng/100g体重)对脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带区凋亡细胞数目无显著影响。

【关键词】血管生长素;脑缺血再灌注;大鼠;凋亡

【中国图书分类法分类号】R743 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Effects of angiogenin on apoptosis cells in the brain of rats with reversible-ischemic injury

ZHAO Ya-feng,et al

(*Department of Neurology,People's Hospital,Peking University*)

【Abstract】*Objective*:The purpose is to observe the change of the number of apoptosis cell in the reversible-ischemia rat brain after the intraperitoneal injection of rhANG. *Methods*:With the use of a reversible(middle cerebral artery occlusion (MCAO))model in rats,apoptosis cells were assessed by(terminal deoxynucleotedyl transferase(TdT))-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL) histochemical methods in sham,brain ischemia control and rhANG intraperitoneal injection groups.*Results*:There was no significant difference in the number of the apoptosis cell in the penumbra zone in the ischemic brain between the rhANG intraperitoneal injection group and the brain ischemia control group.The number of apoptosis cell in the ischemic lateral brain was increased significantly compared with the non-ischemia lateral in the brain ischemia control group and the rhANG intraperitoneal injection group. *Conclusion*:There was no significant difference in the number of the apoptosis cell in the penumbra zone in the ischemic rat brain after the intraperitoneal injection of rhANG(15ng/100g)compared with the control group.

【Key words】 Angiogenin (ANG);Brain reversible-ischemia;Rat;Apoptosis

近年来,随着对血管生成(Angiogenesis)和促血管生成因子(Angiogenic factors)研究的不断深入,治疗性血管生成(Theraputic angiogenesis)的概念日益受到重视,即利用促血管生成因子的促血管生成活性来治疗缺血性疾病[1]。VEGF及bFGF等促血管生成因子对脑缺血的保护作用已见报道[2,3]。血管生长素(Angiogenin,ANG)是由123个氨基酸组成的相对分子量为14.4kμ的碱性蛋白,具有很强的诱导新血管生成的作用[4],其对脑缺血的作脑缺血对照组及用如何,国内外尚未见报道。细胞凋亡在脑缺血后细胞死亡中起着重要作用[3]。本研究观察了腹腔注射rhANG对脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带区凋亡细胞数目的影响。

作者介绍:赵亚锋(1970-),男,主治医师,研究方向:脑血管病。

通讯作者:郭淮莲,女,副教授,E-mail:guoh@bjmu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

重组人血管生长素(rhANG)购自美国R&D公司。凋亡细胞检测采用神经细胞及组织原位凋亡检测试剂盒(美国R&D公司)。Leica DM RXA显微镜(德国)观察并照相。

1.2 实验动物

健康雄性SD大鼠,体重280~330g(由北京大学医学部实验动物科学部提供)。采用线栓法制作左侧大脑中动脉梗死模

型(Middle cerebral artery occlusion,MCAO)[5,6],缺血2h后拔出线栓恢复血流,实现再灌注。假手术组:切开皮肤,暴露及分离左侧颈总动脉及颈内动脉,但不插入线栓及结扎颈内动脉。

1.3 实验分组

大鼠随机分为3组:假手术组、缺血2h再灌注72h+腹腔注射生理盐水组(脑缺血对照组)、缺血2h再灌注72h+腹腔注射rhANG组(rhANG腹腔注射组),每组3只。

1.4 给药方法

rhANG腹腔注射组于手术完成后1h进行第1次腹腔注射rhANG,剂量为15ng/100g体重,ANG浓度为300ng/ml。脑缺血对照组按体重腹腔注射相同剂量的生理盐水。术后24h及48h分别进行第2次及第3次注射,剂量同第1次注射。

1.5 凋亡细胞标记

采用凋亡细胞DNA原位末端标记法(TUNEL)标记凋亡细胞。各组大鼠分别于缺血2h再灌注后72h时用10%水合氯醛(0.35g/kg)腹腔注射麻醉,左心室多聚甲醛灌流固定后取脑,置于4%多聚甲醛过夜,再依次置于20%和30%蔗糖中脱水,OCT包埋,冰冻切片,按照神经细胞及组织原位凋亡检测试剂盒操作步骤进行染色。

1.6 凋亡细胞计数

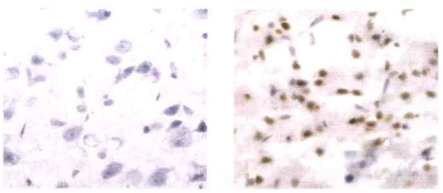
TUNEL组织化学染色结果在Leica DM RXA显微镜下观察并取图,选取缺血半暗带区(缺血边缘区额顶叶皮质上部、内侧尾壳核)500个细胞,计数其中的凋亡细胞数[8]。每只大鼠测量3张脑片,每张脑片选取固定相同的2个位置点。

1.7 统计学分析

实验结果采用SPSS11.5软件进行统计学分析。数据以均数±标准差表示。多组数据均数间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$认为有统计学意义。

2 结 果

显微镜下观察TUNEL染色结果显示:3组大鼠脑内非缺血侧细胞均染为蓝色;缺血侧非凋亡细胞为蓝色,凋亡细胞为棕色(见图1)。



A.非缺血侧脑;B.缺血侧脑;非凋亡细胞染为蓝色,凋亡细胞染为棕色(10×40)

图1 大鼠脑TUNEL染色

大鼠脑缺血2h再灌注72h,在缺血侧(左侧)脑内侧尾壳核(半暗带区)凋亡细胞比非缺血侧明显增多,非缺血侧每500个细胞中凋亡细胞数为0,脑缺血对照组缺血侧每500个细胞中凋亡细胞数为(242.3±86.3)个,rhANG腹腔注射组每500个细胞中凋亡细胞数为(159±14.5)个;假手术组大鼠左右两侧脑相应脑区均未发现凋亡细胞(表1)。

表1 TUNEL染色所示3组大鼠凋亡细胞计数结果

	缺血侧(左侧)	非缺血侧(右侧)
假手术组(n=3)	0±0	0±0
脑缺血对照组	242.3±86.3*	0±0
rhANG 腹腔注射	159.0±14.5*△	0±0

注:*$P<0.05$,与假手术组缺血侧比较;△$P>0.05$,与对照组比较

统计分析显示:rhANG腹腔注射组大鼠缺血侧(左侧)脑内凋亡细胞数比脑缺血对照组缺血侧降低,但差异未达显著性意义($P=0.09>0.05$)。rhANG腹腔注射组及脑缺血对照组缺血侧脑内凋亡细胞数均显著高于假手术组($P<0.05$)(见表1)。

3 讨 论

ANG是一种单链的碱性蛋白,属于核糖核酸酶超家族的一员,具有很强的促血管生成作用[4]。脑缺血后脑内血管生成情况与神经功能恢复之间的关系逐渐引起人们的注意。Krupinski等研究发现脑缺血病人脑内新生血管数目越多则生存时间越长[9]。大量证据显示凋亡是脑缺血后细胞死亡的重要机制。研究外源性促血管生成因子对脑缺血后细胞凋亡情况的影响,是对脑缺血治疗方法的新的探索。外源性bFGF及VEGF对脑缺血的保护作用已见报道[2,3,10]。ANG具有很强的促血管生成作用,外源性ANG可减轻心肌缺血及肢体缺血[1,11]。但ANG对脑缺血的作用尚未见报道。本研究利用大鼠脑缺血再灌注模型观察了腹腔注射重组人rhANG对大鼠脑缺血再灌注后缺血半暗带区神经细胞凋亡情况的影响。

本研究观察到rhANG腹腔注射组大鼠缺血侧脑内神经细胞凋亡数目与脑缺血对照组相比差别无显著性意义。rhANG腹腔注射组及脑缺血对照组大鼠缺血侧脑内凋亡细胞数均显著高于假手术组。

已有研究报道VEGF及bFGF等促血管生成因子对脑缺血具有保护作用[2,3]。本研究结果提示腹腔注

射外源性ANG后脑缺血大鼠脑内神经细胞凋亡数目未见显著性下降,可能与本研究中外源性ANG(rh ANG)的剂量、用药途径、样本量偏小及观察时间等有关。在今后的研究中可改变ANG用量及用药途径、增加样本量、采用不同时间点观察,对外源性ANG对脑缺血的作用进行进一步研究。

参 考 文 献

[1] 包俊敏,曹贵松,景在平.动脉注射血管生长素促进缺血肢体血管生长作用的研究[J].解放军医学杂志,2001;26(9):699-700.

[2] Kaya D,G ü rsoy-Ozdemir Y,Yemisci M,et al.VEGF protects brian against facal ischemia without increa sin g blood-brain permea bility when administered intracerebroventricularly[J]. J Cereb Blood Flow Metab,2005;25(9):1111-1118.

[3] Ay I,Sugimori H,Finklestein S.Intravenous basic fibrobalst growth factor(bFGF)decreases DNA fragmentation and prevents down regulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middl e cerebral artery occlusion in rats[J].Mol Brain Res,2001;87(1):71-80.

[4] Moenner M,Gusse M,Hatzi E,et al. The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a bio log ical functio n not only related to angiogenesis[J]. Eur J Biochem,1994;226:483-490.

[5] Nagasawa H,Kogure K.Correlation between cerebral blood flow and histo log ic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J].Stroke,1989;20:1037-1047.

[6] Longa EZ,Weinstein PR,Carlson S,et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989;20(1):84-91.

[7] 章军建,阮旭中,张苏明.大鼠局灶性脑缺血模型缺血半暗带的定位研究[J]. 中国临床神经科学,2000;8(3):159-161.

[8] 楼 敏,刘建仁,黄鉴政.地塞米松对大鼠脑缺血再灌注后神经元凋亡的影响[J]. 浙江医学,2001;23(9):529-531.

[9] Krupinski J,Kaluza J,Kumar P,et al.Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke[J]. Stroke,1994;25:1794-1798.

[10] Bellomo M,Adamo EB,Deodato B,et al.Enhancement of expres sion of vascular endothelial growth factor after adeno-associated virus gene transfer is associated with improvement of brain ischemia injury in the gerbil[J]. Pharmacol Res,2003;48:309-317.

[11] 李志刚,梅 举,张宝仁.携带Ad.ANG的骨髓基质细胞移植于缺血心肌的试验研究[J]. 中华胸心血管外科杂志,2003;19(1):43-46.

(上接第 19 页)

ase,2003;92(1-2):49-67.

[15] Bettio F,Canevari M,Marzano C,et al.Synthesis and biological in vitro evaluation of novel PEG-psoralen conjugates[J]. Biomacromo lecules,2006;7(12):3534-2541.

[16] Shuai XT,Merdan T,Unger F,et al.Supramolecular gene delive ry vectors showing enhanced transgene expression and good biocomp atibility[J]. Bioconjug Chem,2005;16(2):322-329.

[17] Shuai XT,Merdan T,Unger F,et al.Novel biodegradable terna ry copolymers hy-PEI-g-PCL-b-PEG:synthesis, characterization,and potential as efficient nonviral gene delivery vectors[J]. Macromolecu les,2003;36:5751-5759.

[18] Needham D,McIntosh TJ,Lasic DD Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes[J]. Biochim Bio phys Acta,1992;1108(1):40-48.

[19] Petersen H,Merdan T,Kunath K,et al.Poly (ethylenimine-co-L-lactamide-co-succinamide):a biodegradable polyethylenimine deriva tive with an advantageous pH-dependent hydrolytic degradation for gene delivery[J]. Bioconjug Chem,2002;13(4):812-821.

[20] Singh AK,Kasinath BS,Lewis EJ.Interaction of polycations with cell-surface negative charges of epithelial cells[J]. Biochim Biophys Acta,1992;1120(3):337-342.

[21] Chul CK,Hoon JJ,Jung Chung,et al.Folate receptor-me diated intracellular delivery of recombinant caspase-3 for inducing apoptosis [J]. J control Release,2005;108(1):121-131.

第九届全国神经生化会议将于
2009 年 5 月在湖南长沙举行,欢迎届时参加!