临床研究 文章编号:0253-3626(2009)01-0066-05

依达拉奉对血管性认知功能损害大鼠 IL-1β、TNF-α 与 VEGF 表达的影响

蔡志友[1],晏 勇[1],张 骏[2],吴 芳[1],张建刚[1],王咏龙[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市神经病学重点实验室,重庆 400016;2. 遵义医学院附属医院神经内科 遵义 563003)

【摘 要】目的:观察依达拉奉对血管性认知功能损害大鼠脑组织和血清 VEGF、IL-1β 和 TNF-α 表达的影响,探讨依达拉奉对血管性认知功能损害脑保护作用机制。方法:永久性结扎大鼠双侧颈总动脉法建立血管性认知功能损害血管性认知功能损害动物模型,Wistar 大鼠随机分为假手术组(S 组)、血管性认知功能损害模型组(M 组)、依达拉奉治疗组(MT 组)。酶联免疫吸附法检测大鼠脑组织 IL-1β、TNF-α 表达水平和血清水平,蛋白质免疫印迹法和酶联免疫吸附法检测大鼠脑组织 VEGF,水迷宫实验和跳台实验检测行为学改变。结果 模型组大鼠有明显的学习、记忆、行为障碍,经过依达拉奉治疗后血管性认知功能损伤大鼠的学习、记忆、行为功能明显改善。MT 组 IL-1β、TNF-α 表达较 M 组降低($P<0.01$),MT 组 VEGF 表达较 M 组增高($P<0.01$);MT 组 VEGF、IL-1β、TNF-α 表达较 S 组增高($P<0.01$);M 组 VEGF、IL-1β、TNF-α 表达较 N、S 组显著增高($P<0.01$)。结论 依达拉奉能降低血管性认知功能损害大鼠脑组织和血清 IL-1β、TNF-α 水平、增强 VEGF 表达,依达拉奉可以通过抑制血管性认知功能损害炎症反应和增强血管修复发挥脑保护作用。

【关键词】血管性认知功能损伤;依达拉奉;血管内皮生长因子;炎症

【中国图书分类法分类号】R743.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-23

Upregulation of VEGF and downregulation of IL-1β、TNF-α by edaravone in rats with vascular cognitive impairment

CAI Zhi-you, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of edaravone on expression of VEGF, IL-1β and TNF-α in vascular cognitive impairment brain and the serum level of VEGF, IL-1β and TNF-α in vascular cognitive impairment rats, in order to study neuroprotection mechanism of edaravone against vascular cognitive impairment. *Methods*: The vacsular cognitive impairment rat model was established by permanent bilateral occlusion of both common carotid arteries. Behaviour was evaluated 2 weeks after permanent bilateral occlusion of both common carotid arteries with Morris water maze and shuttle box task. Wistar rats were randomly divided into sham-operation group (S), vascular cognitive impairment model group (M) and edaravone treatment group (MT). Serum level and expression of IL-1β and TNF-α was measured by enzyme linked immunosorbent assay, VEGF by enzyme linked immunosorbent assay and western blotting. *Results*: Edaravone significantly improved cognitive impairment from permanent bilateral occlusion of both common carotid arteries. The serum level and expression of IL-1β and TNF-α in MT group were lower than these in M group ($P<0.01$). The serum level and expression of VEGF in MT group was higher than these in M group ($P<0.01$). The serum level and expression of VEGF, IL-1β and TNF-α in MT and M groups were higher than that of in S group ($P<0.01$). *Conclusions*: Edaravone can restrain the expression of IL-1β, TNF-α and increase the expression of VEGF in rats with vascular cognitive impairment. Edaravone can enhance recovery of vascular cognitive impairment to protect neural function by restraining neuroinflammation.

【Key words】Vascular cognitive impairment; Edaravone; Vascular endothelial growth factor; Inflammation

炎症机制和血管损伤是血管性认知功能损害重要的病理生理机制,痴呆程度和炎症及血管机制的损伤有着直接的联系[1,2]。依达拉奉(Edaravone)是一种新型自由基清除剂,具有神经保护作用[3],依达

作者介绍:蔡志友(1972-),男,博士,
研究方向:血管性认知功能损害和痴呆。
通讯作者:晏 勇,男,教授,E-mail:yyanpro@21cn.com。
基金项目:国家民政部 中国老年学学会(2007-18-3-05)。

拉奉对血管性认知功能损害脑保护机制可以通过清除自由基发挥作用，对于血管性认知功能损伤炎症及血管机制的影响不明确，因此，我们采用依达拉奉对大鼠慢性脑缺血建立血管性认知功能损害动物模型进行治疗干预，检测血管修复因子血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）和炎症因子 IL-1β、TNF-α，探讨依达拉奉对血管性认知功能损害脑保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Wistar 大鼠 48 只（雌性，体质量 200～250 g，第三军医大学野战医院动物研究所提供，动物中心许可证号：渝实动设施准第 260 号）随机原则分为假手术组（S 组，只分离颈总动脉处理，不对颈总动脉结扎处理，等量生理盐水灌胃）、血管性认知功能损害模型组（M 组，双侧颈总动脉结扎建立慢性脑缺血模型，等量生理盐水灌胃）、依达拉奉治疗组（MT 组，在 M 组基础上予以 3 mg/kg 依达拉奉尾静脉注射），每组 6 只。选取造模后 2 周、4 周、6 周为观察点。

1.1.2 试剂及药品 依达拉奉注射液（10 mg/ 支）：中国上海先声制药有限公司；IL-1β、TNF-α 检测试剂盒：福建麦新生物科技有限公司；VEGF 检测试剂盒：北京搏奥森生物科技有限公司；大鼠跳台和大鼠穿梭箱程序自动控制仪均由重庆市神经病学重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 血管性认知功能损害模型制备 按照文献[4]制作动物模型，用 3.5%的水合氯醛，按 1 ml/100 g 体重将大鼠腹腔麻醉后，仰卧固定，颈正中切口，分离双侧颈总动脉，行双侧颈总动脉永久结扎术，术中大鼠体温保持在 36.5℃。对照组大鼠除不结扎双侧颈总动脉外，余处理同模型组大鼠。各模型组于行双侧颈总动脉结扎术后的不同时间点断头取脑，其中脑缺血 2 周、4 周、8 周组在进行学习记忆功能测试后断头取脑。

1.2.2 给药方法 将依达拉奉用生理盐水稀释成 0.5 mg/ml 浓度备用。M 组每天给予等量生理盐水处理；在 M 组的基础上，MT 组于缺血后给予依达拉奉 3 mg/kg，2 次 /d 尾静脉注射。依达拉奉的剂量选择参考 Uno 等[5]的依达拉奉作用机制研究。

1.2.3 行为学检测法

1.2.3.1 穿梭箱实验 穿梭箱底部铺以不锈钢电栅，大小为 60 cm × 16 cm × 25 cm，箱顶部装有蜂鸣器。训练时，将大鼠放在箱内任一侧，20 s 后出现蜂鸣音，持续 15 s，蜂鸣 5 s 后由底部电栅给以电刺激（电流强度 1.5 mA），大鼠受到电刺激后逃到另一端，电击 蜂鸣自动停止。记录动物在单独蜂鸣期间逃避的时间（主动逃避时间）和遭受电刺激的时间以及电击的次数。全部动物每天测试 1 次，每次 20 个循环，全程训练。

1.2.3.2 水迷宫实验 水迷宫水深 62 cm，水温 20℃，在固定象限设有安全岛，高度 60 cm，液面高于安全岛 2 cm。记录各组大鼠全程训练游到安全岛的时间（学习潜伏期），及第 20 天的结果（记忆潜伏期），比较各组潜伏期，评价大鼠学习记忆功能。

1.2.4 酶联免疫吸附法 大鼠麻醉后固定于手术台上，快速心脏抽血约 5 ml 注入试管中，室温下静置 2 h 后，4℃离心，3 000 r/min，10 min，取血清。在冰台上迅速分离大鼠一侧的海马和皮质，按 2.5 ml/g 脑质量加入相当体积的冰生理盐水，用匀浆器将组织研磨，然后在冰浴下超声波粉碎制成匀浆，4℃，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液。实验严格按照 VEGF、IL-1β、TNF-α 酶联免疫吸附法说明书步骤进行。

1.2.5 Western blotting 用 Western blotting 方法检测额顶叶皮质和海马 VEGF 蛋白含量。按 10mL/g 的比例加入全细胞裂解液，组织经匀浆、超声破碎后，用 BCA 法进行蛋白定量。10%的 SDS-PAGE 凝胶电泳，上样量为 28 μg。电泳条件：4℃。电流 20～30 mA。电泳结束后，进行蛋白质转膜。转膜条件：采用孔径为 0.22 mm 的硝酸纤维素膜（NC），4℃，电流 400 mA，转膜 3 h。Western blotting 杂交步骤如下：10%脱脂牛奶封闭 NC 膜 1 h，TYBS（20 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5；0.15 mmol/L NaCl；0.05%Tween 20）漂洗 3 次，每次 10 min，然后室温下与 APP 一抗（1∶3 000）杂交反应 3 h，TTBS 漂洗同前。再将 NC 膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗（1∶5 000）杂交反应 1 h。最后用 TTBS 漂洗 NC 膜 3 次，每次 10 min，加入 ECL 试剂反应 5 min，保鲜膜包裹，暗室进行 X- 光胶片曝光、显影和定影。然后同一张 NC 膜再与 β-actin（1∶1 000）进行 Western blotting 杂交反应，并获得蛋白印迹结果。Western blotting 条带经 Gel-oc 凝胶成像分析系统扫描处理，计算单位吸光度值和条带面积，将各实验点的总吸光度值与对照组比较，得到相对百分数。

1.2.6 RT-PCR 行为学实验结束后，提取各组大鼠额顶叶皮质和海马组织总 RNA 并定量，用 DNA 酶 I 处理总 RNA 以去除 DNA 污染，各实验组取同等量的 RNA 反转录后进行 PCR。VEGF、IL-1β、和 TNF-α PCR 引物设计见表 1（北京奥科生物科技有限公司）。PCR 反应条件：95℃变性 5 min；95℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃1 min，循环 35 次；72℃延伸 7 min。将 PCR 扩增的产物 5 μl 在 2%的琼脂糖凝胶上进行电泳，电压一般为 70～80 V。电泳完毕后，取出凝胶在紫外灯下观察结果并照相。结果用 Quantity One-4.4.0 软件行定量分析，以目的基因与 β-actin 条带平均光密度比值表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.3 统计学分析

所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，全部数据采用 SPSS11.0 软件包进行统计学处理，同一组内不同时相点的比较采用方差分析，两组之间同一时相点的比较采用 t 检验，$P<0.05$ 差异有显著性。

表 1 VEGF、IL-1β 和 TNF-α PCR 引物

靶基因	引物序列(5'-3')	大小(bp)	退火条件(℃)	循环次数
β-actin	正义链: GTTCGCCATGGATGACGATATC 反义链: GCCAGATCTTCTCCATGTCGTC	266	59	32
VEGF	正义链: TGCTCAGCATTCGGACTGACCT 反义链: CAGTATGCATGGACCATGACGG	228	61	31
IL-1β	正义链: TAAGGAATCACGGTTCTCACCGG 反义链: GGACCGCAT TCTAAGGGATCGTT	312	61	35
TNF-α	正义链: GTGTTCCACCAGGAGATGTTGC 反义链: CTCCTGCCCACTGAGTTCGTCT	371	29	32

2 结 果

2.1 水迷宫、穿梭箱实验结果

在各组大鼠中,M、MT 组大鼠的电击次数、潜伏期和主动逃避次数与 S 组大鼠的检测结果间均差异有显著($P<0.01$),M 组大鼠的电击次数、学习和记忆潜伏期时间显著延长,主动逃避次数显著降低;MT 组与 M 组大鼠电击次数、潜伏期和主动逃避次数检测结果间差异有显著性($P<0.01$),MT 组大鼠的电击次数、学习和记忆潜伏期时间显著缩短,主动逃避次数显著增多; M 组大鼠的前后两次跳台实验的检测结果间差异无显著性($P>0.05$) (表 2)。上述结果提示模型组大鼠有明显的学习、记忆、行为障碍,依达拉奉治疗组血管性认知功能损伤大鼠的学习、记忆、行为功能明显改善。

2.2 VEGF 检查结果

ELISA 法检测结果显示与同时点 M 组比较,MT 组 VEGF 脑组织和血清水平均有明显升高 ($P<0.05$)。M 组与 S 组大鼠的检测结果间均差异有极显著性($P<0.01$),MT 组与 S 组检测结果间差异有显著性($P<0.05$)。模型组、治疗组与假手术组比较,VEGF 值明显增高($P<0.01$);治疗组和模型组比较,VEGF 值也明显增高($P<0.01$)(表 3)。TR-PCR 和蛋白质印迹检测大鼠海马组织 VEGF 的表达与 ELISA 法检测结果具有一致性和(图 1、2)。

2.3 IL-1β 检测结果

ELISA 法和 RT-PCR 法检查结果均显示模型组、治疗组与假手术组比较,IL-1β 值明显增高($P<0.01$);治疗组和模型组比较,IL-1β 值明显降低($P<0.01$)(表 4 和图 2)。

2.4 TNF-α 检测结果

ELISA 法和 RT-PCR 法检查结果均显示模型组、治疗组与假手术组比较,TNF-α 值明显增高($P<0.01$);治疗组和模型组比较,TNF-α 值明显降低($P<0.01$)(表 5 和图 2)。

表 2 水迷宫、穿梭箱实验结果($\bar{x}\pm s$)

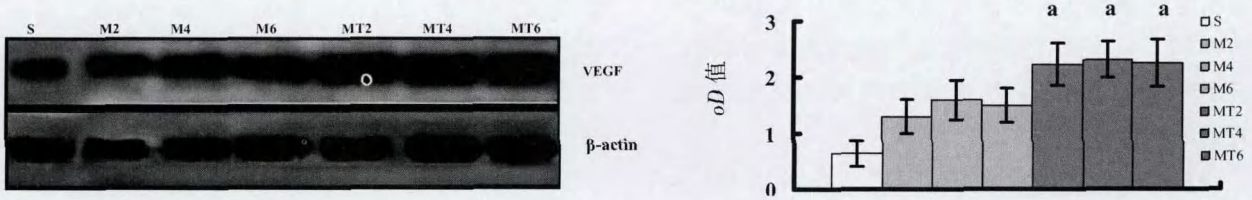
分组	电击次数(t/min)	主动逃避次数(t/min)	学习潜伏时间(t)	记忆潜伏时间(t)
S	56.2 ± 7.9	80.5 ± 8.6	66.5 ± 9.9	60.8 ± 8.7
M	92.4 ± 9.5	56.7 ± 8.4	172.2 ± 8.5	156.4 ± 8.2
MT	72.3 ± 7.6*	68.1 ± 8.3*	144.3 ± 8.6*	121.6 ± 8.4*

注:与假手术组和模型组比较,*$P<0.01$

表 3 ELISA 法检测 VEGF(ng/L)的表达

组别	脑组织			血清		
	2 周	4 周	6 周	2 周	4 周	6 周
S 组	59.9 ± 5.4	59.0 ± 5.8	59.6 ± 5.6	56.3 ± 4.6	56.6 ± 5.4	57.3 ± 5.4
MT 组	91.3 ± 5.1	94.7 ± 6.0	97.3 ± 4.8	82.6 ± 5.6	84.3 ± 5.5	90.4 ± 5.2
M 组	81.7 ± 8.5*	83.8 ± 7.6*	87.3 ± 5.2*	74.3 ± 5.3*	76.6 ± 5.2*	81.7 ± 7.0*

注:与假手术组和模型组比较,*$P<0.01$



与假手术组和模型组比较，*$P<0.01$

图 1 蛋白质印迹检测大鼠脑组织 VEGF 的表达

表 4 各组 IL-1β（ng/L）的检测值

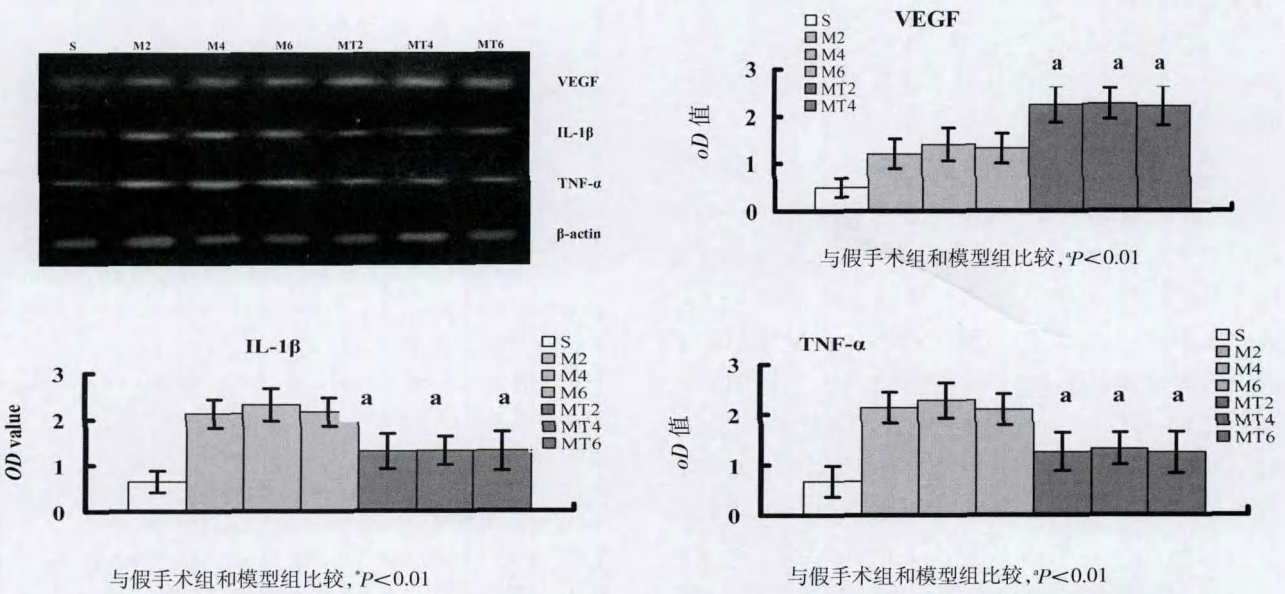
组别	脑组织			血清		
	2 周	4 周	6 周	2 周	4 周	6 周
S 组	15.9 ± 3.4	16.0 ± 3.8	16.1 ± 4.6	16.4 ± 4.1	16.6 ± 4.4	16.7 ± 5.8
MT 组	22.3 ± 3.2	23.7 ± 3.4	23.3 ± 3.1	22.6 ± 5.1	23.3 ± 3.4	24.3 ± 5.6
M 组	29.2 ± 6.6*	30.8 ± 5.3*	31.3 ± 6.4*	30.3 ± 6.2*	31.6 ± 5.6*	32.7 ± 6.2*

注：与假手术组和模型组比较，*$P<0.01$

表 5 各组 TNF-α（ng/L）的检测值

组别	脑组织			血清		
	2 周	4 周	6 周	2 周	4 周	6 周
S 组	16.5 ± 4.4	16.6 ± 3.8	18.6 ± 4.6	17.7 ± 5.6	17.5 ± 5.7	17.3 ± 5.5
MT 组	24.3 ± 5.12	4.5 ± 5.6	24.5 ± 5.2	24.6 ± 5.4	25.5 ± 5.12	5.3 ± 54.7
M 组	38.2 ± 2.7*	38.8 ± 4.3*	38.4 ± 4.9*	39.3 ± 3.4*	39.6 ± 3.4*	40.3 ± 5.1*

注：与假手术组和模型组比较，*$P<0.01$



与假手术组和模型组比较，*$P<0.01$

与假手术组和模型组比较，*$P<0.01$

与假手术组和模型组比较，*$P<0.01$

图 2 RT-PCR 检测大鼠脑组织 VEGF、IL-1β、和 TNF-α 的表达

3 讨 论

炎症反应是缺血性脑组织损伤的主要病理机制，脑缺血损伤炎症反应中早期出现的细胞因子是 TNF-α 和 IL-1[6,7]。抑制炎症是治疗脑血管疾病的主要策略。近来动物模型研究也发现依达拉奉是有效的神经保护剂[8,9]，依达拉奉能够显著减缓新缺血缺

氧而诱发的脑损伤。我们研究也发现依达拉奉的脑保护作用不仅有效的清除机体内的自由基、抑制氧化应激有关,而且还可抑制脑内的神经炎症、改善血管修复功能。

VEGF 又叫血管调理素是新近发现的一种生长因子,具有促内皮细胞分裂的作用,VEGF 可以促进血管的生长和侧支循环的建立。最近 VEGF 基因已克隆出来,有人应用重组 VEGF 给冠状动脉和下肢动脉闭塞的动物血管内持续灌注 14 d,证明可以促进血管的新生和侧支循环的建立,有效地防治心肌梗塞和闭塞性血管病。VEGF 为动脉缺血性疾病的治疗提供了及其诱人的前景,因此把 VEGF 基因治疗称为"分子搭桥术"。局灶脑缺血的动物实验证实梗塞后 3 d 是最活跃的血管增生期,并可见明显的 VEGF 表达[10,11],VEGF 作为脑缺血性损伤血管修复因子在脑缺血性疾病中的脑保护作用已被证实[12]。

大鼠双侧颈总动脉永久性结扎是近年来较常用的一种慢性低灌注模型,大鼠双侧颈总动脉结扎后有 15 个脑区的局部脑血流量降低 25%~87%。我们的实验结果表明,双侧颈总动脉结扎可引起反映大鼠空间记忆能力的大鼠跳台、穿梭箱试验中各项指标的显著下降,并随着时间的推移,大鼠的学习记忆能力有进一步的降低,表明在慢性低灌注状态下,缺血缺氧状态对学习记忆功能的影响是持续的、渐进的,证明了血管性认知功能损伤动物模型是成功的。

本实验通过对血管性认知功能损伤大鼠行为学观察,研究发现依达拉奉能够改善血管性认知功能损伤大鼠的记忆、学习和行为功能,行为学上说明了依达拉奉脑保护作用。我们也通过对 VEGF、IL-1β、TNF-α 检测显示慢性脑缺血大鼠脑组织和血清 VEGF、IL-1β、TNF-α 含量升高。与同时点模型组比较,治疗组 VEGF 活性均有不同程度升高,IL-1β、TNF-α 含量均有不同程度下降,表明依达拉奉有效促进 VEGF 的生物活性,降低血管性认知功能损伤大鼠脑组织和血清 IL-1β、TNF-α 含量,提示该药可抑制血管性认知功能损伤大鼠炎症反应,增强血管修复功能发挥脑保护作用。

本实验采用依达拉奉血管性认知功能损害大鼠干预发现,依达拉奉有效促进 VEGF 的生物活性,抑制神经炎症,增强血管修复功能发挥脑保护作用。由于本组实验观察时间点少,观察时间短,对依达拉奉增高 VEGF 的生物活性和降低炎症因子 IL-1β、TNF-α 水平的机理未进行充分研究。依达拉奉的耐受性好,安全性高,所以对于血管性认知功能损害也是一种有效的脑保护剂。

参 考 文 献

[1] 血管性认知功能损害专家共识组. 血管性认知功能损害的专家共识[J]. 中华内科杂志,2007,46(12):1052-1055.

[2] Hachinski V,ladecola C,Petersen R C,et al. National Institute of Neurological Disorders and Stroke-Canadian Stroke Network vascular cognitive impairment harmonization standards[J]. Stroke,2006,37(9):2220-2241.

[3] Kitagawa Y. Edaravone in acute ischemic stroke[J]. Intern Med,2006,45(5):225-226.

[4] Zheng P,Zhang J,Liu H,et al.Angelica injection reduces cognitive impairment during chronic cerebral hypoperfusion through brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor[J]. Curr neurovasc Res,2008,5(1):13-20.

[5] Uno M,Kitazato K T,Suzue A,et al. Inhibition of brain damage by edaravone,a free radical scavenger,can be monitored by plasma biomarkers that detect oxidative and astrocyte damage in patients with acute cerebral infarction[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(8):1109-1116.

[6] Song Y S,Lee Y S,Narasimhan P,et al. Reduced oxidative stress promotes NF-kappaB-mediated neuroprotective gene expression after transient focal cerebral ischemia: lymphocytotrophic cytokines and anti-apoptotic factors[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007,27(5):764-775.

[7] Saito A,Maier C M,Narasimhan P,et al. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia[J]. Mol Neurobiol,2005,31(1-3):105-116.

[8] Roberts W G,Palade G E. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor[J]. J Cell Sci,1995,108 (Pt 6):2369-2379.

[9] Rafael H. Chronic brain ischemia and revascularization[J]. J Neurosurg,2006,105(2):339-340.

[10] Wang Y Q,Guo X,Qiu M H,et al. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion[J]. J Neurosci Res,2007,85(1):73-82.

[11] 黄承红,蔡志友,曾令琼.依达拉奉对脑出血患者血清 IL-1β、TNF-2 影响的研究[J]. 重庆医学,2008,37(7):728-729.

[12] 崔 洁,曹参祥,郑 静.脑出血大鼠脑组织 MDA、TNF-2 含量变化及其依达拉奉干预效应的研究[J]. 第三军医大学学报,2007,29(11):1032-1035.

(责任编辑:冉明会)