维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)02-0210-03

大鼠局灶性脑缺血再灌注后 VEGF 及 VEGFmRNA 的表达

陶 陶[1], 陈莉芬[1], 胡长林[1], 董佑忠[2]

(1. 重庆医科大学第二临床学院神经内科, 重庆 400010; 2. 贵阳医学院附属医院神经内科, 贵阳 550004)

【摘 要】目的:探讨大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑组织内血管内皮细胞生长因子(VEGF)及 VEGFmRNA 的表达及意义。方法:制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,动物分为缺血 2h 再灌注 6h、12h、24h、48h、72h 及假手术对照组。应用免疫组化法检测 VEGF 蛋白的表达;RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 的动态变化。结果:大鼠缺血再灌注 6h,缺血侧脑组织梗死灶周边 VEGF 免疫阳性反应已出现,24h 明显增多,48h 达高峰;VEGF mRNA 在 6h 开始上升,12h 达高峰,24h 开始下降,48~72h 接近正常水平。结论:脑缺血再灌注损伤可以诱导 VEGF 表达增强,提示 VEGF 对缺血性脑损伤有保护作用。

【关键词】局灶性脑缺血;血管内皮细胞生长因子;VEGFmRNA

【中国图书分类法分类号】R743.32;Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-10-25

Expression of VEGF and VEGF mRNA after focal cerebral ischemia reperfusion in rats

TAO Tao, et al

(*Department of Neurology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF mRNA after focal cerebral ischemia reperfusion in rats. *Methods*: MCAO (Middle Cerebral Artery Occlusion) models were set up in rats, and the rats were divided into six groups: control group, 5 groups of ischemia for 2h then respective reperfusion for 6h, 12h, 24h, 48h and 72h. The samples were analyzed with immunohistochemical methods. The expression of VEGF mRNA was detected by RT-PCR analysis. *Results*: VEGF protein expression started at 6h. It increased remarkably at 24h, and it was strongest at 48h. VEGF mRNA increased at 6h, while reached peak value at 12h and reduced at 24h, finally returned to normal level at 48-72h. VEGF expression was mainly detected in the periphery of infarcts at every timepoint. *Conclusion*: These findings demonstrate that the VEGF strong expression can be induced in focal cerebral ischemia reperfusion in vivo. The changes of VEGF levels suggest that VEGF has neuroprotective effect against cerebral ischemic injury.

【Key words】Focal cerebral ischemia; Vascular endothelial growth factor; VEGF mRNA

脑血管病是目前危害人类健康的主要疾病之一,脑血管病中又以缺血性脑血管病为多见。局灶性脑缺血由严重缺血的中心区和处于低灌流状态的边缘区即缺血半暗带组成。缺血中心区的脑组织在短时间内即发生不可逆性损伤,成为梗死区,而半暗带的脑组织损伤相对较轻而且有潜在的可逆性,超早期再恢复缺血半暗带区血流是改善组织损伤的关键。人们已发现中风后脑组织血管密度增高与中风病人预后改善有关[1],因此,研究促进血管生长的因素对脑缺血病人的恢复有非常重要的意义。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是直接作用于血管内皮细胞的有丝分裂原,是迄今为止已知的最强的促血管生长因子[2],是目前国内外研究的热点。本文就 VEGF 和 VEGF mRNA 在大鼠局灶性脑缺血再灌注后表达及变化进行观察,以探讨脑缺血后 VEGF 表达的意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠,清洁级,体重 200~250g,购自重庆医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK

作者介绍:陶 陶(1964-),女,博士生,副主任医师,主要研究方向:脑血管疾病。

基金项目:重庆市教委渝科教(2002)18 号。

维普资讯 http://www.cqvip.com

(渝)2002－0001。随机分成假手术对照组及实验组,实验组又分为缺血 2h 再灌注 6h、12h、24h、48h、72h,每组均为 6 只。

1.2 局灶性脑缺血模型制备

局灶性脑缺血模型制备参照文献[3],用 10% 水合氯醛(0.35ml/100g,i.p.)麻醉动物,取仰卧位固定在手术台上,行右侧 MCAO 手术,颈部正中切口,分离出右侧颈总、颈外和颈内动脉及翼腭动脉,结扎颈外动脉分支起始处、颈总动脉近心端和翼腭动脉的近心端,在颈总动脉分叉切口处剪一小口,把头端蘸有清漆的 4－0 外科尼龙线向颈内动脉端插入,继续向前推进直到感觉有轻微阻力,即约 18mm,提示已到大脑中动脉的起始部。2h 后缓慢退出尼龙线即可实施再灌注。动物苏醒后观察其体态及行为,以判断 MCAO 模型成功。假手术组:插入尼龙线后马上抽出,余步骤同手术组。

1.3 组织切片的制备

各组大鼠届时以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,打开胸腔,经心脏灌注 0.9% 的生理盐水,续之以 4% 多聚甲醛灌流固定。假手术对照组于术后 24h 将大鼠麻醉后打开胸腔,仍经心脏灌注。剥取脑组织,以视交叉到枕叶处两点冠状切片,常规固定、脱水、透明、浸蜡、包理、切片 5μm 厚,进行相应染色,观察组织学改变。

1.4 HE 染色

将石蜡切片,常规脱蜡、乙醇梯度脱水、苏木素－伊红染色,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜下观察。

1.5 VEGF 免疫组织化学染色

用二步法进行,简要步骤如下:①脱蜡,水化组织切片。②3% 过氧化氢孵育 5min,以阻断内源性过氧化物酶。③PBS 洗 1 次 3min。④滴加适当稀释的一抗 VEGF 单克隆抗体(1:100)(Santa Cruz Biotechnology),置湿盒中 4℃ 过夜。空白对照不加一抗,用 PBS 代替一抗进行孵育。⑤弃第一抗体,用 PBS 洗 3min×3 次。⑥滴加辣根酶标记的二抗(1:500)(北京中山生物技术有限公司)置湿盒中室温孵育 20min。⑦PBS 洗 3min×3 次。⑧DAB(北京中山生物技术有限公司)显色,室温下光镜监视其显色,显色满意后自来水冲洗 5min 终止显色。⑨常规复染,脱水,封片。

结果判定:VEGF 阳性细胞为胞浆呈棕黄色。以生物医学图像分析系统进行定量分析,自动记录相应脑区阳性细胞光密度值。

1.6 RT－PCR 法检测 VEGFmRNA 的含量

1.6.1 脑标本的采集 将假手术对照组及缺血 2h 再灌注 6h、12h、24h、48h、72h 的大鼠断头取脑(每组 6 只),取梗塞灶周围组织在 1‰的 DEPC 水中稍作漂洗,立即放入细胞冻存管中,液氮中保存备用。

1.6.2 大鼠脑组织总 RNA 的提纯 将冻存大鼠脑组织称重,100mg/ml 的比例加 Trizol 后进行组织匀浆,室温放置 5min 后按 1/5 体积加入氯仿,用力振荡 15s,室温静置 3min;4℃ 11500r/min,离心 15min,取上清液,加等体积异丙醇上下颠倒数次,室温静置 10min,4℃ 11500r/min 离心 10min,弃去上清液;用 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次,4℃ 9150r/min 离心 5min,用 DEPC 水溶解沉淀,并测 OD 值后分装－70℃ 保存。

1.6.3 RT－PCR 分析大鼠脑不同时间点 VEGF mRNA 的表达 采用 Promega RT－PCR 一步法成套试剂盒。RT－PCR 反应条件为 94℃,5min for 1 cycle;94℃,45s;60℃ 45s;72℃ 1min for 25cycles;72℃ 10min for 1 cycle;4℃ for 1 cycle。实验时用 β－actin 作内参。VEGF mRNA、β－actin 引物见表 1。

表 1 VEGF 及 β－actin 引物

Substances	primer
β－actin forward	5'－GCC ACT GCC GCA TCC TCT－3'
(402bp) reverse	5'－CTC CTG CTT GCT GAT CCA CAT－3'
VEGF forward	5'－ACC AGC GCA GCT ATT GCC GT－3'
(436bp) reverse	5'－CGC CTT GGC TTG TCA CA－3'

采用琼脂糖电泳观察 PCR 产物,电泳后的琼脂糖凝胶板经凝胶成像处理系统拍摄图象,记录积分光密度值。

产物的含量＝VEGF 扩增产物的光密度值/参照系统 β－actin 扩增产物的光密度值×100%

1.7 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组数据之间进行配对 t 检验,$P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

2.1 HE 染色光镜观察

局灶性脑缺血大鼠于缺血后 6h 开始出现典型的缺血性神经细胞改变,胞体缩小呈三角形,胞浆嗜伊红,细胞核固缩深染,核仁消失。随再灌注时间的延长,病变中心梗死灶扩大,梗死区神经细胞数目均明显减少,可累及尾壳核内侧部及额叶。缺血中心区神经元脱失明显,残存细胞多无完整细胞结构,但缺血周边区皮层未见明显神经元脱失,以固缩神经元为主,在缺血再灌 24～48h 为最多,另见血管内皮细胞肿胀,血管周围间隙扩大。

2.2 免疫组织化学染色光镜观察

假手术对照组大鼠均未见 VEGF 阳性细胞表达。在局灶性脑缺血再灌注早期即有 VEGF 的阳性表达,随再灌注时间延长,表达逐渐增强,于脑缺血再灌注 48h 表达最强(与缺血再灌注 6h 相比 $P<0.01$)。阳性表达表现为胞浆棕黄色着色明显,主要表现在阳性表达的神经元数量增加,各时间点 VEGF 的表达主要集中在梗死灶周围,梗死灶中心仅见少量 VEGF 表达,在对侧非缺血脑组织自缺血 6h 后开始亦有少量 VEGF 表达,但明显少于病灶

维普资讯 http://www.cqvip.com

侧。表达细胞主要为神经胶质细胞,巨噬细胞,其次为神经细胞及血管;在缺血再灌注 48～72h,在梗死灶周围可见 VEGF 免疫阳性着色的血管。VEGF 阳性表达情况见图 1、图 2。



图 1 大鼠脑缺血 2h 再灌注 6h 梗死灶周边 VEGF 弱阳性表达(×200)

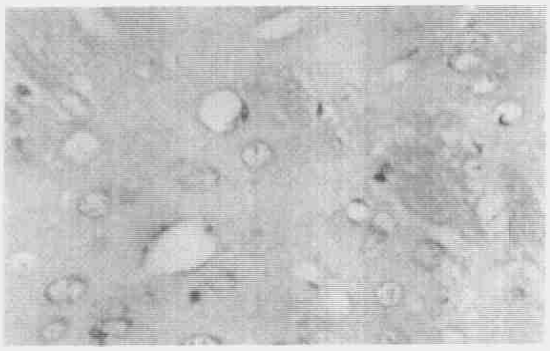


图 2 大鼠脑缺血 2h 再灌注 48h 梗死灶周边 VEGF 强阳性表达及 VEGF 阳性表达的血管(×200)

表 2 大鼠局灶性脑缺血再灌注后 VEGF 蛋白及 VEGFmRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

分组	鼠数(只)	VEGF 蛋白	VFGF mRNA
对照组	6		0.21 ± 0.02
缺血再灌 6h	6	0.15 ± 0.02	$0.52 \pm 0.05^{\triangle}$
缺血再灌 12h	6	$0.20 \pm 0.02^{*}$	$0.69 \pm 0.04^{\triangle\triangle}$
缺血再灌 24h	6	$0.22 \pm 0.03^{*}$	$0.49 \pm 0.06^{\triangle}$
缺血再灌 48h	6	$0.26 \pm 0.01^{**}$	0.25 ± 0.05
缺血再灌 72h	6	0.16 ± 0.03	0.23 ± 0.03

$^{*}P<0.05$ compared with ischemia reperfusion 6h group

$^{**}P<0.01$ compared with ischemia reperfusion 6h group

$^{\triangle}P<0.05$ compared with control group

$^{\triangle\triangle}P<0.01$ compared with control group

2.3 VEGF mRNA 基因表达结果

经 RT-PCR 一步法检测,对照组 VEGF mRNA 有基础表达,缺血再灌注在梗死灶周围与对照组相比,6h 已开始上升($P<0.05$),12h 达高峰($P<0.01$),24h 开始下降($P<0.05$),48～72h 接近正常水平,见表 2。

3 讨 论

血管内皮细胞生长因子是一种内皮细胞特异的有丝分裂原,可以刺激体内尤其是缺血部位的血管形成[4]。脑血管梗死后,缺血区毛细血管增加的范围与程度直接关系到缺血边缘区血流的改善,影响神经元生理功能的恢复,从而决定了患者的预后[5]。有研究发现,VEGF 表达与组织中微血管密度及新血管的密度密切相关。VEGF 参与了局部梗死周边区的微血管形成作用和血液洪应的改善[6]。

在本实验中 VEGF 阳性表达时间从 6h 即很明显,随再灌注时间的延长,表达逐渐增强,于 48h 表达最强,VEGF 表达细胞主要在神经胶质细胞,巨噬细胞,其次为神经细胞及血管,这与文献报导一致[7,8]。梗死灶周围 VEGF 表达明显多于梗死灶中心,造成这种分布上的差异可能是梗死区神经元受损或死亡细胞过多致 VEGF 蛋白合成障碍所致。VEGF mRNA 在缺血周边区的表达 6h 即明显增加,12h 达高峰,24h 开始下降,这些结果均证实在缺血早期在梗死周边带无论在 mRNA 水平还是在蛋白水平均有 VEGF 的表达上调,其机制可能是缺血后缺氧刺激血管内皮细胞使 VEGF 表达增高[9],亦有认为可能与血脑屏障的功能降低或血脑屏障的破坏有关。本实验还观察到,随再灌注时间的延长,在梗死灶周围可见 VEGF 免疫阳性着色的血管,说明 VEGF 可促进血管的增生。总之,VEGF 在大鼠脑缺血后的梗死周边表达上调,说明其在缺血性脑损伤的病理发展和修复过程中发挥着重要作用,其能够刺激受累部位血管生成,改善梗死周边区的微血管供应和侧支循环,VEGF 的这种特异的生物学作用为缺血性脑血管病的治疗提供了一个新的思路,直接引入外源性 VEGF 或间接通过药物或其他治疗手段促进 VEGF 合成及分泌可能有助于缺血缺氧组织中微血管的生成从而改善局部血供而挽救濒死脑组织,对缺血性脑损伤起保护治疗作用。

参 考 文 献

[1] Marchal G, Serrati C, Rioux P, et al. PET imaging of cerebrai perfusion and oxygen consumption in acute ischemic stroke: relation to outcome[J]. Lancet, 1993; 341(8850): 925-927.

(下转第 259 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

响细胞有丝分裂,阻断了细胞生长、分裂,延长了细胞周期,从而起到抑制细胞增殖作用。FCM 分析还发现 G_0/G_1 期前有亚二倍体(凋亡峰)出现,透射电镜观察发现药物组细胞胞浆内有脂滴,有凋亡细胞及凋亡小体。姜黄素具有诱导 $SKOV_3$ 细胞凋亡的作用,也可抑制细胞增殖。

表 3 $SKOV_3$ 细胞表达 Bcl-2、Bax、MTP53 及 Fas 的 HSCORE 得分($\bar{x} \pm s$)

	Bcl-2	MTP53	Bax	Fas
对照组	3.018±0.0950	3.300±0.0894	2.460±0.0938	2.184±0.0713
药物组	2.480±0.1257	2.540±0.1327	3.108±0.0672	2.632±0.0716

细胞凋亡是由多基因调控的主动死亡的过程,在形态学及生物学特征上明显不同于细胞坏死,是维持自身稳定的一种机制。目前研究证实凋亡异常与肿瘤发生发展有极密切的关系,抗肿瘤药物则通过诱导细胞凋亡来发挥治疗作用。姜黄素对人早幼粒白血病细胞、结直肠癌细胞、人肾癌细胞 293、人肝癌细胞 Hep G_2 等均有诱导凋亡作用[6,7]。目前发现与凋亡相关的基因表达蛋白有三类:促进凋亡作用的蛋白如 Bax、Fas 等,抑制凋亡作用的蛋白如 Bcl-2、MTP53 等,以及在凋亡过程中起协助作用的蛋白。我们采用免疫细胞化学法发现,姜黄素诱导 $SKOV_3$ 细胞凋亡的作用与下调 Bcl-2、MTP53 的表达及上调 Bax、Fas 的表达有关。

总之,通过实验已经证实姜黄素能够抑制人卵巢癌细胞株 $SKOV_3$ 的增殖,这种作用可能是阻滞细胞周期及诱导细胞凋亡共同作用的结果。

(通讯作者:汤为学　重庆医科大学病理生理教研室　400016　Email:TWXYY@sina.com)

参 考 文 献

[1] Inaro H, Onada M, Inafuku N, et al. Potent preventive action of curcumin on radiation-induced initiation of mammary tumorigenesis in rats[J]. Carcinogenesis, 2000; 21: 1835-1841.

[2] Huang MT, Lou YR, Ma W, et al. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, deodunal and colon carcinogenesis in mice[J]. Cancer Res, 1994; 54: 5841-5847.

[3] 汤为学,骆云鹏,王瑞雪. 人这关体瘤药物敏感试验 MTT 法的建立[J]. 重庆医科大学学报,1992,17:103-108.

[4] Harrington DJ, Lessey BA, Rai V, et al. Tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis[J]. J Pathol, 1999; 187: 242-248.

[5] Hanif R, Qiao L, Shiff SJ, et al. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway[J]. J Lab Clin Med, 1997; 130: 576-584.

[6] Kuo ML, Huang TS, Lin JK. Curcumin, antioxidant and anti-tumor promoter, induced apoptosis in human leukemia cells[J]. Biochim Biophy Acta, 1996; 1317: 95-100.

[7] Jiang MC, Yang Yen HF, Yen JJ, et al. Curcumin induces apoptosis in immortalized NIH 3T3 and malignant cancer cell lines[J]. Nutr Cancer, 1996, 26: 111-120.

(上接第 212 页)

[2] Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemia myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs[J]. Circulation, 1994; 89(5): 2183-2189.

[3] 陈春富,李劲松. 栓线法大鼠局灶性脑缺血模型的研究[J]. 中风与神经疾病杂志,1996;13(1):18-19.

[4] Edi Brogi, Gina Schatteman, Tiangen Wu, et al. Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression[J]. J Clin Invest, 1996; 97(2): 469-476.

[5] Krupinski J, Kumar P, Wang JM, et al. Prognostic value of blood vessel density in ischemic strock[J]. Lancet, 1993; 342(8873): 742-747.

[6] Risau W. Mechanisms of angiogenesis[J]. Nature, 1997; 386(6626): 671-674.

[7] Pichiule P, Chavez JC, Xu K, et al. Vascular endothelial growth factor upregulation in transient global ischemia induced by cardiac arrest and resusscitation in rat brain[J]. Brain Res Mol, 1999; 74(1-2): 83-90.

[8] Hayashi T, Abe K, Suzuki H, et al. Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Stroke, 1997; 28(10): 2039-2044.

[9] Marti HJ, Bemaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia[J]. Am J Pathol, 2000; 156(3): 965-976.