

当归注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤后 VEGF 表达的影响

郑婵娟 廖维靖* 杨万同 蒙兰青

[摘要] 目的 观察大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后血管内皮生长因子(VEGF)在不同时间点的表达及当归注射液对其表达的影响。方法 线栓法制作脑缺血再灌注损伤模型,雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、缺血损伤组和当归治疗组,采用免疫组织化学和 RT-PCR 方法观察 VEGF 表达变化。结果 免疫组织化学显示缺血损伤组和当归治疗组大鼠 VEGF 蛋白表达均在 24 h 达到高峰后减弱;RT-PCR 显示缺血损伤组 VEGF mRNA 在 3 h 开始表达增强,6 h 达到高峰,后很快降低,至第 7 天恢复到基线水平;当归治疗组 VEGF mRNA 在 3 d 达到高峰后缓慢降低,至第 7 天仍有大量表达,且各时间点 VEGF 的表达比缺血损伤组明显增加。结论 当归可促进局灶性脑缺血再灌注损伤后 VEGF 的表达。

[关键词] 脑缺血/再灌注损伤;血管内皮生长因子;当归注射液

Effects of Angelica sinensis on the expression of vascular endothelial growth factor after the brain ischemia reperfusion injury in rats ZHENG Chan-juan, LIAO Wei-jing, YANG Wan-tong, et al. The Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 430071 Wuhan, Hubei, China

[Abstract] Objective To investigate the effects of Angelica sinensis on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) Flt-1, Flk-1 mRNA after the brain ischemia reperfusion injury in rats. Methods Wistar rats were randomly divided into the group A, group B and normal control group. The group A underwent middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 h by suture, group B underwent MCAO for 2 h meanwhile received treatment with Angelica sinensis (5 g/kg). Immunohistochemistry and quantitative reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) technique were used to examine the gene expression of VEGF. Results The result of immunohistochemistry revealed that VEGF in the group A and group B reached its peak at 24 h after reperfusion then declined gradually. The result of RT-PCR manifested that the gene expression of VEGF in the group A increased from 3 h after reperfusion and reached its peak at 6 h; in the group B reached its peak on the 3rd day. The expression of VEGF in the group B was significantly increased than group A at the same time point. Conclusion Angelica sinensis can enhance the expression of Flt-1, Flk-1 after transient interruption of cerebral blood flow in rats.

[Key words] brain ischemia reperfusion injury;vascular endothelial growth factor (VEGF);Angelica sinensis injection

中图分类号:R743.31 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)12-0973-02

[本文著录格式] 郑婵娟,廖维靖,杨万同,等.当归注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤后 VEGF 表达的影响[J].中国康复理论与实践,2005,11(12):973-974.

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是已知作用最强和特异性最高的血管生长因子^[1],与其受体结合后在血管生成和神经保护方面发挥着重要作用^[2]。当归作为祖国传统的活血化瘀药之一,已广泛应用于缺血性脑血管病的临床治疗,但其具体的作用机理尚未完全清楚。本研究旨在观察当归注射液对局灶性脑缺血损伤后 VEGF 表达的影响,探讨当归对神经的保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及脑缺血再灌注损伤模型建立 雄性 Wistar 大鼠,清洁级,体重 160~180 g,购自湖北省医学科学院动物中心,许可证号:SCXK(鄂)2003-0005。大脑中动脉阻断及再灌注模型制作参照廖维靖等线栓改良法^[3]。将头端直径为 0.21~0.27 mm 的线栓沿颈总动脉、颈内动脉顺行向上插入至大鼠大脑中动脉起始部,遇微小阻力时停止。从颈总动脉分叉处计算插入深度为(1.7±0.2)cm,造成大脑中动脉血供阻断。缺血 2 h 后,将线栓拔退至颈总动脉,恢复大脑中动脉的血供。术后将动物置于放有清洁垫料的饲养盒,自由饮水、进食,必要时用滴管给动物喂水,湿润鼻部和眼部。

1.2 分组及给药方法 随机将大鼠分为正常对照组(n=5)、缺血损伤组(n=48)和当归治疗组(n=48),后两组再分为缺血 2 h

再灌注 3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、7 d 组(每个时间点 8 只)。当归治疗组在造模成功后立即腹腔注射 25%当归注射液(武汉大学中南医院生产,批号:040401),剂量为 5 g/kg,此后每日注射 1 次至动物取材。

1.3 神经行为学评估 动物缺血 2 h 拔线栓后,按 Zea Longa 方法^[4]进行神经功能缺损评分:0 分,无任何神经功能缺失;1 分,左前肢不能伸展;2 分,向左侧行走;3 分,向左侧转圈成追尾状;4 分,意识障碍,无自主行走。评分在 1~3 分之间视为造模成功,否则弃之不用。保证缺血损伤组和当归治疗组每个时间点的动物数目。由一位不了解分组情况的观察者在各时间点评估记录神经行为学评分。

1.4 免疫组化检测 在各时间点用 10%水合氯醛腹腔麻醉动物(每组每个时间点 5 只),打开胸腔,暴露心脏,经左心室用 100 ml 生理盐水快速冲洗,用 4%多聚甲醛磷酸缓冲液约 500 ml 灌注 1 h。立即断头取脑,将脑组织置于上述灌注液中固定 16 h。从视交叉前缘开始作 3 mm 厚冠状切片,依次脱水、浸蜡、包埋,连续切片(切片厚约 5 μm),贴片,放入烤箱 37℃烤 24~48 h,然后放入 4℃冰箱保存备用。

免疫组化检测采用 SP 法,VEGF 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,S-P 试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品,抗体浓度 1:100,以 0.01 mol/L PBS 代替 1 抗做阴性对照;HPIAS-2000 高清晰度彩色医学图像分析系统计数高倍镜下 VEGF 阳性表达区随机 5 个视野中阳性染色细胞数,取平均值。

1.5 RT-PCR 方法检测 VEGF mRNA 含量:①引物合成:引物设计参考 Genbank 核苷酸序列资料,由上海生物工程公司合成

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30271671,39970935)。

作者单位:430071 湖北武汉市,武汉大学中南医院康复医学科。作者简介:郑婵娟(1976-),女,湖北荆州市人,硕士研究生,医师,主要研究方向:神经康复。*通讯作者:廖维靖。

纯化; VEGF 有义链引物为 5'-GCTCTCTTGGGTGCACTGGA-3', 反义链引物为 5'-CACCGCCTTGGCTTGTACAC-3', 600 bp; β -action 有义链引物为 5'-AACCTAAGGCCAACCGTGAA-3', 反义链引物为 5'-TCATGAGGTAGTCGTTCAAGT-3', 265 bp; ②脑标本采集: 到达时间点后, 10%水合氯醛麻醉动物, 迅速断头开颅取脑, 将脑组织置冰盘上, 右侧脑组织自额极至枕叶分 A、B、C、D 四等分, 迅速取 B 脑片皮质 100 mg 置冻存管, 液氮保存备用; ③组织总 RNA 提取: 采用 TRIzol (Fermentas 公司产品) 提取总 RNA, 经测定 A260/A280 比值在 1.8 以上, 取 1 μ g 总 RNA 用无 RNA 的 DNA 酶 (Fermentas 公司产品) 消化; ④ RT-PCR 反应: cDNA 的合成严格按照逆转录试剂盒 (Fermentas 公司产品) 说明书进行操作, PCR 扩增反应: 94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s; 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 7 min; ⑤产物分析: 取 10 μ l 反应产物做 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, 紫外拍摄观察电泳条带, 激光密度扫描仪扫描, 将 VEGF 扩增产物的光密度值与 β -action 扩

增产物光密度值的比值作为表达水平参数, 进行半定量。

1.6 统计学处理 实验数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.0 软件包进行方差分析。

2 结果

2.1 神经缺损评分 正常对照组: 0 分。缺血损伤组: 1 d 组: (2.50 \pm 0.84) 分; 3 d 组: (1.50 \pm 0.55) 分; 7 d 组: (0.67 \pm 0.52) 分。当归治疗组: 1 d 组: (1.50 \pm 0.55) 分; 3 d 组: (0.67 \pm 0.52) 分; 7 d 组: 0 分。缺血损伤组各时间点的神经缺损评分高于当归治疗组 ($P < 0.05$)。

2.2 免疫组化染色 正常对照组大鼠的皮质、海马和皮质下结构中 VEGF 蛋白呈弱阳性表达; 缺血损伤组和当归治疗组的缺血半暗区有较多的神经细胞、胶质细胞和内皮细胞表达 VEGF 蛋白, 在 1 d 时达到高峰, 此后降低; 当归治疗组各时间点 VEGF 蛋白表达比缺血损伤组明显增强 (见表 1、中插 2 图 2.1a、2.1b)。

表 1 各组大鼠各时间点 VEGF 免疫反应平均光密度值 (% , n = 5)

组别	3 h	6 h	12 h	1 d	3 d	7 d
正常对照组	8.11 \pm 0.62	8.11 \pm 0.62	8.11 \pm 0.62	8.11 \pm 0.62	8.11 \pm 0.62	8.11 \pm 0.62
缺血损伤组	11.47 \pm 1.10 ^a	18.82 \pm 1.26 ^a	22.01 \pm 0.91 ^a	27.94 \pm 1.62 ^a	19.33 \pm 1.71 ^a	10.75 \pm 0.84 ^a
当归治疗组	11.97 \pm 1.31	22.64 \pm 0.76 ^b	28.21 \pm 0.76 ^b	39.87 \pm 1.48 ^b	29.64 \pm 1.39 ^b	12.91 \pm 0.99 ^b

注: a: 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b: 与缺血损伤组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 VEGF mRNA 基因的表达 正常对照组几乎检测不到 VEGF mRNA 的表达; 缺血损伤组 VEGF mRNA 在缺血再灌注 6 h 达到高峰后逐渐降低; 当归治疗组在 3 d 达到高峰, 然后降低, 在第 7 天仍有表达, 且各时间点的表达明显高于对照组 (见中插 2 图 2.2)。

3 讨论

在缺血性脑血管疾病的研究中人们注意到, VEGF 及其受体的促血管形成作用对缺血半暗区血供的改善和侧枝循环的建立具有重要意义。VEGF 激活受体后, 通过激活细胞上的磷脂酶 C 诱导 Ca^{2+} 释放, 从而刺激三磷酸肌醇 (IP_3) 积聚, 通过磷酸肌酸特异性的磷脂酶 C 完成自身磷酸化, 促进内皮细胞的分裂、迁移和增殖^[5]; 另一方面, VEGF 可促使微血管通透性增加, 有助于促进在完全阻塞血栓中产生再通血管, 促进周围侧枝循环建立和改善内皮细胞依赖性血管舒张, 从而在缺血性脑血管疾病的治疗中发挥重要作用。

Zhang 等的研究显示, 在缺血大鼠脑表面注入人工重组 VEGF165 能明显加强缺血性脑损伤后的血管再生, 减轻卒中恢复过程中的神经功能障碍^[6]。Byzova 等应用腺病毒编码的 VEGFD 可成功地表达具有生物活性的 VEGF 蛋白, 诱导血管生成和神经功能恢复^[7]。Wang 等发现, 电针刺激内关穴可增强 VEGF 及其受体的表达, 减小梗死灶的体积, 有助于卒中后神经功能的恢复^[8]。但这些方法尚处于实验阶段, 应用于脑血管疾病的治疗还存在着一定的副作用和不足。当归是祖国传统的活血化瘀药物, 从中分离出来的化学成分有 70 余种, 且当归注射液具有疗效显著、副作用小的特点, 在临床上已广泛应用于脑血管疾病治疗^[9]。本实验显示, 当归治疗组大鼠各时间点 VEGF 蛋白和基因表达水平均高于缺血损伤组, 提示当归能够促进 VEGF 蛋白和基因的表达, 这可能是当归的作用机制之一。本研究还显示, VEGF 蛋白和基因表达的曲线并不一致, 可能是基因和蛋白表达的时间窗不同所致。本实验当归治疗组大鼠 VEGF mRNA 高峰延后且峰值增加, 推测当归中的某

种成分促进了细胞表达 VEGF 和(或)表达该基因的细胞增加, 但具体机制有待研究。神经功能缺损评分显示, 缺血损伤组在 1 d、3 d、7 d 时的评分高于当归治疗组, 且当归治疗组神经功能评分在第 7 天为 0, 表明当归有助于神经功能的恢复。Sun 等认为, VEGF 有神经营养作用, 能刺激轴突生长, 在新血管形成之前对神经系统起直接保护作用, 同时有助于神经细胞存活^[2]; 本研究显示当归能诱导 VEGF 大量表达, 但是何种成分的作用有待进一步的研究阐明。

[参考文献]

[1] 金惠铭, 李先涛. 血管新生的调控[J]. 中国微循环杂志, 2001, 5(2): 85—88.

[2] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. J Clin Invest, 2003, 111(12): 1843—1851.

[3] 廖维靖, 刘淑红, 范明, 等. 线栓阻断大鼠大脑中动脉制作缺血性脑损伤模型的改良及讨论[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24(6): 345—348.

[4] Zear Longa E, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rat[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84—91.

[5] Maeda K, Chung Y, Ogawa Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma[J]. Cancer, 1996, 77(5): 858—863.

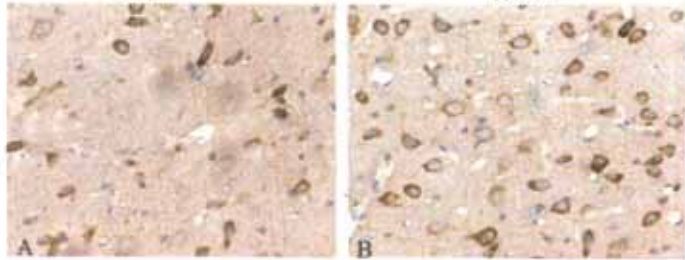
[6] Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, et al. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. J Cerebral Blood Flow Metab, 2002, 22(4): 379—392.

[7] Byzova TV, Goldman CK, Jankau J, et al. Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor D induces tissue-specific vascular patterns in vivo[J]. Blood, 2002, 99(12): 4434—4442.

[8] Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Functional improvement by electroacupuncture after transient middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Neurol Res, 2003, 25(5): 516—521.

[9] 范柳, 孙继虎, 王春安, 等. 川芎 当归萃取液对急性脑梗死大鼠行为和脑组织损伤的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2002, 11(2): 81.

(收稿日期: 2005-08-03)



a. 缺血损伤组
b. 当归治疗组
图2.1 缺血再灌注1 d VEGF免疫组织化学的表达 (×200)

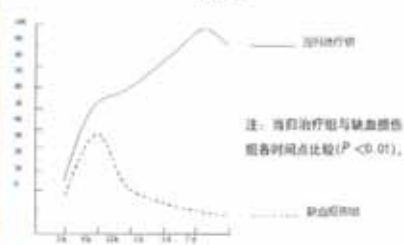


图2.2 VEGF mRNA在缺血再灌注后不同时间点的动态变化 (%，n=3)