

· 基础研究 ·

亚低温对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响

解燕春 李承晏 叶飞 聂德云 王杨

【摘要】 目的 探讨亚低温对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响。**方法** 采用改良的线栓法制作大鼠永久性大脑中动脉闭塞模型,将造模成功的大鼠分为常温组和亚低温组。造模后 14 d 通过股静脉注射异硫氰酸荧光素右旋糖酐(FITC-dextran)标记微血管,结合共聚焦显微镜和 3D Doctor 3.5 版软件分析梗死灶周围微血管的直径、面积及血管分支数目,并采用 TTC 染色观察脑梗死灶体积的变化。**结果** 脑梗死后 14 d,梗死侧微血管直径明显小于对侧,但是血管分支数目及面积较对侧增加,且亚低温组梗死侧微血管直径、面积及分支数目明显大于常温组梗死侧;亚低温组梗死体积也明显小于常温组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 亚低温治疗能减小脑梗死灶体积并促进脑梗死后血管新生。

【关键词】 亚低温; 脑缺血; 血管新生

The effects of mild hypothermia on angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia XIE Yan-chun^{*}, LI Cheng-yan, YE Fei, NIE De-yun, WANG Yang. ^{*} Department of Neurology, Renmin Hospital of Hubei Province, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: LI Cheng-yan, Email: lcy@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of mild hypothermia (MH) on angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia (FCI). **Methods** Unilateral middle cerebral artery occlusion (MCAO) models were established in male Sprague Dawley rats, which were then randomly divided into a normothermic group (N group) and a mild hypothermia group (MH group). Microvessel diameters, numbers of branch points and vessel areas were analyzed in cerebral microvessels at the ischemic boundary perfused with fluorescein isothiocyanate (FITC) dextran on the 14th day after ischemia using laser scanning confocal microscopy (LSCM) and 3D Doctor 3.5 software. Infarct volumes were examined with 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. **Results** Compared with the contra-lateral hemisphere, microvessel diameter was significantly decreased in the ipsilateral hemisphere at the 14th day post MCAO. The total number of branch points and vessel areas had increased in the ipsilateral hemisphere. Microvessel diameters, the number of branch points and vessel areas were significantly increased and infarct volumes were significantly reduced in the MH group compared to the N group. **Conclusion** MH can reduce infarct volume and improve angiogenesis at the ischemic boundary.

【Key words】 Mild hypothermia; Cerebral ischemia; Angiogenesis

脑血管闭塞后缺血可引起神经元变性、坏死,从而导致神经功能缺损,尽快恢复缺血区的血液供应对缺血后神经功能的恢复至关重要。缺血后组织氧分压降低可引起代偿性新生血管形成(neovascularization)或血管新生(angiogenesis),以满足代谢的需要^[1,2]。血管新生的程度与范围直接关系到梗死灶周围血流的改善,影响神经功能的恢复,从而决定患者的预后^[3]。本实验通过观察亚低温治疗对大鼠局灶性脑梗死后血管新生的影响,进一步探讨亚低温的脑保护作用。

材料与方法

一、主要仪器和试剂

德国 Leica 公司产激光共聚焦显微镜和振动切片机;美国 Sigma 公司提供的 2,3,5-三苯基四氮唑溶液(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)和异硫氰酸荧光素标记右旋糖酐(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran)。

二、动物模型制备与分组

取健康雄性清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 50 只,体重(250 ± 30) g,由武汉大学医学院实验动物中心提供。采用改良的线栓法^[4]制作大鼠永久性大脑中动脉闭塞模型。模型入选标准:参照 Longa 的 5 级评分法^[5]评估神经功能缺损程度,0 分及 4 分不纳入本实

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经科(解燕春、李承晏);十堰市人民医院神经科(叶飞);武汉市第五医院神经科(聂德云);武汉市第二医院神经科(王杨)

通讯作者:李承晏, Email: lcy@medmail.com.cn

验。将造模成功的 28 只大鼠分为常温组 12 只和亚低温组 16 只。常温组中取 6 只行 TTC 染色, 6 只股静脉注射 FITC-dextran 标记血管; 亚低温组大鼠死亡 4 只, 剩余大鼠取 6 只行 TTC 染色, 6 只股静脉注射 FITC-dextran 标记血管。

三、亚低温处理方法

亚低温组造模成功后即刻采用冰袋加全身喷洒稀释乙醇进行物理降温, 用电子温度计(欧姆龙大连有限公司)监测深部肛温(插入深度 ≥ 5 cm), 每 30 min 测量 1 次, 温度控制在 $(34 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。当肛温低于 33°C 时, 用 60 W 白炽灯照射大鼠躯干部以升温。亚低温处理 24 h 后撤去冰块及白炽灯, 使体温自然恢复正常。

四、脑梗死灶体积的测量

造模成功 14 d 后, 用过量的 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠, 迅速断头取脑。全脑于 -20°C 下冷冻 15 min, 距离额极 2 mm 处向后连续等距切取 6 个冠状脑片, 脑片厚 2 mm, 立即置入 2% TTC 磷酸缓冲液(pH 值 7.4)中, 37°C 下避光温育 30 min, 置于 10% 福尔马林溶液中固定 24 h 后拍照。采用 MPIAS-500 多媒体彩色图像分析系统计算切片梗死灶面积, 梗死灶体积按下列公式计算: $V = S \times D / T^2$ (S 为每一脑片梗死灶面积, D 为脑片厚度, T 为线性放大倍数)。每一脑片的梗死灶面积采用面积测定软件在计算机上测得, 所有脑片梗死灶体积之和为梗死灶总体积。

五、梗死灶周围区微血管直径、面积及分支数目的测定

造模成功 14 d 后, 用 10% 水合氯醛按 0.35 ml/kg 体重腹腔注射麻醉大鼠, 经股静脉注射 FITC-dextran 0.1 ml (50 mg/ml), 注射完毕 1 min 后迅速断头取脑, 用 4% 多聚甲醛于 4°C 后固定 48 h^[6]。取脑组织经梗死灶做冠状振荡切片, 片厚为 $100\ \mu\text{m}$, 选取缺血侧梗死灶周围 8 个兴趣区和对侧镜像区用激光共聚焦扫描显微镜观察, 氩离子激光器在波长 488 nm 处激发波长为 522 nm 的发射光, 分辨率为 512×512 像素, XYZ 扫描模式, 线平均和面平均均为 2, 物镜镜头放大 20 倍, 以 $0.5\ \mu\text{m}$ 步长进行序列扫描 100 层, 运用 Leica TCS SP2 2.61 版软件进行三维重建, 获得图像体积为 $750\ \mu\text{m} \times 750\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ 。采用 3D Doctor 3.5 版软件分析血管直径和面积, 计数三维立体图像中的血管分支数目。

六、统计学分析

各组数据均用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 SPSS 11.5 版统计软件包进行分析。脑梗死体积采用方差分析, 血管直径、面积和分支数目采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示

差异具有统计学意义。

结 果

一、梗死灶体积变化

常温组梗死体积为 $(110.6 \pm 22.5)\text{ mm}^3$, 亚低温组为 $(81.9 \pm 17.7)\text{ mm}^3$, 亚低温组梗死灶体积明显小于常温组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

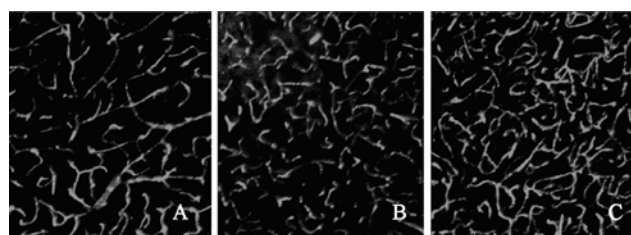
二、血管新生情况

常温组非梗死侧微血管(图 1A)直径明显大于梗死侧(图 1B), 梗死侧多数血管直径小于 $3\ \mu\text{m}$, 对侧血管直径多为 $4 \sim 5\ \mu\text{m}$, 但梗死侧血管分支数目及面积较对侧增加。镜下可见梗死侧微血管不规则扭曲较对侧明显, 且梗死侧由于血脑屏障被破坏可见 FITC-dextran 渗透到血管周围组织(图 1A、B)。亚低温组梗死侧(图 1C)微血管直径、分支数目及面积明显高于常温组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组微血管直径、面积和分支数目定量分析比较见表 1。

表 1 2 组微血管形态定量分析 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	血管直径 (μm)	血管面积 (mm^2)	血管分支 数目(根)
常温组	6			
非梗死侧		4.36 ± 0.11	0.607 ± 0.018	33 ± 4.6
梗死侧		3.31 ± 0.11^b	0.657 ± 0.011^a	43 ± 3.5^a
亚低温组				
梗死侧	6	3.77 ± 0.09^{bd}	0.831 ± 0.066^{ac}	62 ± 5.9^{bc}

注: 与非梗死侧组内比较, $^aP < 0.05$, $^bP < 0.01$; 与常温组梗死侧比较, $^cP < 0.05$, $^dP < 0.01$



A 常温组非梗死侧微血管; B 常温组梗死侧微血管; C 亚低温组梗死侧微血管

图 1 亚低温对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响

讨 论

血管形成有两种途径, 即血管发生 (vasculogenesis) 和血管新生。前者是由来自中胚层的成血管细胞分化为内皮细胞, 内皮细胞在无血管组织中增殖形成原始血管网; 血管新生是已有的母血管通过芽生和内陷形成, 同时内皮细胞与外膜细胞、平滑肌细胞及细胞外基质发生相互作用, 从而形成稳固的血管网结构。缺血性卒中后, 梗死灶周围区的母血管变成大管径薄壁血管, 通过芽生、内陷或形成经腔内

皮桥而成为小管径子血管,14 d 后母血管数目减少而小管径短分支的子血管数目显著增加^[7]。Beck 等^[8]研究发现,血管新生不仅依靠母血管的芽生方式,来源于骨髓的内皮祖细胞(endothelial progenitor cell,EPC)“归巢”到受损组织也参与受损部位的血管新生。脑卒中的临床和动物试验^[3,6-8]表明,脑卒中后血管新生可改善预后,血管密度增高的患者死亡率低,存活时间长。功能成像研究发现,梗死灶周围区的血管新生可增加梗死灶周围的脑血流量^[3]。Taguchi 等^[9]研究发现,免疫缺陷小鼠脑卒中 48 h 后给予人 CD34⁺ 细胞,可通过促进梗死灶周围区的血管新生而促进内源性神经再生,连续皮下注射血管新生抑制剂——内皮他丁(10 μ g) 14 d,可抑制血管新生和神经再生。

亚低温对脑缺血组织的保护作用已得到大多数学者的认可。有研究表明,脑缺血后亚低温治疗开始的时间越早对脑组织的保护作用越明显^[10],且亚低温的持续时间不得少于 12 h^[11],12 ~ 24 h 的亚低温治疗能起到明显的脑保护作用^[12],而低温持续时间过长则会增加副反应的发生。我们在大鼠脑缺血后立即开始亚低温治疗并持续 24 h,研究结果显示,亚低温组梗死灶体积明显小于常温组,证实亚低温对大鼠局灶性脑缺血有脑保护作用,这与以上文献报道的结果一致。此外,本研究经静脉将 FITC-dextran 注射到大鼠体内,通过比较常温组和亚低温组梗死灶周围区微血管直径、面积及分支数目,发现亚低温组梗死侧各项指标均明显高于常温组,这提示亚低温可促进梗死灶周围区血管新生。Cruz 等^[13]在大鼠心脏骤停 8 min 复苏成功后 1 h 予以 33℃ 低温处理,采用免疫印迹法发现再灌注 12 h 低温组和常温组脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)水平无差异,而再灌注 24 h 低温组 BDNF 水平显著高于常温组。Vosler 等^[14]进一步研究发现,亚低温可选择性促进 BDNF 外显子 III 的转录。近年来的研究发现,BDNF 参与了内皮细胞的调节,对血管内皮细胞的生长发育起着重要的支持作用,过度表达 BDNF 的小鼠心脏微血管密度增加,而 BDNF 基因敲除小鼠心脏内血管发育严重缺陷^[15]。胡豫等^[16]的研究也发现,在体外血管新生模型中,BDNF 能明显促进内皮细胞的迁移和管状结构的形成。因此,我们推测亚低温的脑保护机制可能在于:亚低温作用可能通过提高 BDNF 的表达,从而促进内皮细胞增殖、迁移,加速新血管的形成,恢复受损脑组织的血流供应,改善组织低氧和低糖状态,但其具体机制尚有待进一步探讨。

志谢:感谢首尔韩国国立大学医院神经科 Soon-Tae Lee 教授和武汉大学医学院结构中心潘柏群老师为本研究工作提供的指导和帮助。

参 考 文 献

- [1] Plate KH. Mechanism of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58:313-320.
- [2] Wei L, Erinjeri JP, Rovainen CM, et al. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke*, 2001, 32:2179-2184.
- [3] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 1994, 25:1794-1798.
- [4] 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. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24:345-348.
- [5] Longa FZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20:84-87.
- [6] Chen J, Zhang ZG, Li Y, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemia boundary zone after stroke in rats. *Circ Res*, 2003, 92:692-699.
- [7] Morris DC, Yeich T, Khalighi MM, et al. Microvascular structure after embolic focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*, 2003, 972:31-37.
- [8] Beck H, Voswinckel R, Wagner S, et al. Participation of bone marrow-derived cells in long-term repair processes after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23:709-717.
- [9] Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34⁺ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*, 2004, 114:330-338.
- [10] Markarhn GZ, Lee JH, Stein DJ, et al. Mild hypothermia therapeutic window after experimental cerebral ischemia. *Neurosurgery*, 1996, 38:542-550.
- [11] Feigin V, Anderson N, Gunn AJ, et al. The emerging role of therapeutic hypothermia in acute stroke. *Lancet Neurol*, 2003, 2:529-530.
- [12] Safar P, Behringer W, Böttiger BW, et al. Cerebral resuscitation potentials for cardiac arrest. *Crit Care Med*, 2002, 30:140-144.
- [13] Cruz BJ, Fertig KC, Filiano AJ, et al. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22:843-851.
- [14] Vosler PS, Logue ES, Repine MJ, et al. Delayed hypothermia preferentially increases expression of brain-derived neurotrophic factor exon III in rat hippocampus after asphyxial cardiac arrest. *Molecular Brain Res*, 2005, 135:21-29.
- [15] Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development*, 2000, 127:4531-4540.
- [16] 胡豫, 孙春艳, 王雅丹, 等. 脑源性神经营养因子在多发性骨髓瘤患者血浆中表达增高及其意义的初步研究. *中国实验血液学杂志*, 2005, 13:104-109.

(收稿日期:2006-07-29)

(本文编辑:吴 倩)