

· 基础研究 ·

大鼠脑缺血再灌注损伤后 VEGF、Flt-1、Flk-1 mRNA 的表达及意义

郑婵娟 廖维靖 杨万同 蒙兰青

【摘 要】 目的 研究大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 VEGF 及其受体 Flt-1、Flk-1 mRNA 在不同时间点的表达及意义。方法 线栓法制作大鼠脑缺血不同时点模型,采用 RT-PCR 方法观察 VEGF 及其受体 Flt-1、Flk-1 的表达。结果 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 天恢复基线水平; Flt-1、Flk-1 mRNA 在 3 h 表达增强,3 d 达到高峰后逐渐降低至第 7 天仍有表达。结论 局灶性脑缺血再灌注损伤可诱导 VEGF 及其受体的表达。

【关键词】 脑缺血/再灌注; 血管内皮生长因子; 受体

Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors mRNA after focal cerebral ischemic-reperfusion in rats ZHENG Chan-juan, LIAO Wei-jing, YANG Wan-tong, MENG Lan-qing. Department of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 **Objective** To study the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFR) mRNA at different time points after focal cerebral ischemic-reperfusion (CIR) in rats. **Methods** Following the establishment of the of transient ischemia model of middle cerebral artery in rats by Zea-Longa's method, the expression of VEGF and its receptors mRNA was measured with semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) at different time points. **Results** The expression of VEGF mRNA increased 3 h after CIR, and peaked at 6 h, and then declined, returned to the baseline at 7 d. The expression of Flt-1 and Flk-1 mRNA was enhanced at 3 h, and reached its peak at 3 d, then declined gradually. **Conclusion** The expression of VEGF, Flt-1 and Flk-1 mRNA can be induced by focal CIR in rats.

【Key words】 Cerebral ischemia-reperfusion; VEGF; Receptor

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是 Ferrara 等^[1]在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中首先纯化出来的,是一种内皮细胞特异的有丝分裂原。脑缺血再灌注损伤时,VEGF 通过与血管内皮细胞上 VEGF 受体 1(fms-like tyrosine, Flt-1)和 VEGF 受体 2(fetal liver kinase, Flk-1)相结合而在血管中生成,在神经保护等方面发挥重要的作用^[2]。

本实验通过大鼠脑缺血再灌注模型研究了 VEGF 及其受体的早期表达,探讨了 VEGF 及其受体在缺血性脑损伤中的作用。

材料与方法

一、实验动物及分组

雄性 Wistar 大鼠 24 只,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。随机分为正常对照组($n=3$)、假手术组($n=3$)和缺血再灌注组($n=18$),缺血再灌注组根据不同时间点分为缺血 2 h 再灌注 3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、

7 d 组,每个时间点每组分别为 3 只。

二、试剂

TRIzol 变性液、无 RNA 的 DNA 酶(Dnase I, Rnase Free)、RevertAidTM First Strand CDNA Synthesis Kit、GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder 均为 Fermentas 公司产品。引物设计参考 Genbank 核苷酸序列资料,VEGF 正义链引物:5'-GCTCTCTTGGGTGCACTGGA-3', 反义链引物:5'-CACCGCCTTGGCTTGTACACA-3', 635 bp; Flt-1 正义链引物:5'-TCATGCAAGCGGGC-CAGACTCTCTTTC-3', 反义链引物:5'-ATCT-CACGGGGCTCGGCGGGCTTATTT-3', 600 bp; Flk-1 正义链引物:5'-CATTGTGTCCTGCATCCGGGATAACCT-3', 反义链引物:5'-TGTACACGATGCCATGCTCGTCACTGA-3', 600 bp; β -action 正义链引物:5'-AAC-CCTAAGGCCAACCGTGAA-3', 反义链引物:5'-TCAT-GAGGTAGTCGTTTCAGGT-3', 265 bp,由 Sangon 公司合成,其余有关分子生物学试剂由武汉大学免疫教研室-分子生物学实验室提供。

三、动物造模

大脑中动脉阻断及再灌注模型制作参照廖维靖等^[3]线栓改良法,10% 水合氯醛(350 mg/kg 体重)腹

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

作者单位:430071 武汉,武汉大学中南医院康复医学科

腔注射麻醉后,仰卧固定,颈正中切口,仔细分离与右侧颈总动脉伴行的迷走神经,暴露颈内动脉和颈外动脉,在其分叉处丝线结扎颈外动脉,近心端结扎颈总动脉,并在其远端预置一结扎线。在颈总动脉结扎线的远端剪一小切口,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(middle cerebral artery occlusion, MCAO)。缺血 2 h 后,将栓线拔退至颈总动脉,恢复大脑中动脉血供。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。

四、神经功能缺损评分

动物缺血 2 h 拔线栓后,按 Zea Longa^[4]方法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。取评分在 1~3 分之间的动物,且保证每个时间点动物的数目。

五、RT-PCR 方法检测 VEGF、Flt-1、Flk-1 mRNA 的含量

1. 脑标本的采集:到达各时间点的动物用 10% 水合氯醛麻醉,断头开颅取脑置冰盘上,将右侧脑组织自额极至枕叶分 A、B、C、D 四等份,迅速取 B 脑片皮质 100 mg 置冻存管,液氮保存备用。

2. 组织总 RNA 的提取:TRIzol 提取总 RNA,经测定 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 以上,取 1 μ g 总 RNA 用无 RNA 的 DNA 酶消化。

3. CDNA 的合成:严格按照逆转录试剂盒说明书进行操作。

4. 取 12.5 μ l 反应产物在 2% 的琼脂糖凝胶电泳,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底片。计算曲线下峰面积作为 PCR 产物含量,用下列公式计算 mRNA 的表达水平。产物的含量 = (Flt-1、Flk-1 扩增产物的光密度值/参照系统 β -action 扩增产物的光密度值) $\times$ 100%。

六、统计学分析

采用 SPSS 11.0 软件包,实验数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,One-Way ANOVA 的方法进行方差分析,当方差齐时选用 LSD,当方差不齐时选用 Tamhane' T2 完成统计学分析。

结 果

正常对照组几乎未检测到 VEGF 及其受体基因的表达;假手术组可检测到少量 VEGF mRNA 的表达,不能检测到 Flt-1、Flk-1 mRNA 的表达;缺血再灌模型中 VEGF 及其受体基因在各时间点皆有表达。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;Flt-1、Flk-1 mRNA 在 3 h 即有表达,3 d 达到高峰后逐渐降低,至第 7 天仍有少量表达。见表 1 及图 1~3。

表 1 缺血再灌后 VEGF、Flt-1、Flk-1 的动态变化(%)

组 别	例数	VEGF	Flt-1	Flk-1
正常对照组	3	0	0	0
假手术组	3	10.72 $\pm$ 0.21	0	0
缺血再灌 3 h 组	3	19.38 $\pm$ 0.48 *	10.71 $\pm$ 0.53	14.20 $\pm$ 1.02
缺血再灌 6 h 组	3	48.87 $\pm$ 0.76 *	12.48 $\pm$ 0.45	15.70 $\pm$ 0.46
缺血再灌 12 h 组	3	21.38 $\pm$ 1.14 *	14.21 $\pm$ 0.30 [#]	17.27 $\pm$ 0.27
缺血再灌 1 d 组	3	15.64 $\pm$ 0.27 *	15.84 $\pm$ 0.79 [#]	19.45 $\pm$ 0.44
缺血再灌 3 d 组	3	12.46 $\pm$ 0.38 *	17.42 $\pm$ 0.40 [△]	21.14 $\pm$ 0.43 [#]
缺血再灌 7 d 组	3	11.24 $\pm$ 0.64	10.73 $\pm$ 0.37	14.46 $\pm$ 0.92

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与缺血再灌 3 h 组比较,[#] $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$

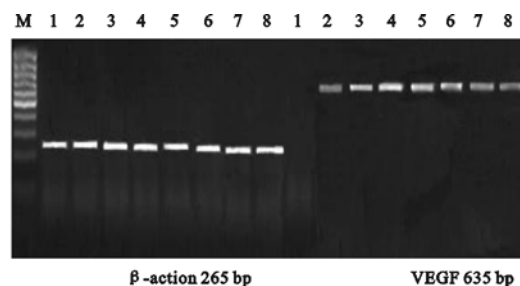


图 1 VEGF、 β -action 2% 琼脂糖凝胶电泳图

注:M 代表 DNA 标志物,条带从上至下依次为 1031、900、800、700、600、500、400、300、200、100 bp;1 代表正常对照;2 代表假手术组,3~8 依次代表缺血再灌 3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、7 d 组

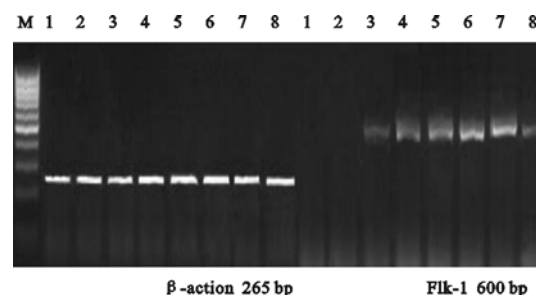


图 2 Flt-1、 β -action 2% 琼脂糖凝胶电泳图

注:M 代表 DNA 标志物;1 代表正常对照;2 代表假手术组,3~8 依次代表缺血再灌 3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、7 d 组

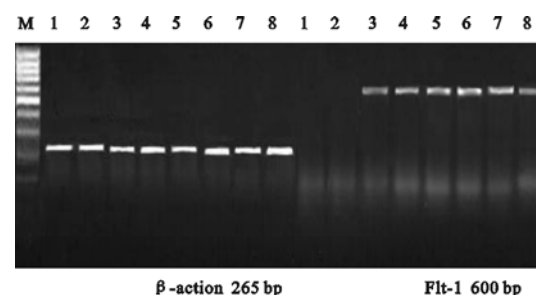


图 3 Flk-1、 β -action 2% 琼脂糖凝胶电泳图

注:M 代表 DNA 标志物;1 代表正常对照;2 代表假手术组,3~8 依次代表缺血再灌 3 h、6 h、12 h、1 d、3 d、7 d 组

讨 论

脑缺血再灌注损伤是临床上许多疾病伴发的病理损害过程,它的进程对原发性疾病的预后起决定性作用,目前对其治疗主要集中在缺血半影区血供的改善及侧枝循环的建立。脑血管的生成可分为四个阶段:最初内皮细胞活化阶段、主动血管生成的两个连续阶段和血管周期性增殖的最后阶段。Plate^[5]认为脑血管生成是一个紧密的调控过程,它由神经外胚层来源的生长因子与内皮细胞表达的酪氨酸激酶受体结合调节。研究发现,缺血性脑损伤可诱导 VEGF 基因早期表达,在缺血再灌 6 h 即达到峰值后很快降低,至第 7 天恢复到基线水平。Flt-1、Flk-1 作为 VEGF 的主导受体,其表达与 VEGF 在时间上并不一致,在第 3 天达到峰值后减弱,且假手术组不能检测到两受体的表达。Mu 等^[6]认为在缺血性脑损伤半暗带低氧区,低氧激活了低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF-1 α)的表达,激活的 HIF-1 α 诱导 VEGF 过量表达,同时 VEGF 刺激了其受体的表达;VEGF 与其受体结合后,一方面促使微血管内皮细胞增殖、迁移,促使新血管生成,改善局部血供,并保护内皮细胞不发生程序性死亡,从而减轻缺血性脑损伤;另一方面通过直接或间接抑制神经细胞凋亡而保护神经元。本研究在缺血再灌注早期检测到 VEGF 及其受体的表达也证明了它们在缺血性脑损伤早期的恢复过程中具有重要的作用。因此如何在缺血性脑损伤早期诱导 VEGF 及其受体大量表达为缺血性脑损伤患者的治疗提供了线索。Zhang 等^[7]发现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中的血管再生,减少在卒中恢复过程中的神经功能障碍。Byzova 等^[8]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,诱导了血管生成和神经功能恢复。Wang 等^[9]发现电针刺激内关穴增强了 VEGF 及其受体的表达,减少了梗死的体积,有助于卒中后神经功能的恢复。但这些方法仅在实验阶段,应用于脑血管疾病的治疗还存在着一定的副作用和不足,需进一步探索各种干预因素对缺血性脑损伤中 VEGF 及其受体表达的影响,寻找切实可行且安全可靠的治疗缺血性脑损伤的方法。

VEGF 与其受体的作用机制是复杂的,它们在血管生成中如何发挥作用?人们进行了探索。鼠的受体敲除实验^[10]发现任何一种受体被敲除都将导致小鼠血管生成障碍,并于胚胎期 8~10 d 后死亡。缺乏 Flk-1 的小鼠只有极少量散在的血管内皮细胞,不够形成血管,而缺乏 Flt-1 的小鼠只有相互畸形连接的非器质管道。本文的研究也发现 Flk-1 mRNA 的表达明显

强于 Flt-1,提示两者的功能可能存在差异。Rahimi 等^[11]发现 Flk-1 在体内外触发细胞内信号转导机制中发挥作用,Flt-1 仅在体内抑制前者活性。Flt-1 主要调节细胞外基层内皮细胞的内部反应,对内皮细胞向基层细胞的分化具有关键作用,而 Flk-1 是内皮细胞有丝分裂和增殖的决定因素。最近的研究^[12]证明,两受体在体内血管生成中必不可少,且两受体的协同作用比其单独作用有更大的刺激动脉形成的潜能。

本实验通过对 VEGF 及其受体在局灶性脑缺血早期表达的研究,认为 VEGF 对其受体表达可能有促进作用,但 VEGF 在缺血性脑损伤中的生物学作用,即 VEGF 与其受体的作用机制和各种干预因素的影响还没有可靠的证据来解释清楚,另外与缺血性脑损伤后血管再生有关的因子还有许多,就各因子间的相互作用也有待进一步完善。

参 考 文 献

- 1 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161:851-858.
- 2 Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*, 2003, 111:1843-1851.
- 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. *中华物理医学与康复杂志*, 2002, 24:345-348.
- 4 Zea-Longa E, Weinstein P R, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rat. *Stroke*, 1989, 20:84-91.
- 5 Plate KH. Mechanism of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58:313-320.
- 6 Mu D, Jiang X, Sheldon RA, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model. *Neurobiol Dis*, 2003, 14:524-534.
- 7 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 Cerebral Blood Flow Metab*, 2002, 22:379-392.
- 8 Byzova TV, Goldman CK, Jankau J, et al. Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo. *Blood*, 2002, 99:4434-4442.
- 9 Wang SJ, Omori N, Li F, et al. Functional improvement by electro-acupuncture after transient middle cerebral artery Occlusion in rats. *Neurol Res*, 2003, 25:516-521.
- 10 Beck L, D'amore PA. Vascular development cellular and molecular regulation. *FASEB J*, 1997, 11:356-373.
- 11 Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K, et al. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenesis activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2000, 275:16986-16992.
- 12 Babiak A, Schumm AM, Wangler C, et al. Coordinated activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 is a potent arteriogenic stimulus leading to enhancement of regional perfusion. *Cardiovasc Res*, 2004, 61:789-795.

(修回日期:2005-04-11)

(本文编辑:阮仕衡)