

· 基础研究 ·

血管内皮生长因子₁₆₅对局灶性脑梗死的影响

常燕群 刘勇 范华燕

【摘要】目的 探讨血管内皮生长因子₁₆₅ (VEGF₁₆₅) 基因对大鼠脑梗死的治疗作用。**方法** 用线栓法制成 Wistar 大鼠持续性大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,将质粒载体与 VEGF₁₆₅ 基因构成的重组 DNA (puC-CAGGS/hVEGF₁₆₅) 经颅骨孔注入到梗死区。术后第 8 天断头取脑,经 2% 红四氮唑染色后测定各组脑梗死体积,采用逆转录 PCR 和免疫组织化学方法检测 VEGF₁₆₅ 基因的表达及血管增生情况。**结果** 治疗组 VEGF mRNA、VEGF 蛋白表达增高,治疗组脑梗死区周围血管数量为 50.76 条/高倍镜视野(×400),明显高于对照组的 40.67 条/高倍镜视野(×400), $P < 0.01$;治疗组脑梗死体积为 9.32%,明显小于对照组的 23.68%, $P < 0.01$ 。**结论** 在质粒载体的介导下,VEGF₁₆₅ 基因可以转化到缺血脑组织中,并表达 VEGF₁₆₅ 蛋白,可明显缩小脑梗死体积,治疗脑梗死。

【关键词】 脑梗死; 血管内皮生长因子₁₆₅; 基因治疗

Vascular endothelial growth factor₁₆₅ can reduce the cerebral lesion caused by focal cerebral ischemia in rats CHANG Yan-qun, LIU Yong, FAN Hua-yan. Department of Neurology and Rehabilitation, Guangdong Maternal and Children's Hospital, Guangzhou 510010, China

【Abstract】Objective To study the effects of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor₁₆₅ (VEGF₁₆₅) on cerebral infarction in rats. **Methods** Following establishment of a permanent middle cerebral artery occlusion (MACO) model by nylon suture embolization in Wistar rats, the puCCAGGS/hVEGF₁₆₅ was directly injected into the ischemic tissues through skull hole. Seven days later, the rats were sacrificed. The infarct volume was measured by 2% TTC staining technique, then the expression of VEGF₁₆₅ gene and vascular proliferation were measured by use of RT-PCR and immunohistochemistry methods. **Results** Expression of VEGF₁₆₅ mRNA and VEGF protein in the therapy group increased. Compared with the control group, the number of vessels of the therapy group was significantly higher (50.76/HPF vs 40.67/HPF) ($P < 0.01$), and the infarct volume of therapy group was obviously smaller in the therapy group (9.32% vs 23.68%) ($P < 0.01$). **Conclusion** Topically applied VEGF₁₆₅ gene can be transformed into the ischemia tissues in the brain and express VEGF₁₆₅ protein, which can help promote vascular proliferation and reduce the infarct volume.

【Key words】 Cerebral infarct; Vascular endothelial growth factor₁₆₅; Gene therapy

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是由多种细胞合成分泌,且具有促进血管内皮细胞增殖和促进新血管形成作用的细胞因子。VEGF 有 VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆ 等 5 种亚型,其中 VEGF₁₆₅ 为分泌型,可溶解、易扩散,可作用于较远处的组织,还能与蛋白多糖结合而起到延长作用时间的效果,因此对其基因的实验研究较多。多项研究表明,VEGF 或其基因可以较好地治疗实验动物外周血管及中央血管闭塞性疾病,挽救缺血的肢体和心肌^[1-3]。临床上应用 VEGF 或其基因治疗冠心病或肢体动脉闭塞性疾病已取得了较好的效果,而应用 VEGF 或其基因治疗缺血性脑血管病还处于动物实验阶段^[4-6]。有报道^[7] 采用外源性 VEGF 蛋白治疗鼠脑梗死有效,由于需要反复多次给药,且用药

量大、易降解、维持时间短等,限制了其应用。本实验将 VEGF₁₆₅ 基因的重组 DNA 注入局灶性缺血大鼠脑梗死区,以探讨 VEGF₁₆₅ 基因对缺血性脑梗死的治疗作用。

材料与方法

一、一般资料

Wistar 大鼠 65 只(湖北省医科院动物中心提供),体重(250±30)g,随机分为 A、B、C、D、E 5 组,每组 13 只。

A 组为正常对照组,正常喂养,不经任何处理。B 组为假手术组,制作大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型时,只将栓线插入颈内动脉约 1 cm。C 组为单纯 MCAO 对照组,采用改进的线栓法^[8] 制备大鼠持续性 MCAO 模型。模型成功的标志为:① Zealona 5 分制^[9] 评分为 1~3 分;② 术后 6~12 h 断头取脑,经 2% 红四氮唑 (TTC) 染色梗死区为

白色,正常组织为红色,分界清楚。D 组为空载质粒组,MCAO 术后顶部剃毛、消毒,于前囟偏右旁开 5 mm 处钻一颅孔,微量进样器垂直进针 3.5 mm(注射部位为鼠脑皮层下,相当于放射冠区),注入 5 μ l 空载质粒(puCCAGGS, 20 μ g/ μ l,日本九州大学 Yonemitsu 博士赠),然后缝合切口,精心饲养。E 组为治疗组,动物模型及药物注射的方法同 D 组,但注入的药物为 5 μ l 质粒载体与 VEGF₁₆₅ 基因构成的重组 DNA(puC-CAGGS/h VEGF₁₆₅)。

二、VEGF₁₆₅ 基因表达水平的检测

MCAO 术后第 8 天,每组随机取 3 只大鼠,断头取右脑,用 SABC 总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)提取系统(II)提取脑组织中总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 样品,用逆转录聚合酶链式反应(RT-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒在聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪上,进行逆转录和扩增。扩增结束后取 5 μ l PCR 产物上样,在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳。VEGF₁₆₅ 基因的 PCR 正义引物 5'-gag ggc aga atc atc acg aag t-3',反义引物 5'-tcc tat gtg ctg gcc ttg gtg a-3';内参照 GAPD 的 PCR 正义引物为 5'-tcc etc aag att gtc agc aa-3',反义引物 5'-aga tcc aca acg gat aca tt-3'(以上引物均由北京赛百盛公司合成,PCR marker 为 Promega 产品)。

三、VEGF₁₆₅、层粘连蛋白免疫组织化学检测

MCAO 术后第 8 天,每组随机另取 5 只大鼠,断头取脑,于 -20℃ 冷冻 3 min 后按冠状切面切成 2 mm 厚脑片 6 片,自头向尾端的第 4 片用 4% 多聚甲醛缓冲液固定 2 d,采用常规方法制成 4 μ m 厚的脑切片,用 VEGF₁₆₅、层粘连蛋白(Lamin)抗体和免疫组织化学试剂盒进行染色。每个标本在梗死灶周围计数 10 个高倍视野中的阳性细胞数,其均值即为该标本每个高倍视野中的阳性细胞数。同样计数 Lamin 染色聚集区,其均值即为该标本每个高倍视野中的血管数。

四、鼠脑梗死体积百分比的测定

MCAO 术后第 8 天,每组剩下的 5 只大鼠按前述方法切成 6 片,立即放入 37℃、2% TTC 中染色 30 min。用德国产莱卡图像分析仪测量每一脑片尾侧面的梗死面积(白色区)及其同侧脑片面积。6 层梗死面积总和占同侧脑片面积总和的百分比即为梗死体积的百分比。

五、统计学分析

所测数据以($\bar{x} \pm s$)表示,各组样本的比较采用方差分析。

结 果

一、VEGF₁₆₅ 基因在大鼠脑组织中的表达

各组鼠脑 VEGF₁₆₅ 基因表达信使核糖核酸(mes-

senger ribonucleic acid, mRNA) 的 RT-PCR 结果参见图 1。A 组及 B 组鼠脑中 VEGF₁₆₅ mRNA 的表达水平较低;C 组及 D 组鼠脑中 VEGF₁₆₅ mRNA 表达增加,水平相近;E 组鼠脑中 VEGF₁₆₅ 基因表达 mRNA 明显增高。

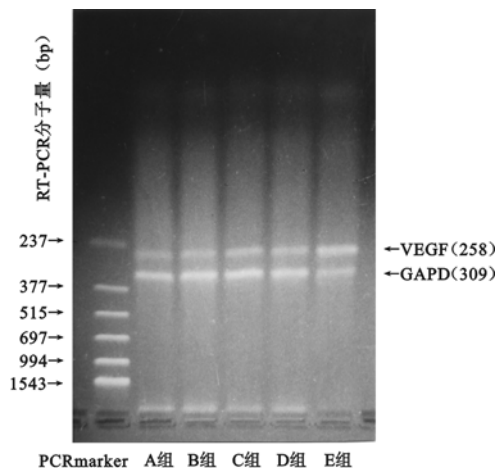


图 1 VEGFmRNA 的 RT-PCR 产物电泳照片

注:GAPK 为内参照

二、VEGF₁₆₅ 蛋白在大鼠脑组织中的表达

VEGF₁₆₅ 蛋白在脑组织中的表达各组鼠脑 VEGF₁₆₅ 蛋白的免疫组织化学结果见图 2,每个高倍视野(10 × 40)中的平均阳性细胞数见表 1。

表 1 鼠脑 VEGF₁₆₅ 免疫组化阳性细胞数(个/高倍视野, 10 × 40)

组别	例数	阳性细胞数						平均值
A 组	5	8.00	10.50	6.75	6.25	4.50	7.20	7.20
B 组	5	8.50	9.50	9.23	7.50	5.50	8.05	8.05
C 组	5	35.75	37.25	25.00	45.50	32.50	35.20	35.20
D 组	5	37.25	38.00	32.50	38.75	27.50	34.80	34.80
E 组	5	75.25	87.25	88.75	83.00	61.75	79.20	79.20

从图 2 和表 1 可见,A 和 B 两组 VEGF 免疫组化反应较弱;C 和 D 两组反应稍强,组内差异无显著性意义($P > 0.05$),与 A、B 两组相比差异有显著性意义($P < 0.01$);E 组免疫组化反应强,与各组比较差异均有显著性意义($P < 0.01$)。手术对侧脑组织仅有微弱的 VEGF 显色。

三、血管计数

各组鼠脑 Lamin 的免疫组织化学染色结果见图 3,每个高倍视野(10 × 40)中平均阳性血管数见表 2。

从图 3 和表 2 可见,C、D 两组血管数较 A、B 两组血管数稍增多,组内及组间差异均无显著性意义($P > 0.05$);E 组血管数明显增多,与各组比较差异均有显著性意义($P < 0.01$)。

四、梗死体积百分比

各组鼠脑片的 2% TTC 染色结果见图 4,梗死体积百分比见表 3。

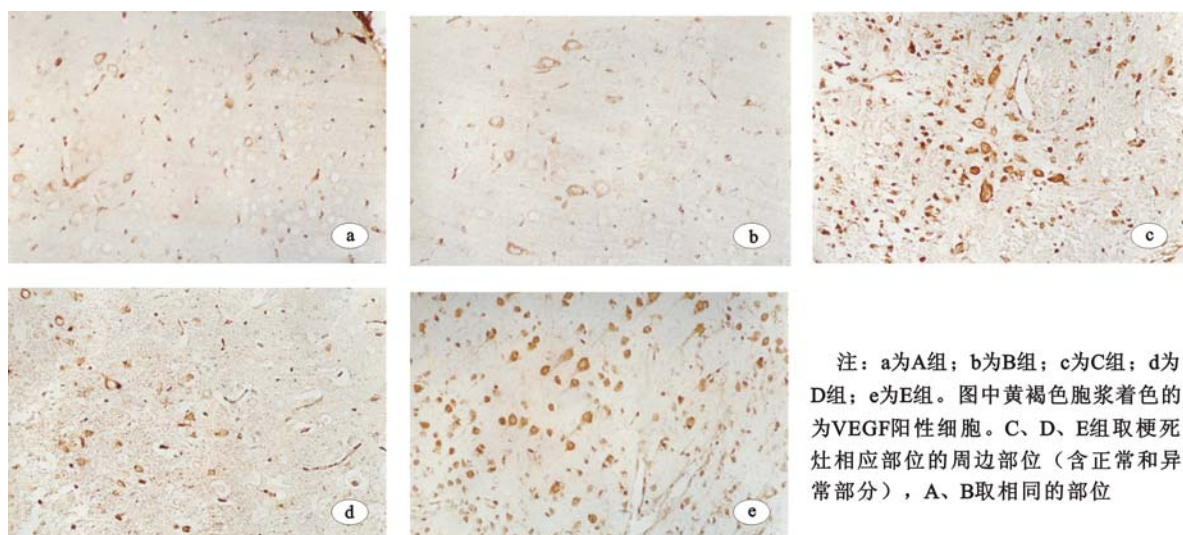
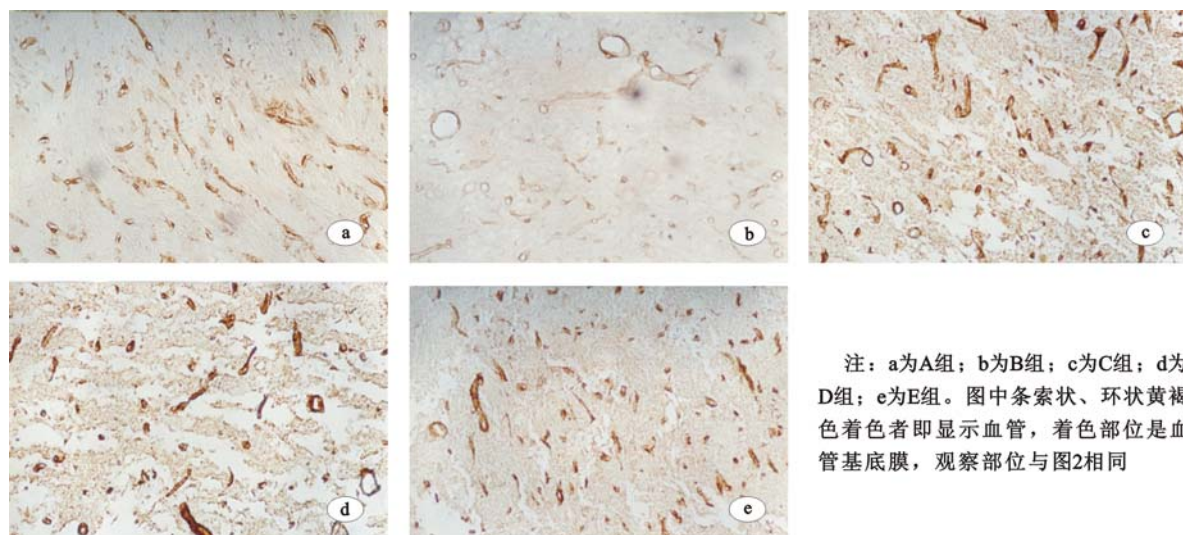
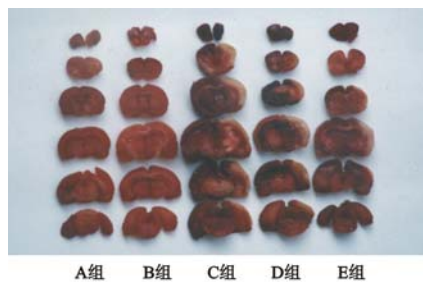
表 2 鼠脑 Lamin 免疫组化显示脑血管数(条/高倍视野, 10×40)

组别	例数	血管数					平均值
A 组	5	39.25	38.75	40.00	38.20	37.02	38.64
B 组	5	36.75	42.50	38.42	40.35	35.67	38.74
C 组	5	38.65	44.25	39.30	41.26	37.50	40.19
D 组	5	39.67	43.50	42.12	37.34	40.80	40.67
E 组	5	49.95	44.20	52.36	50.78	56.49	50.76

表 3 各组鼠脑梗死体积百分比(%)

组别	例数	各个鼠脑梗死体积百分比					平均值
C 组	5	17.98	25.87	17.12	27.10	22.28	22.05
D 组	5	24.65	18.90	18.34	29.00	27.50	23.68
E 组	5	10.95	8.60	11.32	10.70	5.05	9.32

从图 4 和表 3 可见, C、D 两组梗死体积百分比接近($P > 0.05$)。E 组脑梗死体积百分比约是 C 组或 D 组的一半, 与两者比较梗死体积明显缩小($P < 0.01$)。

**图 2** 各组大鼠脑组织中 VEGF₁₆₅ 蛋白的表达(10×40)**图 3** 各组大鼠脑组织中 Lamin 的表达(10×40)**图 4** 各组鼠脑脑片 TTC 染色照片
注: 白色组织为梗死灶, 暗红色部分为正常组织

讨 论

由质粒载体和 VEGF₁₆₅ 基因构建的重组 DNA (puC-CAGGS/hVEGF₁₆₅) 可以转化到缺血脑组织, 尤其是缺血半暗带或半影区 (penumbra) 的神经细胞中, 表达较高水平的 VEGF₁₆₅ mRNA、VEGF₁₆₅ 蛋白。本实验结果表明, 缺血脑组织尤其是缺血半暗带中的细胞在非干预情况下表达 VEGF mRNA、VEGF 蛋白增加, 但程度有限, 可能只是病理生理反应而不能达到自身修复的作用。治疗组

VEGF₁₆₅ mRNA、VEGF₁₆₅ 蛋白表达水平明显增高,表明缺血脑组织有摄取并表达 puCCAGGS/hVEGF₁₆₅ 的能力,脑梗死体积也明显缩小,这可能是 VEGF₁₆₅ 蛋白表达水平明显增高,起到一定治疗作用的结果。从本试验结果分析还可以发现,脑组织在缺血情况下呈现了和缺血的肌肉组织一样的病理生理反应^[2],表现出比正常组织更强的摄取和表达外源基因的能力。

Alon 等^[10] 的研究显示,VEGF 可以防止缺血组织内的毛细血管消失,减少内皮细胞发生凋亡的程度。因此,VEGF 有可能通过直接抑制神经细胞凋亡,最终达到保护脑细胞、缩小脑梗死体积的作用。Ku 等^[11] 认为,VEGF 可能通过一氧化氮舒张血管平滑肌,促使缺血脑组织血流供应部分恢复,从而保护缺血脑组织。我们认为 VEGF 通过促进新血管形成,可改善缺血半暗带的供血从而挽救半暗带。因为缺血半暗带内的脑组织维持存活的时间一般是 24 ~ 48 h 左右,超过这个时间再灌注(如果不考虑再灌注损伤)可能已无效^[12],而生成新血管需要数天以上^[1,2]。因此,梗死区内由于使用 VEGF 所产生的新生血管可能使局部血液循环改善,减少了脑梗死再发的可能性,这与其它保护机制一起,对最终缩小脑梗死体积起到重要作用。本试验中显示的 VEGF₁₆₅ 基因治疗组脑梗死体积缩小,到底是通过抑制脑细胞的凋亡和改善缺血半暗带的血液循环,还是有其它原因,有待进一步研究。

有报道显示,VEGF 的生理病理作用存在矛盾。作为多种组织(包括脑组织)细胞合成的细胞因子,VEGF 除了促进血管内皮细胞增殖从而促进新血管形成外,还可以增加血管的通透性,因此它也被称为血管通透因子(vascular permeability factor, VPF),在脑梗死发生时可能导致脑梗死灶水肿加重及颅内压增高^[1]。但 Hayashi^[7] 认为外源性 VEGF 会产生相反作用,减轻短暂性脑缺血时的脑水肿。本实验和其它文献报道没有发现在治疗过程中治疗组的死亡率比对照组高这一现象,脑组织水肿无明显增加。

本研究发现,通过转化外源性 VEGF₁₆₅ 基因到大鼠脑组织中,其效果与其它试验中直接用外源性 VEGF

蛋白相同,但前者只需局部给药 1 次,比较经济、方便。其它实验表明应用外源性 VEGF 基因和外源性 VEGF 蛋白很少出现副作用,比较安全。

总之,颅内注射外源性 VEGF 对于减少脑损伤有一定的治疗作用,但在使用途径上还需要进一步改进。目前,对于 VEGF 基因治疗的机制、治疗时机、使用方法等还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Takeshita S, Isshiki T, Mori H, et al. Microangiographic assessment of collateral vessel formation following direct gene transfer of vascular endothelial growth factor in rats. *Cardiovasc Res*, 1997, 35: 547-552.
- 2 Tsurumi Y, Kearney M, Chen D, et al. Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. *Circulation*, 1997, 96: 382-388.
- 3 Muhlhauser J, Merrill MJ, Pili R, et al. VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo. *Circ Res*, 1995, 77: 1077-1086.
- 4 Losordo DW, Vale PR, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am Heart J*, 1999, 138: 132-141.
- 5 Arveschoug A, Christensen KS. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 1999, 99: 2967-2968.
- 6 Baumgartner I, Isner JM. Stimulation of peripheral angiogenesis by vascular endothelial growth factor (VEGF). *Vasa*, 1998, 27: 201-206.
- 7 Hayashi T, Abe K, Itoyama Y. Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia. *J cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18: 887-895.
- 8 吴莹, 陈文荣, 吴春泽, 等. 栓线法大鼠局灶性脑缺血模型的建立与改进. *汕头大学医学院学报*, 1999, 12: 23-25.
- 9 Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- 10 Alon T, Hemo I, Itin A, et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implication for retinopathy of prematurity. *Nat Med*, 1995, 1: 1024-1028.
- 11 Ku DD, Zaleski JK, Liu S, et al. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*, 1993, 265: 586-592.
- 12 刘士民, 郭玉璞. 脑缺血半暗带的研究进展. *中华神经科杂志*, 1996, 29: 365-367.

(收稿日期: 2003-02-27)

(本文编辑: 阮仕衡)

· 征 订 ·

《中华物理医学与康复杂志》2003 年合订本征订启事

《中华物理医学与康复杂志》2003 年合订本新鲜出炉, 分上、下两册, 每套定价 120.00 元。本刊内容丰富, 资料新, 一册在手, 将有助于您全面了解我国物理医学与康复领域的最新进展与研究成果。合订本外观精美, 便于查阅, 收藏或赠送皆宜, 欢迎订购。欲购从速, 数量有限, 售完为止。

欲购者请直接汇款至本刊编辑部, 于汇款单附言栏注明“订购 2003 年合订本 × × 套”字样, 我们将免费为您邮寄。

联系地址: (430030) 武汉市解放大道 1095 号(同济医院内)《中华物理医学与康复杂志》编辑部

联系电话: 027-83662874

E-mail: cjpmr@tjh.tjmu.edu.cn

《中华物理医学与康复杂志》编辑部