

## · 论著 ·

大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤  
血管内皮细胞生长因子表达的研究

邢影 徐忠信 莽靖 钱佳利

**【摘要】 目的** 探讨血管内皮细胞生长因子(VEGF)在局灶性脑缺血-再灌注损伤中的表达及作用。**方法** 采用免疫组化染色、原位杂交技术检测缺血 3 h 以及缺血 3 h、再灌注 3、6、24、48 和 72 h 大鼠中动脉栓塞模型大鼠脑组织 VEGF 蛋白及 mRNA 表达。**结果** 正常对照组脑组织有极低水平的 VEGF 表达,脑缺血后表达主要位于半影区,随缺血及缺血-再灌注时间延长,中心区由表达增强降低至正常水平,半影区表达逐渐增强。**结论** 内源性 VEGF 表达增强,对局灶性脑缺血-再灌注损伤具有保护作用。

**【关键词】** 缺血-再灌注损伤,脑; 半影区; 血管内皮细胞生长因子

**Vascular endothelial growth factor expression in focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats** XING Ying, XU Zhong-xin, MANG Jing, QIAN Jia-li. Department of Neurology, China-Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun 130031, Jilin, China

**【Abstract】 Objective** To study the vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and its role in focal cerebral ischemia/reperfusion injury. **Methods** VEGF protein and mRNA expressions at the site of focal ischemia/reperfusion of rat cerebrum were assessed with immunohistochemistry and hybridization techniques. **Results** In normal cerebral tissue there was lower expression of VEGF. It was found to be expressed in the penumbra area after ischemia. With the prolongation of ischemia and ischemia/reperfusion, enhanced expression of VEGF tended to decline to normal level, while it enhanced in the penumbra area. **Conclusion** Enhanced VEGF expression might play a protective role in focal ischemia/reperfusion injury to the cerebrum.

**【Key words】** cerebral ischemia/reperfusion injury; penumbra; vascular endothelial growth factor

血管内皮细胞生长因子(VEGF)又称血管通透性因子(VPF),能特异性地作用于血管内皮细胞,促进血管内皮细胞增殖及体内新生血管生成,并增加血管通透性。为进一步探讨 VEGF 在局灶性脑缺血-再灌注损伤中的表达及作用,本研究拟采用免疫组化染色、原位杂交技术,从细胞及分子水平观察缺血区及半影区 VEGF 的动态变化,报告如下。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物分组:**40 只雄性 Wistar 大鼠,体重 250~280 g,鼠龄 3~4 个月,吉林大学医学部实验动物中心提供。随机分成正常对照组、假手术组、缺血 3 h 组以及缺血 3 h 再灌注 3、6、24、48 和 72 h 共 8 个组,每组 5 只。

**1.2 动物模型制备:**参照 Zea Longa 等<sup>[1]</sup>报道的方法,选用颈外动脉插入线栓法制备大鼠大脑中动脉

栓塞(MCAO)模型。

**1.3 病理标本制备:**以体积分数为 10%的水合氯醛麻醉大鼠,暴露心脏,以 12 号穿刺针刺入左心室,眼科剪刀剪开右心房,首先灌注质量分数为 0.9%的温生理盐水约 200 ml,待从右心房流出液体变清亮时,换用含质量分数为 0.1%的焦碳酸二乙酯(DEPC)、体积分数为 4%的多聚甲醛、0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)200 ml 进行灌注固定。断头取脑,以视交叉为中心,相当于前联合连续脑片继续固定 4~6 h,常规脱水,透明,浸蜡包埋。

**1.4 切片制备:**免疫组化染色切片只需常规石蜡切片;原位杂交的切片需戴手套,切片机的刀柄、刀片需用质量分数为 10%十二烷基硫酸钠(SDS)进行处理,展片用温蒸馏水,并加入 0.1%DEPC 适量。制成的切片置于 70 ℃烤箱中烤 2~3 h,放入 50 ℃烤箱中过夜,烤好的切片用锡纸包裹后放入 4 ℃冰箱或室温保存。切片厚度均为 4 μm。

**1.5 免疫组化方法:**VEGF 免疫组化染色采用链霉卵白素(SP)法。SP 试剂盒为福州迈新生物技术公司产品。VEGF 以胞浆和血管内皮细胞胞浆或胞膜棕黄色为阳性。

基金项目:吉林省科技厅科研基金资助项目(20030536-5);吉林大学中日联谊医院重点资助项目(2002-1-6)

作者单位:130031 长春,吉林大学中日联谊医院神经内科(邢影,徐忠信,莽靖);长春中医学院生理教研室(钱佳利)

通讯作者:徐忠信(1965-),男(汉族),教授,博士研究生导师

作者简介:邢影(1970-),女(汉族),吉林省长春市人,博士研究生,主治医师。

1.6 原位杂交: VEGF mRNA 原位杂交试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。探针序列为: 5'-CAGCC TGGGA CCACT TGGCA TGGTG GAGGT AGAGC - 3'; 5'-CACAT GTGCA AG-TAC GTTCG TTAA CTCAA GCTGC - 3'。VEGF mRNA 以胞浆和胞膜棕黄色为阳性。

1.7 图像分析方法: 免疫组化、原位杂交各组切片, 置于摄像显微镜下, 放大 100 倍, 选取观察部位, 在观察部位随机取 3~5 个视野, 在图像分析仪下测定灰度值、阳性细胞数和阳性血管数。

1.8 统计学方法: 所有资料经 SPSS 统计软件进行统计学处理, 所有数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 VEGF 蛋白及其 mRNA 在神经细胞中的表达(表 1, 表 2): VEGF 蛋白及其 mRNA 在正常对照组, 假手术组神经细胞中均呈极低表达; 缺血 3 h, 缺血中心区、半影区表达均增高, 阳性细胞数增多; 再灌注 3 h, 中心区阳性细胞数最多, 表达达高峰, 随再灌注时间延长其表达下降, 而半影区阳性细胞数增多, 表达逐渐升高; 再灌注 24 h 表达达高峰, 48 h 和 72 h 表达均呈下降趋势, 但仍在较高水平。

表 1 局灶性脑缺血-再灌注不同时间点 VEGF 免疫组化图像分析结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 1 SP image analysis of VEGF at different time point in local cerebral ischemia/reperfusion rats( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	中心区灰度值	半影区灰度值
假手术组	121.90±4.25	122.35±4.86
缺血 3 h 组	146.37±5.28*	148.72±6.02*
再灌注 3 h 组	148.15±4.62*	153.79±6.70*
再灌注 6 h 组	131.96±3.65	156.25±3.99*
再灌注 24 h 组	120.71±5.70	184.36±6.34*
再灌注 48 h 组	121.04±4.54	179.66±5.26*
再灌注 72 h 组	123.22±5.82	165.43±4.43*

注: 与假手术组比较; \* $P < 0.05$

2.2 VEGF 蛋白及其 mRNA 在血管内皮细胞中的表达: VEGF 蛋白及其 mRNA 在正常对照组、假手术组血管内皮细胞中无阳性表达; 缺血 3 h 再灌注 6 h, 中心区、半影区免疫组化染色阳性血管数均增加, 随再灌注时间延长阳性血管数下降, 而半影区阳性血管数明显增多, 24 h 达高峰。

## 3 讨论

缺血性脑损伤与 VEGF 的关系近几年已引起广泛关注。Hayashi 等<sup>[2]</sup>用免疫组化方法研究了大鼠 MCAO 后 VEGF 蛋白表达, 发现, 缺血 90 min、再灌注 1 h 供血区皮质部分神经元胞浆可见 VEGF

表 2 局灶性脑缺血-再灌注不同时间点 VEGF mRNA 原位杂交图像分析结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 2 In situ hybridization image analysis of VEGF mRNA at different time point in local cerebral ischemia/reperfusion rats( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	中心区灰度值	半影区灰度值
假手术组	118.35±3.20	116.74±4.02
缺血 3 h 组	137.16±3.66*	139.59±3.97*
再灌注 3 h 组	143.22±4.86*	148.28±4.22*
再灌注 6 h 组	125.63±4.03	151.93±4.34*
再灌注 24 h 组	119.09±4.23	170.48±4.09*
再灌注 48 h 组	120.43±4.54	165.29±5.01*
再灌注 72 h 组	118.15±3.62	160.57±4.72*

注: 与假手术组比较; \* $P < 0.05$

表达; Northern 印迹法检测 VEGF mRNA 表达发现, 缺血 1 h VEGF mRNA 明显增加, 3 h 达高峰, 再灌注 1 d 后降至缺血前水平; 而对照组大鼠组织未检测到 VEGF mRNA 表达。Cobbs 等<sup>[3]</sup>检测了 MCAO 后 VEGF 蛋白和 mRNA 的表达, 原位杂交结果显示, VEGF mRNA 表达在脑缺血后 30、60 和 120 min 缺血周围区域, 并持续高表达 24 h; Western blot 显示蛋白表达在缺血后 24 h 和 48 h 也增加。

本研究应用免疫组化、原位杂交技术, 从细胞和分子水平对 VEGF 在实验性局灶性脑缺血-再灌注缺血中心区、半影区蛋白及 mRNA 表达水平进行了动态观察。结果表明: 正常对照组及假手术组细胞组织中 VEGF 即有极弱阳性表达, 脑缺血 3 h 再灌注后, 半影区随缺血时间延长 VEGF 表达逐渐增强, 24 h 达高峰, 中心区缺血早期及再灌注早期 VEGF 表达增强, 随再灌注时间延长表达逐渐降低。本实验结果显示, VEGF 蛋白表达与 mRNA 表达一致, 在缺血及再灌注早期, 濒死的神经细胞中有 VEGF 表达, 在坏死神经细胞中 VEGF 几乎无表达, 提示 VEGF 表达并不足以阻止神经细胞死亡。

本研究中还观察了脑缺血-再灌注后血管内皮细胞 VEGF 表达变化, 结果显示, 在缺血及再灌注早期血管内皮细胞 VEGF 即有表达, 随再灌注时间延长, 血管内皮细胞 VEGF 表达增强, 且以缺血半影区最明显, 这与 Pichiule 等<sup>[4]</sup>结果一致。VEGF 表达大部分在半影区, 而梗死区对胶质纤维酸性蛋白(GFAP)无反应性, 表明 VEGF 主要由大胶质细胞表达, VEGF 梗死周边毛细血管中有表达, 表明 VEGF 产生和分泌是由于大胶质细胞与其受体结合在附近内皮细胞上, 且在缺血组织中激活了血管生成反应, 在半影区神经及外胚层有细胞凋亡, 并在血管生成后明显减少, 这种伴随血管生成后 VEGF 的

表达,代表了大脑对缺血脑损伤后的病理反应<sup>[5]</sup>。

VEGF 对缺血性脑损伤的保护作用可能通过以下过程实现:血管闭塞致脑组织缺血、缺氧,在缺血与正常脑组织交界处为低氧区,低氧区作为一种信号激活 3'-磷酸酰肌醇脱酰激酶,改变 VEGF 信号转导通路,促使半暗带 VEGF 高表达,加速血管内皮细胞增生,使受累组织再灌注及供氧量增加,神经元凋亡或坏死数量减少,最终减轻缺血性脑损伤,保护神经元<sup>[6-9]</sup>。其确切机制有待进一步研究,有关 VEGF 的神经保护及细胞治疗研究正在进行中<sup>[10]</sup>。

#### 参考文献:

- 1 Zea Longa E, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Jap Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- 2 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: 2039-2044.
- 3 Cobbs C S, Chen J, Greenberg D A, et al. Vascular endothelial growth factor expression in transient focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 249: 79-82.
- 4 Pichiule P, Chavez J C, Xu K, et al. Vascular endothelial growth factor upregulation in transient global ischemia induced by cardiac arrest and resuscitation in rat brain [J]. *Mol Brain Res*, 1999, 74: 83-90.
- 5 Plate K H, Beck H, Danner S, et al. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58: 654-666.
- 6 Jin K L, Mao X O, Nagayama T, et al. Induction of vascular endothelial growth factor receptors and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling by global cerebral ischemia in the rat [J]. *Neuroscience*, 2000, 100: 713-717.
- 7 邓娟,周华东,陈曼娥,等.局灶性脑缺血-再灌注大鼠神经元 DNA 氧化损伤的研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13: 478-480.
- 8 Mu Dezhi, Jiang Xiangning, Sheldon R A, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model [J]. *Neurobiology Dis*, 2003, 14: 524-534.
- 9 Zhang Zhenggang, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemic [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12: 62-66.
- 10 Tetsuro S, Isao D, Akimasa Y, et al. Cell therapy for cerebral ischemic using vascular endothelial growth factor secreting cells [J]. *Intern Congress Series*, 2003, 1252: 483-487.

(收稿日期:2004-12-04 修回日期:2005-03-01)  
(本文编辑:李银平)

## • 经验交流 •

### 13 例脑干梗死的影像学诊断

郭绍玲

**【关键词】** 脑梗死; 体层摄影术; X 线计算机; 磁共振成像

脑干梗死早期诊断较困难。总结我院 2002 年 1 月—2004 年 10 月收治 13 例脑干梗死患者影像学及临床特征如下。

#### 1 临床资料

1.1 一般资料:13 例患者中男 7 例,女 6 例;年龄 50~81 岁,平均 65 岁。既往有高血压病 11 例,冠心病 6 例,糖尿病 5 例,急性脑血管病 6 例。均为急性起病,发病至就诊时间 3 h~3 d。

1.2 临床表现:意识障碍 2 例次,头晕 5 例次,头痛 6 例次,恶心、呕吐 5 例次,构音不清、呛咳 6 例次,视物模糊、复视 3 例次,一侧肢体无力 9 例次,四肢无力 3 例次。神经系统体征:肢体瘫痪 8 例次,面瘫 3 例次,偏身感觉障碍 3 例次,眼球震颤 3 例次,单侧巴宾斯基征 8 例次,双侧巴宾斯基征 3 例次。

1.3 影像学检查:首次 CT 检查发现脑

干梗死 6 例;发病 24 h 后复查 CT 发现脑干梗死 4 例;另 3 例临床怀疑脑梗死,CT 结果与临床不符,转外院行磁共振成像(MRI)检查发现脑干梗死。CT 发现脑干片状低密灶 11 处,边界较清。MRI 检查:T1 加权像显示脑干小片不规则略低信号影,T2 加权像显示脑干内小片不规则高信号影,共发现病灶 4 处。

#### 2 讨论

高血压是脑干梗死最主要的危险因素,冠心病、糖尿病、动脉粥样硬化、急性脑血管病病史也是常见的危险因素。本组 13 例患者均合并有 1 项以上的上述危险因素。本组患者平均年龄 65 岁,说明脑干梗死好发于老年人。一侧颅神经麻痹伴对侧肢体瘫痪或感觉障碍为一侧脑干缺血的典型表现,本组 13 例中 2 例有上述典型表现。供应脑干的动脉主要是椎-基底动脉的深穿支,其管径较细,在中风危险因素的长期作用下,常引起椎-基底动脉缺血症状,以迷路前庭系统最易受累,多数患者表现为头晕、恶心、

呕吐,但本组仅 5 例有此表现。因此,临床对症状不典型者也应及早进行系统检查,以防变为完全性卒中。

由于供应脑干的穿动脉直径细,发生闭塞形成的病灶较小,而 CT 的层距多用 10 mm,加上后颅窝骨性结构可形成伪影,因此 CT 发现率较低;另外,患者症状出现至检查的时间尚短,一般认为发病 24 h 内 CT 不易发现。而 MRI 具有分辨率高、敏感性高、不受颅骨伪影干扰、显示氢质子密度及水肿非常敏感等优点,比 CT 能显示更多的腔隙性脑梗死,是诊断脑干梗死最可靠的检查方法。笔者认为,对于没有条件行 MRI 检查的医院,首次 CT 检查阴性,患者症状进一步加重,临床怀疑有脑干梗死时,要及时复查 CT,并对后颅底进行薄层(3~5 mm)扫描,以减少漏诊。对于有条件的医院要及时行 MRI 检查。

(收稿日期:2004-12-30

修回日期:2005-03-03)

(本文编辑:郭方)

作者单位:750011 银川,宁夏回族自治区第三人民医院放射科

作者简介:郭绍玲(1969-),女(汉族),河南省偃师市人,主治医师。