

川芎嗪对局灶性脑缺血大鼠血管内皮生长因子表达的影响

陈 懿¹, 王国佐², 葛金文², 陈 敏²

(湖南中医药大学①生理学教研室, ②科技处, 湖南 长沙 410208)

【摘要】 目的 观察川芎嗪对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子(VEGF)的影响。方法 将 15 只 SD 大鼠随机均分为假手术组、模型组、川芎嗪组。通过月桂酸钠损伤血管内皮细胞来复制局灶性脑缺血模型; 采用免疫组化和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组大鼠脑内 VEGF 阳性细胞数和 VEGF mRNA 表达, 同时评价大鼠的神经功能缺失程度。结果 脑缺血后, 大鼠神经功能缺失评分明显升高[(2.80±0.45)比 0], 川芎嗪组神经功能症状得到明显改善[(1.80±0.45)分, $P<0.01$]。假手术组大鼠脑内有少量 VEGF 阳性细胞表达[(11.70±1.83)个/mm²], 模型组 VEGF 阳性细胞数明显增多[(35.28±2.88)个/mm², $P<0.01$], VEGF mRNA 表达增强(0.26±0.08 比 0.20±0.05); 与模型组比较, 川芎嗪组 VEGF 阳性细胞数[(47.16±3.78)个/mm²]明显增多($P<0.01$), 同时 VEGF mRNA 表达(1.12±0.11)也显著加强($P<0.01$)。结论 川芎嗪增强大鼠局灶性脑缺血后 VEGF 的表达, 是其抗脑缺血的作用机制之一。

【关键词】 脑缺血, 局灶性; 血管内皮生长因子; 川芎嗪

中图分类号: R285.5; R743.3 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)06-0329-03

Effects of ligustrazine (川芎嗪) on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF mRNA after focal cerebral ischemia in rats CHEN Yi¹, WANG Guo-zuo², GE Jin-wen², CHEN Min².

1. Department of Physiology; 2. Department of Science and Technology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China

Corresponding author: GE Jin-wen (Email: cmgju@tom.com)

【Abstract】 Objective To observe the effects of ligustrazine (川芎嗪) on vascular endothelial growth factor (VEGF) in rats with focal cerebral ischemia. Methods Fifteen Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups namely: sham operation group, model group, and ligustrazine group. Focal cerebral infarction model was established by sodium laurate which may induce vascular endothelial cell injury. Some indexes were detected such as VEGF mRNA expression examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), the number of VEGF positive cells counted by immunohistochemical methods. In the mean time, the neurological dysfunction score in rats was evaluated. Results The highest neurological dysfunction score appeared in the model group (2.80±0.45), while in the ligustrazine group, it was decreased significantly (1.80±0.45, $P<0.01$), showing neurological improvement. The number of VEGF positive cells was barely detectable in the sham operation group [(11.70±1.83) cells/mm²], while in the model group, both the number of the VEGF positive cells, and VEGF mRNA were obviously increased [(35.28±2.88) cells/mm², $P<0.01$; 0.26±0.08 vs. 0.20±0.05]; compared to those in the model group, the number of VEGF positive cells and the expression of VEGF mRNA in the ligustrazine group were higher [(47.16±3.78) cells/mm², $P<0.01$; 1.12±0.11, $P<0.01$], respectively. Conclusion Ligustrazine may elevate the expression of VEGF in rats with focal cerebral ischemia that is one of the mechanisms for its protective effect against cerebral ischemia.

【Key words】 focal cerebral ischemia; vascular endothelial growth factor; ligustrazine

缺血性脑卒中是临床常见的急性脑血管疾病,

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(08JJ4008);湖南省教育厅科研基金重点项目(07A050);湖南省教育厅科研基金青年项目(06B068);湖南省科技厅社会发展科研基金资助项目(04SK3054);湖南省卫生厅科技基金资助项目(B2006-133)

通信作者:葛金文,教授,博士生导师,Email:cmgju@tom.com

作者简介:陈 懿(1975-),女(汉族),湖南省人,医学硕士,副教授,Email:chenyi075@yahoo.com.cn.

病死率和致死率较高,改善缺血半暗带区血液供应是治疗关键。血管内皮生长因子(VEGF)是作用于血管内皮细胞的特异性多功能因子,参与脑缺血后脑组织的病理修复过程^[1]。治疗性血管新生方法的出现,为急性脑梗死的治疗开辟了一条通向缺血性脑卒中再血管化的新途径^[2]。本研究中采用大脑中动脉阻塞(MCAO)大鼠模型,观察 VEGF 在急性脑

缺血中的变化规律及中药川芎嗪对 VEGF 的影响。

1 材料与方

1.1 药物及主要试剂:月桂酸钠购自上海医药集团上海化学试剂公司(批号:F20070815),盐酸川芎嗪注射液购自哈尔滨三联药业有限公司(批准文号:H20030553),VEGF 多克隆抗体试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司,TRIzol 购自美国 INVITROGEN 公司,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自美国 MBI 公司。

1.2 动物分组与给药:7~8 月龄 SD 大鼠 15 只,体重 280~300 g,雌雄不限,购自上海斯莱克实验动物有限公司,按完全随机法将大鼠分为假手术组、模型组、川芎嗪组,每组 5 只。川芎嗪组于术后 2 h 腹腔注射 80 mg/kg 盐酸川芎嗪注射液,每日 1 次,连续 7 d;假手术组和模型组腹腔注射等量生理盐水。

1.3 MCAO 动物模型制备^[3]:腹腔注射戊巴比妥麻醉大鼠,仰卧位固定于手术台上,分离左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉、枕动脉和翼腭动脉,结扎颈外动脉远心端、大分支和枕动脉,夹闭左颈总动脉和翼腭动脉。在颈外动脉近心端逆行插入动脉导管,将月桂酸钠溶液由导管缓慢匀速推送至颈内动脉,拔出导管,结扎切口,松开动脉夹,缝合皮肤并消炎。

1.4 神经功能评分:术后 6 h,将大鼠尾巴悬挂,离地面约 1 m,观察其前肢的屈曲情况。正常大鼠前肢会伸向地面,参考 Bederson 等^[4]对缺血后大鼠进行神经功能缺失评分(共计 0~5 分)。

1.5 检测指标及方法:各组大鼠于最后一次给药后 1 h 用戊巴比妥腹腔注射麻醉,断头处死后迅速取脑。标本分为两份,一部分用焦碳酸二乙酯(DEPC)水稍作漂洗,立即放入细胞冻存管,液氮中保存;另一部分用多聚甲醛水溶液固定,脱水、透明、浸蜡、包埋、切成 5 μm 厚的冠状切片。

1.5.1 VEGF 免疫组化检测:采用过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)法,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,其中 VEGF 浓度 1:200,VEGF 阳性细胞胞质呈棕黄色。以生物医学图像分析系统进行定量分析,自动记录相应脑区阳性细胞吸光度(A)值。

1.5.2 一步法 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 的含量:①引物合成:引物设计参考电脑基因库中的核苷酸序列资料,由上海生工生物工程公司合成纯化。引物序列:正义链引物(VEGF-1):5'-GGCTTTACTGCTGTACCTCCAC-3',反义链引物(VEGF-2):5'-TTTTTGCAGGAACATTTACACG-3', VEGF 扩增产物大小为 534 bp。内参照三磷酸甘油醛脱氢

酶(GAPDH)引物序列:正义链引物:5'-AACTCCC TCAAGATTGTCAG-3',反义链引物:5'-GGGA GTTGCTTGAAGTCACA-3',DNA 扩增产物大小为 448 bp。②脑组织总 RNA 提取,采用异硫氰酸胍法。③PCR 产物分析:取 5 μl PCR 扩增产物,在质量分数为 2.5%的琼脂糖凝胶电泳上做扩增产物检测分析,电压 50 V,30~45 min,溴化乙锭染色。紫外灯下拍摄观测电泳条带,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,按公式计算 VEGF mRNA 表达水平。

$$\text{产物含量} = \frac{\text{VEGF 扩增产物的 A 值}}{\text{内参照 GAPDH 扩增产物的 A 值}} \times 100\%$$

1.6 统计学方法:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,多组间比较采用方差分析,两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺失评分(表 1):假手术组大鼠神经功能体征正常;模型组大鼠神经功能缺失明显,评分显著增高;用药 7 d 后川芎嗪组神经功能缺失评分较模型组明显降低($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠神经功能缺失评分、VEGF 阳性细胞数及 VEGF mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	神经功能缺失评分(分)	VEGF 阳性细胞数(个/mm ²)	VEGF mRNA
假手术组	5	0	11.70±1.83	0.20±0.05
模型组	5	2.80±0.45	35.28±2.88 ^a	0.26±0.08
川芎嗪组	5	1.80±0.45 ^b	47.16±3.78 ^{ab}	1.12±0.11 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$

2.2 细胞 VEGF 阳性表达(表 1):假手术组大鼠脑内有低水平 VEGF 阳性细胞表达,模型组 VEGF 阳性细胞表达较假手术组明显增多($P < 0.01$),脑缺血后川芎嗪组阳性细胞表达明显高于模型组($P < 0.01$),表现为胞质棕黄色着色明显、神经元数量增加,与神经功能缺失评分结果一致。

2.3 VEGF mRNA 表达(表 1):假手术组、模型组 VEGF mRNA 有基础表达;用药 7 d 后川芎嗪组 VEGF mRNA 表达增强,明显高于模型组及假手术组(P 均 < 0.01)。

3 讨论

血管新生(angiogenesis)又称真性血管新生,是从原有毛细血管发芽长出新的毛细血管和小的非肌性血管。脑缺血后,低氧作为一种信号激活 VEGF/VEGF 受体系统,促使半暗带 VEGF 高表达,并能

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形成^[2,5]。Marti 等^[6]的研究表明,MCAO 后 24 h 血管内皮细胞开始增生,血管样结构从软脑膜和脑实质的血管向缺血区发展。缺血区毛细血管数增加可改善缺血边缘区血流,促进神经元生理功能的恢复^[7-8]。Sun 等^[9]对 MCAO 大鼠脑内注射外源性 VEGF,发现注射组新生血管比正常组高 2 倍,比缺血对照组高 4 倍。在不同脑缺血状态下,VEGF mRNA 及蛋白表达在时间和分布上有一定的差异^[10]。VEGF 短暂的表达可保护血管系统避免缺血损伤,持续表达则促进血管的生成。

川芎嗪是从川芎根茎中提取分离的生物碱单体,主要成分为 2,3,5,6-四甲基吡嗪,现已人工合成,临床药理实验证明,川芎嗪可改善血液流变学指标、改善微循环,抗氧化、抗纤维化和拮抗 Ca²⁺内流,具有抗血小板聚集作用,并有扩张血管、增加冠状动脉血流量、改善微循环及增加脑血流量,保护血管内皮细胞的作用^[11-14]。动物实验研究表明,川芎嗪通过降低缺血/再灌注后大脑皮质肿瘤坏死因子- α 含量和髓过氧化物酶活性来减轻炎症反应,对脑缺血大鼠有神经保护作用^[15]。本研究中通过检测 VEGF mRNA 和 VEGF 阳性细胞表达及神经功能缺失评分,来反映缺血区血管新生和神经功能修复。结果观察到川芎嗪可增强 VEGF 表达,减轻神经功能缺失症状,进一步证实川芎嗪可有效减轻局灶性脑缺血所致脑组织损伤。提示,川芎嗪减轻神经功能缺损程度可能与 VEGF 早期神经保护作用相关,研究中梗死灶周围可见 VEGF 免疫阳性着色细胞数目增多,说明川芎嗪可通过 VEGF 促进血管的生成,发挥抗脑缺血损伤的作用。

参考文献

[1] Szapak GM, Lechowicz W, Lewandowska E, et al. Border zone neovascularization in cerebral ischemic infarct [J]. Folia Neuropathol, 1999, 37(4): 264-268.
 [2] 邢影, 徐忠信, 莽靖, 等. 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[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(3): 174-176.
 [3] Chen Y, Ge JW, Deng BX. A new rat model of cerebral infarction based on the injury of vascular endothelial cell[J]. Chin J Integr Med, 2005, 11(3): 195-200.
 [4] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion, evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
 [5] Dombrowski SM, Deshpande A, Dingwall C, et al. Chronic hydrocephalus-induced hypoxia: increased expression of VEGFR-2+ and blood vessel density in hippocampus [J]. Neuroscience, 2008, 152(2): 346-359.
 [6] Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia[J]. Am J Pathol, 2000, 156(3): 965-976.
 [7] Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1762(11-12): 1109-1121.
 [8] 陶陶, 陈莉芬, 胡长林, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注后 VEGF 及 VEGF mRNA 的表达[J]. 重庆医科大学学报, 2005, 30(2): 210-212, 259.
 [9] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. J Chin Invest, 2003, 111(12): 1843-1851.
 [10] Cobbs CS, Chen J, Greenberg DA, et al. Vascular endothelial growth factor expression in transient focal cerebral ischemia in the rat[J]. Neurosci Lett, 1998, 249(2-3): 79-82.
 [11] 赵丽霞, 郭秀丽, 张庆柱. 川芎嗪抗缺血性心脑血管病的分子机制[J]. 齐鲁药事, 2005, 24(5): 298-300.
 [12] Hsiao C, Chen YC, Lin JH, et al. Inhibitory mechanisms of tetramethylpyrazine in middle cerebral artery occlusion (MCAO)-induced focal cerebral ischemia in rats [J]. Planta Med, 2006, 72(5): 411-417.
 [13] Kao TK, Ou YC, Kuo JS, et al. Neuroprotection by tetramethylpyrazine against ischemic brain injury in rats [J]. Neurochem Int, 2006, 48(3): 166-176.
 [14] 孙建华. 脑梗死患者脑循环动力学改变和川芎嗪对急性缺血性脑损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(4): 248-250.
 [15] 曲友直, 高国栋, 赵振伟, 等. 川芎嗪对脑缺血/再灌注后脑组织肿瘤坏死因子- α 含量及髓过氧化物酶活性的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(1): 35-37.

(收稿日期: 2008-07-02 修回日期: 2008-09-13)
 (本文编辑: 李银平)

欢迎订阅 2009 年《中国危重病急救医学》杂志

中华医学会主办, 中文核心期刊, 中国科技核心期刊

全国各地邮局订阅, 邮发代号: 6-58, 定价: 每期 9.8 元, 全年 117.6 元

2009 年以前的刊物可在本刊社邮购部购买, 电话: 022-23042150

刊社地址: 天津市和平区睦南道 122 号天和医院内 邮编: 300050 传真: 022-23306917