

中药脑泰方对大鼠脑缺血后 VEGF 和 Angiopoietins 表达的实验研究

宋祯彦,周 瑜,王珊珊,龚胜强,刘晓丹,李 平,王国佐*

(湖南中医药大学中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的 探讨中药脑泰方对大鼠脑缺血后血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素(angiotensin, Ang)的表达变化及其在血管生成中的作用。方法 选择 40 只雄性 SD 大鼠,采用随机区组法分为 A 正常对照组, B 假手术组, C MCAO 模型组, D 脑泰方组;观察各组大鼠神经功能缺失计分、脑梗死体积;RT-PCR、Western blot 方法检测不同组大鼠脑组织中 VEGF、Ang-1 及 Ang-2 mRNA 和蛋白的表达变化。结果 神经功能缺失计分及 TTC 染色显示脑泰方组脑缺血情况缓解;大鼠脑缺血后 VEGF、Ang-2 的表达水平增高,脑泰方组表达显著高于模型组($P<0.05$);Ang-1 的表达水平在大鼠脑缺血后呈下降趋势,脑泰方组表达显著低于模型组($P<0.05$)。结论 大鼠脑缺血后 VEGF、Ang-1 和 Ang-2 共同协调作用促进血管生成,中药脑泰方在脑缺血损伤后治疗血管新生样作用中发挥着促进作用。

[关键词] 脑泰方;血管内皮生长因子;血管生成素;脑缺血;黄芪;川芎;地龙

[中图分类号]R285.5 **[文献标识码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.01.004

Experimental Research of Naotaifang on Expression of VEGF and Angiopoietins in Rats after Cerebral Ischemia

SONG Zhenyan, ZHOU Yu, WANG Shanshan, GONG Shengqiang, LIU Xiaodan, LI Ping, WANG Guozuo*

(Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate Naotaifang on expression of VEGF and angiopoietins in rats after cerebral ischemia, and its roles in angiogenesis. **Methods** 40 male SD rats were randomly divided into the control group (A), sham-operation group (B), MCAO model group (C), Naotaifang (NTF) group (D). The score of neurological deficiency and volume of cerebral infarction were observed. The protein expression of VEGF, Ang-1 and Ang-2 in cerebral tissues of rats were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** The score of neurological evaluation and TTC staining showed that the cerebral ischemia situation of NTF group have relieved. The expression of VEGF and Ang-2 were markedly increased, the NTF group is significantly higher than the MCAO group ($P<0.05$). The expression of Ang-1 in rats after cerebral ischemia was markedly reduced, the NTF group is significantly lower than the model group ($P<0.05$). **Conclusion** The coordinating role of VEGF, Ang-1 and Ang-2 expression stimulate angiogenesis after cerebral ischemia. Naotaifang can promote angiogenesis in rats after cerebral ischemia-reperfusion injury.

[Keywords] Naotaifang; vascular endothelial growth factors; angiopoietins; cerebral ischemia; astragalus; *Ligusticum wallichii*; earthworm

近年来,血管新生在缺血性脑卒中的修复作用已引起广泛关注。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素(angiotensin, Ang)是最主要的促血管生成因子^[1]。VEGF能够促进内皮细胞的有丝分裂,促进血管生成^[2],Ang是一个含有受体激动剂和受体抑制剂的血

管生长因子家族,作用于内皮特异性酪氨酸激酶受体 2 (Tie-2),Ang-1、Ang-2与血管生成密切相关^[3]。本实验采用线栓法制作局灶性脑缺血大鼠模型,观察益气活血组方剂脑泰方对大鼠脑缺血后血管内皮生长因子和血管生成素表达变化,探讨其促进脑缺血损伤后治疗血管新生样作用分子机制。

[收稿日期]2015-09-29

[基金项目]国家自然科学基金项目(81202794);中西医结合心脑血管疾病防治湖南省实验室开放基金项目(2014XNFZ05);中西医结合防治心脑血管疾病的相关基础研究湖南高校科技创新团队科研项目(2015CXTD)。

[作者简介]宋祯彦,男,硕士,助理实验师,研究方向:脑血管疾病中西医结合防治研究。

[通讯作者]*王国佐,男,副教授,硕士研究生导师,E-mail:1586074663@qq.com

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

40只SD雄性大鼠,SPF级,体质量(250±30)g,由湖南天勤生物技术公司提供,动物许可证号:SCXK(湘)2009-0012。采用随机区组法分为A正常对照组,B假手术组,C大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型组,D脑泰方灌胃模型组(脑泰方组),每组10只。各组分别给予生理盐水(A、B、C组)、脑泰方提取液(D组,1 mL/大鼠100 g/日),每日2次,连续给药7 d。

1.2 实验药物

脑泰方提取物,脑泰方由黄芪、川芎、地龙等药物组成,经水煎、醇提后制成浸膏粉(由湖南中医药大学药学院制剂教研室提取,每1 g浸膏粉含生药4 g),给药前用蒸馏水稀释至所需浓度。

1.3 大鼠MCAO模型的建立

参照Longa等^[1]方法制作大鼠MCAO动物模型。10%水合氯醛腹腔内注射(400 mg/kg)麻醉大鼠,颈部正中切口,自颈总动脉分叉处向颈内动脉插入栓线(约18 mm),制成MCAO模型。C、D两组制作MCAO模型,假手术组除不插入栓线外,其他步骤同上。

1.4 神经功能缺失评分

参照的Zea Longa^[4]5级4分评分标准评分方法并改进,于术后5 h进行。选取评分为1~3分纳入结果统计。0分:无神经损伤症状;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向对侧转圈;3分:向对侧倾倒;4

分:不能自发行走,意识丧失。

1.5 取材与标本制备:大鼠断头取材,取脑组织,-20℃速冻20 min,将大脑冠状切成厚约2 mm的片状,放入2%TTC溶液,37℃染色30 min。染色后用4%多聚甲醛固定4 h,数码相机拍取照片。剩余新鲜标本至于液氮中保存备用。

1.6 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测

Trizol法提取梗死灶周围大鼠脑组织总mRNA。Thermo公司逆转录试剂盒逆转录成cDNA,并以此为模板进行半定量PCR检测, β -actin基因的表达作为内参照。目的基因VEGF、Ang-1和Ang-2引物序列(上海生工生物公司)如表1,PCR反应条件为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸45 s,循环35次;72℃延伸10 min。以1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,凝胶成像系统(英国SYNGENE)照相分析,每次实验重复3次。

1.7 Western blot检测

大鼠断头取脑梗死灶周围脑组织,用总蛋白提取试剂盒(上海生工生物)提取蛋白,BCA法测定蛋白含量(Fermentas公司),SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转移蛋白至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温摇晃封闭2 h,加一抗小鼠抗大鼠VEGF单克隆抗体(1:1 000,Abcam公司),兔抗鼠Ang-1多克隆抗体(1:1 000,上海优宁维公司),Ang-2多克隆抗体(1:1 000,上海优宁维公司),4℃过夜,TBS-T漂洗后加二抗室温抚育1 h,TBS-T漂洗3次后,ECL发光试剂盒(Fermentas公司)反应,暗室显色压片照相检测蛋白表达量,每次实验重复3次。

表1 VEGF、Ang-1、Ang-2引物序列及PCR反应条件

目的基因	引物序列(5'-3')	退火温度(℃)	扩增长度(bp)
VEGF	F:GCTGTACCTCCACCATGCCAAG;R:ACGCACTCCAGGCTTCATCA	58	237
Ang-1	F:CATTTCTCGCTGCCATTCTGACTCA;R:GCCGTGGTGTGTACTGCTCTGT	58	175
Ang-2	F:AAGTGCTGGACATGGAGGACAAG;R:TGCTGCTGCTTCTGAAGGACTG	59	166
β -actin	F:CCTCTGAACCCTAAGGCCAAC;R:TGCCACAGGATTCATACCC	58	225

1.8 统计学分析

采用SPSS17.0统计软件进行统计分析。计量资料,结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。方差齐者采用方差分析,两两比较采用 q 检验;方差不齐时采用秩和检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺失评分

正常对照组、假手术组的大鼠基本没有出现神经功能损伤的症状,MCAO模型组、脑泰方组的大鼠均出现不同程度的神经功能缺失,即向右侧倾倒、转圈、不能站立行走等,且MCAO模型组的神经

功能缺失评分显著高于脑泰方组如表2,差异具有统计学意义($P<0.05$)。构建模型成功率为75%(30/40)。

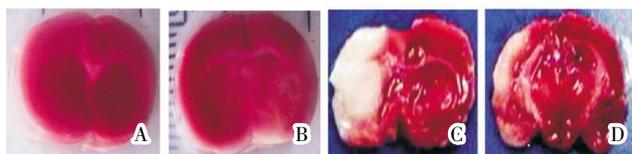
2.2 脑组织TTC染色

四个实验组脑组织切片经TTC染色,如图1所示,正常对照组(A)、假手术组(B)大鼠脑组织TTC染色均未见明显异常,均呈现红染状态,着色较深,无苍白梗死灶形成,MCAO模型组(C)TTC染色出现严重的苍白梗死灶,由此说明脑梗死模型的建立已经成功。另如图1D所示,脑泰方组(D)经过脑泰方给药治疗后脑组织TTC染色苍白梗死情况较MCAO模型组有所改善。

表 2 各组大鼠神经功能缺失评分的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	神经功能评分
正常对照组	10	0.0000±0.0000
假手术组	10	0.0000±0.0000
MCAO 模型组	10	2.0000±0.56884
脑泰方组	10	1.5000±0.84512*
F 值		10.00
P 值		<0.05

注:与 MCAO 模型组比较,*P<0.05。

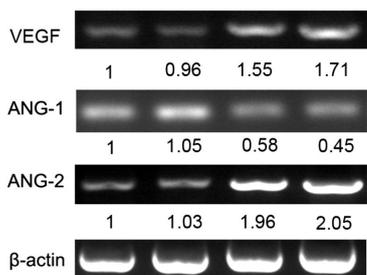


A. 正常对照组脑组织 TTC 染色未见明显异常;B. 假手术组脑组织 TTC 染色未见明显异常;C.MCAO 模型组脑组织 TTC 染色出现较严重苍白梗死灶;D.脑泰方组脑组织 TTC 染色出现轻微苍白梗死灶。

图 1 各实验组大鼠脑组织 TTC 染色

2.3 半定量 PCR 检测 VEGF、ANG-1、ANG-2 mRNA 的表达情况

收集正常对照组、假手术组、MCAO 模型组、脑泰方组四个实验组的脑组织,进行总 RNA 的抽提,逆转成 cDNA,进行半定量 PCR 的实验,检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 mRNA 表达情况,结果如图 2 所示,正常对照组和假手术组各个检测指标的表达无明显差异,MCAO 模型组中 VEGF 和 Ang-2 都出现明显的转录水平的上调,而 Ang-1 则出现明显的转录水平下调趋势;与 MCAO 模型组相比较,VEGF 和 Ang-2 在脑泰方组中 mRNA 的表达水平明显高于 MCAO 模型组,而 Ang-1 则在脑泰方组中 mRNA 的表达水平低于 MCAO 模型组,这提示脑泰方提取物有促进血管生成和增加血管通透性的作用。每个实验组都选取 3 只大鼠分别抽提 RNA 后,进行半定量 PCR 的检测,以实现这一实验的生物学重复,均得到一致的结果,图 3 中展示根据 3 次生物学重复实验得到的数据进行统计分析的结果。



注:由左至右,分别为正常对照组,假手术组,MCAO 模型组,脑泰方组

图 2 半定量 PCR 检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 mRNA 的表达

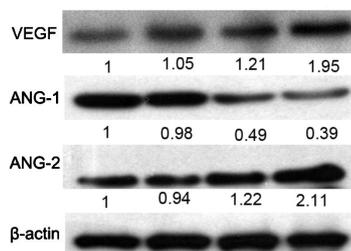


A.正常对照组;B.假手术组;C.MCAO 模型组;D.脑泰方组;(*P<0.05)

图 3 半定量 PCR 检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 mRNA 表达的 3 次生物学重复数据统计图

2.4 Western blotting 检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 的蛋白表达情况

收集正常对照组、假手术组、MCAO 模型组、脑泰方组四个实验组的脑组织,进行总蛋白的抽提,Western blotting,检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 的蛋白表达情况,结果如图 4 所示,正常对照组和假手术组各个检测指标的表达无明显差异,MCAO 模型组中 VEGF、Ang-2 都出现明显的蛋白水平的上调,而 Ang-1 则出现明显的蛋白水平的下调趋势,与 MCAO 模型组相比较,VEGF 和 Ang-2 在脑泰方组中蛋白表达水平明显高于 MCAO 模型组,而 Ang-1 则在脑泰方组中蛋白表达水平则低于 MCAO 模型组,结果显示与 mRNA 表达结果相同。每个实验组都选取 3 只大鼠,分别进行蛋白的提取后完成了 Western blotting 的检测,以实现这一实验的生物学重复,均得到了一致的结果,图 5 中展示根据 3 次生物学重复实验得到的数据进行统计分析的结果。

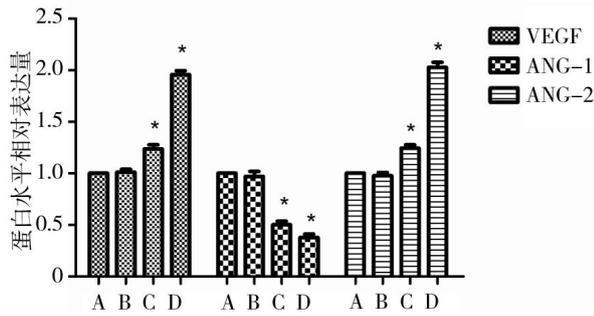


注:由左至右,分别为正常对照组,假手术组,MCAO 模型组,脑泰方组

图 4 Western blotting 检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 的蛋白表达

3 讨论

脑梗死是缺血性卒中的总称,包括脑血栓形成、腔隙性梗死和脑栓塞等,脑梗死病人约占全部脑卒中的 70%,是脑血液供应障碍引起脑部病变。全世界每年死于缺血性卒中的人数近一千万人,已成为人类死亡病因最高的“头号杀手”,近年来,我国每年新发生脑卒中病人近 150 万人,年死亡数近 100 万人^[5-9]。



A.正常对照组;B.假手术组;C.MCAO 模型组;D.脑泰方组;(* $P < 0.05$)

图 5 Western blotting 检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 蛋白表达的 3 次生物学重复数据统计图

脑梗死在中医学认为多因年老气虚,无力推动血行,复加劳倦内伤、忧思恼怒、饮食不节、用力过度或气候骤变等诱因,而至气滞血瘀,闭阻经脉、脑窍而中风,故认为气虚血瘀为发病的关键环节,益气活血法为治疗脑梗死的基本大法。本课题组经过多年系统性、全面性的研究,研制了益气活血组方剂脑泰方,脑泰方由黄芪、川芎、地龙等组成,具有益气活血、化痰通络的功效^[7]。课题组前期已完成,完成部分脑血管动物模型实验和临床观察^[8],证实该方药对脑梗死患者疗效的确切性和作用的安全性^[9]。

血管的新生和调控涉及多种细胞因子及信号通路,其中 VEGF 和 Ang 发挥着重要作用。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^[10]。Marti 等^[11]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,在脑梗死病理损害过程中,血管活性物质平衡失调,与此同时,VEGF 的表达亦增高^[12],本研究中,用药 7 d 后,脑泰方提取物组大鼠神经功能缺失症状减轻,VEGF 表达水平较模型组和假手术组增强。提示脑泰方可能通过 VEGF 促进血管的生成,发挥抗脑缺血损伤的作用。

Ang 是近年来发现的一个与血管新生密切相关的家族,包括 4 个成员:Ang-1、Ang-2、Ang-3 和 Ang-4,其作用截然不同。迄今 Ang-3、Ang-4 的作用仍然不十分清楚,Ang-1、Ang-2 与血管生成密切相关。Ang-2 与 Ang-1 有 60% 的同源性,是 Ang-1 的天然竞争性拮抗剂^[13]。Ang-1 能够促进血管成熟和稳定,Jeansson 等^[14]发现 Ang-1 在正常生理状态时的作用是很小的。但血管损伤时,Ang-1 的缺失会导致器官进一步损伤,加速血管形成及纤维化进程。Ang-2 通过有效刺激血管内皮始祖细胞增殖,诱导内皮细胞蛋白酶的产生,促进新生血管形成^[15]。本研究结果显示,脑泰方组较模型组大鼠 VEGF 和

Ang-2 的表达均增强且呈正相关,与 Ang-1 的表达呈负相关。由于 Ang-2 持续高表达并拮抗了 Ang-1,使 Ang-1 的表达降低,破坏血管的稳定性,活化的内皮细胞对 Ang-2 及 VEGF 的作用极为敏感,迅速发生增殖、迁徙,促进新生血管的形成。VEGF、Ang-1 和 Ang-2 在脑缺血后表达上的差异与其在血管生成中发挥的作用有关,三者相互协调作用,调节血管生成,提示脑泰方提取物在大鼠脑缺血后组织损伤修复过程中,通过调节血管内皮生长因子和血管生成素表达发挥重要的作用。

参考文献:

- [1] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease [J]. *Nat Med*, 2003,9(6):653-660.
- [2] Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis[J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(5) :1 029-1 039.
- [3] Huang H, Lai JY, Do J, et al. Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration and tumor growth [J]. *Clin Cancer Res*,2011 (17):1 001- 1 011.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989,20(1):84-91.
- [5] 方向华,王淳秀,梅利平,等. 脑卒中流行病学研究进展[J]. *中华流行病学杂志*, 2011,32(9):847-854.
- [6] 王 颖,齐晓飞. 我国各地脑卒中流行病学调查近况[J]. *包头医学*,2010,34(1):1-4.
- [7] 张国民,刘慧萍,葛金文,等. 脑泰方对脑梗死大鼠 Bax 蛋白的影响[J]. *山西中医学院学报*,2011,12(3):14-15.
- [8] 刘吉勇,朱惠斌,陈 懿,等. 脑泰方对动脉粥样硬化兔氧化应激的影响研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2015, 35(10) :22-26.
- [9] 贺运河,葛金文. 脑泰方治疗气虚血瘀证脑梗塞临床研究[J]. *中国中医急症*,2001,10(6):319-321.
- [10] Dombrowski S M, Deshpande A, Dingwall C, et al. Chronic hydrocephalus induced hypoxia; Increased expression of VEGFR2+ and blood vessel density in hippocampus [J]. *Neuroscience*, 2008,15,2(2):346-359.
- [11] Marti H J, 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.
- [12] 刘 超,张允岭,陶 冶,等. 从缺血再灌大鼠皮层 6-酮-前列腺素 F1 α /血栓素 B2 及血管内皮生长因子动态变化初探脑梗死络损机制[J]. *中华中医药杂志*,2008,23(5):386-388.
- [13] Fagiani E, Lorentz P, Kopfsten I, et al. Angiopoietin-1 and 2 exert antagonistic functions in tumor angiogenesis, yet both induce lymphangiogenesis[J]. *Cancer Res*, 2011,71(1):5 717-5 727.
- [14] Jeansson M, Gawlik A, Anderson G, et al. Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury[J]. *J Clin Invest*, 2011,121(6):2 278-2 289.
- [15] Goetsch W, Gryczka C, Korff T, et al. Flow-dependent regulation of angiopoietin-2 [J]. *J Cell Physiol*,2008,214(2):491-503.