

rAAV1 载体介导外源性 VEGF-165 和 Angiopoietin-1 基因治疗大鼠脑缺血的疗效评价及其机制研究

赵英杰¹, 李照建², 王任直¹, 魏俊吉¹, 李桂林¹, 赵浩¹

1. 中国医学科学院北京协和医院神经外科, 北京 100730
2. 青岛大学医学院附属医院神经外科, 山东青岛 266003

摘要 为研究经脑室途径联合应用血管内皮生长因子(VEGF)和血管生成素(Angiopoietin-1, Ang-1), 治疗大鼠急性脑梗塞的效果, 并探讨治疗的机制, 采用脑立体定向输注的方法, 将 rAAV1-VEGF 治疗载体或者 rAAV1-VEGF 和 rAAV1-Ang-1 的混合治疗载体, 通过侧脑室转染途径对大鼠大脑中动脉阻塞缺血再灌注模型进行基因治疗。观测 VEGF 和 Ang-1 蛋白表达、血脑屏障通透性、脑微血管密度等指标, 并对大鼠进行神经功能行为评分等。结果显示, 联合应用 VEGF 和 Ang-1 治疗急性脑梗塞可降低血脑屏障通透性, 减轻脑水肿, 增加缺血灶周围脑区的微血管密度, 改善大鼠的神经功能。由此得出结论: 联合应用 VEGF 和 Ang-1 基因治疗大鼠急性脑缺血, 可保护脑细胞, 促进新生血管生成, 减轻脑水肿, 改善大鼠的神经功能。

关键词 脑缺血; 血管内皮生长因子; 血管生成素; 基因治疗; 脑室途径; 腺相关病毒; 血管生成; 血脑屏障

中图分类号 Q789, R-332

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)21-0039-11

rAAV1-mediated Gene Over-expression of VEGF-165 and Angiopoietin-1 in Rat Cerebral Ischemia Model: An Investigation on Its Efficacy and Possible Mechanisms

ZHAO Yingjie¹, LI Zhaojian², WANG Renzhi¹, WEI Junji¹, LI Guilin¹, ZHAO Hao¹

1. Department of Neurosurgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China
2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Abstract To examine the effects of intra-ventricular pre-treatment with a combination of recombinant Adeno-Associated Virus vectors encoding VEGF (rAAV1-VEGF) and Ang-1 (rAAV1-Ang-1) on early stroke in a rat model of transient Middle Cerebral Artery Occlusion (tMCAO), rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 or rAAV1-VEGF/rAAV1-null vector were delivered into the lateral ventricle of each rats. After eight weeks later, the rats were subjected to tMCAO for two hours. During the early stages of ischemic reperfusion, VEGF and Ang-1 expression levels, Blood Brain Barrier (BBB) permeability and cerebral microvessel density were determined and compared statistically between groups. Cerebral infarct volume and modified Neurological Severity Scores (NSS) were also determined to evaluate the therapeutic efficacy of rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1. The results show that the intra-ventricular application of rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1, eight weeks before tMCAO, results in VEGF and Ang1 overexpression, and significantly reduces Evans blue permeability following ischemia ($P<0.05$). The microvessel density in the peri-infarct zone is significantly increased in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group as compared with the rAAV1-VEGF/rAAV1-null group ($P<0.05$). Cerebral infarct volume and NSS in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group are significantly decreased as compared

收稿日期: 2009-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30772227)

作者简介: 赵英杰, 医师, 研究方向为缺血性脑血管疾病的基因治疗, 电子信箱: zhaoyingjie2000@sina.com; 王任直 (通信作者), 主任医师, 研究方向为缺血性脑血管疾病, 电子信箱: wangrz@126.com



with the rAAV1-*VEGF*/rAAV1-null group ($P<0.05$). It is concluded that, in cerebral ischemia, the combination of Ang-1 and VEGF could be used early to promote the formation of mature neovessels and protect the injured cells, without inducing the side effects on BBB permeability. Early intra-ventricular injection of mixed rAAV1-*VEGF* and rAAV-*Ang-1* may be a favorable therapeutic strategy in gene therapy for stroke.

Keywords cerebral ischemia; vascular endothelial growth factor; Angiopoietin-1; gene therapy; intra-ventricular; recombinant Adeno-Associated virus; angiogenesis; Blood Brain Barrier

0 引言

很多研究表明血管内皮生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 在缺血性疾病治疗中的作用是把双刃剑:一方面具有直接促进缺血周围区微血管增生和神经保护作用;另一方面又可以增加微血管的通透性,促进血管壁的渗出,增加血脑屏障的破坏^[1-4]。近年来很多研究表明,缺血后血管生成是一个多因子参与调节的复杂过程,其中血管内皮生长因子和血管生成素(Angiopoietin, Ang)在其中起关键作用^[3]。形成功能性成熟血管有赖于这两类因子的协同作用^[4]。VEGF 也称为血管通透性因子 (Vascular Permeability Factor, VPF),是目前发现的最强的血管通透性因子,其增加微血管通透的作用比组织胺强 5 000 倍,可以在脑缺血后加重血脑屏障(Blood Brain Barrier, BBB)的渗出,诱发血管源性脑水肿甚至脑出血,从而阻塞微血管管腔而减少血供,最终引起颅内压的增高^[5]。近年的研究表明,血管生成的各个阶段都需要 VEGF 的参与,但它在血管生成起始阶段的作用是最关键的^[6]。目前认为,VEGF 除了促进缺血区血管增生外,还在缺血早期通过扩张微血管增加缺血区血流灌注^[7];另外 VEGF 在周围和中枢神经系统对于神经元、雪旺细胞、星形胶质细胞、神经干细胞以及小胶质细胞还具有直接的神经营养和神经保护作用,并能促进神经元轴突的生长^[6-7]。更重要的是 VEGF 在脑缺血后能促使室下带和海马齿状回颗粒下层的神经干细胞增生和迁徙^[6-7]。Ang 是一类新发现的主要由血管内皮周围组织分泌的糖蛋白,是血管内皮细胞 (Endothelial Cells, ECs) 特异性受体酪氨酸激酶 Tie-2 的配体,与 VEGF 协同调节血管的发生和形成过程。很多研究还表明,Ang-1 还参与维持成熟血管的完整性,它的表达可抑制单层 ECs 的通透性,防止微血管渗漏,是迄今为止发现的第一个作用于 ECs 的抗血管通透性因子,这提示 Ang-1 在调节血管通透性方面发挥着重要作用。近年来的很多研究也证明,Ang-1 可以对抗由 VEGF 所引发的血管通透性增加,并认为 Ang-1 和 VEGF 的平衡对于维持中枢神经系统 BBB 的完整性起关键作用,而急性脑缺血打破了这种平衡从而诱发了 BBB 的破坏^[5]。也有研究表明,Ang-1 是通过最大程度地加强血管 ECs 之间、内皮周围细胞和基质之间的相互作用来减少血管的渗出^[8-9]。在脑缺

血的急性期,Ang-1 和 VEGF 是对 BBB 渗漏起重要作用的影响因子,BBB 渗漏增加就会诱发脑水肿甚至脑出血。如何在脑缺血急性期保护 BBB,减轻脑水肿和继发性脑损害,可能对脑缺血的治疗有重要意义。

为了在发挥 VEGF 治疗作用的同时,避免或减轻其诱发 BBB 通透性增高的副作用,本研究设计了 VEGF 与血管生成素 Ang-1 联合基因治疗的研究方案,将采用脑立体定向输注的方法,将治疗载体 rAAV1-*VEGF* 联合 rAAV1-*Ang-1* 注射到大鼠侧脑室内,观察其在脑内的表达,并研究其促进缺血后血管增生和改善脑缺血早期 BBB 通透性的作用及其可能机制,为脑缺血的治疗探索新的途径。

1 实验材料

1.1 实验动物

健康成年雄性 Wistar 大鼠 93 只,年龄 3~4 月,体重 180~200 g,由中国医学科学院实验动物所提供,按照 SPF 级标准饲养。每笼饲养 6 只,自由进食水,饲养室温度控制在 20~22℃,明暗光照每日各 12 h。实验中对动物采取的一切操作都按照中国协和医科大学动物管理委员会制定的要求进行,所有损伤性操作都事先进行麻醉,最大程度地减少动物的疼痛刺激。

1.2 重组腺相关病毒治疗载体

携带治疗基因 *hVEGF*-165 和 *hAngiopoietin*-1 的 I 型重组腺相关病毒载体, rAAV1-*VEGF*, rAAV1-*Ang-1* 和空白对照载体 rAAV1-null 均购自本元正阳基因技术有限公司,均含有 CMV 启动子,病毒滴度均为 2×10^{12} vg(vector genomes)/mL。

1.3 主要抗体及其工作浓度

主要抗体及其工作浓度见表 1。使用的 3 种分子生物学方法是:Western Blot (WB), Immunohistochemistry (IH) 和 Immunofluorescence (IF)。

表 1 主要抗体及工作浓度
Table 1 List of some antibodies and their dilution

抗体	工作浓度			生产厂家
	WB	IH	IF	
c-Fos(sc-52)		1:100		Santa Cruz
β -actin(sc-1616)	1:200			Santa Cruz
occludin(sc-8144)			1:150	Santa Cruz
AQP4(sc-32739)		1:200		Santa Cruz
Ang-1(sc-9044)	1:100			友谊中银
VEGF(sc-152)	1:200			友谊中银

2 实验方法

2.1 实验动物分组

93 只大鼠被随机平均分为 2 个治疗组和 1 个自然恢复组,每组 31 只。① 联合基因治疗组:rAAV1-*VEGF*/rAAV1-



Ang-1; ② VEGF 单基因治疗组: rAAV1-VEGF/rAAV1-null。另取 6 只大鼠作为自然恢复组, 进行 VEGF 和 Ang-1 蛋白质免疫印迹实验, 观察 VEGF 和 Ang-1 在脑缺血自然病程中的表达。

2.2 大鼠麻醉方法

称取大鼠体重, 以 2% 的戊巴比妥纳腹腔注射全麻, 暂时性全麻剂量 40 mg/kg; 取脑过深麻醉剂量 80 mg/kg。

2.3 立体定向载体输注

2.3.1 手术方法

大鼠麻醉成功后固定于立体定向仪。用碘伏消毒头顶部皮肤, 铺盖无菌洞巾。头顶部正中纵行手术切口, 长约 1 cm, 按照坐标靶点, 电钻磨开颅骨直到显露硬膜, 将固定于立体定向仪的 10 μ L 微量注射器在注射靶点上方垂直进针至侧脑室内, 以微螺旋定量推进器匀速缓慢注射 10 μ L 病毒载体 (2×10^{10} vg), 注射速率 0.5 μ L/min, 注射完毕待 5 min 后缓慢拔针。

2.3.2 注射靶点坐标

侧脑室注射靶点坐标 (以前囟点为坐标原点) 值: 向前 0.5 mm, 向右 1.5 mm, 硬膜下 3.5 mm。

2.3.3 各组注射载体剂量

各组侧脑室注射量: ① 联合基因治疗组: rAAV1-VEGF 5 μ L (1×10^{10} vg)/rAAV1-Ang-1 5 μ L (1×10^{10} vg); ② VEGF 单基因治疗组: rAAV1-VEGF 5 μ L (1×10^{10} vg)/rAAV1-null 5 μ L (1×10^{10} vg)。

2.4 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的建立

2.4.1 模型制作时机

病毒载体侧脑室内注入后 8 周制作脑缺血模型。

2.4.2 术前准备

大鼠术前 12 h 禁食。手术前一天进行手术器械 110℃ 高压蒸汽灭菌消毒 20 min。将 6 cm 长的 4-0 尼龙鱼线在距离末端 1.8 cm 处用作标记, 末端浸腊, 使用前先用碘伏浸泡。

2.4.3 手术方法

大鼠麻醉成功后固定大鼠仰卧位, 充分暴露颈部。碘伏消毒铺无菌洞巾后, 在手术显微镜下进行操作。取颈部正中 3 cm 切口, 上至颈和下颌连接处, 下至胸骨角, 于左右颌下腺间剪开阔筋膜, 向两侧翻开并固定。在右侧胸锁乳突肌处安置牵引线, 以充分暴露视野, 在右侧胸锁乳突肌和颈前肌群之间向深部分离, 轻轻分离颈部肌群三角, 显露深面的颈总动脉 (CCA), 开放颈总动脉鞘, 分离颈总动脉, 注意避免过度刺激伴行的迷走神经, 避免损伤邻近静脉。上溯分离颈内动脉系统 (ICA)、颈外动脉 (ECA) 系统起始部、甲状腺上动脉起始部、枕动脉起始部。保护解剖分叉处的迷走神经结。顺着颈内动脉走行方向向深部仔细分离, 暴露出翼腭动脉和颈内动脉的分叉处。依次结扎 CCA 近心端、ECA 系统起始部 (甲状腺上动脉分支之前)、枕动脉和翼腭动脉。随后用动脉夹夹住颈内动脉段阻断血液返流。CCA 距离分叉处约 5 mm 处, 以显微剪剪开动脉壁, 送入线栓, 结扎 CCA 预置线套, 松开动脉夹

继续送入线栓, 长度距离 CCA 分叉处约 1.8 cm。复结扎 ICA 之预置线固定线栓, 分层缝合皮肤。若插入深度约 1 cm 时产生阻力, 可适当退出调整方向。经过多次实验对比, 发现分离并结扎翼腭动脉可使线栓较容易插入颈内动脉颅内分支, 并能较好地提高模型成功率。

2.4.4 脑缺血后再灌注

脑缺血模型制作成功后 2 h, 将线栓拔出 1 cm, 剪除外露线栓, 之后大鼠将慢慢苏醒。

2.4.5 tMCAO 动物模型入选标准

动物 tMCAO 制作完成后 6 h 进行改良的神经功能缺损评分 (Modified Neurological Severity Scores, MNSS), 标准见表 2。选择 7~12 分的动物随机分组, 评分不在该范围的动物不能入组。

表 2 改良的神经功能缺损评分标准 Table 2 Modified neurological severity scores		
功能分类	功能测试结果	评分
运动试验	提起鼠尾 (患侧无法完成以下动作)	
	前肢收缩	1
	后肢收缩	1
	30 s 内头部运动并偏离垂直线 $>10^{\circ}$	1
	提鼠置于桌面	
	正常行走	0
	不能直行	1
感觉试验	向患侧绕圈	1
	向患侧摔倒	1
	位置觉试验 (视觉、触觉)	
	推动动物向侧方移动, 动物无法移动	1
横杆平衡试验	本体感觉试验 (深感觉)	
	将患肢置于桌子边缘, 动物无肢体收缩反应	1
反射消失和反常运动	平衡	0
	抓住横杆一侧	1
	抱住横杆, 一肢体掉下	2
	抱住横杆, 二肢体掉下; 或抱横杆旋转 $>60^{\circ}$	3
	尽力平衡, 但失败掉下 (>40 s)	4
	尽力平衡, 但失败掉下 (>20 s)	5
	掉下 (<20 s)	6
总分	耳廓反射 (刺激耳道后摇头)	1
	角膜反射 (棉花刺激角膜后眨眼)	1
	惊吓反射 (听到突然声响后运动反射或尖叫)	1
	抽搐、肌阵挛、肌张力异常	1
		18

2.5 蛋白质印迹法测定 VEGF 和 Ang-1 表达

2.5.1 脑组织取材

缺血再灌注 48 h 后, 3 组中各取 6 只大鼠快速断头取脑, 从额极到中脑平均切为 7 块, 每块 2 mm, 从前到后依次编号为 S1~S7。取其中 S3 (包含侧脑室注射靶点) 右侧半称重后, 置于液氮中备用。

2.5.2 脑组织总蛋白提取

将上述液氮保存的脑组织切块,按照每 100 mg 加入 600 μ L PRO-PREP™ 蛋白提取液,在冰上孵育 30 min 使细胞裂解冰上匀浆,4℃离心 10 000 g,20 min,吸取上清液-80℃保存,用于 WB 检测。

2.5.3 BCA 法测定蛋白浓度

1) 配置工作液:根据标准品和样品数量,试剂 A 与试剂 B 按照 50:1 的体积比配置适量 BCA 工作液,充分混匀。

2) 稀释标准品:取 BSA 标准品原液 (4 000 μ g/mL)100 μ L 加双蒸水稀释到 200 μ L,然后再倍比稀释 8 次,得到不同蛋白浓度的 BSA 标准浓度溶液,分别为:2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 μ g/mL。

3) 微板滴加标本:将不同浓度的 BSA 标准液(按照浓度大小顺序)和待测标本液分别滴加到 96 孔板,每一浓度蛋白液滴加 3 份,每一孔取 200 μ L 工作液混合。37℃静置 30 min。

4) 冷却到室温,用酶标仪测定 550 nm 的光密度值,绘制标准曲线,根据线性方程计算各标本蛋白浓度。

2.5.4 WB 检测 VEGF 和 Ang-1 表达

将提取的脑组织蛋白 (30 μ g) 加 2 $\times$ SDS 上样缓冲液 (总体积为 20 μ L) 经 95℃变性 10 min;上样于 8% SDS 聚丙烯酰胺 (Sigma 公司) 凝胶中电泳 2 h;用电转膜仪 (Bio-Rad 公司) 将蛋白转印到硝酸纤维素膜 (Sigma 公司) 上,约 75 min;10% 的脱脂奶粉溶液于室温封闭 1 h,TBST 漂洗 3 次 $\times$ 10 min;加入一抗抗体 (稀释浓度见抗体工作浓度表) 室温孵育 2 h 后 4℃过夜,TBST 漂洗 3 次 $\times$ 10 min;加入 HRP-抗兔 IgG (1:4 000,Sigma 公司) 室温孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次 $\times$ 10 min;膜上加 ECL 荧光显影剂,在暗室内压片 (Kodak 公司);用洗脱缓冲液 50℃洗涤硝酸纤维素 30 min。用同法显示 β -actin 条带,以此作为加样的内参照。 β -actin 单克隆抗体 (1:2 000),HRP 标记的抗鼠 IgG (1:4 000,Sigma 公司)。

2.6 血脑屏障通透性的测定

2.6.1 测定时机

大鼠 tMCAO 模型脑缺血再灌注后 24 h 取脑。

2.6.2 测定方法

按 Belayev^[10]等方法,使用伊文思蓝 (Evans Blue,EB) 作为示踪剂测定 BBB 通透性。在动物处死前 3 h,自股静脉注入 2%EB 溶液 (20 mg/kg)。注射 EB 溶液后,经主动脉用 NaCl 盐水 (150 mmol/L,500 mL/kg) 进行灌注,大脑标本迅速取出后从额极到中脑冠状位平均切为 7 块,每块 2 mm,从前到后依次编号为 S1~S7,其中 S3 包含侧脑室注射靶点,取 S3 称取湿重后加甲酰胺 3 mL 加盖避光在 54℃水浴箱中提取 24 h,吸取提取液,在紫外分光光度计下测量提取液的光密度值 (OD 值),波长 632 nm。脑组织 EB 含量以 OD/g 湿脑组织表示,用 EB 含量 (OD/g) 代表 BBB 通透性。

2.7 石蜡切片免疫组化检测

2.7.1 测定时机及脑区

大鼠 tMCAO 模型脑缺血再灌注后 24 h 取脑,检测缺血

侧海马即早基因 *c-fos* 的表达,并检测脑缺血周围区水通道蛋白 APQ4 的表达。

2.7.2 检测方法

2.7.2.1 取材及石蜡包埋

各组动物过深麻醉 ($n=6$),依次用 0.1 mmol/mL 的 PBS 和 4%多聚甲醛各 500 mL 主动脉快速冲洗灌注固定,取脑切块,将脑标本放入 4%的多聚甲醛固定 24 h,行梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。

2.7.2.2 免疫组化步骤

1) 切片:连续石蜡切片,切片厚度 5 μ m,从连续的石蜡冠状切片中每隔 10 张取一张,贴于经过多聚赖氨酸包被处理的载玻片上。

2) 常规脱蜡:二甲苯浸泡切片 15 min;3%的 H_2O_2 浸泡切片 10 min;100%酒精、95%酒精和 80%酒精依次水化,蒸馏水冲洗,PBS 液浸泡。

3) 抗原修复:滴加胰酶工作液修复,室温放置 8 min;蒸馏水冲洗,PBS 液浸泡。

4) 一抗孵育:滤纸吸取多余 PBS 液,分别滴加一抗 (抗体浓度见表 1),4℃过夜。

5) 二抗孵育:滴加生物素标记的相应二抗,室温放置 45 min。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,室温 15 min。

6) 显色:DAB-过氧化氢显色剂显色,室温下 5~8 min,光镜下监视;浅染苏木素。

7) 脱水透明:70%酒精 3 min,80%酒精 3 min,90%酒精 5 min,95%酒精 10 min,100%酒精 I 15 min,100%酒精 II 15 min,依次梯度脱水。透明:二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 III,各 5 min。

8) 封片观察:中性树胶封片,显微镜下观察。

2.7.2.3 免疫组化阳性细胞计数

将完成染色的切片在显微镜下观察并进行显微图像采集。分别对各组脑组织切片中的阳性细胞数进行计数。先以 4 $\times$ 的物镜确定每张图片中的感兴趣区 (Area of Interest, AOI),每张切片的 AOI 定义为阳性细胞最密集处,然后以 20 $\times$ 的物镜将每张切片 AOI 输入 IPP 图像处理系统,每张图片选择 3 个区域进行计数,使用 IPP 色彩分割法 (segmentation) 命令以 HIS 直方图模式确定阳性细胞的轮廓及表达范围的边界,进行阳性细胞计数。每张动物的阳性细胞数量为所观察的 10 张切片中 AOI 的阳性细胞数量之和。

2.8 血脑屏障紧密连接相关蛋白 occludin 免疫荧光检测

2.8.1 测定时机和脑区

大鼠 tMCAO 模型脑缺血再灌注后 7 d 取脑,检测梗塞灶周围区 occludin 表达。

2.8.2 检测方法

2.8.2.1 取材

动物过深麻醉 ($n=6$),依次用 0.1 mmol/mL 的 PBS 和 4%多聚甲醛各 500 mL 主动脉快速冲洗灌注固定;取脑切块,从额极到中脑平均切为 7 块,每块 2 mm,从前到后依次编号为



S1~S7, 其中 S3 包含侧脑室注射靶点, 取 S3 标本放入 4% 的多聚甲醛固定 24 h, 移到 30% 蔗糖溶液中浸泡至脑块沉底。

2.8.2.2 免疫组化步骤

以恒冷冰冻切片由嘴侧向尾侧行冠状位冰冻切片, 切片厚度 25 μm , 切片间隔 100 μm , 每只大鼠脑切片数量 20 张, 切片收集到 24 孔板内, 浸泡在冻存液内 -20°C 备用。各组脑冰冻切片分别进行 occludin 和免疫双染色。将冰冻切片从冻存液内取出, 放入预先加入 0.01 mol/L PBS 的 24 孔板内, PBS 室温洗涤 5 min, 4 次; 3% 双氧水室温洗涤 20 min; 0.01 mol/L 的 PBS 室温洗涤 5 min, 4 次; 0.3% Triton X-100 37°C 水浴 20 min; 0.01 mol/L 的 PBS 室温洗涤 5 min, 4 次; 5% 羊血清 (原液配成的体积比, 溶剂 0.01 mol/L PBS) 作用室温 90 min, 吸除后不洗; 加用 5% 羊血清稀释的 occludin 一抗 1:150, 4°C 过夜; 0.01 mol/L 的 PBS 室温洗涤 10 min, 5 次; 开始避光, 用 5% 羊血清稀释的二抗 TIFC 1:300, 常温孵育 80 min; 0.01 mol/L 的 PBS 室温洗涤 10 min, 5 次。将脑片用毛笔铺于多聚赖氨酸包被的载玻片上, 以 50% 甘油/PBS 混合液封片, 避光 4°C 保存。

2.8.2.3 免疫组化阳性细胞计数

将完成染色的切片在显微镜下观察并进行显微图像采集。分别对各组脑组织切片中的阳性细胞数进行计数。先以 4 $\times$ 物镜确定每张图片中的 AOI, 每张切片的 AOI 定义为阳性细胞最密集处, 然后以 20 $\times$ 的物镜将每张切片 AOI 输入 IPP 图像处理系统, 每张图片选择 3 个区域进行计数, 使用 IPP 色彩分割法命令以 HIS 直方图模式确定阳性细胞的轮廓及表达范围的边界, 进行阳性细胞计数。每张动物的阳性细胞数量为所观察的 10 张切片中 AOI 的阳性细胞数量之和。

2.9 脑梗塞体积测定

2.9.1 测定时间点

大鼠 tMCAO 模型缺血再灌注后 48 h。

2.9.2 测定方法

大鼠 tMCAO 模型 ($n=18$) 过深麻醉取脑, 取脑冷结后冠状切片, 从额极到中脑平均切为 7 块, 每块 2 mm, 从前到后依次编号为 S1~S7, 迅速将切取的脑片浸泡在 2% TTC-PBS 溶液中, 避光条件下, 37°C 水浴 30 min, 每隔 5 min 将标本翻转一次, 以保持染色均匀。注意染色容器足够大, 防止脑片相互掩盖, 导致染色不全, 翻动时应注意保护脑片的完整。染色后小心取出脑片浸泡在 PBS 溶液中, 使用数码相机拍照, 后续使用 NIH 1.6.1 图像分析软件计算各脑片面积及相应梗塞灶面积, 梗塞体积表示为梗塞体积与对侧大脑半球体积的百分比。

2.10 缺血周围区微血管密度测量

2.10.1 测定时机

大鼠 tMCAO 模型脑缺血再灌注后 1 周取脑。

2.10.2 检测方法

2.10.2.1 取材及固定

动物麻醉后, 在取脑前 3 h 经股静脉注射 2% EB 溶液 (20

mg/kg), 在取脑前 1 min 经股静脉注射 5% FITC-葡聚糖溶液 (4 mL/kg)。取脑后将标本固定于 4% 多聚甲醛 4°C 48 h。固定后, 大脑半球从额极到中脑平均切为 7 块, 每块 2 mm, 从前到后依次编号为 S1~S7, 其中 S3 包含侧脑室注射靶点, 取 S3 标本进行冰冻切片。

2.10.2.2 微血管密度计数

以恒冷冰冻切片由嘴侧向尾侧行冠状位冰冻连续切片, 切片厚度 100 μm , 每只大鼠脑切片数量 20 张, 将脑片用毛笔铺于多聚赖氨酸包被的载玻片上, 以 50% 甘油/PBS 混合液封片。在共聚焦显微镜下观察, 观察 EB 在脑缺血中心区及周围区渗出情况, 同时观察 FITC-葡聚糖在脑缺血中心区及周围区微血管显影情况, 分别进行显微图像采集。将 FITC-葡聚糖微血管成像结果输入 IPP 图像处理系统, 测量各样本中 AOI 单位面积 (mm^2) 内微血管显影所占面积 (μm^2), 客观反应缺血周围区微血管密度。

2.11 统计学方法

全部资料采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学分析。各组数据均以均数 $\pm$ 标准差表示。采用单样本检验法 (One Sample T -test (2-tailed)), 对两治疗组动物同项数据进行统计学差异性分析检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异, 有显著意义。

3 实验结果

3.1 模型制作

3.1.1 立体定向手术结果

各组动物术后均未出现神经功能缺损体征, 均可以正常进食水, 无体重减轻及肛温异常, 未发生动物死亡。说明脑室内注射 rAAV1 载体对动物的生理状况无明显影响。

3.1.2 tMCAO 模型制作结果

治疗组和对照组大鼠在右侧 MCA 供血区脑缺血再灌注后均出现不同程度的神经功能缺损体征, 表现为右侧眼裂变窄、左前肢肌力减退、行走时向左侧旋转等, 同时其感觉功能和某些神经反射也有一定的缺损。多数大鼠于术后 1~3 d 出现精神萎靡、进食减少和体重减轻等表现, 但随后这些表现可明显改善, 精神和体重逐渐恢复到术前水平。术后 rAAV1-Ang-1/rAAV1-VEGF 治疗组死亡 9 只, rAAV1-VEGF/rAAV1-null 治疗组大鼠死亡 8 只; 模型制作后死亡的动物均给予补足样本量。

3.2 WB 检测 VEGF 和 Ang-1 表达和半定量分析

两治疗组和自然恢复组大鼠脑缺血再灌注后 48 h, 在缺血侧脑组织内 VEGF 和 Ang-1 蛋白的表达情况见图 1~图 3。在自然恢复组大鼠中, Ang-1 几乎看不到表达条带, 而在 rAAV1-Ang-1/rAAV1-VEGF 可见比较强的 Ang-1 条带。有趣的是在 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 治疗组出现了很弱的 Ang-1 条带。在自然恢复组大鼠中, 有明显的 VEGF 条带。半定量研究发现, 在 rAAV1-Ang-1/rAAV1-VEGF, rAAV1-VEGF/rAAV1-null 和自然恢复组 VEGF 条带表达的相对于内参 β -actin 的 OD 值依次是: 4.81 ± 0.71 , 5.59 ± 0.86 , 3.13 ± 0.65 ; 在

rAAV1-Ang-1/rAAV1-VEGF、rAAV1-VEGF/rAAV1-null 和自然恢复组 Ang 条带表达的相对于内参 β -actin 的 OD 值依次是: 3.88 ± 0.61 , 0.45 ± 0.08 , 0.04 ± 0.01 。

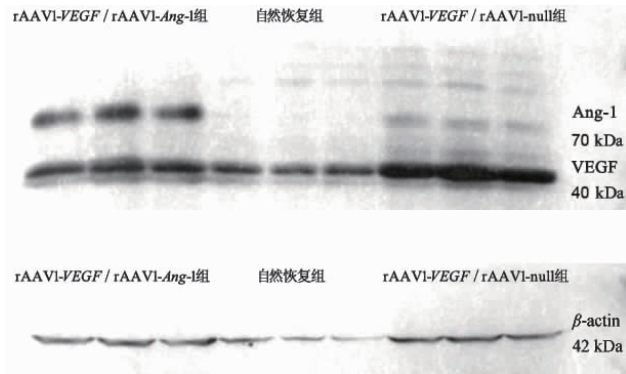


图 1 蛋白质免疫印迹法检测脑缺血 48 h 缺血半球内 VEGF 和 Ang-1 的表达

Fig. 1 Western blot analysis of VEGF and Ang-1 expression in the ischemic brain tissue 48 h after reperfusion

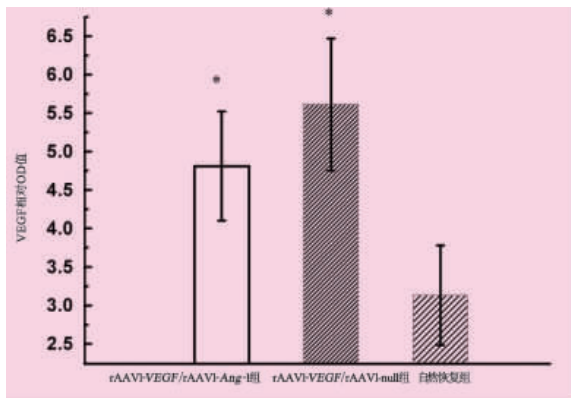


图 2 VEGF 相对内参 β -actin 表达的相对 OD 值 ($n=6$, $P<0.05$)

Fig. 2 Semi-quantitative analysis of VEGF protein β -actin was used as internal control. Results were expressed as the relative OD ratio of VEGF to β -actin

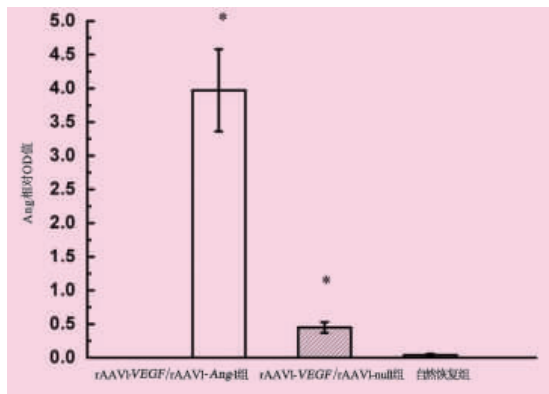


图 3 Ang 相对内参 β -actin 表达的相对 OD 值 ($n=6$, $P<0.05$)

Fig. 3 Semi-quantitative analysis of Ang-1 protein β -actin was used as internal control. Results were expressed as the relative OD ratio of Ang-1 to β -actin ($n=6$, $P<0.05$)

3.3 脑缺血再灌注后血脑屏障通透性的比较

在该实验中, 采用伊文思蓝在脑内的渗出量比较两治疗组大鼠缺血后血脑屏障的破坏情况(图 4)。结果表明, 在大鼠脑缺血再灌注后 24 h, rAAV1-Ang-1/rAAV1-VEGF 治疗组和 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 治疗组所测得的每克脑组织的 OD 值($\text{OD} \cdot \text{g}^{-1}$)分别为: 2.3604 ± 0.3537 , 3.2276 ± 0.3423 。后者的 EB 渗出量几乎是前者的 1.37 倍。上述两治疗组数据差异具有统计学显著性($P<0.05$)。说明 rAAV1-Ang-1/rAAV1-VEGF 能够减轻脑缺血早期血脑屏障的渗出。

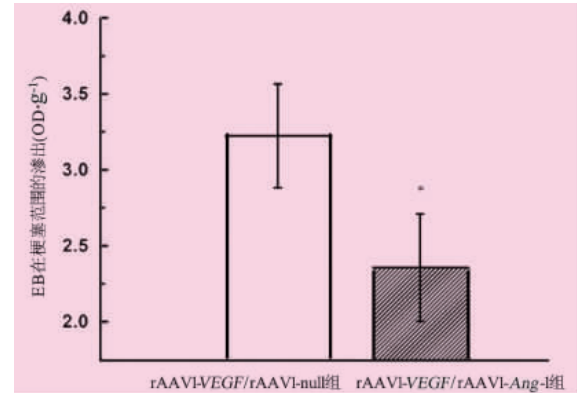


图 4 EB 在 rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 组的渗出情况

Fig. 4 Quantitative analysis of EB permeability

注: EB 在 rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 组的渗出明显少于 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 组 ($n=6$, $P<0.05$)

Notes: The EB permeability (OD/g) in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group was remarkably decreased compared with the rAAV1-VEGF/rAAV1-null group ($n=6$, $P<0.05$)

3.4 脑缺血体积和神经行为学评分

脑缺血再灌注后 48 h 行 TTC 染色, rAAV1-Ang-1/rAAV1-VEGF 组大鼠相对梗塞体积为 $20.45\% \pm 4.3\%$, rAAV1-VEGF/rAAV1-null 组大鼠相对梗塞体积为 $47.20\% \pm 3.2\%$, 自然恢复组相对梗塞体积为 $38.20\% \pm 4.1\%$, 3 组数据差异具有统计学显著性($P<0.05$)。脑缺血再灌注后 48 h, rAAV1-Ang-1/rAAV1-VEGF 组大鼠神经行为学明显改善(图 5~图 7)。

3.5 脑缺血再灌注后缺血灶周围区微血管密度的比较

为了比较 rAAV1-Ang-1/rAAV1-VEGF 和 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 在治疗脑缺血过程中对微血管增殖的作用, 本研究采用 FITC-葡聚糖绿色荧光对微血管进行显影, 用伊文思蓝的红色荧光显示脑梗塞中心区, 两者结合可以清楚地显示和定位缺血灶周围区的微血管数目(图 8~图 9)。结果表明, 在 rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 治疗组和 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 治疗组的微血管密度分别是: $217468.90 \pm 31846.44 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 和 $143301.31 \pm 14716.60 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 。前者是后者的 1.52 倍, 上述两治疗组数据差异具有统计学显著性($P<0.05$)。说明与 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 相比, rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 能够诱导更多的微血管缺血后增殖。

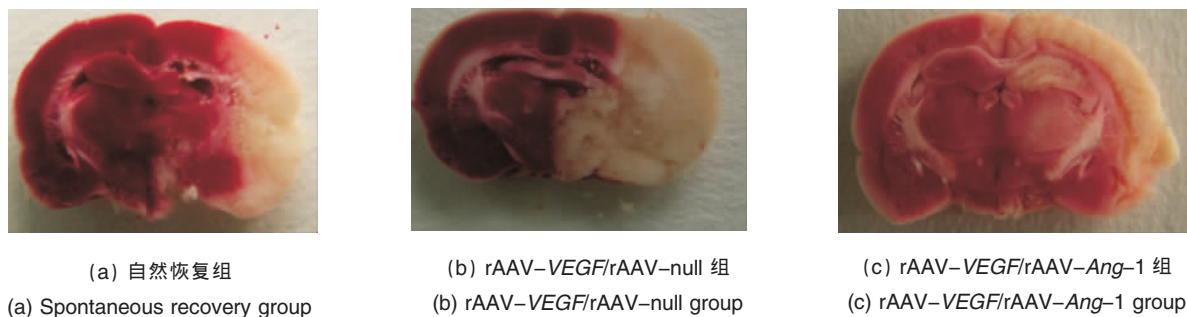


图 5 脑缺血再灌后 48 h 行 TTC 染色

Fig. 5 Evaluation of the ischemic lesion volume with TTC staining at 48 h after reperfusion

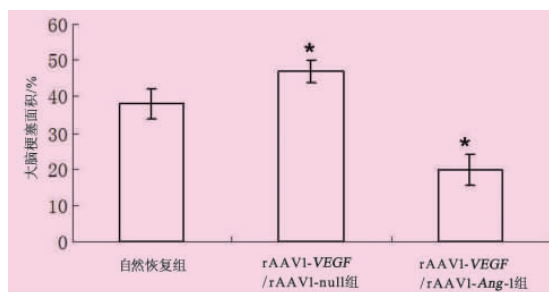


图 6 三组间相对脑梗塞面积的比较

Fig. 6 Comparison of the relative infarct volume between the three groups

注: rAAV-VEGF/rAAV-Ang-1 组脑梗塞面积明显小于自然恢复组和 rAAV-VEGF/rAAV-null 组 ($n=6, P<0.05$)

Notes: The TTC-derived relative infarct volume of the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group was significantly smaller than that of the rAAV1-VEGF/rAAV1-null group and the spontaneous recovery ($n=6, P<0.05$)

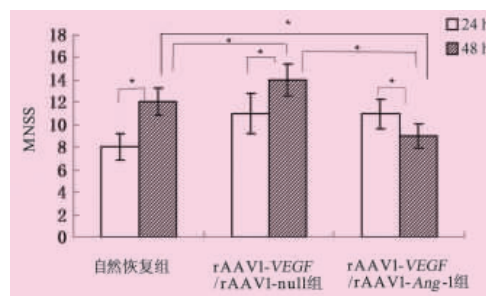


图 7 脑缺血再灌后 48 h rAAV-VEGF/rAAV-Ang-1 组大鼠的神经功能明显改善 ($n=6, P<0.05$)

Fig. 7 The neurological severity score in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group was remarkably decreased after 48 h, which was significantly lower than the scores in the rAAV1-VEGF/rAAV1-null group and the spontaneous recovery group ($n=6, P<0.05$)

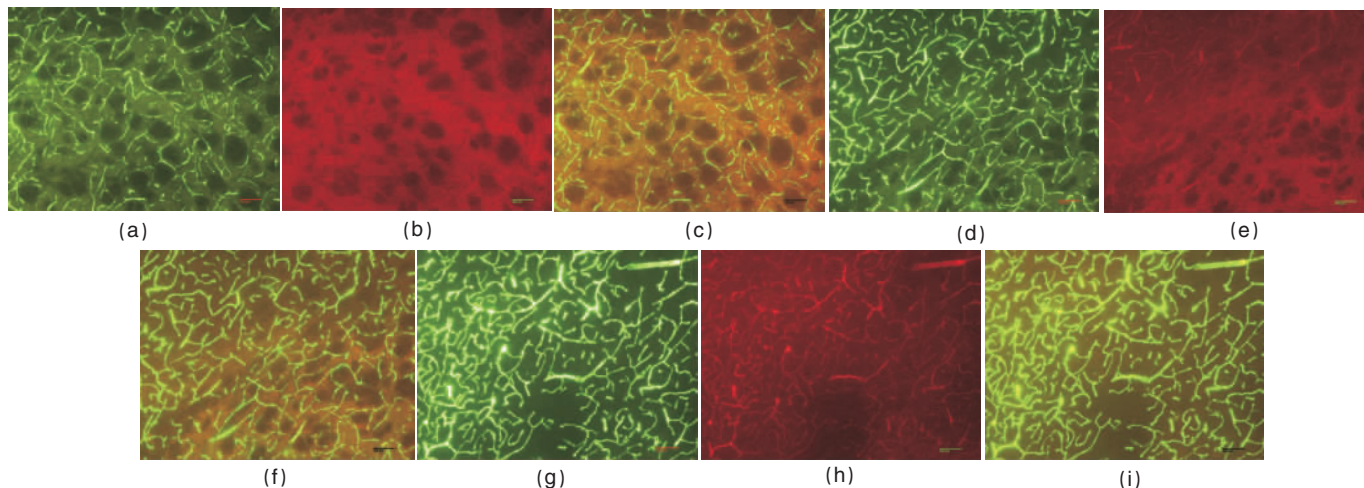


图 8 脑缺血灶及其周围区血管增生情况

Fig. 8 Fluorescence observation of cerebral micro-vessel perfusion in the ischemic peri-focal region

注: 图(a)~(c): 大鼠 tMCAO 自然恢复脑缺血中心区血管灌注情况; 图(d)~(f): rAAV1-VEGF/rAAV1-null 治疗组脑缺血中心区及其周围区血管灌注情况; 图(g)~(i): 在 rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 治疗组脑缺血中心区及其周围区血管灌注情况。图(a)、(d)、(g)为 FITC-葡聚糖绿色荧光显示微血管及缺血灶; 图(b)、(e)、(h)为 EB 红色荧光显示微血管缺血灶; 图(c)、(f)、(i)为上述绿色荧光和红色荧光的叠加合成图像 (scale bar=100 μ m)

Notes: Fluorescence observation of cerebral micro-vessel perfusion in the ischemic peri-focal region from the spontaneous recovery group (figures (a)~(c)), rAAV1-VEGF/rAAV1-null group (figures (d)~(f)), and rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group (figures (g)~(i)).

Evans blue and FITC-dextran emit red and green fluorochrome, respectively, for measurement of plasma-perfused microvessels (yellow color, Evans blue and FITC-dextran), and non-plasma perfused microvessels (red, Evans blue only) (scale bar=100 μ m)

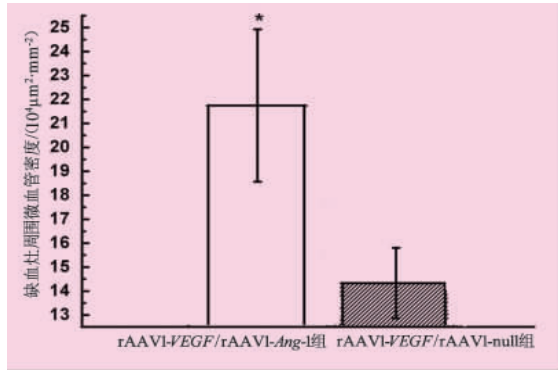


图 9 两组缺血灶周围区微血管密度的比较

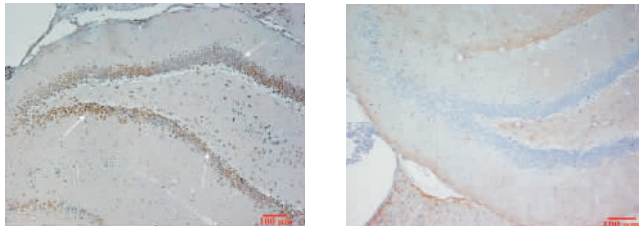
Fig. 9 Comparison of the micro-vessel density between the two groups

注: rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 组缺血灶周围的微血管密度明显多于 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 组 ($n=6, P<0.05$)

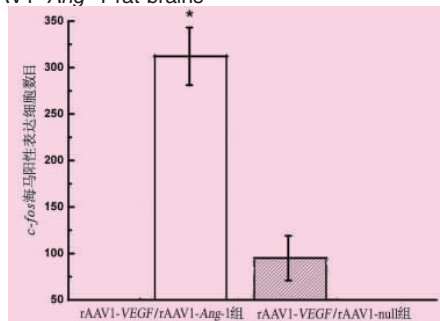
Notes: The micro-vessels density of the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group was significantly higher than that of rAAV1-VEGF/rAAV1-null group. Data were presented as mean $\pm$ SD. * $P<0.05$ versus rAAV1-VEGF/rAAV1-null ($n=6, P<0.05$)

3.6 免疫组化和免疫荧光结果比较

两治疗组免疫组化和半定量结果, *c-fos* 见图 10(a)~(c),



(a) rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 组缺血侧海马即早基因 *c-fos* 存在广泛的表达
(a) There were more cells expressing *c-fos* in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 rat brains
(b) rAAV1-VEGF/rAAV1-null 组几乎很少看到阳性表达
(b) The cells expressing *c-fos* are rare in the rAAV1-VEGF/rAAV1-null brains

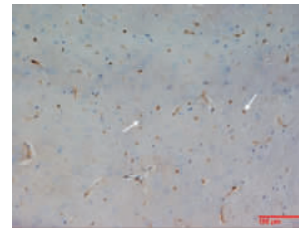


(c) rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 组缺血侧海马即早基因 *c-fos* 表达明显高于 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 组 ($n=6, P<0.05$), (scale bar=100 μ m)

(c) The *c-fos* expression in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group was remarkably higher than that of the rAAV1-VEGF/rAAV1-null group ($n=6, P<0.05$)

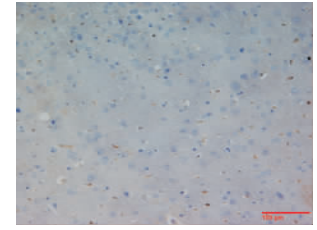
图 10 两组缺血侧海马即早基因 *c-fos* 的表达
Fig. 10 The *c-fos* expression in the ischemic hippocampus in the two groups

AQP4 见图 11 (a)~(c), Occludin 的免疫荧光结果见图 12(a)~(c)。对上述蛋白的表达分别进行半定量比较, 结果发现, rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 治疗组脑缺血后 *c-fos* 和 Occludin 的表达比 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 治疗组明显增高, 而 AQP4 的表达明显降低。上述 3 组数据的差异都具有显著性统计学意义 ($P<0.05$)。

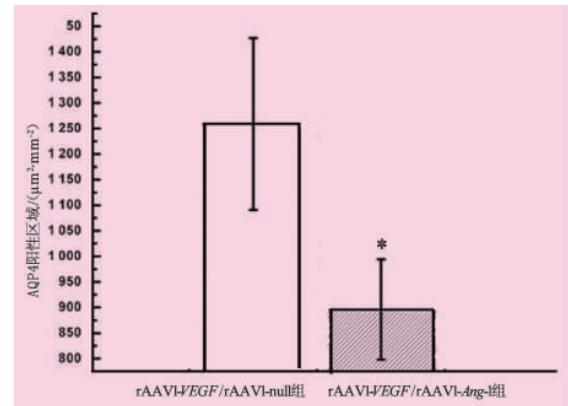


(a) rAAV1-VEGF/rAAV1-null 组缺血周围区 AQP4 存在广泛的表达

(a) There were more cells expressing AQP4 in the rAAV1-VEGF/rAAV1-null rat brains



(b) rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 组缺血周围区 AQP4 阳性细胞数相对较少
(b) The cells expressing AQP4 are rare in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 brains



(c) rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 组缺血周围区 AQP4 表达相对面积明显少于 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 组 ($n=6, P<0.05$)
(c) The AQP4-positive expression in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group was apparently lower than that of the rAAV1-VEGF/rAAV1-null group ($n=6, P<0.05$)

图 11 两组缺血周围区 AQP4 的表达

Fig. 11 Immunohistochemistry for AQP4 and quantification of AQP4 positive cells

4 讨论

Ang-1 调节血管从内皮细胞层形成多细胞精细血管结构的血管成熟过程, 具有吸引血管平滑肌细胞 (VSMC)、周细胞等血管周围细胞的作用, 支持内皮细胞层形成完整的血管壁。Gamble 等^[4]研究发现, Ang-1 可剂量依赖性地抑制 ECs 单层的基础通透性, 而且 Ang-1 还分别抑制由 70% 凝血酶和 100% VEGF 这两种经典通透性诱导物质刺激的单层通透性增加, 提示 Ang-1 是强大的抗血管通透性因子。Thurston 等^[5]在比较分别过量表达 VEGF 和 Ang-1 的转基因小鼠 K14-VEGF、K14-Ang-1 通透性时发现, 基线情况下, K14-VEGF 小

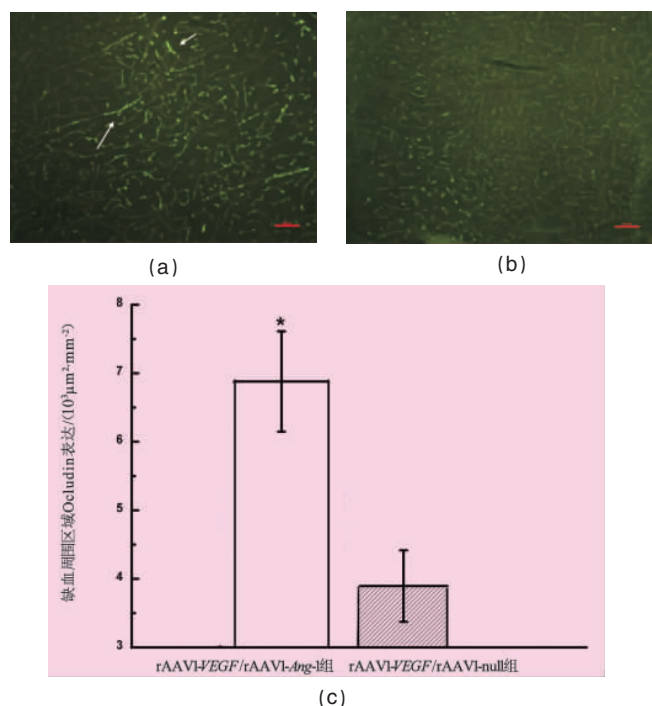


图 12 两组在缺血周围区微血管上 Ocludin 的表达

Fig. 12 Immunofluorescence for Ocludin and quantification of ocludin positive cells

注: rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 组(a)Ocludin 在缺血周围区微血管上的表达明显多于 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 组(b) (scale bar=100 μm), rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 组在缺血周围区微血管上 Ocludin 的表达相对面积明显多于 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 组(c) (n=6, P<0.05)

Notes: There were more cells expressing ocludin in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 rat brains (a) than in the rAAV1-VEGF/rAAV1-null brains (b). The relative area of ocludin expression in the rAAV1-VEGF/rAAV1-Ang-1 group was much wider than that of the rAAV1-VEGF/rAAV1-null group (c) (n=6, P<0.05)

鼠耳朵皮肤血管出现病理性血浆渗漏,但是 K14-Ang-1 小鼠无渗漏发生,并且共表达 Ang-1 和 VEGF 的转基因小鼠血浆渗漏也比 K14-VEGF 小鼠显著减少,证实 Ang-1 的表达可减轻由于 VEGF 所致的血管渗漏。

近年来很多研究表明,缺血后血管生成是一个多因子参与调节的复杂过程,其中血管内皮生长因子(VEGF)和血管生成素(Ang)在其中起关键作用^[3],形成功能性成熟血管有赖于这两类因子的协同作用^[4]。VEGF 是特异性血管内皮细胞有丝分裂原,能够刺激血管 ECs 通过有丝分裂进行增殖、迁移和血管形成,已经明确 VEGF-121 和 VEGF-165 是促 ECs 分裂的主要异构体。同时 VEGF 也称为血管通透性因子(Vascular Permeability Factor,VPF),是目前发现的最强的血管通透性因子,其增加微血管通透的作用比组织胺强 5 000 倍,可以在脑缺血后加重血脑屏障(BBB)的渗出,诱发血管源性脑水肿甚至脑出血,从而阻塞微血管管腔而减少血供,最

终引起颅内压的增高^[7]。Ang 是一类新发现的主要由血管内皮周围组织分泌的糖蛋白,是血管 ECs 特异性受体酪氨酸激酶 Tie-2 的配体,与 VEGF 协同调节血管的发生和形成过程。很多研究还表明,Ang-1 还参与维持成熟血管的完整性,它的表达可抑制单层 ECs 通透性,防止微血管渗漏,是迄今为止发现的第一个作用于 ECs 的抗血管通透性因子,这提示 Ang-1 在调节血管通透性方面发挥重要作用。近年来的很多研究也证明,Ang-1 可以对抗由 VEGF 所引发的血管渗透性增加,并认为 Ang-1 和 VEGF 的平衡对于维持中枢神经系统 BBB 的完整性起关键作用,而急性脑缺血打破了这种平衡从而诱发了 BBB 的破坏^[5,8-9]。也有研究表明,Ang-1 是通过最大程度地加强血管 ECs 之间、内皮周围细胞和基质之间的相互作用来减少血管的渗出^[10-11]。

尽管研究表明 VEGF 和 Ang-1 在正常成年动物脑组织中均呈现低水平的表达,但近年来有关探索脑缺血后血管生成因子的研究表明,脑缺血再灌注损伤后内源性 VEGF 和 Ang-1 在时间表达上具有不同步性。Zhan 等^[12]利用大鼠局灶性缺血再灌注模型的研究表明,缺血后 2~4 h,在缺血半球就出现 VEGF mRNA 的增高,而 Ang-1 mRNA 降低,而且发现脑梗死中心区的血脑屏障渗出程度与 VEGF 的增高水平及 Ang-1 的降低水平明显相关。而缺血 48~72 h 后 Ang-1 表达开始升高,尽管此时 VEGF 的表达仍在上调,但是血脑屏障渗出却开始减退。而且进一步研究发现在脑梗塞后 2~28 d,梗死周围缺血区的 VEGF 和 Ang-1 及其受体都表达增高。与此同时,在梗死周围缺血区也出现了新生的血管。文章最后得出结论认为,在脑缺血引起的缺血核心区,VEGF 和 Ang-1 的急性改变介导了血脑屏障的破坏渗出,而在缺血周围区 VEGF 和 Ang-1 及其受体的增高共同调节着缺血后新生血管的形成。也有人发现,在脑缺血早期应用 VEGF 可以诱发严重的脑水肿,而在内源性 Ang-1 表达开始上调时应用 VEGF 并不加重 BBB 渗出^[13]。VEGF 和 Ang-1 介导 BBB 通透性变化的具体机制仍然有待阐明,有研究认为可能与前者增强而后者抑制间质金属蛋白酶-9 的活性有关^[14]。因此在急性脑缺血中,VEGF 和 Ang-1 的表达及其表达量之间的平衡对于促进健康新生血管生成和维持 BBB 的完整性可能起着关键作用。本研究结果表明,在自然恢复组大鼠 tMCAO 脑缺血再灌注损伤 48 h 后,蛋白免疫印迹实验没有检测到 Ang 蛋白表达条带,而确实检测到了 VEGF 的明显表达,说明至少到缺血损伤 48 h Ang 是几乎没有表达的,正说明了 VEGF 和 Ang-1 在缺血灌注损伤后表达的不同步性。这种不同步性可能是在缺血早期 BBB 渗出增加并导致脑水肿的重要原因之一。而在本实验中发现的有趣现象是,在 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 单基因治疗组,却检测到了微弱的 Ang-1 表达条带。尽管条带表达比较弱,但是说明 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 与自然恢复组相比,在脑缺血再灌注损伤后 48 h 表达的 Ang-1 量是增多的。这种差异的原因目前还不是很清楚,在既往的研究中也没有

类似报道,推测可能与 rAAV1-VEGF/rAAV1-null 治疗组 VEGF 的过表达诱发的血管增殖作用刺激了内源性 Ang-1 的生成以满足这些血管成熟的需要有关,其具体机制需要进一步研究。

目前在促进脑缺血血管增生性治疗的研究中,VEGF 仍然占有主导地位。虽然很多研究之间 VEGF 的应用途径、剂量、给予方式(VEGF 蛋白或基因治疗)以及治疗时机不尽相同,但大多数结果表明,VEGF 可以有效促进缺血后血管增生,但在缺血早期 VEGF 也同时诱发严重的 BBB 渗出,甚至导致脑出血等灾难性后果。Zhang 等^[13]利用大鼠大脑中动脉血栓栓塞模型,在缺血后 1 h 静脉输注 hVEGF-165,发现诱发严重的 BBB 破坏和脑水肿,并引起缺血灶内渗出性出血,最终加重了缺血性脑损害;而在缺血后 48 h 进行治疗可以明显促进半暗区血管增生和改善动物神经功能。与之相似,Abumiya 等^[15]在大鼠脑缺血再灌注后即刻经颈内动脉输注 0.3 mg/kg 的 VEGF,72 h 后发现缺血灶周围区新生血管数目增加,但缺血灶内有血肿形成。VEGF 在急性脑缺血早期诱发脑水肿和脑出血与增加毛细血管通透性有关,如何减轻这种副作用是实现 VEGF 成功治疗脑缺血的关键。为此,很多学者从 VEGF 治疗途径和应用剂量上做了进一步研究。Harrigan 等^[16]利用线栓法制作大鼠脑缺血 2 h 再灌注模型,缺血前一周向侧脑室内连续输注 5 μ g/mL 的 hVEGF-165,发现缺血后治疗组脑水肿减轻,梗塞面积减小,作者认为 5 μ g/mL 浓度的 VEGF 经侧脑室输注时对脑缺血具有直接的神经保护作用,同时诱发脑水肿的副作用最小。另外,Sun 等^[17]利用大鼠线栓法制作脑缺血 90 min 再灌注模型,在缺血再灌注后 1~3 d 通过侧脑室途径输注 VEGF,结果表明可以显著减小梗塞面积,改善神经功能恢复、促进室下带和齿状回增殖的新生神经元存活,并促进缺血纹状体区血管生成。Yano 等^[18]把 VEGF 的 cDNA 导入幼年仓鼠肾细胞中建立能稳定表达 VEGF 的细胞株,然后在缺血前 6 d 将细胞移植到大鼠纹状体内,研究发现缺血后在移植区周围出现血管增生,而且半暗带凋亡细胞减少。上述研究结果不仅表明脑室途径应用 VEGF 是治疗脑缺血的有效途径,也说明 VEGF 对脑缺血的治疗机制可能是多方面的,包括血管生成、直接神经保护作用、促进神经干细胞再生等。尽管很多实验证实 VEGF 促进了缺血区血管增生,但至今却没有可靠的实验结果表明 VEGF 治疗能增加缺血区的局部脑血流量,在 Harrigan 和 Yano 等的实验中明确提出没有检测到缺血半球局部脑血流量的增加,这表明 VEGF 虽然能够促进血管生成,但这些新生的血管能否发挥功能尚需进一步研究,这可能与 VEGF 单因子作用生成的血管不成熟、缺乏有效的血流灌注有关。

本研究结果表明,rAAV-VEGF-165 联合 rAAV-Ang-1 等剂量进行脑室内转染和单纯 rAAV-VEGF-165 单基因转染相比,可以在脑缺血再灌注后 24 h 明显减少伊文思蓝的渗出,伊文思蓝的渗出减少提示血脑屏障的渗出减轻,这进一步提

示 Ang-1 确实对缺血早期的 BBB 破坏和 VEGF 诱发的 BBB 渗透性增加有明显的对抗作用。另外本研究结果也观察到在脑缺血再灌注后 1 周缺血周围区的微血管密度显著增加,这表明外源性 VEGF-165 联合 Ang-1 可能对于缺血后微血管的再生起到互相促进作用,要比 VEGF-165 单因子治疗更能增加血管的密度,另外也可能是外源性 VEGF-165 联合 Ang-1 促进了成熟微血管的增殖,而这些增殖后的血管不会因为不成熟而最终退化。有报道认为^[6]VEGF-165 诱导增生的微血管是幼稚的血管,存活时间比较短,可以发生自发性消退。为了探索 Ang-1 保护 BBB 的机制,本研究进行了 AQP4、Occludin、*c-fos* 的免疫组化实验。结果表明,rAAV-VEGF-165 联合 rAAV-Ang-1 组在缺血灶周围区诱导了更多的 *c-fos* 和 Occludin 表达。AQP4 和 Occludin 是介导 BBB 通透性的关键介质。研究表明,Occludin 表达增多是 BBB 功能恢复或者存在的标志之一。AQP4 蛋白控制微血管内水分子的转运功能,很多研究表明脑缺血性脑水肿总是伴随 AQP4 表达的增加,两者呈正相关,AQP4 在介导血管源性脑水肿方面起到重要作用。在基因联合治疗组可以显著减少 AQP4 的表达,提示可以减轻缺血后脑水肿,而 Occludin 表达明显增强说明 BBB 的功能破坏减轻。这些结果表明,Ang-1 可能是通过抑制 AQP4 和促进 Occludin 的表达而发挥保护 BBB 和减轻微血管渗出的作用。

近年来有学者开始用 VEGF 联合 Ang-1 治疗急性脑缺血并取得了很好的疗效,并认为 VEGF 和 Ang-1 联合治疗急性脑缺血不仅可以有效地促进新生血管增殖和成熟,还可以保护 BBB 完整性。Zhang 等^[19]在大鼠急性脑缺血之前,分别静脉内应用编码 Ang-1 基因的重组腺病毒载体 (Ad-Ang-1)和重组 Ang-1 蛋白,在缺血后 6 h 发现反映微血管通透性的伊文思蓝在脑内的渗出均明显减少,与对照组相比脑梗塞体积也减少约 22%;进一步研究发现,Ad-Ang-1 治疗组的大鼠在缺血早期输注 VEGF 伊文思蓝渗出也比对照组明显减少。Valable 等^[14]在小鼠局灶性永久性脑缺血模型中,把重组 Ang-1 和重组 VEGF 分别或同时在缺血早期注入脑室内,发现联合治疗组与 VEGF 单独治疗组相比,梗死体积和脑水肿体积分别下降 50%和 42%;而且进一步研究发现,联合治疗组脑缺血周围区的新生血管渗出性明显减轻。Zhu 等^[20]在正常成年小鼠脑内分别局部注射 Ad-Ang-1、VEGF、或者 VEGF 加 Ad-Ang-1,结果表明 2 周后 VEGF 加 Ad-Ang-1 组增生血管的管壁上 ZO-1 的表达比 VEGF 组更丰富,作者认为 Ang-1 和 VEGF 在血管生成和维持 BBB 完整性方面有协同作用,两者的联合应用既能有效促进血管增生,又能通过促进血管壁 ZO-1 的表达维持血管壁正常的通透性。本研究结果进一步表明,rAAV-VEGF-165 联合 rAAV-Ang-1 治疗脑缺血可以促使保护性基因 *c-fos* 的表达,从而减少了缺血性脑损伤,这些疗效可能直接来源于 Ang-1 对 BBB 的保护作用和促进成熟性微血管增殖的作用。



5 结论

本实验表明,Ang-1 不仅能够对抗 VEGF 所致的毛细血管通透性增加,并且在血管生成过程中与 VEGF 有协同作用,所以联合应用 VEGF 和 Ang-1 促进脑缺血后血管再生可能会在一定程度上避免 VEGF 单因子治疗所带来的副作用,而发挥协同作用。尽管在动物实验中 VEGF 对脑缺血的治疗已取得了许多可喜进展,但 VEGF 和 Ang-1 的联合治疗仍存在一些问题需要进一步研究:① VEGF 和 Ang-1 联合治疗的量效比例关系;② 对新生血管功能的进一步多角度评价等。但我们相信这是更加合理有效的治疗策略,将会为急性脑缺血的治疗开辟一条新的道路,最终可能会取代 VEGF 单因子治疗缺血性疾病。

参考文献 (References)

- [1] 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(6): 654-666.
- [2] 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.
- [3] Yancopoulos G D, Davis S, Gale N W, *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation[J]. *Nature*, 2000, 407: 242-248.
- [4] Gamble J R, Drew J, Trezise L, *et al.* Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions [J]. *Circ Res*, 2000, 87(7): 603-607.
- [5] Thurston G, Suri C, Smith K, *et al.* Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1[J]. *Science*, 1999, 286 (5449): 2511-2514.
- [6] Zhang Z, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12(2): 62-66.
- [7] Namiecinska M, Marciniak K, Nowak J Z, *et al.* VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor [J]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2005, 59: 573-583.
- [8] Valable S, Montaner J, Bellail A, *et al.* VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(11): 1491-1504.
- [9] Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: Once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection [J]. *Bioessays*, 2004, 26(9): 943-954.
- [10] Sundberg C, Kowanetz M, Brown L F, *et al.* Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: Phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo[J]. *Lab Invest*, 2002, 82(4): 387-401.
- [11] Yancopoulos G D, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border [J]. *Cell*, 1998, 93: 661-664.
- [12] Gamble J R, Drew J, Trezise L, *et al.* Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions [J]. *Circ*

Res, 2000, 87(7): 603-607.

- [13] Thurston G, Rudge J S, Ioffe E, *et al.* Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage[J]. *Nat Med*, 2000, 6(4): 460-463.
- [14] Zhang Z G, 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]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(4): 379-392.
- [15] Zhang Z G, Zhang L, Jiang Q, *et al.* VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(7): 829-838.
- [16] Valable S, Montaner J, Bellail A, *et al.* VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1 [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(11): 1491-1504.
- [17] Abumiya T, Yokota C, Kuge Y, *et al.* Aggravation of hemorrhagic transformation by early intraarterial infusion of low-dose vascular endothelial growth factor after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2005, 1049(1): 95-103.
- [18] Harrigan M R, Ennis S R, Sullivan S E, *et al.* Effects of intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor on cerebral blood flow, edema, and infarct volume[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2003, 145(1): 49-53.
- [19] Sun Y, Jin K, Xie L, *et al.* VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(12): 1843-1851.
- [20] Yano A, Shingo T, Takeuchi A, *et al.* Encapsulated vascular endothelial growth factor-secreting cell grafts have neuroprotective and angiogenic effects on focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosurg*, 2005, 103 (1): 104-114.

(责任编辑 李慧政)

《科技导报》“图书推介”栏目征稿

“图书推介”栏目专门介绍新近出版的学术专著以及涉及科学精神、科学方法、科技哲学、工程理论、科学人文、科学家传记、经典科学著作、科学通俗读物、科学道德等方面的图书,为读者提供优秀图书信息、搭建交流读书心得平台。欢迎将自己认为的好书推荐给读者,每条推荐语约 300 字,要求简明扼要、精辟独到,富有吸引力。推介信息包含:书影、书名、作者、出版社、定价、出版日期、推荐语,以及推荐者单位、姓名。欢迎各出版社提供相关图书样本,本刊将免费推介。栏目责任编辑:陈广仁;投稿邮箱:chenguangren@cast.org.cn。