

脑缺血后不同时间段血管内皮生长因子表达和微血管形成的关系

李成建

(郑州大学附属郑州中心医院 ICU 河南郑州 450007)

摘要:目的:探究脑缺血后不同时间段血管内皮生长因子表达和微血管形成的关系。方法:选取 40 只成年雄性 SD 大鼠,采用 Longa 线栓法建立左大脑中动脉缺血 MCAO 模型,分别于成模后 1 h、3 d、7 d、28 d 以酶联免疫吸附法检测大鼠脑脊液血管内皮生长因子浓度,以激光散斑成像采集大鼠大脑中动脉血流数据,激光扫描共聚焦技术测量微血管密度。结果:Longa 线栓术后大鼠大脑中动脉血供、微血管密度、脑脊液血管内皮生长因子浓度各时间段比较,差异具有统计学意义(均 $P<0.05$)。脑脊液中血管内皮生长因子浓度高峰出现在缺血后 1 h 到缺血后 7 d 之间,高峰在缺血后 3 d,测得浓度为 (4.56 ± 0.34) pg/ml;微血管密度持续升高但没有出现明显高峰。多元线性回归显示,微血管密度 $=0.023+1.724\times$ 时间 $-0.096\times$ 血管内皮生长因子浓度,提示大鼠缺血后微血管密度与术后时间、血管内皮生长因子浓度存在线性关系($F=524.681, P=0.000$)。结论:大鼠缺血后微血管密度与术后时间、血管内皮生长因子浓度存在线性关系,但这一结果需要更严密的实验加以证实。

关键词:脑缺血;血管内皮生长因子;微血管;Longa 线栓法

中图分类号:R332

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2020.06.065

缺血脑卒中是我国乃至世界范围内较为普遍的致死性疾病,大部分脑卒中患者均存在不同程度、不同方面的功能障碍。近年来,有关血管内皮生长因子(VEGF)在缺血性脑卒中治疗中的作用已得到广泛研究,但大多数研究通过大鼠脑组织切片获得微血管密度数据,缺乏连续观察,对于微血管密度与 VEGF 之间的时间效应关系没有十分明确的数据说明^[1-2]。随着激光散斑成像(LSI)、激光扫描共聚焦(LSC)技术的出现,研究者可以更加容易获取不同时间点大脑中动脉血供情况,同时还可以通过抽取脑脊液检测 VEGF 浓度^[3]。本研究通过 Longa 线栓法建立左大脑中动脉缺血 MCAO 模型,观察微血管密度与脑脊液 VEGF 浓度之间的关系。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 动物模型制备、检测方法与观察指标 选取 40 只成年雄性 SD 大鼠(上海市斯莱克动物实验有限责任公司提供),标准环境饲养,Longa 线栓法建立左大脑中动脉缺血 MCAO 模型。分别于术后 1 h、3 d、7 d、28 d 分 4 次,每次 10 只,采用 LSI 技术检测血流,LSC 技术检测微血管密度,酶联免疫吸附法(ELISA)测定大鼠脑脊液 VEGF 浓度。

1.2 统计学分析 数据采用 SPSS22.0 统计学软件分析。计量资料用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,计数资料用%表示,采用方差分析、多元线性回归相关性分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠大脑中动脉血供、微血管密度、脑脊液

VEGF 浓度随时间变化情况 重复测量方差分析显示,Longa 线栓术后大鼠大脑中动脉血供缺血后 3 d 比缺血后 1 h 增加($F=12.422\ 3, P<0.01$),缺血后 7 d 比缺血后 3 d 增加($F=8.470\ 3, P<0.01$),缺血后 28 d 比缺血后 7 d 增加($F=10.195\ 5, P<0.01$);微血管密度缺血后 3 d 比缺血后 1 h 增加($F=2.434\ 2, P=0.012\ 2$),缺血后 7 d 比缺血后 3 d 增加($F=3.466\ 4, P=0.002\ 3$),缺血后 28 d 比缺血后 7 d 增加($F=1.122\ 5, P=0.040\ 1$);脑脊液 VEGF 浓度缺血后 3 d 比缺血后 1 h 增加($F=30.110\ 7, P<0.01$),缺血后 7 d 比缺血后 3 d 降低($F=3.288\ 9, P=0.001\ 8$),缺血后 28 d 比缺血后 7 d 降低($F=4.120\ 0, P=0.037\ 1$)。见表 1。大鼠大脑中动脉血供及微血管密度随时间增加而持续增加,而脑脊液 VEGF 浓度在第 3 天达到高峰后即开始下降。见图 1。

表 1 大鼠大脑中动脉血供、微血管密度、脑脊液 VEGF 浓度变化情况($\bar{x}\pm s$)

指标	缺血后 1 h	缺血后 3 d	缺血后 7 d	缺血后 28 d
中动脉供血 %	38.53± 2.41	62.84± 3.32	77.09± 3.98	92.01± 3.02
微血管密度 %	1.17± 0.63	2.10± 0.70	5.56± 0.62	5.98± 1.21
脑脊液 VEGF 浓度(pg/ml)	0.65± 0.15	4.56± 0.34	4.09± 0.89	2.10± 0.52

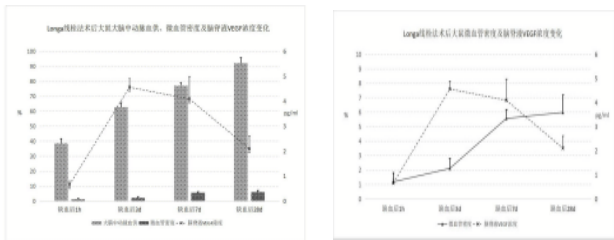


图 1 大鼠大脑中动脉血供、微血管密度、脑脊液 VEGF 浓度随时间变化情况

2.2 大鼠缺血后微血管密度与 VEGF 浓度的相关

性分析 多元线性回归分析显示,微血管密度 = $0.023+1.724\times \text{时间}-0.096\times \text{VEGF 浓度}$,提示大鼠缺血后微血管密度与术后时间、VEGF 浓度存在线性关系 ($F=524.681,P=0.000$)。见图 2。

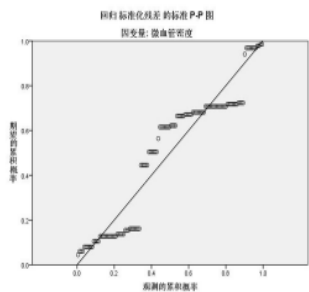


图 2 大鼠缺血后微血管密度与 VEGF 浓度的相关性

3 讨论

动物实验^[3]证实,VEGF 对缺血性疾病有明显的治疗意义,但外源性 VEGF 难以透过血脑屏障,且进入循环系统后半衰期过短,实际治疗价值十分有限。在动物实验中,直接将外源性 VEGF 输入大鼠脑室,可以明确观察到缺血区血管内皮细胞增殖形成血管^[4]。虽然 VEGF 增加毛细血管通透性作用是组胺的 5 万倍,有致脑组织肿胀、脑疝形成等风险,但是 VEGF 同时对神经前体细胞的增殖具有明显调控作用,与神经发生有关,具备神经营养与神经保护作用^[5]。因此,在严格控制 VEGF 剂量效应关系的情况下,可以最大发挥 VEGF 减小脑梗死体积的作用而减少脑水肿效应。

既往研究^[6]显示,脑组织缺血后 VEGF 家族不同时间表达情况有所差异,但都能直接促进血管内皮细胞快速增殖并新生血管形成。也有研究^[7-8]发现,在脑组织缺血 48 h 后即出现血管内皮细胞增殖微血管发生,且 VEGF 表达也会在缺血后 1 d 开始。但是这些研究获取的 VEGF 表达情况以及大鼠微血管密度数据均是来自于不同个体,设计存在缺陷。本研究采用 LSI 采集大鼠大脑中动脉血流数据, LSC 技术采集微血管形成数据,未处死大鼠,可以连续观察大鼠脑缺血阻断后血供以及微血管形成情况。在 Longa 线栓法手术人工干预造成大鼠脑缺血后 1 h、3 d、7 d 和 28 d,分别测得大脑中动脉血供、微血管密度以及脑脊液 VEGF 浓度。虽然本实验过程中有 4 只大鼠发生死亡,但是得到一组同一个体不同时间点连续观察的实验数据。重复测量资料的方差分析显示,大鼠脑缺血后 1 h、3 d、7 d、28 d 这 4 个时

间点大脑中动脉血供、微血管密度、脑脊液 VEGF 浓度比较差异均有统计学意义。脑脊液中 VEGF 浓度高峰出现在缺血后 1 h 到缺血后 7 d 之间,缺血后 3 d 测得浓度为 (4.56 ± 0.34) pg/ml,由于实验设计时未防止过于频繁暴露大鼠皮下伤口,选择时间上偏重于 1 h、3 d、7 d、28 d,脑脊液 VEGF 浓度峰值更为准确的出现时间暂不得而知,需要下一步实验缩短检测时间差。但是在本研究中,微血管密度是持续升高的,期间没有微血管密度高峰表现,与既往研究^[9]结果基本一致。回归分析亦表明大鼠缺血后微血管密度与术后时间、VEGF 浓度存在线性关系 ($F=524.681,P=0.000$)。由于将术后时间作为有序变量赋值纳入方程,得到的微血管密度与 VEGF 负相关结果与一般认识有所出入,需要下一步实验进一步优化观察。

综上所述,脑组织缺血后 VEGF 表达与微血管密度之间存在明显相关性,VEGF 存在一个表达高峰,大概在缺血后 1 h~7 d,位于缺血后 3 d 左右,而微血管发生是一个持续发展过程。但是本研究实验方法有一定局限性,在进行大鼠颅骨打磨时由于每只大鼠颅骨厚度差异,并不能保证大鼠颅骨厚度能够完全一致,LSI、LSC 成像时会有一定偏差。而且每只大鼠测量数据之后没有处死,而是进行伤口闭合,期间伤口情况可能对实验数据造成一定影响。

参考文献

[1]马毓,何晓燕,党辉,等.调控沉默信息调节因子 2 同系物 1 活性对脑缺血大鼠血管发生的影响[J].中华神经科杂志,2018,51(6):456-463
[2]刘海燕,姜季宇,白宏英,等.脑梗死大鼠缺血脑组织中 Slit2 蛋白的表达及与血管新生的关系[J].郑州大学学报(医学版),2015,50(5):655-658
[3]王富明.针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠外周血清 SOD、MDA、miRNA-126 及 VEGF 表达的影响[D].北京:北京协和医学院,2015
[4]余素,周敬华.VEGF-A 在脑卒中的作用[J].中国实用神经疾病杂志,2019,22(10):1157-1160
[5]马涛.VEGF/VEGFR 在缺血再灌注损伤中神经保护作用分析[J].中国实用医药,2015,10(33):285-286
[6]张会玲,李世英,李峥,等.缺血预适应对局灶性脑缺血再灌注大鼠皮质区低氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子表达的影响[J].医学研究生学报,2015,28(7):701-705
[7]张海涛,张平,蒋传路,等.血管内皮生长因子在脑缺血再灌注损伤中的作用研究进展[J].疑难病杂志,2015,14(7):756-758
[8]方晓艳,王琳琳,张帆,等.脑缺血预处理对脑缺血再灌注大鼠的保护作用及对神经营养因子表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(18):112-117
[9]常坤鹏,丁小灵.缺血性脑卒中新生血管相关因子的研究[J].脑与神经疾病杂志,2015,23(4):312-316

(收稿日期: 2020-01-06)