

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00450

雌二醇对脑缺血大鼠海马血管内皮生长因子表达的影响

Influence of estradiol on expression of vascular endothelial growth factor in hippocampus of rats after cerebral ischemia/reperfusion

李 宾,黄承光*,卢亦成

第二军医大学长征医院神经外科,上海 200003

[摘要] **目的:**探讨雌二醇对脑梗死/再灌注损伤大鼠海马区血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。**方法:**雌性成年大鼠,双侧卵巢切除后随机分为3组。雌二醇治疗组给予苯甲酸雌二醇 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹腹腔注射,连续7 d;模型组、假手术组腹腔注射等量麻油。模型组和雌二醇治疗组分别建立大脑中动脉梗死(MACO)模型,缺血2 h后再灌注48 h。Western 印迹技术和 RT-PCR 技术分别检测 VEGF 蛋白及基因表达。**结果:**大脑梗死/再灌注损伤后 VEGF 蛋白、基因表达均增加,雌二醇治疗组 VEGF 表达高于模型组(P<0.05)。**结论:**雌二醇增加脑梗死/再灌注损伤大鼠海马 VEGF 的表达。

[关键词] 雌二醇;血管内皮生长因子;脑梗死;再灌注损伤;海马

[中图分类号] R 743.31 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)04-0450-03

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在血管发生和形成过程中起着主要的调控作用。缺氧、缺血以及某些激素、细胞因子和药物等因素均可以使 VEGF 的表达上调。研究发现,雌激素可使许多肿瘤内的 VEGF 表达增加。但雌激素对梗死脑组织 VEGF 的表达的影响尚不明确。本研究旨在通过检测梗死海马区 VEGF 的表达了解雌激素对梗死脑组织 VEGF 的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组、给药 健康成年雌性 SD 大鼠 30 只(第二军医大学实验动物中心,体质量 250~350 g)。随机均分为 3 组:雌二醇治疗组、模型组、假手术组。双侧卵巢切除 7 d 后,雌二醇治疗组给予苯甲酸雌二醇 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹腹腔注射(上海通用药厂),连续 7 d。模型组、假手术组给予同等剂量麻油(安慰剂)。

1.2 模型建立 雌二醇治疗组、模型组采用改良线栓法^[1]建立大脑中动脉梗死(MCAO)模型。2.5%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔麻醉,将头端涂有硅胶的 4-0 单股手术尼龙线自颈外动脉经颈内动脉插入一侧大脑中动脉,待大鼠清醒后 2 h 内观察大鼠肢体运动。利用改良 Bederson 检查法作神经行为评估:0 级,无神经功能缺损;1 级,提尾时损失对侧前肢屈曲;2 级,在 1 级基础上,还有瘫痪侧肌张力下降;3 级,在 2 级基础上,出现活动时向瘫痪侧打转现象;4 级,在 3 级基础上,出现意识障碍。评分为 2 级以上视作建模成功。缺血 2 h 后,撤出尼龙线,结扎颈外动脉,实现再灌注。假手术组仅结扎颈外动脉,不做颈内动脉插线栓塞处理。再灌注 48 h 后断头处死大鼠,3 min 内取大脑,将梗死侧脑组织自额极至

枕级由前至后均分为 A、B、C、D 4 份,取缺血再灌注损伤较严重的 B、C 部分脑组织用作本次实验。B 部分脑组织在 0.1%的 DEPC 水中稍作漂洗,立即放入细胞冻存管中,液氮中保存备用;C 部分脑组织用 0℃生理盐水冲洗,用于 Western 印迹法分析。

1.3 Western 印迹法分析 VEGF 蛋白 提取大鼠海马区脑组织蛋白,进行 Western 印迹分析(VEGF 多克隆抗体购自武汉博士德公司),以 β-actin 作内参。显色后拍照保存,生物图像扫描分析系统(复日科技 FR-980)测定 VEGF 和 β-actin 电泳条带灰度值,以二者之比作为 VEGF 蛋白表达量,灰度越低,表示表达越高。

1.4 RT-PCR 检测 VEGF mRNA 表达量 参考 GenBank 核苷酸序列资料设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。VEGF 上游 5'-CAA TGA TGA AGC CCT GGA GT-3',下游 5'-TTT TTG CTT TCG CGT TCT TT-3',产物大小为 538 bp;β-actin 上游 5'-TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA-5',下游 5'-GAA GTG GTG GTG TCG ACT CT-3',产物大小为 249 bp。采用 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)抽提总 RNA,严格按照逆转录试剂盒(TaKaRa 公司)说明书操作合成 cDNA。PCR 反应体系经过 35 个循环,72℃延伸 5 min 得到扩增产物。取 10 μg 产物 2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,显示电泳条带。利用生物图像扫描分析系统分析 VEGF 扩增产物和 β-actin 的光密度值,以二者之比作为 mRNA 表达水平,光密度越高,表示表达越高。

1.5 统计学处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 软件,用单因素方差分析,组间两两比较用最小显著差异法 LSD-t 检验。P<0.05 视为有统计学差异。

[收稿日期] 2007-10-21 **[接受日期]** 2008-02-26

[作者简介] 李 宾,硕士,医师. E-mail: libinmed@gmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-63610109-73370, E-mail: huangchengguang@gmail.com

2 结果

2.1 VEGF 蛋白表达 3组均检测到1条45 000电泳带(图1),假手术组、模型组和雌二醇治疗组 VEGF/ β -actin 灰度值比分别为 49.243 ± 7.765 、 107.294 ± 11.246 、 144.256 ± 14.256 ($n=10$)。雌二醇治疗组和模型组 VEGF/ β -actin 灰度值比均较假手术组减少 ($P<0.05$), 相比模型组, 雌二醇治疗组 VEGF/ β -actin 灰度值比减少差异显著 ($P<0.01$)。说明雌二醇能上调 VEGF 蛋白的表达。

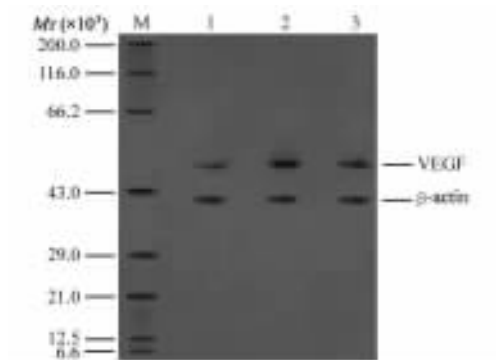


图1 Western 印迹法测 VEGF 蛋白表达

M: Marker; 1: 假手术组; 2: 雌二醇治疗组; 3: 模型组

2.2 VEGF 基因表达 电泳显示各组 VEGF 均为一条特异性扩增产带(图2), 雌二醇治疗组、模型组和假手术组 VEGF mRNA/ β -actin 光密度值比分别为 74.761 ± 8.487 、 57.504 ± 4.487 、 41.885 ± 3.516 ($n=10$)。与假手术组相比, 雌二醇治疗组和模型组 VEGF 基因表达均增高 ($P<0.01$), 雌二醇治疗组 VEGF 基因表达明显高于模型组 ($P<0.05$)。

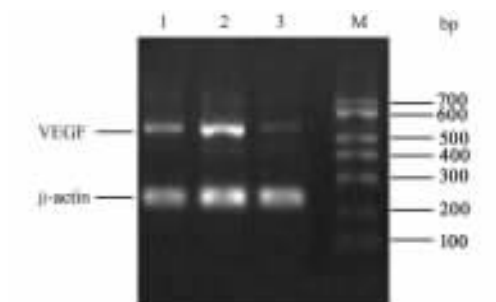


图2 2%琼脂糖凝胶电泳检测 VEGF mRNA 表达

1: 模型组; 2: 雌二醇治疗组; 3: 假手术组; M: Marker

3 讨论

雌激素作为重要的脑保护因子,能够调节血管内皮细胞的增生、迁移和存活^[2]。VEGF 是介导和调节微血管增生的特异性血管内皮因子,成人脑组织中仅脉络丛、小脑颗粒细胞等少数组织有极低水平的 VEGF/VEGFR 表达^[3]。当出现缺氧以及激素改变等变化时使 VEGF 及其受体表达上调,发挥血管调节及脑保护作用^[4]。研究表明,在局灶性脑缺血/再灌注早期即有 VEGF 的阳性表达,随再灌注时间延长,表达逐渐增强,于脑缺血再灌注 48 h 表达最强^[5]。本研究

显示雌二醇可以增加梗死/再灌注脑组织内 VEGF 蛋白和基因的表达。与雌二醇在某些性腺相关性肿瘤如垂体腺瘤、乳腺癌等肿瘤中上调 VEGF 表达的结果类似^[6-7]。雌二醇如何上调 VEGF 的表达,其机制仍不清楚,可以明确这是多因素作用的结果。雌二醇受体可与生长因子信号通路中的酪氨酸激酶受体的上皮生长因子家族成员相互作用,通过升高细胞内的 cAMP 水平激活 cAMP 依赖性蛋白激酶 A(PKA)而启动 VEGF 基因的转录^[8]。VEGF 还可通过 PI3K/Akt 通路调节缺血损伤后的神经保护和血脑屏障的通透性,从而发挥神经保护的作用^[9]。在本实验中我们发现,雌二醇使 VEGF 表达升高,说明雌二醇可能通过调节 VEGF 的表达来实现脑保护作用。大多数研究显示 VEGF 表达增加后能够促进缺血损伤区血管增生、改善局部循环、促进损伤血管修复,从而起到缺血脑保护作用。但 VEGF 增加也可能增加血管的通透性,使炎性介质释放增加、细胞外液增加,加重脑梗死后的继发损伤。有学者给脑损伤小鼠注射抗 VEGF 单克隆抗体后发现其脑组织内的间质液体压力即脑组织水肿有所减轻^[10]。因此,VEGF 在脑缺血、再灌注损伤中的真正作用仍值得我们进一步研究。雌激素和 VEGF 的临床应用目前还有许多争论。由于雌激素是人体自然分泌、不存在排斥反应,且已被证明对预防心、脑梗死是有效的,故有人建议将其用作心、脑疾病的预防用药。但目前雌激素替代治疗心、脑缺血性疾病仍有许多问题需要解决,而且长期使用雌激素可增加妇女性腺相关性肿瘤如乳腺癌、子宫内膜癌等肿瘤的发生率,抑制男性睾丸功能等,这些均限制了雌激素的应用。目前有许多 VEGF 的基因产物已被用于实验治疗缺血性疾病,取得了一定的效果,但由于其作用及其机制还未完全清楚,尚未应用于临床中。

【参考文献】

- [1] 胡国汉,卢亦成,朱 诚,张光霁. 血管内尼龙线栓塞大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型的改进[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2003, 8: 557-559.
- [2] Razandi M, Pedram A, Levin E R. Estrogen signals to the preservation of endothelial cell form and function[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 38540-38546.
- [3] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280: 1358-1366.
- [4] Wang Y, Jin K, Mao X O, Xie L, Banwait S, Marti H H, et al. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration[J]. J Neurosci Res, 2007, 85: 740-747.
- [5] Widenfalk J, Lipson A, Jubran M, Hofstetter C, Ebendal T, Cao Y, et al. Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury[J]. Neuroscience, 2003, 120: 951-960.
- [6] Banerjee S N, Sengupta K, Banerjee S, Saxena N K, Banerjee S K. 2-Methoxyestradiol exhibits a biphasic effect on VEGF-A in tumor cells and upregulation is mediated through ER-alpha; a possible signaling pathway associated with the impact of 2-ME2

- on proliferative cells[J]. *Neoplasia*, 2003, 5:417-426.
- [7] Buteau-Lozano H, Ancelin M, Lardeux B, Milanini J, Perrot-Applanat M. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta [J]. *Cancer Res*, 2002, 62:4977-4984.
- [8] Hamada H, Kim M K, Iwakura A, Ii M, Thorne T, Qin G, et al. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2006, 114:2261-2270.
- [9] Kilic E, Kilic U, Wang Y, Bassetti C L, Marti H H, Hermann D M. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia[J]. *FASEB J*, 2006, 20:1185-1187.
- [10] Lee C G, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, et al. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions[J]. *Cancer Res*, 2000, 60:5565-5570.

[本文编辑] 孙岩