

# 探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围 Flk-1、VEGF 表达的影响

马向阳<sup>1</sup> 贾子善<sup>2,3</sup> 槐雅萍<sup>2</sup> 高俊淑<sup>2</sup> 李 阔<sup>2</sup>

**摘要 目的:**研究探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围 Flk-1、VEGF 表达的影响。**方法:**采用开颅电凝法制作 SD 大鼠右侧大脑中动脉缺血(MCAO)模型,术后 24h 大鼠随机分为标准环境组(造模对照组,SE 组)、探索学习环境(LE)组,以免疫组织化学法检测血管内皮生长因子 VEGF 及血管内皮生长因子受体 Flk-1 的表达。**结果:**大鼠大脑中动脉栓塞后,梗死区神经元变性、坏死,VEGF 和 Flk-1 在梗死周边区表达明显增加,经探索学习环境干预后,VEGF 和 Flk-1 表达大量增加。**结论:**LE 可促使 VEGF 和 Flk-1 表达上调,进而促进微血管新生,利于脑损伤修复。

**关键词** 探索学习环境;脑梗死;血管内皮生长因子;血管内皮生长因子受体

中图分类号:R743 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)-03-0219-03

**Influence of learning on VEGF and Flk-1 expressions in the boundary zone of cerebral infarction region of rats after unilateral local cerebral infarction/MA** Xiangyang, JIA Zishan, HUAI Yaping, et al.//*Chinese Journal of Rehabilitation Medicine*, 2009, 24(3): 219—221

**Abstract: Objective:** To observe the influence of learning on vascular endothelial growth factor (VEGF) and Fms-like tyrosine-1 (Flk-1) expressions in the boundary zone of cerebral infarction region of rats after unilateral local cerebral infarction. **Method:** After the models of right middle cerebral artery occlusion (MCAO) were established with electric coagulation, the models of SD rats were randomly divided into learning environment stimulation group (LE) and control group (standard environment stimulation group, SE). The expressions of VEGF and Flk-1 in the boundary zone of cerebral infarction region were measured at the 1<sup>st</sup> d, 3<sup>rd</sup> d, 7<sup>th</sup> d, 14<sup>th</sup> d and 28<sup>th</sup> d after operation. **Result:** After MCAO operation, degeneration and necrosis of neurons in the infarction region were found both in LE group and SE group. The expression of VEGF and Flk-1 around the infarct regions in LE group were significantly higher than those in SE group at all time points. **Conclusion:** Learning environment stimulation can promote the upregulation of expressions of VEGF and Flk-1, and accelerate the microvessel proliferation and brain injury recovery in rats after unilateral local cerebral infarction.

**Author's address** Cangzhou Medical College, Cangzhou, 061001

**Key words** learning environment; cerebral ischemia; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptor

探索学习环境由社会交往、探索学习和体力活动等成分构成,对成年脑损伤动物的研究已证实,探索学习环境能减轻脑损伤,改善脑功能,促进脑损伤修复<sup>[1-3]</sup>。为进一步研究探索学习环境对脑损伤修复的作用机制,我们应用免疫组化技术、图像分析技术,探讨探索学习对大鼠脑梗死灶周围血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, Fms-like tyrosine-1, Flk-1)表达的影响,为临床应用探索学习环境(learning environment, LE)于脑卒中康复提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及实验设备

清洁级雄性 SD 大鼠, 3—4 月龄, 体重 230—260g, 购自河南医科大学实验动物学部。一抗 VEGF

及 Flk-1(1:200), 购于 Santa Cruze 公司, SP9002 试剂盒及 DAB 显色剂购于北京; 双极电凝笔购自上海, Nikon 尼康光镜显微照相机, LEICA RM2125 石蜡切片机。

### 1.2 制备 MCAO 模型及分组

参照文献方法<sup>[4]</sup>, 用 10% 水合氯醛(0.35ml/100g 体重)腹腔内注射麻醉, 以左侧侧卧位固定于手术台, 剃去右侧顶部鼠毛。常规消毒后, 在右眼与右耳之间切开皮肤, 分离颞肌, 暴露颞骨翼板, 术中避免损伤面神经、面部主要动脉、静脉、眼外肌及泪腺和颞弓。在手术显微镜下, 用牙钻经颞骨翼板钻至硬脑膜, 暴露大脑中动脉后, 用小咬骨钳向下咬去部分

1 河北省沧州医学高等专科学校, 沧州, 061001

2 河北省人民医院康复中心

3 通讯作者

作者简介: 马向阳, 女, 副教授

收稿日期: 2008-08-26

颅骨,暴露大脑中动脉近端,用电凝器凝闭嗅束近端至大脑下静脉之间的一段大脑中动脉,然后依次缝合颞肌及皮肤。腹腔内注射 0.2 万单位青霉素以预防感染。共用大鼠 74 只,有 50 只符合入选条件(苏醒后右眼出现 Horner 征及左侧肢体偏瘫)并存活到规定时间。术后 24h 将大鼠随机分为标准环境(SE)组、探索学习(LE)组各 25 只。

### 1.3 造模后饲养环境

①SE 组:饲养于标准笼(290mm×178mm×160mm),每笼 5 只。②LE 组:饲养于参照文献设计的迷宫笼<sup>[4]</sup>,一笼 20 只。迷宫笼由一个圆笼和一个方笼组成。直径 500mm 圆笼同 640mm×480mm×120mm 方笼中间通过两通道相连(圆笼:中间由丝网分隔,一侧为进食区,一侧为饮水区;方笼:由丝网分隔形成通道宽 80mm×80mm 的迷宫。迷宫由易到难,每周变换 1 次)。

### 1.4 标本的制备

各实验组分别于术后第 1、3、7、14、28 天随机取 5 只处死,剖颅取脑。用 10%水合氯醛腹腔内注射麻醉后固定于手术台,剪开胸腔,暴露心脏,用 9 号针头插入左心室,灌注生理盐水,待右心耳膨起,剪开右心耳让血液流出,至右心耳流出液为无色透明时开始用 4%多聚甲醛灌注固定,先快后慢,每只大鼠约需 200ml,总量在 20—30min 内灌完后,立即剖颅取脑在视交叉处切开后浸于 4%多聚甲醛中再固定 4h。经常规梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,做 7μm 厚连续切片,每隔 100μm 连续取 3 张,相邻切片分为 2 套分别用于 VEGF 和 Flk-1 的免疫组化测定。

### 1.5 VEGF 和 Flk-1 免疫组织化学检测方法

采用免疫组化 SAB 法检测 VEGF 和 Flk-1,操作步骤严格按说明书进行将脑组织切片,裱于经多聚赖氨酸处理的清洁玻片上,60℃烤箱内烘烤 2h 后放于 4℃冰箱内备用。石蜡切片经二甲苯脱蜡(40min×3 次)后依次经过 100%、95%、80%乙醇脱水;3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶 10min,抗原热修复后,滴加一抗,37℃孵育 20min;滴加 DAB 显色剂,显微镜下观察至显色较好时,置于自来水中终止显色,依次经苏木素复染,2%盐酸乙醇分色,蓝化;经 80%、95%、100%乙醇脱水,二甲苯透明,最后封片,贴标签备查。

### 1.6 图像采集

采用 SPSS 7.5 版软件系统图像采集卡、IBM (CP-UP3-500)和 Olympus BX60 显微镜组成的全自动图像分析系统,每张切片于 10×40 放大倍数下,从梗死灶周围随机选 5 个视野,统计出每个视野 VEGF 和 Flk-1 阳性细胞数。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件包对数据进行处理,计量资料用均数±标准差表示,两样本均数比较用 *t* 检验方法,*P*<0.05 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 VEGF 免疫组织化学及图像分析

SE 组、LE 组大鼠缺血边缘区脑组织在 MCAO 术后第 1 天 VEGF 开始表达,第 3 天达高峰,此后开始减少,第 7 天时仍有表达,第 14 天时表达基本恢复正常(见图 1,见彩色插页),其对侧非缺血脑组织自术后亦开始有少量 VEGF 表达,但明显少于病变侧,第 7 天时表达恢复正常。各时间点 VEGF 的表达主要集中在梗死灶周围,梗死灶中心仅见少量 VEGF 表达,表达细胞主要是神经胶质细胞,其次是神经细胞及血管。第 3 天和第 7 天时 LE 组 VEGF 在缺血周边区的表达明显高于 SE 组,差异有显著性(表 1)。

### 2.2 Flk-1 免疫组化及图像分析结果

SE、LE 组大鼠缺血边缘区脑组织在 MCAO 术后第 1 天时 Flk-1 已有表达,第 3 天达高峰,此后开始减少,第 7 天时仍有表达,第 14 天时表达基本恢复正常,其对侧非缺血脑组织自术后亦开始有少量 Flk-1 表达,但明显少于病变侧,第 7 天时表达恢复正常(见图 2,见彩色插页)。各时间点 Flk-1 的表达主要集中在梗死灶周围,其次是海马区,梗死灶中心仅见少量 Flk-1 蛋白表达。表达细胞主要为神经细胞、神经胶质细胞和内皮细胞。第 3 天和第 7 天时 LE 组 Flk-1 在缺血周边区的表达均明显高于 SE 组,差异有显著性意义,见表 2。

## 3 讨论

血管新生是决定缺血性神经元存活的关键因素,与缺血性脑卒中患者的预后关系密切<sup>[5]</sup>,尤其是在梗死灶周围新生血管的数量与中风患者的存活率

表 1 各组大鼠梗死灶周围 VEGF 阳性细胞计数比较

( $\bar{x} \pm s$ , 个)

组别	鼠数	术后第 1 天	术后第 3 天	术后第 7 天	术后第 14 天	术后第 28 天
LE 组	25	11.34±2.56	61.04±5.47	32.18±12.21	13.8±4.92	2.01±1.58
SE 组	25	4.78±1.77	40.01±6.02	20.51±6.17	6.58±3.06	1.18±1.35

各时间点 LE 组与 SE 组比较均 *P*<0.05

表2 各组大鼠梗死灶周围 Flk-1 阳性细胞计数比较

( $\bar{x} \pm s$ , 个)

组别	鼠数	缺血第1天	缺血第3天	缺血第7天	缺血第14天	缺血第28天
LE组	25	48.40±6.53	68.76±10.16	68.66±7.16	48.96±3.19	46.16±7.10
SE组	25	34.36±7.05	51.70±10.66	43.93±6.15	30.16±5.64	29.90±7.76

各时间点 LE 组与 SE 组比较, 均  $P < 0.05$ 

直接相关<sup>[6-7]</sup>。血管再生是一个极其复杂的过程, 涉及内皮细胞分裂、血管基底膜及细胞外基质的降解和内皮细胞迁移等; 而内皮细胞增殖有赖于 VEGF 的刺激<sup>[8-9]</sup>。VEGF 是目前发现的最强的刺激血管生成的因子之一。Harrigan 等<sup>[10]</sup>发现 VEGF 的促血管生成效应呈剂量依赖性, 以 5—25 $\mu\text{g/ml}$  的浓度注入侧脑室, 均能显著诱导血管新生。Marti 等<sup>[11]</sup>的研究进一步表明, 在大脑中动脉闭塞后, VEGF/VEGFR 系统可以诱导大脑缺血后新血管的形成, 新形成的侧枝血管可改善缺血区周围的组织灌流, 其增生的范围和程度直接关系到梗死灶周围血流的改善, 影响神经元生理功能的恢复<sup>[12]</sup>。此外, 血管生成还可以通过改善神经干细胞成体生发区的血管微环境促进神经干细胞增殖<sup>[13]</sup>, 从而进一步促进脑梗死神经功能的恢复。

VEGF 通过与其受体结合而发挥生物学作用。目前较肯定的 VEGF 家族受体共有 Flt-1 (Fms-like tyrosine-1, VEGF-1), Flk-1 (VEGF-2), Flt-4 (VEGF-3), 神经纤维网蛋白-1 (np-1), 神经纤维网蛋白-2 (np-2) 等<sup>[14-15]</sup>。在促进新生血管生成的过程中, 不同的受体具有各自特异的生物学特性。目前, 在脑梗死中研究最多的是 Flt-1 和 Flk-1<sup>[16]</sup>, 且认为 Flk-1 在脑梗死后 VEGF 促进血管生成中起主要作用, 故本实验选用 Flk-1 为 VEGF 受体的代表进行研究。

本实验结果显示, LE 组 VEGF 及 Flk-1 从第 1 天开始较 SE 组明显增加 ( $P < 0.05$ ), 至第 3 天达高峰, 随后 VEGF 表达开始回落, 但至第 7 天时仍明显较 SE 组多; 而 Flt-1 表达持续至第 7 天后逐渐回落, 到第 28 天时 VEGF 及 Flk-1 的表达仍较 SE 组明显增强 ( $P < 0.05$ ), 二者的变化规律大致相同, 说明脑梗死缺血缺氧可以诱使 VEGF 及 Flk-1 表达, 探索学习环境干预可促进两者的表达。以往结果显示<sup>[17]</sup>, LE 干预后大鼠学习记忆能力得到显著改善, 几乎恢复到正常水平, 探索学习组术后第 14 天和第 28 天时梗死灶周围微血管计数又明显多于相应时间的标准环境组, 微血管明显增多的时间较 VEGF 及 Flk-1 的表达晚, 说明探索学习环境可能先通过提高 VEGF 及 Flk-1 的表达, 继而依靠两者的相互作用增加血管生成, 从而促使脑梗死后大鼠神经功能的恢复。在血管形成明显增多之前, 增多的 VEGF 可能通过和其受体的结合对神经系统起着直接的保

护作用, 从而延长细胞的存活时间, 直到新血管形成, 这有利于脑梗死后神经功能的恢复。

大鼠局灶性脑梗死后在梗死灶周围 VEGF 及 Flk-1 的表达对改善梗死周边区的微循环、促进功能恢复具有重要意义, 而探索学习环境对这一过程有明显的促进作用, 这可能是探索学习环境促进脑梗死缺血后功能恢复的一个重要机制。

### 参考文献

- [1] 李晓恒, 刘能保, 张敏海, 等. 慢性复合应激性学习记忆增强大鼠海马神经细胞增殖和突触后酪氨酸激酶表达的变化[J]. 解剖学报, 2005, 36(6):591—596.
- [2] O' Malley A, O' Connell C, Murphy KJ, et al. Transient spine density increases in the mid-molecular layer of hippocampal dentate gyrus accompany consolidation of a spatial learning task in the rodent[J]. Neuroscience, 2000, 99(2):229.
- [3] 高俊淑, 李阔, 李娜, 等. 探索学习对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围皮质 BDNF 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, (7):584—586.
- [4] 贾子善, 李阔, 槐雅萍, 等. 不同环境干预对局灶性脑梗死大鼠行为学恢复的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(7):578—580.
- [5] Ding YH, Li J, Zhou Y. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise[J]. Curr Neurovasc Res, 2006, 3(1):15—23.
- [6] Hai J, Li ST, Lin Q, et al. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain [J]. Neurosurgery, 2003, 53(4):963—970.
- [7] Bellomo M, Adamo EB, Deodato B, et al. Enhancement of expression of vascular endothelial growth factor after adeno-associated virus gene transfer is associated with improvement of brain ischemia injury in the gerbil [J]. Pharmacol Res, 2003, 48(3):309—317.
- [8] 姚瑞芹, 李林. 血管内皮细胞生长因子在缺血性脑损伤中血管新生、神经发生和神经保护的作用 [J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(3):208—211.
- [9] Mu D, Jiang X, Sheldon RA, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model [J]. Neurobiol Dis, 2003, 14(3):524—534.
- [10] Harrigan MR, Ennis SR, Masada T, et al. Intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor promotes cerebral angiogenesis with minimal brain edema [J]. Neurosurgery, 2002, 50(3):589—598.
- [11] 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: 965—976.
- [12] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain[J]. J Clin Invest, 2000, 106:829—838.
- [13] Palmer TD, Whlihoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis[J]. J Comp Neurol, 2000, 425:479—494.
- [14] 李海燕, 张祥建. 血管内皮生长因子与中枢神经系统疾病[J]. 国外医学·血管疾病分册 2004, 12(7):527—531.
- [15] 胡湘蜀. 缺血性中风后的新血管形成 [J]. 生物医学工程学杂志, 2004, 21(3):516—519.
- [16] 李迎春(综述), 王华(审校). 血管内皮生长因子受体与缺氧缺血性脑损伤[J]. 国外医学·儿科学分册 2005, 32(4):210—213.
- [17] 马向阳, 贾子善, 槐雅萍, 等. 探索学习对局灶性脑梗死大鼠学习记忆和新生血管的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(12): 1086—1088.