

电针对脑出血大鼠血管内皮生长因子受体表达的影响

吴秀清 周华军

(三峡大学 第一临床医学院[宜昌市中心人民医院] 神经内科 & 三峡大学 神经病学研究所, 湖北 宜昌 443003)

摘要:目的:通过观察针刺足三里对脑出血后大鼠脑内血管内皮生长因子受体(VEGFR)-1 和-2 表达的影响,以进一步探讨针刺足三里治疗脑出血的可能作用机理。**方法:**72 只 SD 大鼠随机分为 3 组:脑出血组、针刺组和假针刺组,每组 24 只,Ⅶ型胶原酶 0.5U 通过立体定向注入脑内苍白球复制脑出血模型。针刺组针刺大鼠双侧足三里,假针刺组针刺大鼠双侧非经非穴处皮肤。采用免疫组织化学方法检测 VEGFR-1 和-2 在脑出血组 3、7、14 d 表达空间位置变化;运用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测 VEGFR-1 和-2 mRNA 在 3、7、14 d 的表达水平。**结果:**脑出血后 3 d 时损伤区周围可检测到 VEGFR-1 和-2 阳性微血管段,7 d 时阳性微血管段增多并伸入血肿区,至 14 d 时血肿区即出现阳性微血管段。脑出血后 VEGFR-1 和-2 mRNA 表达丰度逐渐增加,且持续至 14 d ($P<0.05$)。针刺组 VEGFR-1 和-2 mRNA 表达水平较同时点脑出血组明显增高($P<0.05$),而假针刺组与脑出血组比较差异无统计学意义。**结论:**针刺足三里通过上调 VEGFR-1 和-2 在脑出血大鼠脑内的表达水平参与脑出血损伤区的血管新生过程,从而实现损伤组织的修复。

关键词:脑出血; 血管新生; 血管内皮生长因子受体; 电针; 足三里

中图分类号:R743.34

文献标识码:A

Effect of Electroacupuncture on Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor in Rat Brains Following Intracerebral Hemorrhage

Wu Xiuqing Zhou Huajun

(Department of Neurology, Yichang Central People's Hospital, The First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University & Institute of Neurology, China Three Gorges University, Yichang 443003, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of electroacupuncture (EA) at Zusanli on expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-1 and -2 in intracerebral hemorrhagic (ICH) rat brains. **Methods:** Collagenase type Ⅶ was injected into right globus pallidus to induce ICH model. Seventy two Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups, including ICH-no EA group, ICH-EA at Zusanli acupoint and ICH-EA at non-acupoint group. EA was applied to bilateral Zusanli (ST36) acupoint in the ICH-EA at Zusanli acupoint group or skin without acupoint in the ICH-EA at non-acupoint group. The expression of VEGFR-1 and -2 were assayed by immunohistochemistry at day 3, 7, 14 after the onset. The mRNA expression of VEGFR-1 and -2 were evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) at day 3, 7, 14 after ICH. **Results:** The positive vessels of VEGFR-1 and -2 were observed at the edge of clot at day 3, and then the positive vessels gradually penetrated into hemotoma at day 7 and found in the hematoma area at day 14 after ICH. The expression of VEGFR-1 and -2 mRNA in ICH model group were increased gradual-

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(No: 81202625); 湖北省自然科学基金项目(No: 2017CFB468)

作者简介:吴秀清,女,主管护师,研究方向为脑血管病。E-mail: 3491221854@qq.com

通讯作者:周华军,男,博士,主治医师,主要从事脑血管疾病的临床与基础研究。E-mail: zhouhuajun02@126.com

ly, and peaked at day 14 ($P < 0.05$). EA at the Zusanli acupoint could up-regulate the expression of VEGFR-1 and -2 at mRNA level. However, EA at the non-acupoint had little effect on the expression of VEGFR-1 and -2. **Conclusion:** These findings suggest that EA at the Zusanli acupoint can accelerate ICH-induced angiogenesis and up-regulate VEGFR-1 and -2 mRNA levels in rats, which may enhance the recovery following hemorrhagic cerebral injury.

Keywords intracerebral hemorrhage; angiogenesis; vascular endothelial growth factor receptor; electroacupuncture; zusanli

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是一种危重的脑卒中亚型。在全球范围内脑出血具有很高的发病率、致死率和致残率^[1]。目前针灸治疗已经被广泛应用于临床治疗脑出血后的神经功能缺损。临床观察显示,针刺足三里具有促进中风患者神经功能恢复之功效^[2]。基础研究也证明,针刺足三里能抑制脑出血后神经细胞凋亡,促进神经功能恢复^[3,4]。

血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)-1 和-2 是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)特异性受体, VEGF 通过与 VEGFR-1 和-2 的结合,启动微血管新生中的初始过程,并最终形成成熟的血管结构^[5]。研究显示:脑出血后 VEGF 及其受体 VEGFR-1 和-2 表达明显上调^[6],且针刺足三里能通过上调 VEGF 的表达而促进脑出血后的血管新生过程^[7]。为进一步研究针刺足三里对促进脑出血后血管新生的作用机制,本实验选用针刺足三里干预大鼠脑出血模型,观察针刺足三里对脑出血脑内 VEGFR-1 和-2 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 72 只,3 月龄,体重 180~220 g,购于中南大学实验动物学部[许可证号:SDXK(湘)2006-0002]。饲养于中南大学实验动物学部,动物自由进食进水。动物房 7:00-19:00 光暗交替,相对湿度 55%,温度 22℃。动物适应环境 1 周后开始实验。将大鼠随机分为脑出血组、针刺组和假针刺组,每组 24 只。

1.2 试剂

Ⅶ型胶原酶(Sigma 公司),Trizol(MRC 公司),逆转录试剂盒,Taq DNA 聚合酶,dNTPmix(均为美国 Fermentas 公司),小鼠抗大鼠 VEGFR-1、VEGFR-2 单克隆抗体(Santa Cruz 公司),ABC 试剂盒(Vector 公司)。

1.3 主要仪器

Stoelting TL-2 鼠脑定位仪(美国),TC-512 型 PCR 仪(英国 Techne 公司),荧光定量 PCR 仪(德国 Roche Diagnostics),罗氏毛细硅管(德国 Roche),低温高速离心机(美国 Sigma 公司)。

1.4 脑出血动物复制

以 10% 水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,麻醉后将大鼠取俯卧位并固定于鼠脑立体定位仪,按无菌操作原则,将 0.5U Ⅶ型胶原酶立体定向注入苍白球(定位前囟后 1.4 mm,旁开 3.2 mm,深 5.6 mm)^[8]。

1.5 针刺干预

参照实验动物穴位图谱(由中国针灸学会实验针灸委员会制定),选取双侧“足三里”为针刺穴位(定位于大鼠后肢膝关节下方腓骨小头内侧 5 mm),使用华佗牌针具(0.3 mm×25 mm),平刺 5~7 mm,应用 G6805-2 型电针仪(上海医疗器械高技术公司),电流强度 2 mA,以局部皮肤肌肉轻微颤抖为度,每次电针时间为 20 min,1 次/d,疏~密波,频率 2~15 Hz。假针刺组以同样的方法针刺双侧非经非穴处皮肤(足三里外侧旁开 5 mm)。

1.6 免疫组织化学(ABC 法)检测 VEGFR-1 和-2 的时空分布

术后 3、7、14 d 随机抽取大鼠 3 只,10% 水合氯醛(400mg/kg)腹腔注射麻醉,打开胸腔,暴露心脏,经升主动脉先以恒温 37℃ 生理盐水冲洗,再以 4℃ 的多聚甲醛(0.1mol/L PBS 配制, pH 7.4)灌注(10 mL/min)固定后分离取脑,随后脑组织置于 4℃ 的多聚甲醛中后固定 4 h 后,依次置于梯度蔗糖溶液(10%, 20%, 30%, 0.1 mol/L PBS 配制, pH 7.4)至沉底以脱水。采用 Leica1850 冰冻切片机行连续冠状切片,厚度 30 μ m, 4℃ 冰箱保存备用。采用 SABC 法进行 VEGFR-1 和或 VEGFR-2 染色,1% BSA 代替一抗作阴性对照。冰冻切片于 37℃ 复温后,采用 0.01% 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,随后用 3% H_2O_2 阻断内源性的过氧化酶。PBS 漂洗后,以 5% 小牛血清白蛋白封闭 1 h,加入一抗(小鼠抗大鼠 VEGFR-1 或 VEGFR-2 单克隆抗体,浓度均为 1:200)37℃ 孵

育 1 h,4℃ 冰箱过夜。滴加生物素标记山羊抗小鼠 IgG(1 : 100)和 ABC 复合物(1 : 100)37℃ 孵育各 1 h,DAB 显色。

1.7 荧光定量 RT-PCR 组织处理方法

各组分别于术后 3、7、14 d 处死动物,分离出以苍白球(血肿)为中心的脑髓质约 100 mg 并置于冻存管,浸入液氮后,-80℃ 保存备用。

1.8 荧光定量 RT-PCR 方法检测 VEGFR-1 和-2 mRNA 表达

1.8.1 引物序列

引物由上海英骏生物工程公司合成纯化,具体的引物序列如下: VEGFR-1: F: 5'-TACCCGCAACG-GAGAA-3', R: 5'-GGCTTGGAAGGGACGA-3'; VEGFR-2: F: 5'-AACGCTTGCCTTATGAT-3', R: 5'-AAGTCGCTGTCTTGTCG-3'; β -actin: F: 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTATGA-3', R: 5'-CATCGGAACCGCTCATTGCCGATAG-3'。

1.8.2 提取总 RNA

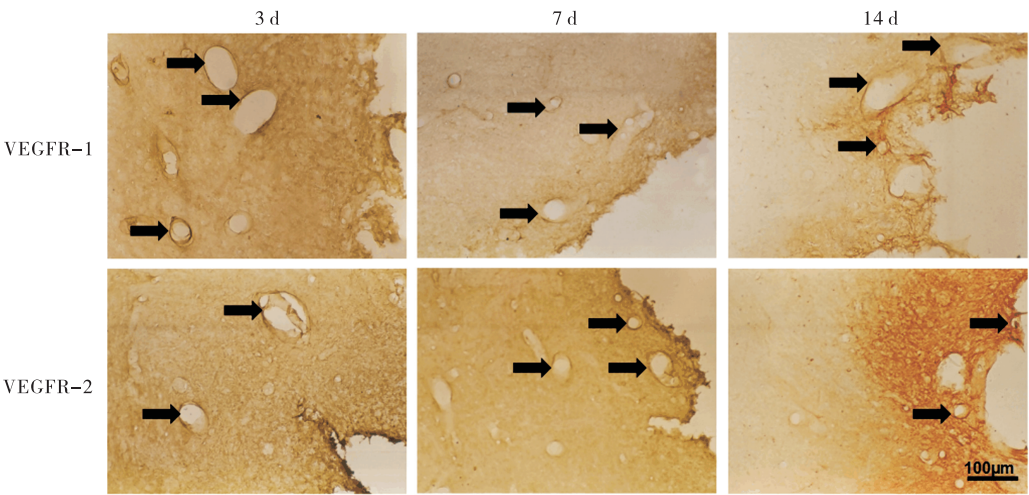
采用 Trizol 方法提取总 RNA,紫外分光光度计检测总 RNA 纯度。按逆转录试剂盒说明书操作,在逆转录酶的作用下,将总 RNA 逆转录为 cDNA,以 β -actin 为内参行 PCR 扩增。扩增条件:95℃ 预变性 3 min,95℃ 5 s,60℃ 34 s,76℃ 5 min,共 40 个循环,生成 VEGFR-1 和-2 的溶解曲线和扩增曲线。根据扩增曲线,对 cDNA 的含量进行定量分析, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计分析数据^[9]。

1.9 统计学方法

所有数据采用 SPSS 12.0 软件包进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用方差分析(ANOVA)。方差齐时,采用 LSD 检验;方差不齐时,采用 Dunnett's T3 检验,检验水准 α 为 0.05。

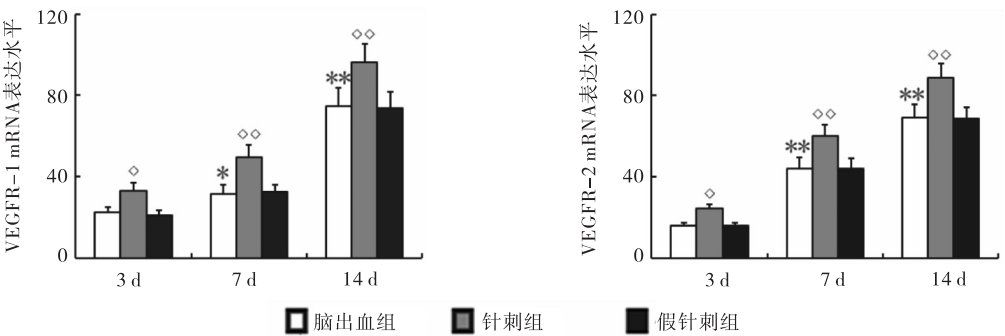
2 结果

2.1 VEGFR-1 和-2 在脑出血组不同时间点的表达位置变化



注:脑出血后 3 d 在血肿周围可检测到 VEGFR-1 和-2 的阳性微血管段,7 d 后 VEGFR-1 和-2 阳性微血管段逐渐伸入血肿区,且开始出现分枝,至 14 d 血肿区出现阳性血管段(黑色箭头所指为阳性微血管段,比例尺 100 μ m,DAB 染色)

图 1 脑出血后 VEGFR-1 和-2 的表达位置变化



注:脑出血组与前一时间点比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与脑出血组同时间点比较:◇ $P < 0.05$,◇◇ $P < 0.01$

图 2 针刺后 VEGFR-1 和-2 mRNA 表达变化

本实验用免疫组化观察到,脑出血后 3 d 时损伤区周围可检测到 VEGFR-1 和-2 阳性微血管段,7 d 时 VEGFR-1 和-2 阳性微血管段增多,并伸入血肿区,至 14 d 时血肿区即出现阳性微血管段(见图 1)。

2.2 针刺足三里对脑出血后 VEGFR-1 和-2 mRNA 表达的影响

为评价针刺足三里对脑出血大鼠脑内 VEGFR-1 和-2 mRNA 表达的影响,本实验采用荧光定量 PCR 检测其在各组不同时间点的表达变化。结果显示:脑出血后 VEGFR-1 和-2 mRNA 表达丰度逐渐增加,且一直持续到 14 d ($P < 0.05$)。VEGFR-1 和-2 mRNA 在针刺组的表达水平明显高于同时间点二者在脑出血组中的表达 ($P < 0.05$),而同时间点 VEGFR-1 和-2 mRNA 在假针刺组中的表达与脑出血组比较,差异无统计学意义(见图 2)。

3 讨论

VEGFR-1 和-2 是 VEGF 的 2 个特异性酪氨酸激酶受体,主要表达于血管内皮细胞。在血管新生过程中,VEGF 通过与 VEGFR-1 和-2 结合从而促使血管内皮细胞出芽,形成新生血管;VEGFR-1 主要介导细胞骨架重排引起细胞迁移,调控细胞的适度增殖和有组织地组合。而 VEGFR-2 在 VEGFR-1 的协调下发挥主导受体的作用,是决定内皮细胞有丝分裂和增殖的关键因素^[10-12]。

既往研究发现,脑缺血后 VEGFR-1 和-2 表达上调,参与调节脑缺血后血管新生,有利于神经功能恢复^[13]。与脑缺血研究结果相似,本实验结果显示脑出血后 VEGFR-1 和-2 表达逐渐增加,提示 VEGFR-1 和-2 可能通过调节内皮细胞增殖、迁移和重组,从而参与脑出血后血管新生过程的调控。由于 VEGFR-1 和-2 的表达受多种因子的调控,包括缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α)、VEGF 以及炎症因子,如肿瘤坏死因子-1 α (tumor necrosis factor-1 α , TNF-1 α)。HIF-1 α 和 VEGF 可以促进 VEGFR-1 和-2 表达^[14,15],而 TNF-1 α 则抑制 VEGFR-1 和-2 的表达^[16]。研究证实脑出血后 HIF-1 α 、VEGF 和 TNF-1 α 表达明显升高^[3,17-19],脑出血早期 HIF-1 α 、VEGF 和 TNF-1 α 共同参与调节 VEGFR-1 和-2 的表达,而脑出血后期,VEGF 表达逐渐增强,TNF-1 α 的表达逐渐降低,因此本实验中 VEGFR-1 和-2 的表达随着时间延长逐渐升高。

脑出血属于祖国医学“中风”范畴,其病理以风、火、痰、瘀、虚为特征,病机多为本虚标实。足三里为

足阳明胃经之合穴,具有调和气血、健脾和胃、通经活络、扶正培元之功效。临床观察显示,针刺足三里能明显改善脑出血患者的神经功能缺损^[2]。同时动物实验也证实针刺足三里能上调 VEGF 在脑缺血和脑出血大鼠脑内的表达^[7,20]。本实验在采用针刺足三里干预后,VEGFR-1 和-2 的表达较脑出血明显升高,提示针刺足三里可能通过上调 VEGFR-1 和-2 的表达,促进血管内皮细胞出芽和增殖,从而有利于损伤组织功能的修复。究其机制可能与以下两个方面有关:(1)针刺足三里可通过促进 VEGF 的表达而诱导 VEGFR-1 和-2 的表达上调^[7,20];(2)针刺足三里能抑制 TNF- α 的表达,使 VEGFR-1 和-2 受抑制程度降低,从而反馈性的上调 VEGFR-1 和-2 的表达^[21,22]。

综上所述,本实验结果证明针刺足三里能显著上调脑出血 VEGFR-1 和-2 的表达,从而促进了损伤区血管新生过程。

参考文献:

- [1] Liu L, Wang D, Wong K S, et al. Stroke and stroke care in China: huge burden, significant workload, and a national priority[J]. *Stroke*, 2011, 42(12): 3651-3654.
- [2] Ko C N, Lee I W, Cho S Y, et al. Acupuncture for cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: a retrospective case-control study [J]. *J Altern Complement Med*, 2013, 19(5):471-473.
- [3] Cho N H, Lee J D, Cheong B S, et al. Acupuncture suppresses intrastriatal hemorrhage-induced apoptotic neuronal cell death in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 362(2):141-145.
- [4] Yang Y J, Kim Y S, Shin M S, et al. Effects of acupuncture on the intrastriatal hemorrhage-induced caspase3 expression and newly cell birth in rats [J]. *Neurol Res*, 2007, 29 (Suppl 1):S65-71.
- [5] Shibuya M. VEGF-VEGFR signals in health and disease [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2014, 22(1):1-9.
- [6] Tang T, Liu X J, Zhang Z Q, et al. Cerebral angiogenesis after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Brain Res*, 2007, 1175(1):134-142.
- [7] 吴 婧,唐 涛,周华军,等. 电针对脑出血大鼠血管内皮生长因子 mRNA 表达的影响[J]. 2010, 7(19): 1172-1174.
- [8] Rosenberg G A, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats [J]. *Stroke*, 1990, 21(5): 801-807.
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene

- expression data using real-time quantitative pcr and the $2(-\Delta\Delta C_t)$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] Carmeliet P, Collen D. Molecular analysis of blood formation and disease [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(5Pt2):H2091-2104.
- [11] Risau W. Mechanisms of angiogenesis [J]. *Nature*, 1997, 386(6626): 671- 6741.
- [12] Zeng H, Zhao D, Yang S, et al. Heterotrimeric G alpha q/G alpha 11 proteins function upstream of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (KDR) phosphorylation in vascular permeability factor/VEGF signaling[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(23): 20738-20745.
- [13] Greenberg D A, Jin K. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(10): 1753-1761.
- [14] Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, et al. Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(4): R1085-1093.
- [15] Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou Y F, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(22):15554-15563.
- [16] Altorjay I, Vereb Z, Serfozo Z, et al. Anti-TNF-alpha antibody (infliximab) therapy supports the recovery of eNOS and VEGFR2 protein expression in endothelial cells[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2011, 24(2): 323-335.
- [17] Zhou H J, Tang T, Cui H J, et al. Thrombin-triggered angiogenesis in rat brains following experimental intracerebral hemorrhage[J]. *J Neurosurg*, 2012, 117(5): 920-928.
- [18] Prunell G F, Svendgaard N A, Alkass K, et al. Inflammation in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage[J]. *Neurosurgery*, 2005, 56(5): 1082-1092.
- [19] Xi G, Keep R F, Hoff J T. Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage [J]. *Lancet Neurol*, 2006, 5(1):53-63.
- [20] 毛庆菊, 陈邦国. 电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠大脑皮层微血管超微结构及血管内皮生长因子表达的影响[J]. 针刺研究, 2012, 37(6):476-481.
- [21] 陈素辉, 孙 华, 徐 虹, 等. 针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠双侧脑组织白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 2012, 37(6):470-475.
- [22] Xu H, Sun H, Chen S H, et al. Effects of acupuncture at Baihui (DU20) and Zusanli (ST36) on the expression of heat shock protein 70 and tumor necrosis factor α in the peripheral serum of cerebral ischemia-reperfusion-injured rats[J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(5): 369-374.

[收稿日期 2018-04-27]