

· 实验研究 ·

腺病毒介导 VEGF165 基因转移对 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

张珊珊, 郑湘榕, 杨于嘉, 钟乐, 王霞, 谢岷, 余小河

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] 目的 研究腺病毒介导的血管内皮生长因子(VEGF)165 基因转移对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的神经保护作用。方法 采用细菌内同源重组技术构建 Ad-VEGF 腺病毒重组载体。7 日龄 Sprague-Dawley 大鼠随机分成 4 组,假手术组($n=20$)、HIBD 组($n=25$)、病毒缓冲液移植组(Buffer 组, $n=20$)、Ad-VEGF 移植组(Ad-VEGF 组, $n=25$)。使用 Rice 法制成 HIBD 模型,Ad-VEGF 移植组和 Buffer 组在 HIBD 后 3 d 于大鼠左侧感觉运动皮层区分别立体定位注射 2 μ L 重组体腺病毒悬液或病毒缓冲液;移植后 7 d 采用 RT-PCR 法检测鼠脑 VEGF165 mRNA 的表达;采用原位缺口末端标记法(TUNEL 法)检测鼠脑皮质神经元凋亡情况;采用免疫组织化学法分别检测 VEGF 蛋白表达及 CD34 表达计数大脑皮质微血管密度;30 日龄时采用放射型迷宫觅水试验进行行为学测试,35 日龄采用苏木精-伊红染色观察鼠脑组织病理学。结果 Ad-VEGF 组 VEGF165 基因表达较 HIBD 组及 Buffer 组明显增高($P<0.05$);Ad-VEGF 组脑细胞凋亡数目较 HIBD 组及 Buffer 组减少($P<0.05$);Ad-VEGF 组平均大脑皮质微血管数及 VEGF 蛋白表达较 HIBD 组及 Buffer 组明显增多($P<0.05$);Ad-VEGF 组行为学测试成绩较 HIBD 组及 Buffer 组改善($P<0.05$);Ad-VEGF 组鼠脑皮层神经元变性坏死较 HIBD 组及 Buffer 组减轻。结论 腺病毒载体介导的 VEGF165 基因转移可增加新生鼠脑组织 VEGF165 mRNA 及 VEGF 蛋白的表达,减少脑细胞凋亡、增加新生脑血管形成,减轻缺氧缺血性脑损伤,改善远期学习记忆功能。

[中国当代儿科杂志,2008,10(6):737-742]

[关键词] 缺氧缺血性脑损伤;血管内皮生长因子;基因转移;新生大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2008)06-0737-06

Adenovirus-mediated VEGF165 gene transfer has neuroprotective effects in neonatal rats following hypoxic-ischemic brain damage

ZHANG Shan-Shan, ZHENG Xiang-Rong, YANG Yu-Jia, ZHONG Le, WANG Xia, XIE Min, YU Xiao-He. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China (Zheng X-R, Email: zhengxiangrong@sohu.com)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor (Ad-VEGF) 165 gene transfer against hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats. **Methods** Ad-VEGF recombinant adenovirus was constructed by bacterial homologous recombination technology. Seven-day-old Sprague-Dawley rats were randomly assigned to 4 groups: sham-operated ($n=20$), HIBD ($n=25$), buffer-treated ($n=20$), and Ad-VEGF-treated ($n=25$). The HIBD model was prepared by permanent occlusion of left common carotid artery, followed by exposure to 8 % oxygen for 2 hrs. In the Ad-VEGF-treated and the Buffer-treated groups, 2 μ L recombinant adenovirus suspension or buffer was injected into the left sensorimotor cortex of the rat brain 3 days after HIBD. Seven days after transplantation, VEGF165 mRNA expression was detected using RT-PCR. Neuronal apoptosis was detected by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphate nickel end labeling (TUNEL). CD34 and VEGF protein were detected using immunohistochemistry. Microvascular density in the cerebral cortex was measured based on CD34 positive cells. A radial arm maze test was performed from 30 postnatal days to evaluate long-term learning and memory functions. At 35 postnatal days, the rats were sacrificed for cerebral histological examinations by hematoxylin and eosin. **Results** The expression of VEGF165 mRNA increased in the Ad-VEGF-treated group more than in the untreated HIBD and the buffer-treated groups ($P<0.05$). The number of apoptotic neurons was less in the Ad-VEGF-treated group

[收稿日期]2008-06-03;[修回日期]2008-07-22
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30500541)。
[作者简介]张珊珊,女,硕士研究生。主攻方向:小儿脑损伤。
[通讯作者]郑湘榕,女,博士,副教授,中南大学湘雅医院儿科,邮编:410008。

compared with that in the untreated HIBD and the buffer-treated groups ($P < 0.05$). Microvascular density and VEGF positive cells increased in the Ad-VEGF-treated group compared with that in the untreated HIBD and the buffer-treated groups ($P < 0.05$). In the radial arm maze test, the Ad-VEGF-treated group had more improved achievements than the HIBD and the buffer groups ($P < 0.05$). Neuronal degeneration and necrosis were lessened in the Ad-VEGF-treated group compared with the HIBD and the buffer groups. **Conclusions** Ad-VEGF gene transfer can increase the expression of VEGF mRNA and VEGF protein, decrease neuronal apoptosis, and increase angiopoiesis in the brain. This attenuates brain damage and improves long-term learning and memory functions in neonatal rats after HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (6):737-742]

Key words: Hypoxic-ischemic brain damage; Vascular endothelial growth factor; Gene transfer; Neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是围生期新生儿常见的中枢神经系统病变,是导致患儿发生脑瘫、智力障碍的重要原因^[1],尽管当前围产医学得到了长足的发展,但目前对于其治疗仅限于对症支持,尚无特效治疗方法,故本病一直是当今围产医学研究领域的重要课题之一。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种内皮细胞特异的有丝分裂原,直接作用于血管内皮细胞刺激其增殖、迁移,形成新生血管,中枢神经系统血管新生对神经系统的成型及保护具有重要的作用^[2]。此外,VEGF在新血管形成之前对神经组织有直接保护作用,这有助于延长细胞的存活时间,直到新血管形成,减轻神经元损伤^[3]。使用VEGF治疗成年大鼠急性脑梗死取得良好效果^[4],目前尚未见VEGF基因治疗新生鼠脑损伤的报道。为了探索新生儿HIE新的治疗途径,本实验利用新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)模型,观察了腺病毒介导VEGF165基因转移对HIBD时VEGF165 mRNA及蛋白的表达、脑细胞凋亡、脑血管形成及神经行为学的影响,以期探讨腺病毒介导的VEGF基因治疗新生大鼠HIBD的可行性,为脑损伤的治疗研究提供了新的实验方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

健康7日龄Sprague-Dawley(SD)大鼠,由中南大学实验动物中心提供,雌雄不拘,体重在12~15 g之间,随机分为假手术组($n = 20$)、HIBD组($n = 25$)、病毒缓冲液移植组(Buffer组, $n = 20$)、Ad-VEGF移植组(Ad-VEGF组, $n = 25$)。假手术组大鼠行假手术,仅予以分离左颈总动脉,不予结扎和缺氧。移植组大鼠在HIBD后3 d进行移植。

1.2 HIBD模型制作

按照Rice法制成HIBD模型^[5],7日龄SD新生大鼠乙醚吸入麻醉后取仰卧位,颈部正中切口,游

离并结扎左侧颈总动脉,缝合皮肤切口后返回母鼠笼中恢复2 h,而后置于37℃恒温的1 L自制有机玻璃缺氧舱(方底拱顶密闭装置,其一侧的近底部和对应一侧的近顶部各有一1 cm×1 cm小孔分别与氮氧混合气源、测氧仪连接)中,以1~2 L/min的速度输入氧浓度为 $(8 \pm 0.1)\%$ 的氮氧混合气体,底层铺有钠石灰以吸收CO₂及湿气,持续缺氧2 h。实验结束后将大鼠放回鼠笼由母鼠行母乳喂养。进行行为学观察的大鼠于21日龄断奶,断奶后按性别分笼饲养。

1.3 脑内移植

本研究组已构建Ad-VEGF重组体腺病毒。首先构建真核表达载体PcDNA 3.1-VEGF+Pa,以XbaI和KpnI酶切,将目的片段与pShuttle穿梭载体连接,构建成pShuttle-VEGF+Pa载体。将构建好的穿梭载体按照Invitrogen腺病毒载体系统操作说明书进行腺病毒重组载体构建,即用PmeI进行酶切后,将线形化的载体与pAdEasy载体电击共转BJ5183感受态细菌,进行同源重组,以卡那霉素进行阳性克隆筛选,获得重组载体pAdEasy-VEGF+Pa,并用CsCl法纯化病毒。Ad-VEGF移植组与Buffer组于HIBD后3 d进行脑内移植,移植时间与移植部位参照我室既往研究^[6],将大鼠固定于立体定位仪,以左侧感觉运动皮层区(坐标AP: -0.3 mm, ML: -2 mm, DV: -1.5 mm,即前囟后0.3 mm,前囟左2 mm,深1.5 mm)为移植点,使用微量进样器垂直缓慢进针1.5 mm,注入2 μL重组体腺病毒悬液或2 μL病毒缓冲液,时间>5 min,保留针头5 min,逐步拔出,历时5 min,缝合头皮,复温苏醒后回笼饲养。

1.4 VEGF mRNA的检测

移植后7 d进行。①引物的设计与合成:根据GenBank资料设计VEGF和GAPDH的引物,GAPDH作为内参照。GAPDH引物序列(5'-3')上游CCTCTGTCATCTCTCCACA,下游ACGTGCAGCAGGAACACTA;VEGF引物序列(5'-3')上游TGCATTCACATTGTTGTGC,下游AGA CCCTGG TGG ACA

TCTTC。②脑组织总 RNA 的抽提:采用 Trizol 试剂,进行总 RNA 的抽提,使用核酸蛋白分析仪测定 RNA 的浓度和质量,琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性。③逆转录和 PCR 扩增:取 2 μg 总 RNA 样品,采用 Promega RT-PCR 一步法成套试剂盒进行逆转录和 PCR 扩增,PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 25 循环;再 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增结束后取 PCR 产物上样,在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,应用凝胶成像系统对条带进行扫描分析,测定 PCR 产物 VEGF cDNA 条带和 GAPDH 内参照条带的光密度值的比值(D/D_0)作为 VEGF 基因的相对表达量。

1.5 末端脱氧核苷酸介导的 X-DUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 操作方法

采用原位细胞死亡检测试剂盒(天津灏阳公司提供)进行脑细胞凋亡的检测。实验步骤按说明书进行。DAB 显色,水洗,苏木素轻度复染,显微镜下监测显色。被标记的凋亡细胞其细胞核呈棕黄色。以 PBS 代替脱氧核苷酸末端转移酶者为阴性对照。计数方法:选取脑皮质及海马,400 倍光镜下随机计算 5 个视野 500 个细胞中阳性细胞数,结果以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

1.6 大脑皮质微血管密度计数

采用 SP 法进行大脑皮质 CD34 免疫组织化学检查计数大脑皮质微血管密度,主要操作步骤如下:石蜡切片脱蜡入水后 0.3% H_2O_2 室温孵育 15 min 以灭活内源性过氧化物酶;正常牛血清封闭液室温孵育 30 min,甩去多余液体,不洗;滴加适当稀释的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;生物素标记二抗(羊抗兔)37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min;辣根酶标记链霉卵白素 37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min;各步骤间用 0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min $\times$ 3;新鲜配制 DAB (武汉博士德生物有限公司提供)显色;镜下观察控制反应时间,自来水充分冲洗,苏木素轻度复染,自来水冲洗返蓝;常规脱水;透明;中性树胶封片。阴性对照除用 0.01 mol/L PBS 代替一抗外,其余步骤相同。结果判定:CD34 定位于血管内皮细胞浆,呈棕黄色。微血管密度计数按 Weidener 方法进行^[7],凡染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞族作为一个血管计数,每张切片在同一皮层缺血区选择 5 个高倍($\times 400$)视野进行微血管计数,其平均数来表示微血管密度。

1.7 VEGF 免疫组化操作方法

按照 VEGF 免疫组化试剂盒(北京中山金桥生物技术有限公司提供)进行 VEGF 免疫组化操作。高倍镜下随机观察 5 个视野,计数 VEGF 免疫组化

阳性细胞数密度。

1.8 放射型迷宫觅水测试

采用双盲法进行,即行测试者不知道动物的分组。本实验主要用于学习记忆和空间能力的考核,自 30 日龄起检测,参照 Balduini^[8]方法。自制放射形迷宫,中央为一直径为 30 cm 的平台,共有 8 个呈放射性对称分布的臂,臂长 50 cm,宽 12 cm,每臂末端有一小孔。动物在测试前禁水 48 h,仅在每日傍晚单独放置笼中饮水 30 min,然后回笼。开始 2 d 在每个臂的孔内都放 50 μL 水,让动物在迷宫内自由觅水。空间测试时,在 3 个臂内加水,它们相邻的角度分别为 135 $^{\circ}$ 、90 $^{\circ}$ 和 135 $^{\circ}$,每天测试 5 次,每次间隔 1 min,连续测试 3 d。每次测试开始时都将大鼠放在迷宫中央面朝固定的第 3 臂,以 3 个臂的水都被找到为结束,记录以下结果:①找到 3 个臂的水所花的时间;②重复的次数,即进入已经去过的臂的次数;③记忆错误的次数,即进入没有水的臂的次数。

1.9 脑组织病理学苏木精-伊红染色染色

行为学测试结束后,大鼠 35 日龄时进行,在 10% 水合氯醛麻醉下,4% 多聚甲醛灌注并取左脑组织固定后石蜡包埋、切片、脱蜡、透明、苏木精-伊红染色、光镜下观察。

1.10 统计学分析

全部资料应用 SPSS 11.5 版统计软件包进行分析,计量数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

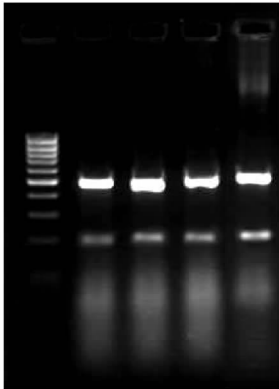
2 结果

2.1 VEGF mRNA 检测结果

测定 PCR 产物 VEGFcDNA 条带和 GAPDH 内参照条带的光密度值的比值(D/D_0)作为 VEGF 基因的相对表达量。假手术组 VEGF 基因的 D/D_0 值为 0.459 ± 0.117 。HIBD 组与 Buffer 组 VEGF 基因的 D/D_0 值分别为 0.885 ± 0.134 、 0.873 ± 0.126 ,HIBD 组与 Buffer 组之间差异无显著性($P > 0.05$),与假手术组比较,均明显增高($P < 0.05$)。Ad-VEGF 组脑组织 VEGF 基因的 D/D_0 值为 1.036 ± 0.063 ,较 HIBD 组与 Buffer 组均明显增高($P < 0.05$),(图 1)。

2.2 TUNEL 检测结果

假手术组脑细胞凋亡数为 5.50 ± 1.41 。HIBD 组与 Buffer 组大鼠病变侧脑凋亡细胞数分别为 264.38 ± 16.29 、 273.75 ± 24.54 ,两组之间差异无显



1 Marker 2 假手术组 3 HIBD 组 4 Buffer 组 5 Ad-VEGF 组

图1 各组大鼠脑组织 VEGF mRNA 表达

著性 ($P > 0.05$), 较假手术组均明显增高 ($P < 0.01$)。Ad-VEGF 组凋亡细胞数为 151.38 ± 21.69 。Ad-VEGF 组较 HIBD 组及 Buffer 组比较, 其凋亡细胞数明显下降 ($P < 0.05$), (图 2)。

2.3 大脑皮质微血管密度计数结果

CD34 表达定位于血管内皮细胞, 染色阳性部位可见芽状或条索状的微血管图。假手术组鼠脑微血管密度为 5.20 ± 0.53 , HIBD 组及 Buffer 组鼠脑 MVD 分别为 10.6 ± 1.40 、 11.1 ± 0.90 , 与假手术组比较, 均明显增加 ($P < 0.05$), HIBD 组与 Buffer 组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。Ad-VEGF 组鼠脑微血管密度为 28.8 ± 1.15 , 分别与 HIBD 组及 Buffer 组比较, 明显增加 ($P < 0.05$), (图 3)。

2.4 大脑皮质 VEGF 免疫组化结果

各组鼠脑皮质 VEGF 免疫组化阳性细胞数密度见表 1, 图 4。HIBD 组及 Buffer 组免疫组化阳性细胞数密度较假手术组明显增强 ($P < 0.05$), Ad-VEGF 组免疫组化阳性细胞数密度较 HIBD 组及 Buffer 组、假手术组明显增强 ($P < 0.05$)。

表1 各组鼠脑皮质 VEGF 免疫组化阳性细胞数

(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	皮层区
假手术组	5	4.88 ± 0.80
HIBD 组	5	24.65 ± 3.41^a
Buffer 组	5	26.47 ± 3.55^a
Ad-VEGF 组	5	68.09 ± 3.37^b

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 分别与 HIBD 组及 Buffer 组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 放射型迷宫觅水测试

各组测试结果见表 2。HIBD 组与 Buffer 组在放射形迷宫中的觅水时间、错误次数、重复次数均

明显高于假手术组 ($P < 0.01$), HIBD 组与 Buffer 组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$), Ad-VEGF 移植治疗后各指标均较 HIBD 组及 Buffer 组明显改善 ($P < 0.05$)。

表2 各组大鼠放射型迷宫觅水试验

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	觅水时间(s)	错误次数	重复次数
假手术组	12	135.56 ± 13.23	8.56 ± 1.09	1.83 ± 0.77
HIBD 组	12	220.89 ± 22.75^a	12.19 ± 1.64^a	3.39 ± 0.74^a
Buffer 组	12	199.67 ± 22.97^a	12.22 ± 2.13^a	3.31 ± 0.70^a
Ad-VEGF 组	12	163.28 ± 15.41^b	10.58 ± 2.03^b	2.53 ± 1.06^b

a: 与假手术组比较, $P < 0.01$; b: 分别与 HIBD 组及 Buffer 组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 脑组织苏木精-伊红染色

假手术组脑组织细胞排列整齐、细胞形态和结构清晰正常。HIBD 组及 Buffer 组缺血半球侧细胞排列紊乱, 有神经元变性、核固缩呈强嗜碱性, 部分神经细胞胞体缩小结构模糊或消失, 呈空隙状或有空腔形成, 有胶质细胞增生, 可见炎性细胞浸润, 另见血管内皮细胞肿胀, 血管周围间隙扩大。Ad-VEGF 组病变侧脑细胞变性坏死减轻, 细胞形态结构较清晰, 偶见核固缩深染 (图 5)。

3 讨论

VEGF 是一类高效的、特异性的可以诱导新生血管形成的内皮细胞有丝分裂原, 具有促进内皮细胞增殖、诱导血管形成, 神经营养及神经再生作用^[9,10]。Sun 等^[11]对大脑中动脉永久性闭塞所致的脑梗塞模型鼠脑注射外源性 VEGF 蛋白治疗大鼠急性脑梗死, 通过免疫组化研究发现, VEGF 治疗组鼠脑新生血管比对照组高出 4 倍, 而脑梗死面积明显缩小, 从而减轻大鼠缺血性脑损伤。由于 VEGF 蛋白价格昂贵, 在体内不稳定, 需要反复多次给药、用药量大, 因而限制了其应用的可行性, 而 VEGF 基因治疗可克服上述局限性。

本研究在建立 7 日龄 SD 新生大鼠 HIBD 动物模型的基础上探讨了腺病毒介导 VEGF165 基因对新生 HIBD 大鼠的治疗作用。结果显示, Ad-VEGF 治疗组鼠脑组织 VEGF 基因表达较 HIBD 组明显增加, 表明 VEGF 基因治疗后的缺血脑组织有摄取并表达外源性 VEGF 基因的能力, 使 VEGF 基因表达增高、VEGF 蛋白合成增加达到有效治疗的程度。

Sun 的研究结果表明^[12], 外源性 VEGF 的神经保护作用机制可能有: ①调节磷脂酰肌醇 3' 激酶

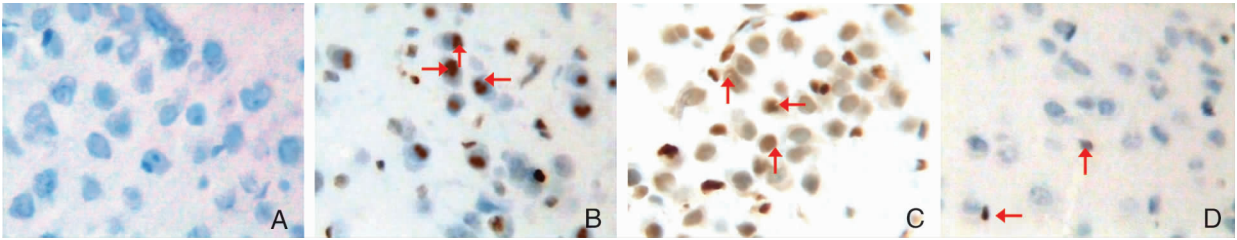


图 2 各组大鼠左大脑皮层 TUNEL 阳性细胞表达 (TUNEL, ×400) A:假手术组大鼠左大脑皮层偶见 TUNEL 阳性细胞; B:HIBD 组大鼠左脑皮层可见大量深色的 TUNEL 阳性细胞(箭头所指为凋亡脑细胞); C:Buffer 组大鼠左脑皮层可见大量 TUNEL 阳性细胞(箭头所指为凋亡脑细胞); D:Ad-VEGF 组大鼠左脑皮层 TUNEL 阳性细胞表达减少。

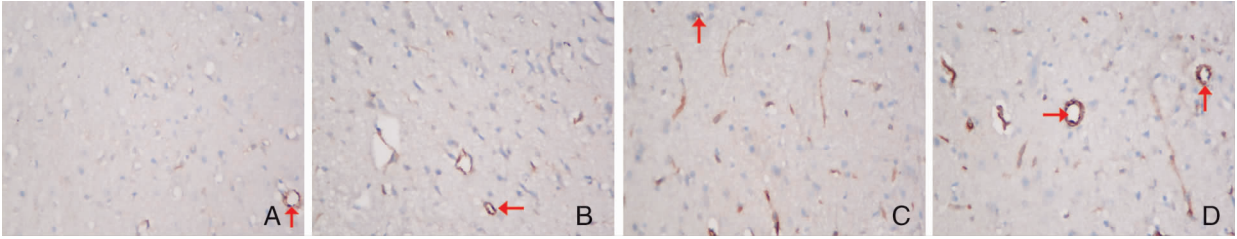


图 3 各组大鼠左脑皮层 CD34 阳性细胞表达 (CD34 免疫组化, ×400) A:假手术组大鼠左脑皮层少量 CD34 阳性细胞; B:HIBD 组大鼠左脑皮层 CD34 阳性细胞较假手术组增加; C:Buffer 组大鼠左脑皮层 CD34 阳性细胞较假手术组增加; D:Ad-VEGF 组大鼠左脑皮层 CD34 阳性细胞较 HIBD 组增加。

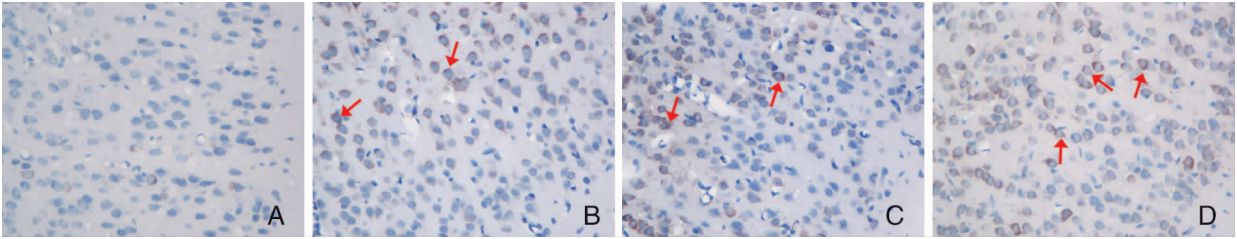


图 4 各组大鼠左脑皮层 VEGF 阳性细胞表达 (免疫组化, ×400) A:假手术组大鼠左脑皮层细胞少量 VEGF 阳性细胞表达; B:HIBD 大鼠左脑皮层区 VEGF 阳性细胞表达较假手术组增加; C:Buffer 组大鼠左脑皮层区 VEGF 阳性细胞表达较假手术组增加; D:Ad-VEGF 组大鼠左脑皮层 VEGF 阳性细胞较 HIBD 组增加。

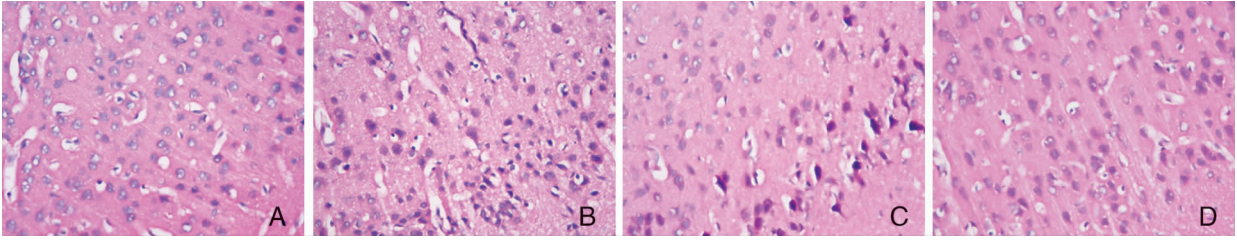


图 5 脑组织切片观察 (苏木精-伊红染色, ×400) A:假手术组大鼠左脑皮层细胞排列整齐,无核固缩; B:HIBD 组大鼠左脑皮层细胞排列紊乱,神经元变性,核固缩; C:Buffer 组大鼠左脑皮层细胞排列紊乱,神经元变性,核固缩; D:Ad-VEGF 组大鼠左脑皮层细胞排列较整齐,偶有核固缩。

(PI3K 的)/核因子 kappaB 信号转导通路,抑制 Caspase-3 活性,减少缺血性神经元细胞凋亡;②通过激活的 PI3K 的途径增加缺血诱导酪氨酸磷酸化的 kv1.2 钾离子通道蛋白;③提高脑室管膜下区神经前体细胞的增殖和迁移、改善脑中中风后纹状体神经发生和促进新生神经元的成熟。目前已证实,脑

缺血缺氧性神经元死亡有坏死和凋亡两种形式, HIBD 脑细胞凋亡是新生大鼠脑细胞死亡的主要形式,在未成熟大鼠脑缺氧缺血损伤模型中均观察到凋亡现象^[13]。本实验结果发现 Ad-VEGF 治疗组较 HIBD 组及 Buffer 组神经细胞凋亡程度减轻,由此初步认为 Ad-VEGF 可能通过抑制新生 HIBD 大鼠脑

细胞凋亡,增加脑神经细胞的存活数,发挥修复脑损伤的作用,因而 VEGF 基因治疗减轻 HIBD 大鼠脑细胞凋亡,可能是其保护新生大鼠 HIBD 的机制之一。

在生理情况下,血管发育与血管形成受到精密的调控。本实验利用目前较为灵敏可靠的抗血管内皮细胞 CD34 单抗来标记微血管,结果发现 Ad-VEGF 治疗组鼠脑皮质微血管密度较 HIBD 组增加 2 倍,表明 VEGF 基因治疗可增加缺氧缺血脑组织的新生血管形成。

在脑损伤后的神经保护措施评价指标中,形态学的改善不一定与功能学的进步成正比,故本研究将病理形态学与神经行为学检测相结合来评价 VEGF 基因治疗对 HIBD 的神经保护作用。行为学检查方法是用于判断远期效果较好的指标,放射形迷宫觅水测试是一种研究与海马功能直接相关的空间学习记忆模型,能较准确地反映动物的空间学习记忆能力^[14~16]。本实验行为学结果显示,HIBD 组较假手术组在放射形迷宫中的觅水时间延长,错误及重复次数增多,提示缺氧缺血损害了动物的空间学习和记忆能力。Ad-VEGF 治疗组较 HIBD 组在放射性迷宫中的觅水时间缩短、错误次数和重复次数减少,提示 Ad-VEGF 治疗对 HIBD 所致大鼠的空间学习记忆能力的损害有显著改善作用。苏木精-伊红染色组织学结果显示,HIBD 组缺血半球侧细胞排列紊乱,神经元变性、部分神经细胞胞体缩小结构模糊或消失,有胶质细胞增生,Ad-VEGF 组鼠脑细胞变性坏死减轻,神经细胞数较 HIBD 组明显增加。这说明 VEGF 基因治疗可改善大鼠远期空间学习记忆能力,减少缺氧缺血所致的神经元丢失,具有神经保护作用。

本研究结果表明,腺病毒载体介导的 VEGF165 基因转移可增加鼠脑组织 VEGF165 mRNA 及其蛋白的表达,减轻缺氧缺血性脑损伤,改善大鼠远期学习记忆功能,具有神经保护作用,其神经保护作用机制可能与减轻鼠脑细胞凋亡、增加鼠脑新血管形成有关。

[参 考 文 献]

[1] Meberg A, Broch H. Etiology of cerebral palsy[J]. J Perinat

Med, 2004, 32(5):434-439.

[2] Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease[J]. Genome Biol, 2005, 6(2):209.

[3] Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory[J]. Nat Genet, 2004, 36(8):827-835.

[4] Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. J Clin Invest, 2003, 111(12):1843-1851.

[5] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann Neurol, 1981, 9(2):131-141.

[6] 王霞,杨于嘉,余小河,钟乐,贾延劼,神经干细胞移植对 HIBD 新生大鼠学习记忆的影响[J]. 中国病理生理杂志,2005,21(8):1491-1494.

[7] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2):169-180.

[8] Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M. Simvastatin protects against long-lasting behavioral and morphological consequences of neonatal hypoxic/ischemic brain injury[J]. Stroke, 2001, 32(9):2185-2191.

[9] Han MK, Kim M, Bae SY, Kang L, Han SY, Lee YS, Rha JH, Kim SU, Roh JK. VEGF protects human cerebral hybrid neurons from in vitro ischemia[J]. Neuroreport, 2004, 15(5):847-850.

[10] Svensson B, Peters M, König HG, Poppe M, Levkau B, Rothermundt M, et al. Vascular endothelial growth factor protects cultured rat hippocampal neurons against hypoxic injury via an antiexcitotoxic, caspase-independent mechanism[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(10):1170-1175.

[11] Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. J Clin Invest, 2003, 111(12):1843-1851.

[12] Sun FY, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor[J]. J Neurosci Res, 2005, 79(1-2):180-184.

[13] Li L, Qu Y, Li J, Xiong Y, Mao M, Mu D. Relationship between HIF-1alpha expression and neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury[J]. Brain Res, 2007, 14, 1180:133-139.

[14] Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M. Simvastatin protects against long-lasting behavioral and morphological consequences of neonatal hypoxic/ischemic brain injury[J]. Stroke, 2001, 32(9):2185-2191.

[15] 钟乐,王霞,余小河,杨于嘉. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后的远期行为学测试[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(3):245-248.

[16] 刘美娜,庄思齐,张红宇,覃肇源,李晓瑜. 早期高压氧治疗对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠的远期保护作用[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(3):216-220.

(本文编辑:吉耕中)