

脑出血大鼠脑内 Angiopoietin-1 及其受体 Tie-2 表达的动态变化*

魏灿杰¹ 唐 涛^{1,2,4} 罗杰坤¹ 黄菊芳³ 杨期东² 黎杏群¹ 张宗荣¹ 齐 勇¹ 张花先¹ 易振佳¹

摘要 目的: 观察与微血管系统重建过程密切相关的促血管生成素 (Angiopoietin-1, Ang-1) 及其受体含免疫球蛋白样环和上皮生长因子样域酪氨酸激酶-2 (tyrosine kinase that contains immunoglobulin-like loops and epidermal growth factor-similar domains-2, Tie-2) 在大鼠基底核脑出血后表达的动态变化。**方法:** 用Ⅶ型胶原酶诱导大鼠脑出血模型, 采用 HE 染色观察大鼠脑组织形态学改变, 免疫组化法检测第 1、2、4、7、14、21 和 28d 血管生成素 Ang-1 及其受体 Tie-2 的表达, 计数阳性血管作为观察指标。**结果:** HE 染色显示正常组及假手术组各时间点取材未见血肿及局部明显病理学改变, 而模型组第 4d 血肿周围出现微血管段, 而后阳性微血管段表达逐渐持续增多, 至第 21d 大量伸入血肿区; 免疫组化研究显示正常及假手术组不同时间点 Ang-1 和 Tie-2 表达均未见明显变化, 模型组大鼠在脑出血后第 2d 起 Ang-1 和 Tie-2 阳性微血管表达明显多于其他两组, 而后表达逐渐升高 ($P < 0.01$), 至 21d 达到高峰, 随后开始下降, 28d 时仍有表达。**结论:** 在脑出血后, 损伤区 Ang-1 及其受体 Tie-2 的表达上调, 可能通过调节血管生成过程而促进脑出血损伤区微血管系统重建。

关键词: 脑出血; 血管新生; 促血管生成素; 受体; 免疫组织化学; 大鼠

中图分类号: R493, R743 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2007)-04-0289-04

Dynamic changes of angiopoietin-1 and the receptor Tie-2 expression in rat brains following intracerebral hemorrhage/GUO Canjie, TANG Tao, LUO Jiekun, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(4):289-292

Abstract Objective: To observe dynamic changes of Angiopoietin-1 (Ang-1) and the receptor tyrosine kinase that contains immunoglobulin-like loops and epidermal growth factor-similar domains-2 (Tie-2) expression following intracerebral hemorrhage (ICH), which were known to be related with angiogenesis in basal ganglia of rat. **Method:** ICH rats were induced with Collagenase VII and the changes of brain were observed by HE staining and expression of Ang-1 and the receptor Tie-2 were assayed by immunohistochemistry on the 1st, 2nd, 4th, 7th, 14th, 21st and 28th d after the onset, then positive microvessels were counted. **Result:** No obvious pathology change appeared in brains of normal control and sham or sham group during the experiment, but for model group, microvessels appeared around hematoma on the 4th d, which got denser gradually and extended into hematoma on the 21st d. Immunohistochemistry revealed no change of expression of Ang-1 and Tie-2 in brains of normal control and sham or sham group during the experiment, and in ICH group, the expression of Ang-1 and Tie-2 were observed on the 2nd d, which increased gradually and peaked on the 21st d, then depressed on day 28. **Conclusion:** Expressions of Ang-1 and its receptor Tie-2 are up-regulated following ICH, which may play an important role in the course of microvascular networks reconstruction by promoting angiogenesis.

Author's address Neurology Department, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410008

Key words intracerebral hemorrhage; angiogenesis; angiopoietin-1; receptor; immunohistochemistry; rats

脑出血是脑血管疾病中的危重类型, 在我国约占脑卒中病例的 20%—40%。近年流行病学调查显示, 50 岁以下的男性人群脑出血的比例较 5 年前有较大增加, 将并严重威胁以青壮年为主的社会劳动力^[1]; 而且由于该病急性期的抢救成功率已取得了较大提高, 因此积极开展其康复机制研究更显重要。

脑出血的预后与病灶微循环的改善及神经组织修复密切相关, 而改善病灶血液供应, 维持神经组织修复所需内环境的稳定对脑出血后神经功能的恢复

有着重要意义; 研究表明, 新形成的侧支血管可改善缺血区周围的组织灌流, 促进脑卒中后的神经功能恢复^[2]。所以, 通过血管新生启动损伤区微血管网重

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (30400581); 中国博士后基金 (2005038224); 湖南省青年骨干教师培养对象经费 (湘教通[2005]247 号) 资助

1 湖南长沙中南大学湘雅医院中西医结合研究所, 410008

2 湖南长沙中南大学湘雅医院神经内科

3 湖南长沙中南大学湘雅医学院神经生物学研究室

4 通讯作者: 唐涛(湖南长沙中南大学湘雅医院神经内科, 410008)

作者简介: 魏灿杰, 女, 硕士研究生

收稿日期: 2006-08-30

建是脑组织修复的重要过程, 重建的血管网将可能为损伤神经元的修复、突触重建和神经发生创造良好的微环境, 为脑出血后神经功能的康复奠定基础。

在血管新生的过程中, 血管生成因子主要包括内皮细胞特异性的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 家族、促血管生成素(angiotensin, Ang) 家族和多效性血管因子(pleiotropic angiogenic factors)^[3]; 其中促血管生成素-1(angiotensin, Ang-1) 是一族特异性作用于血管内皮细胞的生长因子, 含免疫球蛋白样环和上皮生长因子样酪氨酸激酶-2 (tyrosine kinase that contains immunoglobulin-like loops and epidermal growth factor-similar domains-2, Tie-2) 为 Ang-1 内皮特异性酪氨酸激酶受体; Ang-1 以旁分泌形式与 Tie-2 受体结合, 触发血管内皮细胞和血管周细胞相互作用, 促进血管稳定和成熟并维持成熟血管的完整性及静息状态^[4]。在脑卒中的研究中发现, 缺血缺氧可诱导 Angiotensin-1/Tie-2 的表达, 进而调节脑损伤区微血管新生过程^[5]。本研究拟采用胶原酶建立大鼠脑出血模型, 观察脑出血后血肿周围区 Ang-1 及其受体 Tie-2 的表达变化, 探讨脑出血后损伤区微血管系统修复的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: 健康 SD 大鼠 120 只, 雌雄各半, 清洁级, 体重(220±20)g, 动物及饲料均购自中南大学实验动物中心(SD 大鼠许可证号: 025)。

1.1.2 药物与试剂: VII 型胶原酶系 Sigma 公司产品, Ang-1 和 Tie-2 多克隆抗体系 Santa Cruz 公司产品, 兔抗山羊 IgG 二抗系 VECTOR 公司产品, 以上试剂均购自晶美公司; ABC 试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自北京中杉生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组: 将 120 只大鼠随机分为正常对照组、假手术组、模型组, 其中正常对照组 8 只, 假手术组、模型组各 56 只。

1.2.2 脑出血动物模型制备^[6]: 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 400mg/kg 麻醉, 取俯卧位固定于鼠脑立体定位仪(STOELTING TL-2, 美国), 按无菌操作原则, 注入 0.5U VII 型胶原酶灭菌生理盐水 2.5μl (前囟后 1.4mm, 旁开 3.2mm, 深 5.6mm, 位于近内囊的苍白球内)。假手术组以相同方法和位置注入灭菌生理盐水 2.5μl。

1.2.3 组织处理: 各组于术后第 1、2、4、7、14、21、

28d 随机抽取大鼠 8 只 (正常组 8 只大鼠在 28d 处死); 10% 水合氯醛 800mg/kg 麻醉, 经升主动脉以 4℃ 的多聚甲醛 (0.1M PB 配制, pH7.4) 灌注(10ml/min), 取脑, 各组每个时间点取 5 个标本在相同的固定液中后固定 4h, 依次放入 10%、20%、30% 蔗糖 (0.1M PB 配制, pH7.4) 沉底后, 入 Leica1850 恒冷切片机行连续冠状切片, 片厚 30μm, 室温阴干后入 4℃ 冰箱保存备用。各组每个时间点取 3 个标本置于相同固定液进行后固定 1d, 石蜡包埋切片(4μm), 进行苏木精-伊红染色。

1.2.4 免疫组织化学(ABC 法)检测: 冰冻切片室温复温, 用 3% 过氧化氢-甲醇室温 5min, 5% 牛血清白蛋白 37℃ 封闭 60min, 滴加山羊抗大鼠 Ang-1 (1:25)、Tie-2 (1:25) 多克隆抗体, 37℃ 孵育 60min, 4℃ 过夜, 滴加二抗兔抗山羊 IgG (1:100) 和 ABC 复合物(1:100) 37℃ 孵育各 60min, DAB 镜下控制显色。脱水透明中性树脂封片。步骤除滴封闭液不洗外, 各步骤之间用 0.01MPBS 洗 5min×3 次。用 PBS 代替一抗作对照试验。

1.2.5 图像分析: 阳性表达染色为棕褐色, 由一位不了解实验设计的研究人员运用 Moti Images Advance3.2 图像分析软件计数 59294.0 (281.8×210.4)μm² 视野内阳性表达的血管段数, 每只大鼠随机选择 3 张片, 每 1 张片选择 3 个不互相重叠视野, 共 9 个视野, 取平均数作为一只大鼠计数结果。

1.3 统计学分析

所有实验数据均采用 SPSS12.0 统计软件处理, 各组数值均以均数±标准差表示, 血管段阳性计数两组间的比较采用 *t* 检验, 多组间的比较采用 *F* 分析及 SNK-*q* 检验。

2 结果

2.1 脑出血组织 HE 染色

对照组及假手术组各时间段取材未见血肿及局部明显病理学改变, 模型组第 4d 血肿周围出现少量不规则的微血管段, 组织明显水肿、坏死, 炎性细胞浸润以圆形的淋巴细胞为主(图 1, 见前置彩色插页 9), 并可见少量中性粒细胞, 血肿的外缘可见含铁血黄素沉积, 部分神经元水肿变性; 第 14d 时血肿区新生血管长入, 红细胞部分溶解, 但仍可见完整的红细胞, 大量含铁血黄素沉积, 血肿边缘散在多数吞噬含铁血黄素的小胶质, 可见血肿周围及血肿内椭圆形的胶质细胞增生; 第 21d, 血肿基本消失, 损伤区可见明显血管段成条索状, 对应出现管腔扩大, 胶质细胞及血管增生较第 14d 更明显, 淋巴细胞多见 (图

2, 见前置彩色插页 9)。

2.2 脑出血后 Ang-1 及 Tie-2 时空分布特点

正常对照组及假手术组不同时间点 Ang-1 及其受体偶见零星、散在表达, 健侧和患侧分布无明显区别。模型组第 1d 时患侧血肿边可见散在 Ang-1 阳性微血管段, 新生血管管腔不明显, 而在健侧皮质表达较明显; 第 2d 时健侧皮质处表达开始减弱, 患侧血肿边阳性微血管段开始增多, 但较第 1d 无明显

变化; 4d 时 Ang-1 阳性微血管段逐渐靠近血肿, 新生血管管腔初步形成(图 3, 见前置彩色插页 9); 第 7—21d 阳性微血管段进一步增多, 血肿区旁血管呈现条索状且管腔增大, 染色加深(图 4, 见前置彩色插页 9), 第 28d 时阳性微血管段较前明显减少, 但较第 4d 表达仍多(表 1)。Tie-2 的表达特点与 Ang-1 基本相类似, 但 Tie-2 的表达主要在局限在患侧基底核(图 5—6, 见前置彩色插页 9, 表 1)。

表 1 脑出血后 Ang-1 和 Tie-2 的表达

(n=5; N/area; $\bar{x} \pm s$)

	第 1d	第 2d	第 4d	第 7d	第 14d	第 21d	第 28d
Ang-1	4.98±2.25	5.24±2.24	8.00±2.21 ^①	11.02±2.37 ^①	21.58±3.28 ^①	23.51±2.97 ^①	9.82±1.79 ^①
Tie-2	3.58±1.57	3.83±1.78	5.67±1.89 ^①	8.87±1.55 ^①	17.98±2.90 ^①	18.82±3.26	7.69±1.65 ^①

①与同组前一时间点结果比较 $P<0.01$

3 讨论

血管新生(angiogenesis)即从成体血管以出芽或分支的形式发展出来的新生血管, 是脑组织微血管系统修复的主要方式。目前认为其过程包括四个阶段: ①血管通透性增加并出现渗漏; ②基膜降解; ③内皮细胞增生与迁移; ④新生血管床的成熟与稳定^[7]。

Ang-1 在血管新生过程中, Ang-1 和内皮细胞上的 Tie-2 受体结合增强, 使受体磷酸化, 表达 Tie-2 活化的内皮细胞将吸引血管平滑肌、周细胞(pericyte)等血管周围细胞, 包围、支持功能受损的内皮细胞, 形成完整的成熟血管网, 并通过增加内皮细胞间、内皮细胞与血管周围细胞间的连接, 维持内皮细胞的静息状态和血管的完整, 促进毛细血管分支, 而 VEGF 在早期促进内皮细胞的增殖和迁移以形成均匀一致的初级血管网(primary vasculature), 急性心肌梗死患者血清中实验发现重组 Ang-1 能够协同 VEGF 促进内皮细胞管状形成^[8]。因此 Ang-1 能增强 VEGF 的促进血管生成作用^[9]。另外, 用 Ang-1 处理过的单层内皮细胞可降低凝血酶诱导的肺微血管的通透性, 从而对 VEGF 引起的水肿起着制衡作用^[10]。据此 Carmeliet 主张多因子策略, 如合用 Ang-1 可稳定由 VEGF 诱导的新生血管, 加强内皮细胞和周细胞的联系、降低血管通透性、促进间质成分的原位分化及血管平滑肌发育, 促进血管树的分支和延伸^[11]。

Ang-1 和 Tie-2 表达受缺氧、上皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) 和转化生长因子- β (transforming growth factor, TGF- β)等的调控^[12]。本研究中免疫组织化学检测发现脑出血模型大鼠 Ang-1/Tie-2 的表达, 有一个从健侧皮质逐渐向患侧转移靠近血肿的过程, 而血肿中心早期并未见明

显的表达, 可能是由于血肿的占位效应和继发的脑水肿挤压健侧脑组织, 造成局部血流量减少, 脑组织急性缺血缺氧, 诱导对缺氧敏感的内皮细胞的表达, 但也可能是通过出血损伤的内皮细胞, 释放内皮素-1 引起血管痉挛收缩, 导致组织的缺氧所致^[13]; 随着水肿的逐渐吸收, 健侧缺氧减轻, 表达逐渐减少。另外, 脑出血后病灶中心微血管系统遭到破坏, 从而使早期血肿中心并未见表达, 直到第 14d 时随着血管生长进入血肿内部才可见少量表达。

研究中还注意到随着时间的推移, Ang-1 及其受体的表达表现为早期表达不明显, 4d 后逐渐升高, 第 14—21d 达到高峰, 而后逐渐下降, 与 Lin 等在大鼠的局灶性脑缺血再灌注模型中观察的结果大致一致, Ang-1 mRNA 在缺血后 2 周增高(比对照组增高 8 倍), Tie-2 mRNA 在再灌注后 24h 后增高, 持续 2 周, 可能与脑损伤后进行性组织液化和血管新生相关^[14]。研究中 HE 染色也显示脑出血后约 7—21d 出现较多微血管形成, 这与 Ang-1 与 Tie-2 表达时程特点和已知的生物学效应一致。

4 结论

脑出血后损伤区 Ang-1 与 Tie-2 表达增强, 可能有利于促进损伤区形成稳定的成熟血管网, 研究将有助于认识脑出血的修复过程, 为脑出血后的康复治疗 and 药物研究提供线索; 但 Ang-1/Tie-2 的功能实现与 VEGF 的表达有协同作用, 二者如何协调表达诱导血管新生而又能避免引起血管源性脑水肿, 还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 杨期东, 周艳红, 王文志, 等. 中国三社区人群脑卒中发病类型的分布特征[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(13): 875—878.

- [2] 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 (7):829—838.
- [3] Zadeh G, Guha A. Angiogenesis in nervous system disorders[J]. Neurosurg, 2003, 53(6):1362—1376.
- [4] Sundberg C, Kowan etzM, Brown LF, et al. Stable expression of angiopoietin -1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo [J]. Lab Invest, 2002, 2(4):387—401.
- [5] Kampfer H, Pfeilschirer J, Frank S, et al. Expression regulation of angiopoietin -1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and repair[J]. Lab Invest, 2001, 81(3):361—373.
- [6] 何纲, 金益强, 黎杏群, 等. 脑溢安颗粒对脑出血大鼠脑内细胞间粘附分子 1 表达和中性白细胞浸润及神经细胞损伤的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23(7):526—529.
- [7] Bhushan M, Youngl-I S, Brenchley PE, et al. Recent advances in cutaneous angiogenesis[J]. Br J Dermatol, 2002, 147(3):418—425.
- [8] 王春玲, 李宏伟, 傅攀峰, 等. 急性心肌梗死患者可溶性 Tie-2 的检测及其对血管新生作用的研究 [J]. 中国微循环, 2005(5): 311—316.
- [9] 陈伟, 付小兵, 盛志勇. 血管形成因子家族的结构和功能的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(9): 1157—1161
- [10] Pizurki L, Zhou Z, Glynos K, et al. Angiopoietin -1 inhibits endothelial permeability neutrophil adherence and IL -8 production[J]. Br J Pharmacol, 2003, 139(2):329—336.
- [11] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis[J]. Nat Med, 2000, 6(4):389—395.
- [12] Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin -1, a ligand for the tie-2 receptor by secretion-trap expression cloning [J]. Cell, 1996, 87(7):1161—1169.
- [13] Josko J. Cerebral angiogenesis and expression of VEGF after subarachnoid hemorrhage(SAH) in rats[J]. Brain Res, 2003, 981 (1-2):58—69.
- [14] Lin TN, Wang CK, Cheung WM, et al. Induction of angiopoietin and tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia reperfusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20 (2):387—395.

向康复科医师推荐 ——《骨科临床检查图解》(第5版)

近年来,骨关节创伤患者日益增多,术后的康复越来越受到患者的重视,骨关节康复医师的需求也越来越多。体格检查和阅读 X 线片是骨关节康复医师的基本功。然而国内系统介绍骨科检查的书籍并不多。《骨科临床检查图解》就是一本以图解的形式专论骨科临床检查的专著。全书共 13 章,第一二章为骨科检查的一般原则和四肢周围神经的检查,其他 11 章分别介绍了颈、肩、肘、腕、手、胸腰椎、髋、膝、胫骨、踝、足的检查技术。每个章节一般首先介绍该部位常见骨科疾病的特点,然后采用图解与简单文字介绍相结合的方式,按骨科常用的望、触、动诊的顺序讲解体格检查,最后介绍常见的正常和异常 X 线片。以上 3 个部分前后呼应、编排新颖、逻辑性强。其突出的特点是图文并茂、系统讲解,易于读者理解、记忆和掌握各种骨科体格检查的要点及相应的临床意义。另外,本书对正常和异常 X 线片及图示的讲解,也有助于读者提高阅读 X 线片的能力。

该书由山东科学技术出版社最新出版,16 开,精装,310 页,定价 68 元,全国各新华书店及医药卫生书店销售。

国家继续医学教育项目 关于举办全国言语障碍、吞咽困难培训班通知

为了满足各单位亟待培训言语障碍训练人员的需要,才结束后,将举办为期 3 天的言语障碍、吞咽困难培训班,即 2007 年 7 月 2—5 日。本培训班除了将由北京天坛医院神经内科从事多年言语障碍、吞咽困难的专家讲课外,还将请美国加洲嘉惠尔医院语言治疗部主任,双语语言治疗主任医生,曾在美国 UCLA 医院、脑伤康复中心和怀特医院等从事语言治疗工作 20 多年的欧阳来祥(美籍华人)教授。学习班讲课内容理论与实践相结合,突出动手操作能力的培训。本培训班为全国继续医学教育培训项目,培训班结束后,授予继续教育学分 10 分。

学员条件:具有中专或中专以上学历,热爱语言、吞咽困难康复事业。

教学目的:学习言语障碍、吞咽困难的理论与训练技术,重在学员的实际训练能力的提高。

教学方法:理论教学、示范、实习、讨论相结合。

收费标准:学费 800 元。资料费 200 元(包括言语障碍、吞咽困难康复训练示范光盘),食宿由培训班统一安排,费用自理。

讲课地点:北京天坛医院教学楼阶梯教室。

联系方式:北京市崇文区天坛西里 6 号北京天坛医院神经内科,张玉梅,张婧;周筠;邮政编码:100050. 电话:010-86416847,13811313897,86879887. E-mail:zhangyumei95@Yahoo.com.cn 或 zhangfengjing73@Yahoo.com.cn