



丰富环境对脑梗死大鼠梗死灶周围血管内皮生长因子受体的影响

马向阳¹ 牟兆新¹ 陈俊荣¹ 穆剑玲¹ 张小津¹ 崔茂香¹ 黄冬冬¹

摘要

目的:研究丰富环境对大鼠局灶性脑梗死后梗死灶周围血管内皮生长因子受体的影响。

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,术后第24小时随机分为丰富环境(EE)组和标准环境(SE)组。以免疫组织化学法检测血管内皮生长因子受体Flt-1及Flk-1的表达。

结果:大鼠大脑中动脉闭塞后,缺血区神经元变性、坏死,Flt-1和Flk-1在缺血周边区表达明显增加,经丰富环境干预后,血管内皮生长因子受体表达大量增加。

结论:丰富环境可促使血管内皮生长因子受体表达上调,进而促进微血管新生,有利于脑损伤修复。

关键词 丰富环境;脑梗死;血管内皮生长因子受体

中图分类号:R743,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-02-0109-05

Effect of enriched environment on vascular endothelial growth factor receptor expression around-infarction lesion in rats after unilateral local cerebral infarction/MA Xiangyang, MU Zhaoxin, CHEN Junrong, et al.// Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(2): 109—113

Abstract

Objective:To evaluate the effect of enriched environment (EE) on vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) expression around infarction lesion in rats after unilateral local cerebral infarction.

Method:The right middle cerebral artery occlusion(MCAO) was performed with electric coagulation in SD rats, then the models were randomly divided into enriched environment group (EE group) and standard environment group(SE group). The expression of VEGFR-1(Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1) in the boundary zone of cerebral infarction were measured at the 1st d, 3rd d, 7th d, 14th d and 28th d after operation.

Result:The expressions of Flt-1 and Flk-1 around the cerebral infarction in EE group were significantly higher than those in SE group at all time points.

Conclusion:Enriched environment can increase the expressions of VEGFR. It can promote the microangium proliferation and cerebral injury recovery in rats after unilateral local cerebral infarction.

Author's address Cangzhou Medical College, Cangzhou, 061001

Key words enriched environment; cerebral ischemia; vascular endothelial growth factor receptor

缺血性脑血管病是最常见的疾病之一,近年来,脑血管病的康复日益受到重视,对成年脑损伤动物的研究已证实,丰富环境能减轻脑损伤,改善脑功能,促进脑损伤修复^[1-3]。为进一步研究丰富环境对脑损伤修复的作用机制,我们拟利用大鼠脑缺血模

型,探讨丰富环境(enriched environment,EE)对大鼠脑梗死灶周围血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor,VEGFR)表达的影响,为EE应用于脑卒中康复提供理论依据。

¹ 河北省沧州医学高等专科学校,沧州,061001

作者简介:马向阳,女,副教授;收稿日期:2009-03-29

1 材料与方法

1.1 试验材料

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 Flt-1 及 Flk-1 (1:200), 购于 Santa Cruze 公司, SP9002 试剂盒及 DAB 显色剂购于北京中衫生物技术有限公司。

1.2 大脑中动脉缺血模型制备与分组

参照文献报道建立大脑中动脉缺血 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型方法^[4-5], 用 10% 水合氯醛 (0.35ml/100g 体重) 腹腔注射麻醉大鼠, 以左侧侧卧位固定于手术台, 剃去右侧颞顶部鼠毛。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、眼外肌及泪腺和颧弓。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 U 青霉素以预防感染。共用大鼠 107 只, 有 80 只造模成功。

MCAO 造模后第 24h, 80 只 MCAO 大鼠随机分为 EE 组和标准环境 (standard environment, SE) 组, 每组 40 只。

1.3 造模后饲养环境

SE 组饲养于标准笼 (290mm×178mm×160mm), 每笼 5 只; EE 组饲养于 EE 笼^[6-8], 每笼 20 只。丰 EE 笼大小为 815mm×610mm×450mm, 在笼子边高 150mm 处沿两侧各放一 70mm 宽木板, 2 块木板通过 25mm 宽的平衡木连接; 一侧通过楼梯连接笼底; 另一侧通过滑梯连接笼底, 并在高 220mm 处沿一角放一斜板。铁链和秋千悬于笼中; 多种小木块以及小的玩具每周更换 1 次; 同时播放轻音乐, 以明暗红色灯光照射, 每日持续 1h。

1.4 行为学评价

两组分别随机取鼠 15 只于术后第 1 天、3 天、7 天、14 天、28 天进行 Bederson 神经功能评分^[9]、修订的神经功能评分 (modified neurological severity scores, mNSS)^[8]。

1.5 标本的制备

每组分别于术后第 1 天、3 天、7 天、14 天、28 天各随机取鼠 5 只, 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 Flt-1 和 Flk-1 的免疫组化测定。

1.6 Flt-1 和 Flk-1 免疫组织化学检测方法

采用 SAB 法检测 Flt-1 和 Flk-1, 操作步骤严格按照说明书进行。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% 盐酸乙醇分化, 蓝化; 经 80%、95%、100% 乙醇脱水, 二甲苯透明, 最后封片, 贴标签备查。

1.7 图像处理

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 Flt-1 和 Flk-1 阳性细胞数 (计数人员为本试验非相关人员, 双盲方法)。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件包对数据进行处理, 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 两组神经功能评分比较

EE 组于 MCAO 后第 14—28 天 Bederson 神经功能评分明显低于 SE 组 ($P < 0.05$, 表 1)。7—28d EE



组 mNSS 评分均明显低于 SE 组($P<0.05$,表 1)。

2.2 两组 Flk-1 阳性细胞数比较

两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;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。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。表达细胞主要为内皮细胞、神经胶质细胞和神经细胞。各时间点 EE 组 Flk-1 在缺血周边区的表达均明显高于 SE 组 ($P<0.05$,表 2,图 1)。

2.3 两组 Flt-1 阳性细胞数比较

两组大鼠缺血边缘区脑组织在 MCAO 术后第 1 天时 Flt-1 表达最高,第 3 天开始下降,第 14 天后

明显减少。各时间点 Flt-1 的表达主要集中在梗死灶周围,梗死灶中心仅见少量 Flt-1 蛋白表达。表达细胞主要为内皮细胞、神经胶质细胞和神经细胞。各时间点 EE 组 Flt-1 在缺血周边区的表达均明显高于 SE 组($P<0.05$,表 2,图 2)。

3 讨论

3.1 EE 对脑梗死大鼠行为学的影响

EE 被定义为复杂的无生命物与社会刺激的复合体^[10]。即动物的饲养环境空间增大,内置物体丰富而新奇,成员较多,不仅提供了多感官刺激和运动的机会,而且赋予了相互间社交性行为的可能。鼠的典型 EE 为:鼠笼较大,多只鼠群居于笼中,笼中设置各种可操纵的物品和“玩具”,包括支架、秋千、爬

表 1 不同环境下随时间变化各组 Bederson 神经功能评分及 mNSS 评分

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

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
Bederson 评分						
SE 组	15	2.12±0.65	1.92±0.47	1.92±0.47	1.66±0.53	1.26±0.47
EE 组	15	2.06±0.27	1.99±0.01	1.99±0.01	1.20±0.67 ^①	0.72±0.70 ^①
mNSS 评分						
运动						
SE 组	15	3.06±0.97	2.79±0.79	3.06±1.23	2.59±1.36	1.46±0.93
EE 组	15	2.72±0.81	2.32±0.73	2.19±0.69 ^①	1.72±0.89 ^①	1.06±0.71 ^①
平衡木						
SE 组	15	3.12±0.53	2.92±0.27	2.92±0.27	2.94±0.27	2.32±0.50
EE 组	15	3.06±0.27	2.99±0.01	2.86±0.36 ^①	2.52±0.53 ^①	0.94±1.04 ^①
mNSS						
SE 组	15	8.32±1.19	7.72±0.89	7.12±1.26	6.06±1.68	3.86±1.07
EE 组	15	8.26±0.89	7.12±0.84	6.39±0.99 ^①	4.99±1.37 ^①	1.86±1.78 ^①

①与 SE 组比较 $P<0.05$

表 2 各组大鼠梗死灶周围 Flk-1、Flt-1 阳性细胞计数比较

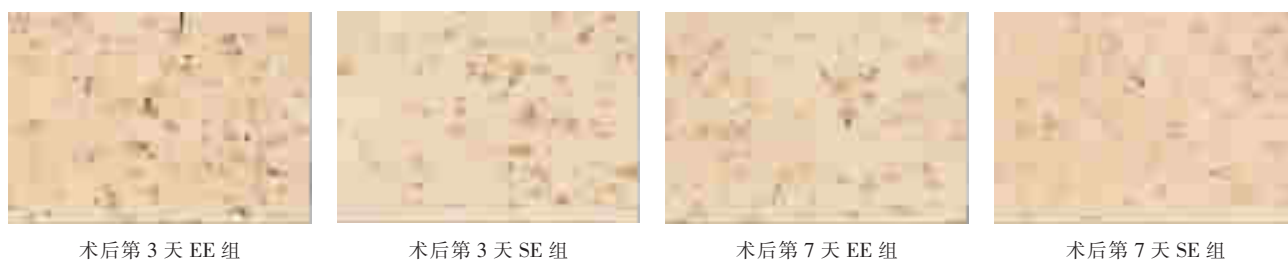
($\bar{x}\pm s$, 个)

组别	鼠数	缺血第 1 天	缺血第 3 天	缺血第 7 天	缺血第 4 天	缺血第 28 天
Flk-1						
SE 组	15	34.4±7.1	51.7±10.7	43.9±6.2	30.2±5.6	29.9±7.8
EE 组	15	48.4±6.5 ^①	68.8±10.2 ^①	68.7±7.2 ^①	49.0±3.2 ^①	46.2±7.1 ^①
Flt-1						
SE 组	15	38.6±7.1	30.6±10.6	22.8±6.1	9.1±5.6	8.8±7.7
EE 组	15	55.6±6.6 ^①	47.7±10.1 ^①	47.6±7.1 ^①	27.9±3.2 ^①	25.1±7.1 ^①

①与 SE 组比较 $P<0.05$

图 1 两组大鼠脑梗死灶周围 Flk-1 的表达

($\times 400$)



术后第 3 天 EE 组

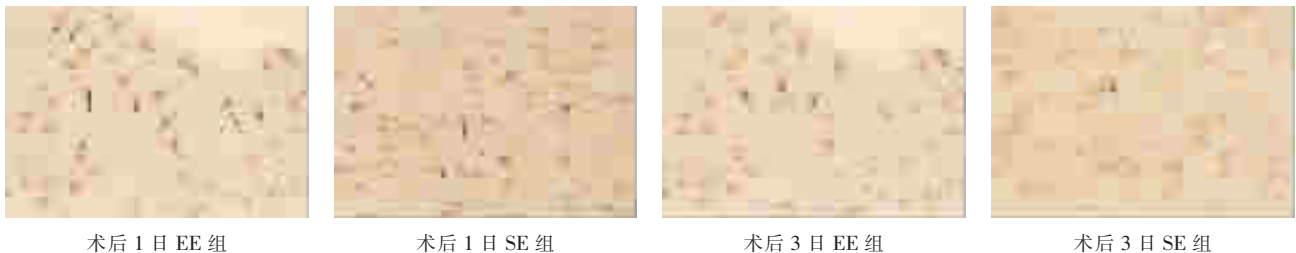
术后第 3 天 SE 组

术后第 7 天 EE 组

术后第 7 天 SE 组

图2 两组大鼠脑梗死灶周围 Flt-1 的表达

(×400)



梯、斜坡、墙壁、水管、积木、玻璃球、乒乓球等,配合不同的声音和光亮,每1周更换1次。大鼠在EE中有机会有机会进行社会交往、探索学习和各种体力活动,但不进行特殊训练^[11]。

有确凿的动物实验研究证据表明,EE对正常幼年、成年及衰老动物的神经系统功能有明显的促进作用,可促进神经系统发育,提高记忆力和解决问题的能力,减少攻击性行为和焦虑,增加觅食活动;也可显著改善实验性脑梗死大鼠的预后,促进运动功能恢复,改善记忆力;EE还可增强其他治疗(如脑移植、药物治疗、运动训练)的效果^[11]。在脑血管病的研究中发现局灶性脑梗死后暴露于EE可促进功能的恢复,保护脑组织的完整性,并引起树突分支,突触发生^[12],胶质细胞、血管数量的增加,各种神经营养因子的表达和神经发生,以及减少焦虑,改善认知,增强记忆、促进学习^[13-14]的作用。

本实验使用修订的神经功能评分标准mNSS,神经功能被分为0—18等级(普通分数0;最高障碍分数18),mNSS是运动(肌肉状态和异常运动)、感觉(视、触、本体感觉)、反射和平衡测试的综合评估。结果显示,在试验性脑梗死后,将大鼠饲养于EE笼中,使之有机会从事各种体力活动、探索学习,并与其他大鼠进行交流,其运动、平衡能力测试结果显示在MCAO手术第14—28天后,明显优于饲养于标准笼的大鼠;丰富环境组于MCAO后第14—28d Bederson神经功能评分也明显低于SE组,均提示EE可促进脑梗死后患肢功能的恢复。

本实验中各手术组mNSS感觉评分显示感觉功能虽然有所改善,但是各组间比较未见显著性差异。原因可能与EE中对感觉的刺激不足有关,如大鼠胡须刺激、抚摸刺激等感觉的刺激,因此在各组间感觉恢复未见差异。

脑卒中后暴露于EE可能成为今后卒中患者康复策略的一部分,并且有必要对EE中发挥作用的机制进行深入研究。

3.2 EE对脑梗死大鼠梗死灶周围Flk-1、Flt-1的影响

脑血管闭塞以后,神经细胞转归受多种因素的影响,其中血供的恢复是重要因素。血管新生是极其复杂的过程,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^[15]。VEGF是目前发现的最强的刺激血管生成的因子之一^[16]。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样酪氨酸激酶,Fms-like tyrosine-1,VEGF-1),Flk-1/KDR(激酶插入嵌合受体/胎肝激酶-1,VEGF-2),Flt-4(VEGF-3),np-1(神经纤维网蛋白-1),np-2(神经纤维网蛋白-2)等。Flt-1和Flk-1对VEGF的高度亲和浓度分别为1—20pmol和75—77pmol,对VEGF非常敏感,共同参与完成血管的新生^[17],本试验中选用Flk-1、Flt-1作为VEGF受体的代表进行研究。

VEGFR的生物学效应主要为促进内皮细胞有丝分裂,诱导血管内皮细胞增殖、分化和迁徙,这是VEGFR和VEGF结合后最明显的生物学效应;另外还有增加血管的通透性及神经保护作用^[18]。

本试验结果显示,两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,各时间点EE组Flk-1在缺血周边区的表达均明显高于SE组;MCAO术后第1天时Flt-1表达最高,第3天开始下降,第14天后明显减少。各时间点Flt-1的表达主要集中在梗死灶周围,EE组Flt-1在缺血周边区的表达均明显高于SE组。两组Flk-1及Flt-1在脑缺血后表达明显



增加,与以往试验结果一致^[19-20],提示脑梗死缺血缺氧可以诱使 Flt-1/Flk-1 表达。EE 组表达明显高于 SE 组,提示 EE 干预可以促进 Flt-1/Flk 表达。有研究显示康复训练可促进脑缺血缺氧后神经功能恢复与微血管新生^[21-22],改善侧支循环、增加脑缺血后脑血流量的作用,提示运动活动可能是 EE 促进 Flt-1/Flk-1 表达的因素之一。社会交往和探索学习在其中的作用有待进一步研究。

参考文献

- [1] Will B, Galani R, Kelche C, et al. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training [J]. *Prog Neurobiol*, 2004, 72 (3):167—182.
- [2] 张国庆,邵肖梅. 丰富环境对于中枢神经系统可塑性的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2006,(3):280—283.
- [3] 李晓捷,吕智海,孙忠人,等. 早期丰富环境刺激对脑瘫大鼠脑发育的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2006,21(12):1061—1064.
- [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] 李娜,高俊淑,李阔,等. 不同环境设置对局灶性脑梗死大鼠梗死灶周围 Syn 表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2009,(3):213—215.
- [6] Gobbo OL, O' Mara SM. Impact of enriched -environment housing on brain-derived neurotrophic factor and on cognitive performance after a transient global ischemia [J]. *Behav Brain Res*, 2004, 152(2):231—241.
- [7] Dahlgvist P, Rönnbäck A, Bergström SA, et al. Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 19(8): 2288—2298.
- [8] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(11): 2682—2688.
- [9] Ohlsson AL, Johansson BB. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats [J]. *Stroke*, 1995,26 (4): 644—649.
- [10] Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment [J]. *Nat Rev Neurosci*. 2000, 1:191—198.
- [11] 贾子善. 努力探索脑卒中康复的最佳环境[J]. *中国康复医学杂志*, 2007,22(7):577.
- [12] Rampon C, Jiang CH, Dong H, et al. Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97(23):12880—12884.
- [13] Schrijver NC, Bahr NI, Weiss IC, et al. Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002, 73(1):209—224.
- [14] Lee EH, Hsu WL, Ma YL, et al. Enrichment enhances the expression of sgk, a glucocorticoid -induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation[J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 18(10):2842—2852.
- [15] 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.
- [16] Harrigan MR. Angiogenic factors in the central nervous system [J]. *Neurosurgery*, 2003, 53(6):639—661.
- [17] 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.
- [18] 郑婵娟,廖维靖,杨万同. 血管内皮生长因子与缺血性脑损伤[J]. *中国康复理论与实践*, 2004, 11(10):688—689.
- [19] 马向阳. 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.
- [20] 马向阳. 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 [J]. *中国康复医学杂志*, 2009,24 (3): 219—221.
- [21] 孙佳红,朵振顺. 缺血性脑血管病的治疗性血管生成与中医药[J]. *中国基层医药*, 2006, 13(8): 1381—1383.
- [22] 蒋红芝,黄光英,张明敏. 针刺对局部脑缺血大鼠血管内皮生长因子表达和脑血流的影响 [J]. *微循环学杂志*, 2006, 16(2): 9—11.