

·基础研究·

运动预处理对脑缺血再灌注大鼠脑缺血区 VEGF/VEGFR2/Dock6 信号通路的影响*

孙晓莹¹ 周璐² 唐丽亚¹ 刘锦灿¹ 蒋心如¹ 瞿启睿¹ 艾坤^{1,3}

摘要

目的:从 VEGF/VEGFR2/Dock6 信号途径探索运动预处理对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血侧脑组织血管新生的影响。

方法:采用随机数字表法将 SD 雄性大鼠分为假手术组、模型组和运动预处理组,每组 18 只。造模前,假手术组与模型组不给予任何处理,运动预处理组大鼠给予适应性跑步训练 3d,电动跑台坡度为 0°,速度 10m/min,每天 1 次,每次 20min。适应性训练结束后,运动预处理组给予为期 3 周的正式跑步训练,每周连续训练 6d,休息 1d,电动跑台坡度为 0°,速度 15m/min,30min/d。模型组和运动预处理组采用 Koizumi 栓线法加以改良制备大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,假手术组仅切开皮肤,不插栓线。采用 Zea-Longa 评分和改良神经严重程度评分(mNSS)法进行神经功能缺损评估;TTC 染色法检测脑梗死体积百分比,HE 染色观察缺血侧大脑皮质组织形态学改变;免疫组化法观察缺血侧大脑皮质 CD31 表达水平;蛋白质免疫印迹测定 VEGFA、VEGFR2、Dock6 蛋白表达水平。

结果:①Zea-Longa 评分:再灌注麻醉清醒后,与假手术组相比,其余 2 组大鼠 Zea-Longa 评分均增高($P<0.01$),且 2 组间 Zea-Longa 评分无显著性意义;再灌注 72h 后,与假手术组相比,模型组大鼠 Zea-Longa 评分显著增高($P<0.01$);与模型组相比,运动预处理组大鼠 Zea-Longa 评分显著降低($P<0.05$)。②mNSS 评分:再灌注 72h 后,与假手术组相比,模型组大鼠 mNSS 评分显著增高($P<0.01$);与模型组相比,运动预处理组大鼠 mNSS 评分显著降低。③TTC 染色:与假手术相比,模型组脑梗死体积百分比增大($P<0.01$);与模型组相比,运动预处理组脑梗死体积百分比相对减小($P<0.05$)。④HE 染色:与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧大脑皮质出现显著病理学改变;与模型组相比,运动预处理组大鼠缺血侧大脑皮质病理学改变减轻。⑤CD31 免疫组化:与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧大脑皮质中 CD31($P<0.01$)显著升高;与模型组相比,运动预处理组大鼠缺血侧大脑皮质中 CD31($P<0.01$)进一步升高。⑥ VEGF、VEGFR2、Dock6 蛋白质免疫印迹:与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧大脑皮质 VEGF($P<0.05$)、VEGFR2($P<0.05$)、Dock6($P<0.01$)蛋白表达含量升高;与模型组相比,运动预处理组大鼠缺血侧大脑皮质中 VEGF($P<0.05$)、VEGFR2($P<0.05$)、Dock6($P<0.01$)蛋白表达含量进一步升高。

结论:运动预处理可有效促进脑缺血后血管新生,减轻脑缺血再灌注以后的神经功能缺损表现,这一作用可能与其激活 VEGF/VEGFR2/Dock6 信号途径有关。

关键词 缺血再灌注;运动预处理;血管新生;血管内皮生长因子;血管内皮生长因子受体-2;细胞分裂蛋白 6

中图分类号:R493,R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2024)-02-0170-08

Effects of exercise preconditioning on VEGF/VEGFR2/Dock6 signaling pathway in ischemic brain tissue of rats with cerebral ischemia reperfusion injury/SUN Xiaoying, ZHOU Lu, TANG Liya, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2024, 39(2): 170—177

Abstract

Objective: To investigate the effect of exercise preconditioning on angiogenesis in ischemic brain tissue in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury in the view of VEGF/VEGFR2/dock6 signaling pathway.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2024.02.004

*基金项目:湖南省自然科学基金青年项目(2021JJ40007);湖南中医药大学研究生科研创新项目(2022CX102)

1 湖南中医药大学针灸推拿与康复学院,湖南省长沙市,410208; 2 郴州市第一人民医院康复医学科; 3 通讯作者

第一作者简介:孙晓莹,女,硕士研究生; 收稿日期:2023-05-08

Method: SD male rats were divided into sham group, model group and exercise preconditioning group by random number table method, with 18 rats in each group. The sham operation group and the model group were not given any treatment, while the exercise preconditioning group was given adaptive running training for 3 days at a speed of 10 m/min, once a day for 20 minutes each time. After the adaptive training, the exercise preconditioning group was given formal running training for 3 weeks, continuous training for 6 days a week, rest for 1 day, electric treadmill slope of 0°, speed of 15m/min, 30min/d. Model group and exercise preconditioning group were modified to prepare the middle cerebral artery occlusion (MACO) models by Koizumi thread method, while sham operation group only given skin cutting without thread insertion. Zea longa score and modified neurological severity score (mNSS) were used to score neurological deficit in rats, the relative infarct size of the brain was detected by TTC staining, the morphological changes of the ischemic cerebral cortex was observed by HE staining, the expression of CD31 in ischemic cerebral cortex was detected by immunohistochemistry and the expressions of VEGFA, VEGFR2, Dock6 in ischemic cerebral cortex were detected by western blot.

Result: ①Zea-Longa scoring: after awaking from anesthetizati, compared with the sham group, the Zea-Longa scores of the other two groups were increased ($P<0.01$), and there was no statistical significance in the Zea-Longa scores between the two groups. At 72 hours after reperfusion, compared with the sham group, the Zea-Longa score of the rats in the model group was significantly increased ($P<0.01$); compared with the model group, the Zea-Longa score of the rats in the exercise preconditioning group was significantly decreased ($P<0.05$). ②mNSS scoring: At 72 hours after reperfusion, compared with the sham group, the mNSS score of the rats in the model group was significantly increased ($P<0.01$); compared with the model group, the mNSS score of the rats in the exercise preconditioning group was significantly decreased ($P<0.05$). ③TTC staining: Compared with the sham group, the cerebral infarction volume in the model group was increased ($P<0.01$), and compared with the model group, the cerebral infarction volume in the exercise preconditioning group was decreased ($P<0.05$). ④ HE staining: Compared with the sham group, the model group rats appeared significant pathological changes in the cerebral cortex on the ischemic side. Compared with the model group, the pathological changes of the cerebral cortex on the ischemic side of the rats in the exercise preconditioning group were alleviated. ⑤ Immunohistochemistry of CD31: Compared with the sham group, the expression of CD31 in the ischemic cerebral cortex of the model group was significantly increased ($P<0.05$). The expression of CD31 in the ischemic cerebral cortex of the exercise preconditioning group was further increased ($P<0.05$). ⑥Western blot of VEGF, VEGFR2 and Dock6: Compared with the sham group, the expressions of VEGF ($P<0.05$), VEGFR2 ($P<0.05$) and Dock6 ($P<0.01$) in the ischemic cerebral cortex of the model group were significantly increased; compared with the model group, the expressions of VEGF ($P<0.05$), VEGFR2 ($P<0.05$) and Dock6 ($P<0.01$) in the ischemic cerebral cortex of the exercise preconditioning group were further increased.

Conclusion: Exercise preconditioning can effectively promote angiogenesis after cerebral ischemia and reduce cerebral ischemia-reperfusion injury, which may be related to the activation of VEGF/VEGFR2/Dock6 signaling pathway.

Author's address Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, 410208

Key word ischemia-reperfusion; exercise preconditioning; angiogenesis; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptors; dedicator of cytokinesis 6

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是脑循环病变引起的供血动脉的血流障碍,是严重危害人类生命健康和生存质量的脑血管疾病之一^[1-2],缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CI/RI)是其病理过程,可导致Ca²⁺超载、氧化应激、

兴奋性氨基酸毒性作用、炎症反应、神经细胞凋亡、能量代谢障碍等一系列继发损伤^[3]。研究表明,促进缺血区脑组织血管有效新生有助于减轻CI/RI,可作为IS防治机制研究的重点^[4]。

研究表明,血管内皮生长因子(vascular endo-

thelial growth factor, VEGF)可作用于血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptors, VEGFR2)引发下游一系列信号转导,进一步调控细胞分裂蛋白6(dedicator of cytokinesis 6, Dock6),促进伪足形成,引起内皮细胞迁移,从而促进血管新生^[5-7]。因此,VEGF/VEGFR2/Dock6信号途径可作为减轻CI/RI的潜在干预靶点。

运动预处理(exercising preconditioning, EP)对机体具有缺血缺氧预刺激作用,可诱导机体产生内源性自我保护反应。临床试验和动物实验均发现,运动预处理可以促进缺血区侧脑组织血管新生,防治CI/RI,减小脑梗死体积^[8-9]。因此,本研究选用大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型,以VEGF/VEGFR2/Dock6信号途径为切入点,探讨运动预处理对脑缺血再灌注大鼠缺血侧脑组织血管新生的影响,为运动预处理防治CI/RI提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

由湖南中医药大学实验动物中心提供健康成年SD大鼠54只,雄性,SPF级,体质量160—180g,合格证编号:SCXK(湘)2019-0004。大鼠饲养于湖南中医药大学SPF级动物房,饲养温度为20—25℃,相对湿度50%—70%,换气次数15—20次/h,压强梯度20—50Pa,每晚定时紫外线照射消毒实验室。适应性饲养7d后,按照随机数字表分为假手术组、模型组和运动预处理组,每组18只。

1.2 主要试剂和仪器

MCAO线栓(北京西浓科技有限公司);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);TTC染液(北京索莱宝科技有限公司);HE染液、组化试剂盒DAB显色剂、二抗工作液购自湖南艾方生物科技有限公司;兔抗血小板内皮细胞黏附分子(CD31)(艾博抗(上海)贸易有限公司,货号ab281583)、鼠抗VEGFA(武汉三鹰生物技术有限公司,货号66828-1-Ig)、兔抗VEGFR2(赛信通(上海)生物试剂有限公司,货号9698S)、兔抗Dock6(武汉三鹰生物技术有限公司,货号25087-1-AP)。

跑步机(浙江省金华市宇晟运动公司,型号:

C100);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);成像系统(日本尼康,型号:NIKON DS-U3)。

1.3 运动预处理方案

运动预处理组大鼠给予适应性跑步训练3d,电动跑台坡度为0°,速度10m/min,每天1次,每次20min。在适应性训练结束后,给予为期3周的正式跑步训练,每周连续训练6d,休息1d,电动跑台坡度为0°,速度15m/min,30min/d^[10],不能适应则另选大鼠补入。假手术组与模型组不给予任何处理。

1.4 模型制备

末次干预结束后,各组大鼠禁食不禁水24h,首先麻醉各组大鼠,模型组和运动预处理组大鼠采用Koizumi栓线法加以改良制备大脑中动脉栓塞(MCAO)模型^[11];假手术组大鼠仅切开皮肤并暴露血管,不插栓线。待大鼠清醒后,行Zea-Longa法评分^[12],将评分为1—3分者视为造模成功,纳入实验。

1.5 取材及样本处理

再灌注72h后,对各组大鼠行Zea-Longa法评分和改良神经系统严重程度评分(modified neurological severity scoring, mNSS),而后麻醉大鼠,断头取全脑,生理盐水冲洗,于冰盘上快速剥离脑膜,剔除嗅球、小脑和低位脑干。每组随机选取6个脑组织样本于-20℃冰箱速冻,行TTC染色;其余各组12个脑组织样本按Ashwal法^[13]将脑组织于冠状面切成3片,舍弃边上2片,取中间一片脑组织,约4mm厚,随机选取6个脑组织样本置于4%多聚甲醛固定,用于HE和免疫组化检测。将剩余各组6个脑组织样本冠状面取缺血半暗带区域,分离出大脑皮质,-80℃保存,用于蛋白质免疫印迹测定。

1.6 指标检测

1.6.1 Zea-Longa评分:大鼠手术麻醉清醒后和再灌注72h后进行Zea-Longa评分,得分越高表明大鼠神经功能缺损情况越严重。评分标准:0分:无神经功能缺损症状;1分:提尾时栓塞动脉对侧前肢不能伸直;2分:行走时向栓塞动脉对侧旋转;3分:行走时向栓塞动脉对侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。

1.6.2 mNSS评分:大鼠再灌注72h后行mNSS评分,评分主要由运动、感觉、平衡和反射4部分组成,得分越高,大鼠神经功能缺损越严重^[14]。

1.6.3 TTC染色检测脑梗死体积百分比:取已经冰冻好的脑组织,于大鼠脑切片槽中将脑组织均匀切成5张厚度约为2mm的冠状切片,放入2%TTC染色液中,于37℃恒温箱避光染色10min,PBS洗,4%多聚甲醛固定24h后,相机拍照,非缺血区组织呈玫瑰红色,缺血区脑组织呈白色。使用Image-Pro Plus 6.0软件测定,消除脑水肿后计算脑梗死体积百分比:脑梗死体积百分比=(对侧未梗死体积-梗死侧未梗死体积)/(对侧未梗死体积 $\times$ 2) $\times$ 100%。

1.6.4 HE染色:取于4%多聚甲醛固定好的脑组织样本,放入脱水盒内于脱水机中依次梯度酒精进行脱水,石蜡包埋,于冠状面连续切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,流水冲洗,苏木素染色,流水冲洗,分化液分化,流水冲洗返蓝,0.5%伊红染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片固定,显微镜下观察缺血侧大脑颞叶皮质的组织形态学改变。

1.6.5 免疫组化:取于4%多聚甲醛固定好的脑组织样本,放入脱水盒内于脱水机中梯度酒精脱水,石蜡包埋,于冠状面连续切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水,蒸馏水洗,3%过氧化氢浸泡,蒸馏水洗,PBS洗,抗原修复1次:把切片浸泡在PBS中,加热至沸腾即可,冷却至常温,PBS洗,湿盒中进行一抗孵育,4℃过夜,PBS洗,滴加反应增强液,室温孵育,PBS洗,滴加二抗,室温孵育,PBS洗,加DAB显色,显微镜下观察显色结果,自来水终止反应,苏木素复染,水洗,盐酸乙醇分色,自来水中促蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。每张切片在显微镜下分别取缺血侧大脑颞叶皮质3个阳性表达最高的 $\times$ 400视野,Image J软件计算每个视野的累积光密度(Integral optical density,IOD)值,取3个视野的平均值进行统计学分析。

1.6.6 蛋白质免疫印迹:取50mg大脑皮质脑组织,加入500 μ l RIPA裂解液,混合均匀,匀浆机匀浆后离心取上清于EP管中,BCA法测定蛋白浓度后,取一定量蛋白原液,制备蛋白质上样液进行Western blot检测。制备SDS-PAGE胶,经过上样、电泳、电转后转移到PVDF膜上。而后5%脱脂奶粉室温封闭1h,TBST洗3次,每次10min,分别加入一抗VEGF、VEGFR2和Dock6,4℃过夜。TBST洗3次后分别加入对应的二抗,室温孵育1h后TBST洗3

次,最后在PVDF膜上滴加显影液于暗室中曝光显影,使用ImageJ软件对各组蛋白相对含量进行定量分析。

1.7 统计学分析

采用SPSS 26.0对实验数据进行统计分析。计量资料符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差表示,三组间比较采用单因素方差分析,方差齐者两两比较采用LSD法,方差不齐采用Tamhane's T2法;不满足正态分布则采用非参数检验。检验水平为 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠再灌注后和再灌注72h后的Zea-Longa法评分比较

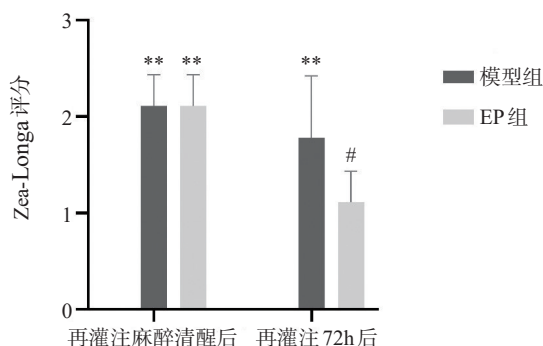
各组大鼠在再灌注麻醉清醒后行Zea-Longa法评分,与假手术组相比,其余2组大鼠Zea-Longa评分均增高($P<0.01$),说明造模成功;2组间Zea-Longa评分无显著性意义,说明本实验可消除基线水平差异。见图1。

各组大鼠于缺血再灌注72h后行第二次Zea-Longa法评分,与假手术组相比,模型组大鼠Zea-Longa评分显著增高($P<0.01$);与模型组相比,EP组大鼠Zea-Longa评分显著降低($P<0.05$),说明EP可有效改善脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损症状。

2.2 各组大鼠造模后和造模72h后的mNSS评分比较

各组大鼠于缺血再灌注72h行mNSS评分。与假手术组相比,模型组大鼠mNSS评分显著增高

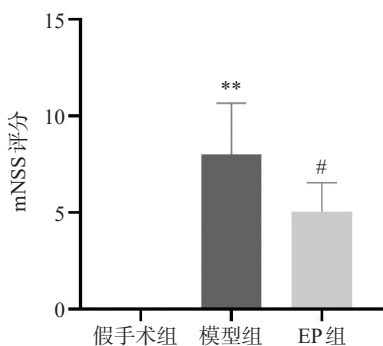
图1 各组大鼠再灌注麻醉清醒后及再灌注72h后Zea-Longa评分比较



注:与假手术组(Zea-Longa评分为0分)比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$

($P<0.01$);与模型组相比,EP组大鼠 mNSS 评分显著降低($P<0.05$),说明 EP 可有效减轻神经系统损伤程度。见图2。

图2 各组大鼠再灌注72h后mNSS评分比较



注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$

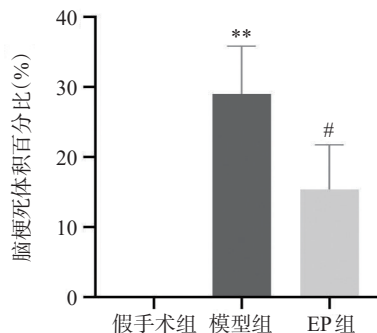
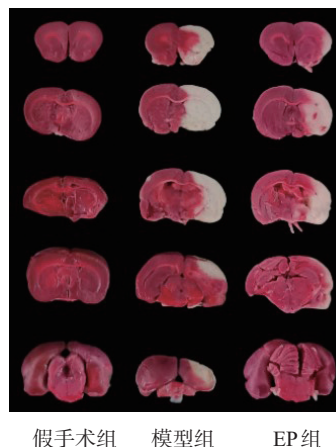
2.3 各组大鼠脑梗死体积百分比比较

假手术组大鼠右侧大脑未见梗死灶;与假手术组相比,模型组大鼠右侧脑梗死体积百分比增大($P<0.01$);与模型组相比,EP组大鼠右侧脑梗死体积百分比减小($P<0.05$),说明 EP 可有效改善脑缺血再灌注大鼠的脑梗死体积。见图3。

2.4 各组大鼠缺血侧脑组织病理结果比较

假手术组大鼠右侧大脑皮质组织层次清晰,染色均匀,无充血、水肿和炎细胞浸润现象,神经细胞紧密有序排列,胞质淡染,胞核居中,核仁清楚。模型组大鼠右侧大脑皮质组织结构排列紊乱,神经细胞数量减少,胞核溶解,呈空泡状,水肿严重,大量炎细胞浸润。与模型组相比,EP组大鼠右侧大脑皮质组织层次尚清晰,神经细胞数量相对较多,水肿减轻,炎细胞浸润数量相对较少。见图4。

图3 各组大鼠再灌注72h后脑梗死体积百分比比较



注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$

2.5 各组大鼠缺血侧脑组织CD31的免疫组化结果

CD31 是公认的可反映血管新生情况的特异性标志物^[15]。免疫组化结果显示阳性表达呈棕黄色。与假手术组相比,模型组大鼠右侧缺血区大脑皮质组织中 CD31 阳性表达率显著升高($P<0.01$);与模型组相比,EP组大鼠右侧缺血区大脑皮质组织中 CD31 阳性表达率升高($P<0.01$)。见图5。

图4 三组大鼠缺血侧大脑皮质 HE 染色结果比较

($\times 400$)

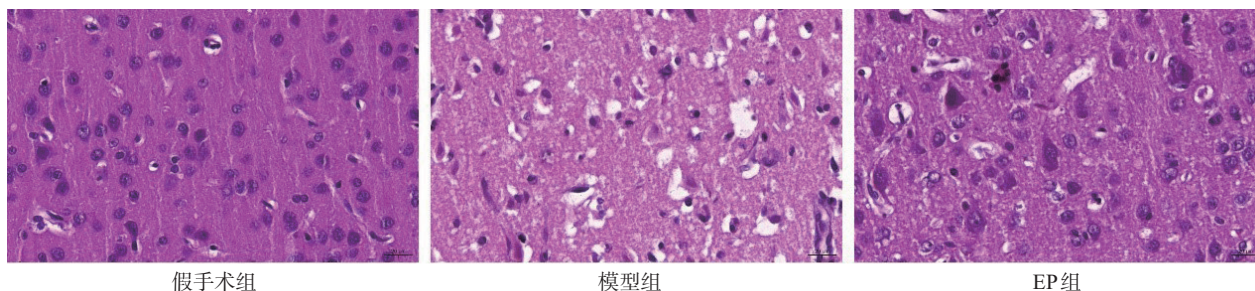
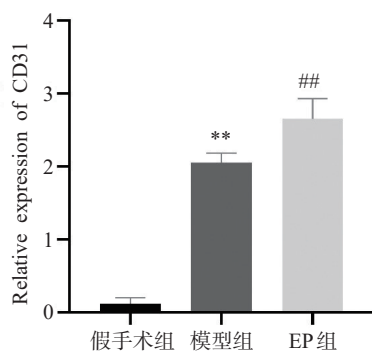
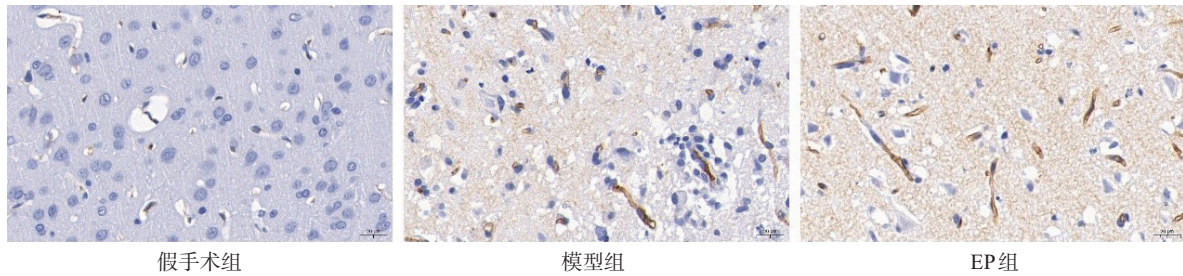


图5 三组大鼠缺血侧大脑皮质组织CD31表达情况比较

(×400)

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$

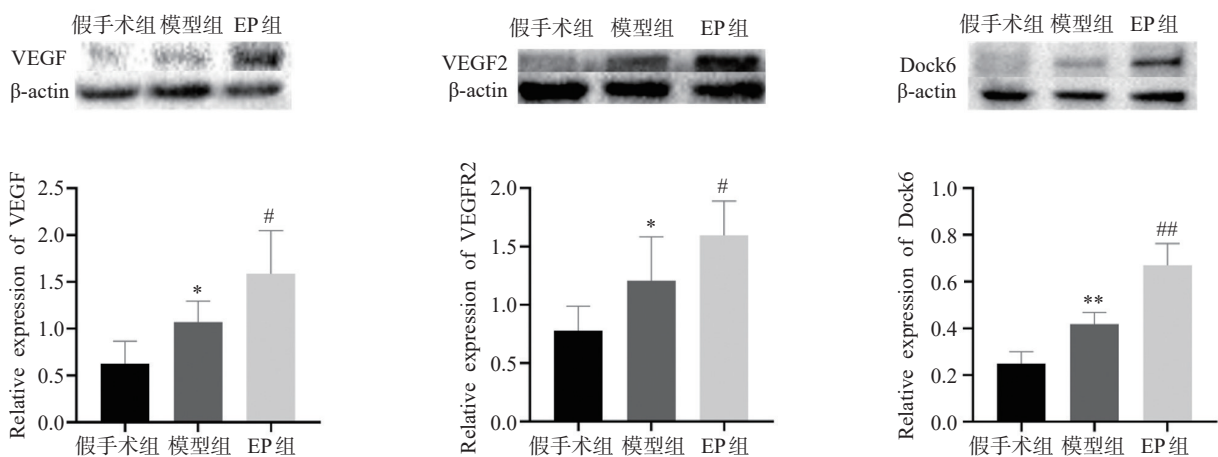
3 讨论

脑缺血再灌注后形成CI/RI是造成脑梗死继发性损伤的主要病理过程,脑梗死后的血流再灌可能加剧脑损伤,导致神经功能缺损障碍进一步加重^[3]。进行适当的体育锻炼有利于减轻缺血再灌注损伤^[16-17]。运动预处理可刺激机体血氧重新分配诱发脑缺血耐受,从而发挥脑保护作用,减缓脑缺血再灌注时出现的一系列脑组织病理损伤^[18]。本实验结果也显示,与假手术组相比,模型组大鼠Zea-Longa评分、mNSS评分和脑梗死体积百分比均显著增大($P < 0.01$),而EP组大鼠Zea-Longa评分、mNSS评分和脑梗死体积百分比相较于模型组减小($P < 0.05$)。组织形态学结果显示,模型组大鼠缺血侧大脑皮质组织结构排列紊乱,水肿严重,大量炎细胞浸润,神经元数量减少。与模型组相比,EP组大鼠缺血侧大脑皮质组织层次尚清晰,水肿减轻,炎细胞浸润明显减少,神经元数量相对较多。血管内皮细胞特异性

2.6 各组大鼠缺血侧脑组织 VEGF、VEGFR2 和 Dock6 的蛋白质免疫印迹结果比较

与假手术组相比,模型组大鼠缺血侧大脑皮质中 VEGF ($P < 0.05$)、VEGFR2 ($P < 0.05$)、Dock6 ($P < 0.01$)明显升高;与模型组相比,运动预处理组大鼠缺血侧大脑皮质中 VEGF ($P < 0.05$)、VEGFR2 ($P < 0.05$)、Dock6 ($P < 0.01$)进一步升高。见图6。

图6 各组大鼠造模72h后大脑皮质 VEGF、VEGFR2、Dock6 蛋白表达水平比较

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

标志物 CD31 免疫组化结果显示,模型组大鼠缺血侧大脑皮质 CD31 较假手术组表达明显增高 ($P<0.01$),提示缺血缺氧损伤后,脑组织会发生适应性血管新生,这与既往研究结果一致^[19]。与模型组相比,EP 组大鼠 CD31 表达进一步增高 ($P<0.01$),提示运动预处理可促进 MCAO 再灌注大鼠缺血侧大脑皮质血管新生。表明运动预处理可改善大鼠神经功能缺损症状,有效减轻 MCAO 再灌注大鼠脑梗死体积,发挥脑保护作用,且与血管新生密切相关。同类研究也支持上述研究结果,Zhang 等^[20]发现缺血前进行跑步机训练可明显减少神经功能缺损和脑梗死体积。Curry 等^[21]观察到缺血前跑步机训练可显著减少 SD 大鼠神经功能缺损、脑梗死体积和炎细胞浸润,抑制脑梗死后炎症反应。这种多次、短暂的缺血所诱导的机体内源性神经保护作用可能是减轻缺血再灌注损伤的关键。Ding 等^[22]观察到运动预处理可促进缺血半暗带区脑组织血管有效新生,诱导脑缺血耐受从而改善脑缺血再灌注大鼠的脑梗死程度,发挥神经保护作用,提高机体的抗病和适应能力。因此,上述实验结果初步证实 EP 防治缺血性脑卒中可能与促进缺血侧大脑皮质血管新生有关。

VEGF 是促进内皮细胞增殖、存活、迁移和成管的关键因子,通过特异性作用于血管内皮细胞,与内皮细胞表面的相应受体相结合,从而调控血管生成^[23]。VEGFA 因其强大的血管生成作用,在缺血性脑卒中治疗中备受关注。VEGFA 可作用于血管内皮细胞(endothelial cells, ECs),主要通过 ECs 表面的 VEGFR2 受体结合将胞外信号传递至胞内,引发一系列信号转导,促进 ECs 增殖、存活、迁移与成管,调控血管新生^[5,24]。本实验以 VEGF/VEGFR2 信号通路为切入点展开研究,VEGF、VEGFR2 的蛋白质免疫印迹结果显示,模型组大鼠缺血侧大脑皮质中 VEGF ($P<0.05$)、VEGFR2 ($P<0.05$) 较假手术组表达均升高;与模型组相比,运动预处理组大鼠缺血侧大脑皮质中 VEGF ($P<0.05$)、VEGFR2 ($P<0.05$) 蛋白表达进一步升高,提示 VEGF/VEGFR2 信号通路可能在这一过程中发挥了重要作用。同类研究也支持上述研究结果,静脉注射 VEGF 可增加大鼠缺血半暗带区脑组织微血管密度^[25],这说明 VEGF/VEGFR2 信号通路在调节缺血后血管新生方面起关键作用。

内皮细胞(endothelial cells, ECs)迁移是缺血半暗带区脑组织血管新生的重要环节,该过程受一系列复杂的信号转导通路共同调控^[26]。Rho GTPases 是 ECs 迁移的关键因子,是肌动蛋白和微管细胞骨架的中心调节者,以其在调节细胞迁移中的作用而闻名,而 Rac1、Cdc42 是典型的 Rho GTPases 家族成员^[27]。研究表明,鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanosine-nucleotide exchange factors, GEFs)位于 VEGFR2 下游并受其调控,可催化 Rho GTPases 由非活性 GDP 结合构象转化为活性的 GTP 结合构象,刺激 ECs 迁移^[28-29]。Dock6 是 GEFs 家族成员,可特异性激活 Rac1 与 Cdc42,活化的 Rac1 与 Cdc42 通过调控下游信号分子诱导 ECs 层状伪足和丝状伪足的形成来刺激细胞迁移,最终导致血管新生^[6,30]。本实验 Dock6 的蛋白质免疫印迹结果显示,模型组大鼠缺血侧大脑皮质中 Dock6 ($P<0.01$) 较假手术组表达显著升高;与模型组相比,运动预处理组大鼠缺血侧大脑皮质中 Dock6 ($P<0.01$) 蛋白表达进一步升高。提示 VEGF 与 VEGFR2 结合后可上调下游 Dock6 的表达,促进内皮细胞迁移,调控血管新生,发挥神经保护作用,减轻脑缺血再灌注损伤。因此,提示 VEGF/VEGFR2/Dock6 信号通路可能介导了运动预处理促进 MCAO 模型大鼠缺血侧大脑皮质血管新生这一作用。

综上所述,运动预处理防治缺血性脑卒中可能是通过激活 VEGF/VEGFR2/Dock6 信号通路,促进缺血侧大脑皮质内皮细胞迁移,从而促进血管新生,发挥神经元保护作用,改善 MCAO 大鼠神经功能缺损症状,减轻脑缺血再灌注损伤。为运动预处理促进缺血性脑卒中血管新生提供了一定的理论支持。

为了更进一步确定 VEGF/VEGFR2/Dock6 信号通路在运动预处理促进缺血侧脑组织血管新生的作用机制,后续将通过设置其信号通路关键蛋白的阻断剂或激动剂展开进一步研究,为临床上制定脑缺血防治方案提供良好的理论基础。

参考文献

- [1] Mendelson SJ, Prabhakaran S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: a review[J]. JAMA, 2021,325(11):1088—1098.
- [2] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经

- 科杂志, 2018,51(9): 666—682.
- [3] LIN L, WANG X, YU Z. Ischemia-reperfusion injury in the brain: mechanisms and potential therapeutic strategies [J]. *Biochem Pharmacol* (Los Angel), 2016,5(4):213.
- [4] Lapi D, Colantuoni A. Remodeling of cerebral microcirculation after ischemia-reperfusion[J]. *J Vasc Res*, 2015,52(1): 22—31.
- [5] Chen B, Zhang Y, Chen S, et al. The role of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke[J]. *Pharmazie*, 2021,76(4):127—131.
- [6] Hernández-García R, Iruela-Arispe ML, Reyes-Cruz G, et al. Endothelial RhoGEFs: a systematic analysis of their expression profiles in VEGF-stimulated and tumor endothelial cells[J]. *Vascul Pharmacol*, 2015,74:60—72.
- [7] Miyamoto Y, Torii T, Yamamori N, et al. Akt and PP2A reciprocally regulate the guanine nucleotide exchange factor Dock6 to control axon growth of sensory neurons[J]. *Sci Signal*, 2013,6(265):ra15.
- [8] Hafez S, Eid Z, Alabasi S, et al. Mechanisms of preconditioning exercise-induced neurovascular protection in stroke [J]. *J Stroke*, 2021,23(3):312—326.
- [9] Zhang Q, Zhang L, Yang X, et al. The effects of exercise preconditioning on cerebral blood flow change and endothelin-1 expression after cerebral ischemia in rats[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2014,23(6):1696—1702.
- [10] 裴飞, 王雪冬, 李保龙, 等. 运动预处理对脑缺血再灌注大鼠 VEGF、NeuN 蛋白表达的影响[J]. *康复学报*, 2021,31(1): 37—43.
- [11] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *Nosotchu*, 1986, 8:1—7.
- [12] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989,20(1):84—91.
- [13] Ashwal S, Tone B, Tian HR, et al. Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Stroke*, 1998,29(5):1037—1047.
- [14] 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.
- [15] Shim Y, Nam MH, Hyuk SW, et al. Concurrent hypermulticolor monitoring of CD31, CD34, CD45 and CD146 endothelial progenitor cell markers for acute myocardial infarction[J]. *Anal Chim Acta*, 2015,853:501—507.
- [16] Hung SH, Ebaid D, Kramer S, et al. Pre-stroke physical activity and admission stroke severity: a systematic review [J]. *Int J Stroke*, 2021,16(9):1009—1018.
- [17] Hooker SP, Diaz KM, Blair SN, et al. Association of accelerometer-measured sedentary time and physical activity with risk of stroke among US adults[J]. *JAMA Netw Open*, 2022,5(6): e2215385.
- [18] Aboutaleb N, Shamsaei N, Khaksari M, et al. Pre-ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation[J]. *J Physiol Sci*, 2015,65(5):435—443.
- [19] Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia[J]. *Angiogenesis*, 2008,11(2):121—140.
- [20] Zhang F, Jia J, Wu Y, et al. The effect of treadmill training pre-exercise on glutamate receptor expression in rats after cerebral ischemia[J]. *Int J Mol Sci*, 2010,11(7): 2658—2669.
- [21] Curry A, Guo M, Patel R, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation in stroke via tumor necrosis factor- α , extracellular signal-regulated kinase 1/2 and matrix metalloproteinase-9 activity[J]. *Neurol Res*, 2010, 32(7):756—762.
- [22] Ding Y, Li J, Luan X, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin[J]. *Neuroscience*, 2004,124(3):583—591.
- [23] Hoebe A, Landuyt B, Highley MS, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis[J]. *Pharmacol Rev*, 2004,56(4):549—580.
- [24] Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: binding and signalling at VEGFR2[J]. *Int J Mol Sci*, 2018,19(4):1264.
- [25] 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.
- [26] Ahir BK, Engelhard HH, Lakka SS. Tumor development and angiogenesis in adult brain tumor: glioblastoma[J]. *Mol Neurobiol*, 2020,57(5):2461—2478.
- [27] Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015,36:103—112.
- [28] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al. VEGF receptor signalling - in control of vascular function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006,7(5):359—371.
- [29] Garrett TA, Van Buul JD, Burridge K. VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2[J]. *Exp Cell Res*, 2007,313(15):3285—3297.
- [30] Li X, Jiang M, Chen D, et al. miR-148b-3p inhibits gastric cancer metastasis by inhibiting the Dock6/Rac1/Cdc42 axis[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018,37(1):71.