

· 基础研究 ·

当归多糖对大鼠缺血性脑损伤后血管生成素表达的影响*

胡晓琴¹ 廖维靖^{1,2} 杨万同¹ 江城¹ 周琴¹ 程明高¹ 毕博¹

摘要 **目的:**观察大鼠短暂缺血性脑损伤后,当归多糖对血管生成素-1(angiotensin-1,Ang-1)和血管生成素-2(angiotensin-2,Ang-2)表达的影响。**方法:**采用 Wistar 雄性大鼠 60 只,体重 180±15g,随机分为当归多糖治疗组(治疗组)25 只,缺血对照组(对照组)25 只,假手术组 10 只,制作右大脑中动脉血供阻断(MCAO)模型,缺血 2h 后,恢复灌注。通过免疫组织化学方法观察血管生成素-1 和-2 在缺血损伤再灌注后 6h,12h,1d,3d,7d 的变化。**结果:**3 组 Ang-1 均持续中等强度表达,组间差异无显著性意义($P>0.05$);Ang-2 在治疗组和对照组中均有表达,除 6h 亚组外,治疗组其他亚组梗死灶周围 Ang-2 蛋白表达水平比对照组相应时间点明显增强,差异有显著性意义($P<0.05$),假手术组 Ang-2 蛋白表达极弱。**结论:**大鼠短暂缺血性脑损伤后,当归多糖能显著促进 Ang-2 的表达。

关键词 当归多糖;缺血性脑损伤;血管生成素-1;血管生成素-2

中图分类号:R493,R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-03-0204-03

Effects of Angelica polysaccharide on the expression of angiotensin after the ischemic brain injury in rats/HU Xiaolin, LIAO Weijing, YANG Wantong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006, 21 (3): 204—206

Abstract Objective:To investigate the effects of Angelica polysaccharide (APS) on the expression of angiotensin-1 and angiotensin-2 in the cerebral tissue after the ischemic brain injury in rats.**Method:**Sixty male Wistar rats with average body weight of 180±15g were randomly divided into three groups:ischemic control group (n=25)underwent middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 2 hours, Angelica sinensis group (n=25)underwent MCAO for 2 hours and treatment with 0.5% APS(0.9ml/100g, i.p.), and sham-operation group(n=10).The immunohistochemistry staining was used to observe angiotensin-1(Ang-1) and angiotensin-2(Ang-2) in the cerebral tissue, which had close relation with angiogenesis in the brain tissues,among the three groups at 6h, 12h, 1d, 3d, 7d after reperfusion, respectively.**Result:**Except at 6h,the expression of Ang-2 in the APS group was higher than that in the control group at the other time points, and the difference between the groups was significant($P<0.05$).There was almost no expression of Ang-2 in the sham-operation group.The expressions of Ang-1 in the three groups were widely, and there was no difference between the three groups($P>0.05$).**Conclusion:**After the ischemic brain injury in rats, the Angelica polysaccharide(APS) can improve the expression of Ang-2 in the cerebral tissue.

Author's address Dept. of Rehabilitation Medicine, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, 430071

Key words Angelica polysaccharide;ischemic brain injury;angiotensin-1;angiotensin-2

研究发现,我国传统活血化瘀药当归能有效治疗脑血管疾病,但具体的有效成分尚不清楚。血管生成素-1(angiotensin-1,Ang-1)能保持血管内皮的稳定性,促进血管成熟。血管生成素-2(angiotensin-2,Ang-2)通过拮抗 Ang-1 的生物功能,降低血管的稳定性,使血管重新进入可塑性强和不稳定状态^[1-2]。本研究对缺血性脑损伤再灌注后的大鼠给予当归的主要成分之一——当归多糖注射液治疗,通过免疫组织化学方法观察 Ang-1 和 Ang-2 的变化,研究当归多糖对缺血再灌注后血管生成的影响,为当归治疗缺血性脑损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组:雄性 Wistar 大鼠 60 只,SPF 级,体重 180±15g,购于湖北省实验动物研究中心(合格证号 0038850)。实验大鼠随机分为当归多糖治疗组 25 只,生理盐水对照组 25 只,假手术组 10 只。按再灌注后 6h,12h,1d,3d,7d 各组又随机分

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30271671)

1 武汉大学中南医院康复医学科,武汉大学医学院脑血管病研究中心,武汉市,430071

作者简介:胡晓琴,女,硕士在读

2 通讯作者:廖维靖(武汉大学中南医院康复医学科,武汉大学医学院脑血管病研究中心,武汉市,430071)

收稿日期:2006-01-08

为 5 个亚组, 治疗组和对照组每个亚组 5 只, 假手术组每个亚组 2 只。

1.1.2 主要试剂: Ang-1 和 Ang-2 兔抗多克隆抗体, 武汉博士德生物技术公司提供; SP 试剂盒购自北京中杉生物技术公司; 当归多糖由武汉大学当归研发办公室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 大脑中动脉阻断(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型的制作: 参照廖维靖等^[3]大鼠大脑中动脉缺血模型的方法进行造模。假手术组插入深度小于 10mm。栓塞 2h 后将线栓退至颅外。术中保持肛温在 37℃—37.5℃。术后将动物置日光灯下保暖直至动物清醒, 而后置于放有清洁垫料的饲养盒, 自由饮水、进食。

1.2.2 大鼠 MCAO 模型的神经功能评分: 采用 Bederson 方法^[4]进行神经功能缺损评分, 标准为: 0 分, 无任何神经功能缺失; 1 分, 左前肢不能伸展, 提尾试验阳性; 2 分, 向左侧行走; 3 分, 向左侧转圈, 成追尾状。评分为 1—3 分的动物列入本研究。

1.2.3 给药方法: 治疗组于缺血再灌注后 10min 内腹腔注射 0.5% 当归多糖注射液(剂量: 0.9ml/100g), 以后每日 1 次至动物取材, 缺血对照组每日注射相同剂量生理盐水, 假手术组不给予任何处理。

1.2.4 脑组织处理及切片: 各组动物于各相应时间点取材, 先用生理盐水经心脏冲洗, 然后用 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注固定, 断头取脑, 置于 4% 多聚甲醛灌注液中后固定 12h, 经视交叉后 1mm 处作冠状切片, 片厚 2mm, 依次脱水、透明、浸蜡及包埋, 行 4μm 厚连续切片, 分 3 套切片。

1.2.5 免疫组织化学和 HE 染色: 两套切片分别常

规行 Ang-1、Ang-2 的 SP 法染色, 中间一套切片行 HE 染色。染色步骤按说明书进行, Ang-1、Ang-2 的浓度均为 1:100, DAB 显色。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片观察。胞浆有棕黄色或棕褐色颗粒者为阳性细胞。

1.2.6 图像分析: SP 法进行免疫组化染色后, 光镜下观察, 阳性细胞染色呈棕黄色或棕褐色, 着色部位多为胞浆。每例动物测 1 张切片, 每张切片在梗死灶周围随机选取 10 个高倍镜视野进行测量, 不同的动物取相同的脑区。每个视野计数 100 个细胞, 计算平均阳性细胞率(阳性细胞数/计数细胞总数)×100%。

1.3 统计学分析

所得数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS11.5 软件, 组间比较用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 组织病理变化

HE 染色显示, 治疗组和对照组脑组织缺血核心区发生液化性坏死, 大量神经元消失, 细胞体肿胀, 胞核缩小, 偏位, 深染, 在缺血周边半暗带区, 神经细胞发生凝固性坏死, 神经元胞体收缩为三角形或多角形, 胞浆向内收缩, 部分伴水肿。除 6h 外, 在其他各时间点, 治疗组的病理改变比对照组轻, 假手术组无明显变化。

2.2 Ang-1 蛋白表达变化

在 3 组脑组织中均存在 Ang-1 蛋白广泛中强度表达。主要表达于皮层及基底节的神经元和血管内皮细胞, 免疫阳性细胞为棕黄色颗粒, 主要位于胞浆, 3 组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$)(图 1)。

A 缺血对照组

B 当归多糖治疗组

C 假手术组

图 1 各组实验动物再灌注 1d 时 Ang-1 的表达

2.3 Ang-2 蛋白表达变化

在对照组和治疗组中 Ang-2 蛋白均有表达, 表达的部位主要为缺血病灶和缺血区周边缺血半暗带, 表达的细胞主要为神经元, 神经胶质细胞(星型胶质细胞和少突胶质细胞)和血管内皮细胞, 在再灌

注 6h 后在病灶内的一些单个细胞内出现, 12h 表达加强, 1d 时达到高峰, 以后逐渐下降, 一直持续到再灌注 7 天。除 6h 组以外, 在其他相应的时间点, 治疗组的 Ang-2 蛋白表达均比对照组的蛋白表达多($P < 0.05$)。假手术组表达极弱(图 2—3)。

A 当归多糖治疗组

B 缺血对照组

C 假手术组

图 2 各组实验动物再灌注 1 d 时 Ang-2 的表达

图 3 各组实验动物 Ang-2 的表达示意图

3 讨论

血管生成素家族主要由 Ang-1, Ang-2, Ang-3 和 Ang-4 组成, 本次实验所研究的 Ang-1, Ang-2 与血管生成密切相关。具有免疫球蛋白和表皮细胞因子相同结构域的酪氨酸蛋白激酶-2 (tyrosine kinase with immunoglobulin and epide growth factor homology domain-2, Tie-2) 是一种受体, 能够与血管生成素家族成员特异性结合, 被称为 Ang/Tie-2 系统^[9]。它在新生血管的形成、重塑和成熟等过程中起重要的调节作用。Ang-1 是由血管内皮细胞周围的支持细胞合成, 能保持血管内皮的稳定性, 促进血管成熟, 其机制可能为: ①通过旁分泌作用, 与附近血管内皮细胞膜上 TIE-2 受体特异性结合后, 引起 Tie-2 磷酸化, 激活 PI3-激酶^[6-7], 提高胞内 1,4,5-三磷酸肌醇和 3,4,5-三磷酸肌醇的含量, 活化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 B (Ser/Thr protein kinase B, PKB/Akt)^[8], 抑制细胞的凋亡, 减少血管的萎缩和退化的发生^[9-10]。②对内皮细胞还具有趋化性, 吸引血管内皮细胞向 Ang-1 浓度高的地方 (即血管受损的地方) 迁移, 加速血管内皮层的愈合^[11]。③能促进血小板内皮细胞黏附蛋白 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) 和血管内皮细胞钙粘附蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-Cadherin) 在血管内皮细胞中的累积, 抑制其磷酸化, 增强内皮细胞间的连接强度^[12-13]。④促进胞浆素和金属基质蛋白酶-2 (MMP-2) 的分泌, 促进基底膜降解, 从而促进内皮迁移和管状结构的形成, 诱导新生血管的形成^[6]。血管生成素-2 (Ang-2) 主要拮抗 Ang-1 的生物功能,

降低血管的稳定性, 促进血管重新进入不稳定性和可塑性强的状态, 促进血管的新生^[1-2]。而且 Ang-2 对血管生成的影响与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等促进血管生成因子的存在有关。如存在 VEGF, Ang-2 促进血管新生和血管重建, 形成新的毛细血管, 如局部缺乏 VEGF, Ang-2 则促进内皮细胞的死亡和血管退化^[2, 14]。

当归是我国传统的活血化瘀药, 研究表明当归可降低血小板聚集, 改善血液流变学, 有显著的改善血液循环及抗血栓形成等作用。当归多糖是从当归中提取的多糖成分, 研究显示当归多糖成分可影响造血系统, 促进造血^[15]。本研究发现治疗组比缺血组的病理改变要轻, 且免疫组化实验中治疗组比对照组的 Ang-2 蛋白表达显著增强, 提示当归多糖的作用机制可能与上调 Ang-2 蛋白表达有关。其机制可能是: ①促进 Ang-2 基因的大量表达; ②能提高 Ang-2 的竞争能力, 使 Ang-2 与细胞膜上 Tie-2 受体结合增多, 拮抗 Ang-1, 降低血管的稳定性; ③提高组织内血管内皮生长因子的表达。高浓度 VEGF 和 Ang-2 蛋白若同时表达, 血管将大量增生。研究发现, VEGF 在 MCAO 再灌注后 3 h 开始出现, 6 h 表达增强, 1 d 达高峰^[16], 这与本实验 Ang-2 蛋白表达的时间一致。在本实验中 Ang-1 在 3 组中均持续广泛的表达, 3 组间的无显著性差异。原因可能是脑受损后, Ang-1 mRNA 的表达增强, 但是转录延迟。

4 结论

大鼠短暂缺血性脑损伤后, 当归多糖能显著促进 Ang-2 的表达, 拮抗 Ang-1 的生物活性, 增加血管可塑性, 促进新血管生成。

参考文献

- [1] Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, et al. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF [J]. *Oncogene*, 1998, 18 (38): 5356-5362.
- [2] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation [J]. *Nature*, 2000, 407

(下转 230 页)