

文章编号: 1003-2754(2004)04-0292-03

局灶性脑缺血大鼠脑内 Angiogenin 表达水平的变化

郭淮莲¹, 黄丽¹, 程敏¹, 伊鸣², 万有³

摘要: 目的 脑梗死患者存活时间与脑内血管增生程度相关。血管生长素(angiogenin)具有促血管生成作用。本研究旨在观察大鼠脑缺血后血管生长素在脑内表达水平的变化。方法 大鼠大脑中动脉栓塞法(MCAO 法)制作局灶性脑缺血模型, 脑切片免疫组织化学检测血管生长素蛋白表达。结果 血管生长素在正常大鼠脑中普遍弱阳性表达, 脑膜、室管膜及血管染色较为明显。脑缺血后6h 缺血脑区血管生长素表达水平明显增强($P < 0.01$), 缺血24h 内血管生长素表达水平逐渐升高。结论 脑缺血可诱导缺血脑区血管生长素蛋白表达增强。

关键词: 血管生长素; 脑缺血

中图分类号: R 743.3

文献标识码: A

The change of the expression of angiogenin in ischemic brain after focal brain ischemia GUO Huailelian, HUANG Li, CHEN G M in, et al (Department of Neurology, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China)

Abstract Objective Previous study has shown that longer survival of the cerebral infarction patients is correlated with increase in neovascularization. Angiogenin is one of the most potent inducers of vascular growth. The purpose of this study is to observe the change of the expression level of angiogenin in the brain after brain ischemia. **Methods** Brain ischemia model was produced with the left middle cerebral artery occlusion (MCAO) model in rats. The expression of angiogenin was identified by immunohistochemistry with anti-angiogenin antibody. **Results** Angiogenin was expressed weakly but widely in rat brain, the expression was relatively strong in cerebral pia mater, ependyma, and vessels. The expression of angiogenin was significantly increased ($P < 0.01$) in ischemic brain 6h after MCAO, and the expression level was increased further with in 24h. **Conclusions** The angiogenin expression is increased in the ischemic brain after brain ischemia.

Key words Angiogenin; Brain ischemia

Krupinski 等人研究发现脑梗死患者缺血脑区微血管密度显著升高, 患者存活时间与缺血区血管增生程度相关^[1]。脑缺血后梗死灶周围血管通过新生血管供应缺血组织有助于缺血后神经功能恢复^[2]。补充外源性促血管生成因子可引起缺血脑区血管数目增加, 并可减轻缺血性损害^[3~5]。血管生长素(angiogenin, ANG)是由123个氨基酸组成的相对分子量为14400的碱性蛋白, 具有很强的诱导新生血管生成和生长的作用^[6]。ANG由肝脏、外周血细胞、内皮细胞、成纤维细胞和肿瘤细胞产生, 正常人血中可检测到ANG^[7,8]。ANG与脑缺血之间的关系尚未见报道。本研究观察了大鼠局灶性脑缺血后脑内ANG表达的变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 ANG 抗体(美国 Santa Cruz 公司); 二步法免疫组织化学检测试剂盒(北京中山公司)。显微镜(德国 Leica 公司)观察并照相, 采用 Leica Q 550 CW 图像分析系统和 Leica Qwin 软件(德国 Leica 公司)测定鼠脑切片免疫组化染色结果的平均光密度值。

1.2 实验动物 健康雄性Wistar 大鼠由北京

大学医学部实验动物科学部提供, 体重280~350g。采用线栓法制作左侧大脑中动脉梗死模型(left middle cerebral artery occlusion, MCAO)^[9, 10]。

1.3 实验分组 大鼠随机分为正常对照组4只, MCAO 组12只(缺血6h 组、18h 组、24h 组各4只)。

1.4 免疫组化染色法检测 ANG 蛋白表达水平 各组大鼠于术后6h、18h、24h 用10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.35g/kg), 先后用生理盐水和4%多聚甲醛经左心室灌流固定后取脑, 置4%多聚甲醛过夜, 再依次置20%和30%蔗糖中脱水, OCT 包埋, 冰冻切片。按照北京中山公司提供的二步法免疫组化检测试剂盒操作步骤进行染色。另取一套切片进行HE 染色。

1.5 平均光密度值测定 免疫组化染色结果在 Leica 显微镜下观察并照相, Leica Q 550 CW 图像

收稿日期: 2004-05-14; 修订日期: 2004-06-17

作者单位: (1. 北京大学人民医院神经内科, 北京 100044; 2. 北京大学医学部97级本科生, 北京 100083; 3. 北京大学神经科学研究所, 北京 100083)

分析系统和Leica Qwin 软件测定免疫组化染色结果的平均光密度值。分别测量每只大鼠左侧大脑皮层和右侧大脑皮层的平均光密度值。每只大鼠测量四张脑片, 取平均值。

1.6 统计学分析方法 数据以均值±标准差($\bar{X} \pm s$)表示。实验结果采用 Prism 3.0软件进行统计学分析。多组数据均数间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA), $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结 果

2.1 ANG 在正常及局灶性脑缺血大鼠脑中的表达情况 免疫组化染色结果显示, 正常大鼠脑内几乎所有区域均见淡棕色, 其中软脑膜、室管膜及血管染色较为明显(见图A)。大鼠脑缺血后6h, 缺血大脑半球大脑中动脉供血区(皮层及基底节)ANG 表达明显增强(见图B), 缺血后18h(见图C) 及24h(见图D)上述区域ANG 表达进一步增强。脑缺血6h、18h、24h 组大鼠缺血对侧(右侧)大脑ANG 表达未见增强。(缺血18h 组有一只大鼠术后死亡, 剔除)。

图像分析结果表明: 缺血6h、18h、24h 组大鼠缺血侧大脑皮层ANG 表达(免疫组化染色平均光密度值)均显著高于缺血对侧大脑皮层($P < 0.01$)及正常对照组大鼠左侧大脑皮层($P < 0.01$)(见表1)。缺血18h 组和24h 组大鼠缺血侧大脑皮层ANG 表达(免疫组化染色平均光密度值)均显著高于缺血6h 组大鼠缺血侧大脑皮层(P 值分别为 < 0.05 和 < 0.01)(见表1)。缺血24h 组大鼠缺血侧大脑皮层ANG 表达高于缺血18h 组, 但差别未达显著性意义($P > 0.05$)。

表1 大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)后不同时间点
缺血侧和缺血对侧大脑皮层ANG 表达情况
(免疫组织化学染色平均光密度值, $\bar{X} \pm s$)

	缺血对侧皮层(右侧)	缺血侧皮层(左侧)
正常对照组(n=4)	0.153±0.001	0.154±0.002
MCAO 6h 组(n=4)	0.155±0.002*	0.171±0.004#
MCAO 18h 组(n=3)	0.156±0.002*	0.176±0.004#
MCAO 24h 组(n=4)	0.154±0.001*	0.178±0.005#

与缺血侧皮层比较 * $P < 0.01$; 与正常对照组左侧皮层比较 # $P < 0.01$; 与MCAO 6h 组左侧皮层比较 $P < 0.05$, $P < 0.01$

2.2 脑缺血后脑组织病理学变化 HE 染色结果显示: 正常对照组大鼠大脑皮层神经元呈三角形或多角形, 细胞核染色均匀, 核仁清楚, 核膜完整, 间质无水肿。局灶性脑缺血6h、18h、24h 组大鼠缺血侧大脑半球大脑中动脉供血区表现为间质水肿及神经元胞体缩小、细胞核固缩浓染、核仁不清、胞浆疏松。

神经元缺血性改变及间质水肿随缺血时间延长而逐渐加重。

3 讨 论

Angiogenin 是一种单链的碱性蛋白, 是核糖核酸酶超家族的一员^[11], 除具有核糖核酸酶活性外, 还具有促血管生成(angiogenesis)活性。脑缺血后脑内血管生成情况与神经功能恢复之间的关系逐渐引起人们的注意。Krupinski 等研究发现脑缺血患者脑内新生血管数目越多则生存时间越长^[1]。因此, 研究脑缺血后血管生成因子的变化规律有助于进一步了解脑缺血的病理机制, 并有助于探索新的治疗脑缺血的方法。VEGF^[12, 13]、bFGF^[3, 4]及 TGF-β^[13]等具有促血管生成作用的因子与脑缺血的关系已见报道。研究发现脑缺血大鼠缺血脑区 VEGF 和 bFGF 水平升高^[12, 14], 脑缺血患者血中 VEGF 水平升高^[13], 适量外源性 bFGF 或 VEGF 对脑缺血有保护作用^[4, 5]。ANG 具有很强的促血管生成作用, 但 ANG 与脑缺血的关系尚未见报道。本研究观察了 ANG 在正常及缺血大鼠脑中的表达情况。

ANG 在正常对照组大鼠脑中呈弱阳性表达(见图A), 提示ANG 在正常脑组织中普遍存在。由图及表1可见, 局灶性脑缺血6h 后缺血脑区ANG 蛋白表达已明显升高, 缺血24h 内ANG 蛋白表达水平随脑缺血时间延长而进一步升高, 提示缺血可诱导ANG 蛋白表达。大量研究证实ANG 可诱导血管生成^[6, 11], 因此, 脑缺血后缺血脑区ANG 蛋白表达升高应有助于缺血区新生血管形成。推测缺血后ANG 表达升高对缺血脑组织具有保护作用。脑缺血可诱导ANG 表达升高, 但缺血后ANG 表达呈逐渐升高, 如能在脑缺血后尽早补充ANG, 有可能促进缺血脑组织功能恢复。

HE 染色结果显示缺血24h 以内随缺血时间延长脑组织缺血性损害逐渐加重, 同时, 缺血脑区ANG 表达水平也逐渐升高, 提示ANG 表达水平与缺血性损害的严重程度有关。因本研究采用的是持续性脑缺血模型(没有再灌注), 缺血大鼠多在48h 内死亡, 因此本研究仅观察了缺血后24h 内的ANG 变化。脑缺血24h 以后ANG 表达水平变化规律尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke [J]. Stroke, 1994, 25 (9): 1794-1798.
- [2] 郑国庆, 黄培新 血管生成与脑梗死[J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(2): 184-186.
- [3] Lyons M, Anderson R, Meyer F. Basic fibroblast growth factor promotes in vivo cerebral angiogenesis in chronic forebrain ischemia

- [J]. Brain Res, 1991, 558(2): 315-320.
- [4] Liu X, Zhu XZ. Basic fibroblast growth factor protected forebrain against ischemia-reperfusion damage in rats [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1998, 19(6): 527-530.
- [5] Sun Y, Jin K, Xie L, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia [J]. J Clin Invest, 2003, 111(12): 1843-1851.
- [6] 岳玉环, 姜力, 许崇波, 等. 人血管生成素基因的克隆与表达 [J]. 中国生物制品学杂志, 2001, 14(3): 136-138.
- [7] Charelli F, Pomilio M, Mohn A. Serum angiogenin concentrations in young patients with diabetes mellitus [J]. Eur J Clin Invest, 2002, 32(2): 110-114.
- [8] Brunner B, Gunsilius E, Schumacher P, et al. Blood levels of angiogenin and vascular endothelial growth factor are elevated in myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia [J]. J Hematother Stem Cell Res, 2002, 11(1): 119-125.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] 郭淮莲, 董为伟. 脑缺血大鼠脑内 II型磷脂酶 A2 mRNA 表达 [J]. 中风与神经疾病杂志, 1997, 11(4): 194-196.
- [11] 盛继群, 刘建平, 谢毅. 血管生成因子及其应用 [J]. 孝感师专学报(自然科学版), 1999, 19(4): 72-75.
- [12] Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, et al. VEGF and flt expression time kinetics in rat brain infarct [J]. Stroke, 1996, 27(10): 1865-1873.
- [13] Slevin M, Krupinski J, Szwik A, et al. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β in serum of patients with acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2000, 31(8): 1863-1870.
- [14] Chen H, Chien C, Liu M. Correlation between angiogenesis and basic fibroblast growth factor expression in experimental brain infarct [J]. Stroke, 1994, 25(8): 1651-1657.

(本文图见加页)

文章编号: 1003-2754(2004)04-0294-01

中图分类号: R 747.4

红斑性肢痛症并系统性红斑狼疮1例报告

程卫东

患者,女,52岁,农民。因双足阵发性疼痛1年,加重半月入院。患者1年前无诱因出现双足底疼痛,足底局部皮肤发红、发热、肿胀、针刺样疼痛,剧烈难忍,症状持续1小时左右完全自行缓解。此后,上述症状反复发作,有时累及足背、小腿等部位,常因站立、行走时间长、气候炎热、温水洗脚等因素诱发,且夜间发作次数多,局部按摩、冷敷能使红、肿、痛减轻。因精神受刺激病情加重,疼痛持续数小时不能缓解入院。发病以来无发热,生育三子,一子患再生障碍性贫血。入院查体:T 36.8℃,P 90次/分,呼吸正常,血压150/90mmHg,全身皮肤黏膜正常,心律不齐,可闻及早博,双肺呼吸音粗,可闻及干湿性罗音,腹部正常,脊柱、四肢关节正常,颅神经正常,颈软,四肢肌力、肌张力正常,腱反射(+),病理征(-),感觉系统共济运动正常,克氏征(-)。辅助检查:血常规:WBC $16 \times 10^9/L$, 中性粒细胞84%, 淋巴细胞10.6%, 血小板 $30 \times 10^{12}/L$; 尿常规:潜血(+), 白细胞(+), 蛋白(+), 24小时尿蛋白定量0.65g/L, 见细胞管型; 血生化: K 4.46mmol/L, Na 126mmol/L, Ca 1.98mmol/L; 肝功能: 总蛋白50g/L, 白蛋白25g/L, 血沉86mm/h, 类风湿因子(-), 抗(O)正常; 胸部X线检查: 双下肺可见片状浸润阴影; 心电图: 心率96次/分, 频发房性早搏, 有时呈二联律, 双足、踝、膝关节X线检查正常。入院诊断: 红斑性肢痛症, 肺部感染, 高血压病, 泌尿系感染。入院后给予抗菌素、普奈洛尔治疗, 足部疼痛明显减轻, 停止发作。但患者体温逐渐升高, 最高达39.6℃, 并出现四肢末端麻木、无力, 且迅速加重。腰椎穿刺检查: 压力100mmH₂O、脑脊液: 常规正常, IgG 合成率正常, 寡克隆区带(-); 头部MRI: 右颞叶可见条片状异常信号, 在T₁WI及FLAIR序列上呈高信号, 在T₂WI上呈稍低信号, 病变区灰质及白质同时受累, 占位征象不明显, 考虑血管炎性病变。复查三大常规

肝、肾功能、血沉大致同入院时, 腹部B超正常, 甲胎蛋白(AFP)定性(-), 定量7ng/ml, 抗双链DNA抗体(dsDNA)阳性、抗SM抗体(阳性)、抗核抗体(ANA)阳性、抗中性粒细胞胞浆(p-ANCA、c-ANCA)阳性, CH₅₀总补体C₃、C₄降低。腓肠肌活检: 血管炎性神经损害。

综合分析上述资料, 本患者符合美国风湿学会1982年的系统性红斑狼疮(SLE)诊断标准。给予大剂量甲强龙(5000mg)冲击治疗后, 递减法服强的松, 20天后病情得到控制, 但周围神经病变无改善。

讨 论 红斑性肢痛症是一种少见的病因不明的阵发性血管扩张性周围自主神经疾病, 症状以肢端, 尤以双足最常见, 表现足前部、足趾的红、肿、热、痛, 阵发性, 剧烈难忍, 夜间发作次数多, 怕温热, 喜冷。如出现上述症状, 排除局部感染性炎症, 诊断即可成立。本患者符合上述特征, 且排除关节炎、血液病、糖尿病、雷诺氏病等, 故临床可确诊。系统性红斑狼疮是一种自身免疫性结缔组织病, 可造成全身各系统脏器损伤。大量自身抗体和免疫复合物可致血管、自主神经病变, 临床可出现雷诺氏现象, 但并发红斑性肢痛症者未见报道。另外本患者整个病程中未出现SLE所常见的颜面部蝶形或盘状红斑。于SLE活动时临床表现以颅内血管炎、周围神经病变为主, 临床亦少见。本患者早期出现红斑性肢痛症, 一年余以后确诊SLE, 提示自身免疫异常可能是导致红斑性肢痛症的一种原因。

收稿日期: 2004-01-05; 修订日期: 2004-06-05

作者单位: (山东省聊城市人民医院神经内科, 山东 聊城 252000)

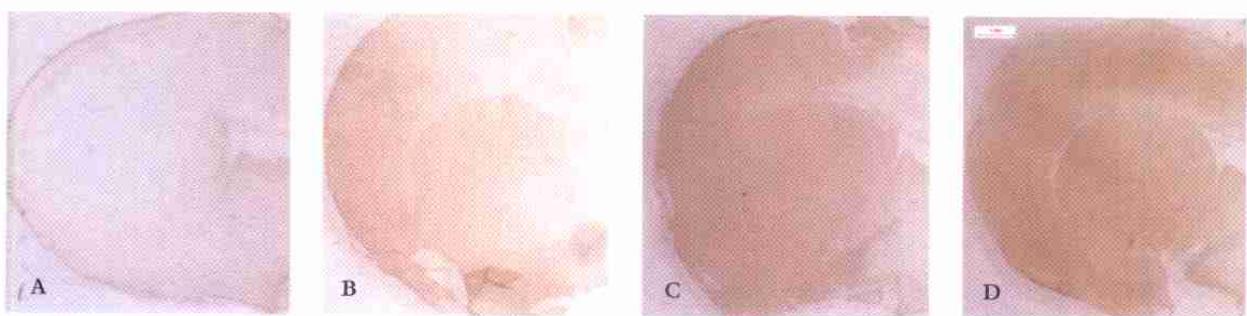


图1 正常及脑缺血大鼠脑内ANG免疫组织化学染色结果

A:正常对照组大鼠左侧大脑半球,示ANG在脑内普遍弱阳性表达,其中软脑膜、室管膜及血管染色较为明显;B:MCAO 6h组大鼠左侧大脑半球,示缺血脑区(大脑中动脉供血区)ANG表达增强;C和D: MCAO 18h组(C)及MCAO 24h组(D)大鼠左侧大脑增强,示缺血脑区ANG表达进一步增强。图中标尺为1mm。

《局灶性脑缺血大鼠脑内Angiogenin表达水平的变化》文图(正文见293页)

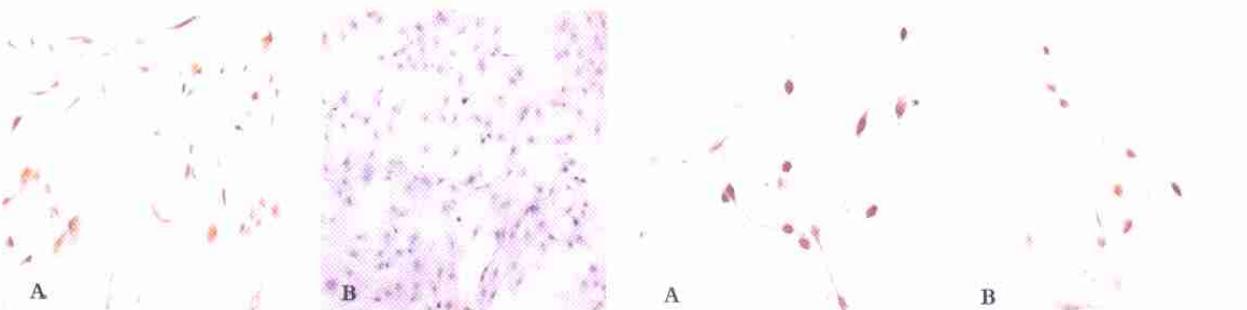


图2 免疫组织化学方法检测MSCs细胞GDNF蛋白表达(200×)
A转染pEGFP-GDNF的MSCs;B正常MSCs

图3 免疫组织化学方法检测共培养神经元TH的表达(200×)
A GDNF基因修饰的MSCs和神经元共培养;B MSCs和神经元共培养

《稳定表达GDNF基因的骨髓基质干细胞对多巴胺能神经元的作用》文图2~图3(正文见312页)

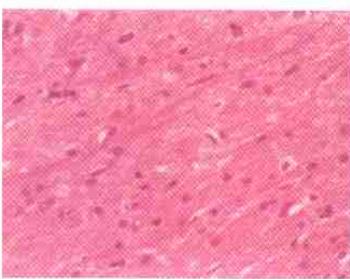


图1 模型组右侧黑质致密带内神经细胞几乎消失,残存细胞萎缩,胶质细胞大量增生(HE10×40)

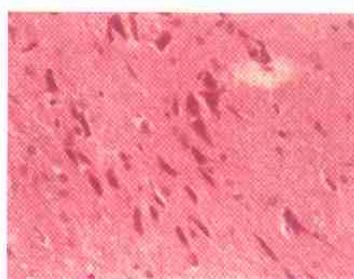


图2 左侧黑质致密带内神经元胞浆浓染,神经细胞呈带状斜行排列(HE10×40)



图3 模型组右侧纹状体,见棕黄色阳性反应的神经胶质细胞(抗TNF- α 免疫组化染色10×20)



图4 模型组左侧纹状体(抗TNF- α 免疫组化无阳性区染色10×20)



图5 假手术组右侧纹状体沿针道周围小胶质细胞增生(抗TNF- α 免疫组化染色10×10)



图6 模型组右侧黑质致密部阳性反应的胶质细胞,呈激活态,有呈斜行带状排列的趋势(抗TNF- α 免疫组化染色10×20)

《神经胶质细胞在帕金森病发病机制中的作用》文图4~图6(正文见339页)