

脑泰方对脑缺血再灌注大鼠 HIF-1 α /VEGF 的调节作用

陈 懿 朱惠斌 廖 君 易亚乔 王国佐 佟 乐 葛金文

摘要 **目的** 从 HIF-1 α /VEGF 通路观察脑泰方对局灶性脑缺血再灌注大鼠的治疗性血管新生样作用。**方法** 将 120 只 SD 大鼠随机分为正常组($n=12$)、假手术组($n=12$)、脑缺血再灌注损伤组(模型组, $n=48$)和脑泰方组($n=48$)。采用线栓法复制大鼠脑缺血再灌注损伤模型,模型组和脑泰方组再分为再灌注时间 1、3、5、7 天四个亚组($n=12$)。通过免疫荧光染色方法观察血管新生的现象,采用 RT-PCR 方法检测 HIF-1 α 、VEGF-A 和 VEGF II 受体的表达。**结果** 脑泰方组的缺血区有大量血管新生的标记,染色结果为 vWF (红)和 Brdu (绿)双染;脑缺血再灌注后第 1 天,与模型组比较,脑泰方治疗组 HIF-1 α 蛋白表达显著增强($P<0.01$);第 3 天,VEGF 蛋白表达开始增强,脑泰方组与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$);第 5 天,VEGFR 蛋白表达升高,与模型组比较,脑泰方组表达最强($P<0.01$);第 7 天,各组 VEGF 和 HIF-1 α 蛋白表达开始下降。**结论** 脑泰方通过提高 HIF-1 α 表达,激活 HIF-1 α /VEGF 信号传导通路,使缺血后血管新生作用加强,以达到治疗性血管新生样作用。

关键词 脑缺血;缺氧诱导因子;血管内皮生长因子;血管新生;脑泰方

Regulation of Naotai Recipe on the Expression of HIF-1 α /VEGF Signaling Pathway in Cerebral Ischemia/Reperfusion Rats CHEN Yi, ZHU Hui-bin, LIAO Jun, YI Ya-qiao, WANG Guo-zuo, TONG Le, and GE Jin-wen *Department of Physiology, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha (410208), China*

ABSTRACT **Objective** To observe the therapeutic angiogenesis effect of Naotai Recipe (NR) on local ischemia/reperfusion (I/R) injury of rats by observing signaling pathway of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods** Totally 120 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 4 groups, namely, the normal control group ($n=12$), the sham-operation group ($n=12$), the I/R model group ($n=48$), and the NR group ($n=48$). Cerebral I/R injury models were established using thread suture method. Rats in the I/R model group and the NR group were sub-divided into 4 sub-groups according to the 1st, 3rd, 5th, and 7th I/R day ($n=12$). The phenomenon of neovascularization was observed by immunofluorescence staining. The protein and mRNA expression levels of HIF-1 α , VEGF-A, and VEGFR II receptor were detected by RT-PCR. **Results** There were a large amount of labels for neovascularization in the ischemic area of the NR group. Double-immunofluorescence labeling [vWF (red) and BrdU (green)] was observed in the NR group. Compared with the model group, the HIF-1 α protein expression was obviously enhanced on the 1st day of I/R ($P<0.01$), and the VEGF protein expression started to enhance on the 3rd day in the NR group ($P<0.01$). The VEGFR protein expression level was the highest in the NR group on the 5th day of I/R ($P<0.01$). The protein expression of VEGF and HIF-1 α started to decrease on the 7th day of I/R. **Conclusion** NR could strengthen angiogenesis after I/R by elevating the expression of HIF-1 α and activating HIF-1 α /VEGF signaling pathway.

KEYWORDS cerebral ischemia/reperfusion injury; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor; angiogenesis; Naotai Recipe

基金项目:湖南省自然科学基金重点课题(No. 09JJ3073);高等学校博士学科点专项科研基金资助课题(No. 20094323110002);湖南省大学生研究性学习和创新性实验(No. 2011-483)

作者单位:湖南中医药大学大学生理学教研室(长沙 410208)

通讯作者:葛金文, Tel: 0731-88458068, E-mail: cmgjlw@tom.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.10.1225

脑缺血再灌注损伤是指缺血脑组织恢复血液灌注后,其神经损害体征和形态学改变有时会较前更加明显,尽快恢复缺血区的血液供应,对缺血后神经功能的恢复至关重要。血管新生是改善脑组织血流供应的有效途径,而促进血管新生则是治疗脑缺血的有效方法。因此血管新生在脑缺血损伤修复中的地位日益受到重视。脑泰方是临床治疗脑梗死的有效方剂。以往研究证实该方治疗脑卒中有良好的疗效,而且发现其可能通过多种途径发挥保护作用,如改善供血、抗血栓形成、抗炎症等^[1]。然而脑泰方发挥保护作用的具体机制还不完全清楚。阐明脑泰方对脑缺血的具体保护机制,可以对组方进行改进和发展,使此药能更好地发挥保护作用。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在血管新生中研究最多且效果最明显。它是血管内皮细胞特异性有丝分裂原,在多种生理和病理条件下促进新生血管的生成从而改善脑血流动力学。缺血后,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)可以通过靶基因促进 VEGF 表达增加^[2]。本研究拟探讨脑缺血再灌注大鼠脑组织 HIF-1 α 和 VEGF 的表达及脑泰方发挥保护作用的具体机制。

材料与方法

1 动物 清洁级 SD 大鼠 120 只,体重 280 ~ 300 g,鼠龄 7 ~ 8 个月,雌雄不限,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号: SCXK (沪) 2008-0016。所有动物均饲养于清洁的饲养笼内,自由饮水、摄食,适应性饲养 1 周后开始实验。饲养温度为 21 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$,湿度为 45% ~ 65%。

2 药物、主要试剂及仪器 脑泰方由 4 味药物组成,其中黄芪:地龙:川芎为 10:1:2。药物经水煎、醇提后制成浸膏粉(由湖南中医药大学药学院制剂教研室提取,每 1 g 浸膏粉含生药 4 g);TRIZOL 购自美国 Invitrogen 公司;RT-PCR 试剂盒购自美国 MBI 公司;HIF-1 α (批号:bs-0737R)、VEGF (批号:bs-1957R)和 VEGFR (批号:bs-0565R)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;vWF 单克隆抗体(批号:F3520)、罗丹明红(Rhodamine red,批号:83697)、异硫氰酸荧光黄(FITC,批号:P5282)均购自美国 Sigma 公司;BrdU 单克隆抗体(NA61)购自美国 Chemicon 公司;免疫组化试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司;BX51 光学显微镜及 Motic Image Advanced 3.0 图像分析系统购自日本 Olympus 公司;Tgradient PCR 仪购自 Biomatra 公司。

3 动物分组、模型制备及干预方法 将 120 只大鼠称重编号,按完全随机法分为正常组($n=12$)、假手术组(灌胃生理盐水, $n=12$)、脑缺血再灌注损伤模型组(模型组,灌胃生理盐水, $n=48$)和脑泰方提取物组(脑泰方组, $n=48$)。模型组和中药组按再灌注后时间分为再灌注后 1、3、5、7 天四个亚组,每组 12 只。造模前,所有动物参照文献[3]培训 3 天。具体方法如下,将大鼠尾巴悬挂,离地面约 1 m,观察其前肢的屈曲情况。评分标准:大鼠前肢伸向地面,无其他症状,记 0 分;大鼠受损脑半球对侧前肢屈曲,且其姿势变化从轻微腰部屈曲,肘部肩部有一定程度内收,到腰、肘完全屈曲及肩内旋,记 1 分;把大鼠放在一张柔软的塑料纸上,提起尾巴,在其肩部施加柔和的力量,大鼠对外力促使其朝着患病一侧滑行的抵抗能力减弱,记 2 分;大鼠意识清楚,向右侧作追尾运动或倒向右侧,记 3 分;伴有意识障碍,无自发活动,记 4 分;死亡,记 5 分。整个测试过程需 3 ~ 5 min。分值在 1 ~ 3 分者入组,死亡不足动物随机替补。参照 Longa EZ 等^[4]方法并加以改进制备大鼠左侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。大鼠术前禁食,用 10% 水合氯醛生理盐水溶液(35 ~ 40 mg/kg)腹腔注射进行麻醉,术中应用恒温循环水系统维持大鼠体温。大鼠颈正中切口,暴露左侧颈外动脉及其分支(枕动脉和甲状腺上动脉)和颈总动脉分叉,将枕动脉和甲状腺上动脉结扎,在颈总动脉分叉处剪口并向颈内动脉插入直径 0.26 mm 头端光滑的尼龙栓线(18.5 $\pm$ 1.5)cm,手感阻力时停止送线,记录时间。大脑中动脉阻断后 2 h 后将栓线抽出恢复再灌注。假手术组仅插渔线约 1 cm,其他均与模型组相同。造模成功率约 80%,失败模型随机替补。模型制备后动物分笼饲养。脑泰方组于术后苏醒 2 h 后,予脑泰方提取物(0.72 g/mL, 1 mL/100 g,成人临床剂量 2 倍)灌胃,其余两组均予等量生理盐水灌胃,每天灌胃 1 次,连续 7 天。

4 标本采集和切片制备 各组大鼠于末次给药后 1 h 麻醉(1% 戊巴比妥钠,按 2.5 mL/kg,腹腔注射),断头处死,迅速取脑。标本分成两份,一份用 1% DEPC 水稍作漂洗,立即放入液氮中保存;另一份用 4% 多聚甲醛固定,脱水、透明、浸蜡、包埋,冠状切片 5 μm 厚,用于免疫组化染色及 BrdU/vWF 荧光双标染色。

5 检测指标及方法

5.1 免疫荧光染色观察 BrdU 和 vWF 的表达 将切片置于 3% H_2O_2 去离子水中浸 10 min;PBS 洗

5 min × 3 次; 2 mol/L HCl 37 °C 浸 15 min; PBS 洗 5 min × 3 次; 5% 山羊血清室温下封闭 30 min, 吸去液体; 加入 BrdU 单克隆抗体 (1:100) 10 μL, 37 °C 水浴 3 h 或 4 °C 过夜; PBS 洗 5 min × 3 次; FITC (发射光波长 520 ~ 530 nm, 黄绿色光) 染色, 37 °C 水浴 30 min; PBS 洗 5 min × 3 次; 5% 山羊血清室温下封闭 30 min, 吸去液体; vWF (1:100) 10 μL 37 °C 水浴 3 h 或 4 °C 过夜; PBS 洗 5 min × 3 次; 罗丹明 (发射光波长 570 ~ 590 nm, 红光) 染色, 37 °C 水浴 30 min; PBS 洗 5 min × 3 次; 贴片待自然风干后用甘油封片。OLYMPUS BX51 荧光显微镜分别在 520 和 580 nm 波长处用相应的滤色镜观察, FITC 呈绿色荧光, 罗丹明呈红色荧光。用 FISH 软件摄取图像, 将两个激发光下获得的图像叠加以获得黄色信号作为共表达的信号。

5.2 HIF-1α、VEGFA 和 VEGFR mRNA 含量检测 采用 RT-PCR 法。引物合成: 引物设计, 参考电脑基因库核苷酸序列资料, 由上海生工生物工程公司合成纯化。VEGF-A 引物序列: 正向: 5'-CGC-CAAGCCCGGAAGATTAG-3', 反向: 5'-CCAGG-GATGGGTTTGTCTGTG-3', 392 bp。VEGFR2 引物序列: 正向: 5'-CTGTGCTGTTTCCTACCCTAATC-3', 反向: 5'-CTTTACCGTCGCCACTTGAC-3', 275 bp。HIF-1α 引物序列: 正向: 5'-TACTGATTGCATCTC-CACCTTCTAC-3', 反向: 5'-CTGCTCCATTCCATC-CTGTTC-3', 210 bp。GAPDH 引物序列: 正向: 5'-AACTCCCTCAAGATTGTCAG-3', 反向: 5'-GG-GAGTTGCTTGAAGTCACA-3', 448 bp。脑组织总 RNA 提取采用异硫氰酸胍法。PCR 产物分析: 取 5 μL PCR 扩增产物, 在 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳上做扩增产物检测分析, 电压 50 V, 30 ~ 45 min, 溴化乙锭染色。紫外灯下拍摄观测电泳条带, 激光密度扫描仪扫描底片。计算曲线下峰面积作为 PCR 产物含量。采用下列公式计算 HIF-1α、VEGF 和 VEGFR mRNA 的表达水平。产物相对含量 = HIF-1α (VEGF、VEGFR) 扩增产物光密度值 / GAPDH 扩增产物光密度值 × 100%。

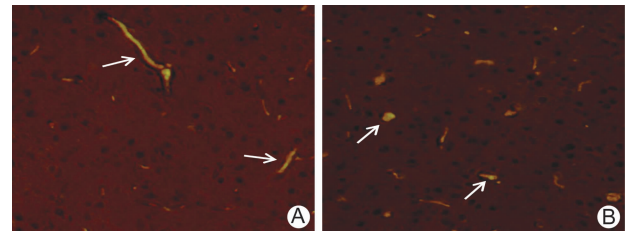
5.3 HIF-1α、VEGFA 和 VEGFR 的免疫组织化学检测 石蜡包埋, 切片 (5 μm), 常规脱蜡至水。3% 过氧化氢室温 10 min, 以灭活内源性酶, 蒸馏水洗 2 次。热修复抗原将切片浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲溶液 (pH 6.0), 微波炉加热至沸腾后断电, 间隔 5 min 后, 重复 1 次。冷却后 PBS 缓冲液 (pH 7.2 ~ 7.6) 洗涤 3 min × 2 次。滴加封闭液, 室温 20 min。

甩去多余的液体, 不洗。分别滴加适当的一抗 (Rabbit Anti-VEGF 1:300; 兔 Anti-VEGFR2 1:200; 兔 Anti-HIF-1α 1:200), 在 37 °C 孵育 2 h。PBS 缓冲液 (pH 7.2 ~ 7.6) 洗涤 3 min × 3 次。滴加生物素化二抗工作液, 20 ~ 37 °C 20 min。PBS 缓冲液 (pH 7.2 ~ 7.6) 洗涤 3 min × 3 次。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 20 ~ 37 °C 20 min。PBS 缓冲液 (pH 7.2 ~ 7.6) 洗涤 3 min × 3 次。DAB 室温显色, 镜下控制反应时间 (5 ~ 30 min)。苏木精轻度复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察 HIF-1α、VEGFA 和 VEGFR 的表达, 以棕黄色或褐色颗粒为阳性表达。

8 统计学方法 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 免疫荧光染色观察 Brdu 和 vWF 的表达 (图 1) 模型组可见 Brdu 和 vWF 双染信号出现, 认为有新生的血管内皮细胞的生成; 脑泰方组阳性信号表达数量较模型组多, 说明在药物治疗后, 新生血管数目增多。



注: A 为模型组 5 天 BrdU 和 vWF 荧光重叠; B 为脑泰方组 5 天 BrdU 和 vWF 荧光重叠; 箭头所指区域为 BrdU (绿色) 和 vWF (红色) 双染阳性

图 1 免疫荧光染色观察 BrdU 和 vWF 的表达 (×200)

2 各组大鼠 VEGF、VEGFR 及 HIF-1α mRNA 表达比较 (表 1) 与正常组和假手术组比较, 模型组 VEGF、VEGFR 及 HIF-1α mRNA 表达增强 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型组同期比较, 脑泰方组第 5 天和第 7 天 VEGF mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), 各时间点 HIF-1α mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。

3 各组大鼠 VEGF、VEGFR 和 HIF-1α 蛋白表达比较 (表 2, 图 2-4) 与正常组和假手术组比较, 模型组缺血再灌注后第 5 天 VEGF 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 第 7 天 VEGFR 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 第 3、5 天

表 1 各组大鼠 VEGF、VEGFR 及 HIF-1α mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

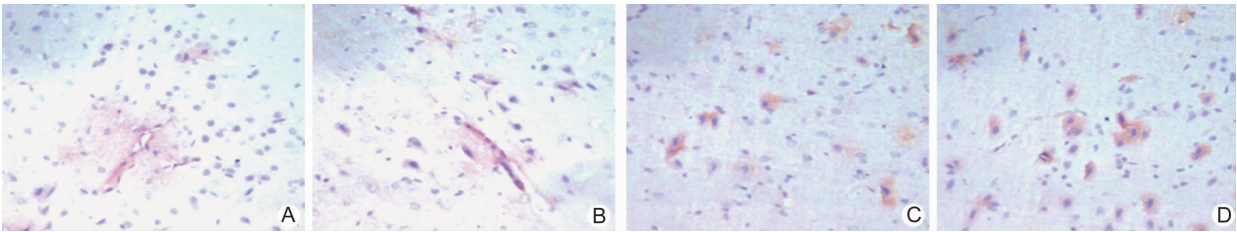
组别	时间	n	VEGF mRNA	VEGFR mRNA	HIF-1α mRNA
正常		12	0.66 ± 0.08	1.6 ± 0.4	0.84 ± 0.061
假手术		12	0.65 ± 0.07	1.6 ± 0.4	0.85 ± 0.081
模型	再灌注后 1 d	12	0.74 ± 0.08 *△	2.1 ± 0.6 *△	0.93 ± 0.061 *△
	3 d	12	0.75 ± 0.08 *△	2.2 ± 0.5 **△△	0.94 ± 0.051 *△
	5 d	12	0.76 ± 0.07 **△△	2.4 ± 0.6 **△△	0.92 ± 0.11 *△
	7 d	12	0.79 ± 0.11 **△△	2.7 ± 0.8 **△△	0.96 ± 0.09 *△
		12			
脑泰方	1 d	12	0.77 ± 0.08	2.1 ± 0.5	1.01 ± 0.11 ▲
	3 d	12	0.81 ± 0.14	2.1 ± 0.5	1.03 ± 0.12 ▲
	5 d	12	0.85 ± 0.12 ▲	2.7 ± 0.6	1.02 ± 0.12 ▲
	7 d	12	0.90 ± 0.09 ▲	3.0 ± 0.8	1.05 ± 0.13 ▲

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与假手术组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与模型组同期比较,▲ $P < 0.05$

表 2 各组大鼠 VEGF、VEGFR 和 HIF-1α 蛋白表达比较 (平均光密度, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	n	VEGF	VEGFR	HIF-1α
正常		12	0.11 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.12 ± 0.04
假手术		12	0.10 ± 0.05	0.16 ± 0.03	0.11 ± 0.05
模型	再灌注后 1 d	12	0.12 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.02
	3 d	12	0.17 ± 0.04	0.19 ± 0.05	0.19 ± 0.03 *△
	5 d	12	0.24 ± 0.07 *△	0.25 ± 0.05	0.18 ± 0.04 *△
	7 d	12	0.17 ± 0.03	0.28 ± 0.07 **△△	0.13 ± 0.04
		12			
脑泰方	1 d	12	0.25 ± 0.09 ▲	0.22 ± 0.05	0.28 ± 0.05 ▲
	3 d	12	0.35 ± 0.08 ▲	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.05
	5 d	12	0.25 ± 0.10	0.34 ± 0.07 ▲	0.16 ± 0.03
	7 d	12	0.20 ± 0.07	0.31 ± 0.06	0.16 ± 0.03

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与假手术组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与模型组同期比较,▲ $P < 0.01$



注:A 为正常组;B 为假手术组;C 为模型组 5 天;D 为脑泰方组 5 天;下图同

图 2 各组大鼠脑组织 VEGF 蛋白表达比较 (SP 法, ×400)

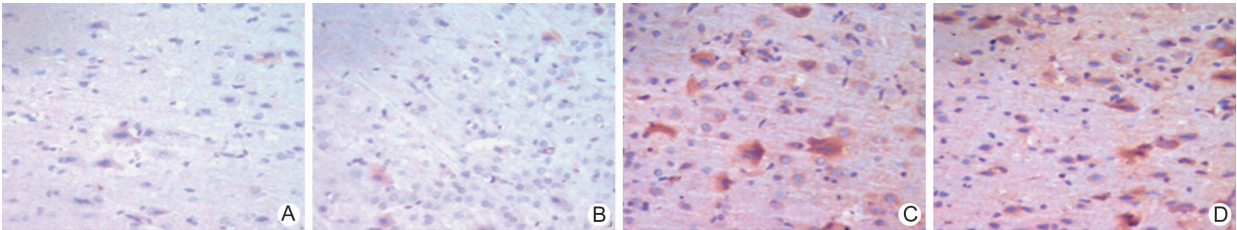


图 3 各组大鼠脑组织 VEGFR 蛋白表达比较 (SP 法, ×400)

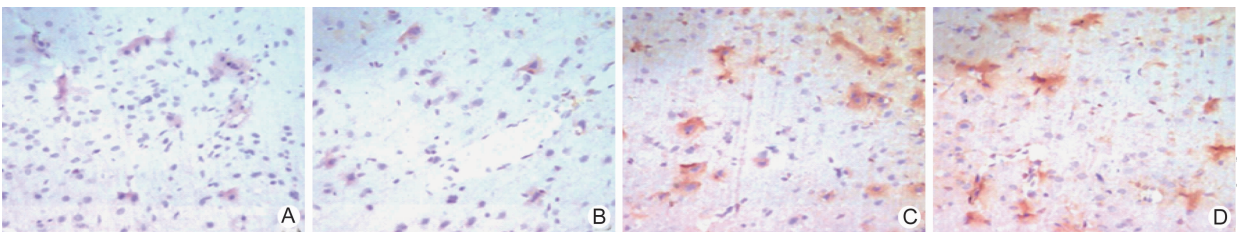


图 4 各组大鼠脑组织 HIF-1α 蛋白表达比较 (SP 法, ×400)

HIF-1 α 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组同期比较,脑泰方组第 1 天和第 3 天 VEGF 蛋白表达升高 ($P < 0.01$),第 1 天 HIF-1 α 蛋白表达升高 ($P < 0.01$),第 5 天 VEGFR 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。

讨 论

脑缺血后,由于缺血、缺氧引起神经细胞变性、坏死、凋亡,导致神经功能受损。尽快恢复缺血区的血液供应,对缺血后神经功能的恢复至关重要。血管新生是指从原有的血管上生出新的毛细血管,它是改善脑组织血流供应的有效途径^[5]。脑梗死后的缺血半暗带是缺血中心周围的低灌注区,此区域血流量减少,但并非完全阻断,此处血量的微细差异就足以决定细胞是否存活,因此缺血区血管增生的范围和程度直接关系到半暗带区血流的改善。但缺血组织周围自发性血管新生,即自我修复能力有限,尚不足以改善脑缺血后神经元血供及神经功能恢复。因而促进血管新生是治疗脑缺血的有效方法^[6]。

血管生成包括内皮细胞增殖、迁移、细胞间黏附、排成直线及形成开放的腔样结构。血管生成需要多种因子参与,其中 VEGF 是主要的调控因子。VEGF 通过旁分泌激活内皮细胞上的特异性受体,刺激内皮前体细胞分化成熟,促进内皮细胞的迁移。VEGFR 主要在内皮细胞表达,与 VEGF 具有高亲和力。VEGF/VEGFR 系统可能在血管新生的早期发挥关键性作用,是整个脑缺血后血管新生调控的中心环节^[7]。

MCAO 动物模型显示,血管新生在缺血 1~2 周明显可见,在缺血半暗带区最为明显^[8]。Marti HJ 等^[9]研究表明,MCAO 后 24 h 血管内皮细胞开始增生,血管样结构从软脑膜和脑实质的血管向缺血区发展。永久性局灶性脑缺血半暗带区的 VEGF 表达于缺血后 2~14 天内持续增高,新血管的形成始于缺血后 6~24 h,并一直延续 28 天^[10]。炎症反应及一些药物可通过 VEGF 及 VEGF 受体促进血管发生及损伤后的恢复^[11,12]。

局部氧分压对血管构筑十分重要,是调节 VEGF 基因表达的关键因素^[13]。缺氧通过诱导缺血区周围的血管新生来代偿局部血供不足。HIF-1 α 是细胞在缺氧条件下产生的具有转录活性的核蛋白,介导缺氧与血管新生的信号传递。在缺氧条件下,VEGF 作为 HIF-1 α 的靶基因之一,能被诱导 HIF-1 α 诱导而转录激活。

中医药在治疗脑缺血方面积累了丰富的经验,其中益气活血法是治疗脑缺血的主要治法之一。益气活血

法用于脑缺血的治疗源于王肯堂《证治准绳》^[14]：“卒仆偏枯之症,虽有多因,未有不因真气不周而病者。故黄芪为必用之君药”,王清任在《医林改错》^[15]将其进一步发展,在其所创的补阳还五汤中以黄芪为君药,重用该药达四两之多。以该法确立的脑泰方用于脑缺血急性期的治疗,且取得了较好的临床效果^[16]。其应用的依据是认为该病的病理基础为气虚血瘀,气虚血瘀为本,气虚血瘀不能行血,瘀血停滞而为病,该药能显著调节气虚血瘀型脑梗死患者血浆 TXB₂、6-keto-PGF₁ α 平衡、降低患者血清 TNF- α 含量^[1,16]。既往研究发现脑泰方可以通过抑制兴奋性氨基酸的释放和调节血管内皮细胞功能来减轻缺血性脑损伤^[17-20]。血管内皮细胞在血管再生和血管形态、功能维持中具有重要地位。本课题组既往研究发现脑泰方可以通过增加脑内微血管数目从而达到减轻脑卒中发生时的脑损害^[21]。研究结果提示脑泰方可能作用于血管内皮细胞,从而达到预防脑卒中发生的作用,这为探索脑泰方保护作用的具体机制提供了线索。之后发表的相关研究报道脑泰方可以促进局灶性缺血脑组织 VEGF 的表达,VEGF 是一种促进血管形成和分化的重要调节因子,同时具有神经保护特性^[22]。综合分析发表的研究,笔者推测脑泰方可能通过促进血管内皮细胞 VEGF 的表达进一步促进血管新生,从而发挥保护作用。

VEGF 表达的上游受到多种因子调节,为更深入阐明脑泰方的作用机制,本研究进一步探讨了脑泰方促进 VEGF 表达的上游通路。文献报道在缺氧条件下 HIF-1 α 可促进血管的再生,而 HIF-1 α 也可作为调节因子促进下游 VEGF 的表达^[23]。本研究探讨了脑泰方是否可以通过上调 HIF-1 α 从而促进 VEGF 的表达。结果表明在脑缺血再灌注后,HIF-1 α mRNA 和蛋白表达增多,脑泰方可进一步促进这种作用。这一结果与笔者观察到脑缺血再灌注后 VEGF 和 VEGFR 变化趋势是一致的。且与模型组比较,缺血再灌注后的第 1 天,脑泰方组 HIF-1 α mRNA 表达差异性增多,而 VEGF mRNA 表达的差异则在再灌注后的第 5 天才显现出来。基于 HIF-1 α 对 VEGF 表达的重要调节作用,笔者推测脑泰方通过上调 HIF-1 α ,从而最终促进了 VEGF 的表达。

综上所述,在脑缺血再灌注损伤中,脑泰方通过上调 HIF-1 α VEGF 和 VEGFR mRNA 的表达,促进血管新生,最终达到预防和治疗脑缺血再灌注损伤的作用。上述结果可以为中医药治疗脑缺血再灌注损伤提供新的靶点,然而 HIF-1 α 对 VEGF 的作用机制尚未完全清楚,仍有待研究者们进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 贺运河,郝晓元,葛金文. 脑泰方治疗气虚血瘀型脑梗死临床研究[J]. 中国中医急症, 2001, 10(6): 319-321.
- [2] Matsuda T, Abe T, Wu JL, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α DNA induced angiogenesis in a rat cerebral ischemia model[J]. Neurol Res, 2005, 27(5): 503-508.
- [3] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [4] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-94.
- [5] 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.
- [6] Emanuelli C, Madeddu P. Angiogenesis gene therapy to rescue ischemic tissues: achievements and future directions[J]. Br J Pharmacol, 2001, 133(7): 951-958.
- [7] Dombrowski SM, Deshpande A, Dingwall C, et al. Chronic hydrocephalus-induced hypoxia: increased expression of VEGFR-2⁺ and blood vessel density in hippocampus[J]. Neuroscience, 2008, 152(2): 346-359.
- [8] Chen HH, Chen CH, Liu HM. Correlation between angiogenesis and basic fibroblast growth factor expression in experimental brain infarct[J]. Stroke, 1994, 25(8): 1651-1657.
- [9] Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia[J]. Am J Pathol, 2000, 156(3): 965-976.
- [10] Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, et al. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia[J]. J Cerebr Blood Flow Metab, 2002, 22(4): 379-392.
- [11] Pillai A, Mahadik SP. Differential effects of haloperidol and olanzapine on levels of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in rat hippocampus[J]. Schizophr Res, 2006, 87(1-3): 48-59.
- [12] Chen J, Zhang C, Jiang H, et al. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice[J]. J Cerebr Blood Flow Metab, 2005, 25(2): 281-290.
- [13] Tang K, Breen EC, Wagner H, et al. HIF and VEGF relationships in response to hypoxia and sciatic nerve stimulation in rat gastrocnemius[J]. Respiratory Physiol Neurobiol, 2004, 144(1): 71-80.
- [14] (明)王肯堂原著,倪和宪点校.证治准绳[M]. 北京:人民卫生出版社,1991:3-12.
- [15] (清)王清任原著,欧阳兵,张成博点校.医林改错[M]. 天津:天津科学技术出版社,1999:36-38.
- [16] 贺运河,葛金文,成战鹰,等. 脑泰方对气虚血瘀型脑梗死患者血浆 TXB₂、6-keto-PGF α 及血清 TNF- α 含量的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(4): 16-17.
- [17] 陈颂,葛金文. 脑泰方提取物抗肿瘤坏死因子诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的研究[J]. 湖南中医学院学报, 2003, 23(4): 1-3.
- [18] 贺运河,葛金文,郝晓元,等. 脑泰方对缺血再灌注沙鼠脑组织谷氨酸及其转运体功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(4): 28-30.
- [19] 贺运河,郭振球,胡彬文. 脑泰方对缺血再灌注损伤沙鼠大脑皮层氨基酸类神经递质含量的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1(8): 465-466.
- [20] 葛金文,陈颂,朱惠斌. 脑泰方提取物对 rhTNF α 诱导人脐静脉内皮细胞凝血、纤溶功能改变的影响[J]. 湖南中医学院学报, 2005, 25(6): 4-7.
- [21] 陈敏,朱惠斌,葛金文,等. 脑泰方对脑缺血再灌注大鼠血管新生作用的实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(1): 12-15.
- [22] 陈懿,王国佐,葛金文. 脑泰方提取物对局灶性脑缺血大鼠血管内皮细胞生长因子表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(2): 205-207.
- [23] 吕倩,王昌明,蒋明,等. HIF-1 α 和 VEGF 在大鼠 COPD 中的表达及与肺血管重构的关系研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 772-777.

(收稿:2013-01-28 修回:2013-11-22)