

·论著·

颞叶癫痫模型大鼠海马区血管形成素-1、血管内皮生长因子的表达

张晶, 翟中文

作者单位
内蒙古医科大学第二附属医院神经外科
呼和浩特 010030
基金项目
内蒙古自治区卫生科研基金项目(No. 2015A037)
收稿日期
2017-04-11
通讯作者
张晶
mgzhangjing@126.com

摘要 **目的:**探讨颞叶癫痫模型大鼠海马区血管形成素-1(Ang-1)、血管内皮生长因子(VEGF)的表达及其在颞叶癫痫中的作用。**方法:**选取雄性Wistar大鼠60只,腹腔注射氯化锂-匹罗卡品及生理盐水分别建立颞叶癫痫模型组及对照组;观察大鼠行为学改变,比较2组大鼠海马区Ang-1、VEGF的动态表达过程。**结果:**模型组均可见动物出现行为呆滞、活动减少、凝视、前肢搔痒样动作或平衡不能等异常表现,部分伴有外周胆碱能反应,但症状程度较轻,持续数十分钟后可自行缓解。对照组动物无抽搐表现。第1小时,模型组的Ang-1表达较对照组减少($P<0.05$),至第3天降至最低水平,后逐渐升高($P<0.05$),至18 d接近正常水平($P<0.05$);VEGF表达第1天升高($P<0.05$),至第3天升至最高水平($P<0.05$),后逐渐降低,至18 d接近正常水平($P<0.05$)。**结论:**抽搐频繁时,Ang-1表达持续降低,VEGF表达持续升高;抽搐减少时,Ang-1和VEGF表达逐渐恢复正常。Ang-1与VEGF表达呈直线负相关关系。

关键词 癫痫;促血管生成素-1;血管内皮生长因子

中图分类号 R741;R741.02;R742.1 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2018.09.004

Expression of Angiopoietin-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Hippocampus of Rats with Temporal Lobe Epilepsy and Its Effect on Temporal Lobe Epilepsy ZHANG Jing, ZHAI Zhong-wen. Department of Neurosurgery, The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Huhhot 010030, China

Abstract Objective: To investigate the expression of angiopoietin-1 (Ang-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the hippocampus of rats with temporal lobe epilepsy and its effect on temporal lobe epilepsy. **Methods:** Sixty male Wistar rats were obtained. Intraperitoneal injections of LiCl-pilocarpine or normal saline were administered to generate the temporal lobe epilepsy model group and control group, respectively. Rat behavior change was observed, and dynamic changes in the expression of Ang-1 and VEGF in the hippocampus were analyzed. **Results:** Epilepsy model group animals displayed sluggish behavior, decreased activity, fixed gaze, scratching motion in forearms, or imbalance and other abnormal behaviors. A portion of these rats also showed peripheral cholinergic reactions, but these symptoms presented at a lesser degree and spontaneously resolved after several minutes. Control group animals displayed no seizures. At 1 hour, the model group showed decreased Ang-1 expression compared to the control group ($P<0.05$); at 3 days, expression reached its lowest level, then gradually increased ($P<0.05$); at 18 days, expression approached normal levels ($P<0.05$). At 1 day, VEGF expression was increased ($P<0.05$); at 3 days, expression reached its highest level ($P<0.05$) then gradually decreased; at 18 days, expression level was close to normal ($P<0.05$). **Conclusion:** Ang-1 expression decreases with frequent tics and returns to normal levels with reduced tics. VEGF expression increases with frequent tics and returns to normal levels with reduced tics. The expression of Ang-1 and VEGF demonstrates a negative linear correlation.

Key words epilepsy; angiopoietin-1; vascular endothelial growth factor

癫痫是一种常见的神经系统慢性疾病,由大脑神经元异常过度同步放电导致短暂大脑功能障碍。临床表现为反复发作的运动、感觉、自主神经、意识和精神行为等不同程度的障碍,具有不可预见性、长期性、反复性,不仅危害患者本身,而且给家庭和社会带来严重的经济负担。既往研究表明神经系统、内分泌系统及免疫系统均参与癫痫的发生、发展^[1,2]。近年来很多研究表明血脑屏

障破坏和炎症因子参与癫痫的发病^[3,4],微血管作为血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的重要组成部分,其形态功能改变都有可能增加BBB的通透性。BBB的破坏与癫痫的发病近年来逐渐被重视,作为血脑屏障的重要组成部分,微血管形态功能改变亦与BBB通透性密切相关。目前,血管形成素-1(angiotensin-1, Ang-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)

在血管形成中的作用已得到证实。氯化锂-匹罗卡品致痫大鼠模型是近年应用较多的一种公认的边缘系统痫性发作模型,癫痫持续状态(status epilepticus, SE)及反复出现的痫性发作,可导致海马结构易损区的特异性损伤改变,较好地反映了人类颞叶癫痫的相关特征,故可作为人类急慢性颞叶癫痫研究的理想模型。本研究通过氯化锂-匹罗卡品造模大鼠,运用 Western blotting 技术检测癫痫大鼠海马区 Ang-1、VEGF 的动态表达变化,探讨 Ang-1、VEGF 在癫痫发病中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠(动物编号 06072A)60只购自内蒙古医科大学实验动物中心,8~12周龄,体质量 270~330 g;精神较好,反应灵敏,体形正常,毛色光泽,饲养于我院动物实验室。将大鼠分到几个笼子中进行饲养,保证饲养环境中无特殊病原体,湿度恒定在 50%~60%,温度恒定在 $(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$,采用 12 h 循环式人工照明,保证饲料、水足够。

1.1.2 主要试剂 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(购于碧云天生物技术公司);PVDF 膜(购于德国 Millipore 公司);GAPDH 抗体(购于杭州贤至生物有限公司);Ang-1、VEGF、HRP 标记的羊抗兔二抗(购于武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模 将大鼠随机分为空白对照组($n=15$,腹腔注射生理盐水)和模型组($n=45$),模型组采取氯化锂-匹罗卡品致痫大鼠,腹腔先注射氯化锂(10 mg/kg),18~24 h 后注射匹罗卡品(20 mg/kg),20 min 内如未发生抽搐症状,20 min 后重复注射匹罗卡品(10 mg/kg),重复注射不得超过 3 次。首先将阿托品(1 mg/kg)注射到大鼠腹腔,采用皮下注射,30 min 后才可进行匹罗卡品处理,因为匹罗卡品会造成机体发生外周胆碱能反应,所以之前要先注射阿托品,起到拮抗作用。

1.2.2 行为学观察 对大鼠的行为学变化进行观察并分级,采用 Racine 分级评价标准:面部出现阵发性痉挛定为 I 级;头部出现节律性点头动作为 II 级;一侧前肢发生抽搐定为 III 级;两侧前肢均出现抽搐定为 IV 级;四肢均出现抽搐,或平衡能力消失,走路不稳,有跳跃动作定为 V 级。如果行为改变等级在 IV 级、V 级,且连续发病时间长达 30 min,就必须给予 10%水合氯醛(4 mL/kg)终止发作。发作级别达 IV 级及以上的存活

大鼠纳入模型组。

1.2.3 Western blotting 技术检测大鼠海马区 Ang-1、VEGF 每组取 1 d、3 d、13 d、18 d 4 个时间点处死大鼠:腹腔注射 10%水合氯醛(4 mL/kg)麻醉后将其头皮剪掉,切开颅骨以便看到清晰的脑组织,将脑组织置于冰块上眼科剪分离大脑皮质,取出海马。使用试剂盒检测大鼠海马区 Ang-1、VEGF,具体操作步骤按照试剂盒说明进行。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计学软件分析数据,正态分布的计量资料以(均数 $\pm$ 标准差)表示,独立样本的 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学观察

急性期模型组大鼠经腹腔注射匹罗卡品后,一般在 30 min 左右出现洗脸样动作、面部抽动、口角咀嚼样动作、凝视或者头摆、不自主运动、流涎、血泪等,为癫痫发作的早期表现。28 只大鼠纳入模型组,排除 12 只(26.7%),注药后持续抽搐死亡 2 只(4.4%),于注药后 3 d 内死亡 3 只(6.7%),此期大鼠精神、食欲较差,活动明显减少。静止期:在此时期无癫痫症状出现,但是有些大鼠表情僵硬,静止期平均时间为 $(8.6\pm 2.2)\text{d}$ 。慢性期:大鼠出现自发性癫痫,与急性期表现相似,发作为每周 1~3 次, I~V 型持续时间不长,大概发作 1 min 即可停止。处于慢性癫痫期的大鼠对外界刺激异常敏感、易激惹,未发作时精神食欲可接近正常大鼠。

2.2 各组大鼠海马区 Ang-1、VEGF 随时间的表达过程

对照组 Ang-1 表达随时间表达无显著性差异;第 1 天,模型组的 Ang-1 表达较对照组减少($P<0.05$),后持续下降,至第 3 天降至最低,第 13 天升高($P<0.05$),至 18 d 接近对照组水平($P<0.05$)。对照组 VEGF 表达随时间表达无显著性差异;第 1 天,VEGF 表达较对照组增加($P<0.05$),后持续下降,至第 3 天降至最低水平,第 13 天升高($P<0.05$),至 18 d 接近对照组水平($P<0.05$) (表 1、图 1)。

2.3 模型组 Ang-1 与 VEGF 表达的相关性

通过双变量直线相关分析可得出 Ang-1 与 VEGF 表达呈负相关($r=-0.735$, $P<0.05$)。

3 讨论

边缘系统痫性发作模型即氯化锂-匹罗卡品致痫大

表1 2组大鼠Ang-1、VEGF 随时间的动态表达过程($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	Ang-1/GAPDH	VEGF/GAPDH
对照组	15		
造模后 1 d	3	0.412±0.013	0.339±0.018
造模后 3 d	4	0.431±0.015	0.326±0.017
造模后 13 d	4	0.422±0.017	0.342±0.019
造模后 18 d	4	0.418±0.012	0.331±0.022
模型组	45		
造模后 1 d	10	0.358±0.083 ^①	0.760±0.018 ^①
造模后 3 d	15	0.262±0.013 ^①	0.873±0.012 ^①
造模后 13 d	15	0.355±0.017 ^①	0.591±0.017 ^①
造模后 18 d	15	0.418±0.025	0.326±0.014

注:与对照组比较,^①P<0.05

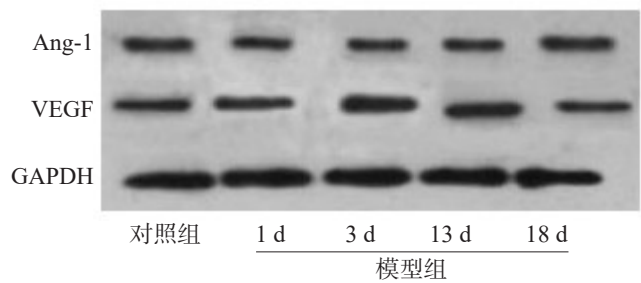


图1 Western blotting 检测海马区Ang-1、VEGF 蛋白表达

鼠模型,海马结构易损区会由于癫痫的反复性发作以及SE而出现特异性损伤的变化,能模拟人类颞叶癫痫的相关特征^[5],故可作为人类急慢性颞叶癫痫研究的理想模型。本研究对大鼠有一定要求:均为雄性、年龄相似,给药时间间隔一样,这样能够避免其他因素对实验的影响。

已有研究证实 Ang-1 的主要生物学功能有以下几点:①抑制内皮细胞凋亡,促进内皮细胞生存,减少血管的萎缩和退化,促进内皮细胞出芽、迁移、趋化;②稳定血管,防止渗漏。VEGF 可使血管壁的基质成分受到破坏,管壁结构变得薄弱,血管内皮细胞通透性增高,在机体缺氧状态、血液切变能力变化状态时 VEGF 及血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等一系列促血管生长因子能进一步表达^[6]。Ang-1 的表达在脑缺血再灌注后显著增加,酪氨酸激酶 2(tyrosine kinase-2, Tie-2)与 Ang-1 相结合,抑制微血管内皮细胞的凋亡,还可以将 VEGF 引起的血管通透作用进一步降低,使脑出血后 BBB 的渗漏量降低,最终达到减轻脑水肿程度的目的^[6];脑缺血缺氧性脑病患者可以利用间充质干细胞进行治疗,此干细胞先用 Ang-1 进行转染,治疗后发现,大鼠的血管功能、结构都比对照组改善效果要好^[7]。颞叶癫痫中,海马硬化发生较多,主要表现为星形胶质细胞结构和功能的改

变。实验中,癫痫大鼠急性期海马有 Ang-1 的降低,这可能破坏海马区新生血管的稳定性,从而影响海马区血液的供应。研究证实,癫痫发作期间,BBB 转运减低,尤其癫痫脑组织糖供应极低^[8-10]。这可能由于海马区 Ang-1 减少,从而影响内皮细胞的功能,进而影响到 BBB 的转运。现在仍然不清楚癫痫发作时 BBB 功能改变的具体持续时间,是整个脑部组织都有损害还是仅有癫痫灶有病变。与 BBB 完整性直接相关的除了内皮细胞是否存在紧密连接、星形胶质细胞的功能是否正常,还与细胞的胞饮作用密切相关。在中枢神经系统中会形成一种独特的毛细血管结构,胶质细胞起辅助作用,而胶质细胞在传递特定信息、刺激时通过内皮细胞完成。BBB 出现损伤后脑组织会发生各种损伤症状,如水肿、免疫损伤,而屏障结构被破坏、通透性降低是 BBB 的主要变化。但 BBB 是如何起到保护作用的呢?胶质细胞的足突是中枢神经系统形成特殊毛细血管的决定因素。应用传统方法已确定癫痫发作时, BBB 的通透性会出现变化,同时脑脊液屏障也有相似改变,脑部血管中的内皮细胞会出现非特异性增高。机体抽搐时间越长,对 BBB 的伤害越大。研究显示,癫痫发作时,脑内的血流量增多,之后会激活这部分脑血管内皮细胞的吞饮活性。此时出现的 BBB 功能受损在症状消失后会恢复,但是若受到血流、血压、神经元活动、血管扩张等因素的影响, BBB 的损伤会加重^[11]。

脑血管畸形患者中发现 VEGF 高表达者中畸形血管更易破裂出血^[7]。实验中 VEGF 表达在癫痫发作急性期初期便开始增高,这可能与癫痫发作引起的脑部缺血缺氧诱导所致,亦可能与匹罗卡品药物诱导 VEGF 表达增加,从而使 BBB 破坏增加, BBB 通透性增强,促使损伤因子进入脑部,造成脑部损害,导致癫痫的反复发生,后者又导致 VEGF 的表达增加。VEGF 在血管微环境里的含量大幅度增高时, Ang-2/Tie2 会发挥出竞争性抑制 Ang-1/Tie2 的血管结构稳定作用,使内皮细胞对 VEGF 的敏感程度增加,使血管基底膜加速裂解,之后新毛细血管会形成^[12]。局部血管的 VEGF 在某种因素的影响下含量降低,血管会出现退变^[13]。机体正常时, VEGF 在血管内皮细胞中含量很低,内皮细胞活化后 VEGF 的表达才增高。癫痫发作经历了短暂的静止期,其功能较前有所恢复,发作后 13 d,发现 Ang-1 的表达增高, VEGF 表达降低,这既可促使新生血管的产生,又减少血管渗漏,从而使 BBB 通透性减低,也有助于营养物质的输送,使脑部功能逐渐恢复正

常,癫痫发作逐渐减少。在慢性期,大鼠短暂的抽搐偶尔可以看见,这可能与神经细胞损伤的不可逆性有关。癫痫发作时细胞功能障碍引起的离子通道改变、神经异常网络的形成及神经电活动异常均可诱导癫痫的反复发作。

综上所述,本研究证实,癫痫大鼠海马区急性期 Ang-1 低表达,VEGF 高表达,慢性期 Ang-1 和 VEGF 的表达均逐渐恢复至正常水平,且二者表达呈负相关,这提示二者表达变化与癫痫发作有一定关系,但本研究存在不足之处,时间点设置太少,且未进行海马区微血管形态学及 BBB 通透性的观察,不能更直观阐述二者在癫痫发生发展中的作用,在研究癫痫的发病机制上缺乏一定的说服力。但本研究中 Ang-1、VEGF 随时间的动态表达变化与癫痫发作频率有一定的相关性,这为临床研究抗癫痫药物提供了新的思路,是否可以通过提高 Ang-1 表达,降低 VEGF 表达来减少癫痫发作频率,还有待进一步的研究。

参考文献

[1] 冯启峰,孙红斌. 血脑屏障与癫痫之间的关系及研究进展[J]. 四川医学, 2014, 35: 621-623.
[2] 刘明刚,朱权,孙美珍,等. 血脑屏障通透性在外伤性癫痫大鼠中的

作用机制研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11: 1244-1247.
[3] 李国辉. 血脑屏障上 P-糖蛋白与耐药性癫痫关系的研究进展[J]. 中国实用医药, 2014, 7: 252-254.
[4] 李家林,李良勇,王玉,等. 外源性转化生长因子 β 1 对大鼠癫痫持续状态后血脑屏障通透性的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2012, 37: 748-753.
[5] 陈云春,黄远桂,杜芳,等. 托吡酯对匹罗卡品诱导的慢性癫痫幼鼠反复发作的疗效观察[J]. 卒中与神经疾病, 2004, 11: 94-96.
[6] Lee SW, Kim WJ, Jun HO, et al. Angiopoietin-1 reduces vascular endothelial growth factor-induced brain endothelial permeability via upregulation of ZO-2[J]. Int J Mol Med, 2009, 23: 279-284.
[7] Toyama K, Honmou O, Harada K, et al. Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia[J]. Exp Neurol, 2009, 216: 123-126.
[8] Scott BB, Zarat in PF, Colombo A, et al. Constitutive expression of angiopoietin -1 and -2 and modulation of their expression by inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts[J]. J Rheumatol, 2002, 29: 230-239.
[9] Yoshida S, Ono M, Shono T, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17: 4015-4023.
[10] Willam C, Koehne P, Jürgensen JS, et al. Tie2 receptor expression is stimulated by hypoxia and proinflammatory cytokines in human endothelial cells[J]. Circ Res, 2000, 87: 370-377.
[11] Lee SW, Kim WJ, Jun HO, et al. Angiopoietin-1 reduces vascular endothelial growth factor-induced brain endothelial permeability via upregulation of ZO-2[J]. Int J Mol Med, 2009, 23: 279-284.
[12] 胥丽坤,宋月佳,滕国鑫,等. 大鼠脑缺血后血管内皮生长因子和血管生成素的表达变化及其作用[J]. 中华病理学杂志, 2011, 12: 834-839.
[13] Qian B, Sun Y, Wu Z, et al. Epileptiform response of CA1 neurones to convulsant stimulation by cyclothiazide, kainic acid and pentylentetrazol in anaesthetized rats[J]. Seizure, 2011, 20: 312-319.

(本文编辑:王晶)

(上接第439页)

[2] Goyal A, Sharma S. Traumatic carotid-cavernous fistula: excellent demonstration on 3D CT angiography[J]. Bmj Case Rep, 2013, pii: bcr2013201707.
[3] Bhatti S, Rashid U. Carotid Cavernous Fistula, Experience in Pakistani Population[J]. IRAN J RADIOL, 2012, 9: 34-38.
[4] Shwe Y, Paramasivam S, Ortegagutierrez S, et al. High-flow carotid cavernous fistula and the use of a microvascular plug system: initial experience[J]. Interv Neurol, 2015, 3: 78-84.
[5] 王一玮,钟勇,马瑾,等. 23例颈动脉海绵窦瘘的临床特点分析[J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36: 158-163.
[6] 周涛. CT、MRI及MRA诊断颈内动脉海绵窦瘘价值探讨[J]. 陕西医学杂志, 2015, 11: 708-709.
[7] Mergeani A, Dan P, Laza C, et al. A Review on Endovascular Techniques for Treatment of Direct Post-Traumatic Carotid-Cavernous Fistula Supported by Case Presentations[J]. Mædica, 2012, 7: 332-338.
[8] 陈泽文,陈忠,张子钦,等. 三维动态增强MR血管造影在颈动脉海绵窦瘘诊断价值[J]. 中国CT和MRI杂志, 2015, 4: 39-41.
[9] Seeger A, Kramer U, Bischof F, et al. Feasibility of Noninvasive Diagnosis and Treatment Planning in a Case Series with Carotid-Cavernous Fistula using High-Resolution Time-Resolved MR-Angiography with Stochastic Trajectories (TWIST) and Extended Parallel Acquisition Technique (ePAT 6) at 3T[J]. Clin Neuroradiol, 2014, 25: 1-7.

[10] 王兰琴,刘海艳,魏秀娥,等. 80例脑梗死患者DSA与TCD检查的临床分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2012, 7: 464-468.
[11] 张阿萌,边媛,杨金君,等. 螺旋CT血管造影和颈部血管超声对急性脑梗死患者颈动脉系统的检查价值[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11: 74-75.
[12] 刘金有,赵顺廷,周光礼,等. 磁共振成像对颅脑外伤所致眼上静脉扩张的研究[J]. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2012, 34: 491-493.
[13] Erlandson EE, Nickerson RB. Poster 27 Carotid-Cavernous Fistula After Traumatic Brain Injury: A Case Report[J]. PM&R, 2012, 4: 198-199.
[14] Moscotesalazar LR, Zenteno M, Santosfranco JA, et al. Endovascular management of dural fistulas into the cavernous sinus. A systematic review[J]. Romanian Neurosurgery, 2014, 21: 135-145.
[15] Calafiore S, Perdicchi A, Scuderi G, et al. Glaucoma Management in Carotid Cavernous Fistula[J]. Case Rep Ophthalmol, 2016, 7: 296-302.
[16] 凌国辉,卢斌贵,游佳,等. 分析颈动脉海绵窦瘘CT、MR、DSA的诊断研究对比[J]. 中国医药指南, 2013, 12: 436-437.
[17] Srinivasan A, Biro NG, Murchison AP, et al. Efficacy of Orbital Color Doppler Imaging and Neuroimaging in the Diagnosis of Carotid Cavernous Fistulas[J]. Ophthalmic Plast Reconstr Surg, 2017, 33: 340-344.
[18] Kothari R, Singh S, Singh R, et al. Abnormal pattern visual evoked response in carotid-cavernous fistula[J]. J Neurosci Rural Pract, 2013, 4: 143-145.

(本文编辑:王晶)