

文章编号: 1003-2754(2015)02-0108-04

# 银杏内酯和白果内酯对大鼠脑缺血再灌注损伤后 VEGF 的表达的影响

刘秀萍, 邓方

**摘要:** 目的 研究银杏内酯(ginkgolides, GK)和白果内酯(bilobalide, BB)对大鼠脑缺血再灌注损伤后血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,探讨 GK 和 BB 能否通过影响血管生成实现神经保护作用。方法 制备 Wistar 大鼠大脑中动脉缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,缺血 2 h 后再灌注 12 h。将实验动物随机分为 4 组:假手术组(Sham 组)、MCAO + 盐水对照组(Saline 组)、MCAO + 白果内酯组(10 mg/kg, BB 组)和 MCAO + 银杏内酯组(10 mg/kg, GK 组)。缺血 2 h 再灌注 12 h 后,对大鼠神经功能缺损评分。通过 TTC 染色观察脑梗死体积变化,应用免疫组化及 Western blot 检测各组大鼠缺血侧脑皮质区 VEGF 及其受体 VEGFR-1 的表达。结果 与 Saline 组相比, GK 组和 BB 组动物神经行为学评分明显降低( $P < 0.05$ ),脑梗死体积明显减小( $P < 0.05$ );与 Saline 组相比, GK 组和 BB 组 VEGF 阳性细胞表达数目及蛋白表达均明显增高( $P < 0.05$ ),而 VEGFR-1 阳性细胞数表达数目增多,其蛋白表达量未见明显变化。结论 银杏内酯和白果内酯对脑缺血/再灌注损伤的保护作用可能与促进 VEGF 的表达有关。

**关键词:** 银杏内酯; 白果内酯; 脑缺血再灌注; 血管内皮生长因子

中图分类号: R743.3 文献标识码: A

**Effects of ginkgolides and bilobalide on VEGF expression in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion** LIU Xiu-ping, DENG Fang. (Department of Neurology, First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effects of ginkgolides and bilobalide on the expression of VEGF after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** MCAO (middle cerebral artery occlusion) models were set up in Wistar rats after ischemia for 2 h then reperfusion for 12 h were performed. The animals were divided into four groups: Sham operation group (Sham group), MCAO + Saline (Saline group), MCAO + ginkgolides group (GK group) and MCAO + bilobalide group (BB group). After ischemia for 2 h then reperfusion for 12 h, the animals' neurological deficits and infarct volumes were evaluated. The expression of VEGF and VEGFR-1 were analyzed with immunohistochemical methods and Western blot. **Results** Compared with Saline group, GK group and BB group showed a significant reduction in infarct volume and neurological deficits ( $P < 0.05$ ). Compared with saline group, the expression of VEGF in brain tissues was increased by immunohistochemical methods and Western blot in GK group and BB group ( $P < 0.05$ ). While the VEGFR-1 expression was increased by immunohistochemical methods but with no change through Western blot assay. **Conclusion** The findings demonstrate that GK and BB can promote VEGF synthesis relieve the brain damage of cerebral ischemia-reperfusion injury.

**Key words:** Ginkgolides; Bilobalide; Cerebral ischemia-reperfusion; VEGF

缺血性脑血管病主要是由于血管病变引起血流中断或减少,导致相应血管供应区缺血缺氧而发生一系列病理生理反应。而促进损伤区域局部血管再生,建立良好的侧支循环是缺血后重要的代偿机制<sup>[1]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)于 1989 年由 Ferrara 等在牛垂体滤泡星形胶质细胞体外培养液中分离纯化,是胚胎期血管新生和血管形成的关键调节物。VEGF 及其受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)系统,在缺血性脑血管病的微循环重建过程中起着至关重要的作用,可能是脑缺血后血管新生调控的中心环节<sup>[2]</sup>。银杏内酯(ginkgolides, GK)和白果内酯(bilobalide, BB)是银杏叶制剂中最为有效的成份,但其对于脑缺血后血管生成方面却鲜有文献报道。为深入研究其对急性脑缺血再灌注损伤的作用机制,本研究从血管新生

角度,观察了 GK 和 BB 对脑缺血的保护作用及对缺血侧皮质 VEGF 和 VEGFR-1 表达的影响。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重 260 ~ 280g,吉林大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号: SCXK(吉)2013-0001。

1.2 药物与试剂 GK(四川成都百裕公司提供,批号:20130801)和白果内酯(四川成都百裕公司提供,批号: NZ130609),兔抗大鼠 VEGF 抗体, VEGFR-1 抗体,  $\beta$ -actin, 羊抗兔二抗,免疫组化试剂

收稿日期: 2014-10-19; 修订日期: 2015-01-29

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81000490, 81271293)

作者单位: (吉林大学白求恩第一医院神经内科,吉林 长春 130021)

通讯作者: 邓方, E-mail: defrances2000@163.com

盒(PV-6000, GBI), BCA 蛋白定量试剂盒, 浓缩型 DAB 试剂盒、ECL 显影液。

1.3 实验分组 将实验动物随机分为假手术组(Sham 组)、MCAO + 盐水对照组(Saline 组)、MCAO + GK 组(10 mg/kg, GK 组)、MCAO + BB 组(10 mg/kg, BB 组), 每组 6 只。每组动物于脑缺血再灌注前 30 min 腹腔给药, 假手术组和盐水对照组给予等量生理盐水。

1.4 大鼠脑缺血再灌注模型的制备 参照 Zea Longa 改良线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO)。具体方法为: 以 10% 水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 仰卧位固定, 碘伏消毒, 经颈部正中切口暴露颈动脉三角。手术分离左侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉, 结扎颈外动脉和颈总动脉, 在颈外动脉近分叉处剪一“V”字形切口, 将直径为 0.26 mm、赖氨酸包被的钝性鱼线线栓斜行插入, 通过颈内动脉推进到大脑中动脉, 插入约 18~20 mm 遇有阻力时为止。缝合肌肉和皮肤, 术中保持大鼠肛温在  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  Sham 组不插线栓, 余操作相同。

1.5 神经功能评分、脑梗死体积测定 按 Zea Longa 5 分制评分法对大鼠进行评分。评分标准: 0 分: 无神经功能损伤症状; 1 分: 对侧前爪不能完全伸展; 2 分: 向右侧转圈; 3 分: 向右侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。入组标准为: 评分为 1~3 分, 且无蛛网膜下腔出血。大鼠脑缺血 2 h 再灌注 12 h 后, 麻醉后迅速取脑, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中速冻 18 min, 然后将脑组织放入脑槽中, 沿脑组织冠状切面切成 5 片, 随后将脑片放入 2% TTC 溶液中,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光置水浴箱 30 min。再将脑片置于 4% 多聚甲醛溶液固定 4~6 h 后, 数码相机拍照, 应用图像分析软件计算脑片梗死面积。

1.6 脑组织病理组织学检查 大鼠脑缺血 2 h 再灌注 12 h 后, 用 10% 水合氯醛麻醉, 迅速开胸, 用生理盐水冲洗心脏, 然后用 4% 多聚甲醛灌注固定, 断头取脑, 置于相同灌注液  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  后固定 1 w, 依次脱水透明浸蜡及包埋, 常规 HE 染色封片, 光镜下观察。

1.7 免疫组织化学法检测 VEGF 及 VEGFR-1 的表达 取大鼠脑组织冰冻切片, 严格按照免疫组化试剂盒说明书操作, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温孵育, 滴加一抗(兔抗 VEGF、VEGFR-1, 工作浓度分别均为 1: 200)后滴加二抗, 经蒸馏水冲洗、苏木素复染、盐酸酒精分化、乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树脂封片, 显微镜下观察。阳性细胞计数: 在 400 倍光学显微镜下分别随机选取 5 个视野, 计数免疫反应阳性细胞数后取平均值。

1.8 Western blot 检测 VEGF 及 VEGFR-1 的表达 取缺血侧大脑皮质进行蛋白提取, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白变性后行 SDS-PAGE 电泳、转膜封

闭, 分别加入一抗(VEGF, 1: 1000; VEGFR-1 抗体, 1: 1000;  $\beta$ -actin, 1: 2000)  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(1: 2000)室温孵育, ECL 液显色, 凝胶成像系统显影。采用 Image J 图像分析测定 Western blot 条带灰度值, 结果以 VEGF 及 VEGFR-1 与  $\beta$ -actin 灰度值的比值显示。

1.9 统计学处理 实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 并采用 Graphpad 软件对数据进行统计学分析, 各组数据采用 One-way ANOVA 统计学分析, 两组间比较应用  $t$  检验。

## 2 结果

2.1 GK 和 BB 对脑缺血/再灌注大鼠脑梗死范围及神经功能缺损的影响 TTC 染色结果提示: 假手术组脑组织未见梗死灶, Saline 组脑组织梗死面积百分比为  $(41.09 \pm 1.33)$ ; 与 Saline 组相比, GK 组和 BB 组脑梗死范围减小(梗死面积百分比分别为  $23.8 \pm 0.58$  和  $26.97 \pm 0.73$ ) ( $P < 0.01$ ), 提示 GK 和 BB 对缺血/再灌注脑损伤有确切的保护作用。在神经功能损伤方面, 假手术组无神经系统损害症状, Saline 组均出现明显的神经功能缺陷表现, GK 组和 BB 组则明显改善大鼠神经症状( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。提示 GK 和 BB 对大鼠神经功能损伤有明显的改善作用(见表 1、图 1)。

2.2 VEGF 及 VEGFR-1 蛋白的表达变化 VEGF 蛋白含量明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。在 GK 和 BB 组, VEGF 蛋白表达较缺血再灌注组显著增多, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。VEGFR-1 蛋白的表达在各组间表达量基本相同, 无统计学差异(见图 2)。

2.3 组织形态学表现 组织切片经 HE 染色, 于  $400\times$  光镜下观察。Sham 组未见明显病理改变, 各种神经细胞层次清晰, 细胞数量、形态多样化, 胞核界限清晰, 胞质均匀, 可清晰见到细胞核。Saline 组见大鼠脑缺血中心区大量神经元变性坏死, 细胞排列紊乱, 形态不规则, 可见部分神经元胞质浓缩, 胞核固缩、碎裂或溶解。GK 和 BB 组与 Saline 组相比, 梗死区缩小, 神经元损伤程度减轻, 细胞排列尚规则, 残存的细胞形态相对正常, GK 组残留的神经元细胞数较 BB 组稍多(见图 3)。

2.4 VEGF 及 VEGFR-1 阳性细胞的表达变化 组织切片经免疫组化染色, 于  $400\times$  光镜下观察。Sham 组可见少量 VEGF 及 VEGFR-1 表达阳性细胞, 分布于在脉络丛及软膜等处。缺血 2 h/再灌注 12 h 后, 基底节处缺血病灶区可见 VEGF 及 VEGFR-1 免疫阳性神经细胞数量明显增加, 主要分布在缺血病灶周边的神经元、胶质细胞、血管内皮细胞等。阳性细胞胞浆内呈明显棕黄色着色。GK 组和 BB 组较 Saline 组阳性表达部位相似, 阳性表达率较 Saline 组显著增高(见图 4)。

表 1 各组再灌注 12 h 神经功能评分、脑梗死体积百分比比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	假手术组	盐水对照组	BB	GK
神经功能评分	0.00 ± 0.00	2.33 ± 0.21 <sup>#</sup>	1.67 ± 0.21 <sup>*</sup>	1.5 ± 0.22 <sup>*</sup>
脑梗死体积百分比(%)	0.00 ± 0.00	41.09 ± 1.33 <sup>#</sup>	26.97 ± 0.73 <sup>**</sup>	23.8 ± 0.58 <sup>**</sup>

与假手术组比较<sup>#</sup> $P < 0.01$ ; 与盐水对照组比较<sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

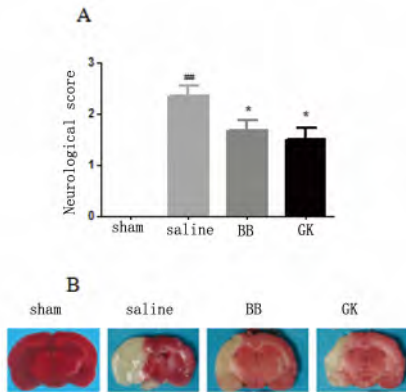


图 1 大鼠脑缺血再灌注 12 h 后神经功能评分(A); 脑梗死体积(B)  
A: 再灌注 12 h 后神经功能比较变化; B: 再灌注 12 h TTC 染色示脑梗死体积, 白色为梗死灶, 红色是正常脑组织

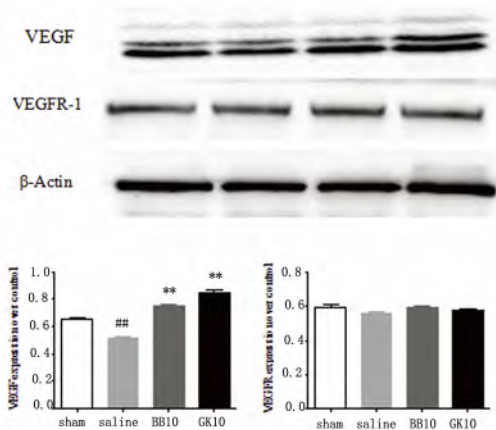


图 2 大鼠再灌注 12 h Western blot 示 VEGF、VEGFR-1 蛋白水平的表达

Western blot 示缺血侧皮质 VEGF、VEGFR-1 蛋白水平变化, 与 Sham 组比较<sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与 Saline 组比较<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

### 3 讨论

本研究采用线栓法制备大鼠脑缺血/再灌注模型, 从血管新生角度观察了 GK 和 BB 的神经保护作用。结果显示: GK 和 BB 能明显改善缺血/再灌注后大鼠神经功能缺损症状, 减小脑梗死范围, 减轻组织形态学改变。此前的研究证明, 受损的脑组织可出现再塑性, 神经元发生的机制均与血管再通有重要的相关性, 所以血管生成可以为大脑修复提供新的思路<sup>[3, 4]</sup>。VEGF 是内皮细胞的有丝分裂原, 具有促进内皮细胞增殖、加速新生血管形成、提高血管通透性等生物学特性, 有类似于血管源性的神经保护和神经营

养作用。在脑缺血发生后, VEGF 能诱导新生血管形成, 并使新生血管从正常组织向半暗带及缺血中心区延伸, 增加受累脑组织再灌注及供氧量, 从而减轻脑缺血损伤。有研究发现, VEGF 参与了局部梗死周边区的微血管形成作用和血液供应的改善<sup>[5]</sup>。VEGF 还可间接地促进神经细胞再生并抑制细胞凋亡<sup>[6, 7]</sup>。目前已经证实, 缺血及移植损伤能显著上调神经元及星状细胞 VEGF 的表达。在多种生理和病理情况下以旁分泌的形式作用于血管内皮细胞上的受体, 产生不同的生物作用, 包括: (1) 诱导内皮细胞增殖、分化和迁移, 以及体内血管的生成; (2) 增加血管通透性; (3) 促进血管支持物的生成等<sup>[8]</sup>。VEGFR-1 主要位于血管内皮细胞上, 其胞外部分对 VEGF 具有很高的亲和力, 能以可溶形式存在<sup>[9]</sup>。VEGF 主要通过 VEGFR-1 在内皮细胞上发挥作用<sup>[9]</sup>, 促进内皮细胞增殖、迁移、微血管管型结构形成及成熟血管生成<sup>[10]</sup>。

本研究免疫组化及 Western blot 结果证明, 大鼠缺血再灌注损伤后, 缺血侧皮质区 VEGF 的表达明显提高, 这可能是机体对抗缺血缺氧所致脑组织损害的一种自身保护方式。而 GK 和 BB 能刺激机体 VEGF 分子表达上调, 从而增强其诱导血管生成的功能, 促进了新生血管的形成和侧支循环的重建, 进而增加局部脑血流量, 提高脑组织对葡萄糖和氧的摄取, 加快神经功能缺损的恢复并有效缩小脑梗死的最终体积。免疫组化结果显示, 在 GK 组和 BB 组中, VEGFR-1 的阳性细胞数较 Saline 组明显增多, 表明 GK 和 BB 在促进 VEGF 表达的同时还能通过促进其受体的表达进一步增强缺血区血管生成。然而遗憾的是, Western blot 结果显示不同组 VEGFR-1 的表达量没有明显的差异。对这一结果, 分析可能有以下几方面的原因: 首先, 本研究选取的时间点为缺血 2 h/再灌注 12 h, 可能 GK 和 BB 促进 VEGFR-1 的表达上调的作用通过半定量的 Western blot 还没有充分显现, 延长观察时间可能会发现其上调趋势; 其次, 虽然给药后免疫组化证实了表达 VEGFR-1 的阳性细胞数增多, 但是单个神经元表达的 VEGFR-1 的量较小, 其蛋白总量变化较小, 提高检测手段的灵敏度可能有助于检出其变化情况; 第三, VEGFR 存在两种亚型, GK 和 BB 可能对 VEGFR-1 和 VEGFR-2 均有作用, 但可能对 VEGFR-2 的影响更大, 因此选用针对亚型的抗体可能更好地揭示其变化规律, 尚需进一步证实。但从以上实验结果, 仍可证实 GK 和 BB 确实可以通过促进血管生成发挥对脑缺血再灌注损伤

的神经保护作用。银杏叶制剂已广泛应用于缺血性脑血管病的临床治疗, 针对其应用价值和作用机制已进行了很多研究, 证明了银杏内酯和白果内酯具有抗炎、抗凋亡等作用<sup>[11, 12]</sup>。但此前研究所用的银杏叶制剂多为混合成份, 未能分辨其不同成份间的作用差异, 机制探讨难于深入。本研究选用了单一成份的银杏内酯和白果内酯进行研究, 并比较了两者的作用差异。从血管新生的角度, 本研究证实了两者可有效促进血管生成, 且银杏内酯组具有更显著的变化趋势。在随后的研究中我们将进一步深入探讨。

本研究证实, 银杏内酯和白果内酯可以通过激活血管内皮生长因子上调, 进而促进新生血管形成, 在脑梗死再灌注损伤中发挥神经保护作用, 这可能为脑梗死患者的治疗和预防提供新的靶点。

[参考文献]

[1] Oshikawa J, Urao N, Kim HW, et al. Extracellular SOD-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promotes VEGF signaling in caveolae/lipid rafts and post-ischemic angiogenesis in mice [J]. Plos one 2010, 5(4): e10189.

[2] 何佳, 丁凤菲, 刘敏珍, 等. VEGF/VEGFR 在脑缺血再灌注损伤中的神经保护作用 [J]. 神经损伤与功能 2013, 3(8): 177-180.

[3] Chopp M, Li Y, Zhang J. Plasticity and remodeling of brain [J]. J Neurol Sci 2008, 265(1-2): 97-101.

[4] Chopp M, Zhang ZG, Jiang Q. Neurogenesis, angiogenesis and MRI indices of functional recovery from stroke [J]. Stroke 2007, 38(2): 827-831.

[5] Liu F, Ni J, Huang J, et al. VEGF overexpression enhances the accumulation of phospho-S292 MeCP2 in reactive astrocytes in the adult rat striatum following cerebral ischemia [J]. Brain Res 2014, 14: 1683-1687.

[6] Yang J, Yao Y, Chen T, et al. VEGF ameliorates cognitive impairment in vivo and in vitro ischemia via improving neuronal viability and function [J]. Neuromolecular Med 2014, 16(2): 376-388.

[7] Greenberg DA, Jin K. VEGF and ALS: The luckiest growth factor [J]. Trends Mol Med 2004, 10(1): 1-3.

[8] Goncalves GA, Camargo-Kosugi CM, Bonetti TC, et al. p27kip1 overexpression regulates VEGF expression, cell proliferation and apoptosis in cell culture from eutopic endometrium of women with endometriosis [J]. Apoptosis 2014, 23: 246-248.

[9] Freitas AM, Carmeliet P, Stanimirovic DB, et al. VEGFR-2-mediated increased proliferation and survival in response to oxygen and glucose deprivation in PIGF knockout astrocytes [J]. Neurochem 2008, 107(3): 756-767.

[10] Chiba Y, Sasayama T, Miyake S, et al. Anti-VEGF receptor antagonist (VGA1155) reduces infarction in rat permanent focal brain ischemia [J]. Kobe J Med Sci 2008, 54(2): 136-146.

[11] Goldie M, Dolan S. Bilobalide, a unique constituent of Ginkgo biloba inhibits inflammatory pain in rats [J]. Behav Pharmacol 2013, 24: 298-306.

[12] Wu X, Qian Z, Ke Y, et al. Ginkgolide B preconditioning protects neurons against ischaemia-induced apoptosis [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13: 4474-4483.

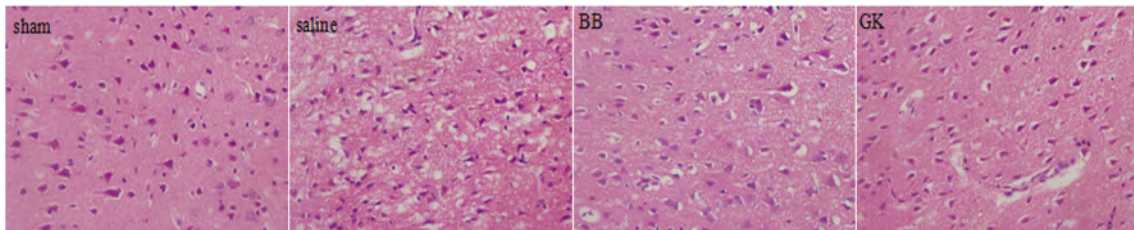


图 3 大鼠脑缺血再灌注 12 h 各组大鼠 HE 染色 (HE × 400)

sham 组: 各种神经细胞层次清晰, 细胞数量、形态多样化, 胞核界限清晰, 胞质均匀。Saline 组: 脑缺血中心区大量神经元变性坏死, 细胞排列紊乱, 形态不规则, 见部分胞质浓缩, 胞核固缩、碎裂或溶解。GK 和 BB 组: 细胞排列尚规则, 残存的细胞形态相对正常

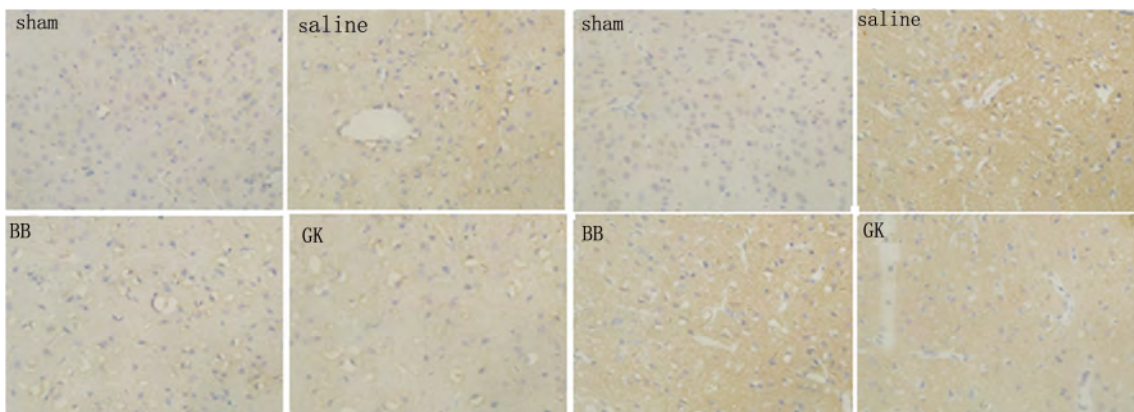


图 4 大鼠缺血再灌注 12 h 后免疫细胞化学染色 VEGF、VEGFR-1 的表达 (× 400)  
此图分别显示梗死中心区 VEGF、VEGFR-1 免疫细胞化学染色, 阳性细胞呈棕色