

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.18.008

慢性缺血性痴呆大鼠大脑皮层及海马中 HO-1、VEGF 表达的变化

沈瑞乐¹, 常文广², 吴艳芝³, 滕军放⁴

(1. 河南科技大学第一附属医院神经内科, 河南洛阳 471003; 2. 新乡市中心医院神经内科, 河南新乡 453000; 3. 郑州市中心医院神经内科, 郑州 450052; 4. 郑州大学第一附属医院神经内科, 郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨慢性缺血性痴呆大鼠学习记忆能力及大脑皮层和海马中血管内皮生长因子(VEGF)、血红素氧化酶-1(HO-1)蛋白表达的变化。**方法** 将健康 Wistar 大鼠 36 只分为对照组、假手术组和模型组, 每组 12 只。以大鼠永久性双侧颈总动脉阻断建立慢性缺血性痴呆大鼠模型, 假手术组除不结扎双侧颈总动脉外, 其他的处理同模型组。1、4、8、12 周进行 Morris 水迷宫实验和攀绳肌力实验来判定大鼠的学习和记忆能力; 用免疫组化 SP 法在光镜下观察各组大鼠大脑皮层和海马中 VEGF 和 HO-1 蛋白的表达。**结果** 8、12 周模型组逃避潜伏期时间长于假手术组和对照组, 跨过平台所在位置的次数少于假手术组和对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 1~12 周模型组与假手术组、对照组动物攀附的时间比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 对照组、假手术组 HO-1、VEGF 蛋白量阳性表达均少于模型组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 慢性脑灌注不足对大鼠学习记忆能力具有永久性的损伤作用, 而对运动功能无明显影响。VEGF 和 HO-1 可能在慢性脑缺血中发挥神经保护作用。

[关键词] 痴呆, 血管性; 血管内皮生长因子; 血红素氧化酶-1; 学习记忆**[中图分类号]** R741.02**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)18-2475-03

Changes of VEGF and HO-1 expression in cerebral cortex and hippocampus of chronic ischemic vascular dementia rat

Shen Ruile¹, Chang Wenguang², Wu Yanzhi³, Teng Junfang⁴

(1. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; 2. Department of Neurology, Xinxiang Municipal Central Hospital, Xinxiang, Henan 453000, China; 3. Department of Neurology, Zhengzhou Municipal Central Hospital, Zhengzhou, Henan 450052, China; 4. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of learning and memory function, vascular endothelial growth factor (VEGF) and heme oxygenase-1 (HO-1) expression in cerebral cortex and hippocampus of chronic ischemic vascular dementia rats. **Methods** Thirty-six healthy SD rats were divided into the control group, sham operation group and model group, 12 cases in each group. The chronic ischemic vascular dementia rat model was established by the permanent bilateral carotid artery occlusion. The sham operation group received the same treatment to the model group except without bilateral carotid artery occlusion. The learning and memory abilities were tested by the Morris water maze experiment and climbing rope strength experiment at 1, 4, 8, 12 weeks respectively. The expressions of VEGF and HO-1 in rat cerebral cortex and hippocampus was determined by immunohistochemical SP technique. **Results** The escape latency time at 8, 12 weeks in the model group was longer than that in the sham operation group and control group, and the number of crossing the platform was less than that in the sham operation group and control group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$); the time of climbing at 1-12 weeks had no statistical difference between the model group and the sham operation group and between the model group and the control group ($P > 0.05$). The positive expression of HO-1 and VEGF protein contents in the control group and sham operation group was less than that in the model group with statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Chronic cerebral hypoperfusion has a permanent damage to the learning and memory abilities in rats, while has no influence on the motor function. VEGF and HO-1 may play a protective role in chronic cerebral ischemia.

[Key words] dementia, vascular; vascular endothelial growth factor; heme oxygenase-1; learning and memory

血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 是仅次于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的第二常见的痴呆类型^[1]。近年来, 随着我国老龄化趋势的加重, VaD 的患者数量呈逐年增加的趋势。慢性缺血所致认知功能障碍的发病机制尚不完全清楚, 有学者认为慢性脑低灌注是主要发生机制之一, 脑血流量的减少与痴呆的严重程度密切相关^[2], 脑缺血后残存神经元突触传递效能降低, 致使神经元之间的信息交流和细胞水平的信号整合存在困难, 是脑缺血损伤后出现进展性认知功能障碍的关键因素^[3]。本实验旨在观察慢性缺血所致大鼠认知功能

改变及大脑皮层和海马中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及血红素氧化酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 表达的变化及意义。

1 材料与方法

1.1 材料 动物: 成年健康 Wistar 大鼠 36 只, 由郑州大学实验动物中心提供, 平均体质量 (365.12 ± 80.02)g, 平均 13 月龄, 雌雄不拘。试剂: 10% 水合氯醛购自青岛宇龙海藻有限公司; 青霉素钠注射液购自河南新乡华星药厂。

1.2 方法

表 1 3 组大鼠不同缺血时间学习记忆能力比较($\bar{x}\pm s$)

组别	逃避潜伏期时间(s)				跨过平台所在位置的次数(次)			
	1 周	4 周	8 周	12 周	1 周	4 周	8 周	12 周
模型组	30.40±6.42	36.81±10.22	79.92±20.12 ^a	82.24±20.20 ^a	4.24±0.83	3.62±0.91	1.02±0.21 ^a	0.91±0.20 ^a
假手术组	31.22±5.23	32.14±8.62 ^b	29.23±6.11 ^b	31.43±5.51 ^b	4.27±1.09	4.14±0.88 ^b	3.89±0.71 ^b	4.23±1.87 ^b
对照组	30.51±3.13	31.90±6.24 ^b	28.90±5.93 ^b	27.62±6.68 ^b	4.38±1.17	4.21±0.78 ^b	4.49±1.10 ^b	4.21±1.07 ^b

^a: $P<0.01$, 与同组第 1 周比较; ^b: $P<0.01$, 与同期模型组比较。

1.2.1 动物模型制作 将 36 只大鼠分为对照组、假手术组和模型组, 每组 12 只。参考文献[4]的方法, 在运动功能无显著性影响基础上制作 VaD 大鼠模型。具体操作: 手术前禁食 12 h, 禁水 6 h, 按大鼠体质量(0.40 mL/100 g)10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后仰卧位固定, 颈前部去毛, 局部消毒后沿颈部正中切口, 小心钝性分离出双侧颈总动脉, 双重 4 号丝线结扎, 逐层间断缝合, 假手术组仅分离双侧颈总动脉而不结扎; 对照组不做任何处理。术后为预防感染常规肌内注射青霉素钠注射液 10 万 U, 每天 1 次, 连用 3 d。

1.2.2 学习记忆能力的检测 采用 Morris 水迷宫实验, 检测内容包括: (1) 定位航行实验, 用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆的能力, 每只大鼠每天上午训练 2 次, 下午训练 2 次, 连续训练 5 d。将大鼠的头朝池壁放入水中, 依次从 I、II、III、IV 4 个象限中任意选取一个起始位置放入水中, 记录 120 s 内大鼠寻找平台的时间(逃避潜伏期)。如果大鼠在 120 s 内找到平台, 记录其实际的逃避潜伏期时间; 如果在 120 s 内仍未找到平台, 由实验者将其引上平台并停留 15 s, 逃避潜伏期的时间记录为 120 s。取第 5 天的平均值为大鼠获取经验(学习)的能力。(2) 空间搜索实验, 定位航行实验结束后撤除平台, 计算大鼠 120 s 内跨原平台相应位置的次数及游泳的轨迹, 评价大鼠保存经验(记忆)能力。

1.2.3 攀绳试验 使大鼠两前肢攀于水平的绳索上, 同时计时直到大鼠落下, 记录动物攀附的时间(s)。

1.2.4 标本的采集和处理 各组大鼠分别在满 12 周时处死, 大鼠经脑灌注固定后, 开颅取脑, 随后将脑组织置入 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液(4℃)内固定 24 h。脑组织经常规冲洗、脱水、透明、石蜡包埋、切片, 免疫组化法分析 VEGF、HO-1 蛋白的表达情况。

1.2.5 免疫组化染色及结果判定 以镜下细胞质、细胞核染成棕黄色为阳性细胞。在皮层和海马各随机选取 5 个 400 倍高倍视野计数 HO-1 和 VEGF 阳性细胞数, 以单个标本为单位, 取平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据处理, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组大鼠不同缺血时间学习记忆能力比较 3 组大鼠逃避潜伏期时间比较, 差异有统计学意义($F=9.78, P=0.00$), 模型组大鼠潜伏期时间长于假手术组和空白对照组, 差异均有统计学意义($P=0.00$); 假手术组和空白对照组大鼠逃避潜伏期时间比较, 差异无统计学意义($P=0.62$)。不同时间段逃避潜伏期时间比较, 差异有统计学意义($F=14.18, P=0.00$), 模

型组大鼠在缺血 1、4 周时逃避潜伏期时间比较, 差异无统计学意义($P=0.54, P=0.09$)。与第 1 周比较, 缺血 8、12 周逃避潜伏期时间差异均有统计学意义($P=0.00$), 分组与时间段间无交互作用($P=0.22$)。3 组间大鼠跨过平台所在位置的平均次数比较, 差异有统计学意义($F=15.35, P=0.00$); 模型组大鼠跨过平台所在位置的平均次数低于假手术组和对照组, 差异均有统计学意义($P=0.00$)。不同时间段跨过平台所在位置的平均次数比较, 差异有统计学意义($F=10.10, P=0.00$), 模型组大鼠在缺血 1、4 周时跨过平台所在位置的平均次数比较, 差异无统计学意义($P=0.42, P=0.54$); 与第 1 周跨过平台所在位置的平均次数比较, 缺血 8、12 周差异均有统计学意义($P=0.00$), 分组与时间段间无交互作用($P=0.32$), 见表 1。

2.2 3 组大鼠不同缺血时间攀附时间比较 在缺血 1、4、8、12 周, 3 组大鼠攀附的时间比较, 差异均无统计学意义($F=2.02, P=0.18$), 见表 2。

表 2 3 组大鼠不同缺血时间攀附时间比较($\bar{x}\pm s, s$)

组别	1 周	4 周	8 周	12 周
模型组	6.75±2.24	7.04±2.48	6.94±2.18	7.13±2.51
假手术组	7.19±2.47	7.41±2.08	6.82±1.98	7.32±2.26
对照组	6.82±2.11	7.10±2.15	7.31±2.34	6.91±2.01

表 3 3 组大鼠不同脑区 HO-1、VEGF 蛋白阳性表达量比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	HO-1		VEGF	
	海马	皮层	海马	皮层
模型组	27.24±5.61	27.25±3.84	25.76±3.56	26.27±3.48
假手术组	12.74±3.39 ^a	19.17±3.13 ^a	21.49±2.85 ^a	19.98±4.02 ^a
对照组	13.61±3.21 ^a	20.26±4.68 ^a	22.17±3.47 ^a	20.16±3.89 ^a

^a: $P<0.01$, 与模型组比较。

2.3 3 组大鼠大脑皮质和海马中 HO-1、VEGF 蛋白的表达比较 HO-1 蛋白阳性表达主要见于皮质和海马的神经元、神经胶质细胞, 细胞质呈棕黄色。3 组大鼠海马及皮层中 HO-1 蛋白阳性表达量比较, 差异有统计学意义($F=44.69, 14.90, P=0.00$), 对照组、假手术组大鼠海马及皮层 HO-1 蛋白阳性表达量均少于模型组($P=0.00$); 对照组和假手术组大鼠海马及皮层 HO-1 蛋白阳性表达量比较, 差异无统计学意义($P=0.12, 0.43$)。VEGF 蛋白阳性表达主要见于皮质和海马的神经元、胶质细胞、血管内皮细胞, 细胞质呈棕黄色。3 组大鼠海马及皮层 VEGF 蛋白阳性表达量比较, 差异有统计学意义($F=5.84, 10.64, P=0.00$)。对照组、假手术组大鼠海马及皮层

VEGF 蛋白阳性表达量均少于模型组 ($P=0.01, 0.01, 0.00, 0.00$); 对照组和假手术组大鼠海马及皮层 VEGF 蛋白阳性表达量比较, 差异无统计学意义 ($P=0.76, 0.90$), 见表 3。

3 讨 论

目前国内外多采用血管阻断法建立动物模型研究 VaD 的发病机制、病理、生理过程和生化改变, 包括四血管阻断法(4-VO)、三血管阻断法(3-VO)、两血管阻断法即(2-VO)、大脑中动脉线栓模型(middlecerebral artery occlusion, MCAO)等^[5]。时文远等^[6]发现 2-VO 法大鼠模型有明显的空间学习记忆能力下降, 适合于 VaD 等与空间记忆受损的实验研究。本研究通过 Morris 水迷宫实验检测 2-VO 大鼠的学习记忆能力, 结果表明模型组与假手术组相比, 两组大鼠在慢性脑缺血第 8 及 12 周, 逃避潜伏期及跨越横台次数比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 证实了慢性脑缺血能够明显影响大鼠的认知功能, 使其出现学习记忆障碍, 并且随缺血时间的延长, 认知功能的损害也呈进行性加重。

VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂原和血管源性因子, 可特异性地作用与血管内皮细胞, 诱导内皮细胞增殖及毛细血管瓣生成, 促进新生血管生成。随着对 VaD 的认识和研究的不断深入, 发现 VEGF 等的生成与 VD 的发生、发展和预后密切相关^[7]。HO-1 作为氧化-抗氧化平衡系统中重要的抗氧化酶, 在保护神经元免受氧化应激损害时起主要作用^[8-10]。魏爱宣等^[11]等研究认为 HO-1 在慢性脑缺血致认知功能障碍大鼠皮层中表达上调, 可能作为保护性因素参与了慢性脑缺血致认知功能障碍的过程^[12-14]。本实验在慢性缺血致认知功能障碍模型的基础上, 采用免疫组化观察 VEGF、HO-1 蛋白表达, 结果表明, 模型组大鼠大脑皮层及海马中 HO-1、VEGF 蛋白表达水平增高, 反映了血管性认知功能障碍发病过程中它们在抗损伤时可能发挥了重要作用。

综上所述, HO-1 和 VEGF 在慢性脑缺血致认知功能障碍的过程中高表达, 表明其可能作为保护性因素调节机体的代偿功能, 提示其可能作为一个有效途径治疗血管性认知功能障碍。

参考文献

- [1] Aggarwal NT, Decarli C. Vascular dementia: emerging trends [J]. *Semin Neurol*, 2007, 27(1): 66-77.
- [2] Liebetrau M, Hamann GF. Vascular dementia [J]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2014, 82(12): 707-718.
- [3] Wu Y, Wen YL, Du L. Effect of Shengmaisan on learning and memory abilities and hippocampal nitric oxide syn-

these expression and neuronal apoptosis in rats with vascular dementia [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2010, 30(6): 1327-1329, 1332.

- [4] 田先翔, 梅琼彬, 杨伟峰. 大鼠血管性痴呆模型的制作 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2007, 9(1): 19-20.
- [5] 蔡晶, 杜建. 血管性痴呆动物模型的制作方法及其评价 [J]. *中医药学刊*, 2002, 20(5): 617-619.
- [6] 时文远, 王正君, 张海燕. 2-VO 法建立大鼠空间学习记忆障碍模型的探讨 [J]. *中国中医急症*, 2009, 18(12): 2032-2033.
- [7] Herran E, Perez-Gonzalez R, Igartua M, et al. Enhanced hippocampal neurogenesis in APP/Ps1 mouse model of Alzheimer's disease after implantation of VEGF-loaded PLGA nanospheres [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2015, 12(10): 932-940.
- [8] 张岗, 王发渭. 血管性痴呆的基础实验研究进展 [J]. *军医进修学院学报*, 2010, 31(7): 734-737.
- [9] Schipper HM, Song W, Zukor H, et al. Heine oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement [J]. *J Neurochem*, 2009, 110(2): 469-485.
- [10] Moreira TJ, Cebera A, Cebers G, et al. Reduced HO-1 protein expression is associated with more severe neurodegeneration after transient ischemia induced by cortical compression in diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(10): 1710-1723.
- [11] 魏爱宣, 徐忠信, 郭洪亮, 等. 慢性脑缺血致认知功能障碍大鼠皮层 HIF-1 α 、HO-1 表达的变化 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(4): 913-915.
- [12] Wang D, Hui Y, Peng Y, et al. Over expression of heme oxygenase 1 causes cognitive decline and affects pathways for tauopathy in mice [J]. *Alzheimer's Dis*, 2015, 43(2): 519-534.
- [13] Hascalovici JR, Song W, Liberman A, et al. Neural HO-1/sterol interactions in vivo: implications for Alzheimer's disease [J]. *Neuroscience*, 2014(280): 40-49.
- [14] Chen L, Chen L, Lv Y, et al. Tetrandrine ameliorates cognitive impairment via inhibiting astrocyte derived S100B activation in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Neurol Res*, 2013, 35(6): 614-621.

(收稿日期: 2015-12-02 修回日期: 2016-03-18)

更 正

本刊 2016 年 45 卷 16 期 2297 页, 第一作者“车小雯”文章“基于奥马哈系统对老年痴呆患者延续护理干预的研究”。由于作者核对清样失误, 现更正通讯作者为: “沈军”, Tel: 18723116355; E-mail: junshency@yahoo.com.cn。

特此更正