

血管生成对慢性低灌注状态下血脑屏障及脑白质损害的影响

林琅 黎红华 武强 骆文静

【摘要】 目的 了解脑血管生成是否参与脑白质区域慢性低灌注状态下血脑屏障的破坏机制。**方法** 将 72 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组:假手术组、脑缺血组、干预组,脑缺血组及干预组大鼠结扎双侧颈总动脉构建慢性低灌注模型,干预组给予血管生成抑制剂灌胃以抑制血管生成;对各组大鼠在相同时间点检测脑深部白质区域微血管密度、白质纤维密度以及伊文思蓝静脉注射 6 h 后脑白质区域组织内伊文思蓝水平。**结果** 脑缺血组及干预组大鼠脑白质区域血管密度和伊文思蓝浓度均显著高于假手术组,白质纤维密度显著低于假手术组,干预组微血管密度、白质纤维密度及脑组织内伊文思蓝水平显著低于脑缺血组。**结论** 慢性低灌注诱导的血管生成可能导致血脑屏障通透性增加,但血管生成有助于减轻白质损伤,但这种保护作用大于血脑屏障通透性改变带来的不利影响。

【关键词】 脑缺血 血脑屏障 血管生成 白质损害

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)03-0181-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.03.003

The effect of angiogenesis on blood-brain barrier disruption and white matter damage under chronic cerebral hypoperfusion status Lin Lang, Li Honghua, Wu Qiang, et al. Department of Neurology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Army, Wuhan 430070

【Abstract】 Objective To estimate the influence of angiogenesis on blood-brain barrier damage mechanism under chronic cerebral hypoperfusion status of white matter. **Methods** Seventy-two male Wistar rats (250-350 g) were divided into three groups: sham-control group, ischemia group and anti-angiogenesis group. Permanent and bilateral common carotid artery occlusion was used to induce hypoperfusion of forebrain in the ischemia group and anti-angiogenesis group, and oral gavage with souvenir was used for anti-angiogenesis administration. Capillary density, Kluver-Barrera's myelin sheath staining and quantitative measurement of Evans Blue were made at the 30th day after the operation. **Results** Compare to the sham-control group, the ischemia group and anti-angiogenesis group had higher capillary density, higher concentration of Evans Blue and lower density of white matter fibers. The capillary density, the concentration of Evans Blue and the density of white matter fibers in the anti-angiogenesis group were much lower than those in the ischemia group. **Conclusion** The angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion states could lead to blood-brain barrier disruption. However, the protective effect of angiogenesis on white matter overwhelmed the bypass adverse effect of subsequent blood-brain barrier disruption.

【Key words】 Brain ischemia Blood-brain barrier Angiogenesis White matter impairment

慢性低灌注状态被认为是引起脑白质损害、血管性痴呆的原因之一^[1-2]。有研究表明慢性低灌注状态下血脑屏障破坏可能参与脑组织损伤机制^[3-4]。研究表明,血管生成(angiogenesis)可导致血脑屏障破坏,而缺血、缺氧则是诱导血管生成的重要因素^[5]。我们此前的研究也表明,在慢性低灌注状态下白质区域的血管生成水平上调,血脑屏障发生破

坏^[6],提示血管生成所引起的血脑屏障破坏可能为缺血性脑白质损害的发病机制之一。本研究目的在于阐明抑制慢性低灌注状态所致血管生成是否可起到保护血脑屏障,减轻脑白质损害的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 72 只,体重 250~300 g,购自军事医学科学院。

1.2 主要试剂与仪器 索拉菲尼(sorafenib,由德

国拜耳公司提供), 荧光素异硫氰酸酯标记葡聚糖、Luxol 固蓝、焦油紫(购于美国 Sigma 公司), 伊文思蓝、三氯乙酸、碳酸锂(购于北京化学试剂公司), VT1000S 脑组织振动切片机(购于德国 Leica 公司), C1-SI 激光扫描共聚焦显微镜(购于日本 Nikon 公司), RF-540 荧光分光光度计(购于日本 Shimadzu 公司)。

1.3 大鼠分组及干预 将 72 只大鼠随机分为假手术组、脑缺血组、干预组各 24 只, 每组大鼠根据检测内容分为血管密度亚组、白质纤维密度及血脑屏障亚组各 8 只。将大鼠用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 颈正中切口切开皮肤, 剥离胸舌骨肌、肩胛舌骨肌与胸锁乳突肌, 暴露颈总、颈内、颈外动脉, 并分离颈总动脉和迷走神经。脑缺血组与干预组结扎颈总动脉, 假手术组不结扎, 缝合皮肤。术后 3 组大鼠同条件饲养, 干预组大鼠每日予血管生成抑制剂 - 索拉菲尼混悬液 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃, 假手术组及脑缺血组大鼠每日予生理盐水 1 mL 灌胃。术后第 30 d 将大鼠根据不同检测目的分别按下述方法处理。

1.4 血管密度检测 大鼠处死前予荧光素异硫氰酸酯标记葡聚糖 50 mg 静脉注射, 1 h 后迅速断头取脑, 4%多聚甲醛溶液内保存 24 h 后取前凶前 2-4 mm 区域脑组织振动切片机冠状位切片, 片厚 100 μm 。按 Paxinos 和 Watson《大鼠脑立体定位图谱》确定脑深部白质区域, 激光扫描共聚焦显微镜下对脑深部白质取 $600\text{ }\mu\text{m}\times 600\text{ }\mu\text{m}$ 区域行逐层扫描, 每层间隔 1 μm , 共扫描 50 层。将扫描图像导入 3D Doctor 3.5 图像分析软件, 利用该软件对脑血管进行三维重建并计算三维空间内血管容积, 将血管容积除以三维空间总容积得到血管密度。

1.5 Kluver-Barrera 髓鞘染色 大鼠用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 仰卧位固定, 开胸, 剪开右心耳后经左心室快速灌注 4%多聚甲醛溶液 250 mL, 断头取脑; 脑组织于 4%多聚甲醛溶液固定 24 h 后石蜡包埋, 取前凶后 2~4 mm 处脑组织冠状位 4 μm 切片; 每只大鼠取 3 张切片, 将切片脱蜡水化至 95%酒精, 0.2% Luxol 固蓝溶液 60 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 95%酒精冲洗后蒸馏水洗, 0.05%碳酸锂溶液 30 s, 70%酒精洗, 0.1%焦油紫溶液 1 min, 70%酒精洗, 脱水、透明、封片。用 Image pro plus 6.0 软件分析深部白质纤维密度。

1.6 血脑屏障破坏检测 大鼠处死前予 2%伊文

思蓝 4 mL/kg 静脉注射, 6 h 后经左心室予 0.9%氯化钠注射液 500 mL 快速灌注, 断头取脑, 取前凶后 2~4 mm 处脑组织, 称重后置入 1 mL 50%三氯乙酸溶液内, 经匀浆、离心后上清液予 3 mL 无水乙醇稀释, 采用荧光分光光度计测定其荧光强度(激发波长 620 nm, 释放波长 680 nm), 根据预先测定的标准曲线测定伊文思蓝水平并计算脑组织内伊文思蓝水平。

1.7 统计学处理 数据用($\bar{x}\pm s$)表示, 采用 SPSS 15.0 软件对各组数据进行单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管密度测定 脑缺血组及干预组血管密度均较假手术组增高($P<0.05$); 干预组血管密度较脑缺血组减低($P<0.05$)(表 1、图 1~3)。

2.2 脑深部白质纤维改变情况 假手术组深部白质纤维排列致密, 走行一致, 无脱髓鞘现象(图 4); 脑缺血组及干预组大鼠深部白质纤维排列松散, 走行较紊乱, 有较多空泡, 脱髓鞘现象明显(图 5~6)。脑缺血组和干预组深部白质纤维密度均较假手术组显著降低($P<0.01$), 干预组深部白质纤维密度较缺血组降低($P<0.05$)(表 1)。

2.3 血脑屏障破坏检测 脑缺血组及干预组伊文思蓝水平平均较假手术组显著增高($P<0.01$), 干预组大鼠伊文思蓝水平较脑缺血组降低($P<0.05$)(表 1)。

表 1 3 组大鼠相关检测指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	血管密度 (%)	伊文思蓝浓度 (ug/mL)	白质纤维密度 (%)
假手术组	6.75 ± 0.95	2.89 ± 1.03	78.53 ± 8.72
脑缺血组	$13.38\pm 3.67^{*}$	$9.01\pm 3.95^{*}$	$66.72\pm 6.43^{*}$
干预组	$9.96\pm 3.61^{\blacktriangle\Delta}$	$6.04\pm 2.02^{*\Delta}$	$57.16\pm 10.40^{*\Delta}$

注: 与假手术组比较, $^{*}P<0.01$, $^{\blacktriangle}P<0.05$; 与脑缺血组比较, $^{\Delta}P<0.05$

3 讨论

脑白质疏松是血管性认知功能损害的重要病理表现之一, 白质疏松的严重程度和认知功能恶化相关。许多研究表明白质疏松和不完全性缺血(低灌注状态)有密切联系^[7]。目前对缺血性脑白质损害的机制尚未取得共识, 但已有的研究提示血脑屏障破坏可能是缺血性脑白质损害的关键环节之一^[8]。Binswanger 病患者脑白质血脑屏障通透性增高多

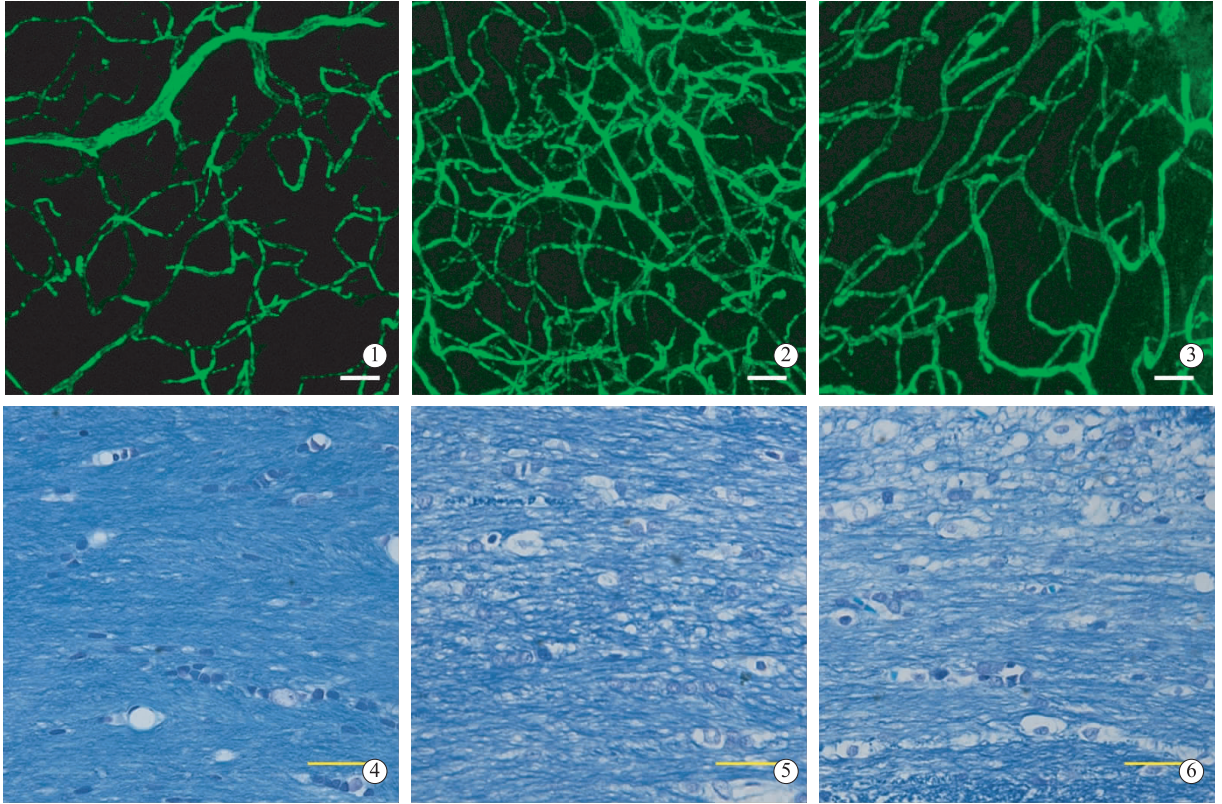


图 1 假手术组血管密度正常 图 2 脑缺血组血管网密度明显增加,走行较紊乱 图 3 干预组血管网密度有所增加(标尺 = 50 μm) 图 4 假手术组大鼠深部白质纤维排列致密,走行一致,无脱髓鞘现象 图 5 脑缺血组 图 6 干预组

发生于白质损害区域边缘部位,提示血脑屏障破坏可能是白质损害的基础之一^[9]。

血管生成(angiogenesis)在缺血性血脑屏障破坏的发生机制中有重要地位。大量研究表明,血管生成过程中的许多重要因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)等均可显著升高脑血管内皮细胞的通透性^[10]。VEGF 不仅和缺血状态下血脑屏障破坏有关,还和炎症等病理状态下的血脑屏障破坏相关^[11],这可能提示在这些病理状态下血脑屏障的破坏有着共同的发病环节。此外,基质金属蛋白酶也与急性脑缺血损害时血脑屏障的破坏有密切联系^[12]。缺血、缺氧是引起血管生成的主要始动因素,因此慢性低灌注状态下血管生成水平很可能被上调,从而成为慢性低灌注状态下血脑屏障破坏的机制之一。

自被发明以来大鼠双侧颈内动脉结扎模型被验证为一种成熟可靠的脑慢性低灌注模型并得到广泛应用。多项研究证实,在双侧颈内动脉结扎所致的慢性低灌注情况下大鼠脑白质会发生明显的脱髓鞘情况。本研究缺血组脑白质纤维密度较假手术组降

低,这与相关文献报道一致。我们此前的研究也已表明,在慢性低灌注状态下大鼠脑内 VEGF mRNA 表达增多,血管生成水平上调,血脑屏障发生破坏^[6],这在本研究中同样得到了体现。

本研究采用了索拉菲尼(sorafenib)作为血管生成抑制剂,索拉菲尼是一种小分子 VEGF 受体抑制剂,可通过抑制 VEGF 受体而产生抗血管生成作用^[13]。给予索拉菲尼后慢性脑缺血大鼠的血管生成水平下调,血脑屏障通透性下降,从而进一步证实慢性低灌注状态下血管生成可以提高血脑屏障通透性。但给予抑制血管生成剂的大鼠的脑白质损害较缺血组加重,表明抑制血管生成所得到的血脑屏障通透性下降并没有起到减轻脑白质损害的效果。这是因为血管生成可能对大鼠的脑白质损害存在多重作用机制,一方面它带来的血脑屏障破坏可能参与脑白质损害的发生;另一方面血管生成可能使局部血供改善,从而起到保护白质纤维的作用;相比之下,血管生成对脑白质的保护作用大于其带来的损害效应。因此,在保护脑低灌注区域的血管生成同时抑制其带来的血脑屏障的不利影响可能会有助于减轻低灌注状态下的脑白质损害。

尽管本研究预期通过抑制血管生成所导致的血脑屏障破坏,从而减轻脑缺血状态下脑白质损害的目标未能实现,但本研究的结果进一步阐明了慢性低灌注下血管生成和血脑屏障破坏间的联系以及血管生成对缺血性脑白质损害的保护价值。这对于进一步探索血管生成对缺血性脑白质损害保护作用机制以及保护血脑屏障对于缺血性脑白质损害的价值有提示意义。

参 考 文 献

- [1] Thomas T, Miners S, Love S. Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. Brain, 2015, 138(4): 1059-1069.
- [2] Kandiah N, Goh O, Mak E, et al. Carotid stenosis: a risk factor for cerebral white-matter disease[J]. Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases, 2014, 23(1): 136-139.
- [3] Schreiber S, Bueche CZ, Garz C, et al. Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease? - New insights from a rat model[J]. Exp Transl Stroke Med, 2013, 5(1): 4.
- [4] Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease[J]. Stroke, 2011, 42(11): 3323-3328.
- [5] Tsipis CP, Sun X, Xu K, et al. Hypoxia-induced angiogenesis and capillary density determination. // Milner R. Cerebral Angiogenesis[M]. New York, USA: Humana press, 2014: 69-80.
- [6] 林琅, 黎红华, 武强, 等. 慢性低灌注对大鼠脑白质血管生成与血脑屏障的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11(1): 9-11.
- [7] Gurol ME. Cerebral hypoperfusion and white matter disease in healthy elderly and patients with Alzheimer's disease[J]. European Journal of Neurology, 2013, 20(2): 214-215.
- [8] Bridges LR, Andoh J, Lawrence AJ, et al. Blood-Brain barrier dysfunction and cerebral small vessel disease (arteriolosclerosis) in brains of older People[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2014, 73(11): 1026-1033.
- [9] Huisa BN, Caprihan A, Thompson J, et al. Long-Term Blood-Brain barrier permeability changes in binswanger disease[J]. Stroke, 2015, 46(9): 2413-2418.
- [10] Easton AS. Regulation of permeability Across the Blood-Brain Barrier. // Cheng CY. Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers[M]. New York, USA: Springer Science + Business Media, 2012: 1-19.
- [11] Chapouly C, Argaw AT, Horng S, et al. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions [J]. Brain, 2015, 138(6): 1548-1567.
- [12] Yang Y, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke[J]. Brain Res, 2015, 1623(SI): 30-38.
- [13] 万博, 刘煜. 作用于 VEGF 信号通路的血管生成抑制剂[J]. 药学进展, 2010, 34(6): 256-263.

(2016-10-16 收稿)