

白藜芦醇对脑动脉瘤大鼠外周血内皮祖细胞及 VEGF 和 TGF- β 表达水平的影响

李伟峰 郭勇 杨茜 张博 张杰

【摘要】 目的 探讨白藜芦醇对脑动脉瘤大鼠外周血内皮祖细胞(Endothelial progenitor cells, EPCs)及血管内皮生长因子(VEGF)和转化生长因子- β (TGF- β)表达水平的影响。**方法** 按随机数字表法将 60 只大鼠随机等分为对照组、模型组、白藜芦醇组;模型组和白藜芦醇组均建立大鼠肾性高血压模型,对照组模拟手术;白藜芦醇组给予白藜芦醇(50 mg/kg)混入饲料喂养,对照组和模型组普通饲料喂养;3 组于术后 1 个月末、3 个月末分别随机抽取 10 只大鼠,通过内眦取血法取血,用流式细胞仪测定其 EPCs 的数量,用 ELISA 法检测大鼠 VEGF 和 TGF- β 表达水平。**结果** 与对照组比较,模型组术后 1、3 个月末 EPCs 水平均明显降低($P<0.05$);与模型组比较,白藜芦醇组术后 1、3 个月末 EPCs、VEGF 水平均显著增高($P<0.01$),TGF- β 水平也明显增高($P<0.05$);与术后 1 个月末比较,术后 3 个月末白藜芦醇组 EPCs、VEGF、TGF- β 水平明显增高($P<0.05$)。**结论** 白藜芦醇可显著动员外周血 EPCs 及其趋化因子 VEGF、TGF- β ,可能在预防和延缓脑动脉瘤的发生发展中起到重要作用。

【关键词】 颅内动脉瘤 白藜芦醇 内皮祖细胞 血管内皮生长因子 转化生长因子- β

【中图分类号】 R743.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2020)05-0618-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.05.013

The effects of resveratrol on EPCs of peripheral blood, VEGF and TGF- β expression levels in rats with cerebral aneurysm Li Weifeng*, Guo Yong, Yang Qian*, et al. * the Fourth Departments of Neurology, Shijiazhuang No. 1 Hospital, Shijiazhuang Hebei 050000

【Abstract】 Objective To study the effects of resveratrol on EPCs of peripheral blood, VEGF and TGF- β expression levels in rats with cerebral aneurysm. **Methods** A total of 60 adult male SD rats were randomly divided into control group, model group and resveratrol group. Model group and resveratrol group were established to model rat renal hypertension. The resveratrol group was treated with resveratrol(50 mg/kg) mixed with feed. The model group was only for ordinary feed. The control group was simulated operation, normal feed-feeding. The three groups randomly selected 10 rats at the end of 1 month and 3 months after surgery respectively. blood was collected by the internal canthus method, and the amount of EPCs in the peripheral circulation blood of each group was determined by flow cytometry, the rat VEGF and TGF- β expression levels were detected by ELISA. The right arterial ring and its main branches were carefully observed under the microscope. **Results** Compared with the control group, the level of EPCs in the model group decreased significantly at the end of 1 and 3 months after surgery ($P<0.05$). Compared with the model group, the levels of EPCs, VEGF and TGF- β in the resveratrol group increased significantly at the end of 1 and 3 months after surgery ($P<0.05$). At the end of 3 months after surgery, the levels of EPCs, VEGF and TGF- β in resveratrol group were significantly higher than those at the end of 1 month after surgery ($P<0.05$). **Conclusion** The resveratrol could significantly mobilize peripheral blood EPCs and its chemokines (VEGF and TGF- β). The resveratrol might be play an important role in preventing and delaying the development of cerebral aneurysms.

【Key words】 Cerebral aneurysm Resveratrol Endothelial progenitor cells Vascular endothelial growth factor(VEGF) Transforming growth factor- β (TGF- β)

基金项目:河北省科技厅自筹经费课题(20170978)

作者单位:050000 石家庄市第一医院神经内四科(李伟峰 杨茜),泌尿外科[郭勇(通信作者)],神经外科(张博),检验科(张杰)

颅内动脉瘤(Cerebral aneurysm, CAS)是临床高发脑血管病之一,更是蛛网膜下腔出血的第一位发病原因,其高致残率和高致死率对患者和社会

造成了巨大的负担。随着 CTA、MRA 及 DSA 等技术的广泛应用,颅内未破裂动脉瘤地被更早和更多发现。虽然目前手术及介入方法治疗 CAS 有了很大的进展,但仍有其不可避免的风险和局限性。目前认为循环血内皮祖细胞(Endothelial progenitor cells,EPCs)有一定增殖能力且可分化为成熟内皮细胞的前体细胞,其缺陷所致的血管内皮修复能力下降是 CAS 产生的重要危险因素之一,故被认为是防治 CAS 的 1 个潜在靶点。白藜芦醇具有抗炎症、抗氧化、增加血管 EPCs 数量并提高其功能、抗血小板聚集、抗神经退行性疾病等多种生物学活性,被认为是一种在心脑血管疾病极具潜力的药物来源,目前白藜芦醇干预 CAS 的研究多在抗炎性机制方面,而对其内皮修复方面相对较少。本研究拟通过研究白藜芦醇干预 CAS 大鼠过程中 EPCs 及其趋化因子(VEGF、TGF- β)表达水平的变化情况,以获得白藜芦醇干预 CAS 新靶点的研究证据,从而为 CAS 的药物干预提供新思路。

1 资料与方法

1.1 实验动物及材料 选择成年健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 250~300 g,8~10 周龄,购自河北省实验动物中心提供,标准饲料喂养。白藜芦醇(美国 Sigma 公司);大鼠单核细胞分离液(Sigma 公司);CD34、CD133、FITC、PE(北京博奥森生物技术有限公司);流式细胞仪(Becton-Dickinson)。

1.2 实验动物分组、造模及干预 将 60 只 SD 大鼠按按随机数字表法分为模拟手术对照组(对照组)($n=20$)、颅内动脉瘤模型组(模型组)($n=20$)、白藜芦醇干预组(白藜芦醇组)(50 mg/kg, $n=20$)。模型组和白藜芦醇组腹腔内注射 10%水合氯醛(0.03 mL/kg)麻醉后经背肋缘下纵切口,用丝线结扎双侧肾动脉后支;术后 1 周末用丝线结扎左侧颈总动脉,1%盐水替代饮水,建立大鼠肾性高血压模型。采用鼠尾袖套法测定大鼠在未麻醉状态下的血压值。白藜芦醇组给予白藜芦醇混入饲料喂养;模型组予以普通饲料;对照组模拟手术,给予普通饲料喂养。

1.3 EPCs 计数及趋化因子(VEGF、TGF- β)水平检测 3 组分别于术后 1、3 个月末取内眦静脉丛血 1.0 mL,置入 EDTA 抗凝管中,采用密度梯度离心法,用大鼠单核细胞分离液收集单核细胞;以 CD34、CD133 为一抗,以异硫氰酸荧光素(FITC)、

藻红蛋白(PE)为二抗制成单个核细胞悬液;用流式细胞仪检测单个核细胞悬液,以 CD34、CD133 双阳性细胞占单核细胞的比例表示外周血 EPCs 数量;3 组分别于术后 1、3 个月末取内眦静脉丛血 2.0 mL,2 h 内将血液进行 3 000 r/min 低温离心 15 min,取上清液移至另一试管,即刻送 -25℃冰箱保存备检;用酶联免疫吸附测定(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法检测大鼠外周血管修复指标(血管内皮生长因子、VEGF、转化生长因子- β ;TGF- β)水平。

1.4 组织形态学观察 显微镜下观测颅底右侧动脉环及其主要分支。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件包,计量资料以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数差异性比较用 One-Way ANOVA 方法,组内两两比较用最小显著差异(LSD) t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学观察 模型组中共有 11 只大鼠可见颅内动脉瘤样形成,余有不同程度动脉瘤样改变;白藜芦醇组共有 3 只大鼠可见动脉壁轻度隆起,余大鼠无特殊改变;对照组大鼠均无上述改变。

2.2 各组大鼠循环血 EPCs 水平的比较 术后 1、3 个月末,与对照组比较,模型组 EPCs 水平均明显降低($P<0.05$);与模型组比较,白藜芦醇组 EPCs 水平均显著增高($P<0.01$)。与术后 1 个月末比较,术后 3 个月末对照组 EPCs 水平无明显变化($P>0.05$);模型组 EPCs 水平稍偏低,但无明显差异($P>0.05$);白藜芦醇组 EPCs 水平明显增高($P<0.05$)(表 1)。

表 1 各组大鼠外周血 EPCs 水平比较($n=10, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	EPCs 水平	
	术后 1 个月末	术后 3 个月末
对照组	1.29 \pm 0.22	1.30 \pm 0.18
模型组	0.78 \pm 0.29 [#]	0.70 \pm 0.26 [#] Δ
白藜芦醇组	1.91 \pm 0.16 ^{#*}	2.62 \pm 0.25 ^{#*} \square

注:与对照组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.01$;与同组术后 1 个月末比较, Δ $P>0.05$, \square $P<0.05$

2.3 各组大鼠循环血 VEGF、TGF- β 水平的比较 与对照组比较,模型组术后 1 个月末 VEGF、TGF- β 水平稍降低,但无明显差异($P>0.05$);与模型组比较,白藜芦醇组术后 1、3 个月末 VEGF 水平显著增高($P<0.01$),TGF- β 水平也明显增高($P<$

0.05)。与术后1个月末比较,术后3个月末对照组 VEGF、TGF-β 水平无明显变化($P>0.05$);模型组 VEGF、TGF-β 水平明显升高($P<0.05$);白藜芦醇组 VEGF、TGF-β 水平显著增高($P<0.01$)(表2~3)。

表2 各组大鼠外周血 VEGF 水平比较($n=10, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	VEGF 水平	
	术后1个月末	术后3个月末
对照组	61.24 ± 1.79	60.78 ± 1.88
模型组	55.97 ± 2.11 [△]	119.36 ± 4.25 ^{#□}
白藜芦醇组	121.36 ± 2.53 ^{#*}	248.23 ± 3.68 ^{#*□}

注:与对照组比较,[#] $P<0.01$,[△] $P>0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.01$;与同组术后1个月末比较,[□] $P<0.01$

表3 各组大鼠外周血 TGF-β 水平比较($n=10, \bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	TGF-β 水平	
	术后1个月末	术后3个月末
对照组	200.75 ± 2.91	200.86 ± 2.18
模型组	186.95 ± 4.82 [△]	252.35 ± 6.23 ^{#□}
白藜芦醇组	298.32 ± 5.67 ^{#*}	361.76 ± 5.97 ^{#*□}

注:与对照组比较,[#] $P<0.05$,[△] $P>0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与同组术后1个月末比较,[□] $P<0.05$

3 讨 论

颅内动脉瘤(CAS)是指颅内动脉局部血管壁的正常膨出,颅底 Willis 动脉环及分支上多发,这些局部血管壁遭受血流冲击力较大,具有破裂出血的高风险。CAS 总人口发病率为2%~5%,而蛛网膜下腔出血(SAH)中约有85%以上是由CAS破裂引起^[1],具有较高的致残性和致死性。在病理生理改变方面动脉瘤发生早期内皮细胞首先表现为表面粗糙、形状不规则、细胞肿胀等形态改变^[2]。随着局部动脉的持续性损伤,进一步加速动脉瘤形成,最终可导致其破裂;在CAS发生发展中血管内皮细胞减少且功能下降,同时伴有血管平滑肌细胞异常增殖。高血压、血流动力学、自身内皮修复功能降低、炎症反应、瘤体形状及位置、吸烟、年龄、性别等均是促使动脉瘤发生发展、增加未破裂CAS破裂出血风险的危险因素。上述因素可导致循环血EPCs数量和功能的双下降,进而血管内皮自我修复能力下降,最终加速了动脉瘤的形成。动脉瘤形成的共同通路为血管内皮损伤、炎症反应、动脉壁结构遭到破坏以及中膜层血管平滑肌细胞的退变、凋亡,故血管内皮损伤和自身修复功能降低均参与了CAS的形成。本研究模型组的有效建立亦再次证实高血压在其中扮演了非常重要的角色;同时,本研究结果显示随着颅内

动脉瘤的发生(表1),循环血EPCs有显著降低,提示二者可能呈负相关,但循环血EPCs的上述变化是颅内动脉瘤形成的原因抑或结果尚需进一步研究。

内皮祖细胞(EPCs)在正常成年人外周血中含量极低,具有高度增殖性,其不但参与血管形成,而且能归巢于受损血管处,分化为成熟内皮细胞,通过修复受损的内皮细胞而保持血管完整性,故其具有启动新血管形成和“靶向”修复受损血管的双重作用^[3]。细胞因子(如VEGF、TGF-β等)、药物、激素等可动员体内定植于其他部位的EPCs(主要在骨髓),促进其趋化、粘附、增殖与分化。有研究显示,血管内皮受损是颅内动脉瘤形成的始发因素^[4-5],而血管内源性保护机制及其微环境的紊乱进一步引起一系列瀑布链式反应^[6-7],使血管损伤持续恶化,从而导致动脉壁结构的破坏,最终诱发CAS形成。目前调控EPCs介导的内皮修复的研究方向主要有①EPCs动员;②EPCs移植;③以EPCs作为载体的基因治疗;④EPCs在血管组织工程中的应用。本研究白藜芦醇组EPCs、VEGF、TGF-β水平显著升高,而结合VEGF、TGF-β其细胞因子自身特性,提示白藜芦醇可能通过增高外周血VEGF、TGF-β等水平,从而有效动员外周血中EPCs。

白藜芦醇(resveratrol)是具有芪类结构的非黄酮类多酚化合物,难溶于水,易溶于甲醇、乙醇、乙醚等有机溶剂中;是某些植物遭受恶劣环境(如干旱、霉菌感染等)时生成的一种植物抗毒素。目前已知在藜芦、葡萄、花生、桑葚及中药虎杖、大黄、决明子等植物中均发现有白藜芦醇成分,特别是葡萄皮中含量较高。在当代白藜芦醇作为红葡萄酒中多酚的主要成分,被认为是所谓“法国悖论(法国人高脂饮食习惯较明显,但心血管疾病的发病率与病死率却明显低于欧美其他国家)”的主要原因^[8]。

白藜芦醇具有抗氧化、抗炎症、增加血管内皮祖细胞数量并提高其功能、调脂、抗血小板聚集、抗神经退行性疾病、抗肿瘤、抗凋亡等诸多生物学活性。结合CAS发生发展相关机制,白藜芦醇在干预CAS发生发展过程中可能存在较大潜力。诸多研究发现白藜芦醇能够通过抑制MMPs-2、9的表达、抑制炎症细胞内核因子-κB(NF-κB)等活性,进而抑制整个炎症反应过程^[9-12],提示白藜芦醇可以通过抑制炎症反应干预颅内动脉瘤的发生发展,但以干预CAS发病过程中的炎症反应为切入点,存在以下

不足:(1)CAS 发生发展过程中的炎症反应更多是继发于内皮损伤,而不是始发环节,炎症反应只是加重了这一过程;(2)抑制炎症反应只是阻断动脉瘤发生发展过程的中下游环节,而白藜芦醇通过增加 EPCs 的表达和功能改善,这对于 CAS 发生发展的干预开辟一条新的途径。本研究白藜芦醇组颅内动脉瘤发生率明显降低,且 EPCs 等水平显著增高,亦提示白藜芦醇有抑制脑动脉瘤形成的潜在价值。

目前关于白藜芦醇动员 EPCs 的具体作用机制尚不十分清楚。顾俊等^[13]研究提示体内小剂量白藜芦醇可上调 eNOS 的表达(eNOS 是 EPCs 从骨髓血动员至外周血过程不可或缺的因素),促进 EPCs 动员,而大剂量白藜芦醇并未能增加外周循环血 EPCs 数量及促进损伤血管内皮修复,只是抑制术后 4 周内膜增生,且效果不如小剂量,他们认为白藜芦醇未能上调损伤血管 eNOS 的表达可能是主要因素;另一方面,白藜芦醇下调内皮素 1 表达、抑制胞外信号调控激酶活化以及上调肿瘤抑制基因 P53 和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 P21 的表达,可能是白藜芦醇不依赖 eNOS 表达却仍旧可以抑制内膜增生的主要原因。相关研究亦提示白藜芦醇可增加 EPCs 数量并提高 EPCs 功能,且其影响呈一定的量效关系^[14-15];同时白藜芦醇可以延缓 EPCs 衰老,可能与其增强 EPCs 端粒酶活性有关^[16]。已有研究仍相对局限,关于白藜芦醇对于 EPCs 的作用机制仍需要进一步研究和了解。

既往关于白藜芦醇对内皮祖细胞的研究在其他疾病模型(如脑梗死、冠心病等)中有所涉及。本研究初步探讨白藜芦醇对颅内动脉瘤大鼠模型中外周血内皮祖细胞表达水平的影响,且了解白藜芦醇对内皮祖细胞趋化因子 VEGF、TGF- β 表达水平的影响,本研究结果显示白藜芦醇在干预 CAS 发生发展过程中 EPCs 及 VEGF、TGF- β 等水平有显著增高,即白藜芦醇通过动员 VEGF、TGF- β 、EPCs,进一步激活其介导的内皮损伤修复链路,可能在 CAS 内皮损伤的始发、后续发展过程中起到及时、有效的内皮修复,从而达到预防、延缓 CAS 生长、降低其破裂风险,发挥重要的治疗作用,为 CAS 的防治开辟新的思路。同时,本研究结果仅为白藜芦醇与大鼠 CAS 外周血 EPCs 及其趋化因子(VEGF、TGF- β)关系的初步探讨,其内在的动员机制尚需要进一步研究明确。

参 考 文 献

[1] 中华医学会神经病学分会. 中华医学会神经病学分会脑血管病

学组,中华医学会神经病学分会神经血管介入协作组. 中国蛛网膜下腔出血诊治指南 2019[J]. 中华神经科杂志, 2019, 52(12):1006-1021.

- [2] Can A, Du R. Association of hemodynamic factors with intracranial aneurysm formation and rupture: systematic review and meta-analysis[J]. *Neurosurgery*, 2016, 78(4):510-520.
- [3] Li XC, Chunyu J, Zhao JG. Human endothelial progenitor cells-derived exosomes accelerate cutaneous wound healing in diabetic rats by promoting endothelial function[J]. *J Diabetes Complications*, 2016, 30(6):986-992.
- [4] Kataoka H. Molecular mechanisms of the formation and progression of intracranial aneurysms[J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2015, 55(3):214-229.
- [5] Fan XJ, Zhao HD, Yu G, et al. Role of inflammatory responses in the pathogenesis of human cerebral aneurysm[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3):9062-9070.
- [6] Nohra C, Atallah E, Jabbour P, et al. Aspirin for the prevention of intracranial aneurysm rupture[J]. *Neurosurgery*, 2017, 64(CN/suppl/1):114-118.
- [7] Sawyer DM, Lauren AP, Crissey LP, et al. Lymphocytes influence intracranial aneurysm formation and rupture: role of extracellular matrix remodeling and phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1):185.
- [8] Thiel G, Rössler OG. Resveratrol regulates gene transcription via activation of stimulus-responsive transcription factors[J]. *Pharmacological Research*, 2017, 117:166-176.
- [9] Liu CW, Hsin-Ching S, Shu-Rung L, et al. Resveratrol attenuates ICAM-1 expression and monocyte adhesiveness to TNF- α -treated endothelial cells: evidence for an anti-inflammatory cascade mediated by the miR-221/222/AMPK/p38/NF- κ B pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):44689.
- [10] Wei P, Yu HZ, Huang SJ, et al. Resveratrol protects against TNF- α -Induced injury in human umbilical endothelial cells through promoting sirtuin-1-Induced repression of NF-KB and p38 MAPK[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1):e0147034.
- [11] 杨茜, 郭勇, 张博, 等. 白藜芦醇对脑动脉瘤大鼠 MMPs 蛋白的影响[J]. *河北医科大学学报*, 2018, 39(8):890-893.
- [12] 树林一, 赵航, 黄雯莉, 等. 白藜芦醇及衍生物的研究进展[J]. *河北医药*, 2019, 41(13):2043-2048.
- [13] 顾俊, 王长谦, 张大东, 等. 白藜芦醇对损伤动脉再内皮化和内膜增生的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14(10):829-834.
- [14] Zhen L, Wang SH, Zhu XY, et al. Resveratrol induces endothelial progenitor cells angiogenesis via MiR-542-3p by targeting angiopoietin-2 and involves in recanalization of venous thrombosis[J]. *Medical Science Monitor*, 2019, 25:7675-7683.
- [15] Zhang YQ, Du XL, Li WD, et al. Resveratrol improves endothelial progenitor cell function through miR-138 by targeting focal adhesion kinase (FAK) and promotes thrombus resolution in vivo[J]. *Medical Science Monitor*, 2018, 24:951-960.
- [16] 徐之丽, 张赛, 涂悦, 等. 白藜芦醇对颅内动脉瘤形成及端粒长度的影响[J]. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2019, 5(5):295-298.

(2020-04-07 收稿)