



DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.05.003

<http://xbyx.xysm.net/xbwk/fileup/PDF/201405452.pdf>

大鼠局灶脑缺血再灌注后Ephrin-B2的表达

肖慧^{1,2}, 谷文萍¹, 杨期东¹, 曾学辉¹

(1. 中南大学湘雅医院神经内科, 长沙 410008; 2. 长沙市中心医院神经内科, 长沙 410004)

[摘要]目的: 探讨Ephrin-B2在大鼠脑缺血再灌注后脑组织中的表达情况以及对血管新生的调节作用。**方法:** 雄性SD大鼠随机分为正常对照组、假手术组及缺血再灌注组, 后者又分为 1, 3, 7, 14, 28 d亚组, 线栓法制备局灶性大脑中动脉缺血再灌注模型; 改良神经功能评分(modified neurological severity scores, mNSS)法对各时间点模型进行评分; Western印迹及荧光定量PCR检测缺血脑组织中Ephrin-B2的表达; 以免疫荧光双标法定位Ephrin-B2表达的细胞类型; 以CD31⁺内皮细胞计数缺血半暗带中微血管密度(microvessel density, MVD)。**结果:** 缺血半暗区MVD从缺血再灌注后第3天起较假手术组开始增加, 第14天最高($P<0.01$), 第28天有所回落; 再灌注7 d亚组的神经功能评分较1 d及3 d亚组增加, 14 d开始下降; Ephrin-B2在血管内皮、血管周围、神经元细胞膜及星形胶质细胞中均有显著表达; Ephrin-B2蛋白及mRNA水平从再灌注第3天开始显著增加, 到第7天及14天($P<0.01$)表达水平最高。**结论:** 脑缺血再灌注可诱导Ephrin-B2表达升高, 并呈动态变化趋势, Ephrin-B2参与了脑缺血后血管新生的调控过程, 并促进脑缺血后血管新生, 从而促进神经功能恢复。

[关键词] 脑缺血; Ephrin-B2; 血管新生

Expression of Ephrin-B2 after focal cerebral ischemia in rats

XIAO Hui^{1,2}, GU Wenping¹, YANG Qidong¹, ZENG Xuehui¹

(1. Department of Neurology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008;

2. Department of Neurology, Changsha Municipal Central Hospital, Changsha 410004, China)

ABSTRACT

Objective: To explore the expression profile of Ephrin-B2 in the ischemic penumbra after transient focal cerebral ischemia in rats, and to clarify the mechanism of Ephrin-B2 triggering angiogenesis.

Methods: Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group, a sham operation group and ischemic-reperfusion 1, 3, 7, 14, and 28 d groups. Suture-occluded method was used to establish the focal middle cerebral artery occlusion model and the ischemic brain was reperused 2 h after the occlusion. Western blot and quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction were used to detect the dynamic expression profile of Ephrin-B2 in the penumbra cortex. Double immunofluorescence was used to speculate the location and the co-expression of Ephrin-B2 in blood vessels, neurons and astrocytes. Microvessel density was quantified by the number of CD31⁺ cells. Rats were subjected to

收稿日期(Date of reception): 2013-11-10

作者简介(Biography): 肖慧, 博士研究生, 主治医师, 主要从事脑血管疾病的研究。

通信作者(Corresponding author): 谷文萍, Email: guwenping393@sohu.com

基金项目(Foundation item): 湖南省科技厅科技计划项目(2012FJ6031)。This work was supported by Project of Hunan Provincial Science and Technology Department, P. R. China (2012FJ6031).

neurologic functional tests by modified neurological severity scores (mNSS) before sacrifice.

Results: Compared with the sham group, Ephrin-B2 protein and mRNA level of the penumbra cortex in the ischemic group increased 3 days ($P<0.05$) after the reperfusion, peaked at day 7 and 14 ($P<0.01$), and declined at day 28. Double immunofluorescence indicated that Ephrin-b2 was expressed in the neurons, blood vessels and astrocytes; mNSS peaked at day 7, and gradually declined at day 14. The microvessel density of penumbra cortex in the ischemic group increased 3 days ($P<0.05$) after the reperfusion, peaked at day 14 ($P<0.01$), and gradually declined at 48 h.

Conclusion: Cerebral ischemia reperfusion induces the over-expression of Ephrin-B2, with a dynamic trend, suggesting that Ephrin-b2 may improve post-stroke functional recovery by enhancing angiogenesis and neurogenesis.

KEY WORDS cerebral ischemia; Ephrin-B2; angiogenesis

Ephrins是受体酪氨酸蛋白激酶家族(receptor tyrosine kinases, RTKs)中的一种。以往的研究^[1]表明脑梗死后存在血管新生, 而Ephrin-B2对血管的生长发育起关键的调节作用, Ephrin-B2在脑梗死后脑组织中的表达情况以及对脑缺血再灌注后血管新生的作用国内外尚无相关报道。本实验通过检测Ephrin-B2在大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型缺血半暗带中的表达水平及表达的细胞类型, 结合缺血半暗带中血管密度及神经功能评分, 以阐明Ephrin-B2在大鼠脑缺血再灌注后脑组织中的表达情况以及对血管新生的调节作用。

1 材料与方法

1.1 动物与分组及脑缺血再灌注动物模型的制备

清洁级雄性SD大鼠60只, 购于中南大学湘雅医学院动物学部, 体质量(280 ± 20) g, 随机分为3组: 正常对照组5只, 自由进食, 饮水, 不实施手术; 假手术组5只, 麻醉, 手术中剪开颈总动脉, 不插线栓; 脑缺血组50只, 根据取材时间又分为1, 3, 7, 14和28 d共5个亚组, 每个亚组10只动物, 随机抽取5只分别用于Western印迹和PCR, 另5只用于免疫荧光。

脑缺血再灌注模型参照Longa等^[2]的线栓法。线栓直径为0.24 mm尼龙鱼线, 头端经显微镜操作烧制而成, 光滑, 大小一致, 在距膨大端18~20 mm处作标记备用。全部大鼠统一栓塞右侧大脑中动脉, 插线深度为18~20 mm, 此时, 大鼠右眼虹膜颜色变浅, 开始记录缺血时间, 2 h后拔出线栓实现再灌注。参考Longa等^[2]的5分制法在动物麻醉苏醒后进行评分以用于判断模型是否成功。评分1~3分为手术成功, 手术过程中室温保持在20~30℃。

1.2 神经功能评分

MCAO大鼠神经功能评分: 按改良神经功能评分(modified neurological severity scores, mNSS)法^[3]在各个时间点处死大鼠前评分。评分包括3项: 1)提起老鼠, 正常运动0分; 前肢屈曲1分; 后肢屈曲1分; 30 s内头转动偏离中轴 $>10^\circ$ 1分。2)将鼠放在地上, 正常运动0分; 不能直走1分; 向偏瘫侧旋转2分; 身体倒向偏瘫侧3分。3)平衡木试验, 保持平衡稳定状态0分; 抓紧木头的边1分; 抓紧木头, 一只脚从木头上掉下2分; 抓紧木头, 两只脚从木头上掉下或在木头上旋转(>60 s)3分; 试图保持平衡但还是掉下(>40 s)4分; 试图保持平衡但还是掉下(>20 s)5分; 没有试图保持平衡而掉下或悬在木头上(<20 s)6分。总分: 9~12分为严重损伤; 4~8分为中度损伤; 1~3分为轻度损伤。

1.3 免疫荧光双染

大鼠10%水合氯醛腹腔麻醉后, 迅速断头处死取脑, 于各时间点采用生理盐水及4%多聚甲醛经心脏灌注固定, 采用尾壳核平面冠状面切片, 冰冻切片, 片厚40 μm 。切片经漂洗、0.3% Triton破膜及正常动物血清封闭后, 滴加一抗。为定位表达的细胞类型, 兔抗Ephrin-B2单克隆抗体(Abcam, 1:200)分别与小鼠抗CD31单克隆抗体(Abcam, 1:500)、小鼠抗NeuN多克隆抗体(Abcam, 1:1 000)及小鼠抗GFAP多克隆抗体(Abcam, 1:1 000)做双染。PBS漂洗后加相应荧光二抗: 羊抗小鼠IgG-Cy3(博士德1:50)、羊抗兔IgG-FITC(博士德1:50)。DAPI复染5 min标记细胞核。荧光显微镜下观察, 并拍照, 照片放大倍数表示目镜放大倍数 \times 物镜放大倍数, 用共聚焦显微镜观察染色切片并作图像扫描。

1.4 微血管密度(microvessel density, MVD)计数

以小鼠抗CD31单克隆抗体(Abcam, 1:500)行免疫荧光染色, 每个样本分别取2个梗死灶中间冠状面切片, 每个切片的缺血半暗带于背侧和腹侧各取2个不重叠的40倍视野, 运用Motic Advance 3.2 Imaging计算4个200 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ 视野相互分离的CD31⁺的内皮细胞、内皮细胞簇、内皮细胞条索数量, 以No./mm²表示。

1.5 Western印迹检测Ephrin-B2蛋白表达

冰上于各时间点分离缺血侧半暗带区大脑皮质(冠状面距额极7~11 mm)约100 mg, 脑组织冰浴条件下行蛋白裂解及研磨。离心取上清液, BCA法行蛋白测定。取蛋白样品, 垂直电泳分离, 转至硝酸纤维素膜上, 脱脂奶粉封闭, 加入兔抗Ephrin-B2单克隆抗体(Abcam, 1:2 000), 4℃过夜, 羊抗兔IgG(Sant Cruz, 1:2 000)室温孵育, 加发光剂后X线-感光盒内曝光。凝胶成像系统分析扫描结果, 测定蛋白条带的平均吸光度值, 目的条带蛋白与内参GAPDH吸光度的比值即为目的蛋白的相对值。

1.6 荧光定量RT-PCR检测Ephrin-B2 mRNA表达

用TRIzol一步法提取脑组织总RNA, 反转

录为cDNA, 应用荧光定量RT-PCR检测脑组织Ephrin-B2 mRNA表达水平。以Premier 5.0设计引物, Ephrin-B2基因引物的上游序列: 5'-AGA AGC TGG TAC GAA TGG-3', 下游: 5'-CAG GAC GGT TGT AAA TGA TG-3', 以上序列由上海生工生物有限公司合成。反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 45 s, 57℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环30次; 72℃ 10 min终止反应, 采用相对定量法采集数据。

1.7 统计学处理

所有数据使用SPSS 13.0统计软件包进行处理。图表绘制由GraphPad Prism 5软件完成。数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间样本均数比较采用ANOVA检验, 组间比较采用双尾LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分和MVD计数

缺血再灌注7 d亚组的神经功能评分较1 d及3 d亚组增加($P < 0.05$), 14 d较7 d亚组下降($P < 0.01$, 图1A)。3 d亚组的缺血半暗区MVD计数(CD31⁺红色荧光)较假手术组明显增加($P < 0.05$), 14 d亚组达到最高峰($P < 0.01$), 28 d亚组有所回落(图1B, 1C)。

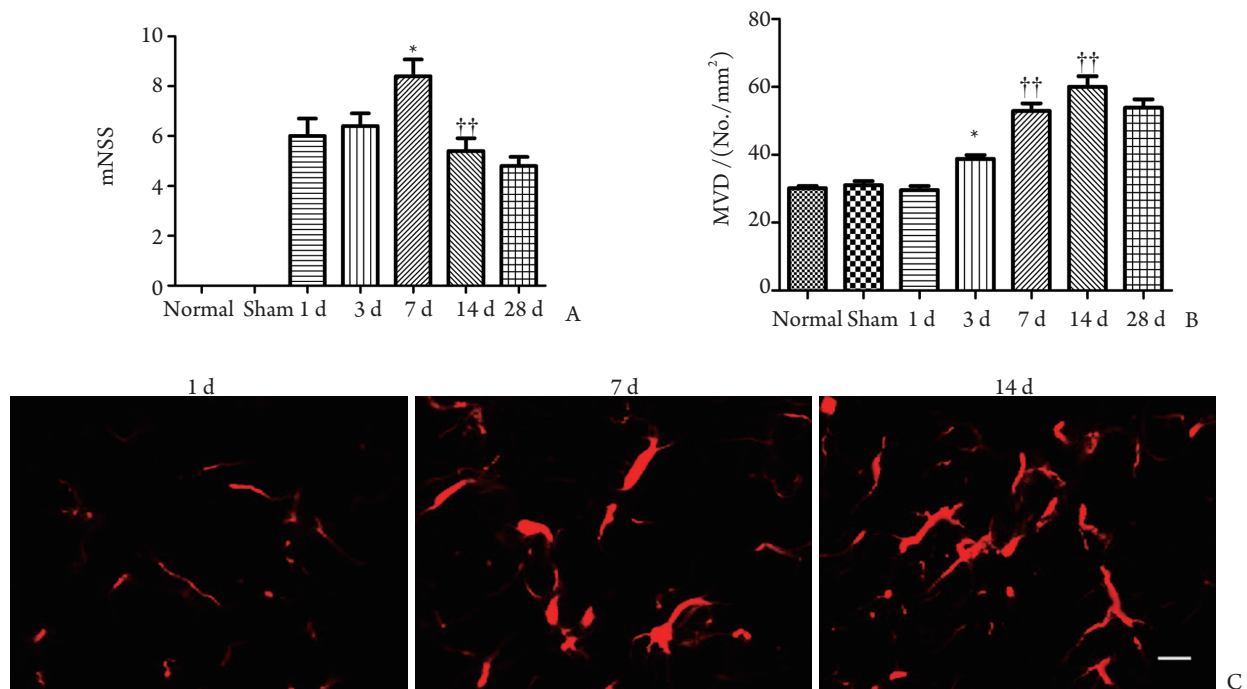


图1 各组神经功能评分和MVD计数

Figure 1 MVD and mNSS of different groups

A: mNSS, * $P < 0.05$ vs ischemic-reperfusion at day 1, $\dagger\dagger P < 0.01$ vs ischemic-reperfusion at day 7; B: MVD, * $P < 0.05$ vs ischemic-reperfusion at day 1, $\dagger\dagger P < 0.01$ vs ischemic-reperfusion at day 3; C: Immunofluorescence of CD31 (red shows positive, scale bar = 50 μm)

2.2 Ephrin-B2分别与CD31, GFAP及NeuN的免疫荧光双染

Ephrin-B2在缺血中心区有少许表达(图2A), 1 d亚组缺血半暗带表达稍强于缺血中心区(图2B), 14 d亚组表达最强(图2C), 28 d亚组有所减弱(图2D)。

Ephrin-B2在血管内皮细胞有表达, 并浓聚于血管的周围(图3A), Ephrin-B2在星形胶质细胞的细胞膜、终足及突起有明显的表达(图3B), Ephrin-B2在神经元的细胞膜也有广泛的表达(图3C)。

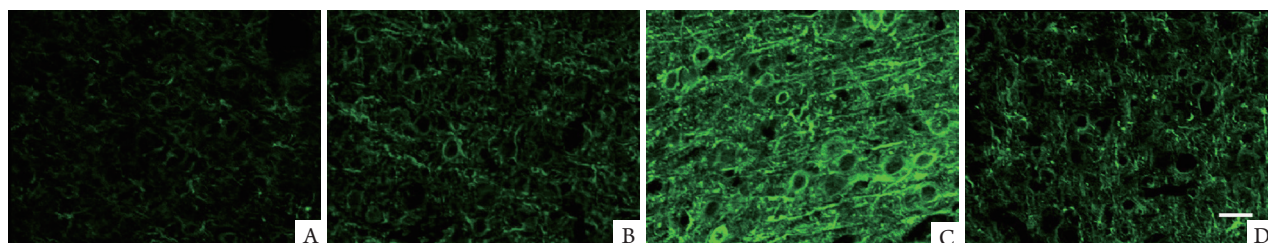


图2 Ephrin-B2 (绿色荧光) 在缺血中心区域及各时间点缺血半暗带的表达

Figure 2 Immunofluorescence of Ephrin-B2 (green) in ischemic core area and ischemic penumbra at different time points

A: Ischemic core; B: Ischemic-reperfusion at day 1; C: Ischemic-reperfusion at day 14; D: Ischemic-reperfusion at day 28 (scale bar=25 μm)

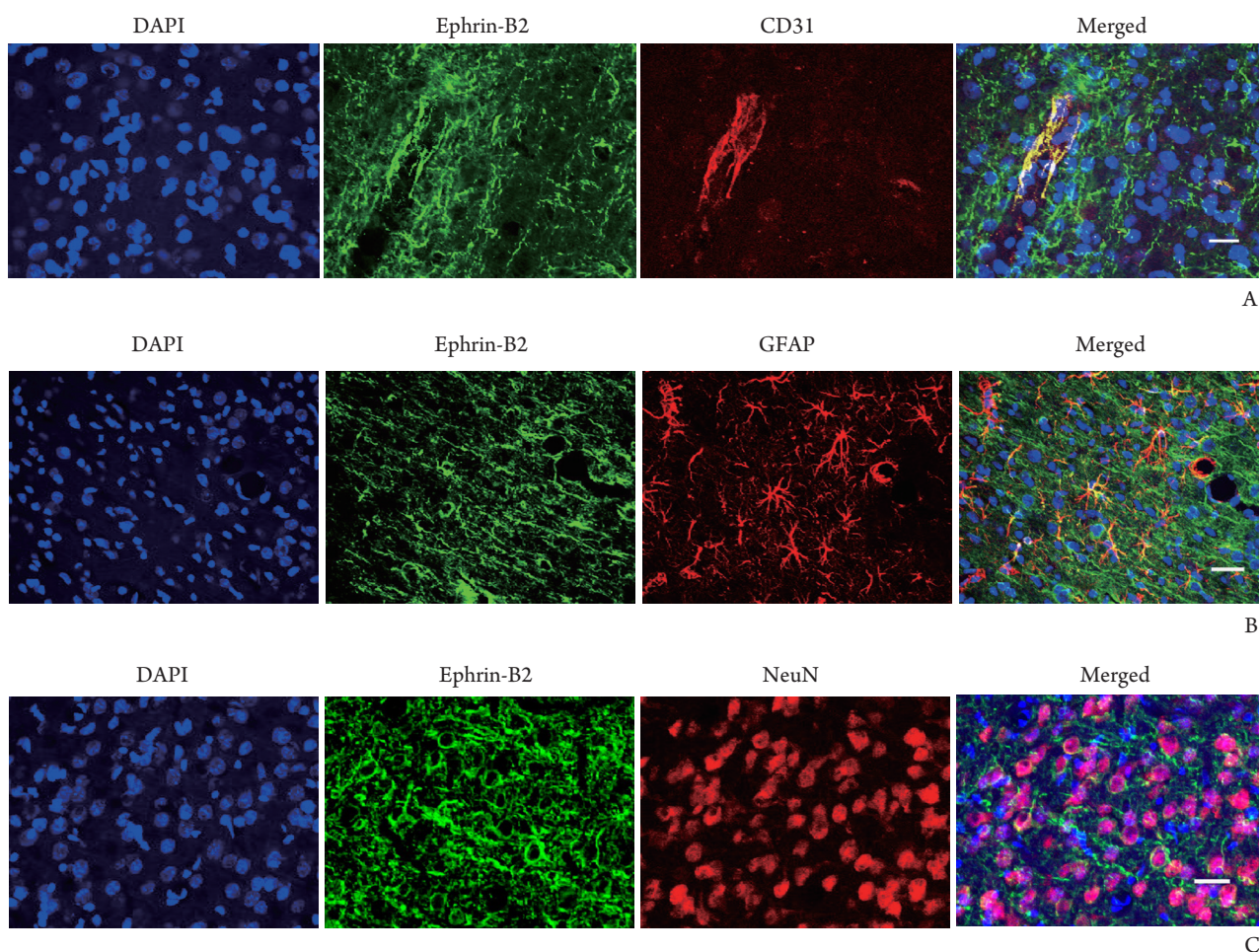


图3 Ephrin-B2 在缺血半暗带的血管内皮、神经元及星形胶质细胞均有表达

Figure 3 Expression of Ephrin-B2 in blood vessels, astrocytes, and neurons in ischemic penumbra

A: Ephrin-B2 was expressed in blood vessels; B: Ephrin-B2 was expressed in astrocytes; C: Ephrin-B2 was expressed in neurons (scale bar=25 μm)

2.3 Ephrin-B2蛋白和mRNA的表达

缺血再灌注3 d亚组Ephrin-B2 mRNA的表达显著增加($P<0.05$), 7 d亚组和14 d亚组达到最高峰($P<0.01$), 28 d亚组回落(图4A)。缺血再灌注后第1

天Ephrin-B2蛋白水平开始增加($P<0.05$), 7 d亚组及14 d亚组表达水平最高($P<0.01$), 28 d亚组有所回落(图4B)。

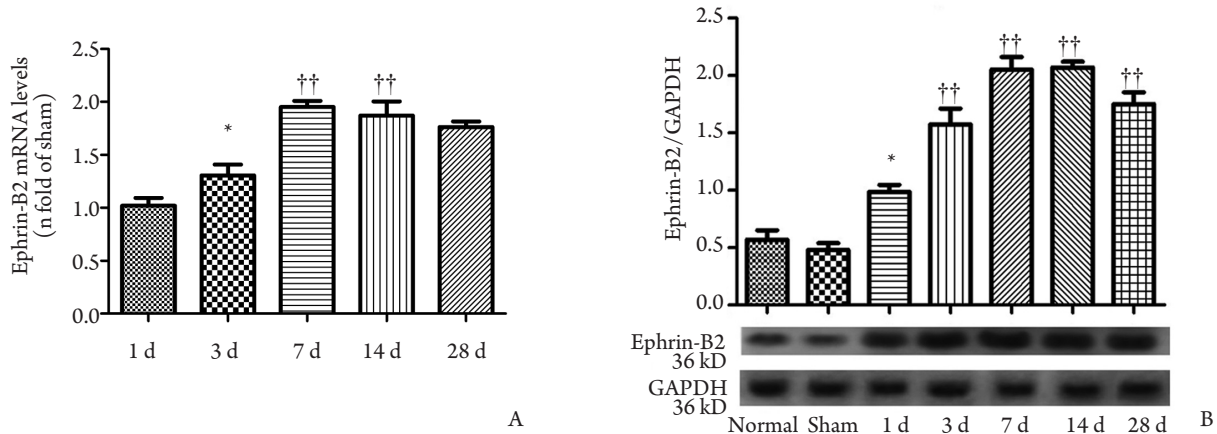


图4 Ephrin-B2 mRNA和蛋白的表达

Figure 4 Protein and mRNA level of Ephrin-B2

A: Ephrin-B2 mRNA level of the penumbra cortex in different groups, * $P<0.05$ vs ischemic-reperfusion at day 1, †† $P<0.01$ vs ischemic-reperfusion at day 3; B: Ephrin-B2 protein level of the penumbra cortex in different groups, * $P<0.05$ vs the sham group, †† $P<0.01$ vs ischemic-reperfusion at day 1

3 讨论

脑缺血后, 由于缺血、缺氧引起神经细胞变性、坏死, 进而导致神经功能缺损。研究^[4]显示脑梗死后脑组织中存在血管新生的现象。血管新生与改善脑组织血流供应、促进神经修复及清除坏死组织密切相关^[5], 对卒中患者的预后十分关键, 从而成为近年来卒中研究的热点之一。本研究观察到缺血半暗带中微血管密度较正常脑组织有所增加, 且随缺血天数增加而递增, 到第14天达到最高峰, 随后第28天有所下降; 同时对各时间点缺血模型进行的改良神经功能评分也发现, 从缺血第1天开始到缺血第7天评分递增, 而后下降, 第28天分数最低。第7天的神经功能评分最高可能是由于水肿高峰期所致。笔者推测半暗带中微血管密度的增加改善了缺血、缺氧引起神经细胞变性及坏死, 促进了神经功能缺失的修复。

受体酪氨酸蛋白激酶家族被认为是参与血管新生及血管发生的关键因子之一^[6]。Ephrins对胚胎形成中的神经轴突生长、细胞迁移以及细胞的附着起着重要的调节作用^[7-8]。Ephrin-B2及其受体 Eph-B4同时参与了血管新生和神经轴

索生长的调控过程^[7-8]。研究^[9]显示大鼠胚胎无论是缺乏Eph-B4还是Ephrin-B2都会导致严重的心血管系统畸形。Ephrin-B2融合蛋白腹腔注射可促进大鼠缺血心肌组织血管新生^[10]。在本研究中, 通过Western印迹对各时间点缺血半暗带脑组织中Ephrin-B2蛋白的表达进行检查, 发现缺血后第3天Ephrin-B2蛋白水平开始显著增加, 到第7天及14天表达水平最高, 第28天有所回落。而通过荧光定量PCR对Ephrin-B2 mRNA的检测结果显示了一致的趋势。本实验观察到的缺血半暗带中微血管密度计数的变化趋势与Ephrin-B2 mRNA及蛋白水平表达趋势基本符合。通过Ephrin-B2与CD31免疫荧光双染, 观察到Ephrin-B2在缺血半暗带扩展的血管周围有浓聚现象。因此推论Ephrin-B2参与了脑缺血后血管新生的调控过程中, 并很可能促进了脑缺血后血管新生。

以往研究^[11]表明Ephrin-B4参与调节胚胎干细胞对中胚层诱导信号的反应, 从而对神经系统的发生、发育起关键调节作用。Ashton等^[12]研究发现Ephrin-B2阳性的星形胶质细胞可促进成体神经干细胞的分化与增殖。本试验也观察到Ephrin-B2在神经细胞胞膜、神经纤维及星形胶质细胞均有明

显的表达。因此, 推测 Ephrin-B2 可能参与了缺血后神经再生。

参考文献

1. Morris DC, Yeich T, Khalighi MM, et al. Microvascular structure after embolic focal cerebral ischemia in the rat[J]. Brain Res, 2003, 972(1/2): 31237.
2. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84291.
3. Krystal LS, Miranda MB, Sean IS, et al. Functional assessments in the rodent stroke model[J]. Experiment Translat Stroke Med, 2010, 2(1): 13.
4. Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke[J]. Stroke, 1994, 25(9): 1794-1798.
5. Advye E, Ahmed A, Susan CF, et al. Angiogenesis: A harmonized target for recovery after stroke[J]. Stroke, 2012, 43(8): 2270-2274.
6. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoetins, and ephrins in vascular development[J]. Genes Dev, 1999, 13(4): 1055-1066.
7. Pasquale EB. The Eph family of receptors[J]. Curr Opin Cell Biol, 1997, 9(5): 608-615.
8. Brantley-Sieders DM, Chen J. Eph receptor tyrosine kinase in angiogenesis: from development to disease[J]. Angiogenesis, 2004, 7(1): 17-28.
9. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by Ephrin-B2 and its receptor Eph-B4[J]. Cell, 1998, 93(6): 741-753.
10. Månsson-Broberg A, Siddiqui AJ, Genander M, et al. Modulation of Ephrin-B2 leads to increased angiogenesis in ischemic myocardium and endothelial cell proliferation[J]. Biochem Biophys Res Communicat, 2008, 37(3): 355-359.
11. Holmberg J, Clarke DL, Frisén J. Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor[J]. Nature, 2000, 408(3): 203-206.
12. Ashton RS, Conway A, Pangarkar C. Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling[J]. Nat Neurosci, 2012, 15(10): 1399-1406.

(本文编辑 彭敏宁)

本文引用: 肖慧, 谷文萍, 杨期东, 曾学辉. 大鼠局灶脑缺血再灌注后 Ephrin-B2 的表达[J]. 中南大学学报: 医学版, 2014, 39(5): 452-457.

DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.05.003

Cite this article as: XIAO Hui, GU Wenping, YANG Qidong, ZENG Xuehui. Expression of Ephrin-B2 after focal cerebral ischemia in rats[J].

Journal of Central South University. Medical Science, 2014, 39(5): 452-457.

DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2014.05.003