

网络出版时间: 2020-12-2 15:58 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201201.1526.017.html>

VEGFb 参与白藜芦醇促进面神经损伤大鼠神经再生

杨棕昕¹, 凤麟飞^{2*}, 李芳¹, 刘泽婷¹, 王元银¹

摘要 目的 探索白藜芦醇(Res)在面神经损伤模型中的作用及机制。方法 按照随机分组原则将雄性SD大鼠分为假手术组(Sham组)和面神经损伤组(Crush组),对Crush组大鼠行右侧面神经干夹持损伤建立面神经损伤模型。将Crush组大鼠随机分为3组:对照组(Crush + Vehicle组)、白藜芦醇组(Crush + Res组)以及抑制剂组(Crush + Res + Axitinib组)。采用Western blot和QPCR比较不同组大鼠面神经内血管内皮生长因子b(VEGFb)及其受体VEGFR1、VEGFR2的表达。采用免疫组化对面神经损伤及再生情况进行评估。结果 与Crush + Vehicle组相比,Crush + Res组VEGFb、VEGFR1、VEGFR2的表达提高($n=3, P<0.05$),神经再生得到促进。与Crush + Res组相比,Crush + Res + Axitinib组中VEGFb及VEGFR1、VEGFR2的表达和神经再生作用被抑制($n=3, P<0.01$)。结论 Res在面神经损伤后提高了VEGFb、VEGFR1和VEGFR2的表达,促进神经再生。关键词 白藜芦醇; 血管内皮生长因子; 面神经损伤

中图分类号 R 745.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)12-1905-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.017

面神经麻痹是部分或完全丧失面神经功能,主要表现为面部表情肌群运动功能障碍,也称为面瘫^[1]。当面部肌群瘫痪时,出现一系列感觉及运动障碍,如鼻唇沟消失,不能上提口角,眼睑不能闭合,不能皱眉,额纹消失等。

白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种天然存在于食物中的多酚化合物,因其在控制氧化应激、炎症和细胞死亡等多个靶点方面的益处而广为人知^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是Res对神经系统发挥有益作用的靶点之一^[3]。Hermann et al^[4]在两项独立研究中发现,Res提高了受损伤大脑中VEGF的表达水平,从而可能通过此缓解脑损伤。该实验通过构建大鼠面神经损伤模型研究Res对于面神经损伤后的神经再生的作用及VEGF在其作用机制中所扮演的角色。

1 材料与方法

1.1 实验动物 36只清洁级成年雄性SD大鼠,7~8周龄,体质量180~200g,购自安徽医科大学实验动物中心,常规饲料饲养,自由饮水,温度为22~25℃,12h/12h交替照明。

1.2 动物模型建立 按随机分组原则将大鼠分为2组,损伤组(Crush组)($n=24$)和假手术组(Sham

2020-07-22 接收

项目基金: 国家自然科学基金(编号: 81271162); 安徽省科技攻关项目(编号: 1401045013); 安徽省重点研究和开发计划项目(编号: 201904a07020062)

作者单位: ¹安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院口腔颌面外科, 合肥 230032

作者简介: 杨棕昕, 女, 硕士研究生;

王元银, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com

* 对本文具有同等贡献

VSMCs were treated with different concentrations of IL-18 (3, 10, 30, 100 ng/ml), and at different times, TNF- α , IL-6, IL-8; block p38 and AKT signal pathways with specific inhibitors, and analyze the activation of these two signal pathways by Western blot and its effect on the expression of TNF- α , IL-6 and IL-8 proteins. **Results** IL-18 at different concentrations could increase the expression of TNF- α , IL-6, IL-8 mRNA in VSMC, showing a dose-dependent effect. IL-18 (30 ng/ml) increased mRNA and protein levels of the three cytokines in a time-dependent manner. Western blot results showed that IL-18 can activate p38 and AKT; analysis of specific blockers found that IL-18 regulates the expression of TNF- α , IL-6, and IL-8 in part dependent on the activation of p38 and AKT signal pathways. **Conclusion** IL-18 partly relies on the activation of p38 and AKT signaling pathways to increase the expression of TNF- α , IL-6 and IL-8 in VSMC.

Key words interleukin-18; vascular smooth muscle cells; cytokines; signal transduction pathways

组) ($n=8$)。Crush 组为该实验主要研究模型,按照 0.35 ml/100 g 对大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛进行全身麻醉;麻醉生效后,无菌条件下对大鼠右侧面部进行解剖,切开皮肤,钝性分离到达肌层,沿面神经走向解剖,到达面神经干部位分离面神经,使用持针器夹持面神经干 90 s 构建面神经损伤模型。Sham 组同样手术操作,但仅暴露面神经干,不进行损伤。两组术后用 3-0 丝线常规进行皮肤伤口的缝合。Crush 组大鼠再随机分为 3 组:①对照组(Crush + Vehicle 组),损伤后仅使用对面神经损伤后无任何作用的盐水;②白藜芦醇组(Crush + Res 组),此组在损伤后使用 Res (Cat V90038,美国 Sigma-Aldrich 公司);③抑制剂组(Crush + Res + Axitinib 组),损伤后使用 Res 和 VEGF 信号抑制剂 Axitinib (Cat S1005,上海 Selleck 公司)。

1.3 药物注射 对 Crush + Res 组与 Crush + Res + Axitinib 组大鼠按照 200 mg/kg 腹腔注射 Res,对照组注射生理盐水。Crush + Res + Axitinib 组大鼠额外在右侧面部耳屏前使用微量注射器局部注射 10 μ mol/L 的 Axitinib 10 μ l。所有药物注射,每日 1 次,持续 10 d。

1.4 QPCR 检测 VEGFb 及受体 mRNA 含量 大鼠连续注射药物 10 d 后,通过腹腔过量注射 10% 水合氯醛致死。麻醉致死后剪下大鼠头部,迅速切开右侧皮肤取出右侧面神经干,称重后将其剪碎后按照每 100 mg 组织加入 1 ml 的 TRIzol 试剂于匀浆器内充分研磨。使用 NanoDropND-3000 检测各面神经组织样本提取的 mRNA 浓度和纯度,然后使用 RevertAidTM 第一链 cDNA 合成试剂盒内的逆转录反应体系制备 cDNA 进行 PCR 的扩增,反应参数为:预变性 95 $^{\circ}$ C、1 min,95 $^{\circ}$ C、20 s,60 $^{\circ}$ C、1 min,40 个循环。各基因扩增的引物序列见表 1,各组 mRNA 的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算。

表 1 基因引物序列

基因	扩增片段大小(bp)	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
β -actin	150	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTC
VEGFR1	107	AAAGTCCGTGTCTCCCTTC	ACAGCCACTTGATGGTAGGC
VEGFR2	184	AGATCGCGAACTACACGG	GGGAGGGTTGGCATAGACT
VEGFb	120	CCAAGTCCGAATGCAGATCC	GGCTTCACAGCACTCTCCTT

1.5 Western blot 检测 VEGFb 及受体蛋白含量 大鼠连续注射药物 10 d 后,致死后同 QPCR 的手术操作采集面神经组织,称重后在匀浆器中根据每 100 mg 加入 1 ml RIPA 裂解液(含 1% PMSF),充分

研磨。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质后转移到 PVDF 膜,用 5% BSA(美国 Sigma-Aldrich 公司)在室温下封闭 1 h,将膜与稀释抗体置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜。使用的 VEGFb 抗体属性为兔抗(1:500, ab185696,英国 Abcam 公司); VEGFR1 抗体属性为兔抗(1:500, ab2350,英国 Abcam 公司); VEGFR2 抗体属性为兔抗(1:400, 26415-4-AP,美国 proteintech 公司) beta Actin 抗体属性为兔抗(1:1000, ab8227,英国 Abcam 公司)。按照 1:5000 用二抗稀释液稀释辣根过氧化物酶标记的二抗(#7074, 美国 Cell Signaling Technology 公司),将膜置于二抗中在摇床上洗涤。参考相关说明书,使用 ECL 发光试剂盒来检测蛋白。设置适宜的曝光时间进行化学发光反应。使用 ImageJ 软件对曝光后的蛋白条带图灰度值进行统计分析。

1.6 免疫组化评估面神经损伤后神经再生情况 大鼠连续注射药物 10 d 后,致死后同 QPCR 的手术操作采集面神经组织,放入 4% 多聚甲醛(PA)溶液固定。随后进行梯度脱水,将组织放入 1 $\times$ PBS 溶液配制的 10%、20% 的蔗糖溶液依次浸泡 2 h,最后放入 1 $\times$ PBS 溶液配制的 30% 蔗糖溶液在 4 $^{\circ}$ C 下过夜。梯度脱水后包埋切片,含驴血清的 PBST 孵育 1 h,使用兔抗 NF200 (1:100, 美国 Sigma-Aldrich 公司),在 4 $^{\circ}$ C 下过夜。二抗标记使用的是含特定驴血清抗体的 Alex Fluor 488 (1:400, 美国杰克逊实验室),置于室温下 2 h。最后滴加荧光淬灭封片液,在激光共聚焦显微镜下观察,计算机获取数据,成像。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。QPCR 结果、Western blot 结果均采用两独立样本 t 检验来比较两组的数据。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠术侧面神经损伤后面神经情况 通过免疫组化评估大鼠面神经损伤后的形态学变化,结果显示,与 Sham 组相比,Crush + Vehicle 组中 NF200 阳性的轴突数目明显减少,表明神经纤维已被损伤,即模型的建立成功。与 Crush + Vehicle 组相比,Crush + Res 组中 NF200 阳性的轴突数目更多,说明神经纤维发生再生,即 Res 具有促进面神经损伤后的再生作用(图 1)。

2.2 大鼠术侧面神经中 VEGFb、VEGFR1 及 VEGFR2 的 mRNA 的表达 通过 QPCR 检测术后

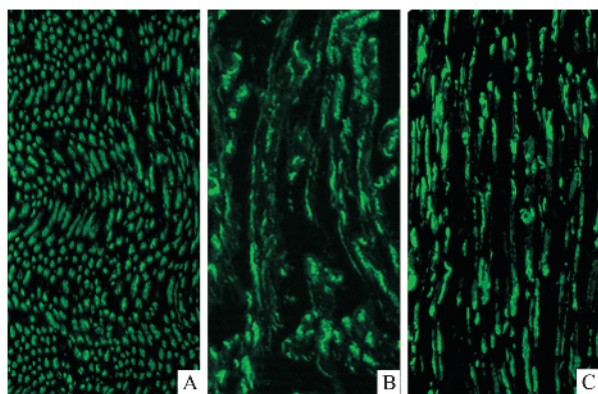


图1 3组大鼠面神经损伤后免疫组化结果 ×20

A: Sham 组; B: Crush + Vehicle 组; C: Crush + Res 组

给药 10 d 后 Sham 组、Crush + Vehicle 组、Crush + Res 组和 Crush + Res + Axitinib 组大鼠中 VEGFb、VEGFR1 及 VEGFR2 的 mRNA 的表达。与 Sham 组和 Crush + Vehicle 组相比, Crush + Res 组 VEGFb、VEGFR1、VEGFR2 mRNA 的表达增加 ($\bar{x}_{\text{sham}} = 1.005, 1.007, 1.015$, $\bar{x}_{\text{vehicle}} = 1.418, 1.660, 1.542$, $\bar{x}_{\text{res}} = 3.263, 3.528, 3.147$, $t_{\text{sham}} = 14.99, 18.46, 10.07$, $t_{\text{vehicle}} = 13.79, 11.03, 7.199$, $P < 0.001, 0.001, 0.001$); 与 Crush + Res 组相比, Crush + Res + Axitinib 组 VEGFb、VEGFR1、VEGFR2 mRNA 表达减少, 即 Axitinib 有效地抑制了 Res 促进 VEGFb mRNA 表达的作用 ($\bar{x}_{\text{axitinib}} = 2.613, 2.687, 2.300$, $t = 4.427, 4.771, 3.303$, $P < 0.01, 0.001, 0.01$)。以上的数据结果表明造模给药 10 d 后, Res 提高了面神经中 VEGFb、VEGFR1 及 VEGFR2 的 mRNA 的表达水平, 而 Axitinib 也有效地抑制了 Res 促进 VEGFb、VEGFR1 及 VEGFR2 的 mRNA 的表达作用, 差异均有统计学意义。见图 2。

2.3 大鼠术侧面神经中 VEGFb、VEGFR1 及 VEGFR2 蛋白的表达 通过 Western blot 检测术后给药 10 d 后不同组别中大鼠面神经中 VEGFb、VEGFR1 及 VEGFR2 蛋白的表达情况。与 Sham 组和 Crush + Vehicle 组相比, Crush + Res 组面神经中 VEGFb、VEGFR1、VEGFR2 蛋白的表达增加 ($\bar{x}_{\text{sham}} = 0.4404, 0.4435, 0.5197$, $\bar{x}_{\text{vehicle}} = 0.5841, 0.5742, 0.5885$, $\bar{x}_{\text{res}} = 1.090, 1.141, 1.272$, $t_{\text{sham}} = 19.61, 21.87, 12.5$, $t_{\text{vehicle}} = 14.81, 14.72, 11.35$); 与 Crush + Res 组相比, Crush + Res + Axitinib 组 VEGFb、VEGFR1、VEGFR2 表达减少, 说明 Axitinib 有效地抑制了 Res 促进 VEGFb、VEGFR1、VEGFR2 蛋白表达的作用 ($\bar{x}_{\text{axitinib}} = 0.8582, 1.0100, 1.0510$, $t =$

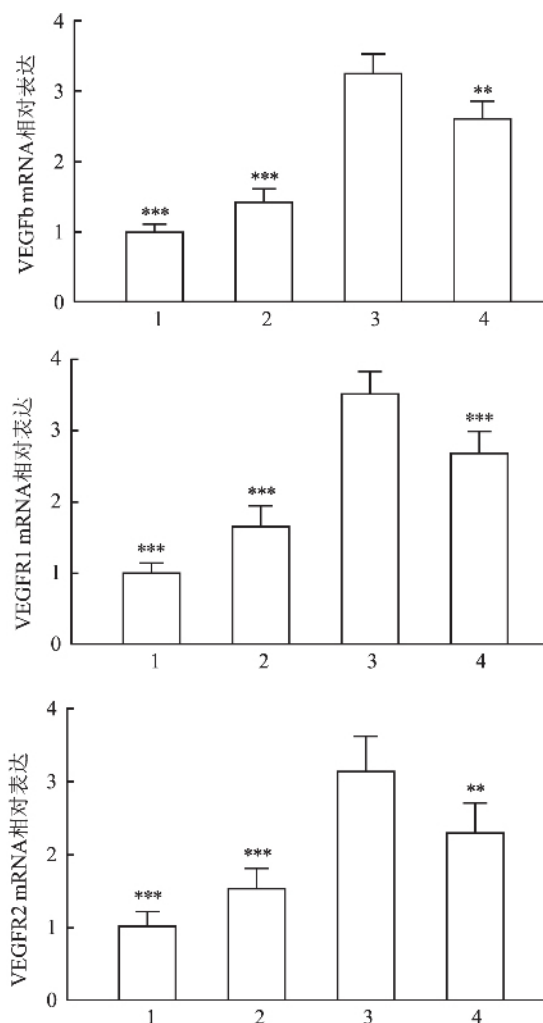


图2 各组大鼠中 VEGFb、VEGFR1 及 VEGFR2 的 mRNA 的表达水平

1: Sham 组; 2: Crush + Vehicle 组; 3: Crush + Res 组; 4: Crush + Res + Axitinib 组; 与 Crush + Res 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

5.112, 3.744, 5.038)。以上的统计结果表明造模给药 10 d 后, Res 提高了面神经中 VEGFb、VEGFR1 及 VEGFR2 蛋白的表达水平, 而 Axitinib 也有效地抑制了 Res 提高 VEGFb、VEGFR1 及 VEGFR2 蛋白表达的作用, 差异均有统计学意义。见图 3。

2.4 Axitinib 对大鼠术区面神经的神经再生作用的影响 通过免疫组化评估 Axitinib 在大鼠面神经损伤后的作用, 结果显示, 与 Crush + Res 组相比, Crush + Res + Axitinib 组的 NF200 阳性轴突数目明显减少, 说明 Res 对神经再生的促进作用被 Axitinib 所抑制(图 4)。

3 讨论

近些年来, Res 在神经系统中的作用得到了广泛的研究。Res 具有多种作用于靶细胞、细胞生理

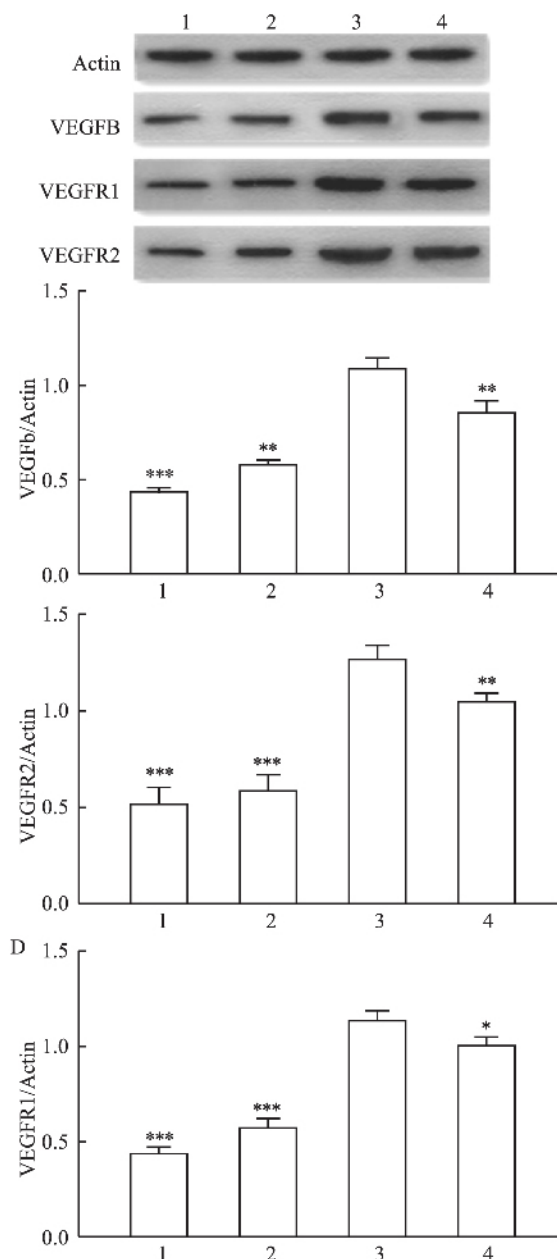


图3 各组大鼠面神经中 VEGFb、VEGFR1 和 VEGFR2 蛋白的表达水平

1: Sham 组; 2: Crush + Vehicle 组; 3: Crush + Res 组; 4: Crush + Res + Axitinib 组; 与 Crush + Res 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

学和信号传导的药理学作用。Res 可能在不同的器官或细胞中对相同的靶点显示出不同的效果。例如, Res 已经被证明可以降低内皮细胞和肿瘤细胞中的 VEGF 表达。Res 通过激活神经系统中的蛋白激酶 B 信号通路产生对神经的保护作用^[8], 也有学者^[9]证实 Res 可通过提高机体内蛋白激酶 B 磷酸化水平从而起到缓解肾脏损伤的作用。Res 已被证明在治疗各种类型的中枢神经系统损伤中具有神经

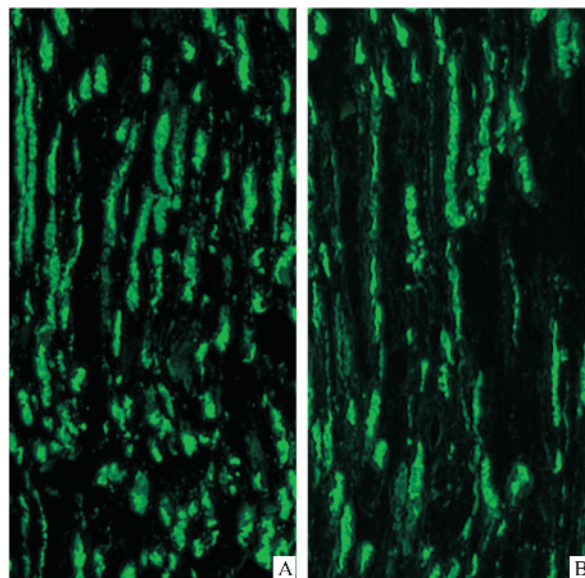


图4 Crush + Res 组和 Crush + Res + Axitinib 组面神经的神经再生情况 ×20

A: Crush + Res 组; B: Crush + Res + Axitinib 组

保护作用, 包括中风、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血和脊髓损伤等。此外, Res 在周围神经损伤动物模型的治疗中也显示出了保护作用。例如 Lindsey et al^[10]发现 Res 通过长期给药显示出对受损视网膜神经节细胞树突的保护作用。

VEGF 是 Res 对神经系统发挥有益作用的靶点之一^[9], 近年来许多学者将 VEGF 作为神经再生的有效中介进行研究。VEGF 可支持和促进再生神经纤维的生长和神经元存活^[8-9]。Raimondo et al^[11]证实 VEGF 和胰岛素样生长因子 1 联合应用可促进小鼠坐骨神经损伤模型中神经支配功能的恢复, 与对照组相比, 实验组小鼠在神经损伤后表现出更强的运动能力。Ding et al^[12]证实了使用 Res 10 d 后, 与损伤组相比, Res 组大鼠在一系列关于坐骨神经运动功能的检测指标上都体现了运动功能的恢复。Ding et al^[13]通过免疫组化发现, Res 应用后促进了损伤后轴突的恢复和再生。其中, 作为 Res 靶点之一的 VEGF 信号通路被激活, 其中 VEGFb 和 VEGFR1 及 VEGFR2 蛋白和 mRNA 表达均提高。以上的研究结果提示在大鼠坐骨神经损伤模型中, Res 可能是通过激活机体内的 VEGF 信号通路, 提高了 VEGFb mRNA 与蛋白表达水平, 最后达到促进神经再生以及运动功能恢复的作用。但是 Res 在面神经损伤模型中的作用及它是否影响 VEGF 相关的表达尚未得到研究。

本研究采用的是大鼠夹持损伤导致的面神经损

伤模型,在面神经损伤后,使用 Res 可促进 VEGFb 与其受体 VEGFR1 和 VEGFR2 的表达,从而促进了神经再生的发生,且 Res 对于神经再生的有效作用可被 VEGF 抑制剂 Axitinib 所抑制。Res 对于面神经损伤后的神经再生具有促进作用,且可能是通过激活机体内的 VEGF 信号通路使 VEGFb 和其受体 VEGFR1 和 VEGFR2 的 mRNA 和蛋白表达增加来实现这一作用。

本实验参考 Ding et al^[3] 的文章,后续希望能够通过对 Res 使用剂量和时间的研究来完善补充 Res 和面神经再生之间的量效关系以及增加对照药物的实验来提高可信度及准确度。

参考文献

- [1] 张志愿,俞光岩. 口腔颌面外科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社,2012: 421-2.
- [2] 华丛书,陈海,张朝东,等. 白藜芦醇诱导人肺腺癌 A549 细胞细胞凋亡及其与 p38 MAPK 信号途径的联系 [J]. 安徽医科大学学报, 2015(10): 85-8.
- [3] Ding Z, Cao J, Shen Y, et al. Resveratrol promotes nerve regeneration via activation of p300 acetyltransferase-mediated VEGF signaling in a rat model of sciatic nerve crush injury [J]. Front Neurosci, 2018,12: 341.
- [4] Hermann D M, Zechariah A, Kaltwasser B, et al. Sustained neurological recovery induced by resveratrol is associated with angiogenesis rather than neuroprotection after focal cerebral ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2015,83: 16-25.
- [5] Banerjee M S, Chakraborty P K, Raha S. Modulation of Akt and ERK1/2 pathways by resveratrol in chronic myelogenous leukemia (CML) cells results in the downregulation of Hsp70 [J]. PLoS One, 2010,5(1): e8719.
- [6] 宋先兵,张宝,黄焱平,等. 白藜芦醇对大鼠肾脏缺血-再灌注损伤保护作用研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2015,50(8): 71-4.
- [7] Lindsey J D, Duong-Polk K X, Hammond D, et al. Protection of injured retinal ganglion cell dendrites and unfolded protein response resolution after long-term dietary resveratrol [J]. Neurobiol Aging, 2015,36(5): 1969-81.
- [8] Lange C, Storkebaum E, de Almodovar C R, et al. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases [J]. Nat Rev Neurol, 2016, 12(8): 439-54.
- [9] Raimondo T M, Li H, Kwee B J, et al. Combined delivery of VEGF and IGF-1 promotes functional innervation in mice and improves muscle transplantation in rabbits [J]. Biomaterials, 2019, 216: 119246.

VEGFb involves in resveratrol promoting nerve regeneration in rats with facial nerve injury

Yang Liangxin¹, Feng Linfei², Li Fang¹, et al

(¹ College of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ² Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the role and mechanism of resveratrol (Res) in facial nerve injury model. **Methods** Male SD rats were randomly divided into sham operation group (Sham group) and facial nerve injury group (Crush group), and facial nerve injury model was established by clamping injury of right facial nerve trunk in rats of the Crush group. The rats in the Crush group were randomly divided into three groups: the control group (Crush + Vehicle group), the resveratrol group (Crush + Res group), and the inhibitor group (Crush + Res + Axitinib group). Western blot and QPCR were used to compare the expression levels of vascular endothelial growth factor b (VEGFb) and its receptors 1 and 2 (VEGFR1, VEGFR2) in facial nerve of different groups. Immunohistochemistry was used to evaluate facial nerve regeneration. **Results** Compared with the Crush + Vehicle group, the expression of VEGFb, VEGFR1 and VEGFR2 in the Crush + Res group was increased and nerve regeneration was promoted. The expression of VEGFb, VEGFR1 and VEGFR2 in Crush + Res + Axitinib group was inhibited compared with that in Crush + Res group. **Conclusion** Res can enhance the expression of VEGFb, VEGFR1 and VEGFR2 after facial nerve injury and promote nerve regeneration.

Key words resveratrol; vascular endothelial growth factor; facial injury