

激肽原酶对大鼠中动脉缺血大鼠 CGRP、RAMP1 及 VEGF 表达的影响

常坤鹏¹, 丁小灵¹, 王取南², 夏新²

摘要 目的 研究激肽原酶预处理对脑缺血大鼠降钙素基因相关肽(CGRP)、受体活性修饰蛋白1(RAMP1)及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。方法 将80只大鼠随机均分成4组,假手术组(S组)、脑缺血组(I组)、激肽原酶低剂量组(3.75×10^{-3} PNA 单位/(kg·d), I + Kal₁ 组)、激肽原酶高剂量组(17.25×10^{-3} PNA 单位/(kg·d), I + Kal₂ 组)。经尾静脉注射给药1周后,采用线栓法堵塞大鼠右侧大脑中动脉,建立右侧大脑中动脉缺血模型。术后24 h 红四氮唑法测量脑梗死体积,使用免疫组化和 Western blot 法观察 CGRP 蛋白在海马组织内的表达及 RAMP1 和 VEGF 蛋白在皮层组织内的表达。结果 与 S 组相比, I 组大鼠脑组织 CGRP、RAMP1 及 VEGF 蛋白水平表达增加 ($P < 0.01$); 与 I 组相比, 激肽原酶高、低剂量能明显促进脑缺血大鼠脑组织 CGRP、RAMP1 及 VEGF 蛋白的表达 ($P < 0.05$), 脑梗死体积缩小 ($P < 0.05$)。结论 激肽原酶促进缺血脑组织内 CGRP、RAMP1 蛋白的表达, CGRP、RAMP1 的表达可能与脑梗死后血管新生有相关性。

关键词 降钙素基因相关肽; 受体活性修饰蛋白1; 血管内

皮生长因子; 激肽原酶; 缺血性脑卒中; 大鼠

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)08-1063-05

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是一个广泛分布于中枢和外周神经系统中的辣椒素敏感感觉神经的重要肽类递质。新近研究^[1]显示, CGRP 还具有显著地促进血管生成的作用, 此作用可能与 CGRP 激活了内皮细胞的 AMPK-eNOS 途径有关。CGRP 的生理作用主要通过其受体发挥, 而受体活性修饰蛋白1(receptor activity modifying protein 1, RAMP1)通过调节降钙素受体样受体(Calcitonin receptor-like receptor, CRLR)与配体结合, 从而决定和调节 CGRP 的受体活性^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种具有内皮细胞特异性的有丝分裂原, 随着相关研究的不断深入, VEGF 的表达水平已被作为血管新生能力的标志。该实验采用大鼠右侧大脑中动脉缺血模型, 观察不同剂量激肽原酶对大鼠脑缺血后脑梗死体积、VEGF 蛋白及促进血管新生因子 CGRP、RAMP1 表达的影响情况, 探讨 CGRP、RAMP1 与缺血性脑卒中后梗死灶周围血管新生的相关性。

2015-03-20 接收

基金项目: 安徽省年度重点科研项目(编号: 1301043017)

作者单位: ¹安徽医科大学附属医院神经内科, 合肥 230001

²安徽医科大学公共卫生学院卫生毒理系, 合肥 230032

作者简介: 常坤鹏, 男, 硕士研究生;

丁小灵, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: mer-ryding@163.com

group. H/R injury was established by 21 hours of hypoxia and subsequent 6 hours of reoxygenation. Expression of growth GHSR in H9C2 cells was reduced by siRNA. Apoptosis of H9C2 cardiomyocytes under different treatments following H/R injury was observed by Hoechst 33258 staining and apoptotic rate was detected by flow-cytometry analysis. Besides, Western blot analysis was performed to detect the expression of the apoptosis related proteins in each group. **Results** GHSR was expressed in H9C2 cells and the expression of GHSR could be significantly knocked down by GHSR-siRNA. Compared with H/R group, in H/R + Ghrelin group the myocardium apoptotic rate was markedly decreased ($P < 0.05$), the Bcl-2/Bax ratio was increased ($P < 0.05$) and the expression of caspase-3 protein was decreased ($P < 0.05$). However, compared with H/R + Ghrelin group, the apoptotic rate was increased ($P < 0.05$), the Bcl-2/Bax ratio was decreased ($P < 0.05$) and the expression of caspase-3 protein was up-regulated ($P < 0.05$) in H/R + Ghrelin + GHSR-siRNA group. **Conclusion** Ghrelin provides concrete protection against H/R injury by inhibiting apoptosis in cardiomyocytes.

Key words H9C2 cells; hypoxia/reoxygenation injury; Ghrelin; apoptosis

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 80 只, 250 ~ 300 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供。大鼠的饲养和各种操作均在同一动物中心和实验室进行, SPF 级饲料产自安徽医科大学实验动物中心。

1.1.2 实验仪器 计算机图像分析系统(德国 VarioCam 公司冷冻图像摄入系统及其分析软件); Power-Pac HC 型电泳仪(美国伯乐公司); 全自动计算机分析系统(KONTRON IBAS 2.5, 德国 VarioCam 公司)

1.1.3 主要试剂 激肽原酶(广东天普生化医药股份有限公司); 兔抗大鼠 CGRP、RAMP1、VEGF、 β -action 单克隆一抗(英国 Abcam 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天公司); 蛋白抽提试剂盒及蛋白 Marker(美国 Fermentas 公司); 红四氮唑(美国 Sigma 公司); PVDF 膜(美国法玛西亚公司); ECL 试剂盒(美国 Thermo 公司); 免疫组化试剂盒、免疫组化用生物素标记山羊抗兔二抗、DAB 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠脑缺血模型的制备 用线栓栓塞法制备大鼠右侧大脑中动脉缺血模型, 手术成功后注意保暖, 单笼饲养观察。术后 24 h 按照 Longa 神经行为缺损评分标准评分, 选择符合实验条件的大鼠, 剔除不合格者, 试验中随机补充, 保证每组动物数不变。

1.2.2 动物分组 将 80 只大鼠随机分为假手术组(S 组)、脑缺血组(I 组)、激肽原酶低剂量组(3.75×10^{-3} PNA 单位/(kg · d), I + Kal₁ 组)、激肽原酶高剂量组(17.25×10^{-3} PNA 单位/(kg · d), I + Kal₂ 组)。

1.2.3 给药方式和药物剂量 药物采用尾静脉注射方式给予(灌胃给药无效)。激肽原酶预处理组连续给药 6 d, 每天 1 次, 手术前 30 min 再给 1 次药。同时, S 组、I 组予以同等剂量 0.9% 氯化钠溶液处理。激肽原酶剂量按如下处理: 激肽原酶低剂量组(3.75×10^{-3} PNA 单位/(kg · d), I + Kal₁ 组)、激肽原酶高剂量组(17.25×10^{-3} PNA 单位/(kg · d), I + Kal₂ 组)。

1.2.4 红四氮唑法测定脑梗死体积 在大鼠脑缺血后 24 h, 水合氯醛麻醉, 迅速断头取脑。将大脑

放置于大鼠脑切片模具中, 每隔 2 mm 作冠状切片, 将脑切片置于 2% 红四氮唑中, 37 °C 避光孵育 30 min, 然后用 4% 多聚甲醛溶液固定。正常脑组织染成玫瑰红色, 缺血脑组织呈白色。脑切片按顺序排列整齐后拍照。将梗死组织和正常组织分别称重。脑梗死体积百分比由脑梗死计算公式计算得出: 脑梗死体积(%) = 白色脑组织重量/(白色脑组织重量 + 玫瑰红色脑组织重量) × 100%。

1.2.5 免疫组化检测 CGRP、RAMP1 及 VEGF 蛋白的表达 大鼠脑缺血模型制备成功后, 经心脏灌注固定大鼠, 然后断头取脑, 置于 4% 多聚甲醛液固定约 24 h。然后进行乙醇梯度脱水、石蜡包埋、制成厚度为 5 μ m 切片。选取海马部位组织切片后进行免疫组织化学染色, 检测 CGRP 蛋白; 视选择交叉部位组织切片进行免疫组织化学染色, 检测 RAMP1 及 VEGF 蛋白。具体操作步骤严格按照试剂盒说明书要求进行。随机选择 5 个阳性细胞分布区非重叠的高倍镜视野, 用阳性率公式计算 CGRP、RAMP1 及 VEGF 阳性细胞数的百分比。

1.2.6 Western blot 检测 CGRP、RAMP1 及 VEGF 蛋白表达 各组分别在大鼠脑缺血模型制备成功 24 h 后, 取右损伤侧大脑海马或者皮质组织, 裂解、研磨、离心, 取上清液。然后配置胶液体, 进行电泳, 湿法转膜、洗膜, 再加入 CGRP、RAMP1 及 VEGF 一抗(1 : 1 000 稀释)或 β -actin (1 : 1 000 稀释), 孵育过夜。加二抗, 室温孵育 2 h 后洗膜, 再加入 ECL 检测试剂, X 线片曝光、显影、定影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(F 检验), 两两比较采用 SNK 方法。

2 结果

2.1 激肽原酶对脑缺血大鼠脑梗死体积的影响 红四氮唑染色后的脑切片, 非梗死区呈玫瑰红色, 梗死区呈白色。S 组无脑梗死; 与 S 组相比, I 组、I + Kal₁ 组、I + Kal₂ 组梗死体积为 (27.19 ± 0.80) %、(25.22 ± 1.61) %、(14.14 ± 0.80) %, 缺血侧脑组织有明显的梗死($P < 0.01$, $F = 190.56$); 与 I 组相比, I + Kal₁ 组脑梗死体积明显缩小($P < 0.05$), I + Kal₂ 组脑梗死体积缩小更明显($P < 0.01$)。

2.2 免疫组化检测激肽原酶对大鼠脑缺血后 CGRP、RAMP1 及 VEGF 蛋白含量表达的影响 CGRP 蛋白阳性表达位于海马区细胞质, RAMP1 及

VEGF 蛋白阳性表达位于大脑皮层细胞质,呈棕黄色颗粒。各组指标采用单因素方差分析进行主体间的效应检验($F_{\text{CGRP}} = 496.64$, $F_{\text{RAMP1}} = 839.73$, $F_{\text{VEGF}} = 807.09$, $P < 0.01$)。SNK 两两比较结果显示, S 组脑组织有少量阳性细胞 CGRP(11.05 ± 2.10) 个, RAMP1(7.03 ± 1.16) 个, VEGF(9.24 ± 2.03) 个。与 S 组比较, I 组大鼠海马区阳性细胞 CGRP(43.37 ± 3.07) 个, RAMP1(27.02 ± 2.31) 个, VEGF(32.27 ± 1.32) 个, 数量明显增加($P < 0.01$), 与 I 组比较, I + Kal₁ 组 CGRP(62.09 ± 3.57) 个, RAMP1(51.04 ± 2.34) 个, VEGF(54.21 ± 1.46) 个及 I + Kal₂ 组 CGRP(85.29 ± 3.57) 个, RAMP1(64.87 ± 2.03) 个, VEGF(71.36 ± 3.05) 个, 阳性细胞逐渐升高($P < 0.05$), 其中以 I + Kal₂ 组升高最为明显($P < 0.01$)。见图 1~3。

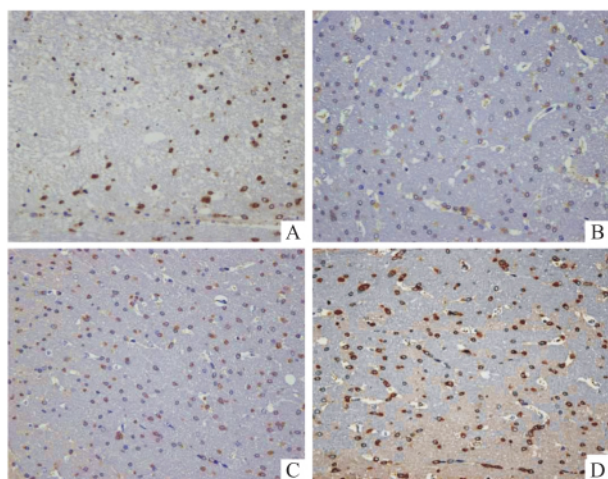


图 1 各组大鼠海马区 CGRP 阳性细胞 $\times 400$
A: S 组; B: I 组; C: I + Kal₁ 组; D: I + Kal₂ 组

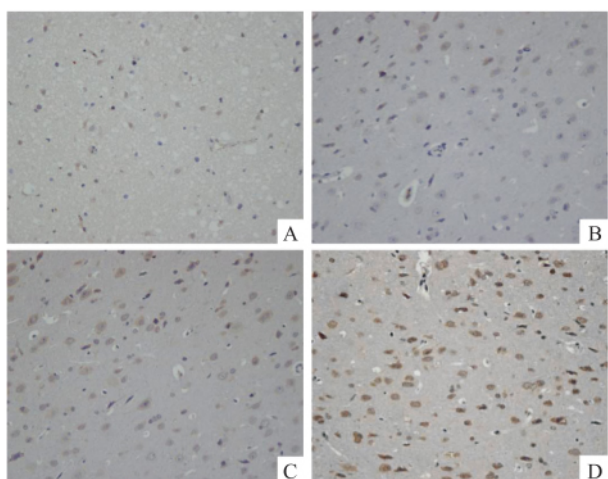


图 2 各组大鼠皮层区 RAMP1 阳性细胞 $\times 400$
A: S 组; B: I 组; C: I + Kal₁ 组; D: I + Kal₂ 组

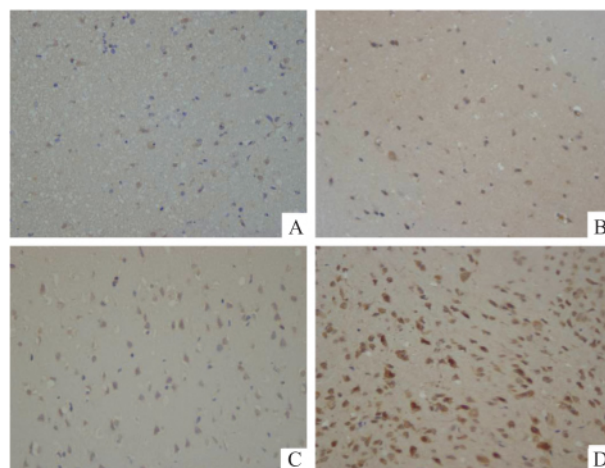


图 3 各组大鼠皮层区 VEGF 阳性细胞 $\times 400$
A: S 组; B: I 组; C: I + Kal₁ 组; D: I + Kal₂ 组

2.3 Western blot 检测激肽原酶对大鼠局灶性脑缺血后脑 CGRP 及 RAMP1 蛋白含量表达的影响

各组指标采用单因素方差分析进行主体间的效应检验, 结果显示 $F_{\text{CGRP}} = 215.40$, $F_{\text{RAMP1}} = 166.71$, $F_{\text{VEGF}} = 64.06$, $P < 0.01$ 。SNK 两两比较结果显示, S 组脑组织有少量 CGRP、RAMP1 及 VEGF 蛋白表达, 与 S 组相比, I 组 CGRP、RAMP1 及 VEGF 蛋白表达明显高于 S 组($P < 0.01$); 与 I 组相比, I + Kal₁ 组和 I + Kal₂ 组 CGRP、RAMP1 及 VEGF 逐渐升高($P < 0.05$), 其中以 I + Kal₂ 组升高最为明显($P < 0.01$)。见图 4、5。

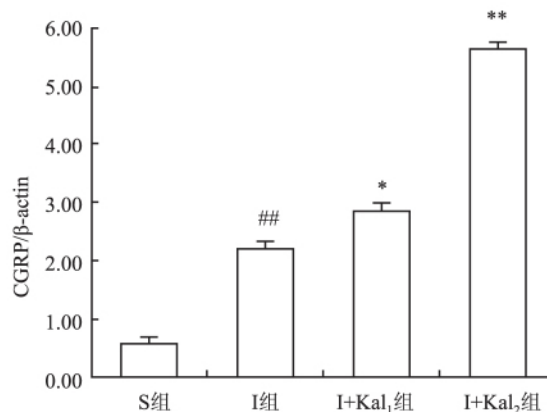
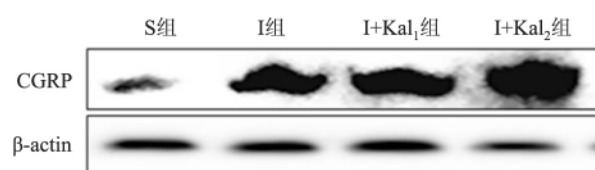


图 4 激肽原酶对脑缺血大鼠脑组织 CGRP 蛋白表达的影响
与 S 组比较: ## $P < 0.01$; 与 I 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

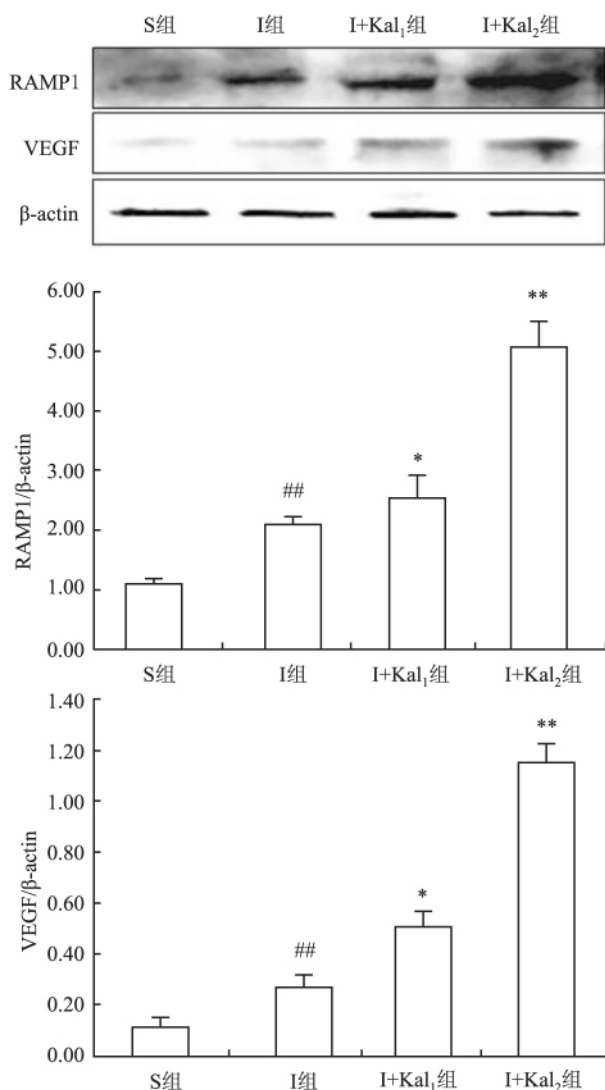


图5 激肽原酶对脑缺血大鼠脑组织 RAMP1 和 VEGF 蛋白表达的影响

与 S 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 I 组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

3 讨论

缺血性脑卒中发生时,大脑会通过其侧枝循环进行代偿。梗死灶周围新生血管(第三级侧枝循环)的密度与缺血性脑卒中患者的预后直接相关,新生的脑血管可能为神经元存活提供营养^[3]并促进脑损伤的恢复^[4]。激肽原酶属丝氨酸蛋白酶超家族中的一员,相对分子质量约 54 000,已被确定为新的血管生成因子。激肽原酶能切割低分子量激肽原,释放血管活性肽—激肽,激肽与高亲和力的 B1/B2 受体结合,促进新生血管的形成,改善脑组织的葡萄糖和氧的摄取,加快神经功能缺损的恢复和缩小脑梗死范围^[5]。

卒中发生后,缺血半暗带区会产生大量 VEGF 等

与血管新生有关的生长因子,促进血管新生^[6]。有研究^[7]表明,缺血、缺氧条件可激活血管内皮出芽式血管新生的发生,而且 VEGF 可促进卒中后出芽式血管新生。另外,在缺氧条件下,VEGF 还可作为一种内源性多效性生长因子,对脑梗死后的神经血管重塑及血管形成有促进作用^[8]。随着研究的深入,VEGF 表达的水平代表了新生血管潜能。本研究给予激肽原酶预处理后大鼠大脑皮层 VEGF 蛋白表达升高。与 S 组比较,I 组大鼠脑组织 VEGF 水平表达增加。与 I 组比较,I + Kal₁ 组及 I + Kal₂ 组大鼠脑组织 VEGF 水平明显增加,其中以 I + Kal₂ 组大鼠脑组织 VEGF 水平增高最为明显。从而间接证实激肽原酶能促进缺血性脑卒中后血管新生。

CGRP 存在功能的多样性,新近研究证实 CGRP 还具有介导血管新生的作用。沙土鼠脑缺血再灌注研究^[9]显示 CGRP 具有增加脑血流量和神经保护双重功能。研究^[10]表明,内源性 CGRP 对肢体缺血小鼠模型的再血管化有促进作用。本研究中给予激肽原酶后,出现 CGRP 蛋白表达升高。与 S 组相比,I 组大鼠脑组织 CGRP 表达水平增加,提示脑缺血本身就是促进 CGRP 表达的因素,脑梗死发生后通过机体自身调节而促进 CGRP 的表达。与 I 组比较,I + Kal₁ 组及 I + Kal₂ 组大鼠脑组织 CGRP 水平逐渐增加,其中以 I + Kal₂ 组大鼠脑组织 CGRP 水平增高最为明显。此结果表明激肽原酶能促进 CGRP 在脑缺血模型大鼠脑组织中的表达,且其表达升高水平与 VEGF 在脑组织表达水平基本一致,而 VEGF 的水平代表了新生血管水平。从而间接证明 CGRP 与缺血性脑卒中后血管的新生有一定相关性。

CGRP 的生物学作用并非仅取决于其本身,还与 CGRP 受体以及某些与受体相互作用的调节蛋白有关。大量研究^[11]表明,CGRP 是通过其关键受体亚单位—RAMP1 发挥作用的,RAMP1 不仅决定了 CGRP 的受体活性及生物学作用,可能还是 CGRP 受体发挥作用的限速蛋白。另有研究^[12-13]显示,RAMP1 可调节 CRLR 与配体的结合,从而决定了配体的受体表型及作用强弱。但是,RAMP1 是否参与缺血性脑卒中后血管新生的过程,尚不清楚。推测 CGRP 是通过 RAMP1 参与缺血性脑卒中后血管新生的过程,即 RAMP1 也与缺血性脑卒中后血管新生有相关性。本研究表明,与 S 组相比,I 组 RAMP1 升高,与 I 组比较,I + Kal₁ 组及 I + Kal₂ 组大鼠脑组织 RAMP1 表达水平逐渐增加,其中以 I + Kal₂ 组大

鼠脑组织 RAMP1 水平增高最为明显。说明激肽原酶促进 RAMP1 在脑缺血大鼠脑组织的表达,同时 VEGF 表达水平明显升高、脑梗死体积也缩小,表明 RAMP1 与缺血性脑卒中后血管新生有相关性。

参考文献

- [1] Mishima T, Ito Y, Hosono K, et al. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(2): H431-9.
- [2] Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, et al. Function of the cytoplasmic tail of human calcitonin receptor-like receptor in complex with receptor activity-modifying protein 2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 392(3): 380-5.
- [3] Font M A, Arboix A, Krupinski J. Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2010, 6(3): 238-44.
- [4] Zan L, Wu H, Jiang J, et al. Temporal profile of Src, SSeCKS, and angiogenic factors after focal cerebral ischemia: correlations with angiogenesis and cerebral edema [J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(8): 872-9.
- [5] 刘平平, 苏赐力, 王燕宏. 尤瑞克林治疗急性期脑梗死的疗效及血清 CRP 的变化 [J]. *中国实用医刊*, 2013, 40(5): 11-2.
- [6] Liman T G, Endres M. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2012, 33(5): 492-9.
- [7] Oladipupo S, Hu S, Kovalski J, et al. VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(32): 13264-9.
- [8] Ma Y, Liu W, Wang Y, et al. VEGF protects rat cortical neurons from mechanical trauma injury induced apoptosis via the MEK/ERK pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2011, 86(5-6): 441-6.
- [9] Feng G, Xu X, Wang Q, et al. The protective effects of calcitonin gene-related peptide on gastric mucosa injury after cerebral ischemia reperfusion in rats [J]. *Regul Pept*, 2010, 160(1-3): 121-8.
- [10] Zheng S, Li W, Xu M, et al. Calcitonin gene-related peptide promotes angiogenesis via AMP-activated protein kinase, American journal of physiology [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(6): C1485-92.
- [11] Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2380-8.
- [12] Koth C M, Abdul-Manan N, Lepre C A, et al. Refolding and characterization of a soluble ectodomain complex of the calcitonin gene-related peptide receptor [J]. *Biochemistry*, 2010, 49(9): 1862-72.
- [13] Barwell J, Miller P S, Donnelly D, et al. Mapping interaction sites within the N-terminus of the calcitonin gene-related peptide receptor; the role of residues 23-60 of the calcitonin receptor-like receptor [J]. *Peptides*, 2010, 31(1): 170-6.

Effect of human urinary kallidinogenase on expression of CGRP, RAMP1 and VEGF in rats suffered focal cerebral ischemia

Chang Kunpeng¹, Ding Xiaoling¹, Wang Qunan², et al

(¹Dept of Neurology Disease, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University,

Hefei 230001; ²Dept of Toxicology, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effect of human urinary kallidinogenase on expression of CGRP, RAMP1 and VEGF in rats suffered focal cerebral ischemia. **Methods** 80 male SD rats were randomly divided into four groups: sham operation group (S group), ischemia group (I group), low dose of kallidinogenase (3.75×10^{-3} PNA/(kg · d), I + Kal₁ group) and high dose of kallidinogenase (17.25×10^{-3} PNA/(kg · d), I + Kal₂ group). Each group had 20 rats. The method of line bolt blocks the right middle cerebral artery in rats was used to establish the right MCAO ischemia model after tail intravenous dosing 1 week. TTC method was used to measure the cerebral infarction volume. Immunohistochemistry and Western blot were used to evaluate the expression of CGRP protein in the hippocampus and the expression of RAMP1 and VEGF protein in the cerebral cortex. **Results** Compared with the S group, the expression of CGRP, RAMP1 and VEGF increased significantly in the I group rats ($P < 0.01$). While, compared with the I group, kallidinogenase high and low dose group can significantly reduce cerebral infarction and markedly increase the expression of CGRP, RAMP1 and VEGF induced in cerebral ischemia 24 h after MCAO ($P < 0.05$). **Conclusion** Human urinary kallidinogenase can promote the expression of CGRP and RAMP1 in ischemic brain tissues and this may be one of the mechanisms of promoting angiogenesis after cerebral infarction. **Key words** CGRP; RAMP1; VEGF; human urinary kallidinogenase; cerebral ischemia; rat