

### 【基础研究】

通信作者:李 彤(1963-),女,河南新乡人,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事脑血管病基础研究与综合治疗;E-mail: litong0833@163.com.

HGF group was increased, but the number of bax protein positive cells was decreased, and the ratio of bcl-2/bax was increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Exogenous Ad-HGF can significantly improve the learning and memory ability of rats with hypertensive and hyperlipidemia, and it play a neuroprotective role in the brain, which may be related to the inhibition of apoptosis of hippocampal neurons.

**Key words:** adenovirus vector encoding hepatocyte growth factor gene; cognitive function; bcl-2; bax; rat

高血压和高血脂是脑血管疾病的危险因素,若不及时治疗则可引起脑组织损害。血管性认知功能障碍是由脑血管疾病引起的在脑组织损害的基础上产生的以记忆、认知功能缺损为主要表现的临床综合征<sup>[1]</sup>。海马区与学习认知功能关系最为密切,国内外研究显示,海马功能区神经元受到损伤时,其行为学表现出严重障碍<sup>[2]</sup>。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)是一种多功能的神经营养因子,对缺血性脑组织有神经保护和修复作用,其机制是通过抑制细胞的凋亡和促进脑的侧支循环实现的<sup>[3]</sup>。肝细胞生长因子重组腺病毒(adenovirus vector encoding HGF gene, Ad-HGF)在治疗缺血性疾病方面已取得良好疗效,目前已进入临床Ⅱ期阶段。本研究通过复制高血压高脂大鼠模型,观察其认知功能的改变;并将 Ad-HGF 经小脑延髓池注入蛛网膜下腔,观察其对大鼠认知功能及海马区凋亡相关蛋白表达的影响,为 Ad-HGF 治疗脑血管疾病的安全性提供基础数据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠 30 只, 18 月龄, 体质量 300 ~ 350 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司[动物生产许可证: SCXK (京)2012-0001]。实验期间所有动物自由饮食、饮水, 饲养温度 23 ~ 25 ℃, 相对湿度 40% ~ 60%。

**1.2 主要试剂及仪器** Ad-HGF (滴度  $0.5 \times 10^{14}$  pfu · L<sup>-1</sup>, 北京奥洛英生物科技有限公司), 通用型免疫组织化学检测试剂盒(基因科技上海股份有限公司), 兔抗鼠多克隆 bcl-2 抗体和兔抗鼠多克隆 bax 抗体(沈阳万类生物科技有限公司), 胆固醇、胆酸钠、丙硫氧嘧啶、猪油、蛋黄粉、蔗糖(北京索莱宝科技有限公司)。Morris 水迷宫实验装置及图像采集处理系统由新乡医学院提供, 55i、DS-Fi1c 荧光显微镜及成像系统(日本 Nikon 公司)。

**1.3 动物分组和造模** 30 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为对照组、模型组和 Ad-HGF 组, 每组 10 只, 参考文献[4]制备高血压高脂大鼠模型。

具体操作: 模型组和 Ad-HGF 组大鼠术前 1 d 禁食, 手术当天禁水, 以 100 g · L<sup>-1</sup> 水合氯醛腹腔麻醉 (3.4 mL · kg<sup>-1</sup>), 无菌条件下行双侧肾动脉狭窄术, 造成实验性肾性高血压。术后 1 周给予高脂饲料[高脂配方(质量分数)<sup>[5]</sup>: 普通饲料(76.3%)、胆固醇(3.0%)、胆酸钠(0.5%)、丙硫氧嘧啶(0.2%)、猪油(10.0%)、蛋黄粉(5.0%)、蔗糖(5.0%)]喂养制备高脂模型, 对照组大鼠仅分离双侧肾动脉, 不予狭窄, 术后给予普通饲料喂养。2 组大鼠均喂养 16 周。造模后, Ad-HGF 组大鼠经小脑延髓池一次性注入 Ad-HGF 10 μL ( $0.25 \times 10^{14}$  pfu · L<sup>-1</sup>); 对照组和模型组大鼠分别经小脑延髓池一次性注入生理盐水 10 μL。

**1.4 Morris 水迷宫实验评估大鼠学习记忆能力** 各组大鼠分别于给药后 10 d 进行 Morris 水迷宫实验, Morris 水迷宫实验参照文献[6]。实验开始前, 大鼠均进行 1 次适应性游泳, 目的是剔除不合格的动物(主要是视力问题)。

定位航行实验检测大鼠的学习能力, 每日 1 次, 共 4 d。大鼠分别从 4 个不同象限面向池壁放入水中, 观察大鼠 2 min 内找到隐匿平台所需时间(逃避潜伏期), 若大鼠在 2 min 内未找到平台, 将其引致平台, 且记录潜伏期为 120 s。

空间探索实验检测大鼠的空间位置记忆能力, 定位航行实验后, 撤去隐匿平台, 任选 1 个人入水点将大鼠面向池壁放入水中, 观察并记录大鼠 2 min 内穿越原平台位置的次数和在目标象限停留时间。

**1.5 大鼠海马区凋亡相关蛋白 bcl-2 和 bax 表达测定** 行为学实验结束后, 大鼠进行腹腔麻醉并置于灌注台上, 开胸充分暴露心脏, 在心脏搏动状态下, 左手持镊子固定心脏, 右手持灌注针经心尖部将其插至主动脉根部, 剪开右心耳, 由助手协助迅速打开恒流泵开关, 以 200 r · min<sup>-1</sup> 的速度灌注生理盐水直至血液冲洗干净后, 改用体积分数 10% 中性甲醛固定液灌注, 并下调恒流泵转速至 60 r · min<sup>-1</sup>, 当大鼠出现四肢抽动后, 转速调为 10 r · min<sup>-1</sup>, 缓慢灌注持续 20 min 后停止, 断头小心取脑组织浸入

体积分数 10% 中性甲醛缓冲固定液中固定 24 h 以上。取出脑组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,完成蜡块制备。脑组织蜡块经修片、切片、展片、烤片,完成石蜡切片制作。石蜡切片进行免疫组织化学染色,分别在光学显微镜下观察海马 CA1 区 bcl-2 和 bax 蛋白的阳性表达结果,并计算 bcl 阳性细胞数与 bax 阳性细胞数的比值(bcl/bax)。阳性细胞为细胞质被染成棕褐色。每张切片随机选取 5 个视野,400 倍光镜下进行阳性细胞计数,取平均数。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组样本均数间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 各组大鼠剔除情况** 手术中死亡 3 只(对照组 2 只,Ad-HGF 组 1 只);Morris 水迷宫实验剔除 4 只(对照组 2 只,模型组 1 只,Ad-HGF 组 1 只);蛛网膜下腔注射死亡 5 只(模型组 3 只,Ad-HGF 组 2 只)。

**2.2 各组大鼠学习记忆能力比较** 结果见表 1。模型组大鼠逃避潜伏期长于对照组,穿越平台次数和在目标象限停留时间少于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );Ad-HGF 组大鼠逃避潜伏期短于模型组,穿越平台次数和在目标象限停留时间多于

模型组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠学习记忆能力比较

Tab.1 Comparison of learning and memory ability of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | n | 逃避潜伏期/s                   | 穿越平台次数                   | 目标象限停留时间/s                |
|----------|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 对照组      | 6 | 30.10 ± 3.73              | 5.99 ± 0.87              | 44.99 ± 5.90              |
| 模型组      | 6 | 51.62 ± 4.47 <sup>a</sup> | 3.22 ± 1.17 <sup>a</sup> | 20.26 ± 4.95 <sup>a</sup> |
| Ad-HGF 组 | 6 | 40.17 ± 3.24 <sup>b</sup> | 5.21 ± 0.83 <sup>b</sup> | 37.89 ± 7.74 <sup>b</sup> |

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

**2.3 各组大鼠海马 CA1 区 bcl-2 和 bax 蛋白表达比较** 见表 2 和图 1。2 种蛋白在细胞质内均有表达,其中 bcl-2 蛋白在细胞核和细胞膜上亦有少量表达。与对照组比较,模型组大鼠海马 CA1 区 bcl-2 和 bax 蛋白表达阳性细胞数均增多,bcl-2/bax 比值降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较,Ad-HGF 组大鼠海马 CA1 区 bcl-2 蛋白表达阳性细胞数升高,bax 蛋白阳性细胞数降低,bcl-2/bax 比值升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 各组大鼠海马 CA1 区 bcl-2 和 bax 蛋白表达阳性细胞数比较

Tab.2 Comparison of the number of bcl-2 and bax protein positive cells in hippocampal CA1 region of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别       | n | bcl-2                     | bax                       | bcl-2/bax                |
|----------|---|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 对照组      | 6 | 33.44 ± 4.52              | 27.15 ± 3.38              | 1.25 ± 0.23              |
| 模型组      | 6 | 41.92 ± 4.45 <sup>a</sup> | 61.85 ± 9.17 <sup>a</sup> | 0.69 ± 0.12 <sup>a</sup> |
| Ad-HGF 组 | 6 | 78.59 ± 4.78 <sup>b</sup> | 51.20 ± 4.11 <sup>b</sup> | 1.54 ± 0.15 <sup>b</sup> |

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

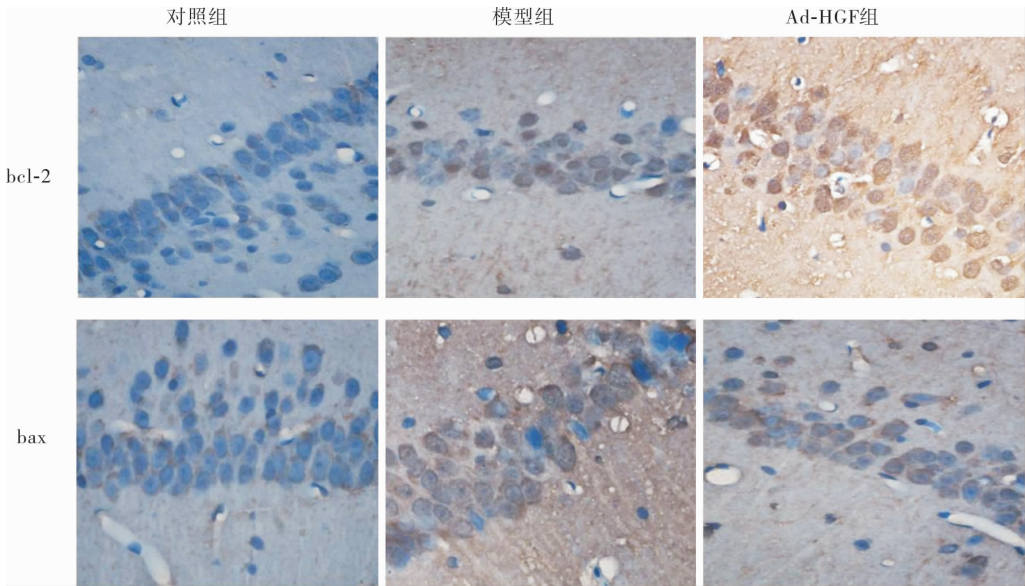


图 1 各组大鼠海马组织中 bcl-2 和 bax 蛋白表达(免疫组织化学法, × 400)  
Fig.1 Expression of bcl-2 and bax protein in hippocampus of rats in each group( immunohistochemistry, × 400)

### 3 讨论

高血压和高血脂是导致血管性认知功能障碍最重要的危险因素,其机制可能是:(1)长期高血压使脑微血管痉挛、缺血,小动脉受损,发生变性坏死,管腔狭窄,阻力增加,脑循环血流量减少。同时,受损的血管内皮细胞使血流处于高凝状态,加快动脉硬化程度,造成脑内多发性小动脉坏死和脑组织损伤。(2)高血脂的脂质成分在血管壁沉积,形成粥样斑块使管腔狭窄闭塞,增加了缺血性脑血管疾病的发病概率。高脂血症使血黏度增加,血流速减慢,同时因纤维蛋白原的浓度升高,容易发生血栓,当脱落的栓子随血液循环到达远端微小血管后,引起微小血管的梗死,加重脑缺血。谢道俊等<sup>[7]</sup>观察60例血管性认知障碍患者,结果显示,高血压是所有危险因素中最重要的因素,其次为高血脂、高血压合并高血脂。KOVÁCS等<sup>[8]</sup>对72例严重高血压患者的颈动脉内膜厚度、动脉硬化程度和血管性认知功能进行评估,结果显示,合并有高胆固醇血症的患者其颈动脉内膜增厚,血管性认知功能进一步恶化。本实验中模型组大鼠亦出现了不同程度的认知功能障碍(学习记忆能力下降),与上述结果一致,提示血管性认知功能障碍与高血压、高血脂存在相关性。

海马CA1区与学习认知功能关系最为密切,对脑缺血具有高度敏感性,当海马区发生细胞凋亡时则出现认知障碍,且认知障碍的程度与凋亡程度相关<sup>[9]</sup>。在缺血性脑损伤中,bcl-2和bax是重要的凋亡调控基因<sup>[10]</sup>,bax为促凋亡蛋白,bcl则为抗凋亡蛋白,二者相互拮抗,当bax蛋白表达过多,加速细胞凋亡,而bcl-2蛋白表达占优势时,则抑制细胞凋亡。本研究中,模型组大鼠海马组织bcl-2蛋白和bax蛋白阳性细胞数较对照组明显增多,表明bcl-2和bax都被激活,参与海马神经细胞的损伤过程。单纯观察bax或bcl-2蛋白的表达不能较好地体现其与凋亡的相关性,故常用bcl-2/bax比值判断促进或抑制细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

研究证实,永久性大脑中动脉阻塞后引起脑缺血和脑梗死的大鼠模型中,HGF可通过抑制细胞凋亡、促进神经发生、轴突发生、血管新生发挥神经保护作用<sup>[12-13]</sup>。随着基因治疗技术的开展,目前Ad-HGF已广泛应用于临床科研中,且取得良好的疗效<sup>[14]</sup>。本实验给予Ad-HGF药物干预后,观察到大鼠海马区bax蛋白表达减弱,bcl-2蛋白表达增强,bcl-2/bax增高。表明Ad-HGF可能通过抑制海马区细胞的凋亡改善大鼠的认知能力。本研究为后期评估Ad-HGF的安全性提供实验数据及参考依据。

认知功能障碍和细胞凋亡是长期慢性过程,本实验未对Ad-HGF剂量梯度和时间梯度进行监测,且样本量偏小,有待以后进一步完善。

### 参考文献:

- [1] YING H, JIANPING C, JIANQING Y, *et al.* Cognitive variations among vascular dementia subtypes caused by small-, large-, or mixed-vessel disease[J]. *Arch Med Sci*, 2016, 12(4):747-753.
- [2] MORIGUCHI S, YABUKI Y, FUKUNAGA K. Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice[J]. *J Neurochem*, 2012, 120(4):541-551.
- [3] ZHANG L, HIMI T, MORITA I, *et al.* Hepatocyte growth factor protects cultured rat cerebellar granule neurons from apoptosis via the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 59(4):489-496.
- [4] 朱岩岩. 高血压合并高血脂建立脑动脉粥样硬化大鼠模型的实验研究[J]. 中华脑科疾病与康复杂志:电子版, 2014, 4(2):31-34. DOI:10.3877/cma.j.issn.2095-123X.2014.02.008.
- [5] HU Y, SUN B, LIU K, *et al.* Icarin attenuates high-cholesterol diet induced atherosclerosis in rats by inhibition of inflammatory response and p38 MAPK signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2016, 39(1):228-236.
- [6] 张羽乔, 周俊山, 张颖冬, 等. 不同程度颈动脉狭窄对大鼠认知功能及海马CA1区神经元凋亡的影响[J]. 中国脑血管病杂志, 2016, 13(10):529-534, 557.
- [7] 谢道俊, 靳伟, 韦彪. 血管性认知功能障碍的血管性危险因素及影像学研究[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(3):198-200.
- [8] KOVÁCS K R, BAJKÓ Z, SZEKERES C C, *et al.* Elevated LDL-C combined with hypertension worsens subclinical vascular impairment and cognitive function[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2014, 8(8):550-560.
- [9] DUAN W, CHUN-QING Z, ZHENG J, *et al.* Relief of carotid stenosis improves impaired cognition in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2011, 71(2):233-243.
- [10] ZHAO H, YENARI M A, CHENG D, *et al.* Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity[J]. *J Neurochem*, 2003, 85(4):1026-1036.
- [11] 朱洁, 马茜, 王辛, 等. 肌肽对局灶性脑缺血大鼠bcl-2、bax表达的影响[J]. 天津医药, 2015, 43(3):259-262.
- [12] TSUZUKI N, MIYAZAWA T, MATSUMOTO K, *et al.* Hepatocyte growth factor reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neurol Res*, 2001, 23(4):417-424.
- [13] SHANG J, DEGUCHI K, OHTA Y, *et al.* Strong neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis, and antifibrosis of hepatocyte growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion[J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(1):86-95.
- [14] YANG Z J, ZHANG Y R, CHEN B, *et al.* Phase I clinical trial on intracoronary administration of Ad-hHGF treating severe coronary artery disease[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(6):1323-1329.

(本文编辑:孟月 英文编辑:孟月)