

- [28] Lizuka T, Sakai F, Mochizuki H. Update on anti-NMDA receptor encephalitis. *Brain Nerve*, 2010, 62(4): 331-338.
- [29] Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, et al. Clinical

experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol*, 2011, 10(1): 63-74.

脑缺血损伤后血管再生的研究进展

惠娟^{1,2} 综述 韩军良¹ 审校

1. 第四军医大学西京医院神经内科, 陕西省西安市 710032

2. 解放军 71625 部队医院, 河南省信阳市 464000

摘要: 脑缺血后血管再生可以改善损伤区域尤其是缺血半暗带的血液供应, 增加氧和营养物的输送, 缩小梗死体积, 同时, 再生血管周围的微环境易化神经发生和突触形成, 加速损伤神经功能的恢复。血管再生已成为目前治疗和协助评价脑梗死临床预后较新颖且有效的靶点, 本文就脑缺血后血管再生的调节因素及当前时新的治疗方法作一综述。

关键词: 血管再生; 缺血性脑损伤; 血管内皮生长因子; 干细胞

血管再生 (angiogenesis) 指从已存在的血管长出新血管的过程, 由内皮细胞激活、趋化移动、增殖, 细胞外基质降解, 新管腔形成, 血管周细胞移入、毛细血管形成等多个步骤组成。人们对脑缺血血管再生的关注最早源于对尸检切片脑缺血边缘区血管再生的观察^[1]。动物模型中, 采用共聚焦显微镜动态观察大鼠脑梗死侧微血管变化, 第 1、第 2 天同侧皮质微血管开始变长, 第 7 天达顶峰, 与梗死对侧相比有显著差异; 至第 14 天, 梗死侧微血管片段的长度和直径虽然不及缺血对侧, 但数量却显著增多, 表明随着脑缺血时间的延长, 局部新生血管形成增加^[2]。血管再生除了形态学上的改变, 相关基因也发生变化, 采用 cDNA 芯片技术分析小鼠脑梗死模型, 结果表明, 在 1 h、1 d 和 21 d 分别有 42 种、29 种和 13 种血管再生基因表达上调, 缺血区血管源性蛋白在数天至数周内持续增加^[3]。目前, 人们已逐渐认识到血管再生有利于改善脑卒中患者病人预后, 如何加强内源性血管再生, 促进脑缺血后神经功能修复, 已成为近年来研究热点。

1 脑缺血后血管再生的调节因素

生理情况下, 脑内血管保持高度稳态, 脑缺血

发生后, 多种促血管生长因子表达上调, 包括血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、粒细胞集落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)、血管生成素 (angiopoietin, Ang) 等, 这些因子通过促进血管再生、神经发生、改善缺血区微环境等, 参与脑缺血的恢复。

1.1 血管内皮生长因子及受体

血管内皮生长因子 (VEGF) 是脑缺血后血管再生中的关键因子, 于 1989 年被成功克隆和确认。在脊椎动物中, VEGF 分为 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 等亚型。血管内皮生长因子受体 (VEGFR) 分为酪氨酸激酶型受体和非酪氨酸激酶受体。酪氨酸激酶型受体有: ① VEGFR-1, 又称诱饵受体, 通过防止 VEGF 与 VEGFR-2 结合抑制血管再生; ② VEGFR-2, 结合 VEGF 后能促血管生成, 提高血管渗透性; ③ VEGFR-3, 主要引起淋巴管内皮增生, 也可促进成年后血管再生。非酪氨酸激酶受体包括 neuropilin-1 (NP-1) 和 neuropilin-2 (NP-2), 协同 VEGFR 功能。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81073094)

收稿日期: 2014-12-17; 修回日期: 2015-02-05

作者简介: 惠娟 (1986-), 女, 在读研究生, 主要从事脑血管发生的研究。

通讯作者: 韩军良 (1968-), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事脑血管发生、神经发生、眩晕等研究。E-mail: hanjlfmmu@163.com。

脑缺血后 VEGF 受低氧诱导基因调控表达上调,在第 4 天达到高峰,7~10 d 后逐渐下降至正常水平^[4]。因此,VEGF 给药时间、方式不同影响其脑梗死后血管再生效果。大鼠脑缺血后 1 h 静脉给予 VEGF 增加血管通透性,加重脑水肿,但 48 h 后给药明显促进血管发生,改善行为学^[5]。Zechari-ah 等^[6]发现,局部脑室注射人重组 VEGF165 (0.02 $\mu\text{g}/\text{d}$) 至第 10 天小鼠脑内微血管密度增加,脑梗死面积减少,第 21 天时发现 VEGF 通过加强微血管周细胞覆盖提高血脑屏障完整性,挽救缺血半暗带,最终促进梗死灶血流恢复。此外,VEGF 通过抑制 Bax 的表达和增强 Bcl-2 的表达减少神经细胞凋亡,保护脑梗死后皮质、海马、小脑的各种神经细胞,发挥直接的神经营养性效应和神经再生作用^[7]。VEGF 还可通过 MEK/ERK 和 PI3K/AKT 依赖的信号通路调节成年海马神经干细胞增殖,促进海马齿状回颗粒下层的神经发生^[8]。以上研究表明,脑缺血后 VEGF 可促进血管发生和神经发生,保护脑内缺血神经元,提高神经轴突可塑性,挽救缺血半暗带,从多方面参与脑缺血后的血管修复和功能恢复。

1.2 血管生成素及受体(Tie)

血管生成素(Ang)家族主要有 4 个成员,即 Ang1、Ang2、Ang3 和 Ang4。Ang1、Ang2 分别由周细胞、内皮细胞分泌,Ang1 通过酪氨酸激酶受体 Tie2 可以促进细胞黏附蛋白分泌,增加细胞内皮间相互作用,降低血管通透性,抑制凝血酶诱导的钙内流及炎症反应^[9]。VEGF 和 Ang2 在缺血早期表达增高,促进内皮细胞的增殖、迁移,而 Ang-1 在后期表达增加,促进血管的成熟及稳定,三者时间窗表达差异,与其在血管再生中不同阶段发挥协调互补作用相关^[10]。

1.3 脑源性神经营养因子

脑源性神经营养因子(BDNF)是广泛表达的神经营养因子成员之一,除了营养神经外,在实验性脑缺血后,提高脑内 BDNF 水平可提高神经功能恢复能力,而 BDNF 基因敲除小鼠脑缺血后神经功能恢复能力差^[11]。BDNF 促进神经功能恢复作用与其参与了血管神经单元成分之间的交互作用相关。此外,BDNF 还参与 VEGF 表达的调节,可诱发内皮细胞的血管再生作用^[12],人体血清高水平的 BDNF 也与较少的白质高密度和更好的视觉记忆相关^[13]。

1.4 成纤维细胞生长因子

成纤维生长因子(FGF)是一类通过与细胞膜特异性受体结合发挥作用的多肽分子,现已知 FGF 家族至少包括 23 个成员,即 FGF1~FGF23,FGFs 可直接激活内皮细胞 FGF 受体或间接通过诱导其他细胞释放血管再生因子发挥促血管再生作用。其中 FGF1(aFGF)和 FGF2(bFGF)是最先被发现、研究最充分的两个成员,因其各自的等电点分别呈酸性和碱性而被称为酸性和碱性成纤维生长因子,FGF1 有促血管生成和促动脉生成作用,FGF2 可在脑缺血损伤时特异性扩张梗塞周围血管,促进神经元轴突生长,形成枝状突起,促进损伤修复,FGF9 刺激骨髓修复中的血管再生^[14];成纤维细胞生长因子信号通路可维持血管的完整性,而抑制内皮细胞 FGF 受体信号导致血管崩解^[15]。

2 基于血管再生的治疗策略

如何促进供应缺血组织的血管再生是脑缺血治疗的另一思路,动物实验和临床实践初步证实的几种方法如下。

2.1 使用促血管生长的相关因子

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)在正常脑组织中呈低水平表达,缺氧状态下 EPO 能通过血脑屏障,且神经损伤时通透性增加,在动物脑缺血模型中 EPO 应用很好的促进血管发生和脑血流恢复^[16,17],目前大剂量静脉注射重组人 EPO(rhEPO)治疗脑梗死 I 期和 II 期实验已完成,剂量和给药方式的缺陷虽限制其进一步应用,仍可作为有前景的临床开发药物^[18]。动物模型中粒细胞集落刺激因子(G-CSF)给药可增加血管再生和 eNOS、Ang-2 表达,促进骨髓源性内皮细胞的血管形成结合神经干细胞因子可明显缩小梗死体积^[19]。近来 Ju 等^[20]利用组织工程技术将 VEGF、Ang-1 联合生物材料植入小鼠脑梗死区,发现促进局部血管发生,并很好改善其神经功能。相信随着研究的不断深入,多血管生成因子联合生物材料能为脑梗死治疗带来新策略。

2.2 应用干细胞治疗

血管再生涉及多种细胞参与,尤其是内皮细胞及基质细胞,不但是新生血管的结构基础,而且可通过分泌某些效用因子直接影响血管再生效果。移植自体干细胞因为入脑转分化力低,其治疗效应不是替代损伤细胞,而是通过 SDF-1/CXCR4 轴、缝隙连接等信号靶向刺激脑内神经元、胶质细胞等分

泌多种调节因子,促进神经发生、血管再生、轴突出芽、炎症调节,从而改善神经行为功能^[21]。

2.2.1 骨髓间充质干细胞 骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)和缺血区的相互作用增加了 BDNF、VEGF、bFGF 等表达,促进梗死区结构和功能的恢复,减少了梗死体积和炎症细胞增殖。将脂肪源性 MSCs 应用于缺血大鼠后增加了内皮祖细胞的数量,说明脂肪源性 MSC 发挥作用可能和促进内皮祖细胞的迁移和内皮细胞分化有关^[22]。既往两例临床试验中,研究者分别对静脉输入自体骨髓 MSCs 移植的病人进行 1 年和 5 年随访调查,改良 Rankin 评分均改善,且无副作用,安全性良好,并发现 MSCs 组的临床改善与血清 SDF-1 水平和侧脑室下区的损伤程度相关^[23,24],为静脉输注自体骨髓间充质干细胞应用于临床提供了临床依据。

2.2.2 内皮祖细胞 内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)主要来源于骨髓和外周血,在特定条件下可分化成熟并整合入血管内皮,参与血管新生和内皮细胞恢复。Rosell 等^[25]将 EPC 或去除 EPC 的培养液分别静脉输入脑缺血小鼠体内,发现 EPC 不但可分泌 VEGF、FGF- β 和 PDGF- $\beta\beta$ 等因子,还可增加梗死灶周围毛细血管密度,促进轴突生长和神经干细胞迁移,改善脑梗死预后。目前 EPC 的研究主要通过移植 EPC 细胞至全身循环或缺血部位实现修复,用药物加强 EPC 的动员,或 SDF-1-CXCR4 轴加强 EPC 归巢,从而实现 EPC 治疗缺血性脑血管疾病^[26]。

2.3 化学药物治疗

尽管有些化学制剂在动物模型中有较明显的促进血管再生的作用,但到目前为止,在临床上一一直没有取得令人满意的效果。

2.3.1 他汀类药物 作为胆固醇抑制剂,他汀类药物在鼠脑缺血损伤模型中,诱导缺血边缘带血管发生、神经发生、突触发生,提高脑缺血功能恢复,VEGF、VEGFR2 和 BDNF 可能参与到这一修复过程。体内体外实验数据显示,他汀类药物在血管再生中有双向剂量依赖性,较低剂量有促血管生成作用,较高剂量对抗内皮细胞的血管生成^[27],在肿瘤和炎症中有抗血管生成的作用^[28]。可见他汀类药物的调节作用取决于剂量与周围微环境,但临床价值则有待进一步研究。

2.3.2 磷酸二酯酶 5 型抑制剂 磷酸二酯酶 5 型

(PDE5)抑制剂提高细胞内 3',5'磷酸鸟腺苷(cGMP)水平,增加脑内血流,提高脑缺血功能恢复。在 PDE5 抑制剂昔多芬干预的脑栓塞大鼠模型中,血管再生增强,缺血边缘血流量也有选择性增加,神经功能得到改善。脑缺血动物的 MRI 和组织学方法都证实了昔多芬治疗还可提高血管再生和轴突再生能力^[29]。其安全性也在最近对轻度和相对严重的脑缺血病人的临床治疗中得到证实^[30]。

3 讨论和展望

已发现的生长因子要么难以透过血脑屏障要么副作用难以耐受,导致临床应用的受限,如何发现新的生长因子或能有效促进内源性生长因子发挥作用的化合物,任重而道远;正如神经发生一样,如何保证血管芽发育为缺血区成熟的功能性血管,此中的诸多机制仍需进一步深入研究;如何协同或调和血管发生和神经发生,血管发生与脑组织的微环境网络等等,需探索不息。若能很好地促进脑缺血后血管再生,同时加强对受损神经元的保护和再生,将为缺血性脑卒中的治疗探索出一条前景光明的道路。

参 考 文 献

- [1] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Prognostic value of blood vessel density in ischaemic stroke. *Lancet*, 1993, 342(8873): 742.
- [2] Morris DC, Yeich T, Khalil MM, et al. Microvascular structure after embolic focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res*, 2003, 972(1-2): 31-37.
- [3] Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, et al. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(2): 166-180.
- [4] Lai T, Li M, Zheng L, et al. Over expression of VEGF in marrow stromal cells promotes angiogenesis in rats with cerebral infarction via the synergistic effects of VEGF and Ang2. *J Huazhong Univ Sci*, 2012, 32(5): 724-731.
- [5] Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest*, 2000, 106(7): 829-838.
- [6] Zechariah A, ElAli A, Doeppner TR, et al. Vascular endothelial growth factor promotes pericyte coverage of brain capillaries, improves cerebral blood flow during subsequent focal cerebral ischemia, and preserves the metabolic penumbra. *Stroke*, 2013, 44(6): 1690-1697.
- [7] Emerich DF, Silva E, Ali O, et al. Injectable VEGF hydrogels produce near complete neurological and anatomical protec-

- tion following cerebral ischemia in rats. *Cell Transplant* , 2010 , 19 (9) : 1063-1071.
- [8] Fournier NM , Lee B , Banasr M , et al. Vascular endothelial growth factor regulates adult hippocampal cell proliferation through MEK/ERK- and PI3K/Akt-dependent signaling. *Neuropharmacology* , 2012 , 63 (4) : 642-652.
- [9] Koh GY. Orchestral actions of angiotensin-1 in vascular regeneration. *Trends Mol Med* , 2013 , 19 (1) : 31-39.
- [10] 咎丽坤 ,宋月佳 ,滕国鑫 ,等. 大鼠脑缺血后血管内皮生长因子和血管生成素的表达变化及其作用. *中华病理学杂志* , 2011 , 40 (12) : 834-839.
- [11] Ploughman M , Windle V , MacLellan CL , et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke* , 2009 , 40 : 1490-1495.
- [12] Zhang L , Hu Y , Sun CY , et al. Lentiviral shRNA silencing of BDNF inhibits in vivo multiple myeloma growth and angiogenesis via down-regulated stroma-derived VEGF expression in the bone marrow milieu. *Cancer Sci* , 2010 , 101 (5) : 1117-1124.
- [13] Pikula A , Beiser AS , Chen TC , et al. Serum brain-derived neurotrophic factor and vascular endothelial growth factor levels are associated with risk of stroke and vascular brain injury: Framingham Study. *Stroke* , 2013 , 44 (10) : 2768-2775.
- [14] Carmeliet P , Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* , 2011 , 473 (7347) : 298-307.
- [15] Murakami M , Nguyen LT , Zhuang ZW , et al. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest* , 2008 , 118 (10) : 3355-3366.
- [16] Wang L , Zhang Z , Wang Y , et al. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* , 2004 , 35 (7) : 1732-1737.
- [17] Li Y , Lu Z , Keogh CL , et al. Erythropoietin-induced neurovascular protection , angiogenesis , and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* , 2007 , 27 (5) : 1043-1054.
- [18] Souvenir R , Doycheva D , Zhang J H , et al. Erythropoietin in Stroke Therapy: Friend or Foe. *Curr Med Chem* , 2015 [Epub ahead of print].
- [19] Toth ZE , Leker RR , Shahar T , et al. The combination of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow-derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia. *Blood* , 2008 , 111 (12) : 5544-5552.
- [20] Ju R , Wen Y , Gou R , et al. The experimental therapy on brain ischemia by improvement of local angiogenesis with tissue engineering in the mouse. *Cell Transplant* , 2014 , 23 (Suppl 1) : 83-95.
- [21] Zhang J , Chopp M. Cell-based therapy for ischemic stroke. *Expert Opin Biol Ther* , 2013 , 13 (9) : 1229-1240.
- [22] Leu S , Lin YC , Yuen CM , et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. *J Transl Med* , 2010 , 8 : 63.
- [23] Bang OY , Lee JS , Lee PH , et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* , 2005 , 57 (6) : 874-882.
- [24] Lee JS , Hong JM , Moon GJ , et al. A longterm follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* , 2010 , 28 (6) : 1099-1106.
- [25] Rosell A , Morancho A , Navarro-Sobrinho M , et al. Factors secreted by endothelial progenitor cells enhance neurorepair responses after cerebral ischemia in mice. *PLoS One* , 2013 , 8 (9) : e73244.
- [26] 龚如 ,江基尧. 内皮祖细胞在缺血性脑血管疾病治疗中的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志* , 2014 , 41 (2) : 130-133.
- [27] Chen J , Cui X , Chopp M , et al. Increasing Ang1/Tie2 expression by simvastatin treatment induces vascular stabilization and neuroblast migration after stroke. *J Cell Mol Med* , 2009 , 13 (7) : 1348-1357.
- [28] Massaro ML , Zampolli A , Scoditti E , et al. Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. *Cardiovasc Res* , 2010 , 86 (2) : 311-320.
- [29] Ding G , Jiang Q , Li L , et al. Magnetic resonance imaging investigation of axonal remodeling and angiogenesis after embolic stroke in sildenafil-treated rats. *J Cereb Blood Flow Metab* , 2008 , 28 (8) : 1440-1448.
- [30] Silver B , McCarthy S , Lu M , et al. Sildenafil treatment of subacute ischemic stroke: a safety study at 25-mg daily for 2 weeks. *J Stroke Cerebrovasc Dis* , 2009 , 18 (5) : 381-383.