

# HIF-1 及 NGB, VEGF 在脑挫裂伤后促脑血管生成的作用机制

龚旋<sup>1</sup>, 邓征浩<sup>2</sup>, 李春涛<sup>1</sup>, 周鸿书<sup>1</sup>, 杨增<sup>1</sup>, 李杰<sup>1</sup>, 李炜<sup>3</sup>, 李臻琰<sup>1</sup>

1. 中南大学湘雅医院神经外科, 湖南 长沙 410008

2. 中南大学湘雅医院病理科, 湖南 长沙 410008

3. 中南大学湘雅医院中西医结合研究所, 湖南 长沙 410008

**摘要:**目的 探讨 HIF-1 调控 Ngb、VEGF 在脑挫裂伤后促血管生成的作用。方法 采用蛋白质组学技术比较脑挫裂伤患者和非颅脑创伤患者额叶组织的差异蛋白质, 并应用生物信息学技术分析鉴定差异蛋白。然后运用免疫组化和酶联免疫方法分别检测差异蛋白 HIF-1、Ngf 及 VEGF 在脑组织以及血清中的表达。结果 建立了脑挫裂伤患者和非颅脑创伤患者组脑组织的 2-DE 图谱, 鉴定了 7 种差异蛋白, 其中有 HIF-1、Ngf 及 VEGF。HIF-1、Ngf 及 VEGF 在脑挫裂伤患者脑组织中的表达水平均高于非颅脑创伤患者。HIF-1、Ngf 及 VEGF 在脑挫裂伤患者血清中的表达水平均显著高于非颅脑创伤患者。结论 脑挫裂伤后, HIF-1 通过调控 Ngf 和 VEGF 两个靶基因的释放, 在新的脑血管生成过程中发挥了重要作用。HIF-1、Ngf 和 VEGF 在血清中的含量变化, 可为临床评估和监测缺氧缺血性脑病的严重程度提供参考; 对脑挫裂伤的诊断、治疗以及疾病的转归具有重要意义。

**关键词:** 脑挫裂伤; HIF-1; Ngf; VEGF.

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2017.01.003

## Mechanism of action of hypoxia-inducible factor-1, neuroglobin, and vascular endothelial growth factor in promoting cerebral angiogenesis after cerebral contusion and laceration

GONG Xuan<sup>1</sup>, DENG Zheng-hao<sup>2</sup>, LI CHUN-tao<sup>1</sup>, ZHOU Hong-shu<sup>1</sup>, YANG Zeng<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1</sup>, LI Wei<sup>3</sup>, LI Zhenyan<sup>1</sup>. 1 Department of Neurosurgery, 2 Department of pathology, 3 Institute of Integration of Traditional Chinese and Western Medicine, Xiangya hospital, Central South University, Changsha, China, 410008.

**Abstract: Objective** To investigate the role of neuroglobin (NGB) and vascular endothelial growth factor (VEGF) regulated by hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in promoting angiogenesis after cerebral contusion and laceration. **Methods** Proteomic technology was used to compare differentially expressed proteins in the frontal lobe between patients with cerebral contusion and laceration and those with non-traumatic brain injury, and bioinformatics technology was used for the analysis and identification of differentially expressed proteins. Immunohistochemistry and ELISA were used to measure the expression of HIF-1, NGB, and VEGF in cerebral tissue and serum. **Results** The 2-dimensional gel electrophoresis profile was established for brain tissues from patients with cerebral contusion and laceration or non-traumatic brain injury, and 7 differentially expressed proteins were identified, including HIF-1, NGB, and VEGF. Immunohistochemistry showed that the patients with cerebral contusion and laceration had higher expression of HIF-1, NGB, and VEGF in brain tissue than those with non-traumatic brain injury. The results of ELISA showed that the patients with cerebral contusion and laceration had higher expression of HIF-1, NGB, and VEGF in serum than those with non-traumatic brain injury. **Conclusions** HIF-1 regulates the release of two target genes NGB and VEGF after cerebral contusion and laceration and thus plays an important role in cerebral angiogenesis. Changes in the serum levels of HIF-1, NGB, and VEGF can be used as a reference for clinical evaluation and monitoring of the severity of hypoxic-ischemic encephalopathy. They also have important significance in the diagnosis, treatment, and outcome of cerebral contusion and laceration and await in-depth research.

**Key words:** Cerebral contusion and laceration; Hypoxia-inducible factor-1; Neuroglobin; Vascular endothelial growth factor

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (30472115); 湖南省科技厅计划项目: (2013sk3007)

**收稿日期:** 2016-12-18; **修回日期:** 2017-02-07

**作者简介:** 龚旋, 男, 博士, 医师, 助理研究员, 主要从事神经再生及脑外伤临床研究。

**通信作者:** 李臻琰, 男, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事神经肿瘤及脑外伤的综合治疗, E-mail: lizhenyan@126.com

脑挫裂伤是多发病、常见病。研究显示,脑挫裂伤可引发基因及蛋白质表达变化,导致神经细胞损伤或死亡。目前脑挫裂伤的实验研究已经取得很大进展但尚不能令人满意。深入探讨脑挫裂伤的病理生理变化,及其在诊断、治疗和疗效评估中的作用,逐渐成为学者们关注的热点。

本研究采用脑挫裂伤患者和非颅脑创伤患者作为研究对象,分别取两组的脑组织及血清为样本,采用二维凝胶电泳和质谱技术分离、鉴定 2 种样本的差异蛋白。随后使用酶联免疫法与免疫组化法检测差异蛋白——HIF-1 及 Ngf, VEGF 在正常人和脑挫裂伤患者的脑组织及血清中表达水平的动态变化,从而探讨三者对脑挫裂伤后促进脑血管的生成作用,为进一步从蛋白质整体水平筛选人类脑挫裂伤的靶标打下良好基础。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

所有纳入研究的脑挫裂伤患者均为重型颅脑创伤,GCS 评分为 5~8 分、通过 CT 检查证实。组织经手术切除后 30 min 内,置液氮中保存。实验组:选择 10 例患者(其中男 6、女 4),年龄在 18~70 岁之间,平均年龄  $39.14 \pm 2.8$  岁,术中所取脑挫裂伤组织均位于右额叶。对照组:2 例癫痫患者及 3 例脑室肿瘤患者术中取得少量非颅脑创伤额叶组织为对照。用于酶联免疫分析的 10 例脑挫裂伤患者血清均为手术前、未经任何治疗患者的血清。标本的获取均履行告知并获得书面同意。正常人血清由年龄和性别匹配的 10 例志愿者提供。

**1.1.1 试剂** 酶联免疫检测试剂盒;SP 免疫组化试剂盒;PVDF 膜;2D Quant 蛋白质定量试剂盒;ECL 发光试剂盒;辣根过氧化物酶偶联的羊抗大鼠,大鼠抗 VEGF 及 HIF-1 多克隆抗体;DAB 显色试剂盒等。

**1.1.2 仪器** 等电聚焦仪、垂直电泳槽、水平式电泳仪、扫描仪、质谱仪、酶标仪等。

### 1.2 方法

**1.2.1 质谱分析** 将处理过的脑挫裂伤灶及非颅脑创伤额叶组织标本先后取出、研磨、离心;按 IPGphor 等电聚焦系统使用指南进行二维电泳;结束后,对 2-DE 胶进行染色;随后进行凝胶图像分析,软件比较分析脑外伤患者和非颅脑创伤患者 2-DE 电泳图谱差异,取表达水平相差 2 倍以上的蛋白质点行质谱分析;利用 Mascot 软件检索 NCBI 数据库鉴定蛋白质。

**1.2.2 血清样品分析** 采集实验组患者和对照组正常人空腹静脉血各 5 mL,采用酶联免疫方法,按照相关试剂盒说明进行操作。绘制标准曲线、分别计算各样本的 HIF-1、Ngf、VEGF 浓度。随后采用 SP 法,按照试剂盒说明书分别进行免疫组织化学染色,染色结果判定:HIF-1 蛋白的表达以细胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性细胞,参照试剂盒说明书,采用双盲法,稍加改进做半定量分析:分为阴性、弱阳性、阳性、强阳性。用已知阳性表达的脑外伤组织作阳性对照,另取 PBS 溶液代替 HIF-1 抗体作阴性对照。

### 1.3 统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计学分析。各组数据采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采取方差分析, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脑组织双向凝胶电泳图谱及分析

**2.1.1 脑组织双向凝胶电泳图谱** 在同等条件下对同一标本的总蛋白质样品分别进行了 3 次双向凝胶电泳,其总蛋白质的分布模式非常相似,以 pI4~8 和 Mr20~75 kD 范围的蛋白质斑点分布最多。经过优化的 2-DE 条件获得了分辨率高、背景清晰的双向凝胶参考图谱(见图 1~2)。

**2.1.2 脑组织双向凝胶电泳图像分析** 利用分析软件选择最强点及最弱点进行分析。与对照组比较分析,实验组中蛋白质点表达差异点共 31 个。随机选取其中 9 个点进行质谱分析。

### 2.3 脑组织质谱鉴定结果

上述差异蛋白质点进行质谱分析和数据库查询,搜寻到 7 个有意义的蛋白质点,而 Ngf、VEGF、和 HIF-1 位列其中。

### 2.4 脑组织中 HIF-1、Ngf 及 VEGF 的表达

经免疫组化检测,提示脑组织中 HIF-1、Ngf、VEGF 表达均位于胞浆内。在非颅脑创伤脑组织中,HIF-1、Ngf、VEGF 表达均呈弱阳性;在脑挫裂伤灶脑组织中,三者表达呈阳性;而挫裂伤灶周围水肿带脑组织中,三者表达呈强阳性,与对照组比较有显著性统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3~5。

### 2.5 血清中 HIF-1、Ngf 及 VEGF 的表达

酶联免疫检测,HIF-1、Ngf、VEGF 在正常人血清中呈低表达;脑挫裂伤后 3 小时三者表达均呈现逐渐增高趋势,Ngf、VEGF 于 12 小时后达到峰值,其后表达逐渐下降,72 小时后恢复至正常;而 HIF-1

直到 72 小时后达到峰值(图 6);其后逐渐下降,于 96 小时后降至 48 h 水平。脑挫裂伤后 6 h、12 h、

24 h、36 h、48 h、72 h 及 96 h,三者表达与对照组比较有显著性统计学差异( $P < 0.05$ )。

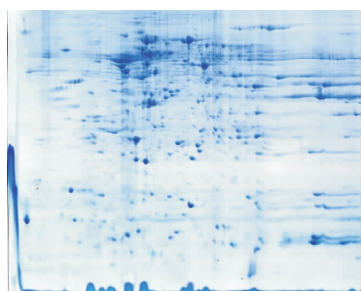


图 1 正常对照组脑组织 2-DE 图

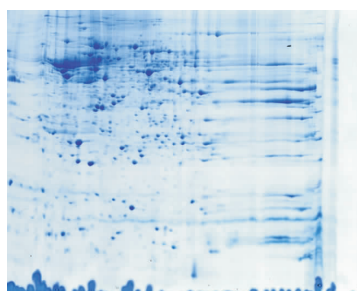


图 2 脑挫裂伤组脑组织 2-DE 图

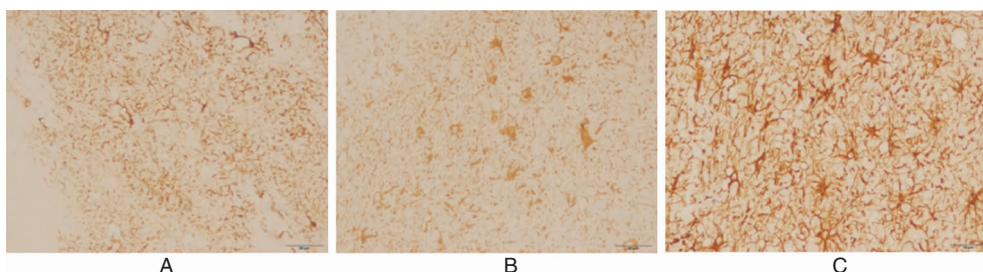


图 3 HIF-1 的表达变化情况。

A. HIF-1 在非颅脑创伤脑组织中的表达;B. HIF-1 在挫裂伤灶脑组织的表达;C. HIF-1 在挫裂伤灶周围水肿带脑组织中的表达

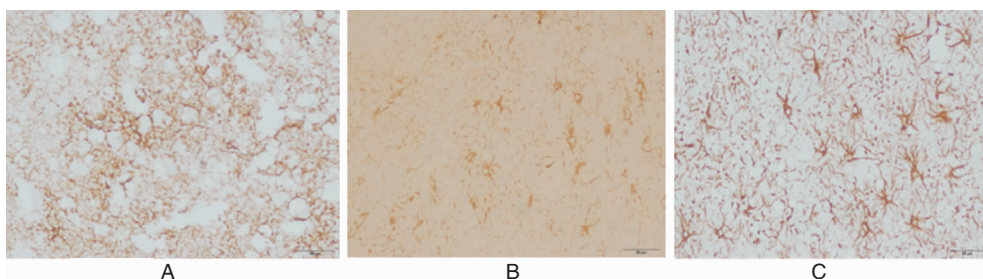


图 4 Ngf 的表达变化情况。

A. Ngf 在非颅脑创伤脑组织中的表达;B. Ngf 在挫裂伤灶脑组织中的表达;C. Ngf 在挫裂伤灶周围水肿带脑组织中的表达

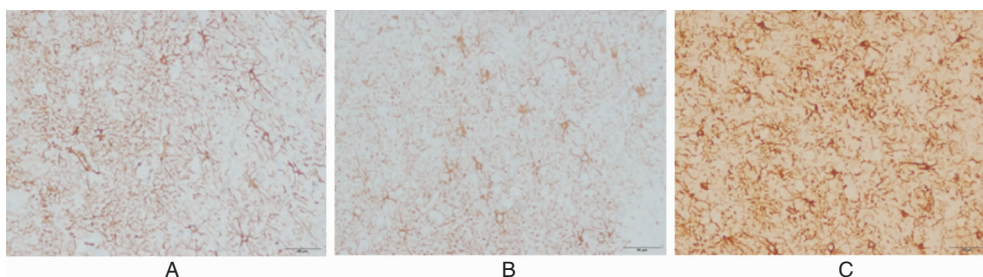


图 5 VEGF 的表达变化情况。

A. VEGF 在非颅脑创伤脑组织中的表达;B. VEGF 在挫裂伤灶脑组织中的表达;C. VEGF 在挫裂伤灶周围水肿带脑组织中的表达

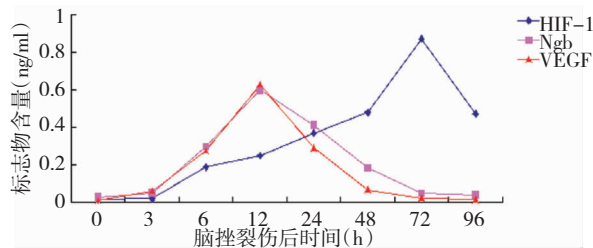


图 6 Ngf、VEGF 和 HIF-1 在脑挫裂伤后的表达变化情况

### 3 讨论

为了探讨脑挫裂伤后脑组织中蛋白质的变化,本研究找到 7 个认为有意义的蛋白质。

其中 HIF-1 作为细胞适应低氧环境的关键性调节因子,在缺血缺氧相关性脑损伤的发生、发展过程中发挥着重要的双向调节作用<sup>[1-2]</sup>。Ngf 是主要位于神经元内、能够可逆性结合氧的球蛋白,它能转运氧通过血脑屏障,提高代谢活跃的神经组织的氧供和利用率<sup>[3]</sup>。VEGF 及其受体能促进内皮细胞增殖,加速新生血管形成,增加血管通透性,抗血栓,促进组织愈合<sup>[4]</sup>。HIF-1、Ngf 和 VEGF 与其它 4 个经质谱鉴定的蛋白质比较,更具有从实验和临床深入研究的价值<sup>[3,5]</sup>。因此本文将 HIF-1、Ngf 及 VEGF 列为重点研究对象。

经免疫组化检测发现,HIF-1、Ngf 和 VEGF 表达均定位于胞浆内<sup>[6-8]</sup>。在非颅脑创伤脑组织中,HIF-1、Ngf 和 VEGF 均呈弱阳性表达,在脑挫裂伤灶脑组织中则呈阳性表达,而脑挫裂伤灶周围水肿带脑组织中的 HIF-1、Ngf 和 VEGF 表达均呈强阳性。上述变化的机制可能是神经细胞受到外在暴力作用造成损伤,出现原发性神经元死亡及诱导迟发性神经元死亡如细胞凋亡等<sup>[9]</sup>,致 HIF-1 的合成明显减弱或维持在低水准。在 HIF-1 的调控下,Ngf 和 VEGF 的合成明显减弱;而在脑挫裂伤灶周围水肿带脑组织中,由于继发脑缺血缺氧,诱导 HIF-1 在创伤早期的反应性合成增加,从而促进神经元内线粒体内部的氧含量不断增加,以保持线粒体的正常功能并满足线粒体的产能,因而在这一时期可见 HIF-1 表达明显增强。其靶基因 Ngf 和 VEGF 表达也明显增强;随着时间的推移,脑挫裂伤进入后期,脑组织的缺血缺氧及水肿逐渐减轻,HIF-1 及 Ngf 和 VEGF 的表达也就逐渐恢复至正常。

HIF-1 和 VEGF 均参与缺血缺氧所致脑损伤的病理进展过程,对维持神经细胞功能和脑内环境稳

定状态起到重要作用<sup>[10-11]</sup>。VEGF 作为 HIF-1 的靶蛋白,参与脑缺血中神经血管重塑,促进血管形成及神经细胞保护<sup>[12-14]</sup>。HIF-1 的诱导因子能增强 Ngf 的表达,HIF-1 可介导 Ngf 的表达,推测 Ngf 可能为 HIF-1 的靶基因之一<sup>[15-18]</sup>。梁孟亚的研究结果亦证实了 HIF-1 和 Ngf 的这一功能联系<sup>[19]</sup>。本文推测,脑挫裂伤后 HIF-1 可能介导了 Ngf 和 VEGF,而 Ngf 和 VEGF 均是 HIF-1 的靶基因。

本研究发现:在非脑挫裂伤人脑组织及血清中,HIF-1、Ngf 和 VEGF 均呈现低表达;而在脑挫裂伤后,三者脑组织中及与血清中表达水平均升高,且在时间上亦基本一致。提示 HIF-1、Ngf 和 VEGF 的表达可能与缺氧时间呈正相关(图 1-6)。

研究表明<sup>[20]</sup>,细胞内氧含量下降可导致 HIF-1 增加,后者通过羧基端侧的有效转录激活结构域,通过低氧反应元件结合,进一步调控下游基因,促进 Ngf 生成。Mones<sup>[21]</sup>等报道:Ngf 的 5' 端非编码区存在数个能与 HIF-1 结合的碱基序列 5'-RCGTG-3' 片段,其可能促进 Ngf 基因的转录,使 Ngf 得以高表达,从而诱导 Ngf 的产生,直接协助氧透过血脑屏障进入脑细胞;这个机制可以解释为什么神经细胞在此类缺氧环境中仍能摄取足够的氧分子,满足自身功能需求<sup>[22]</sup>。在缺氧情况下,HIF-1 被激活后分别参与新生血管形成、细胞内压调节以及细胞凋亡、葡萄糖的转换和代谢。HIF-1、VEGF 二者在脑缺血状态中,在体内某些激酶刺激下,表达具有很好相关性<sup>[23-24]</sup>。提示脑挫裂伤后酶体被激活,通过上调 HIF-1 进而调控 VEGF 的表达<sup>[25]</sup>,介导了大脑缺血后的脑损伤<sup>[26-27]</sup>。

本研究还发现,正常人血清中 HIF-1、Ngf 和 VEGF 均呈低表达,在脑挫裂伤后 3 h 血清中三者的表达均逐渐升高,后两者 12 h 后达到峰值,前者 72 h 后表达才到峰值。其后 Ngf 和 VEGF 表达逐渐下降,并于 72 h 后基本恢复正常,而 HIF-1 于 72 h 后表达才逐渐下降(图 6)。提示脑挫裂伤后,在 HIF-1 的调控下,Ngf 和 VEGF 的表达水平随着脑挫裂伤患者脑组织的缺血缺氧由早期的加重至中晚期的减轻而发生变化。Ngf 和 VEGF 在表达的时间上亦基本一致,提示两者的表达可能与缺氧时间呈正相关。由此推测,Ngf 和 VEGF 的这种相关性,可能是:①由于 HIF-1 的介导作用而产生的;②其它信号转导通路使 Ngf 和 VEGF 两者相互作用而实现的。以上论点还有待进一步的研究论证。

总之,HIF-1,Ngb 和 VEGF 的血清学变化有可能在一定程度上反映出脑细胞的损伤和修复情况从而直接体现患者脑外伤的严重程度。血清中三者的变化有可能作为评价脑挫裂伤的一种生物标记物,也可能作为评估缺血缺氧性脑病严重程度的潜在参考指标。对脑挫裂伤的诊断、治疗以及疾病的转归具有重要意义,值得深入研究。

### 参 考 文 献

- [1] Khan M , Dhammu TS , Baarine M , et al. GSNO promotes functional recovery in experimental TBI by stabilizing HIF-1 $\alpha$  [ J ]. Behav Brain Res. 2016 , [http:// dx. doi. org/10. 1016/j. bbr. 2016. 10. 037](http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.037)
- [2] Khan M , Dhammu TS , Matsuda F , et al. Promoting endothelial function by S-nitrosoglutathione through the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway stimulates neurorepair and functional recovery following experimental stroke in rats [ J ]. Drug Des Devel Ther 2015 ; 9 2233-47.
- [3] 李臻琰,邓征浩,李春涛,等. 脑红蛋白在小儿脑挫裂伤病理过程中变化的初步研究 [ J ]. 中国当代儿科杂志,2012;14(9):697-702.
- [4] Qin X , You H , Cao F , et al. Apolipoprotein E Mimetic Peptide Increases Cerebral Glucose Uptake by Reducing Blood-Brain Barrier Disruption after Controlled Cortical Impact in Mice : An 18F-Fluorodeoxyglucose PET/CT Study [ J ]. J Neurotrauma. 2016 Sep 27. [ Epub ahead of print ]
- [5] Sen T , Sen N. Treatment with an activator of hypoxia-inducible factor 1 , DMOG provides neuroprotection after traumatic brain injury [ J ]. Neuroparmacology. 2016;107:79-88.
- [6] Semenza GL , Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation [ J ]. Mol Cell Biol. 1992;12(12):5447-54.
- [7] Burmester T , Weich B , Reinhardt S , Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain [ J ]. Nature , 2000 , 407 ( 6803 ) : 520-523.
- [8] Chodobski A , Chung I , Kozniowska E , et al . Early neurophilic expression of vascular endothelial growth factor after traumatic brain injury [ J ]. Neuroscience , 2003 , 122 ( 4 ) : 853 ~ 867.
- [9] Pierce WM , Cai J. Applications of mass spectrometry in proteomics . Contrib Nephrol , 2004 , 141 : 40-58.
- [10] 陈忠余,赵世巧,李蔚,等. 睡眠呼吸暂停低通气综合征患者血清 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、sVCM1 水平的变化及意义 [ J ]. 重庆医学,2013,42(5):484-486.
- [11] 刘永年,俞科贤,马祁生,等. 间歇性低压缺氧预处理对大鼠全脑缺血/再灌注海马 CA1 区 Ngb 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 [ J ]. 中国病理生理杂志,2013,29(12):2240-2244.
- [12] Ding Y H , Luan X D , Li J , et al. Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke [ J ]. Curr Neurovasc Res , 2004 , 1 ( 5 ) : 411-20.
- [13] 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 ) : 441-446.
- [14] Lu KT , Huang TC , Wang JY. NKCC1 mediates traumatic brain injury-induced hippocampal neurogenesis through CREB phosphorylation and HIF-1 $\alpha$  expression [ J ]. Pflugers Arch. 2015 ; 467 ( 8 ) : 1651-1661.
- [15] Sun Y , Jin K , Mao XO , et al. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA , 2001 , 98 ( 26 ) : 15306-15311.
- [16] 贺建勋,魏洪涛,高武. 颅脑损伤患者血清中脑红蛋白表达变化的研究 [ J ], 中华神经外科疾病研究杂志, 2015; 14(1):65-67.
- [17] Hota KB , Hota SK , Srivastava RB , et al. Neuroglobin regulates hypoxic response of neuronal cells through HIF-1 $\alpha$ -and Nrf2-mediated mechanism [ J ]. J Cereb Blood Flow Metab , 2012 , 32 ( 6 ) : 1046-1060.
- [18] 史少阳,刘焱虹,冯雪梅,等. 脑红蛋白与神经系统缺氧缺血性损伤 [ J ]. 中华医学杂志,2008,88(6):430-432.
- [19] 梁孟亚,唐志贤,陈光献,等. 深低温停循环下幼猪脑皮质 HIF-1 与 NGB 的表达及作用 [ J ]. 中国病理生理杂志,2015; 31(5):823-827.
- [20] Ran R , Xu H , Lu A , et al. Hypoxia preconditioning in the brain [ J ]. Dev Neurosci. 2005;27(2-4):87-92.
- [21] Mones L , Dewilde S. Globins in the brain [ J ]. Nature , 2000 , 407 ( 2 ) : 461-462.
- [22] 黄生炫 刘窗溪,熊云彪. 缺氧诱导因子-1 在缺血缺氧性脑损伤中的作用 [ J ], 中风与神经疾病杂志;2012; 29 ( 4 ) : 375-376.
- [23] Schmidt-Kastner R , van Os J , WM Steinbusch H , et al. Gene-regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia [ J ]. Schizophr Res , 2006 , 84 ( 2-3 ) : 253-271.
- [24] Lee HY , Lee T , Lee N , et al. Src activates HIF-1 $\alpha$  not through direct phosphorylation of HIF-1 $\alpha$ -specific prolyl-4-hydroxylase 2 but through activation of the NADPH oxidase / Rac pathway . 2011 , 32 ( 5 ) : 703-712.
- [25] Wu W , Tian R , Hao S , et al. A pre-injury high ethanol intake in rats promotes brain edema following traumatic brain injury [ J ]. Br J Neurosurg. 2014;28(6):739-745.
- [26] 张磊,刘家传,杨艳艳,等. 缺氧预处理对创伤性脑损伤大鼠脑组织 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达的影响 [ J ], 安徽医科大学学报,2014; 49(4):447-450.
- [27] 李永金,杨开勇,张谊,等. 低氧诱导因子-1 在脑损伤中的双向调节作用 [ J ]. 中国细胞生物学学报,2015, 37(6):906-910.