

血管生成素样蛋白2 (ANGPTL2) 对大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤的炎症保护机制研究

张恒^{1a}, 袁莉², 王佩^{1a}, 吴晓康³, 雷华斌^{1b}, 焦飞燕⁴

(1. 北京中医药大学孙思邈医院 a. 检验科; b. 脑病科, 陕西铜川 727031; 2. 西安交通大学第一附属医院检验科, 西安 710061; 3. 西安交通大学第二附属医院检验科, 西安 710000; 4. 陕西省第四人民医院, 西安 710043)

摘要: **目的** 探讨血管生成素样蛋白2 (Angiogenin-like protein 2, ANGPTL2) 在大鼠缺血 / 再灌注后脑损伤过程中的炎症保护机制。 **方法** 选择健康雄性 Wister 大鼠 60 只, 建立大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注损伤模型, 随机分为假手术组和 ANGPTL2 组。建模后 6, 12, 24, 48 和 72 h 后, 采用实时定量 PCR (real-time quantitative PCR) 以及苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin, HE) 检测每组大鼠体内 ANGPTL2 的表达水平。在建模 48 h 后分别记录每组大鼠的神经功能评分, 检测其脑组织含水量、血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 通透性以及脑梗死体积。采用酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 在建模前 (T0)、建模后 2 h (T1)、建模后 6 h (T2)、建模后 12 h (T3) 和建模后 24 h (T4) 分别检测大鼠血清中 S-100 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) 的表达水平。 **结果** 在缺血 30 和 90 min 中的 ANGPTL2 组再灌注 6, 12, 24, 48 和 72 h 的 ANGPTL2 mRNA 表达水平均高于假手术组。ANGPTL2 组大鼠的脑组织含水量、伊水思蓝含量和脑梗死体积均显著低于假手术组, 而神经功能评分高于假手术组, 差异均有统计学意义 ($t=2.431\sim6.058$, 均 $P < 0.05$)。相较于 T0, 大鼠在 T1 时的 S-100B 显著增加, 随着建模时间的延长, S-100 β 水平逐渐降低, 并且与 T0 的差异均有统计学意义 ($t=2.346\sim3.649$, 均 $P < 0.05$)。相较于 T0, ANGPTL2 组大鼠在 T1, T2, T3, T4 时血清中的 TNF- α 和 IL-1 水平均显著升高, 且差异具有统计学意义 ($t=5.036\sim9.775$, 均 $P < 0.05$)。 **结论** ANGPTL2 可以降低大鼠局灶性脑缺血 / 再灌注后血脑屏障的通透性, 并减轻脑血管炎症反应, 对脑缺血 / 再灌注损伤具有保护作用。

关键词: 血管生成素样蛋白2; 脑缺血 / 再灌注; 急性脑损伤; 血脑屏障

中图分类号: R-332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2019) 06-032-05

doi:10.3969 / j.issn.1671-7414.2019.06.008

Study on the Inflammatory Protective Mechanism of Angiogenin-Like Protein 2 (ANGPTL2) on Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats

ZHANG Heng^{1a}, YUAN Li², WANG Pei^{1a}, WU Xiao-kang³, LEI Hua-bin^{1b}, JIAO Fei-yan⁴

(1a. Department of Clinical Laboratory; 1b. Department of Encephalopathy, Sun Simiao Hospital, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Tongchuan 727031, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Medicine of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710000, China; 4. the Fourth People's Hospital of Shaanxi, Xi'an 710043, China)

Abstract: Objective To investigate the protective mechanism of angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) in brain injury induced by ischemia/reperfusion in rats. **Methods** 60 healthy male Wister rats were selected to establish focal cerebral ischemia/reperfusion injury model. They were randomly divided into sham operation group, and ANGPTL2 group saline group. After 6, 12, 24, 48 and 72 hours, Real-Time Quantitative PCR and Hematoxylin-Eosin staining were used to detect the expression level of ANGPTL2 in each group of rats. After 48 hours of modeling, the neurological function scores of each group were collected, and the brain water content, blood brain barrier (BBB) permeability and cerebral infarction volume of each group were measured. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect S-100 β , tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-1 (IL-1) expression level in rat serum before modeling (T0), 2 hours after modeling (T1), 6 hours after modeling (T2), 12 hours after modeling (T3), 24 hours after modeling (T4). **Results** The mRNA expression level of ANGPTL2 in the ANGPTL2 group at 6, 12, 24, 48 and 72 hours after reperfusion was higher than that in the sham group at 30 and 90 min. The brain water content,

基金项目: 陕西省自然科学基金项目 (2013JM4016)。

作者简介: 张恒 (1982-), 女, 本科, 主管检验师, 研究方向: 临检、生化, E-mail: tongzheng@163.com。

通讯作者: 焦飞燕 (1981-), 女, 大学本科, 主管检验师, E-mail: 394531101@qq.com。

Evans blue content and cerebral infarction volume of ANGPTL2 group were significantly lower than that of the sham group, and the neurological function score of ANGPTL2 groups was significantly higher than that of the sham group ($t=2.431\sim6.058$, all $P<0.05$). Compared with T0, S-100 increased significantly at T1. With the extension of modeling time, the S-100 β level gradually decreased, and the difference with T0 was statistically significant ($t=2.346\sim3.649$, all $P<0.05$). Compared with T0, the levels of TNF- α and IL-1 in the serum of ANGPTL2 group were significantly increased at T1, T2, T3 and T4, and the difference was statistically significant ($t=5.036\sim9.775$, $P<0.05$). **Conclusion** ANGPTL2 can reduce the permeability of blood-brain barrier after focal cerebral ischemia/reperfusion in rats, and alleviate cerebrovascular inflammatory reaction, which has protective effect on cerebral ischemia/reperfusion injury.

Keywords: angiopoietin-like protein 2; ischemia reperfusion; acute cerebral injury; blood brain barrier

缺血性脑血管病产生的神经功能损害是医学界一大难题^[1]。研究表明,脑缺血/再灌注损伤后会引起人体血脑屏障(blood brain barrier, BBB)通透性的破坏,从而引发脑出血、脑水肿^[2]。另外发现脑缺血后缺血区新生血管的恢复与神经营养因子、生长相关因子的表达水平相关^[3]。血管生成素作为其中一种生长相关因子,已证实在血管新生方面具有重要作用,据报道其可改善脑血流灌注后造成的脑损伤,挽救缺血半暗带的神经元,从而促进脑缺血区的神经功能恢复^[4]。血管生成素样蛋白2(Angiopoietin-Like Protein 2, ANGPTL2)作为血管生成素样蛋白家族成员,具有促进血管发生、组织修复、维持造血干细胞的特性,调控肿瘤细胞转移等功能,并且发现该蛋白与糖尿病、癌症等疾病的发生相关^[5-7]。另有研究发现,内皮细胞、巨噬细胞来源的ANGPTL2在心血管疾病的发生、发展中起重要作用,而血小板源的ANGPTL2在血栓形成中有关键作用^[8]。然而,ANGPTL2在脑缺血/再灌注后脑损伤过程中的作用机制却很少有报道。本研究通过建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型,探讨ANGPTL2对大鼠脑缺血/再灌注损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物来源 SPF级雄性Wister大鼠由西安交通大学医学院实验动物中心提供。选择Wister大鼠60只,建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型,随机分为假手术组和ANGPTL2组。

1.2 试剂与仪器 病理组织漂烘仪、包埋机购自常州市中威电子仪器有限公司;酶标仪购自美谷分子仪器有限公司;大鼠脑槽购自美国TED-Pella;氯代三苯基四氮唑溶液购自青岛海博生物技术公司;ELISA试剂盒购自上海通蔚生物技术公司;PCR试剂盒购自日本TAKARA公司;SP试剂盒购自上海国源生物技术有限公司;ANGPTL2单克隆抗体购自上海信裕生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型建立: 参照高轩等^[8]人报道的大脑中动脉线栓法建立脑缺血/再灌注模型。首先注射

戊巴比妥钠(60 mg/kg)麻醉大鼠,然后使大鼠仰卧位,剪开大鼠右侧皮肤,暴露颈总动脉,将涂有肝素的尼龙线线栓自颈总动脉向颈内动脉插入,栓线长度约17~18 mm,从而阻断大脑中动脉血流,造成局灶性脑缺血。本研究分别在脑缺血30 min或90 min后松开尼龙线,造成血流再灌注。假手术组:不阻断大鼠大脑中动脉,手术操作与模型制备相同;ANGPTL2组:再灌注同时,向大鼠尾静脉注射ANGPTL2(2 μ g/kg)。实验过程符合动物伦理学标准。

1.3.2 ANGPTL2 mRNA及蛋白检测: 假手术组、ANGPTL2组建模6, 12, 24, 48, 72 h后,采集大鼠的外周血,进行RT-PCR检查,应用Thermal Cycler Dice Real time System两步法PCR扩增标准程序,严格按照试剂盒说明书进行操作。

HE染色: 采用SP法,操作步骤按试剂盒说明书进行。一抗为ANGPTL2单克隆抗体。实验结果用Image-Pro Plus高清彩色病理图文报告分析系统对所选取视野中阳性信号进行图像分析。

1.3.3 大鼠神经功能评分: 建模48 h后,进行神经功能缺损评分^[9],分为0分、1分、2分、3分、4分。在手术前1天和手术后分别进行该项检测。

1.3.4 脑组织含水量检测: 建模48 h后,每组随机取5只大鼠断头取脑,去除大鼠嗅球、小脑和脑干,测定湿重,110℃烘烤24 h后称干重,脑组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 。

1.3.5 BBB通透性检测: 建模48 h后,每组随机取5只大鼠经股静脉按2 ml/kg注入2.5g/dl伊文思蓝生理盐水,2 h后经左心室注射200 ml生理盐水。取出脑组织将其浸润于二甲基甲酰胺溶液,60℃孵育24 h,离心取上清。在620 nm波长处检测吸光度(A),根据标准曲线计算脑组织中伊文思蓝(Evans blue, EB)含量(1 μ g/g脑重量)。

1.3.6 大鼠脑梗死体积测定: 建模48 h后,每组随机取5只大鼠在规定的不同处理时间点断头处理,取出脑组织置于-20℃冰箱,从额极开始从前向后切取脑组织5~7片,每片约2 mm厚。然后置于2%氯代三苯基四氮唑溶液中,37℃避光孵育30 min。

红色区域为正常脑组织,苍白色为梗死区。采用图像分析软件处理计算脑梗死体积。

1.3.7 标记物检测:分别于建模(T0)、建模后2 h(T1),6 h(T2),12 h(T3)和24 h(T4)各时间点抽取每组大鼠眼眶血1 ml,3000 r/min离心10 min。采用ELISA测定血清中S-100 β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1(IL-1)水平。

1.4 统计学分析 采用SPSS22.0进行统计学分析。计量资料用均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 t 检验比较两组间的差异。采用重复测量资料比较不同时间点大鼠血清中S-100 β ,TNF- α 和IL-1水平。计数资料用构成比表示,采用卡方(χ^2)检验比较组间差异。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠大脑皮层中ANGPTL2 mRNA表达水平的变化 见表1。采用免疫组化分析大鼠缺血/再灌注后大脑皮层中ANGPTL2的表达水平,缺血30和90 min时ANGPTL2 mRNA的表达水平高于假手术组。大鼠脑缺血/再灌注处理后,随着时间的延长,ANGPTL2 mRNA水平逐渐升高,在48 h时达到最高峰,随后ANGPTL2 mRNA水平逐渐减少。

表1 缺血30 min及90 min再灌注不同时间点大脑皮层中ANGPTL2 mRNA表达的变化

组别	缺血30 min	缺血90 min
假手术组	107.65 \pm 9.26	109.52 \pm 7.62
ANGPTL2组 再灌注6 h	115.85 \pm 7.62	117.52 \pm 9.65
再灌注12 h	121.52 \pm 8.11	126.59 \pm 9.59
再灌注24 h	148.02 \pm 9.41	159.95 \pm 7.95
再灌注48 h	152.67 \pm 8.62	157.62 \pm 7.49
再灌注72 h	148.55 \pm 7.26	150.23 \pm 9.46

表1可以看出,在缺血30min时ANGPTL2组再灌注6 h的ANGPTL2 mRNA表达水平高于假手术组($t=1.841$, $P=0.103$),ANGPTL2组再灌注12 h的ANGPTL2 mRNA表达水平显著高于假手术组($t=2.412$, $P=0.042$),ANGPTL2组再灌注24 h的ANGPTL2 mRNA表达水平显著高于假手术组($t=3.646$, $P=0.006$),ANGPTL2组再灌注

48h的ANGPTL2 mRNA表达水平显著高于假手术组($t=7.437$, $P=0.000$),ANGPTL2组再灌注72 h的ANGPTL2 mRNA表达水平显著高于假手术组($t=5.021$, $P=0.001$)。在缺血90 min时ANGPTL2组再灌注6 h的ANGPTL2 mRNA表达水平高于假手术组($t=1.833$, $P=0.104$),ANGPTL2组再灌注12 h的ANGPTL2 mRNA表达水平显著高于假手术组($t=2.394$, $P=0.043$),ANGPTL2组再灌注24 h的ANGPTL2 mRNA表达水平显著高于假手术组($t=3.578$, $P=0.007$),ANGPTL2组再灌注48 h的ANGPTL2 mRNA表达水平显著高于假手术组($t=7.645$, $P=0.000$),ANGPTL2组再灌注72 h的ANGPTL2 mRNA表达水平显著高于假手术组($t=5.660$, $P=0.000$)。

2.2 ANGPTL2对大鼠脑缺血/再灌注损伤的影响

见表2。在建模48 h后,ANGPTL2组大鼠的脑组织含水量、伊文思蓝含量和脑梗死体积均显著低于假手术组,而ANGPTL2组大鼠的神经功能评分显著高于假手术组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表2 ANGPTL2对各指标的影响

项 目	假手术组	ANGPTL2组	t	P
脑组织含水量(%)	68.81 \pm 4.26	62.38 \pm 3.25	2.431	0.041
伊文思蓝含量(μ g/g)	131.02 \pm 16.05	87.41 \pm 9.41	4.735	0.001
脑梗死体积(cm^3)	0.22 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	3.764	0.006
神经功能评分(分)	0.80 \pm 0.10	1.82 \pm 0.26	6.058	0.000

2.3 ANGPTL2对标记物S-100 β 的影响 见表3。相较于T0,大鼠在T1时的S-100 β 显著增加。随着建模时间的延长,S-100 β 水平逐渐降低,并且与T0的差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表3 ANGPTL2组不同再灌注时间对不同组大鼠血清S-100 β 标记物表达水平的影响

类 别	ANGPTL2组	t	P
T0	0.05 \pm 0.01	-	-
T1	0.57 \pm 0.12	2.346	0.001
T2	0.36 \pm 0.18	2.729	0.006
T3	0.21 \pm 0.05	3.054	0.000
T4	0.13 \pm 0.04	3.649	0.007

表4 ANGPTL2组不同再灌注时间对大鼠血清中TNF- α , IL-1表达水平的影响

类 别	TNF- α	t	P	IL-1	t	P
T0	56.62 \pm 4.02	-	-	341.20 \pm 24.06	-	-
T1	80.29 \pm 5.17	5.036	0.001	375.20 \pm 16.46	2.441	0.026
T2	100.34 \pm 5.03	6.223	0.000	459.59 \pm 26.62	2.978	0.017
T3	115.07 \pm 3.61	6.904	0.000	572.62 \pm 15.26	5.374	0.001
T4	133.25 \pm 5.23	9.775	0.000	692.26 \pm 15.25	7.058	0.000

2.4 ANGPTL2对炎症介质TNF- α , IL-1的影响见表4。相较于T0, ANGPTL2组大鼠在T1, T2, T3, T4时血清TNF- α , IL-1均显著增加, 且差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

据报道血管生成素样蛋白是与血管生成相关的一类分泌型糖蛋白, 其中ANGPTL2在血管内皮细胞受损恢复中具有重要作用, 另外还发现ANGPTL2具有促进巨噬细胞浸润、抑制血小板聚集的功能^[8]。TAZUME等^[9]发现了ANGPTL2在腹主动脉瘤的巨噬细胞中大量表达, 证实了巨噬细胞来源的ANGPTL2能够促进腹主动脉瘤的发展。HORIO等^[10]人对10例冠心病患者进行检测, 发现内皮细胞和巨噬细胞中ANGPTL2过表达, 同时粥样斑块浸润的巨噬细胞数目显著降低; 人为抑制内皮源性的ANGPTL2表达后, 诱导型一氧化氮合酶发生失活, 内皮细胞功能减弱, 同时还促使部分促炎症型巨噬细胞M1向抗炎型巨噬细胞M2的分化。然而关于ANGPTL2蛋白在脑缺血/再灌注后急性脑损伤过程中的作用机制却少有报道。

本文发现在缺血30和90min时ANGPTL2组再灌注6, 12, 24, 48和72h的ANGPTL2 mRNA表达水平高于假手术组。在建模48h后, ANGPTL2组大鼠的脑组织含水量、伊文思蓝含量和脑梗死体积均显著低于假手术组, ANGPTL2组大鼠的神经功能评分显著高于假手术组。该结果表明ANGPTL2可以帮助大脑缺血/再灌注后受损伤的血脑屏障的恢复, 降低脑水肿, 从而遏制了脑缺血/再灌注病程的发展。

有研究报道, 脑梗死体积和脑出血量与S-100 β 蛋白表达水平呈正相关^[11]。另外发现脑损伤发生20min后血清中S-100 β 浓度就会出现明显升高^[12]。且大量研究证实缺血、缺氧是诱导神经细胞内S-100 β 表达上调的重要因素, 因此S-100 β 水平可作为检测中枢神经系统损伤的一个灵敏性指标^[13]。本研究中将S-100 β 水平高低作为判断血脑屏障是否损伤的监测指标, S-100 β 蛋白分子量大, 如果血脑屏障未受到损伤的情况下, 正常脑血流中很难检测到S-100 β , 只有当血脑屏障发生破坏时才能检测到。本研究结果显示相较于T0, 大鼠在T1时S-100 β 显著增加。随着建模时间的延长, S-100 β 水平逐渐降低, 并且与T0的差异均有统计学意义($P<0.05$)。表明ANGPTL2可有效降低S-100 β 蛋白的表达, 对脑缺血/再灌注损伤(中枢神经系统损伤)有保护作用。

大脑缺血/再灌注时分子氧进入缺血组织时会产生O^{2·}, OH⁻等氧自由基, 从而激活促炎症相关的

转录信号, 导致炎症因子表达量升高, 这是目前关于脑缺血/再灌注损伤时发生的机制^[14]。本研究结果表明相较于T0, ANGPTL2组大鼠在T1, T2, T3, T4时血清中TNF- α 和IL-1水平均显著升高, 且差异具有统计学意义($P<0.05$)。ANGPTL2作为一种多功能的炎症因子可以参与多种信号通路在不同的组织细胞中发挥功能^[15-16]。目前发现ANGPTL2主要通过结合整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 和免疫抑制性受体来发挥生理作用^[17]。本研究揭示了ANGPTL2可以促进组织炎症反应、减轻由脑缺血、缺氧造成的BBB通透性的改变、降低S-100 β 蛋白的表达, 具有帮助脑缺血/再灌注损伤恢复的作用。

参考文献:

- [1] 左林, 赵佳, 姜小建, 等. 缺血性脑血管病患者血清同型半胱氨酸、叶酸和维生素B12水平与头颈部血管狭窄的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(2):23-25, 29.
ZUO Lin, ZHAO Jia, JIANG Xiaojian, et al. Correlation study between serum homocysteine, folate, vitamin b12 levels and head and neck vascular stenosis in patients with ischemic cerebrovascular disease[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(2):23-25, 29.
- [2] 曾燕, 张丹, 姜丽萍, 等. 嗜铬粒蛋白A衍生多肽CGA₄₇₋₆₆抑制脓毒症小鼠血脑屏障通透性增加[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(2):122-126.
ZENG Yan, ZHANG Dan, JIANG Liping, et al. Chromogranin A derived peptide CGA₄₇₋₆₆ inhibits hyperpermeability of blood brain barrier in mice with sepsis[J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28(2):122-126.
- [3] 董豪杰. 血管生成素对miR-141的调控作用及其在血管生成中的功能[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
DONG Haojie. The regulation of angiogenin on miR-141 expression and its role in angiogenesis[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [4] 杨洪强, 朱杰, 王中群, 等. 血管生成素样蛋白2促进ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化内膜钙化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(8):757-762.
YANG Hongqiang, ZHU Jie, WANG Zhongqun, et al. Angiopoietin-like 2 promotes atherosclerotic calcification in aortic artery ApoE^{-/-} mice[J]. Chin J Arterioscler, 2015, 23(8):757-762.
- [5] 李礼, 胡娟玉, 于正清, 等. 血管生成素样蛋白1和2水平在胃癌患者中的表达及临床意义[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(2):55-57.
LI Li, HU Juanyu, YU Zhengqing, et al. Expression and clinical significance of angiopoietin-like protein 1 and 2 in patients with gastric cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(2):55-57.
- [6] 刘玉林, 黄晓楠, 赵琪林, 等. RI与ANG相互作用对BALB/C裸鼠人膀胱癌移植瘤生长转移及PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(4):34-38.
(下转46页)