

门脉高压性胃病大鼠 VEGF 及其受体 FLT-1 和 FLK-1 的表达

陶平,黄冠,潘超,戴树龙,王小平*

(南京医科大学附属南京医院普外科,江苏 南京 210006)

[摘要] 目的:探讨门脉高压性胃病(portal hypertensive gastropathy,PHG)模型大鼠胃组织血管内皮生长因子(VEGF)及其受体 FLT-1 和 FLK-1 的表达情况。方法:Wistar 大鼠 60 只随机分为 PHG 组及假手术(SO)组,一期缩窄门静脉主干法制作 PHG 大鼠模型,术后 2 周用生理测压仪测定门静脉压力,免疫组化法测定大鼠胃组织 VEGF 及其受体的表达,并利用 RT-PCR 法测定 VEGF 及其受体 mRNA 的表达。结果:PHG 组大鼠门静脉压力显著高于 SO 组($P < 0.05$),免疫组化结果显示,PHG 组大鼠胃组织细胞胞浆中 VEGF 及其受体的阳性表达率明显高于 SO 组 ($P < 0.05$);RT-PCR 结果显示,PHG 组 VEGF 及其受体 mRNA 的表达显著高于 SO 组($P < 0.05$)。结论:VEGF 及其受体 FLT-1 和 FLK-1 可能参与 PHG 的形成。

[关键词] 血管内皮生长因子; FLT-1; FLK-1; 门脉高压性胃病;大鼠

[中图分类号] R575

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)05-589-04

doi:10.7655/NYDXBNS20160515

Expression of vascular endothelial growth factor and it's receptors FLT-1 and FLK-1 in rats with portal hypertensive gastropathy

Tao Ping, Huang Guan, Pan Chao, Dai Shulong, Wang Xiaoping*

(Department of General Surgery, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and it's receptors FLT-1 and FLK-1 in rats with portal hypertensive gastropathy. **Methods:** Wistar rats were divided into two groups:PHG group whose portal hypertension was established by ligating the portal vein, and the sham-operation (SO)group served as control. After two weeks portal vein pressure was measured by physiological pressure capsule. Immunohistochemistry was used to detect the expression of VEGF and it's receptors, and RT-PCR was used to detect the mRNA expression of VEGF and the receptors in both groups. **Results:** The pressure of PHG group was higher significantly than that in SO group ($P < 0.05$). And the PHG group has a significantly higher expressions of VEGF and the receptors compared with SO group ($P < 0.05$), the same of mRNA expressions. **Conclusion:** VEGF and the receptors may participate in the pathogenesis of portal hypertensive gastropathy.

[Key words] vascular endothelial growth factor; FLT-1; FLK-1; portal hypertensive gastropathy; rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05): 589-592]

门脉高压性胃病 (portal hypertensive gastropathy, PHG) 是由门静脉高压引起的以内镜下胃黏膜呈“蛇皮样”改变为典型特征的一种疾病。近年来,随着对肝硬化门静脉高压症血流动力学的深入研究以及胃镜对出血部位的直接观察,人们注意到门脉高压性胃病是导致门静脉高压症患者发生上消化道出血的另一个重要原因^[1]。因为,门静脉高压所引起的胃组织局部血管改变是 PHG 形成的基础,因

此,研究胃组织局部血管改变发生的可能机制对 PHG 的防治有重要意义。

血管内皮细胞生长因子(VEGF)是一种具有多种生物学功能的血管活性因子。有研究发现,VEGF 与其受体 FLT-1 和 FLK-1 结合后不仅可促进新生血管的形成,同时亦可通过增加血管的通透性而引起局部组织充血水肿,这与门脉高压性胃病等多种疾病的发生及预后均有着密切的关系^[2]。有研究发现,PHG 患者胃组织中 VEGF 及其受体 FLT-1 和 FLK-1 mRNA 的表达显著高于正常人^[3],此外,PHG 大鼠模型胃组织中 VEGF 的表达显著高于对照组^[4]。据

[基金项目] 南京市卫生局课题(2012YKK12080)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:809221698@qq.com

此,本研究在建立 PHG 大鼠模型的基础上,全面系统地研究 VEGF 及其受体 FLT-1 和 FLK-1 蛋白及 mRNA 的表达变化,探讨其在 PHG 形成过程中的可能作用,为 PHG 的药物治疗进行有益的探索。

1 材料和方法

1.1 材料

纯种 Wistar 大鼠 60 只,由南京市第一医院中心实验室提供,体重 160~220 g,并随机分为 PHG 组(40 只)和假手术(SO)组(20 只)两组。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备

参照段进东等^[5]报道的方法制备门静脉高压大鼠模型。大鼠给予 3%戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉,开腹并游离出门静脉后沿纵轴置入一大圆针,用 4 号线结扎门静脉主干后拔出大圆针,形成肝前性门静脉缩窄,为 PHG 组。SO 组仅游离出门静脉而不结扎。

1.2.2 门静脉压力测定

手术 2 周后打开腹腔,用探针穿刺门静脉,利用压力换能器将采集到的压力信号转换为数字信号后导入计算机,采用生理记录仪测定门静脉压力,压力以 mmHg 表示。

1.2.3 胃组织病理学检查

在测定门静脉压力后处死大鼠,剪取少许胃体组织(1.0 cm×1.0 cm×0.2 cm),经 4%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色后,于光学显微镜下观察并拍照。

1.2.4 免疫组化法检测胃组织 VEGF 及其受体 FLT-1 和 FLK-1 的表达

组织标本经 4%甲醛固定,常规石蜡包埋,采用免疫组化(IHC)法,显色后苏木素复染封片。分别用鼠抗-VEGF、鼠抗-FLT-1 和鼠抗-FLK-1(工作浓度为 1:100,Abcam 公司,美国)测定胃组织中 VEGF、FLT-1 和 FLK-1 的表达。VEGF 及其受体在胃组织中的表达位于细胞胞浆,阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色颗粒状或团块状。通过显微摄影系统摄取图像,利用免疫组化软件计算面积并做定量分析。

1.2.5 RT-PCR 法检测 VEGF 及其受体 FLT-1、FLK-1 mRNA 的表达

采用 Primer 软件设计引物,其中 VEGF 上游引物:5'-CCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACC-3',下游引物:3'-GAAGCTCATCTCTCCTATGTGCTGGC-5'。FLT-1 上游引物:5'-ATCAGAGATCAGGAAGCACC-

3',下游引物:3'-TACCTGGGTCTACTTCAAGG-5'。FLK-1 上游引物:5'-TGATGTGGTTCTGAGTCCGT-3',下游引物:3'-ACGCTTCATGGAACCAATGG-5'。β-actin 上游引物:5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3',下游引物:3'-GAGTAACGGTTACCACTACT-5'。利用 TAKARA 公司逆转录试剂盒,设定 PCR 程序:37℃ 5 min 后 40 个循环(95℃ 15 s,60℃ 20 s,72℃ 40 s)。每个样本基因做 3 个复孔,PCR 结果采用荧光定量曲线分析结果,并通过内参标准化数据。

1.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计学软件分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行 *t* 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

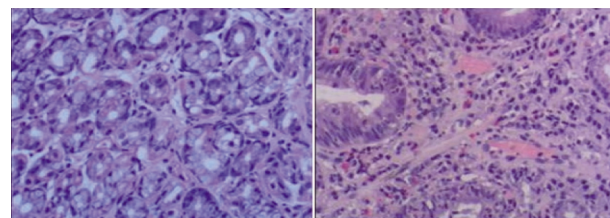
2 结果

2.1 门静脉压力变化

PHG 模型组动物的门静脉压力(21.06 ± 2.53) mmHg 显著高于 SO 组(7.98 ± 1.05) mmHg,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示造模成功。

2.2 胃黏膜病理学改变

光镜下,PHG 模型组大鼠胃组织黏膜毛细血管呈弥漫性扩张、伴大量红细胞渗出,固有层充血水肿明显,对照组大鼠胃黏膜及固有层未见明显的相应改变(图 1)。



对照组 PHG 组
图 1 PHG 组大鼠胃组织血管扩张明显($\times 200$)

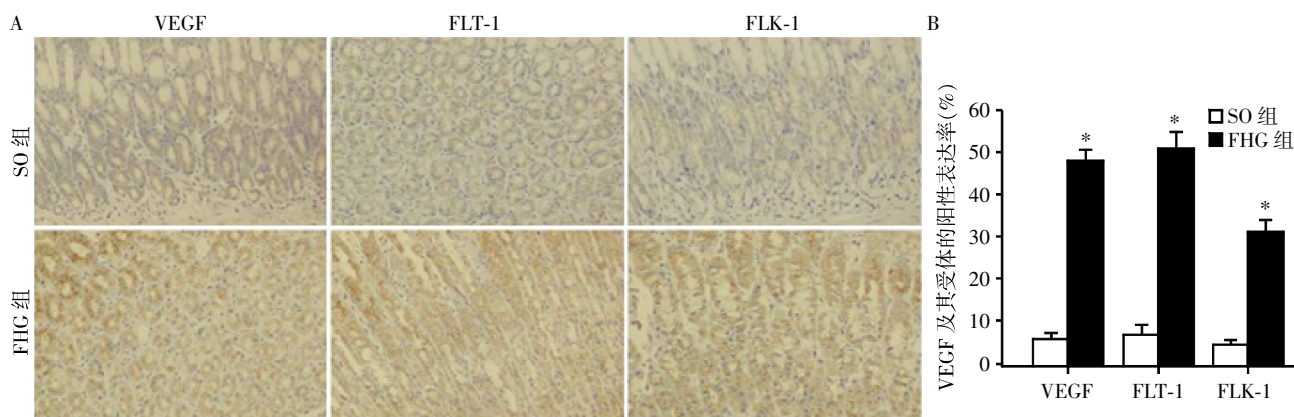
Figure 1 The blood vessels of gastric tissue dilate in rats of PHG group($\times 200$)

2.3 PHG 组大鼠胃组织 VEGF 及其受体蛋白呈显著高表达

免疫组化结果显示,PHG 组大鼠胃组织细胞胞浆中 VEGF 及其受体 FLT-1 和 FLK-1 蛋白均呈显著高表达(图 2A),和 SO 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2B)。

2.4 PHG 组大鼠胃组织 VEGF 及其受体 mRNA 显著高表达

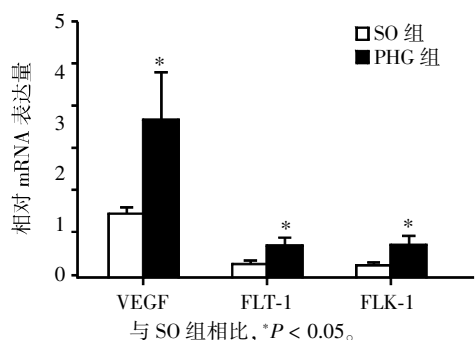
RT-PCR 结果显示,PHG 组大鼠胃组织中 VEGF 及其受体 FLT-1 和 FLK-1 mRNA 的表达均明显高于 SO 组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。



A:免疫组化结果($\times 200$);B:胃组织 VEGF 及其受体的表达率,与 SO 组相比, $*P < 0.05$ 。

图 2 PHG 组大鼠胃组织 VEGF 及其受体蛋白表达

Figure 2 The expression of VEGF and it's receptors in rats of PHG group



与 SO 组相比, $*P < 0.05$ 。

图 3 PHG 组大鼠胃组织 VEGF 及其受体 mRNA 的表达
Figure 3 The mRNA expression of VEGF and it's receptors in rats of PHG group

3 讨论

门静脉压力升高和肝硬化肝功能受损是 PHG 形成的基本原因。门静脉高压症时胃静脉入肝血流受阻,毛细血管静水压升高,引起胃黏膜水肿,胃动脉血流灌注增加,动静脉短路开放,黏膜细胞的氧代谢和营养物质代谢障碍,使胃的屏障功能减弱,同时,血浆内皮素释放增加,胰高血糖素、前列环素、内源性一氧化氮等激素代谢紊乱^[6]。另一方面,肝硬化肝功能受损时,内源性血管调节物质比例失调,胃黏膜血管自我调节能力降低^[7]。这些因素相互作用,可导致门静脉高压性胃病的发生。

门静脉压力升高是 PHG 形成的必备条件。门静脉高压会导致静脉回流受阻,胃组织黏膜及黏膜下层血管扩张和血浆外渗,这可导致胃组织广泛充血。另一方面,门静脉压力升高后还会使胃组织形成动静脉短路,造成局部缺氧,胃黏膜防御机制被破坏,进而导致胃黏膜组织损伤。本研究利用 I 期门静脉缩窄法对大鼠造模 2 周后发现,PHG 组门静脉压力显著高于 SO 组($P < 0.05$)。此外,PHG 组大

鼠胃黏膜可见典型的“蛇皮样”改变及斑片样出血灶,而 SO 组大鼠胃黏膜未见明显改变。以上两点均表明造模成功,同时也表明门静脉压力升高是 PHG 形成的基础。

病理性的血管生长可导致多种疾病^[8]。VEGF 是目前发现的最重要的血管生成促进因子之一,被认为是一种促血管通透性因子和血管内皮细胞高度特异的促有丝分裂原^[2],研究表明 VEGF 与其受体结合后通过激活细胞外信号调节激酶途径来诱导血管的新生及发育成熟^[9]。在血管闭塞性疾病中,代偿性升高的 VEGF 可通过促进新生血管形成进而建立有效的侧支循环来改善局部组织的血液供应^[10]。人和大鼠在此类疾病的初期往往都具有足够有效的血管再生能力来延缓疾病的进程^[11]。有研究发现,通过转入神经纤毛蛋白抗体 1 下调 VEGF 的表达可导致大鼠的动脉出现明显缺陷^[12],提示 VEGF 在血管的形成及发育过程中均起重要的作用。此外在给予围产期母鼠转入神经纤毛蛋白抗体 1 后,其幼鼠的动脉也会出现明显的功能缺陷^[13]。

为了深入探讨 VEGF 及其受体的异常表达在 PHG 形成过程中的具体作用,本研究在建立 PHG 大鼠模型成功的基础上,利用免疫组化法及 RT-PCR 法分别测定 VEGF 及其受体 FLT-1、FLK-1 蛋白和 mRNA 的表达。结果表明 PHG 组大鼠胃组织中 VEGF 及其受体 FLT-1、FLK-1 蛋白和 mRNA 的表达均显著升高($P < 0.05$),结果表明,VEGF 及其受体的异常表达在 PHG 的形成过程中发挥了重要的作用。本文猜测,由于门静脉高压导致胃组织局部缺氧,这可以导致 VEGF 表达的代偿性升高,VEGF 与其受体结合后则可通过激活细胞外信号调节激酶及酪氨酸激酶等通路进而促进局部胃组织

大量新生血管形成及扩张^[14];此外, VEGF 的高表达还会导致血管壁通透性增加, 引起红细胞及蛋白等大量渗出, 形成本研究所见的“蛇皮样”改变。他人的研究亦发现, 在给予 PHG 大鼠 VEGF 抗体后, 其门静脉压力明显降低, 阻断 VEGF 信号路径可以抑制血管生成过程, 血管生成的调控可能是治疗门静脉高压的新途径^[15]。本实验结果为 VEGF 及其受体抑制剂用于 PHG 患者的治疗进行了有益的探索。

[参考文献]

- [1] Pongp rasobchai S, Nimitvilai S, Chasawat J, et al. Upper gastrointestinal bleeding etiology score for predicting variceal and non-variceal bleeding[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(9): 1099-1104
- [2] Kofler NM, Simons M. Angiogenesis versus arteriogenesis: neuropilin 1 modulation of VEGF signaling[J]. *F1000Prime Rep*, 2015, 7: 26, doi: 10.12703
- [3] 商中华, 张波, 陈海云, 等. VEGF 及其受体在门静脉高压性胃病中的作用[J]. *山西医科大学学报*, 2008, 39(1): 55-57
- [4] Pan WD, Liu Y, Lin N, et al. The expression of PEDF and VEGF in the gastric wall of prehepatic portal hypertensive rats[J]. *Hepatogastroenterology*, 2011, 58(112): 2152-2155
- [5] 段进东, 管红康, 陈易人, 等. 一期门静脉缩窄法复制大鼠门静脉高压性模型[J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(5): 356-357
- [6] Satin SK, Agarwal SR. Gastric varices and portal hypertensive gastropathy[J]. *Clin Liver Dis*, 2001, 5(3): 727-767
- [7] Dong L, Zhang ZN, Fang P, et al. Portal hypertensive gastropathy and its interrelated factors [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2003, 2(2): 226-229
- [8] Presta M, DellEra P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(2): 159-178
- [9] Lanahan A, Zhang X, Fantin A, et al. The neuropilin 1 cytoplasmic domain is required for VEGF-A-dependent arteriogenesis [J]. *Dev Cell*, 2013, 25(2): 156-168
- [10] Lucitti JL, Mackey JK, Morrison JC. Formation of the collateral circulation is regulated by vascular endothelial growth factor-A and a disintegrin and metallo-protease family members 10 and 17 [J]. *Circ Res*, 2012, 111(12): 1539-1550
- [11] Faber JE, Chilian WM, Deindl E, et al. A brief etymology of the collateral circulation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(9): 1854-1859
- [12] Fantin A, Schwarz Q, Davidson K, et al. The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins [J]. *Development*, 2011, 138(19): 4185-4191
- [13] Fantin A, Herzog B, Mahmoud M, et al. Neuropilin 1 (NRP1) hypomorphism combined with defective VEGF-A binding reveals novel roles for NRP1 in developmental and pathological angiogenesis [J]. *Development*, 2014, 141(3): 556-562
- [14] Zhang X, Simons M. Receptor tyrosine kinases endocytosis in endothelium: biology and signaling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(9): 1831-1837
- [15] Fernandez M, Vizzutti F, Gareia-Pagan JC, et al. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(3): 886-894

[收稿日期] 2015-06-17