

· 实验研究 ·

## 持续高氧暴露降低新生大鼠肺组织血管内皮生长因子的表达

刘博<sup>1</sup>, 刘雪燕<sup>2</sup>, 李娟<sup>2</sup>, 王伟<sup>2</sup>, 魏克伦<sup>2</sup>

(1. 锦州市儿童医院新生儿重症监护室, 辽宁 锦州 121000; 2. 中国医科大学第二临床医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

**[摘要]** 目的 高氧肺损伤是导致支气管肺发育不良(BPD)的最常见原因。血管内皮生长因子(VEGF)在新生肺中具有促进内皮细胞增殖、分化、诱导血管发生的作用。本研究动态观察高氧暴露对新生鼠肺组织 VEGF 表达的影响,探讨 BPD 的发生机制。**方法** 新生 Wistar 大鼠出生后随机分为空气组和高氧组(均  $n=30$ )。高氧组在生后 12 h 内开始,予以持续吸入 95% 氧气。分别于生后 1、2、3、7、14、21 d 各处死 5 只大鼠,留取肺组织标本。苏木精-伊红染色观察病理改变,免疫组化检测 VEGF 蛋白表达,原位杂交方法检测 VEGF mRNA 表达。结果以切片视野灰度值表示,值越高说明蛋白或 mRNA 表达越少。**结果** 新生鼠高氧暴露 7 d 后肺泡间隔减少,肺微血管发育异常,间质纤维化,且病变随高氧暴露时间延长而加重。高氧组大鼠第 3、7 天时肺组织 VEGF 蛋白表达明显低于相应空气对照组( $81.9 \pm 0.8$  vs  $80.8 \pm 1.0$ ,  $82.8 \pm 1.2$  vs  $79.2 \pm 1.6$ , 均  $P < 0.01$ )。VEGF mRNA 表达亦显著减少( $89.5 \pm 1.1$  vs  $88.0 \pm 1.0$ ,  $91.1 \pm 1.5$  vs  $87.7 \pm 1.7$ , 均  $P < 0.001$ )。随着暴露时间的延长,VEGF 蛋白和 mRNA 进行性降低,在高氧暴露 14、21 d 时几乎检测不到 VEGF 蛋白和 mRNA 的表达。**结论** 高氧暴露抑制新生鼠肺 VEGF 的表达,这可能与高氧诱导 BPD 的发生有关。 [中国当代儿科杂志, 2005, 7(5):447-450]

**[关键词]** 支气管肺发育不良;血管内皮生长因子;高氧暴露;大鼠,新生

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2005)05-0447-04

## Exposure to prolonged hyperoxia decreases the expression of vascular endothelial growth factor in lungs of neonatal rats

Bo LIU, Xue-Yan LIU, Juan LI, Wei WANG, Ke-Lun WEI. Neonatal Intensive Care Unit, Jinzhou Children's Hospital, Jinzhou 121000, China (Email: jzliubo2004@126.com)

**Abstract: Objective** Hyperoxia-induced lung injury is the most common cause of bronchopulmonary dysplasia (BPD) in neonates. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an endothelial cell mitogen that can regulate proliferation, differentiation and angiogenesis of endothelial cells in neonatal lungs. This paper aimed to study the changes of VEGF expression in the lungs of neonatal rats exposed to prolonged hyperoxia so as to explore the mechanism of BPD. **Methods** Wistar rat pups were randomized to hyperoxia (Hyperoxia group,  $FiO_2 = 0.95$ ) or room air exposure (Normoxia group) (both  $n=30$ ) from postnatal 12 hrs. The rats were sacrificed at postnatal days 1, 2, 3, 7, 14 and 21 (5 rats each time point) and their lungs were collected. The lung sections were stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation. Expressions of VEGF protein and mRNA were detected by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. Results were expressed as gray values. The higher the value, the lower the expressions. **Results** After being exposed to hyperoxia for 7 days, lung tissues developed interstitial fibrosis, abnormal vascular constitution and a decreased alveolar septation. These changes became more obvious with the time of prolonged hyperoxia exposure. Expressions of VEGF protein at 3 and 7 days of exposure in the Hyperoxia group decreased significantly as compared with the Normoxia group ( $81.9 \pm 0.8$  vs  $80.8 \pm 1.0$ ,  $82.8 \pm 1.2$  vs  $79.2 \pm 1.6$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of VEGF mRNA in the Hyperoxia group was also lower at 3 and 7 days of exposure ( $89.5 \pm 1.1$  vs  $88.0 \pm 1.0$ ,  $91.1 \pm 1.5$  vs  $87.7 \pm 1.7$ ,  $P < 0.001$ ). Both VEGF protein and mRNA levels gradually decreased with the hyperoxia exposure time and their levels could not be detected at 14 and 21 days of hyperoxia exposure. **Conclusions** Hyperoxia exposure inhibited the expression of lung VEGF in neonatal rats, which may be the underlying mechanism of hyperoxia-induced BPD. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(5):447-450]

**Key words:** Bronchopulmonary dysplasia; Vascular endothelial growth factor; Hyperoxia; Rats, newborn

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是慢性肺部疾病(chronic lung disease, CLD)最为常见的形式,其发病机理与高氧损伤密切

相关。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)也称 VEGF-A,能特异性促内皮细胞有丝分裂,诱导内皮细胞的迁移,增加血管

的通透性。VEGF 主要在肺组织末梢肺泡上皮细胞表达,并以旁分泌的方式促进临近毛细血管的发育<sup>[1]</sup>。此外,VEGF 在组织损伤和愈合中还有重要作用<sup>[2]</sup>。Bhatt 等<sup>[3]</sup>发现患 BPD 而死亡的婴儿肺组织中的 VEGF 和受体表达降低,提示 VEGF 表达受阻可能是高氧后肺组织血管内皮细胞损害,并导致 BPD 发生的原因之一。

本实验利用免疫组化和原位杂交的方法,动态观察高氧暴露新生鼠肺组织 VEGF 蛋白和 mRNA 水平的表达变化,探讨 BPD 发生机制。

## 1 对象与方法

### 1.1 实验动物分组与高氧肺损伤动物模型建立

新生 Wistar 大鼠在出生 12 h 内随机分为空气组和高氧组(均  $n = 30$ ),选用喂养能力相近的新近分娩的母鼠作为代乳鼠。参照文献建立高氧肺损伤动物模型<sup>[4]</sup>:将高氧组置于有机玻璃氧箱中,持续输入氧气,氧浓度维持在 95% 以上,钙石灰吸收二氧化碳,每天开箱 1 h,添加水和饲料,更换垫料,并与空气组互换母鼠以避免母鼠因氧中毒致护理能力下降。空气组置于同一室内空气中,温度 25 ~ 26℃,湿度 60% ~ 70%。分别于 1、2、3、7、14、21d 每组各取 5 只大鼠,腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后打开胸腔,分离肺组织,置于 4% 多聚甲醛/PBS 中固定过夜,常规酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋。

### 1.2 组织学检测

5  $\mu\text{m}$  石蜡切片,常规苏木精-伊红染色,光镜下观察肺组织病变。

### 1.3 免疫组织化学

3% 过氧化氢灭活内源性过氧化酶,微波抗原修复,正常山羊血清封闭,兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体(浓度 2  $\mu\text{g/mL}$ ,武汉博士德工程有限公司)4℃ 过夜孵育,PBS 洗后加生物素化山羊抗兔二抗(浓度 10  $\mu\text{g/mL}$ )孵育 30 min,洗后加试剂 SABC,洗后 DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,封片。

### 1.4 原位杂交

0.5% 过氧化氢/甲醛灭活内源性过氧化酶,胃

蛋白酶消化暴露 mRNA,预杂交 2 ~ 4 h 后恒温箱 37 ~ 40℃ 杂交过夜。SSC 洗液后加封闭液,加生物素化鼠抗地高辛,PBS 洗后滴加 SABC,PBS 冲洗,加生物素化过氧化物酶,PBS 冲洗后 DAB 显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。

### 1.5 图像半定量分析

每个时间点各取表达清晰切片 3 张,每张切片于光镜( $\times 400$ )下随机选取 5 个视野,用 Vniversal Imaging Porporation 的图像分析系统,应用 Meta Morph 软件测量灰度值,取平均值。

### 1.6 统计学分析

结果以灰度值表示,灰度值越高提示蛋白或 mRNA 表达越弱。所有数据用均数  $\pm$  标准差表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计学处理。空气组与高氧组比较采用  $t$  检验;组间两两比较用 SNK- $q$  检验。

## 2 结果

### 2.1 高氧持续暴露后新生鼠肺组织病理学改变

高氧暴露 1,2 d,新生鼠肺组织病理学改变不明显。高氧暴露 3 d,小血管扩张,充血,肺泡腔内出现大量红细胞及炎性细胞,肺间质内细胞增多。高氧暴露 7 d,肺间隔轻中度增宽,间质细胞及胶原样物增多,肺组织结构紊乱。高氧暴露 14,21 d,肺泡数量明显减少,肺间隔明显增宽,其内成纤维细胞及胶原物质明显增多,肺泡结构紊乱,部分萎陷,符合 BPD 的病理改变(图 1)。

### 2.2 高氧持续暴露后新生鼠肺组织 VEGF 蛋白和 mRNA 表达的变化

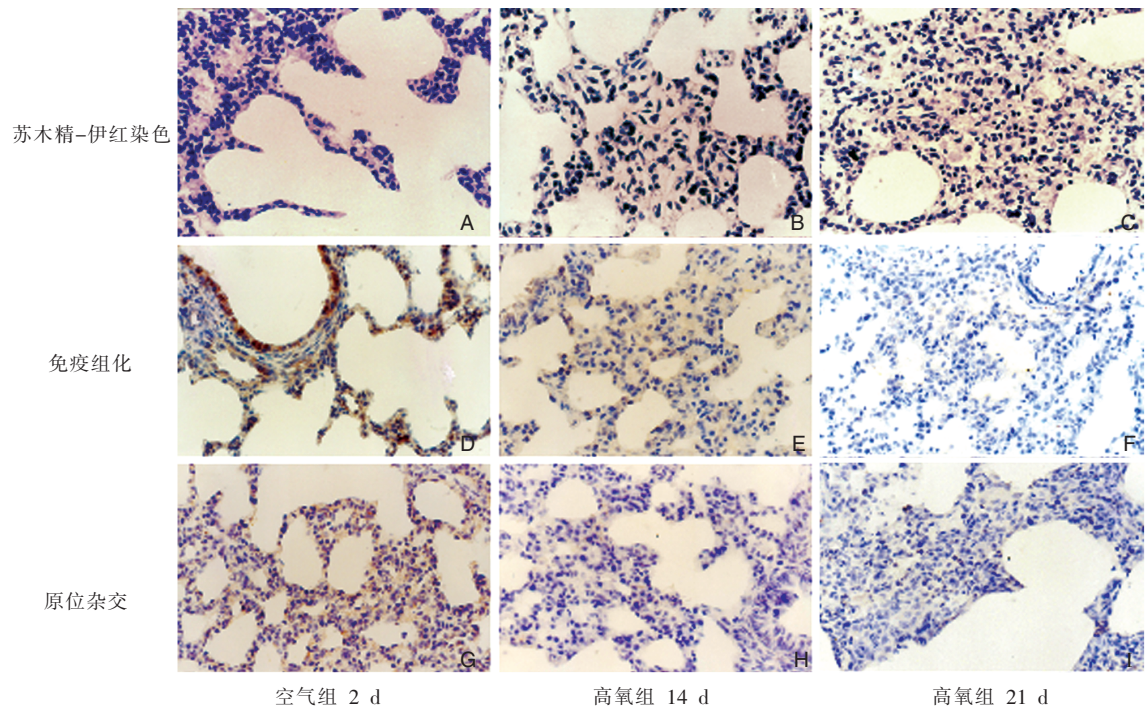
空气组大鼠 VEGF 蛋白主要在肺泡间隔表达,在血管平滑肌和支气管上皮细胞也有阳性表达,但在气道平滑肌细胞无表达。VEGF mRNA 主要在肺泡间隔表达,以肺泡角处明显,在小气道上皮细胞偶有表达,在平滑肌细胞和血管内皮细胞没有表达。随着日龄增加空气组大鼠 VEGF 蛋白和 mRNA 表达无明显变化。新生鼠高氧暴露第 3 天起,VEGF 蛋白和 mRNA 开始减少,并随着暴露时间的延长进行性降低,在高氧暴露 14、21d 时几乎检测不到 VEGF 蛋白和 mRNA 的表达(表 1 和 2,图 1)。

表 1 高氧后肺组织 VEGF 蛋白的表达变化

( $n = 15, \bar{x} \pm s$ , 灰度值)

|     | 1 d            | 2 d            | 3 d            | 7 d                         | 14 d                        | 21 d                        |
|-----|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空气组 | 80.5 $\pm$ 1.2 | 79.9 $\pm$ 1.8 | 80.8 $\pm$ 1.0 | 79.2 $\pm$ 1.6              | 79.0 $\pm$ 2.4              | 78.4 $\pm$ 1.7              |
| 高氧组 | 79.8 $\pm$ 1.2 | 79.5 $\pm$ 1.5 | 81.9 $\pm$ 0.8 | 82.8 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup> | 84.1 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup> | 84.2 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup> |
| $t$ | 1.26           | 0.58           | 3.46           | 6.91                        | 6.68                        | 9.25                        |
| $P$ | 0.24           | 0.67           | 0.0018         | <0.001                      | <0.001                      | <0.001                      |

a 与高氧 3d 组相比  $P < 0.05$ , b 与高氧 7d 组相比  $P < 0.05$



**图1 两组肺组织病理学改变与 VEGF 表达(×400)。**正常组2日龄鼠肺组织肺泡丰富,肺间隔正常(图A)。高氧暴露14,21 d 肺组织,肺泡数量减少,肺间隔明显增宽,肺间隔内成纤维细胞及胶原样物质明显增多,肺泡结构紊乱,萎缩(图B,C)。在正常大鼠中 VEGF 蛋白和 mRNA 主要在肺泡间隔表达(图D,图G)。高氧暴露14 d 时 VEGF 蛋白和 mRNA 表达明显减弱(图E,图H),高氧暴露21 d 时 VEGF 蛋白和 mRNA 表达几乎消失(图F,图I)。VEGF 蛋白和 mRNA 表达的减弱与肺组织病理损伤程度在时间上几乎平行。

**表2 高氧后肺组织 VEGF mRNA 的表达变化** (n=15,  $\bar{x} \pm s$ , 灰度值)

|     | 1 d        | 2 d        | 3 d        | 7 d                     | 14 d                    | 21 d                    |
|-----|------------|------------|------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空气组 | 88.6 ± 1.1 | 88.9 ± 1.2 | 88.0 ± 1.0 | 87.7 ± 1.7              | 87.0 ± 1.2              | 88.2 ± 1.4              |
| 高氧组 | 88.3 ± 1.4 | 88.4 ± 0.9 | 89.5 ± 1.1 | 91.1 ± 1.5 <sup>a</sup> | 92.2 ± 2.1 <sup>b</sup> | 92.1 ± 1.8 <sup>b</sup> |
| t   | 0.72       | 1.47       | 3.89       | 5.80                    | 8.40                    | 6.33                    |
| P   | 0.49       | 0.20       | <0.001     | <0.001                  | <0.001                  | <0.001                  |

与高氧3 d 组相比 a  $P < 0.01$ ,与高氧7 d 组相比 b  $P < 0.05$

3 讨论

本研究发现 VEGF 蛋白和 mRNA 在正常肺泡间隔细胞表达,但在血管平滑肌、呼吸道上皮仅检测到 VEGF 蛋白,很少有 mRNA 表达,这与人类胎肺的研究结果类似<sup>[5]</sup>。可能因为肺组织中, VEGF mRNA 含量太低,用原位杂交方法不易检测到。

小猪高氧暴露后,肺组织匀浆中 VEGF mRNA 和蛋白含量均减少<sup>[6]</sup>, Maniscalco 等<sup>[7]</sup>在早产犊犊 BPD 的模型中也发现了同样的结果。以上资料提示高氧所致的新生期肺损伤可能与 VEGF 的减少有关。本研究进一步证实,新生鼠持续高氧暴露过程中, VEGF mRNA 和蛋白在高氧暴露3 d 开始较对照组明显减少,尤其在增厚的间隔,并且随着高氧暴露时间的延长,逐渐下降,14、21 d 几乎检测不到。VEGF 的这种动态变化与肺组织的损伤程度在时

间上相一致。

VEGF 在高氧暴露过程中表达减少可能与肺泡细胞表型的改变有关。Bhatt 等<sup>[3]</sup>在 BPD 婴儿肺组织中发现由于慢性上皮细胞损伤和修补,表达 VEGF 的Ⅱ型细胞可能转化成高表达的表面活性物质相关蛋白(surfactant protein, SP)-C 的细胞,而 SP-C 高表达的肺泡Ⅱ型细胞仅表达低水平的 VEGF。另有研究发现新生鼠高氧暴露肺 VEGF 水平减少还可能与其上游因子低氧诱导因子(hypoxia indu cible factor, HIF) -2α 的下调有关<sup>[8]</sup>。

VEGF 的减少导致高氧肺损伤中的详细作用机理尚不十分明确。目前认为 VEGF 的减少导致血管内皮细胞凋亡。内皮细胞生存由生长因子和与之相连的细胞外基质维持,生长因子丢失会导致细胞程序死亡。研究证明,在高氧诱导新生鼠视网膜病中, VEGF 表达下降,内皮细胞凋亡导致视网膜毛细血管退化。而这种凋亡可由眼内注射 VEGF 阻断<sup>[9]</sup>。

近来发现高氧肺损伤时,肺组织的渗透性增加和凋亡细胞增多与 VEGF 的降低呈相关关系,而这种渗透性的增加与肺泡毛细血管屏障破裂或损害相一致<sup>[6]</sup>。本研究中,高氧所致的 VEGF 缺乏可能诱导了内皮细胞的凋亡,导致肺基质纤维组织增生,血管数量减少,肺功能严重破坏,促进了 BPD 的发生。

#### [参 考 文 献]

- [1] Marszalek A, Daa T, Kashima K, Nakayama I, Yokoyama S. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the developing rat lung[J]. Jpn J Physiol, 2001, 51(3):313-318.
- [2] Thickett DR, Armstrong L, Millar AB. A role for vascular endothelial growth factor in acute and resolving lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med 2002,166(10):1332-1337.
- [3] Bhatt AJ, Pryhuber GS, Huyck H, Watkins RH, Metlay LA, Maniscalco WM. Disrupted pulmonary vasculature and decreased vascular endothelial growth factor, Flt-1, and TIE-2 in human infants dying with bronchopulmonary dysplasia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001,164(10 Pt 1):1971-1980.
- [4] Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispe JR. Functional and

- pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice [J]. Am J Physiol,1998,275(1 Pt 1):L110-L117.
- [5] Lassus P, Turanlahti M, Heikkila P, Andersson LC, Nupponen I, Sarnesto A, et al. Pulmonary vascular endothelial growth factor and Flt-1 in fetuses, in acute and chronic lung disease, and in persistent pulmonary hypertension of the newborn [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001,15,164(10 Pt 1):1981-1987.
- [6] Ekekezie II, Thibeault DW, Rezaiekhiligh MH, Norberg M, Mabry S, Zhang X, et al. Endostatin and vascular endothelial cell growth factor (VEGF) in piglet lungs: effect of inhaled nitric oxide and hyperoxia [J]. Pediatr Res, 2003,53(3):440-446.
- [7] Maniscalco WM, Watkins RH, Pryhuber GS, Bhatt A, Shea C, Huyck H. Angiogenic factors and alveolar vasculature: development and alterations by injury in very premature baboons [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002,282(4):L811-L823.
- [8] Hosford GE, Olson DM. Effects of hyperoxia on VEGF, its receptors, and HIF-2alpha in the newborn rat lung [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003,285(1):L161-L168.
- [9] Gu X, El-Remessy AB, Brooks SE, Al-Shabrawey M, Tsai NT, Caldwell RB. Hyperoxia induces retinal vascular endothelial cell apoptosis through formation of peroxynitrite [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003,285(3):C546-C554.

(本文编辑:钟乐)

· 消息 ·

## 儿科病特效治疗提高班招生

为了提高儿科医生的临床水平,也为广大基层医生掌握儿科疾病中西医有效的治疗方法,拓展业务范围,我校特聘北京中医药大学附属医院儿科专家传授著名中医刘弼臣教授的经验及各种特色疗法。内容:①“一方九法”治疗肾病、肾炎的经验;②病毒性肺炎、哮喘的中医辨证治疗及用药特点;③脱水、慢性及迁延性腹泻、营养不良、肺炎、心衰、休克、脑水肿的液体疗法经验;④抗生素在儿科的应用;⑤小儿心肌炎的治疗;⑥抽动秽语综合征的中医特色治疗;⑦小儿推拿治疗儿科常见病的手法;⑧小儿腹泻的穴位贴敷疗法。

本班同时聘请中国民间名医、齐都晨鸿医院直肠滴入研究中心主任王洪才医师传授适合基层医疗单位开展的特色直肠滴入新方法,该法是根据传统医学与现代医学理论发展起来的一项新的治疗技术,配合自拟的多种复合制剂肛门给药,可快速、有效治疗小儿上呼吸道感染、小儿肺炎、支气管炎、哮喘、顽咳、高热、腹泻、肠炎、急性细菌性痢疾等疾病,尤其适合于口服给药和静脉给药困难的患儿,适合基层开展特色项目或建立专科门诊。本班将重点介绍最新用药组方、最新研制的栓剂应用经验。学费:850 元。

本校常年举办各种中西医实用技术培训班,欢迎索取详细招生简章,或登陆 [www.tcm-school.com.cn](http://www.tcm-school.com.cn) 查询。

咨询电话:(010)84064076,64286738,84064077,64202604

通信地址:100029,北京中医药大学 1356 信箱 王永忠 收

报到地址:北京市北二环小街桥东南角北小街 2 号楼 401 室,北京站乘 713 路北小街下;南站 106 换 13 路、西站特 2 路至雍和宫站向东即是