

· 实验研究 ·

新生大鼠高氧肺损伤血管内皮生长因子蛋白及其 mRNA 表达变化研究

侯伟, 刘海燕, 李丹, 周戡平, 陈玺

(西安交通大学医学院第二附属医院儿科, 陕西 西安 710004)

[摘要] 目的 血管内皮生长因子(VEGF)参与肺的发育和损伤修复,VEGF 具有促进肺泡和肺血管增殖以及预防新生儿支气管肺发育不良(BPD)的作用。该研究的目的是探讨新生大鼠高氧肺损伤后肺组织 VEGF 蛋白及 VEGF mRNA 表达的变化。**方法** 新生 Sprague-Dawley 大鼠 48 只随机分为高氧实验组和空气对照组,高氧实验组吸入 95% 以上高氧建立高氧肺损伤模型。分别采用免疫组化法和逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR)检测新生大鼠 3 d,7 d,14 d 肺组织 VEGF 蛋白及 VEGF mRNA 表达变化。**结果** 空气对照组新生大鼠出生后随着肺发育,肺组织中 VEGF 蛋白及 VEGF mRNA 表达逐渐增加。高氧实验组新生鼠吸入高氧 3 d,肺 VEGF 蛋白表达出现降低,在 7 d,14 d 明显降低与对照组比较差异有显著性(VEGF 蛋白:12.67 ± 3.82 vs 7.79 ± 5.23; 15.10 ± 8.91 vs 5.85 ± 3.37, 均 $P < 0.01$);高氧实验组 VEGF mRNA 表达在 3 d,7 d,14 d 均明显低于对照组(VEGF mRNA: 1.19 ± 0.63 vs 0.78 ± 0.22, 1.52 ± 0.47 vs 0.53 ± 0.18, 1.89 ± 0.81 vs 0.48 ± 0.12, 均 $P < 0.01$)。**结论** VEGF 能促进新生大鼠肺发育,VEGF 蛋白及 VEGF mRNA 表达与新生大鼠肺发育有密切关系。高氧可抑制 VEGF 蛋白及 VEGF mRNA 在新生大鼠肺内的表达,VEGF 在新生鼠肺发育和高氧肺损伤发病机制中起重要作用。

[中国当代儿科杂志,2008,10(2):207-210]

[关键词] 高氧肺损伤;VEGF 蛋白;VEGF mRNA;新生大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)02-0207-04

Expression of VEGF protein and mRNA in neonatal rats with hyperoxia-induced lung injury

HOU Wei, LIU Hai-Yan, LI Dan, ZHOU Jian-Ping, CHEN Xi. Department of Pediatrics, Second Hospital of Xi'an Jiao-tong University, Xi'an 710004, China (Email: houweidj@sina.com)

Abstract: Objective Vascular endothelial growth factor (VEGF) contributes to lung development and recovery of lung structure from lung injury. This study aimed to explore the changes of expression of VEGF protein and mRNA in neonatal rats following hyperoxic lung injury. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley neonatal rats were randomly continually exposed to hyperoxia ($FiO_2 = 95\%$) or to room air ($FiO_2 = 21\%$, control group) 30 minutes after birth. VEGF protein and mRNA expression in the lungs was determined by immunohistochemical methods and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively 3, 7 and 14 days after birth. **Results** VEGF protein and mRNA expression increased with increasing postnatal age in the control group. In the hyperoxia exposure group VEGF protein expression decreased markedly at 7 days (7.79 ± 5.23 vs 12.67 ± 3.82 ; $P < 0.01$) and 14 days of hyperoxia exposure (5.85 ± 3.37 vs 15.10 ± 8.91 ; $P < 0.01$) compared with the controls. VEGF mRNA expression in the hyperoxia exposure group was significantly reduced from 3 days (0.78 ± 0.22 vs 1.19 ± 0.63) through 14 days of hyperoxia exposure (0.48 ± 0.12 vs 1.89 ± 0.81) compared with the controls ($P < 0.01$). **Conclusions** VEGF is associated with lung development in neonatal rats. Hyperoxia exposure can decrease VEGF protein and VEGF mRNA expression in the lungs of neonatal rats. VEGF might be involved in the pathogenesis of hyperoxic lung injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (2):207-210]

Key words: Hyperoxic lung injury; VEGF protein; VEGF mRNA; Neonatal rats

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是与早产、感染及长期吸入高浓度氧有关的严重慢性肺疾病。虽然 BPD 的发病机制不完全清楚,但新生肺暴露在高氧环境中,通过氧毒作用所致的肺损伤是重要的原因之一。研究发现重症 BPD 患儿死亡率约为 30%~40%,存活者常有慢性肺功能

[收稿日期]2007-05-31;[修回日期]2007-07-13
[基金项目]陕西省科技攻关项目(2004K17G18)。
[作者简介]侯伟,男,硕士,副教授。主攻方向:小儿呼吸疾病研究。

与气体交换异常,导致长时间氧疗依赖,从而严重影响营养、代谢和生长发育,因此积极寻找有效地防治高氧所致的慢性肺疾病是当前研究的重要问题^[1]。VEGF 是一种具有广泛活性的缺氧诱导因子,通过作用于血管内皮的 VEGF 受体而发挥促进细胞分裂、增殖、细胞变形及抗细胞凋亡等作用^[2]。近年来研究发现持续性高氧暴露可降低 VEGF 蛋白和 mRNA 表达,患 BPD 的早产儿的肺组织中 VEGF 水平较低,子宫内或早产新生小鼠给予重组 VEGF(rh-VEGF)可预防呼吸窘迫综合征的发生^[3~5]。由此可见,VEGF 与高氧肺损伤有密切的关系,而关于 VEGF 蛋白及其基因表达在新生大鼠高氧肺组织中的变化和作用目前尚不完全清楚。本研究旨在通过建立新生大鼠高氧肺损伤模型,观察高氧对新生大鼠肺组织中 VEGF 蛋白和 VEGF mRNA 表达的影响,为 BPD 的防治提出新的方法。

1 材料和方法

1.1 动物及模型制作

新生足月 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只,雌雄不拘,由西安交通大学医学院动物中心提供。动物模型制作参照 Frank 方法^[6]略加改进,随机分为高氧实验组和空气对照组各 24 只。将实验组新生大鼠生后 30 min 内置于自制氧箱中,持续输入氧气,维持氧箱氧浓度在 95% 以上,用氧浓度测定仪检测氧浓度 (CY-100A 杭州利华科技公司),钠石灰吸收氧箱内 CO₂,保持 CO₂ 浓度 < 5%,用变色硅胶吸除水蒸气,保持湿度在 50% ~ 60%。每天定时开箱 30 min,添加水、饲料及更换垫料,并将高氧组和空气组中的代母鼠互换,以免因高氧引起喂养能力下降。对照组置于室内空气中,具体方法和实验控制因素同高氧实验组。

1.2 标本收集与处理

每组生后 3, 7, 14 d 将各组新生大鼠固定在蜡盘上,快速剪开胸腔,取出双侧肺脏,生理盐水冲洗后,将左肺浸入质量分数为 4% 多聚甲醛中固定,石蜡包埋后常规切片,进行免疫病理检测。右肺下叶肺组织进行 VEGF mRNA 表达检测。

1.3 肺组织 VEGF 蛋白表达的检测

采用免疫组织化学方法,VEGF 一抗由西安中杉生物科技公司提供。主要步骤如下:常规脱蜡、水化,3% 过氧化氢去除内源性过氧化物酶;抗原修复液 37℃ 10 min 修复抗原,正常血清封闭;加一抗 37℃ 2 h,加入生物素化二抗 37℃ 20 min,加入 ABC

复合物,37℃ 孵育 20 min,DAB 显色;苏木素复染、透明、封片,以胞浆染色呈棕黄色的细胞为阳性细胞。结果判定采用 VEGF 免疫组化半定量计数,每只大鼠取 2 ~ 3 张片子,计算每高倍镜视野下计数 100 个细胞中的阳性细胞数,取其平均值。

1.4 肺组织 VEGF mRNA 表达检测

采用逆转录多聚酶链式反应 (RT-PCR) 检测大鼠肺组织中 VEGF mRNA 表达。取右下叶用 trizol 提取纯化组织中总 RNA,取肺组织 50 ~ 100 mg,匀浆器制成匀浆,匀浆组织中加入 1 mL trizol,室温静置 15 min,加入 200 μ L 氯仿,混匀抽提,冰上放置 20 min,12 000 r/min 离心 15 min,取上层水相,与等体积异丙醇混匀,冰上静置 20 min,12 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,用 1 mL 75% 乙醇悬浮沉淀,12 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,管壁残留乙醇于超净台中充分挥发,30 μ L 灭菌水溶解沉淀。取 8 μ L 总 RNA 模板,加 1 μ L Olig dT,70℃ 加热 10 min,冰浴 10 min。逆转录的总反应体积 25 μ L,含总 RNA 8 μ L,42℃ 逆转录 40 min。PCR 扩增,每样品设两个反应,一个使用 VEGF 引物,另一个使用 β -actin 引。VEGF 引物:上游引物 5'-GCTCTCTTGGGTGCACTGGA-3',下游引物 5'-CACGCCTTGCTTGTCACA-3'; β -actin 引物:上游引物 5'-GGATTCCTATGTGGGGGACG-3',下游引物 5'-GGAACCGCTCATTGCCAATG-3'。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳,5 μ L/孔 加样,对结果进行灰度扫描,每个样品的 VEGF 灰度值与其自身的 β -actin 灰度值的比值作为该样品中 VEGF 的相对表达量 (VEGF/ β -actin),通过样品与样品之间相对表达量的比较,确定不同样品中 VEGF 基因的表达水平。

1.5 统计学分析

所有数据均采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS10.0 软件分析处理,同组观察时间点采用配对 *t* 检验进行组间差异性,组间差异性比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。

2 结果

2.1 肺组织 VEGF 蛋白表达的动态变化

空气对照组 VEGF 主要在肺组织肺泡间隔表达,在血管平滑肌和支气管上皮也有阳性表达,生后 3 d 肺组织 VEGF 表达增加以远端气道上皮表达增加为著,7 d 以后肺泡上皮和肺泡间隔增多,14 d 明显增加,与生后 3 d 组之间比较差异有显著性 (图 1A)。高氧实验组 VEGF 蛋白表达水平在生后 7 d

开始下降, 生后 14 d 进一步下降, 与空气对照组同时间比较差异有显著性(图 1B, 表 1)。

表 1 VEGF 阳性细胞在新生大鼠肺组织表达 ($\bar{x} \pm s, \%$)

日龄(d)	鼠数	空气对照组	高氧实验组
3	8	9.82 ± 3.48	8.91 ± 4.56
7	8	12.67 ± 3.82 ^b	7.79 ± 5.23 ^{a, b}
14	8	15.10 ± 8.91 ^c	5.85 ± 3.37 ^{a, c}

a: 为与空气对照组比较 $P < 0.01$; b: 为 7 d 组与同组别的 3 d 组比较 $P < 0.05$; c: 为 14 d 组与同组别的 3 d 组比较 $P < 0.01$ 。

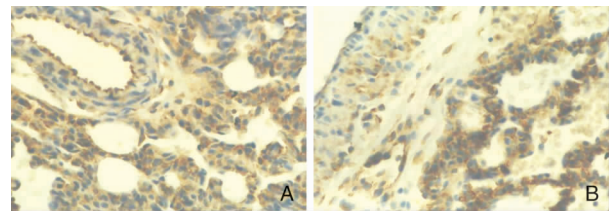


图 1 两组 14 d 肺组织 VEGF 蛋白表达(免疫组化 × 400) A: 空气对照组; B: 高氧实验组。高氧实验组 VEGF 蛋白表达明显减少。

2.2 肺组织 VEGF mRNA 表达变化

与空气对照组相比, 高氧实验组在 3, 7, 14 d 肺组织 VEGF mRNA 表达均明显降低, 与同组的空气对照组比较差异有显著性($P < 0.01$); 生后 7 d 高氧实验组 VEGF mRNA 表达水平与 3 d 组比较明显降低($P < 0.01$), 而在生后 14 d 高氧实验组 VEGF mRNA 表达水较 7 d 组降低, 但差异无显著性(表 2, 图 2)。

表 2 VEGF mRNA 在新生大鼠肺组织表达 (VEGF/ β -actin)

日龄(d)	鼠数	空气对照组	高氧实验组
3	8	1.19 ± 0.63	0.78 ± 0.22 ^a
7	8	1.52 ± 0.47 ^c	0.53 ± 0.18 ^{a, b}
14	8	1.89 ± 0.81 ^d	0.48 ± 0.12 ^a

a: 与空气对照组比较 $P < 0.01$; b: 与同组别的 3 d 组比较 $P < 0.01$; c: 与同组别的 3 d 组比较 $P < 0.01$; d: 与同组别的 7 d 组比较 $P < 0.01$ 。

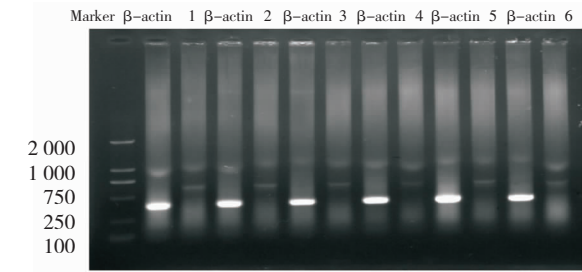


图 2 新生大鼠肺组织 VEGF mRNA 表达水平
注: marker 标志物为华美 D2000, 自上而下依次为: 2000, 1000, 750, 500, 250, 100 bp; 每个实验样本 2 泳道, 分别为: β -actin pcr 产物, VEGF PCR 扩增产物。1 ~ 5 分别代表高氧对照组 7 d 时 VEGF mRNA 表达; 6 代表空气对照组 7 d 时 VEGF mRNA 表达。

3 讨论

VEGF 及其受体在正常机体内分布较广泛, 其中在肺内 VEGF 表达水平较高, 显示其不仅在肺脏的生长发育中起重要作用, 在维持肺的正常生理功能及抗损伤修复中有重要意义^[7]。同时, VEGF 在肺泡 II 型上皮细胞(alveolar type II epithelial cell, AEC-II)的增殖和成熟中也起十分重要的作用, 在研究 VEGF 对体外培养的胎肺 AEC-II 产生肺表面活性物质(surfactent protein, SP)的影响时发现, 加入 VEGF 100 ng/mL 在培养液中可使 SP-B 的产生增加 4 倍, 显示 VEGF 在肺损伤修复中可能通过影响 SP-B 而发挥重要作用。研究发现在肺发育的关键时期长时间吸入高浓度氧会引起肺组织损伤, 机体脱离高氧环境后, 肺损伤会逐渐减轻, 进行自身修复, 但在大多数情况下, 已经受损的肺组织并不能完全恢复至正常状态, 严重者最终可发展成 BPD。研究发现高氧肺损伤可降低新生兔肺 VEGF 的基因表达, 认为高氧损伤了肺毛细血管的发育, VEGF 在损伤后对微血管内皮的修复中起调节作用^[8]。本文通过建立新生鼠高氧肺损伤模型, 对肺组织 VEGF 蛋白表达进行动态观察, 结果发现新生大鼠生后随着肺的发育 VEGF 蛋白表达逐渐增加, 显示 VEGF 与新生肺发育有密切关系。在高氧暴露 3 d 的新生鼠 VEGF 蛋白表达已经出现减少, 在 7 d 时 VEGF 蛋白明显减少, 14 d 时降低更为明显, VEGF 蛋白表达减少与高氧暴露持续时间长短有关, 与文献报道一致^[3], 推测 VEGF 蛋白表达减少, 可能会导致 VEGF 与血管内皮细胞上的受体结合减少, 从而导致肺微血管发育障碍, 使肺生长发育受阻。

血管内皮损伤是高氧肺损伤的特征性改变, 上皮细胞特异性有丝分裂剂 VEGF 是血管生成的重要介质, 在肺损伤恢复中血管内皮细胞再生起重要作用。研究发现 VEGF 在高氧肺损伤修复中可增强 AEC-II 增殖^[9]。在胎儿后期和新生儿早期肺泡的发育有赖于肺泡细胞(AEC)相邻的内皮细胞的增殖、血管生成和毛细血管的排列。正常肺发育和肺末端上皮细胞 VEGF mRNA 的表达呈平行增加^[10]由 AEC 衍生的各类细胞中均有 VEGF mRNA 的表达, 特别是在肺微血管相邻的上皮细胞中, 推测 VEGF 可能是通过 AEC-II 发挥作用, Maniscalco 等^[11]在研究中应用 VEGF 干预 AEC-II 的分化时发现 SP-A mRNA, SP-ACmRNA 和 SP-A 蛋白表达均增加, 同时能改善 ACE 的功能。目前关于新生大鼠高

氧肺损伤 VEGF mRNA 表达变化的研究尚少,关于 VEGF mRNA 表达变化在新生大鼠高氧肺损伤发病中的作用尚不完全清楚。本研究显示空气对照组新生大鼠随鼠龄的增加肺组织中 VEGF mRNA 表达逐渐增多,显示 VEGF mRNA 表达在新生鼠肺发育中起重要作用。高氧试验组肺组织中 VEGF mRNA 表达随高氧暴露持续时间的增加持续减少,表明 VEGF mRNA 表达的减少参与肺损伤的过程。提示 VEGF mRNA 表达的降低降低可导致血管内皮细胞损伤,但其确切发病机制仍需进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Ambalavanan N, Carlo WA. Bronchopulmonary dysplasia: new insights[J]. Clin Perinatol, 2004, 31(3):613-628.
[2] Lassus P, Turanlahti M, Heikkilä 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, 164(10):1981-1987.
[3] 刘博,刘雪燕,李娟,王伟,魏克伦.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[J].中国当代儿科杂志,2005,7(5):477-450.
[4] Asikainen TM, Ahmad A, Schneider BK, White CW. Effect of preterm birth on hypoxia-inducible factors and vascular endothelial

growth factor in primate lungs[J]. Pediatr Pulmonol, 2005, 40(6):538-546.
[5] Kunig AM, Balasubramaniam V, Markham NE, Morgan D, Montgomery G, Grover TR, et al. Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(4):L529-535.
[6] Frank L. Protective effect of keratinocyte growth factor against lung abnormalities associated with hyperoxia in prematurely born rats[J]. Biol Neonate, 2003, 83(4):263-272.
[7] 郑劲龙,冉丕鑫.血管内皮生长因子与烟雾暴露所致大鼠肺气肿发病关系的研究[J].中华结核和呼吸杂志,2003,26(11):671-674.
[8] Brown KR, England KM, Goss KL, Snyder JM, Acarregui MJ. VEGF induces airway epithelial cell proliferation in human fetal lung in vitro[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(4):L1001-1010.
[9] Maniscalco WM, Watkins RH, Finkelstein JN, Campbell MH. Vascular endothelial growth factor mRNA increases in alveolar epithelial cells during recovery from oxygen injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995(13):377-386.
[10] Cruz A, Vazquez L, Velez M, Perez-Gil J. Effect of pulmonary surfactant protein SP-B on the micro- and nanostructure of phospholipid films[J]. Biophys J, 2004, 86(1 Pt 1):308-320.
[11] 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):L811-823.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

中华医学会第十届全国儿科危重症研讨会征文通知

中华医学会儿科分会急救学组、中华医学会急诊分会儿科学组及《中国小儿急救医学》杂志将于2008年9月在河南郑州召开“中华医学会第十届全国儿科危重症研讨会”。

1. 征文内容:儿科各种急、危重症诊断治疗,包括诊疗进展,各种急性中毒,院前急救,重症监护新技术、新设备应用,急救新药,急救护理,急诊、重症监护相关基础、临床、流行病学研究及急救管理与继续教育。
2. 征文要求:(1)凡未在全国性杂志发表的论文均可投寄,优秀论文将优先在《中国小儿急救医学》杂志发表。(2)请寄500~1000字结构式摘要一份,A4纸打印,并附电子文档,论著请附全文。自留底稿,恕不退稿。(3)首页请写清论文题目、作者姓名、工作单位、详细地址、邮编、联系电话及Email邮箱。(4)每篇论文需交审稿费20元。
3. 投稿方式:(1)邮寄:将稿件及电子文档寄至沈阳市和平区三好街36号《中国小儿急救医学》杂志编辑部吴繁收,邮编110004(联系电话:024-23926295),信封上请注明“危重症会议征文”字样;(2)电子邮件:发Email至xjjyxzzh@yahoo.com.cn,邮件主题请注明“危重症会议征文”字样。
4. 会议将安排专家专题讲座。
5. 会议前将举办小儿急救、重症监护学习班。
6. 截稿日期:2008年6月30日(以当地邮戳为准),具体会议时间、地址等另行通知。

中华医学会儿科分会急救学组
中华医学会急诊分会儿科学组
中华医学会中国小儿急救医学编辑委员会