

论著 · 实验研究

高浓度氧对新生大鼠肺血管内皮生长因子及其受体表达的影响

冯海燕, 陆爱珍, 张晓波, 王立波, 陈超

(复旦大学附属儿科医院, 上海 201102)

[摘要] **目的** 研究持续吸入75%氧对新生大鼠肺血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体(VEGFR1和VEGFR2)表达的影响,探讨较高浓度吸氧对肺血管发育的影响及与支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)的关系。**方法** 新生足月Sprague-Dawley大鼠48只,随机分为对照组和实验组。实验组生后12 h开始持续吸入75%氧气。分别于实验开始后的7 d、14 d和21 d处死留取肺组织标本,苏木精-伊红染色观察病理改变,免疫组化检测VEGF及其受体蛋白表达,RT-PCR检测其mRNA表达。**结果** 实验组大鼠肺组织结构发生类似“新型”BPD的病理改变。75%氧暴露21 d时,VEGF(10.9 ± 2.7 vs 30.8 ± 6.4)、VEGFR1(5.4 ± 1.4 vs 15.6 ± 3.4)和VEGFR2(11.3 ± 2.6 vs 21.7 ± 4.5)的蛋白表达均较对照组减少($P < 0.05$);VEGF(1.6 vs 3.3)、VEGFR1(0.4 vs 6.6)及VEGFR2(0.5 vs 4.9)的mRNA表达均较对照组减少($P < 0.05$)。**结论** 在新生大鼠中,长时间吸入较高浓度氧可能通过抑制肺血管发育导致BPD的发生。[中国当代儿科杂志,2009,11(11):927-930]

[关键词] 血管内皮生长因子;受体,血管内皮生长因子;高浓度氧;新生大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)11-0927-04

Effects of prolonged exposure of high concentration of oxygen on expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in neonatal rat lungs

FENG Hai-Yan, LU Ai-Zhen, ZHANG Xiao-Bo, WANG Li-Bo, CHEN Chao. Children's Hospital of Fudan University, Shanghai 201102, China (Chen C, Email: chen6010@163.com)

Abstract: Objective To study the effects of prolonged 75% oxygen exposure on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGFR1 and VEGFR2) in the neonatal rat lungs and to elucidate the effects of prolonged exposure of high concentration of oxygen on lung vascular development and its relationship with bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rat pups were randomly exposed to air (control group) and 75% oxygen (experimental group) 12 hrs after birth. The rats were sacrificed 7, 14 and 21 days after exposure and their lungs were sampled. The lung sections were stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation. Expression of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 protein and mRNA was detected by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** After being exposed to 75% oxygen for 21 days, lung tissues had pathological changes as “new” BPD. Expressions of VEGF protein (10.9 ± 2.7 vs 30.8 ± 6.4), VEGFR1 protein (5.4 ± 1.4 vs 15.6 ± 3.4) and VEGFR2 protein (11.3 ± 2.6 vs 21.7 ± 4.5) on day 21 in the experimental group decreased significantly as compared with the control group ($P < 0.05$). The expression of VEGF mRNA (1.6 vs 3.3), VEGFR1 mRNA (0.4 vs 6.6) and VEGFR2 mRNA (0.5 vs 4.9) on day 21 in the experimental group also decreased significantly as compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Prolonged exposure of high concentration of oxygen may cause BPD possibly by inhibiting lung vascular development in neonatal rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (11):927-930]

Key words: Vascular endothelial growth factor; Receptors, vascular endothelial growth factor; High concentration of oxygen; Neonatal rats

肺血管发育障碍与新生儿支气管肺发育不良
(bronchopulmonary dysplasia, BPD)密切相关。肺血
管发育过程受多种生长因子调控,其中血管内皮生

长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是
一种特异作用于血管内皮细胞的有丝分裂原,通过
受体(VEGFR1和VEGFR2)介导,可调节血管内皮

[收稿日期]2009-03-31;[修回日期]2009-08-28
[作者简介]冯海燕,女,硕士,主治医师。主攻方向:小儿呼吸系统疾病。
[通讯作者]陈超,男,教授,复旦大学附属儿科医院,邮编:201102。

细胞增殖、迁移,增加血管通透性,调节肺血管发育,在建立正常肺形态和功能发挥重要作用。长期吸入高浓度氧已被认为是 BPD 发生的最常见原因和最危险因素,以往报道常用 85% 氧制作高氧肺损伤模型,但临床上长时间吸入如此高浓度氧还是比较少,较高浓度吸氧相对常见。因此,本实验设计了一个相对较高的氧浓度(FiO_2 75%),旨在研究较高浓度持续吸氧对新生大鼠肺 VEGF 及其受体表达的影响,探讨较高浓度吸氧对肺血管发育的影响及与 BPD 的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

新生足月 Sprague-Dawley (SD)大鼠(由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供)48 只,雌、雄不拘,随机分为对照组($n=24$)和实验组($n=24$)。对照组生后 7 d、14 d 和 21 d 的体重分别为 17.2 ± 0.7 g、 27.7 ± 1.6 g 和 53.4 ± 1.6 g,实验组生后 7 d、14 d 和 21 d 的体重分别为 16.5 ± 1.0 g、 27.6 ± 2.4 g 和 50.4 ± 2.9 g,与对照组相应时间点比较,差异无显著性。

1.2 模型制作

实验组:将新生 SD 大鼠生后 12 h 即置于氧箱中,持续输入氧气,维持吸入氧浓度为 75% (用测氧仪监测), CO_2 浓度 $<0.5\%$ (用钠石灰吸收 CO_2),温度 $25 \sim 27^\circ\text{C}$,湿度 $50\% \sim 70\%$ (用变色硅胶吸除水蒸气),隔天定时开箱 0.5 h,添加水、饲料及更换垫料,并与对照组交换母鼠以避免因为氧中毒致喂养能力下降。对照组:置于室内空气中,具体方法及实验控制因素同实验组。光镜下观察苏木精-伊红染色病理切片,肺组织结构出现 BPD 的病理改变为制模成功。

1.3 标本采集

每组 8 只大鼠,于实验开始后的 7 d、14 d 和 21 d 麻醉后处死。结扎右支气管,取出右肺下叶,速冻于液氮中,随后置 -70°C 保存用于 PCR 检测。通过左支气管注入 4% 多聚甲醛至肺尖膨胀,取左肺置 4% 多聚甲醛液中固定过夜,常规石蜡包埋切片,连续 $5\text{ }\mu\text{m}$ 切片用于苏木精-伊红染色和免疫组化检测。

1.4 免疫组化检测 VEGF 及其受体蛋白表达

一抗:兔抗 VEGF 多克隆抗体、兔抗 VEGFR1 多克隆抗体及兔抗 VEGFR2 多克隆抗体均购于美国 Lab Vision 公司。石蜡切片常规脱蜡至水,抗原修复,3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶,正常山羊血

清封闭,滴加一抗,4℃ 过夜,0.01 mol/L PBS 充分洗涤后加生物素标记的羊抗兔 IgG 抗体,37℃ 孵育 30 min,加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素 37℃ 30 min,DAB 显色,复染封片,镜下观察。结果判定以细胞浆内有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。VEGF、VEGFR1 及 VEGFR2 的抗体稀释度均为 1:100。每张切片于 Leica 显微镜下($\times 200$)随机选取 4 个视野拍照,用 Image-pro plus 6.0 图片分析软件分析,测定棕黄色颗粒的平均累积光密度(integrated optical density,IOD)。

1.5 RT-PCR 检测 mRNA 表达

采用 Trizol(美国 Invitrogen 公司产品)一步法提取冰冻肺组织总 RNA,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 18S RNA 和 28S RNA 证实其完整性后,用 MMLV 逆转录酶逆转录为 cDNA,以此为模板进行实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR)。引物(中国上海生物工程有限公司合成)设计参考国内外文献资料,并采用计算机辅助设计,引物序列和扩增产物长度见表 1。PCR 反应条件:95℃ 5 min,95℃ 30 s,退火 30 s,72℃ 30 s,反应共 40 个循环。Real-time PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 相对定量方法处理^[1]。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析,定量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析并采用 LSD 方法进行两两比较;两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

表 1 PCR 引物序列及扩增产物片段长度

基因	引物序列	产物大小(bp)
VEGF	上游 5'-TCTTCAAGCCGTCCTGTG-3'	228
	下游 5'-CCTTTCCTCGAACTGATTTT-3'	
VEGFR1	上游 5'-CTCGTTAGAGATTGGAAGCGC-3'	107
	下游 5'-GCAGGGACACCTCTAGCTTGAC-3'	
VEGFR2	上游 5'-TTTTGGTAGCGGGATGA-3'	219
	下游 5'-ATGGGATTGCTGAGGATGA-3'	
β -actin	上游 5'-AACCTAAGGCCAACAGTGAAAAG-3'	231
	下游 5'-TCATGAGGTAGTCTGTGAGCT-3'	

2 结果

2.1 模型的建立

苏木精-伊红染色发现,对照组自生后 7 d 至生后 21 d 肺组织发育逐渐成熟,肺泡结构逐渐规整,大小较均匀,肺泡间隔逐渐变薄。而实验组随着大鼠日龄增加肺泡逐渐出现融合,肺泡大小不均,肺泡数目明显减少,肺泡间隔变厚,肺组织结构发生类似“新型”BPD 的病理改变(图 1)。

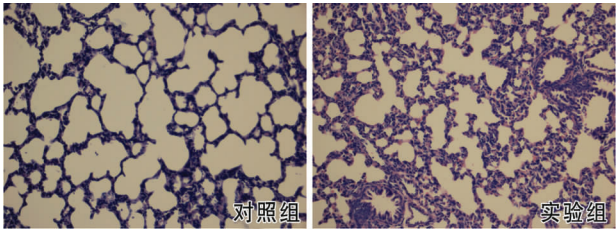


图1 生后21 d的肺组织病理改变(苏木精-伊红染色×200) 对照组可见肺泡结构规整,大小均匀,肺泡间隔变薄,实验组可见肺泡结构紊乱,大小不均,肺泡数目明显减少,肺泡间隔变厚。

2.2 75%氧对肺 VEGF、VEGFR1 及 VEGFR2 蛋白表达的影响

对照组 VEGF 主要在肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞表达,支气管上皮细胞、血管平滑肌细胞和肺泡间隔内也可见表达,自生后7 d至21 d逐渐升高($F=17.7, P=0.0$)。实验组 VEGF 自生后7~21 d先升高后降低($F=20.7, P=0.0$),21 d时肺部 VEGF 表达明显减少,与对照组相比,差异有显著性($P<0.01$)(图2A、B,表2)。

对照组 VEGFR1 主要在支气管上皮细胞及支气管上皮下的微血管内皮细胞表达,自生后7 d至21 d无明显变化。实验组21 d时肺部 VEGFR1 表达减少($F=46.23, P=0.00$),与对照组比较,差异有显著性($P<0.01$)(图2C、D,表2)。

对照组 VEGFR2 的表达部位与 VEGFR1 相同,自生后7 d至21 d也无明显变化。实验组21 d时

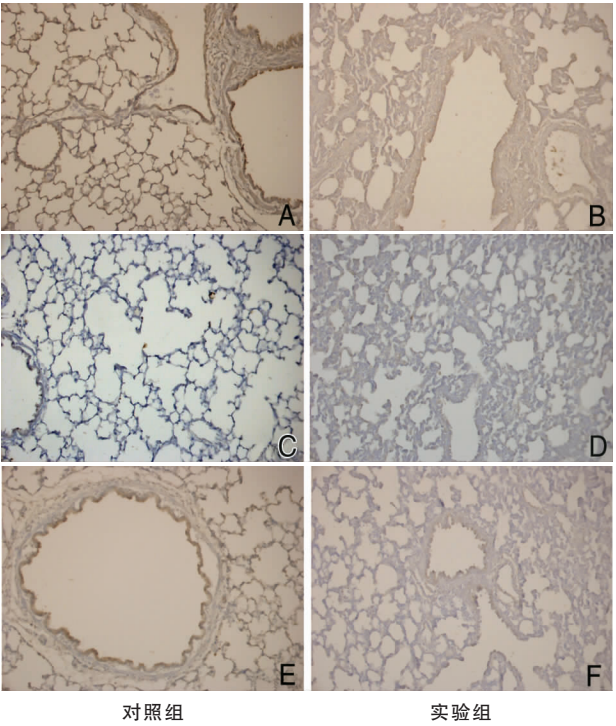


图2 生后21 d肺组织 VEGF 及其受体的表达(DAB×200) A、B为生后21 d肺组织 VEGF 的表达,VEGF 阳性细胞呈棕黄色,实验组阳性细胞较对照组明显减少; C、D为生后21 d肺组织 VEGFR1 的表达,VEGFR1 阳性细胞呈棕黄色,实验组阳性细胞较对照组明显减少; E、F为生后21 d肺组织 VEGFR2 的表达,VEGFR2 阳性细胞呈棕黄色,实验组阳性细胞较对照组明显减少。

肺部 VEGFR2 表达减少($F=4.67, P=0.02$),与对照组比较,差异有显著性($P<0.01$)(图2E、F,表2)。

表2 两组大鼠肺组织 VEGF 及其受体蛋白的变化										$(\bar{x} \pm s, n=8)$	
组别	VEGF			VEGFR1			VEGFR2				
	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d		
对照组	14.4±2.8	22.0±6.1	30.8±6.4	14.5±2.2	14.1±1.8	15.6±3.4	21.4±3.9	22.5±4.0	21.7±4.5		
实验组	13.3±2.6	20.4±3.8	10.9±2.7 ^a	14.0±2.7	14.9±2.2	5.4±1.4 ^b	20.7±7.3	21.7±10.4	11.3±2.6 ^c		

与对照组比较, a: $t=8.00, P<0.01$; b: $t=7.90, P<0.01$; c: $t=5.64, P<0.01$

2.3 75%氧对肺 VEGF、VEGFR1 及 VEGFR2 mRNA 表达的影响

对照组 VEGF、VEGFR1 及 VEGFR2 mRNA 表达自生后7 d至21 d呈逐渐升高的趋势,生后21 d时表达较生后7 d和14 d时明显增高(F 值分别为10.70、8.99和13.71, P 值均为0.00)。实验组21 d时 VEGF、VEGFR1 及 VEGFR2 mRNA 表达均较对照组减少($P<0.01$)(表3)。

表3 两组大鼠肺组织 VEGF 及其受体 mRNA 的变化										$(\text{倍数})(n=8)$	
组别	VEGF			VEGFR1			VEGFR2				
	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d		
对照组	1.0	1.2	3.3	1.0	1.0	6.6	1.0	1.2	4.9		
实验组	1.4	1.1	1.6 ^a	1.6	0.9	0.4 ^b	2.1	1.1	0.5 ^c		

与对照组比较, a: $t=-2.30, P<0.05$; b: $t=-7.50, P<0.01$; c: $t=-5.91, P<0.01$

3 讨论

自 Warner 等于 1998 年建立了新生鼠持续高氧暴露的 BPD 模型后,国内外多采用非常高的氧浓度($\text{FiO}_2 > 85\%$),但这么高的氧浓度在临床应用很少,所以本研究设计了一个相对较高的氧浓度($\text{FiO}_2 75\%$)。本研究发现,新生大鼠持续吸入 75% 氧 21 d 时,肺组织结构发生类似“新型”BPD 的病理改变,VEGF 及其受体的蛋白和 mRNA 表达下降,提示较高浓度氧可能通过抑制肺血管的发育导致 BPD 的发生。

VEGF 是近年研究发现的一种特异地作用于血管内皮细胞的生长因子,具有促进血管内皮细胞增殖、分化、迁移,促进血管生成,并具有增加血管通透性和维持血管正常状态和完整性的作用。VEGF 的生物学效应是通过膜受体介导实现的。目前发现它有 3 种受体,分别为 Flt-1 (VEGFR1)、Flk-1/KDR (VEGFR2)和 Flt-4 (VEGFR3)。VEGFR1 和 VEGFR2 主要在血管内皮细胞表达,而 VEGFR3 特异表达于淋巴细胞^[2]。VEGF 对内皮细胞的增殖、分化、迁移作用由 VEGFR2 介导,它还能调节血管通透性。有研究认为 VEGFR1 在血管形成中具有双重作用,生理状态下无调节血管生成作用,而在病理状态下起到调节血管生成的作用。有人认为,VEGFR1 与脉管早期分化、血管网的形成有关。生后肺发育中,VEGF 及其受体发挥着重要作用^[3]。

近年来,由于产前激素、生后肺表面活性物质的应用和适用于新生儿的呼吸机及通气策略的出现,Northway 等描述的经典 BPD 现在较少见。“新型”BPD 主要的病理变化是肺泡数减少,即肺泡发育不良,因此,许多影响肺泡发育进程的因素都可能导致“新型”BPD 的发生^[4]。长期吸入高浓度氧已被认为是 BPD 发生的最常见原因和最危险因素。以往有关高氧引起肺损伤的研究多集中于肺泡损伤方面,近年来,有人提出 BPD 发病的“血管假说”^[5]:利用抑制血管生成的药物(如烟曲霉素)或 VEGF 受体拮抗剂 Su-5416 阻止新生鼠肺部微血管发育,同时也使肺泡数目显著减少,表明肺微血管正常发育是肺泡化的必要条件,生长发育期血管生成受阻会导致肺发育不良。国内有研究表明,持续高氧暴露使新生大鼠肺 VEGF 及其受体蛋白表达下降^[6~8]。Hosford 等^[3]研究发现,高氧使新生大鼠肺 VEGF、VEGFR1、VEGFR2 的蛋白和 mRNA 表达下

降,推测 VEGF 可能参与了高氧介导的肺损伤,其机制可能是高氧通过阻断低氧介导转录因子-2 α (HIF-2 α)-VEGF-VEGFR 系统的信号转导,使肺泡化受阻。本研究发现,较高浓度氧也可能通过抑制肺血管的发育导致 BPD 的发生。不过,与高浓度氧在暴露 10 d 左右就产生作用相比^[6~8],较高浓度氧产生作用的时间较晚。

Kunig 等^[9]用人类重组 VEGF 防治高氧暴露的 BPD 大鼠,发现治疗组大鼠的肺泡化较对照组明显改善。Tang 等^[10]研究发现吸入一氧化氮使接受 VEGF 受体拮抗剂 Su-5416 的新生大鼠的肺发育得到改善。针对 VEGF 及其受体的干预治疗,也许将成为新型 BPD 防治研究的新方向。

[参 考 文 献]

[1] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.

[2] 黄波, 罗小平. 血管内皮生长因子及其受体在肺发育及新生儿肺损伤中的作用[J]. 中华围产医学杂志, 2005, 8(3): 212-214.

[3] Hosford GE, Olson DM. Effects of hyperoxia on VEGF, its receptors, and HIF-2 α in the newborn rat lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(1):L161-168.

[4] Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia[J]. Pediatr Res, 2005, 57(5 Pt 2): 38R-46R.

[5] Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: “a vascular hypothesis”[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(10 Pt 1):1755-1756.

[6] 胡月, 薛辛东, 富建华, 刘春英. 高氧对新生鼠肺组织 VEGF 蛋白表达及肺血管内皮细胞超微结构的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2006, 14(2):20-21.

[7] 张素玲, 薛辛东. 高氧对新生大鼠肺血管内皮生长因子及其受体表达的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005, 13(3): 67-68.

[8] 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):447-450.

[9] 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.

[10] Tang JR, Seedorf G, Balasubramaniam V, Maxey A, Markham N, Abman SH. Early inhaled nitric oxide treatment decreases apoptosis of endothelial cells in neonatal rat lungs after vascular endothelial growth factor inhibition [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(5):L1271-L1280.

(本文编辑:王庆红)