

· 论 著 ·

血管内皮生长因子在门静脉高压大鼠腹水形成中的作用*

赵永忠¹, 漆志平², 周英琼³, 霍群⁴, 韦铮武¹, 侯巧燕³

(桂林医学院: 1. 附属医院消化内科; 2. 硕士研究生; 3. 附属医院病理科, 541001; 4. 生化教研室 541004)

摘要:目的 探讨血管内皮生长因子(VEGF)在门静脉高压大鼠腹水形成中的作用。方法 将雄性 SD 大鼠随机分为 3 组: 门静脉结扎(PVL)组 32 只, 假手术(SO)组 16 只, 门静脉结扎联合沙利度安治疗(PVL-T)组 8 只。为诱导腹水形成, 于手术后第 1、3、5、7 天分批给予每只大鼠腹腔注射 33.33% 葡萄糖溶液 1 mL, 30 min 后收集腹水标本并测总量, 同时采用 ELISA 检测腹水中 VEGF 含量; 留取肠系膜组织作 VEGF 免疫组化染色和实时 RT-PCR 检测。结果 术后第 1、3 天 PVL 组大鼠腹水总量和 VEGF 含量明显大于 SO 组($P < 0.05$), 术后第 5、7 天 PVL 组大鼠腹水总量和 VEGF 含量与 SO 组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 术后第 3 天 PVL-T 组腹水总量明显低于 PVL 组[分别为(3.4 ± 0.27) mL、(4.92 ± 1.53) mL, $P < 0.05$]。组织学检查 PVL 组肠系膜可见较多扩张血管。PVL 组 VEGF 呈强阳性表达, 而 SO 组 VEGF 则呈弱阳性表达, 且表达部位多为血管内皮细胞胞浆; PVL-T 组肠系膜 VEGF mRNA 表达明显降低($P < 0.05$)。结论 门静脉高压可增加由于渗透性改变所致大鼠腹水形成, VEGF 高表达可能与大鼠腹水形成有关。

关键词: 血管内皮生长因子; 门静脉高压; 腹水; 肠系膜; 沙利度安

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.007

中图分类号: R442.502

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)16-2105-03

Role of vascular endothelial growth factor on ascites formation in portal hypertensive rats*

ZHAO Yong-zhong¹, QI Zhi-ping², ZHOU Ying-qiong³, et al.

(1. Department of Gastroenterology; 2. Master; 3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, China; 4. Department of Biochemistry Teaching and Research, Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

Abstract: Objective To study the role of vascular endothelial growth factor on ascites formation in portal hypertensive rats.

Methods Male S-D Rats were randomly divided into three groups: portal vein ligation (PVL) group with 32 rats, sham-operated (SO) group with 16 rats, portal vein ligation combined with thalidomide treatment (PVL-T) group with 8 rats. To induce the formation of ascites, 1.0 mL of 33.33% glucose was injected into abdomen of every rats in 1, 3, 5, 7 days after operation. Ascites and mesentery was collected 30 minutes after injection of glucose solution. VEGF levels in ascites were measured by ELISA. Expression of VEGF in tissues was studied using real-time RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** 1 day, 3 days after operation, the amount of ascites and VEGF level in PVL rats was significantly higher than that in SO rats ($P < 0.05$), whereas, 5 days, 7 days after operation, the amount of ascites and VEGF concentration had no significant difference between the PVL group and the SO group ($P > 0.05$). 3 days after operation, the amount of ascites in PVL-T group was significantly lower than that in PVL group (3.4 ± 0.27 mL vs 4.92 ± 1.53 mL, $P < 0.05$). Histological results showed that Many dilated collateral veins were recognized in the mesentery of PPVL rats. The endothelium of the veins was immunohistochemically strong positive for anti-VEGF in PVL rats. Real-time RT-PCR results also showed that VEGF-mRNA expression of mesentery in PVL-T group was significantly lower than that in PVL group ($P < 0.05$). **Conclusion** Portal hypertension increases ascites formation which is caused by a difference of osmolality. Increase expression of VEGF may be associated with ascites formation in portal hypertensive rats. Suppression of VEGF activity may be a new strategy for treatment of refractory ascites in cirrhotic patients.

Key words: vascular endothelial growth factor; portal hypertensive; ascites; mesenteric; thalidomide

腹水是肝硬化患者最突出的临床表现, 同时也是提示肝硬化患者预后不良的因素之一。门静脉高压、低清蛋白血症及肾功能不全常是引起肝硬化患者腹水形成的主要原因。新近研究表明, 门静脉高压在肝硬化腹水形成中起主导作用^[1]。然而门静脉高压导致腹水形成的原因尚未彻底阐明。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前发现的最强的增强血管通透性的物质之一, 又是血管发育、成熟的病理生理过程中最重要的血管生成因子。作者以前的研究表明, VEGF 在门静脉高压大鼠模型中胃组织的表达是增高的^[2]。本研究中作者利用渗透性改变复制门静脉高压大鼠腹

水模型, 同时进一步探讨门静脉高压状态下 VEGF 与腹水形成的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 56 只成年雄性 SD 大鼠, 由日本福冈大学医学部实验动物中心提供, 体质量 220~240 g。随机分为 3 组: 门静脉结扎(portal vein ligation, PVL)组 32 只, 假手术(sham-operated, SO)组 16 只, 门静脉结扎联合沙利度安(thalidomide)治疗(PVL-T)组 8 只。

1.2 门静脉高压腹水模型制备 参照参考文献[3]制作门静脉高压模型: 实验前 24 h 禁食, 自由饮水, 予 5% 戊巴比妥钠溶

* 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅资助项目(Z2008295)。

液 0.11~0.13 mL/100 g 体质量腹腔内注射麻醉;开腹后暴露并游离门静脉主干,沿其纵轴外置一根 20 G 钝性针头,于近肝门处用 3-0 丝线结扎门静脉主干及外置针头后拔针,形成肝前性门静脉狭窄;假手术组仅游离门静脉主干而不结扎,其余步骤同 PVL 组。于术后第 1、3、5、7 天分别处死 PVL 组 8 只和 SO 组 4 只。为复制大鼠腹水模型,作者给每只大鼠腹腔注射 33.33% 葡萄糖溶液 1 mL,30 min 后收集腹水和肠系膜组织标本进行 VEGF 测定。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 收集腹水总量与腹水中 VEGF 含量测定 麻醉大鼠后开腹,收集所得腹水减去注入的葡萄糖 1 mL 即为腹水总量。采用 ELISA 法测定腹水中 VEGF 含量,严格按试剂盒说明书操作(VEGF 试剂盒购自美国 R&D 公司)。

1.3.2 门静脉压力测定 采用与造模相同的方法打开腹腔,稳定 10 min 后用 20 G 套管针穿刺肠系膜上静脉近端,退出针芯并将套管送至门静脉结扎远端,将该处所测得的压力代表门静脉压力;SO 组因无粘连可直接穿刺门静脉测压,套管针另一端接压力传感器(型号为 TSD104A),传感器将采集到的压力信号转换成数字信号后输入计算机,采用 MP-2100 型多道生理记录仪测定门静脉压力(美国 BIOPAC 公司制造),单位以 mm Hg 表示。

1.3.3 组织学检查 处死大鼠后剪取少许肠系膜组织,经 10% 中性福尔马林溶液固定后,常规石蜡包埋、切片(约 4 μ m),HE 染色,光镜下观察肠系膜组织学改变。

1.3.4 肠系膜组织 VEGF 免疫组化染色 处死大鼠后剪取少许肠系膜组织,经 10% 中性福尔马林溶液固定 24 h 后,脱水作石蜡包埋、切片(约 4 μ m),采用免疫组化 SABC 法(兔抗人多克隆 VEGF 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司)检测肠系膜组织中 VEGF 表达情况(严格按试剂盒说明书操作),PBS 代替一抗做阴性对照。

1.3.5 实时 RT-PCR 检测肠系膜组织 VEGF mRNA 表达

1.3.5.1 提取总 RNA 采用 Trizol 裂解抽提法提取术后 3 d 各组大鼠肠系膜组织总 RNA(试剂盒购自美国 Ambion 公司),严格按试剂盒说明书操作。

1.3.5.2 逆转录合成 cDNA 采用 ASTEC 温控系统(Pc818, 日本)进行 cDNA 合成(cDNA 逆转录试剂盒购自美国 A&B 公司),总体积 20 μ L,25 $^{\circ}$ C、10 min,37 $^{\circ}$ C、120 min,85 $^{\circ}$ C、5 s。

1.3.5.3 PCR 扩增 应用 7500Fast 实时荧光定量 PCR 仪(美国 A&B 公司)进行扩增。扩增条件:置 PCR 仪 95 $^{\circ}$ C、20 s,以后 95 $^{\circ}$ C、3 s,62 $^{\circ}$ C、30 s,共 40 循环,34 min 扩增产物片段为 645 bp。采用磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照。VEGF 的上、下游引物和探针分别为:5'-AGTGGTCCCAG-GCTGCAC-3', 5'-TCCATGAACTTCACCACTTCGT-3', 5'-(FAM) ATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAATCA (TAM-RA)-3'。GAPDH 的上、下游引物和探针分别为:5'-TGGGT-GTGAACCACGAGAA-3', 5'-GGCATGGACTGTGGTCAT-GA-3'和 5'-CTGCACCACCACTGCTTAGC-3',其中探针于 5'端标记荧光发光基团 FAM,3'端标记荧光淬灭基团 TAM-RA。通过标准曲线精确计算样品循环阈值(Ct 值)的比值(任意单位)。

1.3.6 沙利度安治疗门静脉高压腹水疗效观测 为阻断 VEGF 活性,PVL-T 组大鼠术后连续 3 d 给予沙利度安(美国 Sigma 公司)腹腔注射(100 mg/kg),术后第 4 天给每只大鼠腹腔注射 33.33% 葡萄糖溶液 1 mL,30 min 后收集腹水和肠系膜组织待检。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 12.0 统计软件处理,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PVL 组与 SO 组大鼠门静脉压力变化 见表 1。

表 1 PVL 组与 SO 组大鼠术后门静脉压力变化比较(mm Hg, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
PVL 组	15.83 \pm 0.86*	16.91 \pm 0.96*	16.73 \pm 1.29*	16.39 \pm 1.62*
SO 组	5.83 \pm 0.51	5.92 \pm 0.76	6.17 \pm 0.89	5.90 \pm 0.68

与 SO 组比较,* : $P < 0.05$ 。

2.2 腹水总量及腹水中 VEGF 含量 术后第 1、3 天 PVL 组与 SO 组大鼠腹水总量及腹水中 VEGF 含量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),而术后第 5、7 天 PVL 组与 SO 组大鼠腹水总量及腹水中 VEGF 含量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、3。

表 2 PVL 组与 SO 组大鼠术后腹水总量比较(mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
PVL 组	4.83 \pm 1.53*	4.92 \pm 1.53*	4.17 \pm 0.29#	3.83 \pm 0.28#
SO 组	3.27 \pm 0.46	3.40 \pm 0.42	3.33 \pm 0.28	3.67 \pm 0.29

与 SO 组比较,* : $P < 0.05$,# : $P > 0.05$ 。

表 3 PVL 组与 SO 组大鼠术后腹水 VEGF 含量比较(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
PVL 组	104.0 \pm 41.2*	226.1 \pm 132.2*	64.6 \pm 2.1#	62.2 \pm 22.9#
SO 组	42.6 \pm 4.1	62.4 \pm 16.7	60.2 \pm 17.9	45.6 \pm 10.2

与 SO 组比较,* : $P < 0.05$,# : $P > 0.05$ 。

2.3 肠系膜组织学改变及 VEGF 免疫组化染色 PVL 组大鼠肠系膜可见毛细血管和小静脉明显扩张、扭曲和变形;而 SO 组缺如,见插图 II 图 1。PVL 组大鼠肠系膜 VEGF 染色呈强阳性,而 SO 组则呈弱阳性,两组均在血管内皮细胞胞浆中表达,见插图 II 图 2。

2.4 肠系膜组织 VEGF mRNA 表达 术后第 3 天 PVL 组大鼠肠系膜组织 VEGF mRNA 表达明显高于 SO 组(分别为 1.32 \pm 0.58、0.43 \pm 0.35, $P < 0.05$);而 PVL-T 组大鼠肠系膜组织 VEGF mRNA 表达明显低于 PVL 组(分别为 0.28 \pm 0.08、1.32 \pm 0.58, $P < 0.05$)。

2.5 沙利度安腹腔注射后腹水改变 连续注射 3 d 沙利度安后,PVL-T 组大鼠腹水总量明显小于 PVL 组[分别为(3.4 \pm 0.27)mL、(4.92 \pm 1.53)mL, $P < 0.05$]。

3 讨论

迄今为止,针对肝硬化患者顽固性腹水的治疗仍缺乏有效措施。再者缺乏复制肝硬化腹水的有效动物模型,故作者试图通过部分门静脉结扎复制出大鼠门静脉高压模型后,再采用腹腔注射高渗葡萄糖诱导大鼠腹水形成。

本研究发现,门静脉结扎后第 1、3 天腹水形成总量和腹水中 VEGF 含量均较 SO 组明显增高($P < 0.05$);然而,门静脉结扎后第 5、7 天腹水形成总量和腹水中 VEGF 含量与 SO 组比较,差异无统计学意义。并且门静脉结扎后第 3 天腹水形成总量和腹水中 VEGF 含量达最高值,换言之,腹水 VEGF 含量与腹水形成总量呈正相关,提示 VEGF 增高后可能通过增加血

管通透性促进腹水形成。

免疫组化结果表明, PVL 组大鼠肠系膜 VEGF 染色呈强阳性, 而 SO 组则呈弱阳性, 两组主要在血管内皮细胞胞浆中表达。由于在预实验中, 作者观察到术后第 3 天大鼠腹水形成总量和腹水 VEGF 含量最高, 故只选择术后第 3 天大鼠肠系膜作 VEGF mRNA 分析。结果表明, 术后第 3 天 PVL 组大鼠肠系膜组织 VEGF mRNA 表达明显高于 SO 组, 与 Geerts 等^[4] 研究结果一致。国外学者通过复制门静脉高压小鼠模型也得出了同样结果^[5-6]。业已证实, VEGF 是强有力的血管生成因子, 可以引起血管内皮细胞分裂增生并形成新生血管, 减少细胞凋亡, 促进细胞增生, 对不同器官损伤均起到一定保护作用^[7-8]。但研究发现 VEGF 促血管再生的同时亦可使血管通透性增高, 导致液体渗出增加。

有资料表明, 沙利度安通过降低 TNF_{α} 而下调 VEGF 表达, 通过产生氢氧基等发挥抗血管新生作用^[9-11]。本研究结果显示, 采用沙利度安腹腔注射 3 d 后大鼠腹水形成总量与 PVL 组相比明显减少; 同时肠系膜组织 VEGF mRNA 表达亦明显降低。作者推测沙利度安可能通过下调 VEGF 表达来减少腹水形成。Lopez-Talavera 等^[12] 研究显示沙利度安可改善门静脉高压大鼠高动力内脏循环状态, 并可降低门静脉压力。

综上所述, 门静脉高压可增加由于渗透性改变所致大鼠腹水形成, VEGF 高表达可能与大鼠腹水形成有关, 抑制 VEGF 的活性可能是治疗肝硬化患者顽固性腹水的一种新的治疗策略。

(衷心感谢日本福岡大学医学部消化内科向坂彰太郎教授对本文的大力支持和帮助)

参考文献:

- [1] Moore KP, Aithal GP. Guidelines on the management of ascites in cirrhosis[J]. Gut, 2006, 55(Suppl 6): S1.
- [2] 赵永忠, 王波, 王天才, 等. 血管内皮生长因子在大鼠门脉高压胃病中的作用初探[J], 中华消化杂志, 2003, 23(3): 189.
- [3] Groszmann RJ, Vorobioff J, Riley E. Splanchnic hemodynamics in portal-hypertensive rats: measurement with gamma-labeled microspheres[J]. Am J Physiol, 1982, 242

(2): 156.

- [4] Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, et al. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study[J]. Liver Int, 2006, 26(7): 889.
- [5] Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-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.
- [6] Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, et al. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats[J]. J Hepatol, 2005, 43(1): 98.
- [7] 董晓灵, 王曙光, 张玉君, 等. VEGF 对大鼠 50% 减体积肝脏移植术后肝再生的影响[J], 重庆医学, 2008, 37(9): 959.
- [8] 郎明健, 曾秋棠, 陈波, 等. VEGF 基因转染乳鼠心肌细胞移植治疗心梗的研究[J], 重庆医学, 2005, 34(11): 1669.
- [9] Gupta D, Treon SP, Shima Y, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications[J]. Leukemia, 2001, 15: 1950.
- [10] Sauer H, Gunther J, Hescheler J, et al. Thalidomide inhibits angiogenesis in embryoid bodies by the generation of hydroxyl radicals[J]. Am J Pathol, 2000, 156(1): 151.
- [11] Andr'e L M, Darid RF, Bronya S, et al. Thalidomide and thalidomide analogue inhibit endothelial cell proliferation in vitro[J]. J Neuro Oncol, 1999, 43(2): 109.
- [12] Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, et al. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats[J]. Hepatology, 1996, 23: 1616.

(收稿日期: 2010-01-03 修回日期: 2010-06-17)

(上接第 2104 页)

- [2] Yanagihara K, Seki M, Cheng PW. Lipopolysaccharide induces mucus cell metaplasia in mouse lung[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24(1): 66.
- [3] Young HW, Williams OW, Chandra D, et al. Central role of MUC5AC expression in mucous metaplasia and its regulation by conserved 5' elements[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 37(3): 273.
- [4] Issemann I, Green S. Activation of a number of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. Nature, 1990, 347: 645.
- [5] Lee KS, Park SJ, Kim SR, et al. Modulation of airway remodeling and airway inflammation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma[J]. J Immunol, 2006, 177(8): 5248.
- [6] Wang AC, Dai X, Luu B, et al. Peroxisome proliferators-

activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24: 688.

- [7] Ward JE, Tan X. Peroxisome proliferator activated receptor ligands as regulators of airway inflammation and remodelling in chronic lung disease[J]. PPAR Res, 2007, 2007: 14983.
- [8] Birrel MA, Patel HJ, Mccluskie K, et al. PPAR-gamma agonists as therapy for diseases involving airway neutrophilia[J]. Eur Respir J, 2004, 24: 18.
- [9] Honda K, Marquillies P, Capron M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model[J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 113: 882.

(收稿日期: 2009-12-17 修回日期: 2010-01-15)