

· 基础研究 ·

# VEGF 在大鼠重症急性胰腺炎中的表达及意义<sup>\*</sup>

李 鑫<sup>1</sup>, 刘 静<sup>2</sup>, 王 东<sup>3</sup>

(1. 成都医学院人体解剖学教研室, 成都 610083; 2. 成都医学院附属医院普外科, 成都 610500;  
3. 四川省绵阳市中心医院普外科 621000)

**摘 要:**目的 观察血管内皮生长因子(VEGF)在重症急性胰腺炎(SAP)大鼠胰腺中的动态表达情况和组织病理改变的关系,初步探讨 VEGF 在 SAP 病理机制中的作用。方法 将 36 只 SD 大鼠随机分成假手术组(Sham 组)和 SAP 组各 18 只。5%牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射制备 SAP 模型。每组分别于术后 3、6、12 h 检测各组腹水量、血清淀粉酶的水平,免疫组织化学染色及蛋白印迹法检测胰腺组织 VEGF 的表达水平。结果 SAP 组血清淀粉酶较 Sham 组明显升高( $P<0.05$ );SAP 组的水肿、炎症浸润、出血、坏死情况及 Schmidt 评分较 Sham 组严重( $P<0.01$ );SAP 组大鼠各时间点的胰腺组织 VEGF 的阳性表达水平较 Sham 组明显增加( $P<0.01$ )。结论 VEGF 与 SAP 的病理改变密切相关,可能是胰腺出血坏死的重要机制之一。

**关键词:**重症急性胰腺炎;血管内皮生长因子;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2951-03

## The significance of VEGF expression in the severe acute pancreatitis<sup>\*</sup>

Li Xin<sup>1</sup>, Liu Jing<sup>2</sup>, Wang Dong<sup>3</sup>

(1. Department of Human Anatomy, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610083, China;

2. Department of General Surgery, Chengdu Medical College Hospital, Chengdu, Sichuan 610500, China;

3. Department of General Surgery, Mianyang central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

**Abstract:**Objective To investigate the expression of VEGF in severe acute pancreatitis(SAP), we preliminarily discuss the effect of VEGF in SAP. **Methods** Thirty-six female SD rats were randomly divided into sham-operated group(Sham group;  $n=18$ ) and severe acute pancreatitis model group(SAP group;  $n=18$ ). SAP was induced by retrograde injection of 5% sodium taurocholate in the pancreaticobiliary duct. The serum, ascites and pancreatic tissue of each group were detected at 3h, 6h, 12h after the operation. The severity of pancreatitis was assessed according to histological scoring. The expression of VEGF in the pancreatic tissues was observed by Western Blot, immunohistochemistry method. **Results** At each of the time points for measurement, both the serum Amylase and the scores of pancreatic tissue injury were significantly higher in SAP group than them of sham group( $P<0.01$ ). Compared with the sham group, the expressions of VEGF in the pancreatic tissues of SAP group were significantly up-regulated following the operation( $P<0.01$ ). **Conclusion** The expression of VEGF may play an important role in the pathological change and involve in hemorrhage and necrosis in SAP.

**Key words:** severe acute pancreatitis; VEGF; rats

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一种常见的临床急腹症,病情凶险,病死率高,目前其发病机制仍不清楚<sup>[1-2]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)不仅参与肿瘤、损伤中新生血管的形成,而且参与血管渗透性的改变<sup>[3-4]</sup>。在 SAP 早期,由于炎性介质大量产生,引起的微循环(微静脉或毛细血管)的通透性增加,血管内血浆、蛋白及血细胞等渗透至组织间隙或体腔中,引起胰腺组织的出血水肿甚或腹水等<sup>[5-6]</sup>。本实验通过牛磺胆酸钠诱导大鼠 SAP 模型,通过观察 SAP 时 VEGF 的表达水平,探讨 VEGF 在 SAP 的发病机制中的作用,以期对 SAP 的诊治提供新思路。

## 1 材料与与方法

**1.1 实验动物与主要试剂** 普通级 SD 雌性大鼠,鼠龄 3~4 个月,体质量 180~250 g,平均 220 g,由四川省医学科学院实验动物研究所提供,动物合格证号:SCXK(川)2009-10。牛磺胆酸钠 25 g 购自美国 Sigma 公司,分析纯。溶于蒸馏水配成质量浓度为 5%牛磺胆酸钠水溶液。VEGF 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 分组与动物模型的制备** SD 大鼠 36 只,称质量编号

后查随机数字表随机分为假手术对照组(Sham 组)、重症急性胰腺炎模型组(SAP 组)、各组按照 3、6、12 h 分为 3 个亚组,每组 6 只。清洁级实验室饲养。SAP 组:SD 大鼠实验前禁食 12 h,自由饮水,室温 22~24 ℃,4%水合氯醛 0.6 mL/kg 体质量腹腔注射麻醉。SAP 组动物常规备皮消毒铺巾,于无菌条件下腹壁正中切口入腹,用尖端磨平的 1 mL 小注射器针头经胆管的十二指肠乳头开口处入胰胆管,同时分别在胰胆管穿刺口及肝门部胆管处用两枚小动脉夹夹闭,加压逆行注入 5%牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g),按照 0.1 mL/min 匀速推注并于 4 min 内注完。推注完后维持 5 min,确认大鼠胰腺组织出血、水肿呈暗红色后去掉动脉夹,逐层关腹<sup>[7]</sup>。Sham 组模拟造模手术情况,开腹后不经胰胆管推注牛磺胆酸钠而仅翻动十二指肠及胰腺组织后关腹。各组所有动物关腹后于大鼠肢体皮下注射生理盐水(2 mL/100 g),以补充术中丢失的液体。各组动物手术后仍禁食,但可自由饮水。

**1.2.2 腹水量的检测** 肉眼观察量多时采取先用注射器抽取加棉签蘸后干湿差值进行计量。量少时采取棉签蘸后干湿差值计量。

**1.2.3 血清的采集与检测** 各组大鼠于造模后 3、6、12 h 经

<sup>\*</sup> 基金项目:四川省卫生厅科研基金资助项目(090247)。

心脏抽取血标本 5 mL×2 EP,后处死大鼠。血液标本于 4 ℃冰箱过夜静置后分离血清,分离后再次于 2 000 r/min 离心 8 min,血清置于 EP 管,−20 ℃保存。血清标本用 Automatic Analyzer 7600 型全自动生化分析仪采用 G7-PNP 法检测 Amylase 含量,由绵阳市中心医院检验科检测。

1.2.4 胰腺组织形态学检测 肉眼观察胰腺组织胰头胰尾及肠系膜的变化。取新鲜胰腺组织,胰头胰尾各一块,修整后大小约 1.0 cm×1.0 cm×0.2 cm,置包埋盒于 4%多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,5 μm 厚切片,HE 染色光镜观察组织形态学变化并由 2 位病理医师进行 Schmidt<sup>[3]</sup> 双盲法评分。

1.2.5 免疫组化检测 采用免疫组织化学方法检测 VEGF 的原位表达水平。一抗工作浓度为 1:200,按照 Envision 二步法免疫组织化学方法说明书严格操作。显微镜观察染色情况:细胞质或细胞核染为棕黄色为阳性细胞。对每张切片任意取 6 个高倍视野(×400),每视野选取 100 细胞,根据胞浆或胞核染色深浅分为 4 个等级(0~3),记 6 个视野的平均值作为其染色得分。

1.2.6 免疫印迹(Western blot)检测 取保存于液氮中的胰腺组织块 100 mg,剪碎,RIPA 裂解液裂解后冰浴下玻璃匀浆器中匀浆,12 000 r/min 4 ℃离心 15 min,取上清液。Bradford 法蛋白定量,每孔加样量 30 μg,7.5%SDS-PAGE 电泳;蛋白转移至 PVDF 膜,5%BSA 的 TBST 液室温封闭 1 h,加入兔抗大鼠 VEGF(1:100)和兔抗大鼠 β-actin 抗体(1:1 000),4 ℃反应过夜;取膜,TBST 液洗 5 min×3 次,加 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗孵育;ECL 显影,图像使用 Total Lab 软件灰度扫描,计算目的蛋白(VEGF)与内参蛋白 β-actin 吸光度的比值。以上实验重复 3 次,取平均值。

1.3 统计学处理 计量资料数据均采用  $\bar{x} \pm s$  来表示。应用 SAS8.0 统计软件,采用线性回归模型对资料进行统计学处理,所有检验水准均设定为 0.05。数据以 Mean±SD 表示,组间差异使用方差分析,两两比较采用 Student-Newman-Kewls 法,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 腹水量测定 SAP 组腹水量明显高于 Sham 组,以 12 h 为著。SAP 组和 Sham 组腹水量比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

表 1 各组不同时间点腹水量( $\bar{x} \pm s$ , mL, $n=6$ )			
组别	3 h	6 h	12 h
Sham 组	1.33±1.20	1.32±1.18	1.32±1.18
SAP 组	3.72±0.94 <sup>△</sup>	5.73±1.50 <sup>△</sup>	7.70±3.36 <sup>△</sup>

△:  $P<0.01$ ,与 Sham 组比较。

2.2 血清淀粉酶检测结果 SAP 组与 Sham 组血清淀粉酶比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。在各时点观察中,两组变化趋势不尽相同,SAP 组在 6 h 时升高,且与 3 h 比较差异有统计学意义( $P=0.009 4$ ),但在 12 h 时与 3 h 比较差异无统计学意义( $P=0.742 1$ )。Amylase 在 Sham 组 6 h 略升高,而 6 h、12 h 与 3 h 时比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 2。

表 2 各组不同时间点血清淀粉酶 lg 含量( $\bar{x} \pm s$ , $n=6$ )			
组别	3 h	6 h	12 h
Sham 组	3.10±0.10	3.11±0.10	3.12±0.21
SAP 组	3.57±0.30 <sup>△</sup>	3.89±0.21 <sup>△</sup>	3.61±0.23

△:  $P<0.05$ ,与 Sham 组比较。

## 2.3 形态学改变

2.3.1 肉眼改变 Sham 组:大鼠腹腔见少许渗出,肠系膜无皂化斑,胰腺仅见轻微水肿、充血,胰头胰尾基本正常,无出血及坏死性改变。SAP 组:腹腔大量血性腹水,各时间段胰腺质地稍硬,胰头明显充血水肿、出血,颜色呈暗红色改变,胰尾明显充血。胰腺及肠系膜可见皂化斑(彩插 I 图 1)。

2.3.2 HE 染色 Sham 组:光镜下胰腺组织结构清晰,形态正常,无出血和坏死,仅见轻微充血水肿(彩插 I 图 2)。胰腺小叶间隔清晰、结构完整、间质清晰可见,偶可见个别炎性细胞浸润,胰腺腺泡细胞完整,胰岛清晰可见。SAP 组:3 h 组胰腺腺体结构紊乱,腺小叶结构不清晰,小叶间隔明显增大,腺泡细胞明显水肿伴有局灶性坏死和大量炎细胞浸润。6 h 组腺体实质内可见大片凝固性坏死伴有出血,有的腺小叶或腺泡细胞轮廓可见(彩插 I 图 2)。坏死灶及周围大量中性粒细胞、单核细胞浸润。12 h 组见胰腺小叶大片、弥漫性的凝固性坏死及大量炎细胞浸润,坏死灶内有灶状出血、血管壁毁损、小叶和腺泡细胞轮廓模糊不清,部分腺小叶呈现孤岛效应。胰腺病理评分(表 3,彩插 I 图 2),Sham 组与 SAP 组相比差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。

表 3 各组不同时间点胰腺组织 Schimit 评分( $\bar{x} \pm s$ , $n=6$ )			
组别	3 h	6 h	12 h
Sham 组	1.42±2.12	1.43±2.32	1.43±2.47
SAP 组	12.57±2.86 <sup>△</sup>	13.89±2.21 <sup>△</sup>	14.61±1.23 <sup>△</sup>

△:  $P<0.01$ ,与 Sham 组比较。

2.3.3 VEGF 蛋白表达及定位 VEGF 表达的阳性部位在胰腺腺泡细胞胞浆和胞核中,以胞浆为著,也表达于炎细胞。Sham 组无 VEGF 的表达或弱阳性表达于胞浆,SAP 组腺泡细胞阳性表达与 Sham 组相比明显增多( $P<0.01$ ),见表 4。Sham 组:光镜下可见 VEGF 少数腺泡细胞胞浆中呈淡黄色弱阳性表达,细胞核内基本不表达,胰岛细胞表达明显,各个时间点变化不明显(彩插 I 图 3)。SAP 组:VEGF 蛋白在胰腺腺泡细胞及炎细胞呈阳性表达,坏死灶也呈片状表达。阳性表达主要定位于胞浆中,部分胞核中也呈强阳性反应(彩插 I 图 3)。Western blot 检测,Sham 组 VEGF 蛋白条带显色浅淡,而 SAP 组各时间点 VEGF 相对吸光度值则明显增高( $P<0.01$ ),见表 5。

表 4 各组胰腺组织 VEGF 免疫组化检测( $\bar{x} \pm s$ , $n=6$ )			
组别	3 h	6 h	12 h
Sham 组	21.8±6.6	29.3±7.1	37.6±10.2
SAP 组	220.3±49.2 <sup>△</sup>	214.3±51.3 <sup>△</sup>	256.7±60.8 <sup>△</sup>

△:  $P<0.01$ ,与 Sham 组比较。

表 5 各组胰腺组织 VEGF Western blot 检测相对吸光度值( $\bar{x} \pm s$ , $n=6$ )			
组别	3 h	6 h	12 h
Sham 组	0.08±0.006	0.07±0.005	0.05±0.003
SAP 组	0.47±0.13 <sup>△</sup>	0.51±0.22 <sup>△</sup>	0.63±0.26 <sup>△</sup>

△:  $P<0.01$ ,与 Sham 组比较。

## 3 讨 论

血管反应是炎症发生、发展的核心环节,微循环障碍学说在 SAP 的发病机制已得到广泛共识<sup>[8-11]</sup>。SAP 时由于炎性介质的产生导致微循环通透性增加、屏障功能下降,血管通透性增加可导致局部渗血及血液瘀滞等病理改变,引起组织水

肿、胰腺组织出血及炎性细胞的浸润。VEGF 基因的表达受缺血缺氧、多种细胞因子、类固醇激素、瘤基因、抑瘤基因产物及一些小分子物质等因素的调控,VEGF 能促使组织形成新生血管,提高血管通透性,在已知的微血管高渗透性诱导物中作用最强,是组织胺的 50 000 倍<sup>[12-14]</sup>。一般认为,当 VEGF 在局部组织分泌时,VEGF 与相应受体结合后,通过多条信号通路的传递,可增加内皮细胞的移动、新生血管的形成以及促进内皮细胞周围的周细胞、内皮细胞分泌基质金属蛋白酶等,结果导致血管内液体及蛋白外渗至组织中,引起血压降低、组织低灌注<sup>[15-16]</sup>。

本实验中 SAP 组大鼠各时点血清淀粉酶的含量均明显高于假手术组,并随时间递增而升高趋势,这与 SAP 发展过程中胰腺组织病理损伤程度变化相一致,因此,血清淀粉酶水平可在一定程度上反映胰腺组织病理损伤程度。此外,SAP 组腹水量较正常组明显增加,且随观测时间的延长而增多,提示 SAP 早期即存在微循环通透性增加,并随时间延长有加重趋势。另据文献报道,细胞内的渗透压改变、胰腺间质水肿、淋巴回流受阻、组织静水压增高等因素可能也参与了胰腺微循环障碍的发生过程<sup>[17]</sup>。本实验免疫组织化学染色结果显示,VEGF 蛋白在正常组胰腺组织很少表达,且在各时点的表达变化不大,而在 SAP 组腺泡细胞、炎性细胞等的胞浆及胞核内广泛表达,且在 SAP 早期即有升高,提示 VEGF 可能作为 SAP 发生的始动性因素之一,参与了胰腺微循环血管通透性改变、胰腺出血坏死等胰腺炎症病理性损伤过程。因此,作者推测阻抑 VEGF 基因或抑制其下游产物表达有可能成为一种新的干预 SAP 的有效治疗手段。

# 参考文献:

- [1] Skipworth JR, Pereira SP. Acute pancreatitis[J]. Curr Opin Crit Care,2008,14(2):172-174.
- [2] Mofidi R, Lee AC, Madhavan KK, et al. Prognostic factors in patients undergoing surgery for severe necrotizing pancreatitis[J]. World J Surg,2007,31(10):2002-2005.
- [3] Schmidt J, Ebeling D, Ryschich E, et al. Pancreatic capillary blood flow in an improved model of necrotizing pancreatitis in the rat[J]. Surg Res,2002,106(2):335-337.
- [4] Carvalho JF, Blank M, Shoenfeld Y. Vascular endothelial growth factor(VEGF) in autoimmune diseases[J]. J Clin Immunol,2007,27(3):246-248.
- [5] Wig JD, Bharathy KG, Kochhar R, et al. Correlates of organ failure in severe acute pancreatitis[J]. JOP,2009,10(3):271-274.
- [6] Ito Y, Lugea A, Pandol SJ, et al. Substance P mediates cerulein induced pancreatic microcirculatory dysfunction

in mice[J]. Pancreas,2007,34(1):138-140.

- [7] Aho HI, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis [J]. Scand J Gastroenterol, 1980,15(4):411-413.
- [8] Tian H, Zhang X, Wu C, et al. Effects of baicalin and octreotide on the serum TNF-alpha level and apoptosis in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis[J]. Inflammation,2009,32(3):191-194.
- [9] Nakajima T, Ueda T, Takeyama Y, et al. Protective effects of vascular endothelial growth factor on intestinal epithelial apoptosis and bacterial translocation in experimental severe acute pancreatitis[J]. Pancreas,2007,34(4):410-413.
- [10] Zhang XP, Zhang J, Ma ML, et al. Pathological changes at early stage of multiple organ injury in a rat model of severe acute pancreatitis [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2010,9(1):83-85.
- [11] Bumbasirevic V, Radenkovic D, Jankovic Z, et al. Severe acute pancreatitis: overall and early versus late mortality in intensive care units [J]. Pancreas,2009,38(2):122-124.
- [12] Gerber HP, Olazoglu E, Grewal IS. Targeting inflammatory cells to improve anti-VEGF therapies in oncology [J]. Recent Results Cancer Res,2010,180(1):185-187.
- [13] Murukesh N, Dive C, Jayson GC. Biomarkers of angiogenesis and their role in the development of VEGF inhibitors [J]. Br J Cancer,2010,102(1):8-13.
- [14] Bates DO. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability[J]. Cardiovas Res,2010,87(2):262-271.
- [15] Azam F, Mehta S, Harris AL. Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy [J]. Eur J Cancer,2010,46(8):1323-1325.
- [16] Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation[J]. Nature,2008,456(12):809-812.
- [17] Vajanto I, Rissanen TT, Rutanen J, et al. Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ[J]. J Gene Med,2002,11(3):371-374.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-13)

(上接第 2950 页)

- [11] Nesti LJ, Li WJ, Shanti RM, et al. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold(HANFS)amalgam[J]. Tissue Eng Part A,2008,14(9):1527-1537.
- [12] Wilke HJ, Heuer F, Neidlinger-Wilke C, et al. Is a collagen scaffold for a tissue engineered nucleus replacement capable of restoring disc height and stability in an animal model? [J]. Eur Spine J,2006,15(3):433-438.
- [13] 阮狄克,辛洪奎,张超,等. 组织工程椎间盘体内原位植入

的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2010,20(7):581-585.

- [14] 陈清河,叶君健. 组织工程髓核移植治疗椎间盘退变[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(35):6602-6606.
- [15] Xiao DM, Xu ZS, Lin BW, et al. Reparation of experimental models of osseous nonunion[J]. Chin J Clin Rehabil,2005,9(3):214-215.

(收稿日期:2012-02-09 修回日期:2012-04-01)