

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.20.007

## 血管内皮细胞生长因子受体 2 在慢性静脉性溃疡组织中表达的研究\*

钟武<sup>1</sup>, 杨帆<sup>1</sup>, 陈睦虎<sup>1</sup>, 吴刚<sup>2△</sup>

(四川医科大学附属第一医院:1. 急诊科;2. 感染科, 四川泸州 646000)

**[摘要]** **目的** 观察静脉性溃疡组织中的血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)表达情况,从血管再生障碍途径探讨静脉性溃疡发病机制。**方法** 采用 HE 染色对比观察溃疡创面组织结构差异;RT-PCR 检测 VEGFR2 mRNA 的相对系数;采用免疫组织化学观察 CD34、CD133、VEGFR2 表达,评估新生血管形成。**结果** HE 染色见静脉性溃疡创面鳞状上皮结构破坏严重,底部明显附着炎性渗出物。与正常皮肤对照组比较,静脉性溃疡 VEGFR-2、CD34、CD133 的表达明显降低。采用 RT-PCR 检测 VEGFR2 mRNA 水平,在病程 3 周至 2 个月和大于 2 个月组中,静脉性溃疡表达相对系数低于创伤性溃疡( $0.407 \pm 0.014$ 、 $0.249 \pm 0.088$  vs.  $0.856 \pm 0.049$ 、 $0.985 \pm 0.032$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 内皮祖细胞(EPCs)的数量和功能受到明显抑制,在损伤局部不能分化形成功能性新生血管,可能是溃疡创面经久不愈的重要原因。

**[关键词]** 内皮祖细胞;静脉性溃疡;血管新生**[中图分类号]** R654.4;R34**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)20-2756-03

## Expression of VEGFR2 in the tissues of chronic venous ulcer\*

Zhong Wu<sup>1</sup>, Yang Fan<sup>1</sup>, Chen Mulu<sup>1</sup>, Wu Gang<sup>2△</sup>

(1. Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study expression of VEGFR2 in the tissues of chronic venous ulcer, and to explore pathogenesis of chronic venous ulcer from the pathway of angiogenesis dysfunction. **Methods** ulcers cell morphology changes were observed with HE staining; VEGFR 2, CD34 and CD133 were detected with immunohistochemistry. The expression of VEGFR2 mRNA was detected by RT-PCR. **Results** HE staining displayed the squamous cell of venous ulcer wound was disarranged, at ulcer base, there was a large number of inflammatory disarranged, at ulcer base, there was a large number of inflammatory exudate. RT-PCR detection of VEGFR2 mRNA content in venous ulcer is lower than the traumatic ulcer group obviously ( $0.407 \pm 0.014$ ,  $0.249 \pm 0.088$  vs.  $0.856 \pm 0.049$ ,  $0.985 \pm 0.032$ ,  $P < 0.05$ ). Compared with control group, the expression of VEGFR-2, CD34 and CD133 by immunohistochemistry significantly reduced in venous ulcer. **Conclusion** The number and function of EPCs was suppressed significantly, thus the EPCs can not differentiate into functional neovascularization in the jury tissues, and that could be important causes of wound that is slow to heal.

**[Key words]** endothelial progenitor cells; venous ulcer; angiogenesis

静脉性溃疡是慢性静脉功能不全发展到晚期并发症之一<sup>[1]</sup>,主要表现为下肢踝周皮肤缺损、慢性感染,临床愈合困难。有研究表明,溃疡形成与病变组织中存在的氧化应激,炎症介质释放,激活血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)凋亡,抑制血管再生等因素关系密切<sup>[2]</sup>,所以本研究针对静脉性溃疡组织与其他溃疡组织的血管内皮修复能力进行了对比实验研究,意在揭示血管再生障碍与静脉性溃疡发病机制的相关性,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2013 年 10 月至 2014 年 12 月本院收治的 72 例下肢溃疡患者溃疡创面及正常皮肤标本,其中男 50 例,女 22 例,年龄 51~72 岁,平均( $61.5 \pm 2.53$ )岁。试验对象首先排除动脉基础性疾病。按以下标准分组:(1)静脉性溃疡组 24 例,取下肢静脉功能不全合并溃疡患者溃疡组织,大小约  $0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$ ;按病程分为 A 组(急性组)8 例,病程小于 3

周;B 组(亚急性组):8 例,病程 3 周至 2 个月;C 组(慢性组):8 例,病程大于 2 个月;(2)创伤性溃疡组:24 例,取下肢皮肤挫裂伤患者溃疡创面标本,病程分组法同第一组;(3)正常皮肤对照组:24 例,取下肢浅表良性肿瘤梭形切除术中与病灶一同切下的正常皮肤。

## 1.2 方法

**1.2.1 组织石蜡切片的制备** 按操作常规制作石蜡切片,对溃疡标本、正常皮肤标本作 HE 染色,并作血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)、CD34、CD133 免疫组织化学染色。

**1.2.2 RT-PCR 检测 VEGFR2 mRNA 水平** 检索 GenBank 公布的基因序列,设计 VEGFR 基因引物:正向引物:5'-CCT CAT TCA TAT TGG TCA CCA TCT C-3';反向引物:5'-CTC CTC AGG GTG GAC AGG TTT-3'。所扩增的目的片段长度约为 126 bp。β-actin 基因引物:正向引物:5'-GTG GAC ATC CGC AAA GA-3';反向引物:5'-CTC GTC ATA CTC CTG

\* 基金项目:泸州医学院自然科学基金课题(12310)。 作者简介:钟武(1973-),副主任医师,硕士,主要从事急诊医学与血管外科基础和临床研究。 △ 通讯作者, Tel:13002866368; Email:wuganglz2008@sina.com。

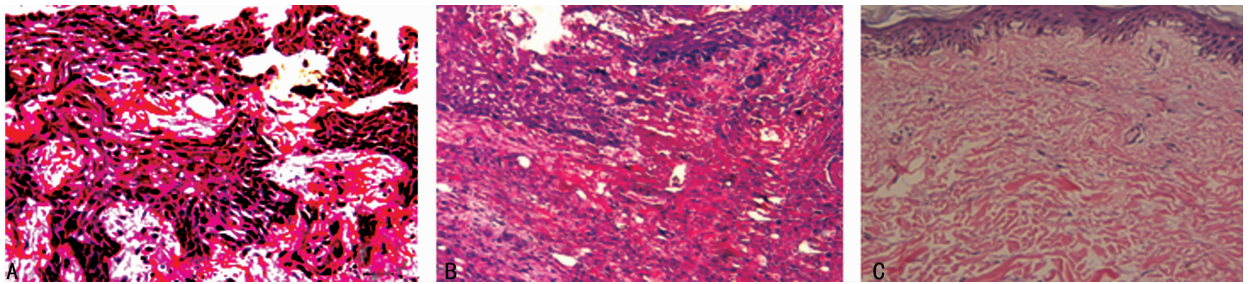
CTT G-3'。所扩增的目的片段长度约为 234 bp。计算目标基因片断电泳条带密度相对系数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 HE 染色结果 溃疡组织及正常皮肤 HE 染色结果, 见图 1。

2.2 免疫组织化学染色 选取病程大于 2 个月病变典型组织及正常皮肤对比, 棕黄色细胞为阳性表达, 见图 2。



A: 静脉性溃疡组; B: 创伤溃疡组; C: 正常皮肤对照组。

图 1 溃疡组织及正常皮肤 HE 染色 (×100)

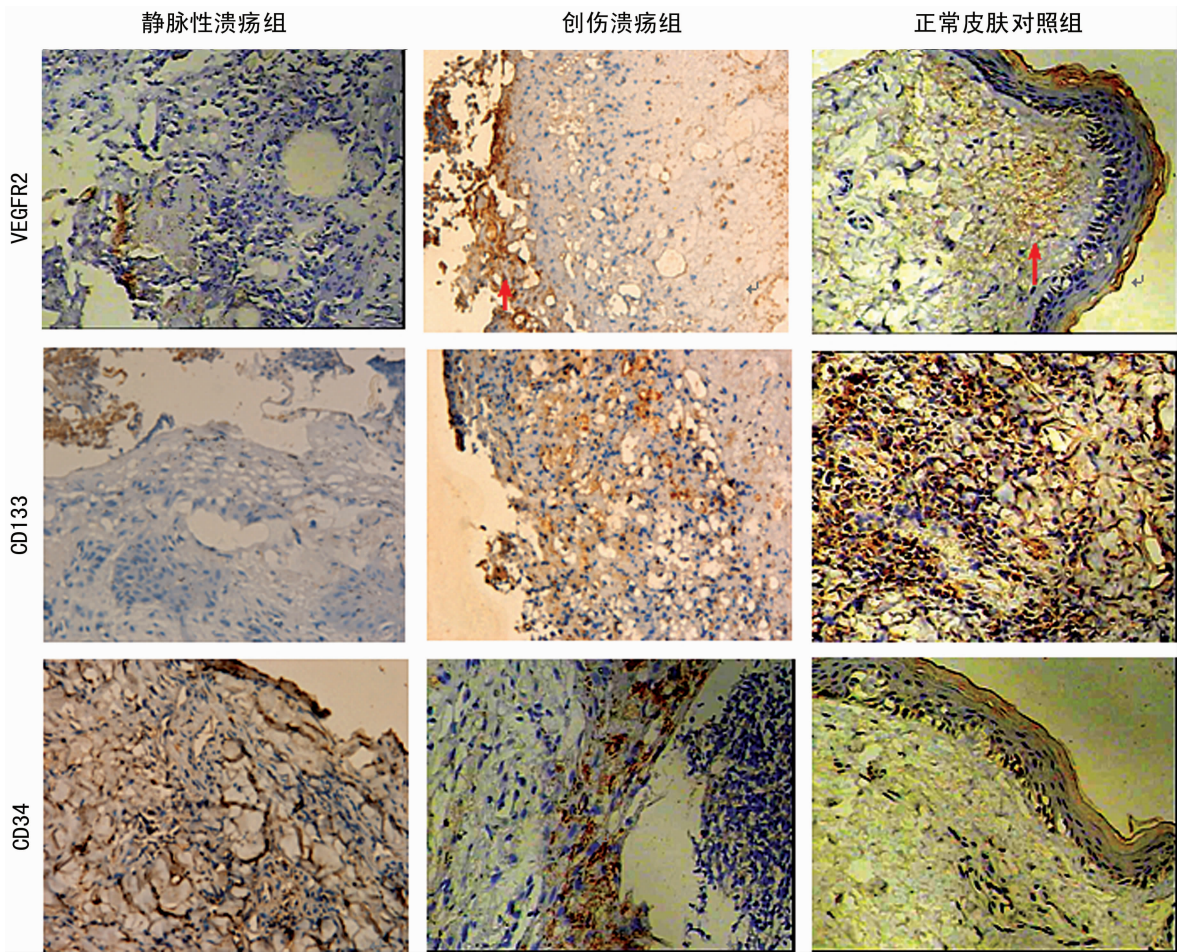
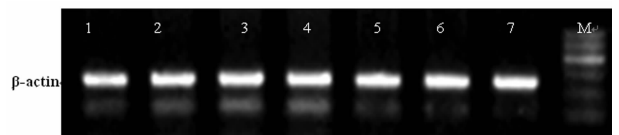


图 2 溃疡组织及正常皮肤免疫组织化学染色 (×200, ↑ 为 VEGFR2 阳性表达)

2.3 RT-PCR 检测 VEGFR2 mRNA 表达相对系数 正常皮肤对照组为  $0.772 \pm 0.023$ ; 创伤溃疡 A 组为  $0.774 \pm 0.014$ , 静脉性溃疡 A 组为  $0.683 \pm 0.021$ , 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。在 B 组和 C 组溃疡组织中, 与创伤溃疡组 ( $0.856 \pm 0.049, 0.985 \pm 0.032$ ) 及正常皮肤对照组 ( $0.772 \pm 0.023$ ) 比较, 静脉性溃疡 ( $0.407 \pm 0.014, 0.249 \pm 0.088$ ) 表达明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。不同病程静脉性溃疡组内比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1, 图 3。



M: Marker; 1: 正常皮肤对照组; 2: 创伤溃疡 A 组; 3: 创伤溃疡 B 组; 4: 创伤溃疡 C 组; 5: 静脉性溃疡 A 组; 6: 静脉性溃疡 B 组; 7: 静脉性溃疡 C 组。

图 3 各组溃疡组织 VEGFR2 mRNA 表达



表 1 各组溃疡组织 VEGFR2 mRNA 相对系数 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	病程		
		小于 3 周	大于 3 周至 2 个月	大于 2 个月
正常皮肤正常组	24	0.772±0.023	—	—
创伤溃疡组	24	0.774±0.014	0.856±0.049	0.985±0.032
静脉性溃疡组	24	0.683±0.021*	0.407±0.014◆◇*	0.249±0.088◆◇*

◆:  $P < 0.05$ , 与同时段正常皮肤对照组比较; ◇:  $P < 0.05$ , 与同时段静脉性溃疡组比较; \*:  $P < 0.05$ , 组内比较; —: 表示此项无数据。

### 3 讨 论

VECs 由内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 分化而来, 在体内 EPCs 是缺血组织血管新生、受损内皮细胞修复和合成的重要前体<sup>[3]</sup>。组织损伤修复依赖于受损局部的血供情况<sup>[4]</sup>, 而血管新生除了需要多种促生长因子的协同作用 (如 VEGF、FGF、EGF 等), 更重要的是有足够数量的 EPCs 参与<sup>[5]</sup>, 所以说 EPCs 根据组织需要, 从骨髓动员, 并迁移至损伤部位, 动态调节内皮细胞凋亡/再生平衡, 其在损伤局部的表达情况是评估组织损伤后修复能力重要标准<sup>[6-7]</sup>。

VEGF 共有 3 种酪氨酸激酶受体: VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3, VEGF 与其受体 VEGFR2 结合后主要生理学效应是正性调节有丝分裂和血管形成, 促进新生血管内膜及管腔样结构的形成<sup>[8]</sup>, 为组织损伤修复提供充足的血供及稳定的内环境<sup>[9-10]</sup>。当前认为, CD34、CD133 和 VEGFR2 是表达于 EPCs 表面特异性较高的标记组合<sup>[11]</sup>, 笔者采用 CD34、CD133、VEGFR2 阳性表达细胞来鉴定 EPCs, 目的是根据损伤组织 EPCs 表达情况间接评估溃疡组织潜在修复能力。

本研究 HE 染色发现静脉性溃疡上皮细胞结构紊乱, 基底部大量炎症细胞浸润, 缺乏毛细血管分布; 创伤溃疡基底部肉芽组织增生, 新生毛细血管丰富, 进一步比较两种溃疡组织血管新生功能的差异。本研究对 VEGFR2、CD34、CD133 进行免疫组织化学染色, 静脉性溃疡组明显低于正常皮肤对照组, 并且 RT-PCR 半定量检测 VEGFR2 mRNA 水平显示, 病程大于 3 周至 2 个月和大于 2 个月静脉性溃疡组低于创伤溃疡组, 随着病程延长其水平明显下降, 表明创伤性溃疡组中 VEGFR2 随病程延长呈现代偿性增生, 其转归演变符合普通溃疡愈合的病理、生理学规律, 而静脉性溃疡组织在已供血障碍的基础上, EPCs 的数量和功能受到明显抑制, 在损伤局部不能分化为成熟的 VECs, 进而形成功能性新生血管, 完成内皮损伤后自我修复过程<sup>[12]</sup>, 血管内皮层的完整性受到严重破坏, 溃疡组织难以得到充足的血供, 这种恶性循环效应可能是溃疡创面经久不愈的重要原因<sup>[13]</sup>。

综上所述, 静脉性溃疡组织 VEGFR2 的表达情况有别于其他病理性溃疡, 有自身的规律和特点, 但导致溃疡组织 EPCs 功能抑制进而引起局部血管新生障碍, 组织代谢紊乱, 缺氧坏死的分子生物学机制还有待于深入研究。

### 参考文献

[1] 张培华, 蒋米尔. 临床血管外科学[M]. 北京: 北京科学出

版社, 2007: 501-504.

- [2] Ma Y, Zechariah A, Qu Y. Effects of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke [J]. J Neurosci Res, 2012, 90(10): 1873-1882.
- [3] Shaik S, Nucera C, Inuzuka H, et al. SCF ( $\beta$ -TRCP) suppresses angiogenesis and thyroid cancer cell migration by promoting ubiquitination and destruction of VEGF receptor 2 [J]. Exp Med, 2012, 209(7): 1289-1307.
- [4] 时德, 赵渝. 下肢慢性静脉功能不全治疗的再认识 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2009, 16(6): 421-424.
- [5] Abajo A, Bitarte N, Zarate R, et al. Identification of colorectal cancer metastasis markers by an angiogenesis-related cytokine-antibody array [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(7): 637-645.
- [6] Fadini GP, Sartore S, Albiero M, et al. Number and function of endothelial progenitor cells as a marker of severity for diabetic vasculopathy [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(9): 2447-2466.
- [7] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells vascular function and cardiovascular risk [J]. N Engl J Med, 2003, 348(7): 593-600.
- [8] Tasaki Y, Nishimura R, Shibaya M, et al. Expression of VEGF and its receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: effects of VEGF on prostaglandin production in endometrial cells [J]. Reprod Dev, 2010, 56(2): 223-229.
- [9] Ulyatt C, Walker J, Ponnambalam S. Hypoxia differentially regulates VEGFR1 and VEGFR2 levels and alters intracellular signaling and cell migration in endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(3): 774-779.
- [10] Appelmann I, Liersch R, Kessler T. Angiogenesis inhibition in cancer therapy: platelet-derived growth factor (PDGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors: biological functions and role in malignancy [J]. Recent Results Cancer Res, 2010(180): 51-81.
- [11] Sölder E, Böckle BC, Nguyen VA, et al. Isolation and characterization of CD133<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> VEGFR-2<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> fetal endothelial cells from human term placenta [J]. Microvasc Res, 2012, 84(1): 65-73.
- [12] Joshi D, Sinclair A, Tsui J, et al. Incomplete removal of great saphenous vein is the most common cause for recurrent varicose veins [J]. Angiology, 2011, 62(2): 198-201.
- [13] 王深明, 王斯文. 血管外科现代临床的难点和热点问题探讨 [J]. 中国实用外科杂志, 2014, 34(1): 19-23.

(收稿日期: 2015-01-18 修回日期: 2015-03-26)