

• 论 著 •

血管内皮生长因子在肾间质纤维化大鼠中的表达

李志兰¹, 陈碧英¹, 吴学兵¹, 叶玉妹²

(上海第七人民医院: 1. 医学检验科; 2. 传统医学科, 上海 200137)

摘要:目的 分析血管内皮生长因子(VEGF)表达在早期肾纤维化形成过程中的作用。方法 45 只雄性 SD 大鼠右肾切除术后, 随机分为模型组(30 只)和对照组(15 只)。模型组给予腹腔注射牛血清清蛋白, 对照组注射生理盐水。分别于第 1、5、9 周末常规方法测定肾功能、24 h 尿蛋白(Pr)、VEGF 水平, 肾脏组织常规病理检测。分析 VEGF、Pr、肾小管间质病理(TIL)积分的相关性。结果 模型组 24 h 尿蛋白、肾功能和 TIL 与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且出现早期肾间质纤维化的病理特征。第 1、5、9 周末模型组大鼠 VEGF 与 24 h Pr 水平均呈正相关($P < 0.05$)。结论 血浆 VEGF 的表达与 24 h Pr 水平变化趋势一致, VEGF 可能在蛋白尿的发生机制中起重要作用。

关键词:血管内皮生长因子; 蛋白尿; 肾间质纤维化

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)02-0227-03

Expression of vascular endothelial growth factor in renal interstitial fibrosis in rats

Li Zhilan¹, Chen Biying¹, Wu Xuebing¹, Ye Yumei²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Traditional Medicine, the Seventh Hospital of Shanghai, Shanghai 200137, China)

Abstract: **Objective** To analysis the role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the formation of the early renal fibrosis. **Methods** A total of 45 male SD rats after receiving right nephrectomy were randomly divided into model group(30 rats) and control group(15 rats). Rats in the model group were given intraperitoneal injection of bovine serum albumin, rats in the control group were injected with physiological saline. Renal function, 24 h urine protein, and VEGF level, routine pathological detection of kidney tissue were detected at first, fifth and ninth week. The correlation between the VEGF level and the renal tubulointerstitial pathological(TIL) score, and urinary protein. **Results** The 24 h urinary protein, renal function and TIL score in the model group were significant difference compared with those of the control group ($P < 0.05$), and rats in the model group showed pathological characteristic of the early renal interstitial fibrosis. The level of VEGF and 24 h urine protein excretion in the model group were positively correlated ($P < 0.05$). **Conclusion** VEGF might play an important role in the mechanism of proteinuria.

Key words: vascular endothelial growth factor; proteinuria; renal interstitial fibrosis

在正常生理情况下, 肾小球滤过膜具有机械屏障及电荷屏障作用。当这些屏障作用, 特别是电荷屏障受损时, 带负电荷的血浆蛋白滤过率将增加, 原尿中蛋白水平增加。当原尿中蛋白远超出近端肾小管重吸收能力时, 形成大量蛋白尿。在此基础上, 如存在大量输注血浆蛋白等增加高灌注的因素均可加重蛋白尿。而持续大量蛋白尿又可引起肾实质细胞不可逆损伤, 使其被纤维组织侵袭替代, 最终导致肾小球硬化和肾间质纤维化^[1]。本研究以蛋白超负荷肾病大鼠为实验模型, 观察血管内皮生长因子(VEGF)的水平与 24 h 尿蛋白(Pr)和肾间质纤维化的关系。现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 动物模型 健康 SD 大鼠 45 只, 雄性, 清洁级, 体质量 200~220 g, 由上海中医药大学实验动物中心提供。适应性喂养 1 周实施右肾切除术。术后 1 周分为对照组 15 只, 模型组 30 只。第 1~5 天, 模型组给予腹腔注射生理盐水配置的 0.33 g/mL 牛血清清蛋白溶液, 每天注射剂量分别为 1.00、1.575、2.150、2.725、3.30 mL; 对照组第 1~5 天腹腔注射模型组等量生理盐水。模型组从第 2 周开始, 根据大鼠体质量注射牛血清清蛋白溶液 15.15 mL/(kg·d)^[2], 每周连续注射 5 d, 持续 9 周; 对照组从第 2 周开始, 根据大鼠体质量给予腹腔注射模型组等量的生理盐水。

1.2 仪器与试剂 牛血清清蛋白粉末由美国 Proliant 公司提供; 大鼠 VEGF 水平采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒进行检测, ELISA 试剂盒由上海酶联生物科技有限公司提供。日本 Hitachi 7600-020 型全自动生化分析仪; HMIAS-2000 高清晰彩色医学图文分析系统由重庆天海公司提供; Stat Fax-2100 型酶标仪由美国 AWARENESS 公司提供。

1.3 24 h Pr 定量 分别于第 1、5、9 周末将大鼠放入代谢笼中收集 24 h 尿液, 记录 24 h 尿量并进行 Pr 定量。

1.4 血液生化指标检测 第 1、5、9 周末均随机取对照组 5 只、模型组 10 只采取静脉血进行血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、VEGF 等 3 项生化指标的检测, 采血后 2 h 内完成检测, 所有操作均严格按照试剂和仪器说明书执行。采用配制浓度为 500.0、250.0、125.0、62.5、31.3、15.6 pg/mL 的 VEGF 标准品, 与待测血浆标本经常规酶联免疫吸附试验(ELISA)进行检测, 用酶标仪在 450 nm 测定光密度(OD)值。

1.5 肾组织光镜检查 第 1、5、9 周末随机取的对照组 5 只、模型组 10 只大鼠进行静脉采血后, 均处死, 取肾皮质组织。肾皮质用 10% 甲醛浸泡 12 h 进行固定, 石蜡切片, 六胺银-马松(PASM-Masson)染色。采用 HMIAS-2000 系统进行检测。肾间质病理参数半定量(TIL)积分根据肾小管萎缩、管形和肥大情况, 肾间质纤维化和炎症的严重程度评为 0~4 分; 无病变, 0

分;病变区域小于 25%,1 分;病变区域为 25%~<50%,2 分;病变区域为 50%~<75%,3 分;病变区域大于或等于 75%,4 分。

1.6 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理及统计学分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时改用近似 *t* 检验。采用 Pearson 相关进行相关分析。 $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组大鼠 24 h Pr 定量比较 第 1、5、9 周末,模型组大鼠 24 h Pr 均明显高于对照组,比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 5 周上升至最高值,随后有所下降,但到第 9 周末模型组 Pr 仍明显高于对照组,比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 2 组大鼠 3 项生化指标水平的比较 模型组 BUN、

VEGF 水平在第 1、5、9 周末均明显高于对照组,比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。BUN、VEGF 在第 1 周末出现有意义的上升,在第 5 周末达到最高峰,并持续到第 9 周末。Cr 水平在第 5、9 周末均明显低于对照组,比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Cr 在第 1 周末下降不明显,第 5 周末出现明显的降低,随后虽然有所回升,但仍低于对照组。见表 2。

表 1 2 组大鼠 24 h Pr 定量比较 ($\bar{x} \pm s$, mg/24 h)

分组	第 1 周末	第 5 周末	第 9 周末
对照组	3.43 ± 1.11	8.45 ± 4.00	14.08 ± 3.86
模型组	20.60 ± 9.22	158.29 ± 36.24	104.87 ± 87.27
F/t'	F=50.828	t'=-18.685	t'=-2.749
P	<0.05	<0.05	<0.05

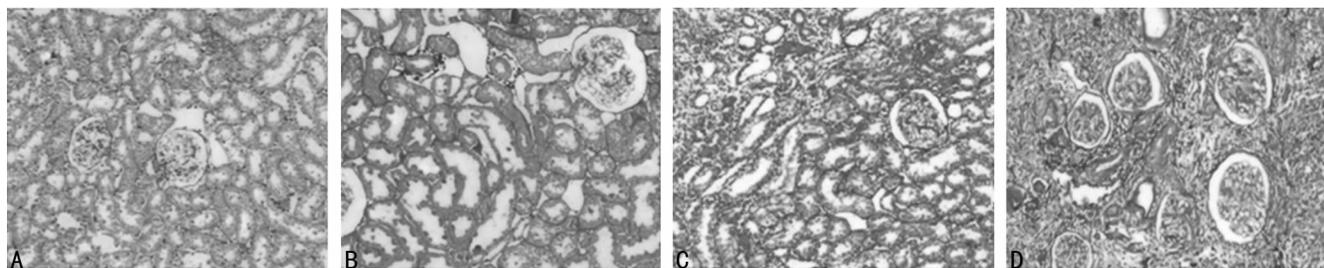
表 2 2 组大鼠 3 项生化指标水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	BUN(mmol/L)			Cr(mL/min)			VEGF(pg/mL)		
		第 1 周末	第 5 周末	第 9 周末	第 1 周末	第 5 周末	第 9 周末	第 1 周末	第 5 周末	第 9 周末
对照组	5	6.03 ± 1.14	9.99 ± 3.23	9.77 ± 3.07	0.66 ± 0.10	0.68 ± 0.19	0.72 ± 0.12	19.87 ± 22.7	25.00 ± 20.66	17.40 ± 9.72
模型组	10	11.66 ± 1.27	17.37 ± 3.77	13.58 ± 2.51	0.59 ± 0.65	0.22 ± 0.17	0.34 ± 0.16	57.81 ± 23.8	187.70 ± 49.8	92.30 ± 18.44
F	—	68.674	14.312	5.557	3.678	20.821	17.2219	8.709	49.599	67.650
P	—	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

—:无数据。

2.3 2 组大鼠肾脏组织病理检测比较 对照组肾小球和肾间质均正常,见图 1A。模型组第 1 周末肾小球系膜细胞和基质轻度弥漫增生,肾小球毛细血管壁轻度增厚,毛细血管腔开放较好,少量肾小管呈混浊肿胀、颗粒变性及空泡变性,肾间质无明显病变,见图 1B。模型组第 5 周末系膜细胞和基质异常增生,系膜区有少量嗜复红免疫蛋白沉积,毛细血管祥因受压而皱缩于肾小球血管极一侧,肾间质炎性细胞浸润及少量纤维化。见

图 1C。第 9 周末系膜弥漫增生基础上呈团块聚集,毛细血管祥纤维素样坏死及微血栓形成,少数肾小球硬化呈局灶性及节段性分布,并可见节段祥与邻近的囊壁粘连,炎性细胞聚集在节段硬化处,可见纤维-细胞性新月体,系膜区可见明显嗜复红免疫蛋白沉积,肾小管内可见蛋白管型,多灶状萎缩,肾间质呈灶状纤维化。见图 1D。



A: 对照组肾组织光镜改变; B: 模型组第 1 周肾组织光镜改变; C: 模型组第 5 周肾组织光镜改变; D: 模型组第 9 周肾组织光镜改变。

图 1 大鼠肾脏组织光镜改变 (PASM-Masson 染色, ×100)

表 3 2 组大鼠 TIL 积分比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	TIL 积分
对照组	15	0.75 ± 0.28
模型组	第 1 周末	1.86 ± 0.71* Δ
	第 5 周末	2.37 ± 0.85*
	第 9 周末	3.14 ± 1.01*

*: $P < 0.05$, 与对照组比较; Δ : $P < 0.05$, 与第 9 周末比较。

病理半定量分析显示,模型组第 1、5、9 周末 TIL 积分均明显高于对照组,比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 1 周

末模型组 TIL 积分均明显低于第 9 周末,比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。而模型组第 5 周末 TIL 积分与第 9 周末比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 VEGF 与 24 h Pr、TIL 积分的相关分析 第 1、5、9 周末牛血清清蛋白大鼠血浆 VEGF 与 24 h Pr 水平均呈显著正相关 (*r* 分别为 0.906、0.897、0.635, $P < 0.05$)。第 5、9 周末 VEGF 水平与 TIL 积分呈显著负相关 (*r* 分别为 -0.771、-0.906, $P < 0.05$); 第 1 周末 VEGF 水平与 TIL 积分无显著相关 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

蛋白尿不仅是肾小球损伤严重程度的重要指标,而且持续

较高的蛋白尿,是终末期肾脏疾病(ESRD)的独立危险因素^[3]。肾小球疾病时,Pr 定量及持续时间与肾间质病变程度与肾功能恶化程度密切相关^[4]。本研究成功复制了蛋白尿肾损伤大鼠模型,肾功能明显降低,出现早期肾小球硬化和肾间质纤维化的病理特征。

VEGF 最早于 1989 年由 Ferrara 等从中垂体滤泡细胞培养液中分离,是一种特异性促血管内皮细胞有丝分裂因子。后来人们逐渐在鼠和人肾上腺等多种细胞培养液中纯化出 VEGF 蛋白,相对分子质量为(40~50)×10³,是目前最强的血管通透剂,数纳克即有生物活性,其血管通透作用是组胺的 5 万倍,且增强血管通透性的作用不被抗组胺或其他一些炎症抑制因子所阻断^[5-6]。受 VEGF 刺激后毛细血管超微结构改变存活数目明显降低,有利于大分子物质通过^[7]。Horita 等^[8]用牛血清清蛋白诱发的蛋白过负荷性肾炎模型中,肾组织中 VEGF mRNA 表达明显高于正常对照组人群,并与 Pr 呈正相关。有研究发现,在轻至中度肾损伤的 IgA 肾病肾组织中,VEGF 表达水平增加与肾损伤严重程度相关,而抑制 VEGF 的表达可以防止早期肾损伤和功能障碍^[9-10]。Li 等^[11]发现在肾综合征出血热中血清 VEGF 水平升高与病情严重程度及肾功能损伤程度呈正相关性。本研究发现,血浆 VEGF 表达与 24 h Pr 的变化趋势一致,二者呈正相关,与文献^[8-11]结论一致。因此 VEGF 是临床判断早期肾损伤的潜在标记物。

VEGF 在肾脏纤维化中的作用尚无定论,它可能通过影响血管生成、抗内皮细胞凋亡和化学趋化作用参与肾脏纤维化进程^[12]。本研究发现,随着间质病理程度加重,血液 VEGF 表达量递减,但仍处于较高水平,鉴于 VEGF 生物学功能的复杂性,所以单纯从本研究结果不能确定 VEGF 在肾间质纤维化中的作用,有待进一步深入研究。

参考文献

[1] Luis EB, Fuvia DO, Heike C, et al. Cellular infiltrates and NF-κB subunit c-Rel signaling in kidney allografts of patients with clinical operational tolerance[J]. Transplantation, 2012, 94(7): 729-737.

(上接第 226 页)

编码 mecA 基因产生补充的 PBP2a。(2)超量生产 β-内酰胺酶,使药物失活。(3)修饰固有的 PBPS(MQD-SA)改变药物的亲和力。正是由于其复杂的耐药机制,导致 MRSA 的多药耐药。

因此,在日常工作中要重视细菌的药敏试验,合理使用抗菌药物,加强耐药性监测,严格消毒制度和无菌技术操作规范,防止在院内感染与扩散。

参考文献

[1] Venkatesh MP, Placencia F, Weisman LF. Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update[J]. Semin Pediatr Infect Dis, 2006, 17(3): 120.

[2] 李春辉, 吴安华, 黄昕, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌分子流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(9): 1032-1035.

[3] 郭靓, 范红, 陈知行, 等. 华西医院 5 年耐甲氧西林金黄色葡萄球菌医院感染调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(9): 1151-1154.

[4] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 736-762.

[2] 张五星, 陈香美, 魏日胞, 等. 大鼠慢性血清病肾炎模型的改进研究[J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(3): 138-141.

[3] Kaissling B, Lehir M, Kriz W. Renal epithelial injury and fibrosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(7): 931-939.

[4] Moriyama T, Tanaka K, Iwasaki C, et al. Prognosis in IgA nephropathy: 30-year analysis of 1 012 patients at a single center in Japan[J]. PLoS One, 2014, 9(3): 91756.

[5] Guillermina YJ, Alfredo LS, Oiana G, et al. Immunoglobulin E induces VEGF producing in mast cells and potentiates their pro-tumorigenic actions through a Fynkinase-dependent mechanism[J]. J Hematol Oncol, 2013, 6(1): 56.

[6] Jiang S, Xia R, Jiang Y, et al. Vascular endothelial growth factors enhance the permeability of the mouse blood-brain barrier[J]. PLoS One, 2014, 9(2): 86407.

[7] 田艳霞, 李冉, 高俊玲, 等. 血管内皮生长因子在蛛网膜下腔出血大鼠早期脑损伤中的作用机制[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 37-40.

[8] Horita Y, Miyzaki M, Koji T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rats with protein overload nephrosis[J]. Nephrol Dial Transpl, 1998, 13(10): 2519-2528.

[9] Bai XY, Li X, Tian JW, et al. Antiangiogenic treatment diminishes renal injury and dysfunction via regulation of local AKT in early experimental diabetes[J]. PLoS One, 2014, 9(4): 96117.

[10] 邢国兰, 孙军伟, 葛秀峰. IgA 肾病患者肾组织中血管内皮生长因子与内皮素-1 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2011, 46(4): 96-98.

[11] Li M, Ji Y, Dong Y, et al. The detection of vascular endothelial growth factor in serum of patients with hemorrhagic fever with renal syndrome[J]. Inflammation, 2013, 36(4): 962-967.

[12] 赵瑾, 张莉. 血管内皮生长因子与血小板反应蛋白在间质纤维化中的表达研究[J]. 海南医学, 2013, 24(24): 3602-3604.

(收稿日期: 2014-12-10)

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S19 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

[6] 王凤玲, 李洪志, 陈洋, 等. 金黄色葡萄球菌红霉素诱导克林霉素耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(1): 100-101.

[7] 吴伟元, 吴劲松, 卢月梅, 等. 金黄色葡萄球菌和肠球菌属对 17 种抗菌药物敏感性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(6): 871-873.

[8] 孙自镛, 徐金莲, 朱旭慧, 等. 2005 年武汉同济医院细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2007, 7(4): 238-243.

[9] 朱德妹, 汪复, 胡付品, 等. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11(5): 321-329.

[10] 李娟, 韩艳. 连续 5 年金黄色葡萄球菌耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(24): 4008-4010.

[11] Timothy JF. The Staphylococcus aureus "superbug"[J]. J Clin Invest, 2004, 114(12): 1693-1696.

[12] 邹启富, 闵文静, 范文. 医院感染金黄色葡萄球菌的分布与耐药性调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(16): 2179-2180.

(收稿日期: 2014-11-15)