

• 论 著 •

肝源性溃疡黏膜中 VEGF、bFGF 表达的临床意义

陈文彬

(海口市人民医院滨江分院,海口 570208)

摘要:目的 探究肝源性溃疡中胃黏膜组织血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的表达,分析其与病情进展及患者并发症发生率的关系。**方法** 临床选取 2014 年 7 月至 2016 年 5 月 133 例肝硬化伴门静脉高压合并胃或十二指肠溃疡患者,内镜下活检溃疡边缘及正常黏膜组织为对照。采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测正常胃黏膜(133 例)、胃溃疡活动期(GA 期 52 例)、胃溃疡愈合期(GH 期 45 例)、胃溃疡瘢痕期(GS 期 36 例)患者黏膜组织 VEGF mRNA、bFGF mRNA 的表达情况,并与患者的并发症发生率行 Spearman 秩相关分析。**结果** 溃疡边缘组织 VEGF mRNA、bFGF mRNA 的表达量显著高于正常黏膜组织,差异有统计学意义($P<0.05$);GH、GS 期患者 VEGF mRNA 的表达量明显高于 GA 期患者,差异有统计学意义($P<0.05$),GS 期患者 bFGF mRNA 的表达量明显高于 GA 期患者,差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman 秩相关分析结果示 VEGF mRNA、bFGF mRNA 的表达量与患者溃疡并发症发生率呈负相关($r_s=-0.672, -0.508, P<0.05$)。**结论** VEGF mRNA、bFGF mRNA 在肝源性溃疡的修复过程中可能发挥重要的促进作用,是潜在的临床标志物。

关键词:肝源性溃疡; 血管内皮生长因子; 碱性成纤维细胞生长因子; 并发症发生率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.18.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)18-2579-03

Clinical significance of the expression of VEGF and bFGF in the mucosa of hepatogenic ulcer

CHEN Wenbin

(Binjiang Branch of Haikou People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and basic fibroblast growth factor(bFGF) in gastric mucosa of patients with hepatogenic ulcer, and to analysis the relationship between them and the incidence of complications and disease progression in patients. **Methods** During July 2014 to May 2016, 133 cases of patients with hepatocirrhosis and portal hypertension associated with gastric or duodenal ulcer were selected as study object. Marginal tissue of ulcer were collected, and normal mucosa tissue were collected as control group. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) detect the expression of VEGF mRNA and bFGF mRNA in 133 cases of normal gastric mucosa and 133 cases of marginal tissue of ulcer, including 52 cases of gastric ulcer activity period(GA), 45 cases of gastric ulcer healing period(GH) and 36 cases of gastric ulcer scar period(GS). Spearman correlation coefficient analysis the correlation between the expression of VEGF mRNA and bFGF mRNA and complication rate. **Results** The expression of VEGF mRNA and bFGF mRNA in ulcer marginal tissues was significantly higher than that in normal mucosa tissues, the difference was statistically significant($P<0.05$). The expression of VEGF mRNA in GH and GS of patients was significantly higher than that in GA patients, the difference was statistically significant ($P<0.05$), the expression of bFGF mRNA in GS of patients was significantly higher than that of GA patients, the difference was statistically significant($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed VEGF mRNA and bFGF mRNA was negatively correlated with incidence rate of ulcer complications ($r_s=-0.672, -0.508, P<0.05$). **Conclusion** bFGF mRNA and VEGF mRNA may play an important role in the repair of hepatogenic ulcer. It is a potential clinical marker.

Key words: hepatogenic ulcer; vascular endothelial growth factor; basic fibroblast growth factor; complication rate

肝源性溃疡是指在肝硬化基础上并发的消化性溃疡,临床上治疗难度大,并发症发生率高,多数研究认为肝硬化导致的胃肠道黏膜保护机制削弱是导致溃疡发生的主要原因,但其发病机制尚不完全清楚^[1]。血管内皮生长因子(VEGF)和 b-碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)均为重要的内皮细胞生长因子^[2],本试验拟探究 VEGF mRNA 和 bFGF mRNA 在溃疡发生发展不同时期的表达情况及其与患者并发症发生率的相关性,以揭示其可能的临床意义并指导临床工作。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院及海南省人民医院 2014 年 7 月至 2016 年 5 月 133 例肝硬化伴门静脉高压合并胃或十二指肠溃疡的患者溃疡边缘组织标本为溃疡组,另取距取溃疡边缘 >5 cm 处的正常组织作为对照组,取出后的样本部分用于常规病理镜检;部分置于冻存管中,液氮保存,用于提取 RNA 做反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)用。患者的胃溃疡内镜下分期根

据日本学者崎田隆夫提出的分期法,将溃疡分为活动期(GA)、愈合期(GH)、瘢痕期(GS),患者溃疡分期的情况:GA 期 52 例、GH 期 45 例、GS 期 36 例,将不同时期的患者组织纳入相应的组别。其中 GA 组患者男 29 例,女 23 例;年龄 31~70 岁,平均(47.6 $\pm$ 13.4)岁;体质量 43.8~81.1 kg,平均(56.3 $\pm$ 14.0)kg。GH 组患者男 28 例,女 17 例;年龄 33~76 岁,平均(51.3 $\pm$ 15.1)岁;体质量 46.1~77.8 kg,平均(53.9 $\pm$ 16.2)kg。GS 组患者男 22 例,女 14 例;年龄 36~72 岁,平均(50.7 $\pm$ 13.2)岁;体质量 47.5~82.7 kg,平均(59.4 $\pm$ 17.6)kg。两组患者男女比例、年龄、体质量之间差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。排除标准:(1)排除病理检查结果出现恶性病变的患者;(2)排除合并凝血功能障碍的患者;(3)排除既往经规范或非规范治疗的患者;(4)排除心肺功能或内分泌功能障碍的患者。所有患者及家属知情并同意参与此项目。本研究经本院伦理委员会批准同意开展。本研究溃疡并

发病包括：(1)急性穿孔；(2)上消化道出血；(3)幽门梗阻。

1.2 主要试剂 逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司,Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit)、定量 PCR 试剂盒(美国 BioRad 公司,iQ SYBR Green Supermix)、RNAiso Plus(日本 TAKARA 公司,Code No. 9108)。

1.3 检测方法 RNA 提取方法：(1)收集的组织样本 2~3 mg 液氮下研磨至粉末,加入 RNAiso Plus 1 mL；(2)室温静置 5 min,12 000 r/min 4℃离心 5 min,上清液转移至 1.5 mL 离心管中；(3)加入 200 μL 氯仿,震荡混匀；(4)室温静置 5 min,12 000 r/min 4℃离心 15 min,上清液转移至新的离心管中；(5)加入 500 μL 异丙醇,室温静置 10 min,12 000 r/min 4℃离心 10 min；(6)弃上清,加入 1 mL 75%乙醇溶液清洗沉淀,7 500 r/min 4℃离心 5 min；(7)弃上清,保留沉淀,30 μL 无核酶水溶解。分光光度计测定 RNA 浓度。取 5 μg RNA 使用逆转录试剂盒进行逆转录,得到 cDNA 后利用荧光定量 PCR 仪检测 mRNA 水平。反应条件：预变性 94℃ 4 min,扩增条件：94℃ 30 s,60℃ 1 min,40 个循环。VEGF mRNA 上游引物序列：5'-GGG CGC GCC GCG GAG GGG GTG CTG G-3'；下游引物序列：5'-AGA CCC TGG TTG CCA GGT CAT GCG G-3'；扩增引物大小为 249 bp。bFGF mRNA 上游引物序列：5'-GGA GCC CAG GGA ATG CCA AAG CCC T-3'；下游引物序列：5'-GCA GGT GGA AAG ATC TGA TCT TGG A-3'；扩增引物大小为 211 bp。以 β-actin 为内参基因,其上引物序列为 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3'；下游引物序列为 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'；目标片段大小为 186 bp。VEGF mRNA 及 bFGF mRNA 的相对表达量为其与内参基因 β-actin 的 CT 值比值计算,采用 2^{-ΔΔCT} 法。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计分析软件,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验比较两组患者 RT-PCR 检查结果差异,方差分析比较多组患者 RT-PCR 检查结果差异,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验；Spearman 秩相关分析患者 VEGF mRNA、bFGF mRNA 水平的表达与患者并发症发生率间的关系。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组与溃疡组患者 VEGF mRNA 及 bFGF mRNA 表达水平比较 RT-PCR 检查结果显示,对照组患者 VEGF mRNA 表达水平(0.084±0.061)ng/mL 显著低于溃疡组(0.218±0.043)ng/mL,差异有统计学意义(*P*<0.05)；对照组患者 bFGF mRNA 表达水平(0.118±0.072)ng/mL 显著低于溃疡组(0.204±0.067)ng/mL,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 对照组与溃疡组患者溃疡组织 VEGF bFGF mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$,ng/mL)

组别	<i>n</i>	VEGF mRNA	bFGF mRNA
对照组	133	0.084±0.061	0.118±0.072
溃疡组	133	0.218±0.043	0.204±0.067
<i>t</i>		12.110	8.592
<i>P</i>		0.000	0.000

2.2 溃疡组 GA、GH、GS 期患者 VEGF mRNA 及 bFGF mRNA 表达水平比较 进一步比较溃疡组患者各个发展阶段 VEGF mRNA 及 bFGF mRNA 的表达水平,RT-PCR 检查结果显示,GH、GS 期患者 VEGF mRNA 表达水平[分别为(0.262±0.021),(0.272±0.033)ng/mL]显著高于 GA 期患者(0.175±0.029),差异有统计学意义(*P*<0.05)；GH 期与

GS 期 VEGF mRNA 表达水平差异无统计学意义(*P*>0.05)。GS 期患者 VEGF mRNA 表达水平(0.244±0.032)ng/mL 显著高于 GA 期患者(0.180±0.042)ng/mL,差异有统计学意义(*P*<0.05)。GH 期(0.193±0.079)bFGF mRNA 表达水平与 GA、GS 期相比差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表 2。

表 2 GA、GH、GS 期患者 VEGF mRNA 及 bFGF mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$,ng/mL)

组别	<i>n</i>	VEGF mRNA	bFGF mRNA
GA	52	0.175±0.029	0.180±0.042
GH	45	0.262±0.021	0.193±0.079
GS	36	0.272±0.033	0.244±0.032
<i>F</i>		8.621	5.146
<i>P</i>		0.000	0.003

2.3 VEGF mRNA、bFGF mRNA 表达水平与患者并发症发生率的相关性分析 对未丢失的 116 例患者进行 VEGF mRNA、bFGF mRNA 表达水平与并发症发生率的相关性分析,Spearman 秩相关分析结果显示 VEGF mRNA 表达水平与患者并发症发生率呈负相关关系(*r_s*=-0.672,*P*<0.05)；bFGF mRNA 表达水平患者并发症发生率呈负相关关系(*r_s*=-0.508,*P*<0.05)。

3 讨 论

肝源性溃疡发病率较健康人高 2~3 倍^[3],是肝硬化致上消化道出血的常见原因。关于肝硬化致胃或十二指肠溃疡的发病机制研究很多,主要包括以下几种因素：(1)肝硬化致门静脉高压,黏膜下动、静脉组织充血水肿,局部血流量不足且黏膜层血流减少,导致血液循环及营养供应发生障碍^[4],加之黏膜防御机制减弱,胃酸及胃蛋白酶发生“自我消化”,进而形成溃疡^[5]；(2)其次患者肝功能不全,导致灭活血中胃泌素、5-羟色胺等促胃酸分泌物质的能力大大减弱,促进胃酸分泌,加重黏膜的损伤^[6]；(3)肝硬化所致的低蛋白血症,加重组织水肿缺血的过程,进一步削弱黏膜防御机制,促进溃疡的形成^[7]；(4)肝功能障碍使 T 细胞活性不足,B 细胞功能亢进,免疫平衡失调,机体免疫能力下降^[8],使幽门螺杆菌增殖,通过直接侵袭胃黏膜和分泌尿素酶等加重胃黏膜的损伤,促进溃疡的发生^[9]；(5)免疫失调也导致肠源性内毒素增多,加之低蛋白血症,肠壁通透性增加,内毒素入血导致内毒素血症的发生,内毒素血症不仅导致组织缺血缺氧,而且促使门静脉高压的加重,导致门静脉淤血形成黏膜溃疡^[10]。这些因素导致肝源性溃疡患者较易出现溃疡复发、迁延不愈或合并并发症。

VEGF 具有强大的促血管生成的作用,对血管内皮细胞有特殊的专一性^[11],对溃疡的愈合起着重要的作用,有报道显示,VEGF 能促进胃肠黏膜上皮细胞增生并维持胃肠道的完整性,增加胃黏膜血流量^[12]。本研究显示溃疡组织 VEGF mRNA 的表达显著高于正常组织,且愈合期及瘢痕期 VEGF mRNA 表达显著高于活动期,提示 VEGF 可能在溃疡愈合的过程中发挥一定的作用。所以,本研究对 VEGF mRNA 和患者并发症发生率进行了相关性分析,结果两者存在负相关关系,提示 VEGF 在溃疡愈合中发挥积极作用。bFGF 是一种细胞生长调节因子,对中胚层来源的细胞具有较强烈地促增殖和分化作用的,可以有效地促进血管再生和新生肉芽组织的形成^[13],本研究显示溃疡组织 bFGF mRNA 表达显著高于正常组织,且愈合期 bFGF mRNA 表达显著高于活动期,提示 bFGF 在愈合的过程中发挥一定作用,bFGF mRNA 与患者并发症发生率的相关性为负相关关系,提示 bFGF 在溃疡愈合中起积极作用。

综上所述, VEGF 和 bFGF 在溃疡的愈合中发挥着重要的作用, 临床可以围绕这两种分子开展工作, 阐明其发挥修复作用的具体机制, 揭示其可能存在的相互作用分子, 可以为药物的研发及临床的诊断和治疗提供新的依据。

参考文献

- [1] Holland-Bill L, Christiansen CF, Gammelager H, et al. Chronic liver disease and 90-day mortality in 21,359 patients following peptic ulcer bleeding—a Nationwide Cohort Study[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2015, 41(6): 564-572.
- [2] Ng CT, Yip WK, Mohtarrudin N, et al. Comparison of invasion by human microvascular endothelial cell lines in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in a three-dimensional (3D) cell culture system[J]. Malays J Pathol, 2015, 37(3): 219-225.
- [3] Fleig WE, Stange EF, Winkler K. Is there a hepatogenic ulcer: prospective study of the incidence of peptic ulcer in portal hypertension[J]. J Gastroenterol, 1987, 25(Suppl 3): S47-51.
- [4] Bang CS, Baik GH, Kim JH, et al. Peptic ulcer disease in liver cirrhosis and chronic hepatitis: impact of portal hypertension[J]. Scand J Gastroenterol, 2014, 49(9): 1051-1057.
- [5] Trebicka J, Wix C, Von Heydebrand M, et al. Expression of vasoactive proteins in gastric antral mucosa reflects vascular dysfunction in patients with cirrhosis and portal hypertension[J]. Liver Int, 2015, 35(4): 1393-1402.
- [6] Mcleland SM, Lunn KF, Duncan CG, et al. Relationship among serum creatinine, serum gastrin, calcium-phosphorus product, and uremic gastropathy in cats with chronic

- kidney disease[J]. J Vet Intern Med, 2014, 28(3): 827-837.
- [7] Seow JG, Lim YR, Shelat VG. Low serum albumin May predict the need for gastric resection in patients with perforated peptic ulcer[J]. Eur J Trauma Emerg Surg, 2016, 11(2): 1-6.
- [8] Herkel J. Regulatory T cells in hepatic immune tolerance and autoimmune liver diseases[J]. Dig Dis, 2015, 33(Suppl 2): S70-74.
- [9] Chang SS, Hu HY. H. pylori eradication lower ulcers in cirrhosis[J]. J Dig Dis, 2014, 15(8): 451-458.
- [10] Du Y, Zhao W, Lu L, et al. Study on the antiulcer effects of Veronicastrum axillare on gastric ulcer in rats induced by ethanol based on tumor necrosis factor- α (TNF- α) and endothelin-1 (ET-1)[J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2013, 3(12): 925-930.
- [11] Tanaka M, Kanazashi M, Maezawa T, et al. Abnormalities in three-dimensional capillary architecture and imbalance between vascular endothelial growth factor-A and thrombospondin-1 in soleus muscle of ovariectomized rat[J]. Acta Histochem, 2015, 117(7): 605-611.
- [12] Tarnawski AS, Ahluwalia A, Jones MK. Angiogenesis in gastric mucosa: an important component of gastric erosion and ulcer healing and its impairment in aging[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, 29(Suppl 4): S112-123.
- [13] Guo ZY, Yao GD, Fu LP, et al. Effect of recombinant human endostatin on the expression of c-Myc and bFGF in mouse gastric cancer cells[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(2): 5258-5265.

(收稿日期: 2017-03-02 修回日期: 2017-05-12)

(上接第 2578 页)

- et al. Variability of pathologists' utilization of p16 and Ki-67 immunostaining in the diagnosis of cervical biopsies in routine pathology practice and its impact on the frequencies of cervical intraepithelial neoplasia diagnoses and cytohistologic correlations[J]. Arch Pathol Lab Med, 2014, 138(1): 76-87.
- [5] 马莉娟, 何金彩, 柴泽英. 细胞分化抑制因子-1 与细胞增殖核抗原 Ki-67 在宫颈癌中的表达及相关性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(8): 627-630.
- [6] Ma XF, Zhang J, Shuai HL, et al. IKK beta/NF-kappa B mediated the low doses of bisphenol A induced migration of cervical cancer cells[J]. Arch Biochem Biophys, 2015, 573: 52-58.
- [7] Yuan J, Wu CF, Huang ML, et al. TSP50 depends on its threonine protease activity and its interactions with TNF- α -induced NF- κ B for its role in human cervical tumorigenesis[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(2): 891-896.
- [8] Park JM, Yang SW, Yu KR, et al. Modification of PCNA by ISG15 plays a crucial role in termination of Error-Prone translesion DNA synthesis[J]. Mol Cell, 2014, 54(4): 626-638.
- [9] Unek G, Ozmen A, Mendilcioglu I, et al. Immunohisto-

- chemical distribution of cell cycle proteins p27, p57, cyclin D3, PCNA and Ki67 in normal and diabetic human placentas[J]. J Mol Histol, 2014, 45(1): 21-34.
- [10] 杨燕芬, 邱毅, 佟雁, 等. HPV 多重感染与宫颈病变的关系研究[J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(2): 254-256.
- [11] 徐静, 李磊, 张丽, 等. 不同 CIN 分级宫颈病变组织中 hTERT 基因表达及意义[J]. 山东医药, 2014, 54(14): 43-45.
- [12] 魏聪, 刘远程, 王友强, 等. 宫颈病变中 PCNA、Ki-67 的表达及其与 HPV 感染的相关性分析[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(22): 3873-3876.
- [13] 付敏, 杨彪, 杨宗桥. 人乳头状瘤病毒感染与宫颈病变临床价值的研究[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(18): 2875-2877.
- [14] 金士杰, 陶秀坤, 李存肖, 等. P16 表达与宫颈病变的相关性及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(18): 2944-2945.
- [15] 董永学. 宫颈病变 PCNA、Ki-67 表达检测及其与 HPV 感染相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(21): 3083-3085.

(收稿日期: 2017-02-21 修回日期: 2017-05-02)