维普资讯 http://www.cqvip.com

·论 著·

外源性 VEGF 对自体移植脾组织血管再生的影响

郭光金，蒋登金，姜 恒，左艳芳 （第三军医大学基础医学部外科应用解剖与手术学教研室，重庆 400042）

［摘 要］ **目的** 探讨应用外源性 VEGF 促进自体脾组织移植后血管再生与结构重建的影响，为 VEGF 用于自体移植脾组织的实验研究和临床应用提供理论参考依据。**方法** 采用 216 只昆明种小白鼠随机分为脾切除自体脾组织移植组和假手术组，再将脾移植组分为实验组和对照组。实验组小鼠分别于术后 7、14、30、60 d 于尾静脉内注射 VEGF，注射后 7、15、30、60、90 d 取脾组织标本。进行组织学观察、血管面密度测定、免疫组化染色方法 KDR 的检测、KDR 阳性细胞密度测定、组织原位杂交技术 KDR mRNA 检测。**结果** 术后 7、15、30 d 注射 VEGF 组 注射 VEGF 后较对照组的血管数量明显增多；术后 60 d 注射 VEGF 组注射 VEGF 后与对照组各时相点的组织学特征没有明显差别；术后 7、15、30 d 注射 VEGF 组 KDR 面积密度值高于对照组，术后 60 d 注射 VEGF 组 KDR 面密度值与对照组比较无显著差别；术后 7、15、30 d 注射 KDR mRNA 表达阳性细胞密度高于对照组，术后 60 d 注射 VEGF 组 KDR mRNA 表达阳性细胞密度与对照组比较没有明显差异。**结论** 外源性 VEGF 能够促进移植脾组织内血管生长，自体脾组织移植术后 7～15 d 开始静脉应用 VEGF 是促进血管再生的较理想时间；外源性 VEGF 可能是通过与移植脾组织内所表达的 KDR 结合发挥作用。

［关键词］ 自体移植脾组织；血管再生；VEGF；KDR；小鼠
［中图分类号］ R657.6；S857.134 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672－5042(2006)01－0001－03

Effects of exogenous VEGF on vascular regeneration in autotransplanted splenic tissues of mice

GUO Guang-jin, JIANG Deng-jin, JIANG Heng, ZUO Yan-fang (Department of Surgical Anatomy and Surgery, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects, the feasibility and the mechanism of exogenous VEGF on vascular regeneration and reconstruction of the splenic tissues during the process of splenic autotransplantation into the greater omentum. **Methods** A total of 216 healthy Kunming mice were randomized into splenic tissue autotransplantation + VEGF group (named as VEGF group), splenic tissue autotransplantation group (control group) and sham operation group. The mice in VEGF group were injected with exogenous VEGF into the caudal veins on day 7, 15, 30, 60 respectively after operation. Three mice of 3 groups were killed and the splenic tissue was taken as specimen on day 7, 14, 30, 60, 90 after injection of exogenous VEGF to conduct the following investigations. The morphologic changes in autotransplanted splenic tissue were observed under light microscope and electron microscope. After intubation was conducted through left ventricle and right atria was opened and lavaged with Chinese ink, the splenic tissue pieces were made and the area density of blood vessel was tested by using computer image system. The density of KDR positive cells was tested by immunohistochemical methods and computer image analysis. The expression of KDR mRNA were investigated and analyzed by in situ hybridization to study exogenous VEGF on KDR mRNA expression. **Results** On day 7, 15, 30 after injection with exogenous VEGF, the mice in VEGF group were found more renascent blood vessels, splenic corpuscles, central arteries and peripheral lymphatic sheathes in the autotransplanted splenic tissues than the control group, and eventually formed more integral structure of white pulp, marginal zone and red pulp with much less fibrous tissue, while on day 60 there was no significant difference between VEGF group and the control group. On day 7, 15, 30 after injection, the renascent blood vessels were more in number, the KDR area density and the KDR mRNA expression in splenic tissues were higher in VEGF group than the control group, while on day 60 there were no significant differences in the area density of renascent blood vessel, the KDR area density and the KDR mRNA expression between the two groups. **Conclusion** The exogenous VEGF can enhance the vascular regeneration and reconstruction of the autotransplanted splenic tissues into the greater omentum. The day 7 to day 15 after the autotransplantation of splenic tissues was the ideal period for the venous injection of exogenous VEGF that can make its effects through elevating the expression of KDR mRNA.

Keywords: splenic autotransplantation; regeneration; VEGF; KDR; mouse

脾脏是人体最大的免疫器官。脾脏损伤或切除后会导致机体免疫力降低，当脾脏严重创伤时自体脾组织移植手术已经得到广泛的认可，自体移植脾组织通过变性、坏死、再生基本能恢复原位脾组织的主要结构特征并能够部分地恢复其功能。VEGF（血管内皮细胞生长因子）能与相应的受体（KDR）结合后有助于新生血管的形成[1]。因此，本研究拟静脉注射外源性

［作者简介］ 郭光金（1953－），男，四川省叙永县人，教授，硕士，主要从事脾创伤脾移植方面的研究。电话：(023)68752251
［收稿日期］ 2005－10－05 ［修回日期］ 2005－11－19

维普资讯 http://www.cqvip.com

VEGF，观察移植脾组织内血管再生与组织结构重建的变化特点，探索应用外源性 VEGF 促进移植脾组织内血管再生的能力，为临床提供实验资料和理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康昆明种小鼠 216 只（第三军医大学动物所提供），雌雄不限，体重 15～25 g，按实验设计分为自体脾组织移植＋VEGF 组（实验组）、自体脾组织移植组（对照组）和假手术组。实验组和对照组均在无菌条件下行脾切除自体脾组织移植术，取其中间切除脾脏约 50%，切成 1 mm×1 mm×1mm 大小均匀脾组织颗粒，植入大网膜内。实验组于术后 7、15、30、60 d 从尾静脉注入 VEGF，每组给药 7 d，2 次·d^{-1}，每次 1 ng。注射后 7、15、30、60、90 d 各处死 3 只，取移植脾组织标本进行观测；假手术组小鼠仅松动脾脏，不行其他手术处理。

1.2 组织形态学观察

每组按上述时相点各取 3 只小鼠，麻醉下放血取脾组织标本，常规福尔马林固定，石蜡包埋切片，HE 染色，光镜观察每组动物各时相点的脾组织结构特征。应用透射电镜观察血管内皮细胞的超微结构特征。

1.3 血管密度测定

每组各时相点分别取小鼠 3 只，经左心室行主动脉插管，灌注墨汁福尔马林混悬液，直至小鼠唇、肢端变黑后，切取移植脾组织标本，石蜡包埋切片，进行计算机图象分析测定血管面密度。

1.4 KDR 的检测

每组各时相点分别取脾切除自体脾组织移植组小鼠 3 只及对照组小鼠 3 只，腹腔注射麻醉，取脾组织福尔马林固定，常规石蜡包埋、切片，免疫组化 ABC 法抗 KDR 抗体染色，光镜观察，采用医学图象分析系统，对不同时相点免疫组织化学 KDR 面密度。

1.5 KDR mRNA 的原位杂交检测

术后每时相点分别取脾切除自体脾组织移植组小鼠 3 只及对照组小鼠 3 只，腹腔注射麻醉，取脾组织冰冻切片，原位杂交地高辛染色，光镜观察，采用医学图象分析系统，原位杂交所得 KDR mRNA 面密度进行图象分析定量。

1.6 数据分析及统计处理

计量数据以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用 SPSS 统计数据包对所得数据进行单因素方差分析，$P<0.05$ 为相差显著，$P<0.01$ 为相差非常显著。

2 结果

2.1 组织学观察

术后 7、15、30 d 注射 VEGF 组：注射 VEGF 后较对照组的血管数量明显增多，脾小体、中央动脉及其周围淋巴鞘的数量也增多，面积增大，最终形成了较完整的白髓、边缘区、红髓结构（图 1）。术后 60 d 注射 VEGF 组：注射 VEGF 后与对照组各时相点的组织学特征没有明显差别。

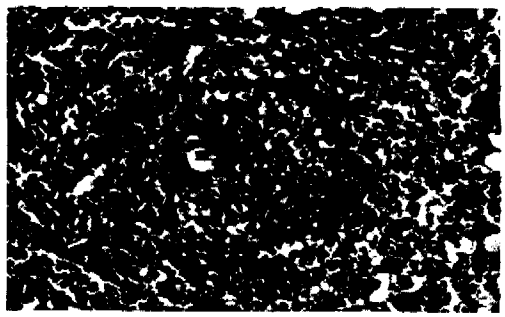


图 1 自体脾组织移植术后 7 d 注射 VEGF 组，最后一次注射 VEGF 后的第 30 天（即术后 44 d）坏死的脾组织完全消失，可见明显的脾小体、中央动脉（⇨）及其周围淋巴鞘（➡）形成，其面积较小。HE×200

2.2 血管面密度测定

术后 7、15、30 d 注射 VEGF 组：墨汁灌注显示血管数量及面密度实验观察组较对照组明显增多。术后 60 d 注射 VEGF 组：血管数量与对照组比较没有明显差别。

2.3 KDR 表达的检测

术后 7、15、30 d 注射 VEGF 组：KDR 面积密度值高于对照组。术后 60 d 注射 VEGF 组：KDR 面密度值与对照组比较无显著差别，见表 1。

表 1 术后 30 d 静脉注射 VEGF 后各时相点 KDR 面密度（$\bar{x}\pm s$）

组别	最后一次静脉注射 VEGF 后的测定时间(d)					
	1	7	14	30	60	90
实验组	8.04±0.23△	10.61±0.31△	11.73±0.29*	9.64±0.14*	5.26±0.03*	2.89±0.05*
对照组	6.05±0.03	8.88±0.13	10.51±0.09	9.72±0.04	6.42±0.21	2.25±0.03
假手术组	2.09±0.04#	2.10±0.08#	2.08±0.12#	2.07±0.16#	2.09±0.06#	2.05±0.06#

*：与对照组各时相点比较 $P>0.05$；#：与对照组和实验组各时相点比较 $P<0.01$；△：与对照组比较 $P<0.01$

2.4 KDR mRNA 检测

术后 7、15、30 d 注射：KDR mRNA 表达阳性细胞密度高于对照组。术后 60 d 注射 VEGF 组：KDR mRNA 表达阳性细胞密度与对照组比较无显著差异（图 2）。

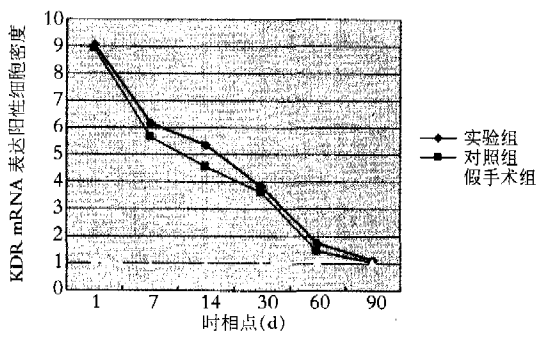


图 2 术后 60 d 静脉注射 VEGF 后各时相点 KDR mRNA 表达阳性细胞密度

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨论

脾脏是是免疫活性细胞增殖分化的场所,临床及实验研究证明脾脏具有抗感染免疫功能、抗肿瘤免疫功能和抗血友病功能等。自体脾组织大网膜内移植作为脾脏损伤后的一种最常见的保脾术式,已经被广泛认可和应用,移植成功的脾组织能够部分恢复脾脏的免疫功能。充分的血管再生不仅为自体移植脾组织的存活、再生和结构重建提供血供,而且可以形成较完整的血脾屏障,为脾组织免疫功能的发挥提供形态学基础[2-3]。本实验对小鼠移植脾组织进行墨汁灌注、组织切片、光镜观察,其结果也证实了自体移植脾组织形态结构重建与血管再生的关系密切。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是高度特异的血管内皮细胞有丝分裂素,具有促血管形成的作用,血管再生包括内皮细胞的激活、增殖、迁移、血管和血管网的形成,以及血管网的连接等复杂过程,VEGF在血管再生中起重要作用[4]。VEGF的半衰期很短且分泌量较少,单纯内源性VEGF表达的增加常常不足于尽快建立侧枝循环。本实验将VEGF通过小鼠尾静脉注射使其到达目标组织细胞发挥其生物活性,观测VEGF对脾切除自体移植脾组织血管再生的影响。结果显示:术后7 d注射VEGF组,注射VEGF后的第1~7 d(即术后14~21 d)与单纯脾切除自体脾组织移植组比较,镜下组织结构特征没有明显差别;注射VEGF后14 d(即术后28 d)自体移植脾组织血管数量较单纯脾切除自体脾组织移植组增多;注射VEGF后30~60 d(即术后44~74 d)可见明显的脾小体、中央动脉及其周围淋巴鞘形成逐渐数量增多,血管数量进一步增加;注射VEGF后的第90 d(即术后104 d),形成了较完整的白髓、边缘区、红髓结构;术后15、30 d注射VEGF组注射VEGF后自体移植脾组织学特征的变化规律与前大致相同,术后60 d注射VEGF组注射VEGF后与对照组各时相点的组织学特征没有明显差别,表明了外源性VEGF能够促进移植脾组织内血管生长,有利于移植脾组织再生。自体脾组织移植术后7~15 d开始静脉应用VEGF是促进血管再生的较理想时间。但是,静脉应用VEGF多长时间最佳,还需进一步探讨。

Flk-1/KDR是人体内的VEGF受体形式,它在鼠类中的同源产物是Flk-1,特异表达于血管内皮细胞,是血管形成的主要调控因子[4]。本实验采用免疫组化和原位杂交结果显示,观测外源性VEGF对自体移植脾组织KDR的影响明显。术后7 d + VEGF组在注入外源性VEGF后各个时相点与对照观察组比较,KDR阳性细胞表达均有所增加,相差显著。术后15、30 d + VEGF组在注入外源性VEGF后与对照观察组比较,KDR阳性细胞表达增加,相差较显著。术后60 d + VEGF组在注入外源性VEGF后与对照观察组比较,KDR阳性细胞表达增加不明显。从原位杂交结果来看与免疫组化结果大致相似。从实验检测结果得知外源性VEGF对自体移植脾组织中的KDR mRNA表达有明显促进作用。术后用VEGF组与对照组之间的KDR mRNA在表达量上却具有明显差异,说明应用外源性VEGF促进KDR mRNA表达的作用强于内源性。本实验观察发现:术后7、15、30 d注射VEGF组较单纯脾切除自体脾组织移植组血管数量明显增多。从本实验结果看,自体移植脾组织通过血管再生、细胞增生结构逐渐恢复,局部形成良好的血供有利于自体移植脾组织结构重建及功能恢复[5-6]。本实验还通过对移植脾组织KDR免疫组化检测及KDR mRNA组织原位杂交检测,采用半定量图像分析发现,术后7、15、30 d注射VEGF组,注射VEGF后KDR面密度值及KDR mRNA表达阳性细胞密度均高于对照组。说明外源性VEGF对自体移植脾组织中的KDR mRNA表达有明显促进作用。本实验结果可供临床和实验研究参考。

[参考文献]

[1] 张 坤,郭光金,余汇洋,等. 自体移植脾组织VEGF、KDR表达与血管再生的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志,2003,9(2):95.

[2] 郭光金,蒋登金,张 坤,等. 自体移植脾组织血脾屏障重建的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2002,24(21):1451-1453.

[3] Marques RG, Petroianu A, Coelho JM, et al. Regeneration of splenic autotransplants[J]. Ann Hematol, 2002, 81(11): 622-626.

[4] Lip PL, Chatterjee S, Caine GJ, et al. Plasma vascular endothelial growth factor, angiopoietin-2, and soluble angiopoietin receptor tie-2 in diabetic retinopathy: effects of laser photocoagulation and angiotensin receptor blockade[J]. Br J Ophthalmol, 2004, 88(12): 1543-1546.

[5] 兰阳军,陈维佩,郭光金. 自体脾组织移植后再生的实验研究[J]. 局解手术学杂志, 2004, 13(1): 25-27.

[6] 蒋登金,郭光金,王 林,等. 大网膜内植入自体脾组织与原位脾组织的结构比较[J]. 解剖学杂志,2004,27(2):180-183.

(编辑:蒋登金)