维普资讯 http://www.cqvip.com

中国局解手术学杂志 2001 年第 10 卷第 4 期
Chin J Regional Anat & Operative Surg,2001,Vol. 10,No.4

血管内皮细胞生长因子 mRNA 在门脉高压脾脏中的表达

韩殿冰　孙学军*

【摘要】 目的 了解血管内皮细胞生长因子 mRNA 在门脉高压脾脏中的表达。方法 逆转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测 20 例门脉高压小鼠脾脏 VEGFmRNA 表达。结果 有 18 例巨脾组织表达 VEGF mRNA，表达率为 90%；2 例无表达。对照组为零。两组间有显著差异($p<0.01$)。结论 VEGF 在门脉高压所致的脾肿大中起重要作用，通过诱导内皮细胞通透性和内皮细胞的增生，促进脾脏的肿大。

【关键词】 门脉高压；脾脏；血管内皮细胞生长因子

Expression of vascular endothelial cell growth factor mRNA in spleens of portal hypertension mice *Han Dianbing,Sun Xuejun. Department of General Surgery , the 89th hospital PLA.Weifang , 261021*

【Abstrct】 **Objective** To explore the expression of vascular endothelial cell growth factor mRNA in spleen of portal hypertension mice .**Methods** VEGF mRNA of spleens in portal hypertension rice were detected by transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Expression of VEGF mRNA in proliferative spleens were found in 90% of mice ,whereas, not found in control group. **Conclusion** High expression of VEGF plays an important role in the splenic proliferation in portal hypertension.

【Key words】 portal hypertension; spleen; VEGF

血管内皮细胞生长因子(vascular endonthelial growth factor，VEGF)是近年来发现的能影响新生血管形成的可溶性生长因子，又称血管通透因子(vascular permeability factor，VPF)。目前的研究多集中在与恶性肿瘤关系方面。门脉高压症肿大的脾脏血供丰富，是否与 VEGFmRNA 有关。门脉高压造成的脾脏肿大其确切的机理至今不甚明了[1]，本文试图就 VEGFmRNA 的表达在门脉高压所致的脾脏肿大中的作用中做一探讨。

材料与方法

一、材料

PTC-2000DNA 扩增仪，8000R 低温离心机(美国产)

2F-4 紫外线分光光度计(上海产)

PCR 引物引物序列：VEGF 正向引物为 5′ TTGCTGCTCTACCTCCAC3′，反向为 5′ AATGC TTTCTCCGCTCTG3′(均由中科院上海植物研究所合成)

β -actin 正向引物为 5′ ctattgg CAACGAGCG GTTC 3′ 反向为 5′ CTTAGGAGTGGGGGTGGCT T 3′

Tag 酶，DNTP，OligdT,Rnasin,AMV 逆转录酶(AMV-RT)(均为美国 Promega 公司产品)

RNA 抽提试剂盒(德国 Qiagen 公司)

二、方法

1．动物模型：20 只昆明种健康小鼠,皮下注射 60%$CCL_4$0.3ml/100g(首剂加倍)，每隔 3d 一次，共 25 次[2]。对照组 20 只同样方法注射生理盐水。病理证实 20 只形成肝硬化并脾大，取脾脏置液氮保存备用 。

2、RNA 抽取及鉴定：按试剂盒说明进行，抽提 RNA 存 -80℃备用。总 RNA 经紫外线分光光度计定量。

3．RT-PCR: 总 RNA2 μg+AMV 逆转录酶 10U+4 种 dTP(每种浓度 10mmol/L)2 μl+OligdT1 μl+Rnasin 20U+ 逆转录酶缓冲液 1 μl,加双蒸水至 20 μl,42℃反应 45min,95℃加热 5min,以灭活转录酶。2.5 μl 逆转录产物用于 PCR，25 μl 反应体积中包括 2mmol/LdNTP2.5 μl，正反向引物各 25pmol,Tag 酶 2U(SABC)，10 × PCRbuffer2.5 μl. PCR 反应条件 94℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 1min15s，30 个循环，最后 72℃延伸 7min[3]。

4．RT-PCR 扩增产物：PCR 产物,用紫外线分析仪观察结果。

* 作者单位：261021 山东省潍坊市解放军第 89 医院普外科

维普资讯 http://www.cqvip.com

结　果

一、组织总RNA定量

提取的总RNA经紫外线分光光度计测定，浓度为2.7～5.6 μg/μl，平均3.6 μg/ μl。

二、 RT-PCR VEGFmRNA在巨脾中的表达

20例巨脾18例表达VEGFmRNA，2例无表达。对照组无一例表达。差异显著（$p<0.01$）。内标基因β -actin作为内部对照,所有组织标本均有表达。

讨　论

VEGF在体内的生物学功能主要是促进血管生成，这是由于VEGF能引起血管内皮细胞的增殖及促血管生成机制所决定的。

血管内皮细胞的表面存在着VEGF受体，VEGF通过与VEGF受体结合而引起受体的磷酸化，激活丝裂原活化的蛋白激酶，实现VEGF丝裂原特性，诱导血管内皮细胞的增殖。VEGF除了引起血管内皮细胞的增殖外，还参与血管形成。VEGF又称VPF，他能增加微血管内皮细胞的通透性，使血浆蛋白溢出血管外，导致纤维蛋白在血管外凝结，形成血管形成的临时基质。这种基质一方面促血管形成，另一方面促使一些间质细胞进一步形成成熟的血管基质，有利于血管生成[3]。

大量资料表明VEGF与肿瘤血管形成有密切的关系，在肿瘤组织可发现VEGF的过量表达。不仅如此，低氧、低血糖是VEGF表达的强有力的诱导因子[5]。通过对低氧条件下的人视网膜上皮细胞、星型角质细胞、鼠心基质细胞表达的VEGFmRNA的监测显示，低氧能诱导VEGFmRNA表达。低血糖低氧是诱导神经角质细胞的VEGFmRNA表达，并延长VEGFmRNA半衰期的因素[5]。肝硬化门脉高压状态下脾脏的血液流变学发生了明显变化，血液在脾内循环时间明显延长，正常脾血循环时间平均为2分钟，而脾肿大者可延长1小时以上，脾血循环时间延长不仅使血细胞阻留增多，而且经试验证实病变脾脏每单位体积的摄氧量也下降，脾血的葡萄糖浓度低，酸度高[1]。结合本试验结果可推测门脉高压状态下，脾脏淤血引起的低氧低血糖诱导了VEGFmRNA的高度表达，产生的大量VEGF形成了大量血管，为脾脏的病理性增大创造了条件。新生成的迂曲、畸形[4]的血管又进一步造成了脾脏淤血，更严重的脾脏淤血引起的低氧低血糖又诱导了VEGFmRNA的高度表达，如此形成恶性循环。有2例肿大脾脏无VEGFmRNA的表达，说明在门脉高压引起脾脏肿大的因素中除VEGF外还有其他因素，是多种因素作用的结果。

综上所述，门脉高压状态下脾脏淤血导致的低氧低血糖诱导了VEGFmRNA的高度表达，VEGF作用下形成的丰富血管是门脉高压状态下脾脏肿大的原因之一。

参考文献

1、夏穗生，曹秀峰，姜洪池. 现代脾脏外科学，南京：江苏科学技术出版社，2000.162、
2. 胡颖，王秀玲，李定国，等、钙拮抗剂对大鼠肝硬化模型门脉高压的实验研究. 中华消化杂志，1995,15(2)：89、
3. 夏圣，顾可梁，郝顺祖. 血管内皮生长因子的研究进展. 国外医学临床生化与检验学分册，1997,14(4)：161-163.
4. 王忠，张元芳，孔宪国，等. 血管内皮细胞生长因子mRNA在肾细胞癌中的表达. 中华泌尿外科杂志，1998,19(4):202-204
5. Takahashi A,Sasaki H,Kim J,et al. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vscular endothelial growth factor and placeta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogennesis. Cancer Res, 1994,543：4233.

（收稿：2001-09-10）