

血管内皮生长因子及受体在大鼠衰老肾脏的表达

何凤屏, 李 山, 曾志羽, 陈宇明, 冼 苏, 尹瑞兴
(广西医科大学第一附属医院临床实验中心, 广西南宁 530021)

摘要:【目的】研究血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR)在大鼠衰老肾脏的表达及探讨它们在肾脏衰老中的作用。【方法】取 3 月龄、12 月龄大鼠作为对照组, 24 月龄大鼠作为观察组各 6 只, 提取其肾脏组织的 RNA, 应用逆转录聚合酶链反应技术(RT-PCR)检测肾脏组织内 VEGF mRNA 转录水平, 以及应用免疫组化技术检测肾小球 VEGF 和 VEGFR 蛋白的表达; 应用酶联免疫法检测肾组织培养液的 VEGF 总含量。【结果】3、12、24 月龄的大鼠 VEGF 总的含量(g/L)分别为 126.49±32.29, 95.14±49.17, 79.21±61.17, $P = 0.048$ 。3、12、24 月龄的大鼠 VEGF mRNA 表达量(g/L)分别是 0.821±0.132, 0.713±0.143, 0.678±0.126, $P = 0.012$ 。24 月龄组 VEGF mRNA 和 VEGF 总含量较 3、12 月龄两组减少 ($P < 0.05$); 24 月龄大鼠肾小球 VEGF 和 VEGFR-2 的表达较 3、12 月龄两组减弱。【结论】证实了随着增龄大鼠肾组织 VEGF mRNA 转录水平和 VEGF 含量减少, 肾小球 VEGF-VEGFR 的表达量也随着增龄而减少。肾小球 VEGF-VEGFR 系统在肾脏衰老过程中起到重要的作用。

关键词: 血管内皮细胞生长因子; 肾; RT-PCR; 受体; 衰老; 大鼠

中图分类号: R692

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-0443-03

Expression of VEGF and VEGF Receptors in Aging Kidney of Adult Rats

HE Feng-ping, LI Shan, ZENG Zhi-yu, CHEN Yu-ming, XIAN Su, YIN Rui-xing
(Department of Clinical Science Experiment Center, The First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptors (VEGFR) in aging kidney of adult rats and the role of them in aging. 【Methods】To select 3-month ($n=6$) and 12-month ($n=6$) rats as control groups, 24-month ($n=6$) rats as observation group. The RNA of the renal tissue was extracted. Then the level of VEGF mRNA in kidney was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR); the expression of VEGF and VEGFR in glomerulus were determined by immunohistochemistry. Total quantity of VEGF in culture fluid of renal tissue was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 【Results】Total quantity of VEGF in 3-, 12-, and 24-month rats were 126.49±32.29, 95.14±49.17, and 79.21±61.17, respectively ($P=0.048$). The expression levels of VEGF mRNA in 3-, 12-, and 24-month rats were 0.821±0.132, 0.713±0.143, and 0.678±0.126, respectively ($P=0.012$). VEGF mRNA and total quantity of VEGF in 24-month rat group were lower than those in 3-month and 12-month rat groups ($P < 0.05$). VEGF and VEGFR in 24-month rats group were lower than the other two groups. 【Conclusion】The level of VEGF mRNA and quantity of VEGF are decreased with age. Expression of VEGF and VEGFR in glomerulus is decreased with age. These suggest VEGF-VEGFR system play an important role in aging progression of kidney.

Key words: vascular endothelial growth factor; kidney; reverse transcription polymerase chain reaction; receptor; aging; rats

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(4):443-445]

血管内皮生长因子(VEGF)是调节血管发生的基本生长因子,在肾脏中含量丰富。已有研究表明^[1],血管内皮细胞的生长增殖和迁移,随着增龄而发生变化。肾组织内 VEGF 随着增龄的变化影

响其血管生成。我们采用免疫组化方法观察肾小球 VEGF 及其受体 VEGFR 表达的变化,并应用 RT-PCR 检测肾脏组织内 VEGF mRNA 转录水平,探讨 VEGF 与肾脏的关系。

收稿日期:2004-09-12

基金项目:广西壮族自治区自然科学基金资助项目(桂科自 0007044)

作者简介:何凤屏(1960-),女,广西梧州市人,硕士导师,教授,澳大利亚 MACQUARIE 大学内分泌生理研究学者。研究方向:细胞衰老及其相关疾病的研究

1 材料与方 法

1.1 实验分组

选取 3 月龄(儿童组)、12 月龄(壮年组)、24 月龄(老年组)SD 大鼠(由广西医科大学动物中心提供)各 6 只。常规消毒麻醉后,取一侧肾脏,冲洗,40 g/L 甲醛。固定,常规组织脱水、透明浸蜡、包埋,石蜡切片行 PAS 染色。另一侧分割成细小碎片-20℃冰冻保存。

1.2 免疫组化染色

兔 VEGF 多克隆抗体、兔 VEGFR-1 多克隆抗体、小鼠 VEGFR-2 单克隆抗体由美国 Santa Cruz 公司提供。免疫组化试剂盒购自北京生物技术有限公司。4 μm 石蜡切片脱蜡入水,30 mL/L 过氧化氢孵育 15 min,抗原修复(VEGF 抗原采用微波修复、VEGFR-1 和 VEGFR-2 采用胰酶修复),正常山羊血清封闭。加入稀释一抗(兔 VEGF 多克隆抗体 1:50 稀释、兔 VEGFR-1 多克隆抗体 1:100 稀释、小鼠 VEGFR-2 单克隆抗体 1:50 稀释),4℃过夜。加入生物素标记的二抗,室温下孵育 20 min。加入链酶卵白素标记的 HRP (horseradish peroxidase)室温下孵育 20 min。DAB 染色 5 min,苏木素衬染,脱水,透明封片。每组染色均设不加一抗的对照。显微镜下胞浆呈棕黄色颗粒状者为阳性,利用 GDS8000 凝胶图象分析系统计算 VEGF/VEGFR 阳性着色细胞吸光度。

1.3 肾组织培养和 VEGF 含量测定

按 3、12、24 月龄分为 3 组,每组取肾组织 1 g,剪碎后尽量洗去血细胞,用 PBS 冲洗 3 遍。将肾组织放置含有 20%小牛血清的 DMEM/F-12 (1:1)培养液培养,24 h 换液 1 次,连续培养 3 d,取上清液进行检测。采用酶联免疫法测定各组大鼠的 VEGF 的含量,试剂由美国 R&D 公司提供。

1.4 RT-PCR 检测肾内 VEGF mRNA 转录水平

按试剂盒说明书严格操作(试剂盒由 Life Technology 公司提供)。提取各组肾组织总 RNA,分别取 10 μg 总 RNA。按试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,PCR 扩增 VEGF 的基因片段。PCR 总反应体系 30 μL,含 1 μL cDNA 模板,10×Buffer 反应缓冲液 3 μL,2.5 mmol/L dNTP 1.5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL,Taq DNA 聚合酶 5 U,上游及下游引物各 100 pmol,加去离子水补齐 30 μL。94℃变性 30 s,61℃ 30 s,72℃ 30 s,30 循环,72℃ 7 min 结束反应。其中,上游引物:5'-TCCGGATG GGCACGAGTA-3',下游引物:5'-TGC CGGAG

AGGGGCACAT-3'。以人磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照(扩增产物 325 bp),采用四星凝胶成像分析系统测定各基因条带的吸光度,计算 VEGF/ GAPDH 比值。

1.5 统计学处理

采用 TEMS 软件,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间分析采用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 免疫组化结果

在 PAS 染色切片上观察 3 月、12 月、24 月龄大鼠肾脏 VEGF 和 VEGFR-2 的表达,见图 1。

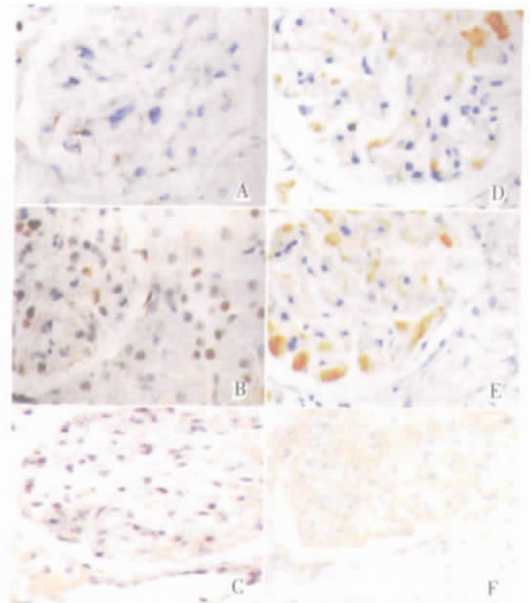


图 1 3、12、24 月龄大鼠肾脏 VEGF 和 VEGFR-2 的表达

Fig. 1 Expression of VEGF and VEGFR-2 in 3-, 12-, and 24-month rats

A~C: VEGF expression in renal tissue of 24-, 12-, 3-month rat; D~F: VEGFR-2 expression in renal tissue of 24-, 12-, 3-month rat; ×400

2.2 RT-PCR 结果

RT-PCR 检测 3 月、12 月、24 月龄大鼠的 VEGF mRNA 转录水平分别为 0.821 ± 0.132 , 0.713 ± 0.143 , 0.678 ± 0.126 , $F=7.4433$, $P=0.012$, 24 月龄的 VEGF mRNA 表达量较 3、12 月龄大鼠减少($P<0.01$),见图 2。

2.3 各组肾组织培养液 VEGF 总含量的测定

采用酶联免疫法测定各组肾组织培养液 VEGF 总的含量和 VEGF mRNA 表达量,并作比较,24 月龄的 VEGF 含量较 3、12 月龄的大鼠减

少($P < 0.01$),其中,3、12、24月龄的大鼠总的含量分别为 126.49 ± 32.29 , 95.14 ± 49.17 , 79.21 ± 61.17 , $F=5.7849$, $P=0.048$ 。

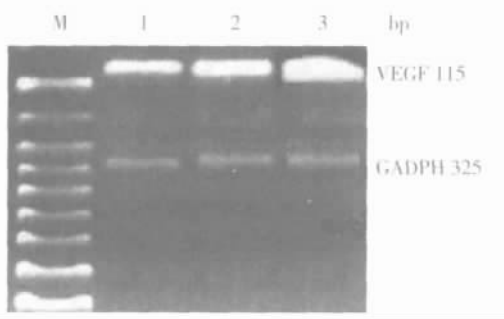


图2 3个鼠龄组的肾组织内 VEGF mRNA 表达
Fig.2 VEGF mRNA expression in rat renal tissue of three groups of rats

M:marker; 1:24 months; 2:12 months; 3:3 months

3 讨论

VEGF 在肾脏中含量丰富。有报道 VEGF 与肾脏的生理、病理作用有密切相关^[1]。在胚胎肾和成年肾应用免疫组化检测肾小球存在 VEGF mRNA。研究表明 VEGF 减少参与了随增龄出现的肾脏血管生成的异常^[2]。我们的研究显示,在 24 月龄大鼠肾组织 VEGF 的总含量较 3、12 月龄减少 ($P < 0.05$),这些结果说明随增龄肾脏出现血管生成障碍,在老年大鼠肾脏中微血管内皮细胞适应性生存能力减退^[2]。

VEGF 主要有两种特异性的高亲和力受体,即 VEGFR-1 和 VEGFR-2。VEGFR 在肾脏中主要分布于肾小球毛细血管内皮细胞及管周毛细血管网的内皮细胞。一些学者报道^[3]在肾脏的 VEGFR-1 很微弱或几乎没有表达,而 VEGFR-2 介导了 VEGF 全部的生物学效应。我们发现类似变化,且 VEGFR-2 在 3 月龄大鼠的肾小球表达为最强。VEGF 对体外培养的血管内皮细胞上的 VEGF 受体有上调作用^[3],可认为肾小球分泌的 VEGF 以旁分泌的方式作用于肾小球毛细血管内皮细胞上的 VEGFR,发挥其增强血管壁通透性的效能,使得 VEGFR-2 表达上调。相应地,VEGF 在 3 月龄大鼠的肾小球表达为最强,12 月龄次之,24 月龄为最弱。有研究表明^[4],肾小球及肾小管周毛细血管内皮细胞有 VEGF mRNA 的表达,肾小管周毛细血

管内皮细胞存在 VEGF 受体,促使肾小管上皮细胞增殖,提高他们的抗凋亡能力,使得 VEGF 具有抗衰老作用。我们 RT-PCR 结果表明,24 月龄大鼠肾组织有 VEGF mRNA 的表达,且与 3、12 月龄比较有显著性的减少 ($P < 0.01$)。这提示在大鼠肾组织的 VEGF mRNA 随增龄而减少。可理解为肾组织上皮细胞增殖和抗凋亡能力减弱,肾周围的血管减少,使肾的氧供减少,导致肾组织的萎缩和肾脏衰老。

VEGF 能扩张肾周围的血管,增加血流量,减轻肾脏的硬化^[5]。VEGF 在肾脏不同时期、不同阶段可能起不同的作用,且 VEGF 效应具有多方面,目前认识尚不一致^[6-7]。我们的研究认为,衰老大鼠肾组织内 VEGF mRNA 的表达量减少与 VEGF 的含量减少有关,而 VEGF 在衰老大鼠肾组织内表达的差异提示 VEGF 与受体结合后,通过不同的生理机制在不同肾脏阶段发挥不同的生物学效应。

参考文献:

- [1] 丁磊. 血管内皮生长因子与肾脏[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2002, 22(6): 385-8.
- [2] Simon M, Rockl W, Hornig C *et al.* Receptors of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in fetal and adult human kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 9 (6): 1032-44.
- [3] 黄从新, 赵志明, 杨波, 等. 血管内皮生长因子(VEGF)对培养内皮细胞 VEGF 受体表达的影响[J]. 微循环杂志, 2001, 11(2): 9-11.
- [4] Kang DH, Anderson S, Kim YG, *et al.* Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin in renal disease [J]. Am J Kidney Dis, 2001, 37 (3): 601-11.
- [5] 周智, 杨曦明, 李艳君, 等. 血浆血管内皮生长因子及血管紧张素 II 与糖尿病肾病的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(5): 550-2.
- [6] 李恒, 刘志红, 刘栋, 等. 缺氧诱导人肾间质成纤维细胞血管内皮生长因子的表达[J]. 中华肾脏病杂志, 2002, 18(3): 185-9.
- [7] Kanellis J, Fraser S, Katerelos M, *et al.* Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells[J]. Am J Physiol, 2000, 278 (6): 905-15.

(编辑 张恩健)