

## FGF10 对鸡胚尿囊膜血管形成的影响

刘芳 李刚 张丝雨 张小涵

**摘要** 目的 研究纤维母细胞生长因子 FGF10 对鸡胚尿囊膜血管生长作用,探讨 FGF10 对血管形成的影响。方法 应用胶原蛋白共培养方法,将 FGF10(100 ng/ml)单独或与 FGF 受体拮抗剂 SU5402(20 μmol/L)作用于鸡胚尿囊膜血管内皮细胞组织块,观察 FGF10 对新生血管形成的影响。结果 与空白对照组比较,FGF10 组新生血管形成面积显著增加( $P < 0.001$ )。SU5402 可抑制 FGF10 的作用,与空白对照组比较,其新生血管形成面积显著下降( $P < 0.001$ )。结论 FGF10 能促进鸡胚尿囊膜新生血管的形成。

**关键词** FGF10; SU5402; 血管形成

**中图分类号** R 331

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)02-0208-03  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.012

血管网络的形成包括 2 个阶段:血管生成和血管形成。血管生成是胚胎期血管从无到有的发生过程,是中胚层分化出血管内皮前体细胞,以及细胞并入中轴主干血管的过程;血管形成是指从原有血管(主要指毛细血管和毛细血管后静脉)以芽生的方式长出新的血管<sup>[1]</sup>。血管形成的发生过程包括血管内皮细胞的增殖与迁移、细胞的重新排列、血管构成、血管基底层形成<sup>[2]</sup>。

纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)在血管形成中扮演了各种角色,其中研究得最多的则是 FGF2。FGF2 分别结合于受体 FGFR1 和 FGFR2,在内皮细胞和血管平滑肌细胞的增殖和迁移中都起着非常重要的作用<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>显示,血管与轴突的发育受相同的导向因子调控,但这项研究尚处于起步阶段,只限于对几类经典轴突导向因子的研究;例如,经典神经轴突导向因子 ephrins、slits、semaphorins 及 netrins 同时调节着血管内皮细胞的迁移和血管新生。研究<sup>[5]</sup>表明,FGF10 具有导向因子的功能,对于下丘脑神经元轴突走向具有化学趋化作用。然而,目前还尚无研究系统阐述

FGF10 对血管形成的影响。该实验拟通过观察 FGF10 对鸡胚尿囊膜(chicken chorioallantoic membrane, CAM)血管生长的影响,探讨 FGF10 对血管形成的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 试剂和仪器** 种鸡蛋(江西省种鸡场);FGF10(美国 R&D 公司);SU5402(德国 Calbiochem 公司);鼠尾胶原蛋白 I 型、M199、小牛血清、胰酶、中性蛋白酶(美国 Thermo Fisher 公司);anti-Tie1(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司);Alexa Fluor 488(美国 Molecular Probes 公司);Affigel beads(美国 Pharmacia Biotech 公司);CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 CB150(德国 BINDER 公司);净化工作台(苏州安泰空气技术公司);倒置相差荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

**1.2 FGF10 对 CAM 血管生长的实验** 挑选同一批刚受精未孵化的鸡蛋,用新洁尔灭洗净外壳后,移入 37 °C 孵箱中孵化。种蛋钝端呈 45°角向上,每隔 2 h 翻蛋 1 次,孵化至胚胎第 5 天(E5),在种蛋的钝端轻轻开窗揭去外壳和外壳膜,露出气室,便可直接看到鸡胚 CAM。血管片段从鸡胚 CAM 中切取出来,并使用中性蛋白酶将血管内皮细胞层分离出来。使用解剖针将血管切成 0.2~0.5 mm 的片段,并放入胶原蛋白凝胶中。待胶原蛋白凝固后,加入培养液(M199 + 15% 小牛血清 + 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素)。根据实验要求,各组分别为 FGF10 组(于培养液中加入 100 ng/ml 的 FGF10)、SU5402 组(于培养液中加入 100 ng/ml FGF10 和 20 μmol/L SU5402)、空白对照组。

**1.3 FGF10 对神经纤维和新生血管的趋化实验** 下丘脑组织块(E5)、CAM 血管组织块与吸附有 FGF10 蛋白质的 Affigel beads(美国 Pharmacia Biotech 公司)保持 100~300 μm 的距离,共同培养在胶原蛋白凝胶中<sup>[6]</sup>。培养 48 h 后,倒置显微镜观察并拍照。

**1.4 免疫组织化学检测** 在 4 °C L15 培养液中被分离含有组织块的胶原蛋白凝胶,固定于含 4% 多

2016-11-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:31460259)

作者单位:南昌大学医学部基础医学院细胞生物学教研室,南昌 330031

作者简介:刘芳,女,博士,讲师,责任作者,E-mail:fangliuncueducn@126.com

聚甲醛的PBS中。PBS洗2次后,将组织加入4℃、30%蔗糖中脱水12h。OCT包埋剂包埋组织,在-23℃切片机中,将组织块切50 μm厚的组织切片。PBS洗2~3次,各5 min。PBS+5%山羊或驴血清+0.1% Triton X100封闭。滴加一抗Tie1 50 μl(于封闭液中),4℃过夜。PBST洗涤3遍,加荧光素Alexa 488连接的二抗孵育2h, PBST(PBS+0.1% Triton X100)洗涤,荧光显微镜观察并拍照。

**1.5 统计学处理** 运用SPSS 22.0软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 FGF10对神经纤维和新生血管的趋化实验

吸附有FGF10的Affigel beads与下丘脑组织块(E5)和CAM血管组织块共培养实验显示,FGF10同时对下丘脑神经轴突及新生血管有化学趋化作用,新生轴突和血管均向FGF10起源方向生长(图1)。

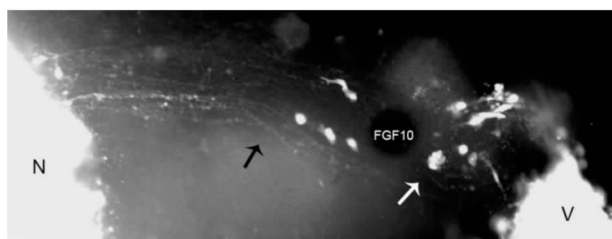


图1 FGF10对神经元轴突和新生血管的趋化作用 ×100

黑色箭头:新生轴突;白色箭头:新生血管;N:下丘脑神经元组织块;V:CAM血管组织块

**2.2 FGF10对血管形成的影响** 为了观察FGF10对血管形成的影响,CAM血管组织块被培养于胶原蛋白凝胶中。结果显示,与空白对照组比较,FGF10

促进更多的新生血管从组织块中生长出来(图2B)。为了检测FGF10是否参与了新生血管的形成,将FGF受体拮抗剂SU5402(20 μmol/L)加入到含有FGF10的培养液中。与空白对照组比较,当培养液中加入了SU5402后,只能观察到少量新生血管的生长(图2C)。Tie1是血管内皮细胞的标记抗体,因此应用免疫荧光方法鉴定新生血管;结果显示,新生管状物均为Tie1表达阳性(图2)。统计分析显示,3组比较差异有统计学意义( $n = 6, F = 60.16, P < 0.05$ )。其中与空白对照组比较,FGF10显著增加了新生血管形成面积[(43 166.67 ± 2 785.88) μm<sup>2</sup> vs (101 333.33 ± 9 614.80) μm<sup>2</sup>,  $P < 0.001$ ];而在SU5402组中,新生血管形成面积明显降低[(43 166.67 ± 2 785.88) μm<sup>2</sup> vs (12 050.00 ± 1 487.22) μm<sup>2</sup>,  $P < 0.001$ ]。实验结果表明,FGF10对新生血管的形成是有必要的,并且FGF10有促进新生血管形成的作用。

## 3 讨论

FGFs构成了一个多肽生长因子的大家族;在胚胎发育中,其参与了胚层的前后分化及器官形成等多个环节。现已显示的FGFs有23种,其中有13种FGFs显示于鸡中<sup>[7]</sup>。在脊椎动物中,基于其不同的序列相似性和功能特征,FGFs能被化分为七大亚族;其中,FGF10属于FGF7亚族,其受体是FGFR1或FGFR2,且2种受体都存在于血管内皮细胞中<sup>[8]</sup>。FGFs主要通过1类酪氨酸激酶受体FGFR激活下游的信号通路,主要包括RAS-MAP、PI3K、PLCγ等通路,启动下游基因的表达,进而对生命活动进行广泛的调节<sup>[9]</sup>。目前已表明,FGFs在血管形成中起着非常重要的作用;其中,报道<sup>[10]</sup>最多的FGF2,但其他FGFs也在血管形成中起着非常重要

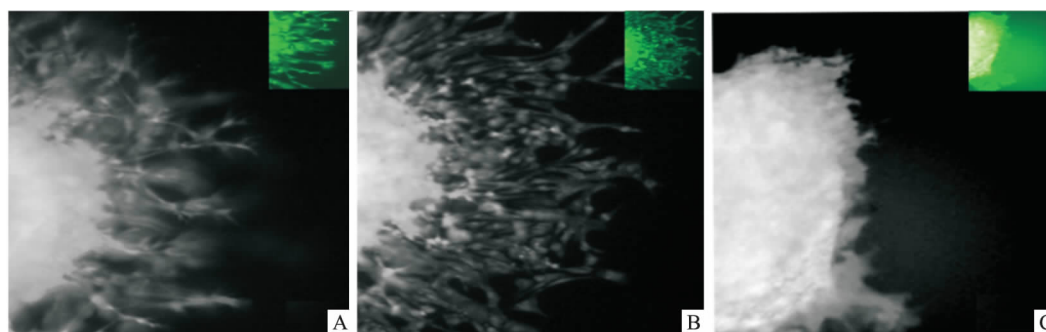


图2 各组对新生血管形成的影响 ×120

A:空白对照组;B:FGF10组;C:SU5402组

的作用,例如 FGF21 能促内皮细胞运动,增强新生血管的形成。目前,还没有报道阐明 FGF10 对血管形成的影响。

血管和神经有着非常相似的分支结构,常伴行到达某一远处靶位<sup>[6]</sup>。同时,在血管系统,发育中的毛细血管末梢与轴突的末梢极为相似,二者都具有丝状伪足的结构<sup>[4]</sup>。这些研究都提示神经纤维和新生血管受到了某些共同信号分子调控。而最新研究<sup>[4]</sup>也证明了这一推论:血管和神经往往受共同信号分子调控,伴行同时到达某一远处靶位。随着越来越多的导向因子被发现及应用,血管与神经纤维的共同导向机制将被进一步揭示。已有研究<sup>[5]</sup>证明了 FGF10 在神经纤维生长过程中起着重要的化学趋药性作用,这提示 FGF10 可能与其它轴突导向因子一样,对新生血管的形成和走向也具有一定的功能。

本实验表明 FGF10 不仅对下丘脑神经元轴突有导向作用;同时 FGF10 也可作用于新生血管,影响新生血管的生长方向。但 FGF10 作为轴突趋化因子,在新生血管形成中的作用仍未被完全理解。血管形成是一个复杂的过程,是通过抑制因子与激活因子之间的平衡活动来实现的。研究<sup>[10]</sup>表明 FGFs 多具有激活因子的作用,指引内皮细胞的运动。本研究表明,FGF10 同其它轴突导向因子一样,对血管内皮细胞具有趋化作用,促进血管内皮细胞的迁移;同时 FGF10 作为 FGFs 的成员,也可增强内皮细胞的迁移,促进新生血管的形成。FGF10 在中枢神经系统中有多处表达,如下丘脑、脑干等处都有 FGF10 的表达<sup>[11]</sup>,因此 FGF10 对血管形成的影响,是探索这些区域发育及形成机制的基础,并将可能进一步解决此区域神经与血管损伤、再生等重要临

床问题,具有潜在的应用价值。

## 参考文献

- [1] Ribatti D. History of research on angiogenesis[J]. *Chem Immunol Allergy* 2014, 99: 1-14.
- [2] Pandya N M, Dhalla N S, Santani D D. Angiogenesis - a new target for future therapy[J]. *Vascul Pharmacol*, 2006, 44(5): 265-74.
- [3] Yang X, Liaw L, Prudovsky I, et al. Fibroblast growth factor signaling in the vasculature[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2015, 17(6): 509.
- [4] Eichmann A, Thomas J L. Molecular parallels between neural and vascular development[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013, 3(1): a006551.
- [5] Liu F, Pogoda H M, Pearson C A, et al. Direct and indirect roles of Fgf3 and Fgf10 in innervation and vascularisation of the vertebrate hypothalamic neurohypophysis[J]. *Development*, 2013, 140(5): 1111-22.
- [6] Placzek M. Tissue recombinations in collagen gels[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 461: 325-35.
- [7] Thisse B, Thisse C. Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development[J]. *Dev Biol*, 2005, 287(2): 390-402.
- [8] Terwisscha van Scheltinga A F, Bakker S C, Kahn R S, et al. Fibroblast growth factors in neurodevelopment and psychopathology[J]. *Neuroscientist*, 2013, 19(5): 479-94.
- [9] Esser J S, Rahner S, Deckler M, et al. Fibroblast growth factor signaling pathway in endothelial cells is activated by BMPER to promote angiogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(2): 358-67.
- [10] Yaqoob U, Jagavelu K, Shergill U, et al. FGF21 promotes endothelial cell angiogenesis through a dynamin-2 and Rab5 dependent pathway[J]. *PLoS One* 2014, 9(5): e98130.
- [11] Cox E, Lanier J, Quina L, et al. Regulation of FGF10 by POU transcription factor Brn3a in the developing trigeminal ganglion[J]. *J Neurobiol*, 2006, 66(10): 1075-83.

## Influence of FGF10 on the angiogenesis of chorioallantoic membrane vessels

Liu Fang, Li Gang, Zhang Siyu, et al

(Dept of Cell Biology, School of Basic Medical Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031)

**Abstract Objective** To study the effect of FGF10 on the angiogenesis of chicken chorioallantoic membrane (CAM) vessels. **Methods** By using collagen co-culture method, FGF10 (100 ng/ml) alone or with its antagonist SU5402 (20 μmol/L) were acted on the endothelial vessel explants, and then the *in vitro* angiogenesis experiment was carried out. **Results** Compared with the control groups, FGF10 promoted the area of vessel outgrowth ( $P < 0.001$ ). However, SU5402 suppressed the effect of FGF10; compared with blank control groups, the area of newborn vessels decreased significantly ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** FGF10 has the function of enhancing the formation of new CAM vessels.

**Key words** FGF10; SU5402; angiogenesis