

LRP6 和 VEGFR2 在牦牛肺的分布

马俊兴, 何俊峰*, 崔燕, 张倩, 刘鹏刚

(甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘要: 旨在探究 LRP6 和 VEGFR2 在不同年龄段牦牛肺组织中的表达和定位, 以及两者对牦牛肺低氧适应性结构形成和可能的调控作用。选取新生(1~7 日龄)、半岁(5~6 月龄)、成年(3~6 岁)和老年(7~10 岁)健康牦牛肺组织样品各 5 头份, 采用酶联免疫吸附试验、Western-blot 和免疫组织化学方法对不同年龄的牦牛肺组织中 LRP6 和 VEGFR2 的表达量和准确分布位置进行研究。结果显示: LRP6 和 VEGFR2 在初生和半岁牦牛组之间的表达量均差异不显著($P > 0.05$), 初生、半岁与老年组牦牛的表达量均差异显著($P < 0.05$), 成年和老年牦牛组之间的表达量差异显著($P < 0.05$)。LRP6 主要分布于肺内支气管和其分支的上皮细胞以及肺泡 II 型细胞, 其表达较强; 少量分布在肺血管内皮细胞和管壁平滑肌细胞, 表达较弱; VEGFR2 主要分布于肺内支气管及其分支的上皮细胞、管壁平滑肌细胞和肺泡隔细胞以及肺泡 I 型细胞中, 其表达较强; 在肺血管内皮细胞和平滑肌细胞内也有分布, 但表达较弱。综上所述, LRP6 和 VEGFR2 不仅在不同年龄段的牦牛肺组织中表达量具有差异性, 而且它们对高原环境下牦牛肺适应低氧适应性的结构形成和维持可能的调控具有重要的意义。

关键词: 牦牛; 肺; LRP6; VEGFR2; 适应性

中图分类号: S823.8⁺5.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)07-1550-08

The Distribution of LRP6 and VEGFR2 in Yak Lungs

MA Jun-xing, HE Jun-feng*, CUI Yan, ZHANG Qian, LIU Peng-gang

(College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the expression and localization of LRP6 and VEGFR2 in yak lungs of different ages and their roles in yak lung hypoxia adaptive structure formation and the possible regulation. Newborn (1-7 days old, $n=5$), juvenile (5-6 months old, $n=5$), adult (3-6 years old, $n=5$) and old (7-10 years old, $n=5$) yaks were selected as the subjects, the expression and precise location of LRP6 and VEGFR2 in yak lung tissue of different age groups were detected by ELISA, Western-blot and immunohistochemistry. The results showed that the expression of LRP6 and VEGFR2 between the newborn and juvenile yak groups was not significant different ($P > 0.05$); the expression between newborn, juvenile and old yak groups was significant different ($P < 0.05$); the expression between the adult and old yak groups was significant different ($P < 0.05$). The LRP6 was mainly distributed in the lungs of branches and their branches epithelial cells and alveolar type II cells and the expression was stronger; the expression in pulmonary vascular endothelial cells and vascular wall smooth muscle cells was weak. The VEGFR2 was mainly distributed in the epithelial cells of the bronchial lung and its branches, wall smooth muscle cells and alveolar septum and alveolar type I cells and the expression was stronger; the expression in pulmonary vascular endothelial cells and smooth muscle cells was weak. The results suggested that LRP6 and VEGFR2 not only had different expression levels in

收稿日期: 2017-11-23

基金项目: 甘肃农业大学青年导师基金资助项目(GAU-QNDS-201708); 甘肃农业大学动物医学院教研产学研支持计划资助项目(JYCXKX003)

作者简介: 马俊兴(1993-), 男, 河北威县人, 硕士, 主要从事动物组织学与胚胎学研究, E-mail: 17361596112@163.com

* 通信作者: 何俊峰, 副教授, E-mail: hejf@gsau.edu.cn

yak lung tissues of different ages, but also had important implications for the regulation of the formation and maintenance of hypoxic adaptative structures in the lungs of yak in the plateau environment.

Key words: yak; lung; LRP6; VEGFR2; adaptability

随着海拔的升高,空气中的氧气含量会逐渐减少,造成长期暴露于高海拔环境中的哺乳动物会发生高山病。而生活在海拔 3 000~6 000 m 高寒地区的牦牛(*Bos grunniens*)已具有适应这种高原低氧环境的稳定遗传学特性^[1-3]。低密度脂蛋白受体相关蛋白(low density lipoprotein receptor-related protein, LRP)为低密度脂蛋白受体家族中的一员,起初发现它主要与脂蛋白特别是残余乳糜微粒的清除有关,它有 30 多种配体分子,参与体内多种生理和病理过程^[4]。通过配体竞争结合研究发现,与 LRP 的其他配体相比,结缔组织生长因子 CTGF 对 LRP 有非常高的亲合力;而其他配体与 LRP 具有中等亲合力。目前,CTGF 与 LRP 之间高亲合力的机制尚不清楚,但这种高亲合力提示,LRP 会在介导 CTGF 的生物学效应方面起重要作用;经基因敲除 LRP 基因缺陷细胞不能结合 CTGF 等研究证实,LRP 是 CTGF 的受体,CTGF 在细胞的快速内吞和降解过程依赖 LRP^[5]。LRP6 作为 CTGF 受体之一,不仅与 CTGF 结合,还参与发育^[6]。VEGFR2 又称激酶功能区受体(kinase domain receptor, KDR),不仅是受体酪氨酸蛋白激酶。血管内皮细胞生长因子型受体 2(VEGFR2)同时还是 VEGF 的主要功能受体。作为受体型酪氨酸激酶,主要通过调节血管内皮细胞的通透性,促进细胞有丝分裂趋化作用以及新生血管的形成,除此之外,还在抗内皮细胞凋亡、维持内皮细胞存活方面发挥重要作用^[7]。VEGFR2 与肺血管内皮细胞的凋亡有关。CTGF 和 VEGF 与低氧条件下的肺有着十分紧密的联系^[8-9]。国内外许多学者对 LRP6 和 VEGFR2 在肺癌、非小细胞肺癌和大鼠肺内的分布特点进行了研究^[10-15]。本课题组之前对牦牛肺的组织结构进行过较为详细的研究^[16-17]。研究表明,CTGF 表达与分布是成年牦牛的基础分布,成年牦牛肺并未发生典型的肺纤维化或肺动脉高压的病理特征,即成年牦牛并未产生肺动脉高压。而在低氧环境下能刺激初生牦牛肺内 VEGF 含量增高,从而对牦牛的发育产生影响。但有关 LRP6 和 VEGF 在牦牛肺的分布特点未见报道。

本研究采用酶联免疫吸附方法、Western blot 和免疫组织化学,对 LRP6 和 VEGFR2 在初生、半岁、成年和老年牦牛肺准确分布位置和表达量进行观察比较,为低氧环境下牦牛肺适应性结构的形成和机理提供部分理论基础,同时也为心肺疾病的治疗、高原医学和运动医学的研究提供部分理论资料。

1 材料与方法

1.1 试验动物及材料

本试验以牦牛为研究对象,分别采集新生(1~7 日龄)、半岁(5~6 月龄)、成年(3~6 岁)和老年(7~10 岁)健康牦牛肺组织样品,每个年龄段各 5 头份,经颈动脉放血处死后,迅速采集肺膈叶的肺组织,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,脱水、石蜡包埋,切片厚 4 μm 。其中新生牦牛购自甘肃省甘南自治州,其余组别牦牛购自青海省西宁市。

1.2 ELISA 检测

1.2.1 材料 ELISA 试剂盒购于武汉基因美生物科技有限公司(LRP6, JYM0135Bo; VEGFR2, JYM0139Bo)。

1.2.2 蛋白样品的提取 采集组织样本后,称重。加入一定量的 PBS(pH7.4)。用液氮迅速冷冻保存备用。标本融化后,仍然保持 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 的温度。加入一定量的 PBS(pH7.4),用手工或匀浆器将标本匀浆充分。离心 5 min(2 000~3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$)。收集上清液。分装后,1 份备用,其余 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

1.2.3 方法 采用双抗夹心 ELISA 法,用纯化的 LRP6 和 VEGFR2 抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被抗体的微孔中依次加入 LRP6 和 VEGFR2,再与 HRP 标记的 LRP6 和 VEGFR2 抗体结合,形成抗体-抗原-酶标记抗体复合物,经过彻底洗涤后,加底物 TMB 显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转为蓝色。用酶标仪在 450 nm 波长下的测定吸光值(OD 值),通过标准曲线计算样本中 LRP6 和 VEGFR2 浓度。

1.3 Western-blot 检测

1.3.1 蛋白样品的制备 取各个年龄段牦牛肺

组织样品各 0.1 g, 分别加入等量的组织均质缓冲液 (1 mL RIPA + 10 μ L PMSEF), 冰浴摇匀 2 h, 然后 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 min, 吸取上清液, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.2 方法 取各年龄段牦牛肺的总蛋白各 60 μ L, 分别加入 20 μ L 溴酚蓝混匀, 100 $^{\circ}$ C 煮 10 min, 冰上 5 min, 然后将蛋白进行 SDS-PAGE, 再用湿转法将其电极转移至硝酸纤维膜 (NC) 上, 从正极~负极的顺序按 4 层滤纸、NC 膜、凝胶块、4 层滤纸的顺序摆放整齐, 然后经 50 g \cdot L $^{-1}$ 脱脂奶粉溶液室内封闭 1.5 h, 分别用 LRP6 和 VEGFR2 抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 用 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 温孵育 1.5 h, 每步完成后, 用 PBST 洗膜, 每次洗 10 min, 最后用 ECL 避光显色, X 光显影、定影。扫描蛋白印迹条带。

1.4 免疫组织化学检测

1.4.1 抗体及检测系统 抗体和 SP 试剂盒均购自北京博奥森生物科技有限公司 (Rabbit Anti-LRP6, bs-2905R; Rabbit Anti-VEGFR2, bs-10412R); DAB 显色试剂盒购自中杉金桥公司。

1.4.2 免疫组织化学染色 石蜡切片贴于免疫组化防脱切片上。60 $^{\circ}$ C 烘片 4~6 h。切片脱蜡至水, 蒸馏水浸泡 5 min, PBS 浸泡 5 min。按照试剂盒说明书步骤进行处理, DAB 显色。LRP6 多克隆抗体和 VEGFR2 多克隆抗体均按照 1:400 稀释后使

用, 空白对照用 0.01 mol \cdot L $^{-1}$ 的 PBS 代替一抗。

1.4.3 结果判定 以阳性表达强度为判定标准。深棕黄色为强阳性表达, 浅棕黄色为阳性表达, 浅黄色为弱阳性表达, 接近背景色或无色为阴性。照片均通过 Olympus-BX51 生物显微镜和 Olympus DP73 照相系统进行拍摄。

1.5 数据分析

采用 SPASS19.0 软件处理各个年龄段牦牛肺相关数据: (1) 单位面积内 LRP6 和 VEGFR2 在牦牛肺的光密度值; (2) LRP6 和 VEGFR2 在牦牛肺平均浓度值。对数据进行单因素方差分析, 并用 SNK 法对平均值进行多重比较, 所有结果均用“平均值 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$)”表示。

2 结果

2.1 双抗体夹心 ELISA 检测 LRP6 和 VEGFR2 在牦牛肺的浓度

由表 1 和图 1A 可知, LRP6 在初生和半岁的浓度均差异不显著 ($P > 0.05$), 初生、半岁与成年和老年的 LRP6 浓度值均差异显著 ($P < 0.05$), 成年和老年的 LRP6 浓度差异显著 ($P < 0.05$)。由表 1 和图 1B 可知, VEGFR2 在初生和半岁的浓度差异不显著 ($P > 0.05$), 初生、半岁与成年和老年的 VEGFR2 浓度差异均显著 ($P < 0.05$), 成年和老年的 VEGFR2 浓度差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1 LRP6 和 VEGFR2 在不同年龄牦牛肺的浓度

Table 1 The concentration of LRP6 and VEGFR2 in the lung of yaks at different ages

年龄 Age	初生 Newborn	半岁 Juvenile	成年 Adult	老年 Old
LRP6 / (pg \cdot mL $^{-1}$)	133.357 \pm 3.341 ^c	143.272 \pm 4.321 ^c	190.278 \pm 2.935 ^b	242.323 \pm 1.987 ^a
VEGFR2 / (mg \cdot mL $^{-1}$)	136.028 \pm 2.414 ^c	140.074 \pm 3.040 ^c	173.378 \pm 4.186 ^b	241.954 \pm 3.909 ^a

同一行字母不同表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 同一行字母相同表示组间差异不显著 ($P > 0.05$)

Different letters mean significant differences in the same row among different groups ($P < 0.05$), same letters mean no difference in the same row among different groups ($P > 0.05$)

2.2 Western-blot 检测 LRP6 和 VEGFR2 在不同年龄牦牛肺的表达

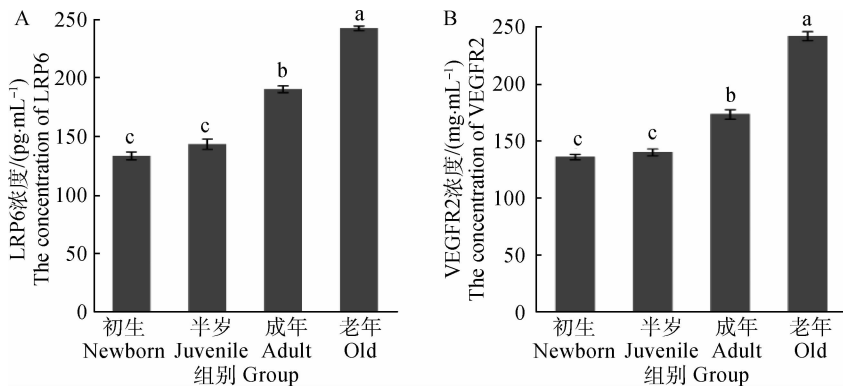
由图 2B 可知, LRP6 在初生和半岁牦牛肺的表达均差异不显著 ($P > 0.05$), 初生、半岁与成年和老年牦牛肺 LRP6 表达均差异显著 ($P < 0.05$), 成年和老年牦牛肺 LRP6 表达差异显著 ($P < 0.05$)。由图 2C 可知, 在初生和半岁牦牛肺 VEGFR2 表达差异不显著 ($P > 0.05$), 初生、半岁与成年和老年牦牛

肺 VEGFR2 表达均差异显著 ($P < 0.05$), 成年和老年牦牛肺 VEGFR2 表达差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 免疫组织化学观察 LRP6 和 VEGFR2 在不同年龄牦牛肺中的分布与表达

2.3.1 LRP6 在牦牛肺的分布和表达情况

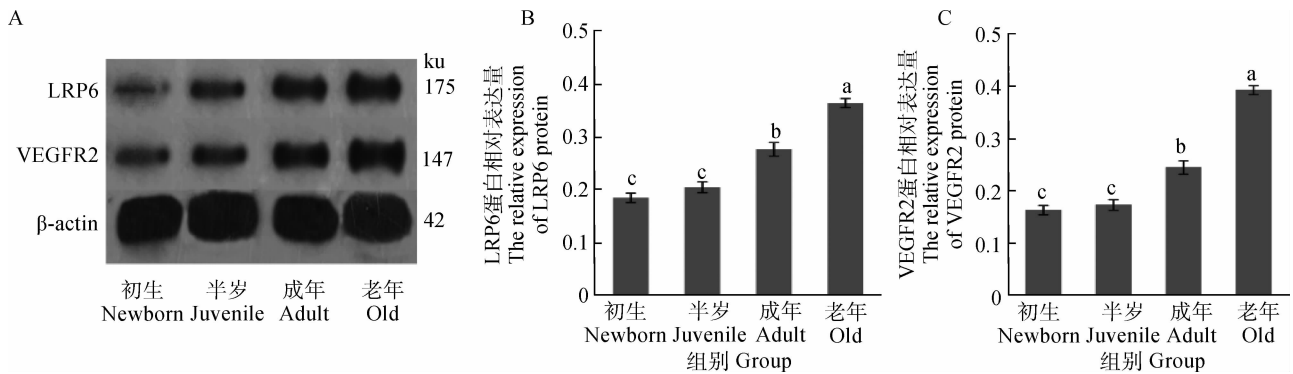
LRP6 在初生和半岁年龄段牦牛肺的分布和表达量基本一致, 在细支气管 (图 3a)、终末细支气管 (图 3b)、呼吸性细支气管 (图 3c) 上皮细胞中以及肺泡



不同年龄组间,字母不同代表组间差异显著($P < 0.05$),字母相同代表组间差异不显著($P > 0.05$)。下同
Different letters mean significant differences among different age groups ($P < 0.05$), same letters mean no difference among different age groups ($P > 0.05$). The same as below

图 1 LRP6(A)和 VEGFR2(B)在不同年龄牦牛肺的浓度

Fig. 1 The concentration of LRP6 (A) and VEGFR2(B) in the lung of yaks at different ages



A. Western-blot 结果; B. LRP6; C. VEGFR2

A. The result of Western-blot; B. LRP6; C. VEGFR2

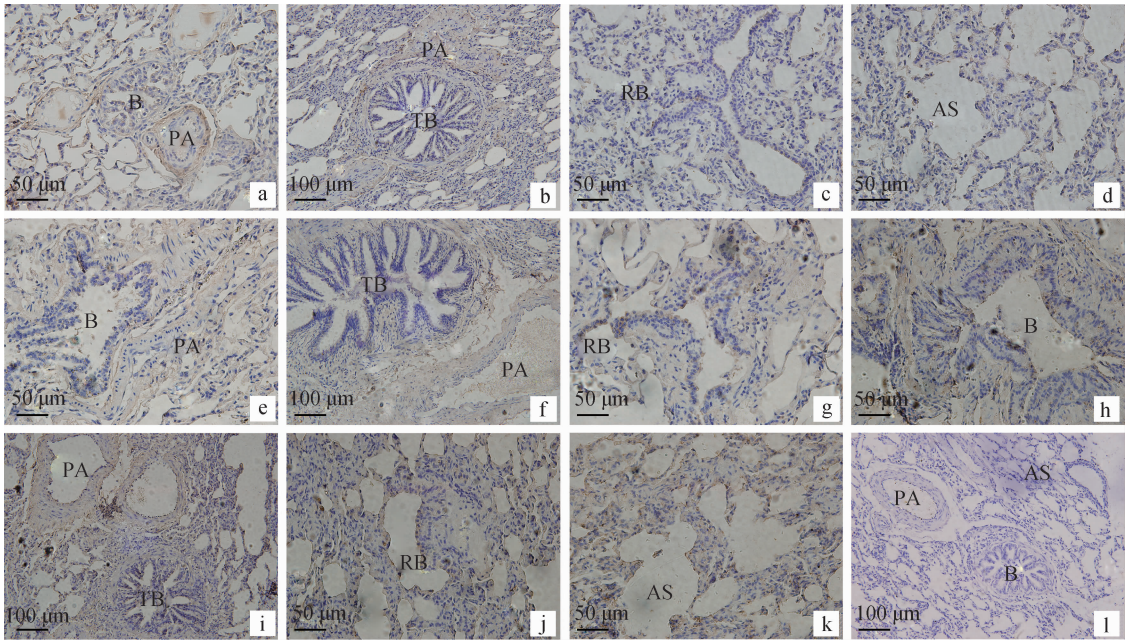
图 2 不同年龄中 LRP6 和 VEGFR2 蛋白在牦牛肺的表达

Fig. 2 The expressions of LRP6 and VEGFR2 protein in yak lung at different ages

II 型细胞中(图 3d)呈弱阳性表达,在细支气管动脉(图 3a)、伴行肺动脉(图 3b)内膜上皮细胞和平滑肌也有分布,呈阳性表达。成年牦牛肺细支气管(图 3e)、终末细支气管(图 3f)上皮细胞和肺泡 II 型细胞成阳性表达,呼吸性细支气管(图 3g)上皮细胞的表达和初生以及半岁基本一致。而在老年牦牛肺细支气管(图 3h)、终末细支气管(图 3i)、呼吸性细支气管(图 3j)上皮细胞呈强阳性表达,在细支气管肺动脉和肺泡 II 型细胞(图 3k)中也有大量分布,呈强阳性表达。图 3l 为空白对照。

2.3.2 VEGFR2 在牦牛肺的分布情况 VEGFR2 在初生和半岁年龄段牦牛肺的分布和表达量也基本一致,在细支气管(图 4a)、终末细支气管(图

4b)、呼吸性细支气管(图 4c)上皮细胞中和平滑肌细胞以及肺泡 I 型细胞中(图 4d)呈弱阳性表达,在细支气管动脉(图 4a)、伴行肺动脉(图 4b)内膜细胞也有分布,也呈弱阳性表达。在成年牦牛肺在细支气管(图 4e)上皮和管壁平滑肌中强阳性表达;在终末细支气管(图 4f)只有上皮有阳性表达及管壁平滑肌中无表达;在呼吸性细支气管(图 4g)和 I 型肺泡上皮细胞和肺泡隔细胞(图 4h)内强阳性表达。在伴行肺动脉血管壁平滑肌细胞和内皮细胞阳性表达(图 4f)。而在老年牦牛肺细支气管(图 4i)、终末细支气管(图 4j)、呼吸性细支气管上皮和管壁平滑肌中以及 I 型肺泡上皮细胞和肺泡隔细胞(图 4k)上皮细胞呈强阳性表达,图 4l 为空白对照。



a. 初生牦牛肺细支气管及肺动脉; b. 半岁牦牛肺终末细支气管及伴行动脉; c. 初生牦牛肺呼吸性细支气管; d. 半岁牦牛肺泡囊; e. 成年牦牛肺细支气管及肺动脉; f. 成年牦牛肺终末细支气管及伴行动脉; g. 成年牦牛肺呼吸性细支气管; h. 老年牦牛肺细支气管及肺动脉; i. 老年牦牛肺终末细支气管及伴行动脉; j. 老年牦牛肺呼吸性细支气管; k. 老年牦牛肺泡囊; l. 空白对照。B. 细支气管; TB. 终末细支气管; RB. 呼吸性细支气管; PA. 肺动脉; AS. 肺泡囊。下同

a. Newborn yak lung bronchioles and pulmonary arteries; b. Juvenile yak lung terminal bronchiole and accompanying artery; c. Newborn yak lung respiratory bronchioles; d. Juvenile yak lung alveolar sac; e. Adult yak lung bronchioles and pulmonary arteries; f. Adult yak lung terminal bronchioles and accompanying arteries; g. Adult yak lung respiratory bronchioles; h. Old yak lung bronchioles and pulmonary arteries; i. Old yak lung terminal bronchioles and accompanying artery; j. Old yak lung respiratory bronchioles; k. Old yak lung alveolar sac; l. The blank control; B. Bronchioles; TB. Terminal bronchioles; RB. Respiratory bronchioles; PA. Pulmonary artery; AS. Alveolar sacs. The same as below

图 3 免疫组织化学染色检测 LRP6 在不同年龄牦牛肺的表达 (a、c、d、e、g、h、i、k、l:400×; b、f、j:200×)

Fig. 3 Immunohistochemical expression of LRP6 in the lung of yak at different ages (a, c, d, e, g, h, i, k, l:400×; b, f, j:200×)

表 2 LRP6 在不同年龄牦牛肺中的表达情况

Table 2 The LRP6 expression in the lung at different ages yak

年龄 Age	细支气管 Bronchioles		肺动脉 Pulmonary artery			终末细支气管 Terminal bronchiole		呼吸性 细支气管 Respiratory bronchiole	肺泡囊 Alveolar sacs
	上皮 Epithelium	管壁平滑肌 Smooth muscle	内膜 Ti	中膜 Tm	外膜 Ta	上皮 Epithelium	管壁平滑肌 Smooth muscle		
	初生 Newborn	+	+	+	-	+	+		
半岁 Juvenile	+	+	+	-	+	+	+	+	+
成年 Adult	+	+	++	+	+	+	+	++	++
老年 Old	++	+	++	+	+	+	+	++	+++

+++ . 强阳性表达; ++ . 阳性表达; + . 弱阳性表达; - . 阴性表达。下同

+++ . The strong positive expression; ++ . The positive expression; + . The weak positive expression; - . The negative expression. The same as below

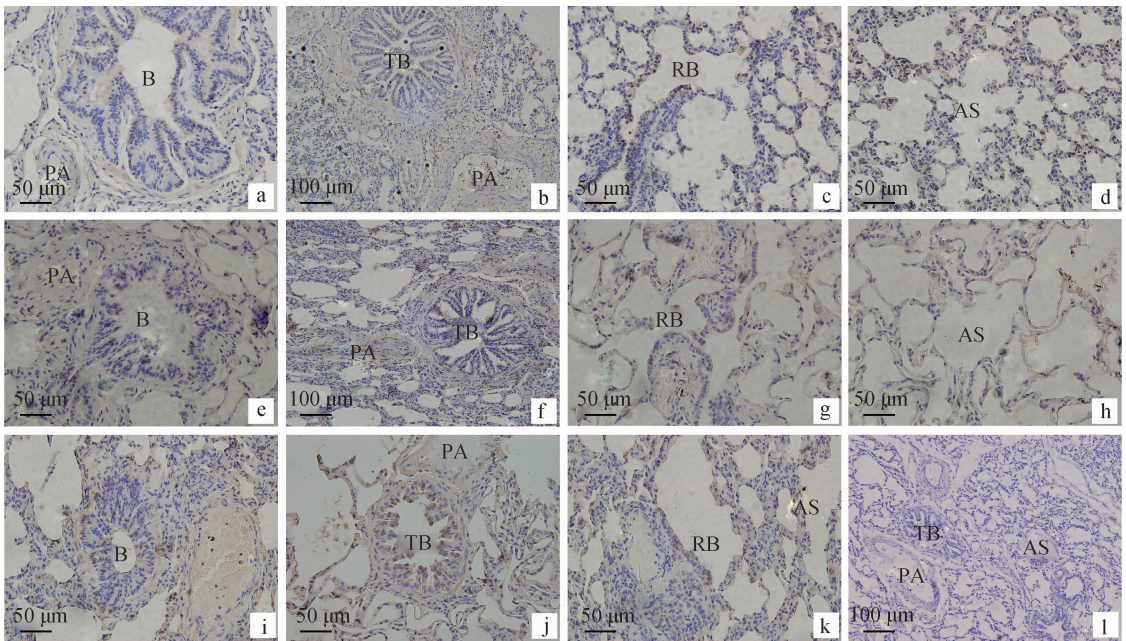


图 4 免疫组织化学染色检测 VEGFR2 在不同年龄牦牛肺的表达 (a、c、d、e、g、h、i、k、l:400×; b、f、j:200×)

Fig. 4 Immunohistochemical expression of VEGFR2 in the lung of yak at different ages(a,c,d,e,g,h,i,k,l:400×; b,f,j:200×)

表 3 VEGFR2 在不同年龄牦牛肺中的表达情况

Table 3 The VEGFR2 expression in the lung at different ages yak

年龄 Age	细支气管 Bronchioles		肺动脉 Pulmonary artery			终末细支气管 Terminal bronchiole		呼吸性 细支气管 Respiratory bronchiole	肺泡囊 Alveolar sacs
	上皮 Epithelium	管壁平滑肌 Smooth muscle	内膜 Ti	中膜 Tm	外膜 Ta	上皮 Epithelium	管壁平滑肌 Smooth muscle		
	初生 Newborn	+	+	+	+	+	+	+	+
半岁 Juvenile	+	+	+	-	+	+	+	+	+
成年 Adult	++	+	+	+	+	+	+	+	++
老年 Old	++	+	++	+	+	+	+	++	+++

3 讨论

VEGFR2 广泛存在于正常机体的组织器官中。笔者观察到肺内 VEGFR2 主要分布于肺泡 II 型细胞,支气管上皮细胞、肺血管平滑肌细胞、成纤维细胞、肺泡巨噬细胞及肺血管内皮细胞也有 VEGFR2 表达。生长发育过程中,肺组织内皮血管增生、迁移、出芽、新生心血管形成与细胞外基质重塑都需要

VEGFR2 参与^[18]。有研究证实在新生大鼠予以 VEGFR2 受体拮抗剂后肺组织内皮细胞凋亡增加,出现肺气肿样病变^[19]。VEGFR2 与血导管、血管形成和造血有关。提示 VEGFR2 是血导管生成的主要调控因子^[20]。Hanahan 和 Folkman^[21]1996 年提出了“血管形成的开关平衡假说”,认为血管生成受多种促进因子和血管生成抑制因子的共同调控,当生长因子的浓度下降时,开关处于开放状态导致血

管形成。成年时期由于肺部血管内皮细胞增生不活跃,此时 VEGFR2 可能对维持肺血管的正常生理功能起一定的作用。VEGFR2 是血管生长和发育的主要调节者,它们不仅在内皮细胞上有表达,在非内皮细胞上也有表达。说明 VEGFR2 可能在维持正常生理状况及抗损伤修复中发挥作用。

本研究发现随着年龄的增加,牦牛肺组织中的 VEGFR2 表达也逐渐上升,本研究结果与 Hanahan 和 Folkman^[21] 对血管内皮生长因子及其受体在大鼠肺发育过程中的表达研究结果不同,大鼠肺内 VEGFR2 不仅在胎儿及新生儿肺内表达,以后也持续存在,但水平很低。这可能表明牦牛随着年龄的增长,肺组织中内皮细胞增生、迁移能力显著上升,其抗损伤能力也随之上升。肺内 VEGFR2 逐渐增加以满足其生长需要,说明可能与牦牛所处的高原低氧环境有关系。

LRP6 是 Wnt 信号转导途径必不可少的受体^[6],通过 LRP6 抑制 Wnt 信号传导降低了肺癌细胞体内自我更新的能力^[22]。Wnt 信号途径是胚胎早期发育过程中调控细胞生长、发育和分化的关键途径,使细胞沿着某一方向定向分裂,使新产生的细胞定位于某个区域,决定着细胞命运的^[23],并在涉及肺癌发展的多个过程中发挥作用^[24]。LRP6 与结缔组织生长因子 CTGF 有高度的结合能力,证实 LRP6 是 CTGF 的受体之一^[5]。笔者观察到 LRP6 在牦牛不同发育时期肺组织中支气管上皮细胞、平滑肌细胞和肺动脉等也均有表达。这与 Wang 等^[25]对 Wnt 信号传导通过 LRP6 作用激活上皮细胞和血管平滑肌细胞的研究结果相似。随着已有大量研究报道 LRP6 作为 Wnt 信号传导的受体可调节肺上皮细胞和内皮细胞的黏附、增殖、迁移和生长促进血管生长和细胞外基质沉积,调节血管生成因子的产生或活性,并参与直接和间接的血管生成调节机制,从而引起肺动脉和小动脉重塑^[26-28]。

4 结 论

本研究结果表明:1)在分布区域上,VEGFR2 和 LRP6 均在肺内支气管及其分支的上皮细胞、平滑肌细胞表达较高。2)在年龄方面,LRP6 和 VEGFR2 在牦牛肺组织中表达丰富且在不同年龄段的表达有差异。说明这 2 种因子可能共同作用于牦牛肺细胞,促进肺动脉重建以抵抗高原低氧对肺的损伤。为进一步研究高原低氧对牦牛肺的损伤,还需

对牦牛肺进行更深入的研究,从而为探索治疗肺疾病提供新的思路。

参考文献 (References):

- [1] 陈秋生,冯 霞,姜生成.牦牛肺脏高原适应性的结构研究[J].中国农业科学,2006,39(10):2107-2113.
CHEN Q S, FENG X, JIANG S C. Structural study on plateau adaptability of yak lung[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(10): 2107-2113. (in Chinese)
- [2] 何俊峰,余四九,崔 燕.不同年龄高原牦牛肺脏的组织结构特征[J].畜牧兽医学报,2009,40(5):748-755.
HE J F, YU S J, CUI Y. Characteristics of lung structure in different age Plateau yak [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(5): 748-755. (in Chinese)
- [3] 张勤文.不同海拔地区牦牛的肺组织形态学比较[J].中国兽医科技,2004,34(2):73-74.
ZHANG Q W. Morphological comparison among pneumatic constitutions of yaks in different elevation areas[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, 34(2): 73-74. (in Chinese)
- [4] 李 深.低密度脂蛋白受体相关蛋白在肾脏的表达及意义[J].国外医学泌尿系统分册,2004,24(1):125-127.
LI S. Expression and significance of low density lipoprotein receptor related protein in kidney[J]. *Foreign Medicines-Urinary System*, 2004, 24(1): 125-127. (in Chinese)
- [5] SEGARINI P R, NESBITT J E, LI D X, et al. The low density lipoprotein receptor-related protein/ α_2 -macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor[J]. *Biol Chem*, 2001, 276(44): 40659-40667.
- [6] MAO B Y, NIEHRS C. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/IRP6 signaling [J]. *Gene*, 2003, 302(1-2): 179-183.
- [7] GRATZINGER D, ADVANI R, ZHAO S C, et al. Lymphoma cell VEGFR2 expression detected by immunohistochemistry predicts poor overall survival in diffuse large B cell lymphoma treated with immunotherapy (R-CHOP)[J]. *Br J Haematol*, 2010, 148(2): 235-244.
- [8] 蒋寒丹,何俊峰,崔 燕.CTGF 和 FGF-2 在成年牦牛肺脏的分布[J].中国兽医科学,2017,37(5):888-892.
JIANG H D, HE J F, CUI Y. Distribution of CTGF

- and FGF-2 in adult yak lung[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2017, 37(5):888-892. (in Chinese)
- [9] 何俊峰, 崔 燕. 高原牦牛肺血管内皮生长因子的分布[J]. 中国兽医学, 2008, 38(12):1086-1088. HE J F, CUI Y. Distribution of vascular endothelial growth factor in Plateau Yak's lung[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38(12):1086-1088. (in Chinese)
- [10] LIU L, QIAO Y, HU C, et al. Endostatin exerts radiosensitizing effect in non-small cell lung cancer cells by inhibiting VEGFR2 expression[J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(1):18-26.
- [11] WANG S S, TU J C, ZHOU C J, et al. The effect of Lfcin-B on non-small cell lung cancer H460 cells is mediated by inhibiting VEGF expression and inducing apoptosis[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(2):261-271.
- [12] GASKILL C, MARRIOTT S, PRATAP S, et al. Shared gene expression patterns in mesenchymal progenitors derived from lung and epidermis in pulmonary arterial hypertension: identifying key pathways in pulmonary vascular disease[J]. *Pulm Circ*, 2016, 6(4):483-497.
- [13] SHI L L, ZHANG S, WU H G, et al. miR-200c increases the radiosensitivity of non-small-cell lung cancer cell line A549 by targeting VEGF-VEGFR2 pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10):e78344.
- [14] JIANG Y Y, ALLEN D, KERSEMANS V, et al. Acute vascular response to cediranib treatment in human non-small-cell lung cancer xenografts with different tumour stromal architecture[J]. *Lung Cancer*, 2015, 90(2):191-198.
- [15] FAN Y, SHI C Y, LI T Y, et al. microRNA-454 shows anti-angiogenic and anti-metastatic activity in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting LRP6[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(1):139-147.
- [16] KALITA H C, KALITA P C. Topographical anatomy on the lungs of yak (*Bos grunniens*) [J]. *Mysore J Agric Sci*, 2005, 39(4):525-527.
- [17] YANG B, YU S, CUI Y, et al. Morphological analysis of the lung of neonatal yak[J]. *Anat Histol Embryol*, 2010, 39(2):138-151.
- [18] 陈劲龙, 冉丕鑫. 血管内皮生长因子及其受体 KDR 在成熟期大鼠肺内的表达[J]. 广州医学院学报, 2003, 31(4):1-4. CHEN J L, RAN P X. The expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR in the lung of mature stage rat[J]. *Academic Journal of Guangzhou Medical College*, 2003, 31(4):1-4. (in Chinese)
- [19] TUDER R M, KASAHARA Y, VOELKEL N F. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptors causes emphysema in rats[J]. *Chest*, 2000, 117(5 Suppl 1):281S.
- [20] HEROLD-MENDE C, STEINER H H, ANDL T, et al. Expression and functional significance of vascular endothelial growth factor receptors in human tumor cells[J]. *Lab Invest*, 1999, 79(12):1573-1582.
- [21] HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. *Cell*, 1996, 86(3):353-364.
- [22] DIMEO T A, ANDERSON K, PHADKE P, et al. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13):5364-5373.
- [23] 田晓菲, 金先庆, 罗 庆, 等. CTGF、TGFβ₃ 及其受体在唇腭裂缘组织中的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(1):55-58. TIAN X F, JIN X Q, LUO Q, et al. The expression and significance of CTGF, TGFβ₃ and their receptors in fissure tissues of the patients with NSCLP[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2009, 34(1):55-58. (in Chinese)
- [24] STEWART D J. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(1):djt356.
- [25] WANG Z S, SHU W G, LU M M, et al. Wnt7b activates canonical signaling in epithelial and vascular smooth muscle cells through interactions with Fzd1, Fzd10, and LRP5[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(12):5022-5030.
- [26] BROTT B K, SOKOL S Y. Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(17):6100-6110.
- [27] BRIGSTOCK D R. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61)[J]. *Angiogenesis*, 2002, 5(3):153-165.
- [28] SHU W G, JIANG Y Q, LU M M, et al. Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung[J]. *Development*, 2002, 129(20):4831-4842.