

分类号：
学号：20202014070

密级：内部★1年
单位代码：10759

石河子大学 硕士学位论文



低分子肝素及 VEGF 通过 ERK1/2 信号通路对 PPHN 影响的机制初探

学位申请人	刘畅
指导教师	谷强
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	儿科学
研究方向	小儿重症
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子
2024年03月

分类号：
学号：20202014070

密级：内部★1年
单位代码：10759

石河子大学 硕士学位论文



低分子肝素及 VEGF 通过 ERK1/2 信号通路对 PPHN 影响的机制初探

学位申请人	刘畅
指导教师	谷强
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	儿科学
研究方向	小儿重症
所在学院	医学院

中国·新疆·石河子
2024年03月

**A preliminary investigation of the mechanism of the effects of low
molecular weight heparin and VEGF on PPHN via ERK1/2**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Liu Chang

(Pediatrics)

Dissertation Supervisor: Gu Qiang

March,2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名： 刘畅 时间： 2024 年 05 月 08 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名： 刘畅 时间： 2024 年 05 月 08 日

导师签名： 谷强 时间： 2024 年 05 月 08 日

摘要

目的：新生儿持续性肺动脉高压（Persistent pulmonary hypertension of the newborn, PPHN）是新生儿重症监护室常见的疾病，其主要发病机制是肺循环异常过渡，引起严重的低氧血症。主要病理机制为肺动脉平滑肌细胞（Pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs）的增生导致肺中小动脉重塑。本研究模拟 PPHN 的发病机制，通过低氧诱导建立动物模型以及细胞模型，探讨低分子肝素（Low molecular weight heparin, LMWH）、血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor, VEGF）及细胞外信号调节蛋白激酶 1/2（Extracellular signal regulated kinase1/2, ERK1/2）信号通路是否能逆转肺血管平滑肌的增殖及肺动脉血管重塑，进而改善持续性肺动脉高压的发生发展，为新生儿持续性肺动脉高压的治疗提供新的思路。

方法：根据本课题组前期造模成功的基础进行造模，将 36 只新生乳鼠随机分为六组，一组 6 只，分别为：对照组、PPHN 组、PPHN+DMSO 组、PPHN+依诺肝素钠组、PPHN+贝伐单抗组、PPHN+U0126 组。实验组根据体重每日给予乳鼠腹腔注射相应剂量的药物一次，对照组及 PPHN 组两组乳鼠每天注射等量的生理盐水，共计喂养 14 天。于第 15 天，提前禁食水 3-4 小时，进行经肋间隙右心室穿刺技术测量右心室收缩压(RVSP)判断小鼠肺动脉压力情况，将小鼠胸腔剪开，取出心肺组织，计算右心室肥厚指数，并通过 HE 染色观察肺泡及肺血管形态，以及免疫组化、Western blot 等方法检测 PCNA、VEGF、ERK1/2、pERK 蛋白的表达情况。提取新生乳鼠的原代肺血管平滑肌细胞并按干预条件分以下六组：常氧组、低氧组、低氧+DMSO 组、低氧+依诺肝素钠组、低氧+贝伐单抗组、低氧+U0126 组，低氧组细胞放置于三气培养箱内，分别给予相应干预药物 24h 后完成造模，取出造模好的细胞，进一步进行划痕实验、CCK-8 实验等检测细胞增殖及迁移情况，通过 Western blot 检测肺血管平滑肌细胞中 VEGF、ERK1/2、pERK、PCNA 蛋白的表达。

结果：（1）VEGF、ERK1/2 和 pERK 在肺血管平滑肌中均有表达，且在低氧条件下表达水平增加，低氧条件下促进了肺血管平滑肌细胞的增殖。（2）在低氧条件下，分别抑制 VEGF 和 ERK1/2 信号通路可降低 VEGF 的表达和 ERK1/2 的磷酸化水平，从而抑制了肺血管平滑肌细胞的增殖，有助于改善肺动脉高压的发生和发展。（3）低分子肝素可以抑制 VEGF 及 ERK1/2 进而抑制低氧引起的 PASMCs 增殖，降低肺动脉压力，减轻小鼠右心室肥厚程度，有助于改善肺动脉高压的发生和发展。

结论：低氧条件下可激活 VEGF 和 ERK1/2 通路信号，导致肺动脉平滑肌细胞增殖并促进血管重塑。肝素可抑制 VEGF 和 ERK1/2 信号通路，进而抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖，从而有助于改善 PPHN 的发生和发展。

关键词：新生儿持续性肺动脉高压；低分子肝素；VEGF；ERK1/2

Abstract

Objective: Persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN) is a common disease in neonatal intensive care units (NICUs), and its main pathogenesis is an abnormal transition in the pulmonary circulation that causes severe hypoxemia. The main pathological mechanism is the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) leading to remodeling of small arteries in the lung. In the present study, we simulated the pathogenesis of PPHN and established an animal model and a cellular model through hypoxia induction to investigate the effects of low molecular weight heparin (LMWH), vascular endothelial growth factor (VEGF) and extracellular signaling. We investigated whether low molecular weight heparin (LMWH), vascular endothelial growth factor (VEGF), and extracellular signal regulated kinase1/2 (ERK1/2) signaling pathways could reverse the proliferation of pulmonary vascular smooth muscle and pulmonary arterial vascular remodeling, and thus improve the development of persistent pulmonary hypertension, and provide new ideas for the treatment of persistent pulmonary hypertension in neonates.

Methods: The modelling was carried out based on the successful pre-modelling of our group, and 36 neonatal suckling mice were randomly divided into six groups of six mice: control group, PPHN group, PPHN+DMSO group, PPHN+Enoxaparin sodium group, PPHN+Bevacizumab group, and PPHN+U0126 group. The mice in the experimental group were given intraperitoneal injections of the appropriate dose of drug once a day according to their body weights, and the mice in the control group and the two groups in the PPHN group were injected with an equal amount of saline every day for a total of 14 days of feeding. On the 15th day, the mice were fasted from food and water for 3-4 hours in advance, and the transcostal right ventricular puncture technique was performed to measure the right ventricular systolic pressure (RVSP) to determine the pulmonary artery pressure of the mice, and the chest cavity of the mice was cut open to remove the cardiopulmonary tissues to calculate the right ventricular hypertrophy index, and to observe the morphology of alveoli and pulmonary vasculature by HE staining, as well as to detect the PCNA by immunohistochemistry, Western blot and other methods, VEGF, ERK1/2, pERK protein expression. Primary pulmonary vascular smooth muscle cells from neonatal mice were extracted and divided into the following six groups according to the intervention conditions: Normoxia group, Hypoxia group, Hypoxia + DMSO group, Hypoxia + enoxaparin sodium group, Hypoxia + bevacizumab group, Hypoxia + U0126 group, cells of the Hypoxia group were placed in the triple-air incubator, and the molding was completed after 24h of the corresponding intervention drugs were given respectively, and the molded cells were taken out to further carry out scratching experiments, The modelled cells were taken out, and the cells were further subjected to scratch assay, CCK-8 assay and other assays to detect cell proliferation and migration, and the expression of VEGF, ERK1/2, pERK and PCNA proteins in pulmonary vascular smooth muscle cells was detected by Western blot.

Results: (1) VEGF, ERK1/2 and pERK were all expressed in pulmonary vascular smooth muscle, and the expression levels increased under hypoxic conditions, which promoted the proliferation of pulmonary vascular smooth muscle cells. (2) Under hypoxic conditions, inhibition of VEGF and ERK1/2 signaling

pathway respectively can reduce the expression of VEGF and the phosphorylation level of ERK1/2, thus inhibiting the proliferation of pulmonary vascular smooth muscle cells, and contributing to the improvement of the occurrence and development of pulmonary hypertension. (3) Low molecular heparin can inhibit VEGF and ERK1/2 and thus inhibit the proliferation of PASMCs induced by hypoxia, reduce pulmonary artery pressure, and attenuate the degree of right ventricular hypertrophy in mice, which contributes to the improvement of the occurrence and development of pulmonary arterial hypertension.

Conclusion: Hypoxic conditions activate VEGF and ERK1/2 pathway signaling, leading to proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells and promoting vascular remodeling. Low molecular weight heparin inhibits the VEGF and ERK1/2 signaling pathways, which in turn inhibits the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells, thus contributing to the amelioration of the onset and progression of PPHN.

Key words: Persistent pulmonary hypertension in newborns; Low molecular weight heparin; VEGF; ERK1/2

目 录

摘 要.....	I
Abstract	II
目 录.....	IV
英文缩略表.....	VI
第 1 章 前 言.....	1
第 2 章 材料与方 法.....	4
2.1 材料.....	4
2.1.1 研究对象.....	4
2.1.2 主要试剂及设备.....	4
2.2 实验方 法.....	6
2.2.1 新生小鼠 PPHN 模型建立.....	6
2.2.2 新生小鼠 PPHN 模型分组.....	7
2.2.3 新生小鼠生长情况评估.....	7
2.2.4 新生小鼠组织的采集和保存.....	7
2.2.5 新生小鼠心、肺组织切片 HE 染色.....	7
2.2.6 免疫组化.....	9
2.2.7 Western Blot.....	10
2.2.8 原代肺动脉平滑肌细胞的提取和培养.....	12
2.2.9 实验模型制备及分组.....	14
2.2.10 CCK-8 检测细胞增殖活性.....	15
2.2.11 划痕实验检测细胞迁移能力.....	15
2.2.12 细胞 Western Blot 实验检测相关蛋白表达.....	16
2.2.13 统计学分析方法.....	17
第 3 章 结 果.....	18
3.1 依诺肝素钠、VEGF 及 ERK1/2 对 PPHN 小鼠 RVSP 及右心室肥厚程度的影响.....	18
3.2 依诺肝素钠、VEGF 及 ERK1/2 对 PPHN 小鼠体重的影响.....	19
3.3 依诺肝素钠、VEGF 及 ERK1/2 对 PPHN 小鼠肺组织的影响.....	19
3.4 依诺肝素钠、VEGF 及 ERK1/2 对 PPHN 小鼠肺内小血管的影响.....	20
3.4.1 HE 染色检测肺内小血管平滑肌增厚情况.....	20
3.4.2 免疫组化检测肺内小血管平滑肌 PCNA 表达情况.....	21
3.4.3 Western blot 检测肺内小血管平滑肌 PCNA 蛋白表达情况.....	22

3.5 PPHN 模型小鼠中依诺肝素钠及 VEGF 对 ERK1/2 表达的影响.....	23
3.5.1 依诺肝素钠对 VEGF 蛋白表达影响.....	23
3.5.2 依诺肝素钠对 ERK1/2 蛋白表达影响	23
3.5.3 抑制 VEGF 对 ERK1/2 及 pERK 蛋白表达影响	24
3.6 原代肺血管平滑肌细胞的提取与传代.....	25
3.7 依诺肝素钠、VEGF 及 ERK1/2 对体外血管平滑肌细胞增殖的影响.....	25
3.7.1 CCK-8 实验检测血管平滑肌细胞的增殖情况.....	25
3.7.2 Western blot 法检测增殖蛋白 PCNA 的表达影响.....	26
3.8 体外平滑肌细胞中依诺肝素钠及 VEGF 对 ERK1/2 表达的影响.....	27
3.8.1 依诺肝素钠对 VEGF 蛋白表达影响.....	27
3.8.2 依诺肝素钠对 ERK1/2 蛋白表达影响	27
3.8.3 抑制 VEGF 对 ERK1/2 及 pERK 蛋白表达影响	28
3.9 依诺肝素钠、ERK1/2 及 VEGF 对体外血管平滑肌细胞迁移的影响.....	29
第 4 章 讨 论.....	30
第 5 章 结 论.....	34
第 6 章 不足与展望	35
第 7 章 综 述.....	36
参考文献.....	41
致 谢.....	48
导师评阅表.....	50

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文全称
PPHN	Persistent pulmonary hypertension of the newborn	新生儿持续性肺动脉高压
PPH	Persistent pulmonary hypertension	持续性肺动脉高压
NICU	Neonatal Intensive Care Unit	新生儿重症监护室
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
PEF	Pulmonary blood flow	肺血流量
HP	Heparin	肝素
LMWH	Low molecular weight heparin	低分子肝素
ERK1/2	Extracellular signal regulated protein kinases1/2	细胞外信号调节蛋白激酶 1/2
RVSP	Right ventricular systolic pressure	右心室收缩压
GAGs	Glycosaminoglycans	糖胺聚糖
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	增殖细胞核抗原
iNO	Inhaled nitric oxide	吸入一氧化氮
PVR	Pulmonary vascular resistance	肺血管阻力
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
RV	Right ventricular	右心室
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
RVHI	Right ventricular hypertrophy index	右心室肥厚指数
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
WB	Western blot	蛋白印迹法

MAPK	Mitogen-activated protein kinases	丝裂原活化蛋白激酶
TBST	Tris-Buffered-Saline with Tween	洗膜缓冲液
OD	Optical density	光密度
PBF	Pulmonary blood flow	肺血流量
PASMCs	Pulmonary arterial smooth muscle cells	肺动脉平滑肌细胞
HIF	Hypoxia-inducible factor	缺氧诱导因子
VSMC	Vascular smooth muscle cells	血管平滑肌细胞
SMC	Smooth muscle cells	平滑肌细胞
Qp	Pulmonary flow quantity	肺循环血流量
CCK-8	Cell counting kit-8	细胞计数试剂盒-8

第1章 前 言

新生儿持续性肺动脉高压（Persistent pulmonary hypertension of the newborn, PPHN）是一种临床综合征，它的起源是多因素的，是一种出生时循环适应受损的综合征^[1]，由于出生时肺循环异常过渡，引起肺血管阻力升高，导致右向左肺外低氧血分流，以及严重的低氧血症。病理特点包括肺血管重塑和平滑肌增生，通常没有明显的肺实质病理改变^[2]。目前临床治疗策略包括高水平吸入氧气的机械通气和吸入一氧化氮（Inhaled nitric oxide, iNO）或西地那非药物治疗。尽管迄今为止对围产期病理生理和新生儿管理策略的了解有所进展，但其患病率仍并未发生显著变化^[3]。绝大多数 PPHN 患儿为足月儿和近足月儿，仅有大约 2% 的病例是早产儿^[4]，而且 PPHN 的患儿死亡率依然在 5%-10% 左右，仍没有太大的改变，其仍然是新生儿重症监护病房危重疾病的主要原因之一^[5]，因此探索 PPHN 潜在的发病机制和寻找新的治疗策略显得尤为重要。

PPHN 的病理生理学特征主要是肺血管阻力（Pulmonary vascular resistance, PVR）增加，导致肺血流量（Pulmonary blood flow, PBF）减少，因此返回左心的氧合血量减少，导致缺氧，终末器官灌注量减少^[3]。低氧血症可触发血管收缩，进而引起 PVR 的增高，而随着 PVR 的持续升高，右心室（Right ventricular, RV）承受的负荷增加，可导致右心室肥大，进而引起右心室功能受损和右心室扩张，严重者可导致右心室衰竭，进一步降低 PBF，加重低氧血症，在严重的 PPHN 病例中，这成为一个恶性循环，直到病理生理学发生不可逆的改变^[5]。PPHN 的病因较为广泛，一般可归结为以下三类：

（1）适应不良型：肺血管的结构和数量正常，但血管活性异常；（2）过度肌肉化型：平滑肌细胞厚度增加和远端异常。平滑肌细胞层的增厚，肌肉异常延伸到通常没有肌肉化的血管中，导致胎儿慢性缺氧，这也是特发性 PPHN 主要病因；（3）发育不全型：肺组织发育不全并伴随肺动脉数量的减少^[6]。研究指出，血管重塑的机制涉及到肺动脉平滑肌细胞（Pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs）的异常发育和过度增殖，导致血管平滑肌层的增生和肥大，血管壁增厚及小血管阻塞，进而导致血管腔变窄和 PVR 增加^[7, 8]，这些变化最终促使肺动脉高压的形成。

肝素是一种多分散的糖胺聚糖（Glycosaminoglycans, GAGs）混合物，具有很强的抗凝作用，与它的衍生物一起被广泛用于抗凝治疗，以防止静脉血栓栓塞症。低分子肝素（Low molecular weight heparin, LMWH）是肝素通过化学或酶解聚生成的，生成的片段大小约为肝素的三分之一，其制剂的血浆半衰期更长，生物利用度更高，剂量反应更可预测^[9, 10]。在近期的研究中发现，低分子肝素也有着多种非抗凝作用，包括抗病毒、抗炎抗免疫调节、生长因子调节及抗肿瘤作用，在去年的研究中发现，低分子肝

素在 COVID-19 的感染中起到抗炎及抗病毒的作用^[11]，在接受高剂量依诺肝素治疗的 COVID-19 患者中，与标准剂量预防相比，死亡率和临床恶化减少了 60%^[12]。有学者研究发现，LMWH 可以抑制股动脉平滑肌细胞的增殖，进而减少股动脉血管的重塑^[13]。在体外培养人主动脉平滑肌的研究中也发现，肝素及 LMWH 可以抑制主动脉平滑肌细胞的增殖，并表明他们可能在控制血管平滑肌细胞增殖和维持血管结构完整性方面发挥重要作用^[14]。研究者在新生兔肺血管的实验中发现应用 LMWH 治疗的动物中肺动脉内侧壁厚度和肌层化减少，能有效促进新生兔肺血管的成熟^[15]。此外，对肝素的研究发现，肝素可与血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor, VEGF）信号通路相互作用，从而调节新生血管的形成^[16]。同时，在糖尿病伤口的研究中，肝素也显示出通过调节 VEGF 进而调节血管生成的作用^[17]。本课题组在临床治疗新生儿持续性肺动脉高压中发现，在按临床指南规范治疗的同时，辅助加入适量肝素可提高患儿的生存率^[18]，但目前尚未有人研究肝素在 PPHN 中的作用机制。

VEGF 在血管生成中扮演着至关重要的作用，其被发现、分离和克隆可以追溯至二十多年前^[19]。VEGF 主要作用于内皮细胞，包括几个相关的基因，如 VEGF-B、VEGF-C 和胎盘生长因子（Placental growth factor, PlGF），但仍由 VEGF-A 在调节血管生成和疾病方面中发挥主导作用，影响血管通透性和新的血管生成。先前的研究表明，VEGF 在肿瘤生长和转移的分子发病机制中扮演着关键角色，以及与一些致盲性眼病相关的视网膜病变密切相关^[20]。在某些肿瘤细胞系中，VEGFR1 的表达可以介导对 VEGF 或 PlGF 的增殖^[21]。研究显示，缺氧可通过缺氧诱导因子（Hypoxia-inducible factor, HIF）、其他低氧调节基因以及不同的因素（如表皮生长因子、血小板衍生生长因子和致癌突变基因）协调 VEGF 的表达，VEGF 信号通过 VEGFR1/R2 调节多种激酶的活动，最终影响细胞增殖、迁移、存活，并调节血管通透性，在血管生成过程中有着重要作用^[22]。有研究者发现在肺部发育的胚胎阶段开始直至整个胎儿期，VEGF 配体及受体在肺上皮和间质均有表达，与 PPHN 及支气管肺发育不良（Bronchopulmonary dysplasia, BPD）的发生发展有着密切的关系^[23]。

丝裂原活化蛋白激酶（Mitogen-activated protein kinases, MAPK）是保守程度较高的丝氨酸/苏氨酸（Ser/Thr）蛋白激酶家族，在生物学的多个过程中发挥着重要的作用，包括参与细胞增殖、分化、迁移、应激反应、凋亡等过程的关键信号传导途径^[24]。目前已知的 MAPK 的家族成员有 ERK1/2 激酶、ERK5（BMK1）、JNK/SAPK、p38 激酶等^[25]，这些成员们对不同的上游信号刺激或抑制作用产生反应。其中细胞外信号调节蛋白激酶 1/2（Extracellular signal regulated kinase1/2, ERK1/2）是研究的最为广泛的成员，主要参与细胞增殖、分化、迁移及转录调节等的生物学过程^[26]。由于 ERK1/2 信号通路的增殖作用，在肿瘤中研究较多，已有大量研究证实其参与结肠癌、神经母细胞瘤、星形细胞瘤、横纹肌肉瘤等多种肿瘤的发生和发展有关^[27, 28]。有研究已证明

VEGF 可通过 ERK1/2 信号通路介导血管生成^[29]。然而，在 PPHN 中关于 ERK 是否参与平滑肌细胞的增殖导致肺血管重塑的研究相对较少。

基于以上分析，我们推测在新生儿持续性肺动脉高压中，VEGF 及 ERK1/2 信号通路可能引发肺动脉平滑肌的增殖，导致肺血管重塑，从而促进 PPHN 的发生发展。而肝素的作用可能在于抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖，从而改善肺血管重构。这一发现有望为 PPHN 的临床治疗提供新的思路，为寻找新的治疗靶点提供可能性。

本研究使用低氧诱导方法建立了新生小鼠肺动脉高压(PPHN)模型，原代培养肺内小血管平滑肌细胞，分别给予依诺肝素钠、VEGF 抑制剂贝伐单抗、ERK1/2 抑制剂 U0126，测量右心室收缩压 (Right ventricular systolic pressure, RVSP) 及计算右心室肥厚指数，通过免疫组化和 Western blot 检测体外肺血管平滑肌细胞增殖细胞核抗原 (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) 蛋白表达及 CCK-8 技术检测细胞增殖，分析依诺肝素钠和 VEGF 分别对 ERK1/2 表达的影响，初步探讨依诺肝素钠、VEGF 及 ERK1/2 信号通路在 PPHN 中的作用机制，探究其是否能成为 PPHN 治疗的新思路。

第2章 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 研究对象

本研究采用了 SPF 级 C57BL/6 小鼠作为实验动物，购买于广东斯嘉景达生物科技有限公司，实验动物许可证号 SCXK(湘)2019-0004。细胞实验所用的细胞为从 C57BL/6 小鼠幼崽肺小血管中提取的原代平滑肌细胞。

2.1.2 主要试剂及设备

2.1.2.1 构建 PPHN 动物模型、测量右心室收缩压及组织提取需要的主要试剂和仪器

表 2-1 模型建立、测量右心室收缩压及取材所需主要试剂、仪器和厂商

主要试剂及仪器	厂商
小鼠小颗粒饲料	实验动物中心
小鼠垫料	零售
罐装氮气	零售
微量注射器	浙江纳德科学仪器有限公司
依诺肝素钠	上海麦克林生化科技有限公司
U0126	SIGMA
DMSO	SIGMA
贝伐单抗	上海罗氏制药有限公司
组织镊	杭州康诚健康科技有限公司
弯手术剪	杭州康诚健康科技有限公司
直手术剪	杭州康诚健康科技有限公司
医用换药包	振德医疗用品股份有限公司
75%酒精消毒液	山东利尔康医疗科技股份有限公司
七氟烷	上海恒瑞医药
超纯水	石河子大学生理实验室
多聚甲醛	Biosharp
0.9%氯化钠注射液	山东齐都药业有限公司
BL-420 生物机能实验系统	石河子大学机能实验室
KY-2F 型控氧仪	浙江省建德市新安江分析仪器二厂

2.1.2.2 HE 染色需要的主要试剂

表 2-2 HE 染色需要的主要试剂和厂商

主要试剂以及仪器	厂商
二甲苯溶液	山东旭然生物科技有限公司
无水乙醇	天津市致远化学试剂有限公司
95%酒精	山东康贝健消毒科技有限公司
90%酒精	山东康贝健消毒科技有限公司
85%酒精	山东康贝健消毒科技有限公司
75%酒精	山东康贝健消毒科技有限公司
苏木精染液	比克曼生物
伊红染液	比克曼生物
PBS 缓冲液	武汉塞维尔生物科技有限公司

2.1.2.3 免疫组化所用的主要试剂和仪器

表 2-3 免疫组化实验所需主要试剂和厂商

主要试剂以及仪器	厂商
PBS	武汉博士德生物工程有限公司
牛血清白蛋白(BSA)	德国 Biofrox
4%多聚甲醛	德国 Biosharp
Anti-VEGF antibody	Abcam
Anti-ERK Antibody	武汉博士德生物工程有限公司
Anti-pERK Antibody	武汉博士德生物工程有限公司
Anti-PCNA Antibody	武汉塞维尔生物科技有限公司
Pep Pen	比克曼生物

2.1.2.4 Western Blot 免疫印迹分析法相关试剂及仪器设备

表 2-4 Western Blot 实验所需主要试剂和厂商

主要试剂以及仪器	厂商
Anti-PCNA Antibody	武汉塞维尔生物科技有限公司
Anti-ERK Antibody	武汉博士德生物工程有限公司
Anti-pERK Antibody	武汉博士德生物工程有限公司
Anti-VEGF antibody	Abcam
Anti-beta Actin mouse mAb	武汉塞维尔生物科技有限公司
Anti-Beta Tubulin/TUBB Antibody	武汉塞维尔生物科技有限公司
辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)	武汉塞维尔生物科技有限公司
FITC 标记山羊抗兔 IgG(H+L)	武汉塞维尔生物科技有限公司
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	武汉博士德生物工程有限公司
PVDF 膜	Millipore 公司
湿转转移仪	北京六一仪器厂
化学发光成像仪 Tanon5200	化学发光成像仪 Tanon5200