文章编号:1000-5404(2010)13-1399-04

论著

雌二醇调控小鼠内皮祖细胞凋亡及体外血管新生研究

赵晓辉[1],吴 楠[2],尹扬光[1],方玉强[3],宋明宝[1],于世勇[1],陈剑飞[1],崔 斌[1],黄 岚[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军眼科中心[2];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科[3])

[摘要] **目的** 观察雌二醇(estradiol,E_2)对体外培养骨髓来源内皮祖细胞(endothlial progenitor cells,EPCs)分化及凋亡的影响。**方法** 密度梯度离心法获取骨髓单个核细胞,流式细胞分析、FITC-荆豆凝集素Ⅰ、DiI-乙酰化低密度脂蛋白荧光双染鉴定。单个核细胞培养 7 d 后进行实验分为对照组、0.01 μmol/L E_2 组、0.1 μmol/L E_2 组、1 μmol/L E_2 组。分别采用流式细胞仪、体外管型生成实验观察 EPCs 的凋亡及体外血管新生的变化。**结果** 雌二醇治疗组体外血管新生实验评分分别为 0.01 μmol/L 组(2.91 ± 0.70);0.1 μmol/L 组(4.04 ± 0.66); 1 μmol/L 组(4.73 ± 0.48),较对照组(2.13 ± 0.59)均明显增加($P<0.01$);流式细胞仪检测过氧化氢诱导的雌二醇治疗组 EPCs 凋亡率分别 0.1 μmol/L 组[(0.24 ± 0.01),($P<0.05$)]; 1 μmol/L 组[(0.21 ± 0.02),($P<0.01$)],较对照组(0.29 ± 0.02)明显降低;0.01 μmol/L 雌二醇治疗后 EPCs 凋亡率无明显变化[(0.27 ± 0.03),($P>0.05$)]。**结论** E_2 可抑制 EPCs 凋亡、促进 EPCs 体外血管新生。

[关键词] 雌二醇;内皮祖细胞;凋亡;血管新生;小鼠
[中图法分类号] R322.12; R329.28; R977.12 **[文献标志码]** A

Effects of estradiol on apoptosis of mice endothelial progenitor cells and *in vitro* neovascularization

Zhao Xiaohui[1], Wu Nan[2], Yin Yangguang[1], Fang Yuqiang[3], Song Mingbao[1], Yu Shiyong[1], Chen Jianfei[1], Cui Bin[1], Huang Lan[1] ([1] Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2] Department of Ophthalmology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [3] Department of Cardiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[Abstract] Objective To observe the effect of estradiol (E_2) on apoptosis of endothelial progenitor cells (EPC) and *in vitro* neovascularization. Methods Bone marrow mononuclear cells (MNC), harvested by density gradient centrifugation, were double-stained with FITC-agglutinin 1 and DiI-acetylated low density lipoprotein fluorescence and analyzed by flow cytometry. Seven days after culture, MNC were divided into control group, 0.01 μmol/L E_2 group, 0.1 μmol/L group and 1 μmol/L E_2 group. After treated with E_2 at the concentrations of 0.01, 0.1, and 1 μmol/L, apoptosis of EPC and *in vitro* neovascularization in experimental group were detected with a flow cytometer. Results E_2 used at the concentrations of 0.01, 0.01, and 1 μmol/L, promoted *in vitro* tube formation in experimental group and control group (2.91 ± 0.70, 4.04 ± 0.66 and 4.73 ± 0.48 *vs* 2.13 ± 0.59), and apoptosis of EPC in experimental group decreased (0.24 ± 0.01 and 0.21 ± 0.02 *vs* 0.29 ± 0.02 and 0.29 ± 0.02, $P<0.01$). Conclusion E_2 can inhibit apoptosis of EPC and promote *in vitro* neovascularization.

[Key words] estradiol; endothelial progenitor cell; apoptosis; neovascularization

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470729, 30800480), the Starting Funds for Personnel Returning from Overseas (2009XHG13), the Foundation of Overseas Returner of Chongqing (CSTC2009BB5020) and the Innovative Foundation for Young Scholars of Third Military Medical University (2007XG31). Corresponding author: Huang Lan, Tel: 86-23-68755601, E-mail: huanglan260@yahoo.com.cn

如何有效促进血管损伤后再内皮化已成为动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)研究领域中的重要课题之一。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)由造血干细胞分化而来,是血管内皮细胞的前体细胞,表

[基金项目] 国家自然科学基金(30470729,30800480);留学回国人员启动基金(2009XHG13);重庆市留学回国人员基金(2009BB5020);第三军医大学创新青年基金(2007XG31)
[通信作者] 黄 岚,电话:(023)68755601,E-mail: huanglan260@yahoo.com.cn

达干细胞及内皮细胞的相关抗原[1]。在血管损伤时，EPCs从骨髓动员到外周血，迁移、黏附到损伤区域，增殖、分化为成熟内皮细胞，促进损伤血管再内皮化[2]，维持内皮细胞单层完整性，从而起到修复损伤血管，预防AS发生的作用。

雌激素在多种心血管疾病的发生、发展中发挥重要的作用，探讨雌激素对EPCs生物学功能的影响具有重要的研究价值。本研究拟探讨雌二醇对EPCs凋亡和体外血管新生的影响，为EPCs治疗策略提供一定的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

雌性4～6周C57BL/6小鼠40只，体质量20～30 g，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。小鼠Percoll液购自Amersham bioseience公司，胎牛血清购自天津TBD公司，M199培养液购自HyClone公司，二甲基亚砜(DMSO)购自北京亚太精细化工公司(分析纯)，DiI-乙酰化低密度脂蛋白(aeLDL)购自Molecular probe公司，人纤维连接蛋白、二苯基四氮唑溴盐(MTr)、胰蛋白酶、雌二醇及FITC标记荆豆凝集素Ⅰ(FITC-UEA-Ⅰ)购自Sigma公司，血管生成试剂盒购自加拿大CHEMICON公司；荧光倒置显微镜(Olympus)，激光共聚焦荧光显微镜(Leica)。

1.2 EPCs的培养和鉴定

1.2.1 EPCs的培养 小鼠脱臼处死，75%酒精浸泡5 min，密度梯度离心法获取骨髓单个核细胞悬液后与DMEM以1∶2体积稀释；按5∶3的比例沿管壁缓慢平铺于淋巴细胞分离液面之上，2 000 r/min离心20 min；取单个核细胞加入DMEM培养液(添加20%胎牛血清，1%青链霉素，VEGF 50 ng/ml，b-FGF 5 ng/ml，EGF 10 ng/ml)，以$1\times10^6/cm^2$接种于纤连蛋白(1 ng/L)包被的培养板，3～4 d换液[1]。

1.2.2 acLDL-DiI摄取和FITC-UEA-Ⅰ结合荧光双染鉴定 细胞培养7 d后，PBS冲洗后与acLDL-DiI(2.4 μg/ml) 37 ℃孵育1 h，PBS清洗3次，2%多聚甲醛固定细胞15 min，加入FITC-UEA-Ⅰ(10 μg/ml)，37 ℃孵育1 h；1 μg/ml DAPI孵育20 min复染；激光共聚焦显微镜鉴定UEA和LDL双染色阳性细胞为正在分化的EPCs[1]，计算双阳性细胞比例。

将1×10^6细胞重悬于100 μl PBS中，分别加入FITC-Sca-1和PE-VEGFR-2抗体各10 μl，阴性对照管加入小鼠同型IgG抗体10 μl，4 ℃避光孵育30 min；1 000 r/min离心5 min，弃上清液，流式细胞检测缓冲液洗涤2次；以488 nm氩离子激光激发，流式细胞仪检测，以测定管所测定的荧光标记细胞比例减去同型对照管所测定的荧光标记细胞比例(即非特异性的背景染色)，作为实际荧光标记阳性细胞比例，其值以百分比表示。

1.3 体外血管新生实验

Matrigel 4 ℃过夜使其溶解，预冷枪头及96孔板，将100 μl Matrigel缓冲液加入900 μl Matrigel中，加入雌二醇使其终浓度为0、0.01、0.1、1 μmol/L，缓慢混匀，避免产生气泡，按50 μl/孔接种至96孔板，37 ℃孵育2 h使胶凝固；0.25%胰蛋白酶消化细胞，计数；按5 000～10 000/孔接种细胞，培养箱37 ℃，饱和湿度，5% CO_2培养6 h(超过24 h可导致细胞凋亡)。200倍视野下观察管状结构形成情况[3]。评价标准：分离明显的单个细胞：0分；细胞开始迁移并排列：1分；血管结构形成、未出芽：2分；有新生血管出芽：3分；闭合的多边形出现：4分；复杂的筛网状结构出现：5分。

1.4 流式细胞仪Annexin V/PI双染色法检测雌二醇对EPCs凋亡的影响

培养14 d EPCs于无酚红、无血清DMEM培养过夜，PBS清洗细胞3遍，加入雌二醇使其终浓度为0、0.01、0.1、1 μmol/L，37 ℃培养1 h，随后加入过氧化氢使其终浓度为200 μmol/L，共孵育24 h，诱导凋亡[4]；0.125%胰蛋白酶消化细胞、计数，每样本细胞数为$(1\sim5)\times10^6$/ml，用孵育缓冲液洗涤1次，1 000 r/min离心5 min；100 μl的标记溶液重悬细胞，室温下避光孵育10～15 min；加入荧光(SA-FLOUS)溶液4 ℃下孵育20 min，避光并不时振动；流式细胞仪激发光波长用488 nm，用一波长为515 nm的通带滤器检测FITC荧光，另一波长大于560 nm的滤器检测PI。结果判断：凋亡细胞对所有用于细胞活性鉴定的染料如PI有抗染性，坏死细胞则不能。细胞膜有损伤的细胞的DNA可被PI着染产生红色荧光，而细胞膜保持完好的细胞则不会有红色荧光产生。在双变量流式细胞仪的散点图上，左下象限显示活细胞，为($FITC^-/PI^-$)；右上象限是非活细胞，即坏死细胞，为($FITC^+/PI^+$)；而右下象限为凋亡细胞，显现($FITC^+/PI^-$)。

1.5 统计学处理

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 11.0统计软件，组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 EPCs形态、功能鉴定

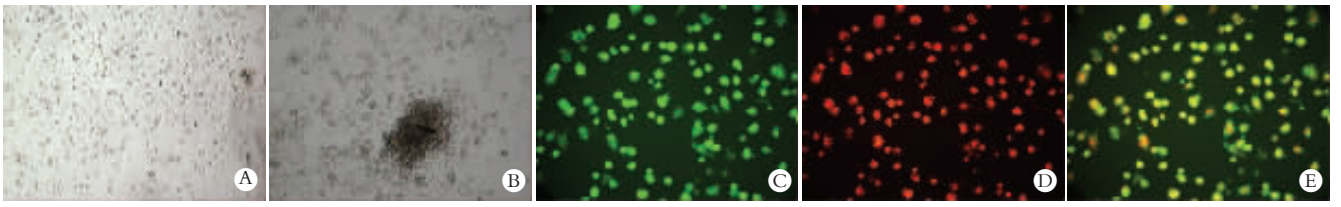
分离后单个核细胞台盼蓝染色存活率>90%，细胞培养第4天，相差显微镜下可见细胞增多、增大，并伸展呈椭圆形、短梭形细胞，有少量细胞突起(图1A)。培养7 d，长梭形细胞较前明显增多，并呈簇状生长，有一定方向性，形成细胞克隆(图1B)，细胞Sca-1及VEGFR-2的阳性率分别为(38.82±9.09)%、(55.91±17.18)%。通过共聚焦显微镜鉴定发现，绿色荧光细胞为FITC-UEA-Ⅰ结合阳性(图1C)，红色荧光细胞为acLDL-DiI摄取阳性(图1D)，黄色荧光细胞为UEA-Ⅰ和DiLDL双染色阳性细胞，被认为是正在分化的EPCs(图1E)，阴性对照未见染色。培养细胞双染阳性数为(87.32±5.13)%。

2.2 雌二醇促进EPCs体外血管新生

0.01、0.1、1 μmol/L雌二醇治疗组体外血管新生实验评分分别为(2.91±0.70)、(4.04±0.66)、(4.73±0.48)分，较对照组[(2.13±0.59)分]均明显增加($P<0.01$)，见图2。

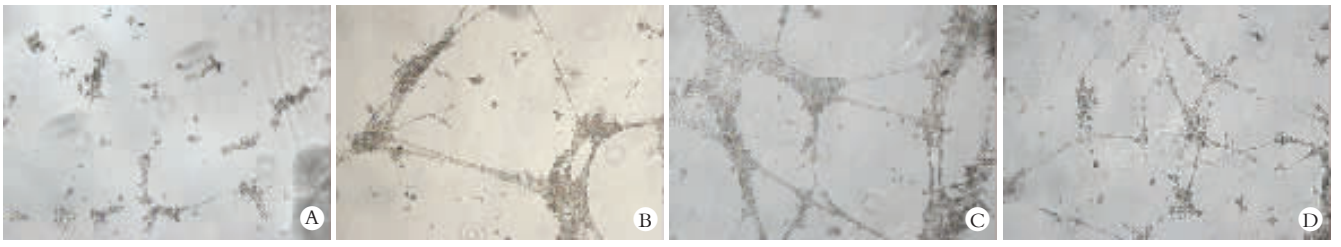
2.3 雌二醇对培养EPCs凋亡的影响

流式细胞仪分析显示：过氧化氢诱导的EPCs凋亡率在对照组为(0.29±0.02)，0.1 μmol/L[(0.24±0.01)，$P<0.05$]与1 μmol/L[(0.21±0.02)，$P<0.01$]雌二醇治疗可以明显减少EPCs凋亡率。而0.01 μmol/L雌二醇治疗后EPCs凋亡率无明显变化[(0.27±0.03)，$P>0.05$]。



A:培养第 4 天(相差显微镜 ×100);B:培养第 7 天(相差显微镜 ×200);C:培养第 7 天 FITC-UEA-Ⅰ染色(激光共聚焦显微镜×400);D:培养第 7 天 acLDL-DiI 染色(激光共聚焦显微镜×400);E:培养第 7 天 UEA-Ⅰ和 DiLDL 双染色(激光共聚焦显微镜×400)

图 1 原代小鼠 EPCs 形态学及功能鉴定



A:对照组;B:0.01 μmol/L 雌二醇治疗组;C:0.1 μmol/L 雌二醇治疗组;D:1 μmol/L 雌二醇治疗组

图 2 雌激素对 EPCs 体外血管新生的促进作用 (相差显微镜 ×200)

3 讨论

EPCs 是参与损伤血管修复的重要成分。EPCs 由造血干细胞分化而来,是血管内皮细胞的前体细胞,表达干细胞及内皮细胞的相关抗原,可由骨髓、外周血、脾脏中分离获得[5,6]。在血管损伤时,EPCs 从骨髓动员到外周血,迁移、黏附到损伤区域,增殖、分化为成熟内皮细胞,促进损伤血管再内皮化,维持内皮细胞单层完整性,从而起到修复损伤血管,预防 AS 发生的作用[7]。由于 EPCs 比内皮细胞更原始,具有更强的增殖能力,因此在损伤血管修复方面具有一定的优越性,并受到人们广泛的关注。

雌激素在心血管疾病的发生、发展中发挥重要的作用,研究发现雌激素对损伤血管修复的益处不仅与内皮细胞有关,其对内皮细胞前体 EPCs 的生物学功能调控也发挥着重要的作用。Strehlow 等[8]研究发现卵巢切除后 4 周小鼠骨髓及外周血中 Sca-1 +/VEGFR2 + EPCs 数量减少,而补充雌激素可以促进 EPCs 动员,增加其数量;利用 DiI-LDL 及 UEA 双染体外培养的脾脏 EPCs 也发现了相似的结果。同时,流式细胞检测也发现绝经期女性外周血 EPCs 数量较正常人降低,而雌激素替代治疗后 EPCs 数量明显升高。另外有研究显示,颈动脉损伤后,卵巢切除组外周血 EPCs 数量较雌激素替代治疗组明显减少,而在 eNOS 基因敲除小鼠,则没有上述差别[9],提示雌激素介导血管损伤后的 EPCs 动员,而 eNOS 信号通路在其中发挥重要的作用。我们在既往研究中发现雌激素可以改善内皮祖细胞的体外增殖和迁移能力,并报道该机制与雌激素受体/PI3K 信号通路有关[10]。另有报道认为雌激素可以通过 EPCs 表达的雌激素受体促进心肌梗死后血管新生[11,12]。提示雌激素对 EPCs 功能调控作用非常广泛,在血管新生及损伤血管再内皮化研究中具有重要的研究价值。

血管新生是出生后血管生成的重要机制,也是目前心血管疾病研究的重点内容之一。虽然有关雌激素调控 EPCs 体外及在体功能的报道日益增加,但有关雌激素在 EPCs 体外血管新生的相关报道研究较少。目前体外研究血管新生的方法主要采用 matrigel 模拟体内三维环境进行评价,我们结合既往研究的方法采用量化评价血管新生,本研究发现 0.01、0.1、1 μmol/L 雌二醇还可以促进 EPCs 体外血管出芽,形成闭合的类血管结构,即雌激素可以促进体外血管新生。

糖尿病、老龄、吸烟、冠状动脉疾病及其危险因素均可导致 EPCs 功能受损。本实验证实 0.1、1 μmol/L 雌二醇还可以抑制 H_2O_2 介导的 EPCs 凋亡,该结果是对目前 EPCs 研究的一个重要补充,为将来进一步深入探讨雌激素治疗作用提供了一些实验基础。我们猜测雌激素受体/PI3K 信号通路可能在其中发挥重要的作用,但这仍有待进一步研究证实。

志谢 对第三军医大学新桥医院心血管病实验室邓梦扬等为本实验付出的辛勤劳动表示感谢

参考文献:

[1] Zhao X, Huang L, Yin Y, *et al*. Estrogen induces endothelial progenitor cells proliferation and migration by estrogen receptors and PI3K-dependent pathways[J]. Microvasc Res, 2008, 75(1):45 - 52.

[2] Brouchet L, Krust A, Dupont S, *et al*. Estradiol accelerates reendothelialization in mouse carotid artery through estrogen receptor-alpha but not estrogen receptor-beta[J]. Circulation, 2001, 103(3): 423 - 428.

[3] Liu C, Wang S, Deb A, *et al*. Proapoptotic, antimigratory, antiproliferative, and antiangiogenic effects of commercial C-reactive protein on various human endothelial cell types in vitro: implications of contaminating presence of sodium azide in commercial preparation[J]. Circ Res, 2005, 97(2): 135 - 143.
[4] Adams V, Lenk K, Linke A, *et al*. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(4): 684 - 690.
[5] 赵晓辉, 黄岚, 尹扬光, 等. 小鼠脾脏内皮祖细胞的分离和培养[J]. 心脏杂志, 2006, 18(5):532 - 535.
[6] 尹扬光, 黄岚, 赵晓辉, 等. SDF-1 对内皮祖细胞增殖迁移的影响及 AMD3100 对其的干预[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 475 - 478.
[7] Zhao X, Wu N, Huang L. Endothelial progenitor cells and spleen: new insights in regeneration medicine[J]. Cytotherapy, 2010, 12(1): 7 - 16.
[8] Strehlow K, Werner N, Berweiler J, *et al*. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation[J]. Circulation, 2003, 107(24): 3059 - 3065.
[9] Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, *et al*. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9[J]. Circulation, 2006, 113(12): 1605 - 1614.
[10] 赵晓辉, 黄岚, 尹扬光, 等. 雌二醇对骨髓内皮祖细胞部分生物学功能的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2006, 8(5): 343 - 345.
[11] Masuda H, Kalka C, Takahashi T, *et al*. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis[J]. Circ Res, 2007, 101(6): 598 - 606.
[12] Hamada H, Kim M K, Iwakura A, *et al*. Estrogen receptors alpha and beta mediate contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to functional recovery after myocardial infarction[J]. Circulation, 2006, 114(21): 2261 - 2270.

(**收稿**:2009-12-04;**修回**:2010-01-21)
(编辑 张 维)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)13-1402-01

肺保护性通气策略对上腹部肿瘤手术患者术后呼吸功能的影响

张 冰,努尔波拉提,刘亚华,张国庆 (830011 乌鲁木齐,新疆医科大学附属肿瘤医院麻醉科)

[关键词] 肿瘤;手术;上腹部;呼吸功能;肺;保护性通气
[中图法分类号] R61 **[文献标志码]** B

气管插管及机械通气是腹部手术后院内肺炎发生的高危因素之一[1]。长时间、传统的机械通气可能由于潮气量较大使肺泡过度牵拉和过小的呼气末肺容积致终末气道和肺泡反复开闭产生肺损伤,甚至并发呼吸机相关性肺损伤[2],其发病率高达9% ~40%[3]。近年小潮气量,低气道压、低 PEEP 的肺保护性通气策略,治疗急性呼吸窘迫综合征效果显著[4],但其在长时间全麻手术中应用的相关报道较少。本研究拟探讨肺保护性通气策略对上腹部肿瘤手术患者术后呼吸功能的影响。

1 资料与方法

1.1 临床资料

筛选2007年1月至2009年10月我们上腹部肿瘤手术患者60例,ASA Ⅰ或Ⅱ级,年龄30 ~55岁,体质量45 ~75 kg,术前血气及肺功能正常,无呼吸道感染。分为2组(n=30):常规通气组(CV组)和保护性通气组(PV组)。

1.2 方法

患者均行硬膜外复合全身麻醉。通气参数:氧流量2 L/min,吸入氧浓度>90%。CV组潮气量(VT) 10 ml/kg,I∶E=1∶1.5,呼吸频率(RR)12/min;PV组 VT 6 ml/kg,I∶E=1∶1.5,PEEP 3 ~5 cmH_2O,RR 16/min。两组均不用吸入麻醉药。术后硬膜外镇痛。

术前、气管插管后5 min、120 min、术后2、24 h抽桡动脉血测血气分析,计算氧合指数(oxygenation index,OI):OI = PaO_2/FiO_2。所有患者术前训练用流量计测坐位时潮气量(VT)、肺活量(VC)和RR。在术前、术后2、6、24、48 h按上述方法测定VT、VC和RR,每次连续测3次,取平均值。记录术后7 d内有无肺部感染、肺不张等并发症。

1.3 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用重复测量设计的方差分析,组间比较采用成组 t 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。

2 结果

组患者一般情况及手术时间差异无统计学意义(P>0.05)。与术前(7.39 ±0.08)相比PV组pH值在气管插管后5 min(7.35 ±0.08)、120 min(7.30 ±0.06)及术后2 h(7.33 ±0.13)降低(P<0.05)。与CV组相比PV组pH值在气管插管后120 min[(7.30 ±0.06)*vs*(7.43 ±0.12)及术后2 h[(7.33 ±0.13)*vs*(7.42 ±0.08)]降低(P<0.05)。CV组 $PaCO_2$ 气管插管后120 min(32.2 ±2.0)mmHg及术后2 h(5.4 ±2.6)mmHg低于术前(38.6 ±4.0)mmHg(P<0.05),而 $PaCO_2$ 在插管后5 min(40.8 ±2.4)、120 min(42.3 ±4.5)及术后2 h(40.1 ±4.9)较CV组增高(P<0.05)。两组术后2 h OI值均低于术前(P<0.05),PV组(386 ±30)高于CV组(362 ±32)(P<0.05)。

(下转1407页)

[通信作者] 张国庆,E-mail:zgqprofessor@sina.com