维普资讯 http://www.cqvip.com

中国局解手术学杂志 2001年第10卷第3期
Chin J Regional Anat & Operative Surg, 2001, Vol 10, No.3

犬小肠缺血再灌注血管内皮细胞 Bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达及意义

赵佐庆*

【摘 要】 目的 研究犬小肠缺血再灌注后血管内皮细胞中的凋亡基因(Bcl-2, Bax)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达改变和意义。方法 阻断分布于小肠较小范围的小肠动脉,建立小肠缺血再灌注模型。以免疫组织化学方法对小肠组织中的 Bcl-2, Bax 和 VEGF 的表达进行观察研究。结果 小肠缺血再灌注后,Bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达有明显的改变。小肠再灌注 0 min, Bcl-2、Bax 和 VEGF 的阳性细胞率分别为 85%, 55%和 10%,再灌注 30min,分别为 66%, 54%和 65%,而至再灌注 60min 则分别为 44%, 75%和 5%,在对照组仅有少量阳性细胞 结论 小肠缺血再灌注可引起抗凋亡基因 Bcl 表达增加,但随着血流恢复而逐渐减少 而凋亡基因 Bax 的表达则逐渐增加。VEGF 表达虽有一定增加,但最终减少。小肠缺血再灌注既增强凋亡基因表达和诱导凋亡。

【关键词】 缺血再灌注; Bcl-2; Bax; VEGF

The expression and its significance of apoptotic gene and VEGF in intestinal endothelial cells after ischemia-reperfusion of the dogs *Zhao Zuoqing. Department of Experimental Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xian 710038*

【Abstract】 **Objective** To investigate the expression and its significance of Bcl-2, Bax and vascular endothelial growth factor (VEGF) in intestinal ischemia and reperfusion injury. **Methos** The ischemia and reperfusion models were established by clamping the intestinal artery distributing in small area, and the expression of Bcl-2, Bax and VEGF were studied in intestinal tissues by immunohistochemical method. **Results** The changes of expression of Bcl-2, Bax and VEGF in intestine after ischemia and reperfusion were obvious. After reperfusion for 0 min, the positive cell ratio of Bcl-2, Bax and VEGF was 85%, 55% and 10%, for 30 min and 60 min, that was 66%, 54%, 65% and 44%, 75%, 5% respectively. There was only a small number of positive cells in control animals. **Conclusion** Ischemia and reperfusion could increase the expression of anti-apoptotic gene Bcl-2 and VEGF at early stage, but it decreases when the blood flow recovered, the expression of apoptotic gene Bax increases continuously. Intestinal ischemia and reperfusion injury might play an important role in increasing the expression of apoptotic gene and induces the apoptosis.

【Key words】 Ischemia and reperfusion; Bcl-2; Bax; VEGF

在小肠外科创伤及手术过程中,血管的损伤阻断引起缺血再灌损伤甚为常见。研究证明,缺血再灌注损伤是一种肯定的但机制复杂的病理改变过程,其中包括氧自由基损伤,ATP 酶水解,Ca^{2+} 超载及细胞凋亡等[1-4]。其中缺血再灌注后细胞凋亡对创伤,术后修复等的影响是人们关注的研究内容。在小肠粘膜组织等缺血再灌注损伤研究中已发现了上述的病理改变,但小肠组织中的血管内皮细胞是否同样出现细胞凋亡改变目前报道少见。本文采用犬小肠缺血再灌注模型,以免疫组织化学方法对小肠组织中的血管内皮细胞的 Bcl-2、Bax 和血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达改变进行了研究,以探讨小肠缺血再灌注损伤机制和防治手段打下基础。

材料和方法

一、材料:青年家犬 18 只,雌雄不拘,重量 15~20kg。分再灌注 0, 30 及 60min 三个实验组,每组 6 只动物。以速眠新肌肉注射麻醉后(0.15ml/kg),仰卧位固定于手术台上,按无菌手术操作开腹。提出小肠,距空肠起始部 15cm 处,选择分布于肠管约 5cm 范围之小肠动脉,用无损伤钳阻断 30min 后松开恢复血流。各组动物分别于再灌注 0 min(血流恢复即刻), 30 min 和 60 min 及缺血再灌注区外的正常肠管(对照)切取 0.3cm×0.3cm×0.3cm 之大小组织块置 4%多聚甲醛磷酸缓冲液(0.01mol PBS, pH7.4)固定以备免疫组织化学研究。Bcl-2, Bax 及 VEGF 鼠单克隆抗体为 MBI 公司产品,链霉菌抗生物素过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒购自福州迈新生物技术公司, DAB 为 Sigma 公司产品。

二、方法:将组织块脱水、石蜡包埋后切片,片厚 5μm。切片经脱蜡水化后,PBS 漂洗 10min,按试剂盒要求进行免疫组织化学技术操作。依次以氧化酶阻断剂和非免疫血清室温孵育 10min, PBS 漂洗 15min 后,切片分别滴加 Bcl-2, Bax 及 VEGF 单克隆抗体室温孵育 60min,同样以 PBS 漂洗。其间均以 PBS 漂洗 10~15min。最后以 DAB 反应 5~10min,自来水终止反应及 PBS 漂洗。以苏木精复染后,切片经酒精脱水、二

* 作者单位:710038 西安市第四军医大学唐都医院实验外科

维普资讯 http://www.cqvip.com

甲苯透明，树胶封片光镜下观察。用 PBS 分别代替第一、二、三抗体以做阳性对照。细胞质内出现棕黄色颗粒或匀质样棕黄色结构为 Bcl-2，Bax 及 VEGF 免疫反应阳性细胞，各例切片连续观察 5 个高倍视野，计数每 100 个细胞中的阳性细胞数为阳性细胞率（以% 表示）。

统计学分析：所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 χ^2 检验分析。

结　果

一、Bcl-2 在血管内皮细胞的表达：Bcl-2 免疫阳性细胞表现为血管内皮细胞质的棕黄颗粒。Bcl-2 免疫阳性细胞主要位于小肠壁粘膜下层和平滑肌层的小动脉和毛细血管内皮细胞。有阳性细胞的血管常呈束状分布，也有散在阳性毛细胞血管。再灌注 0min，阳性细胞明显增多，染色增深。至再灌注 30min 和 60min 阳性细胞率逐渐下降（表 1）。

二、Bax 在血管内皮细胞的表达：Bax 免疫阳性细胞也表现为内皮细胞核两侧条状胞浆内的棕黄色颗粒或匀质样结构。再灌注 0 min，与对照组动物相比，阳性细胞已很明显，至再灌注 30min 和 60min 则逐渐增多（$P < 0.01$，表 1），出现阳性细胞之血管和毛细胞血管也更为密集。

三、VEGF 在血管内皮细胞的表达：VEGF 阳性细胞的胞浆内也充满棕黄色颗粒状结构。VEGF 在再灌注后的表达较弱。再灌注 0min 仅有少量散在阳性细胞，至再灌 30min 则明显增多，但至再灌注 60min 则明显减少（附表）。

附表　Bac-2、Bax 和 VEGF 在小肠血管内皮细胞的表达（n = 6，$\bar{x} \pm s$，%）

分组	Bcl-2	Bax	VEGF
对照组	5 ± 2.1	4 ± 3.0	7 ± 3.2
0min	8.5 ± 4.0**	55 ± 3.1	110 ± 4.0*
30min	6.6 ± 3.0**	54 ± 2.7**	65 ± 3.8**
60min	44 ± 2.5**	75 ± 3.0**△	5 ± 4.0

注：*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$ vs 对照组，△：$P < 0.01$ vs 同组中 Bcl-2、VEGF 和同种基因的 30min

讨　论

研究表明，缺血再灌注可通过氧自由基改变，ATP 酶水解及 Ca^{2+} 超载等途径对组织细胞的功能和形态造成损伤。还发现上述各种损伤因素可诱导细胞凋亡[1-4]。小肠缺血再灌注损伤研究中关于小肠组织损伤与细胞凋亡也有报道[5]，目前认为再灌注损伤诱导细胞凋亡的机制是由于氧自由基对膜结构的磷脂不饱和脂肪酸的攻击，跨膜梯度改变，Ca^{2+} 进入胞内，激活相关酶系统而发生，但其中相关凋亡基因的激活在凋亡发生发展过程中有重要作用。在小肠外科创伤及手术过程中造成的缺血再灌注损伤除直接对小肠组织的影响外，包括氧自由基在内的多种因素均可对血管内皮细胞产生破坏作用。在本实验中发现，再灌注后不仅肠粘膜和小肠腺细胞的相关基因表达外，在粘膜下层等处的血管和毛细血管内皮细胞，Bcl-2、Bax 及 VEGF 的表达均非常显著，说明再灌注损伤引起了血管内皮细胞的功能和形态改变。资料显示，血管内皮细胞具有十分复杂的生理功能，如促凝抗凝，介导炎症反应，影响血管平滑肌的表型及血液循环等[1]。再灌注对血管内皮细胞的损伤，可对小肠的微循环和功能产生不利的作用，并加重其它组织细胞的损伤。

三种基因表达的时空特点说明存活基因 Bcl-2 表达在再灌注初期有所增加，但随着血流的恢复而逐渐减少，Bax 表达则呈逐渐增强趋势。在同一时间，两者的表达相比 Bax 明显高于 Bcl-2（$P < 0.01$）。根据两者比率不同，细胞存活或凋亡的发展方向不同的规律[7,8]，本文认为小肠缺血再灌注后血管内皮细胞的凋亡基因 Bax 明显被激活，有发生凋亡的趋势，但是否最终凋亡可能与损伤器官的状态及多种因素有关。VEGF 对血管内皮细胞功能和形态具有重要作用，但实验中发现仅在再灌 30min 时表达明显增强，60min 时则明显减少，是否与对血管内皮细胞具有保护作用还有待进一步研究。三种基因表达特点可能提示，小肠血管内皮细胞的再灌注损伤后，细胞出现增殖而修复损伤，而损伤较重不能存活的细胞则进行凋亡，此过程，与损伤后的修复重建有关。实验中 Bcl-2 和 Bax 的表达时空特点可能与此相符。

参 考 文 献

1. Bastide M, Bonlet R, Pu Q, et al. Relationship between inward rectifier potassium current impairment and brain injury after cerebral ischemia/reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab, 1999, 19(2): 1309 - 1315.
2. Mitsuoka H, Unno N, Sakurai T, et al. Pathophysiological role of endothelins in pulmonary microcirculatory disorders due to intestinal ischemia and reperfusion. J Surg Res, 1999, 87(2): 143 - 151.
3. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. Ann Thorac Surg, 1999, 68(5): 1905 - 1912.

维普资讯 http://www.cqvip.com

4. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, et al. Interleukin-10 inhibits pulmonary NF-Kappa B activation and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. Am J Physiol, 1999, 277(5 pt 1): L919 - 923.
5. Lo CC, Chen JC, Chen HM, et al. Aminoguanidine attenuates hemodynamic and microcirculatory derangement in rat intestinal ischemia and reperfusion. J Trauma, 1999, 47(6): 1108 - 1113.
6. Seidel SA, Hegde SS, Bradshaw LA, et al. Intestinal tachyarrhythmias during small bowel ischemia. Am J Physiol, 1999, 277(5 pt 1): G993 - 999.
7. 朝启德, 文允镛. 血管生物学. 北京: 北京医科大学中国协合医科大学联合出版社, 1997. 45.
8. 熊长云, 张祖传. 细胞凋亡. 生命科学, 1991, 11(增刊): 37 - 41.

(收稿: 2001-05-28)

·个案与短篇·

消化道 Dieulafoy 病出血的治疗体会

原志平* 张平时**

一、临床资料

本文收集 1989 年 10 月 ~ 1999 年 10 月间治疗的消化道 Dieulafoy 病 15 例，其中男 11 例，女 4 例，年龄 17 ~ 75 岁，平均年龄 46 岁。病变部位于食管下段 1 例，胃体小弯近贲门处 2 例，胃小弯侧 3 例，胃底 7 例，回肠 1 例，降结肠 1 例。临床表现及内窥镜检查：均以不明原因间歇发作性大呕血、黑便、鲜红色血便，贫血、营养不良、休克为临床表现，出血量 600 ~ 3000ml 不等。有一例合并有急性下壁心肌梗死，二例合并有高血压、糖尿病。其中胃镜确诊 8 例，纤维结肠镜确诊 1 例，剖腹探查及术中胃镜定位 5 例。

二、结果

6 例经胃镜下止血，余 9 例手术治疗，包括胃壁楔形切除、空肠部分切除、降结肠部分切除。术后立即止血，有二例经胃镜下止血，分别于半年及二年后再次出血，经手术治愈。全部病例均随访 2 ~ 5 年，治疗效果满意。

三、讨论

Dieulafoy 病是消化道出血的少见病因，约占上消化道大出血病因的 2%，随着胃镜检查的普遍应用和对本病认识的提高，其发病率近年来有增高趋势。Dieulafoy 病又称消化道粘膜血管畸形，解剖学显示粘膜下小动脉管径增粗达 0.4 ~ 4 毫米（正常 0.12 ~ 0.2 毫米），由于小动脉异常扩张，压迫粘膜使之变薄，再加消化液的腐蚀作用，使小动脉裸露，受到食物等的磨擦导致破裂出血，血管收缩，继则出血停止或减少，血痂脱落，血压升高又可再出血，故临床表现为反复间歇性消化道大出血。

急诊胃镜检查是确诊本病的首选方法，镜下为圆形或椭圆形孤立的粘膜糜烂，直径约 10 毫米，中央有搏动性出血或血管残端被覆血痂。剖腹探查，术中胃镜及结肠镜辅助诊断定位可避免胃肠切开，减少术中污染和手术盲切。血管造影可作为一种确诊手段，但因经验所限以及患者出血时耐受性差，情况紧急，不宜常规使用。本组有 2 例诊为胃底溃疡出血，经抗酸治疗二周，期间又间断出血两次，再次胃镜检查确诊。因此，我们强调反复、仔细胃镜检查可提高确诊率，尤其要注意与胃溃疡的镜下鉴别诊断。

关于 Dieulafoy 病的治疗，目前首选内镜止血，其方法有高频电凝、激光、微波及局部注射无水乙醇，喷洒去甲肾上腺素等。内镜下止血设备简单、操作方便，可直视下确切止血，并可随访观察，暂时止血率高。但因内镜下止血不能解除病因，解剖畸形仍然存在，有复发出血的可能。观察中发现有两例胃镜止血后两年内复发，重新手术治愈，而第一次手术者无一例复发。内镜下止血虽不能 100% 彻底止血，但能创造条件，为进一步手术治疗赢得宝贵时间，且是在诊断同时进行治疗，应作为 Dieulafoy 病的常规治疗措施，不应简单放弃。

对于首次出血量大或镜下止血后复发者、内镜发现血管较粗大者，病变位于胃底内镜操作困难不能满意止血者，应及时手术治疗。我们强调尽早手术，甚至急诊手术，术中探查发现胃腔积血，配合胃镜定位，在内镜引导下作病灶局部楔形切除。也可保护术野切开胃前壁仔细探察胃底、贲门部及小弯侧等好发部位，后楔形切除。废弃盲目胃大部切除。本组 7 例胃壁楔形切除、一例空肠部分切除，一例降结肠部分切除均一次治愈，随访 2 ~ 5 年均未见复发出血。

对于老年病人，要注意合并症的处理包括糖尿病、冠心病、高血压、肺心病等，不能作为手术禁忌症而消极等待贻误抢救时机，应在严密监护下积极手术。本组有一例即存在有上述多种疾病，经充分准备，第一次呕血时急诊手术，挽救了生命。因为 Dieulafoy 病人出血较多，经常伴有贫血、营养不良、休克等，围手术期应注意补充血容量，加强营养支持，预防应激性溃疡出血发生。

(收稿: 2001-04-11)

* 作者单位: 043300 山西省河津市山西铝厂医院外科
** 山西省运城地区医院外一科