维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0661-04

氧化应激促进维持性血透患者血清体外诱导血管新生

王喜超[1],甘 华[1],杜晓刚[1],李正荣[1],巫 江[1],李 革[2],杜 鹃[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院肾内科,重庆 400016;2. 重庆医科大学公共卫生学院流行病学教研室,重庆 400016;
3. 重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨维持性血液透析患者的氧化应激状态诱导血管新生。方法:11 例血液透析患者口服 VitE 400mg/d,连续服用 6 周(干预组),另外 11 例透析患者常规治疗(非干预组)。用 10%干预组患者血清培养基和 10%非干预组患者血清培养基培养人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell,HUVEC)。TBA 法检测血浆丙二醛(Malondialdehyde,MDA)水平,倒置显微镜下观察血管样结构形成,MTT 法检测细胞增殖,用 Transwell 小室测定细胞迁移能力,比色法检测细胞内活性氧产生。结果:在干预组,治疗后血浆 MDA 水平低于治疗前,用非干预组血清细胞培养 30h 后,有血管样结构形成,平均面积(1 438±112)μm^2,细胞迁移及增殖能力增强,细胞内活性氧产生增加。结论:维持性血透患者血清能够诱导 HUVEC 血管样结构形成,氧化应激状态是其重要机制。

【关键词】血管形成;内皮细胞;血液透析;氧化应激
【中国图书分类法分类号】R457 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-30

Haemodialysis patients sera induced angiogenesis in vitro by oxidative stress

WANG Xi-chao, et al

(*Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prove that haemodialysis patients sera medium can induce angiogenesis by oxidative stress. *Method*: Eleven haemodialysis patients were administered 400mg/d of vitamin E for 6 weeks per os (treated group), and another eleven haemodialysis patients were treated regularly (non-treated group). HUVEC were cultured in 10% treated patients sera medium and 10% non-treated patients sera medium respectively. The plasma level of MDA was detected by TBA method. Angiogenesis were observed under inverted microscope, cell proliferation examinded by MTT, cell migration measured in transwell, and ROS investigated by colorimetry. *Results*: In treated group, the plasma level of MDA was lower after treatment. There were tube formation (average area as 1 438 μm^2 ± 112 μm^2) and more cell proliferation and migration after cells were cultured in non-treated haemodialysis patients sera. The production of ROS was higher than that of cells exposed to treated patients sera medium. *Conclusion*: Haemodialysis patients sera medium can induce angiogenesis and oxidative stress is the important mechanism.

【Key words】 Angiogenesis; Endothelial cells; Haemodialysis; Oxidative stress

近年来研究证实,无论何种病因,人类多种急慢性肾损害均伴有微血管系统丧失或过度新生,并且提出了调控血管新生改善肾病进展的治疗概念。在透析患者中,血管新生也有相关报道。Giorgos K 等对 12 例血液透析患者的腓肠肌进行病理活检发现新生血管与肌纤维组织的比例增加[1]。Serradell 等报道血液透析患者大血管病变早期有内皮细胞的增生,并且可能是血管早期病变的主要形式[2]。血管新生是血管系统一种重要的代偿性变化,可能与透析患者血管系统病变相关。虽然血液透析患者也有新生血管形成,但其形成机制还不十分清楚。本文在体外培养的细胞水平探讨氧化应激对于维持性血液透析患者血清诱导血管新生的作用。

作者介绍:王喜超(1973-),男,博士,
研究方向:血液透析。
通讯作者:甘 华,女,教授,E-mail:zxg0233@sina.com。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 研究对象及材料

1.1.1 患者一般情况及血清留取 选取我院1996 年 9 月至 2006 年 10 月的 22 例维持性血液透析患者。所有患者在实验前近 1 月均无急、慢性感染、心力衰竭、不稳定心绞痛及手术史;实验前近 3 个月所有患者均未使用过维生素 E 和维生素 C 等抗氧化药物,透析年限均在 3 年以上,所有对象均签署知情同意书。原发病为慢性肾炎、高血压肾病和多囊肾等。随机分为干预组和非干预组,干预组患者 11 例,平均年龄(63.2 ± 7.8)岁,给予口服 VitE 400mg/d,连续服用 6 周,患者在干预期间其他的治疗药物方案不变。非干预组患者 11 例,平均年龄(58.8 ± 13.7)岁。所有患者均用碳酸盐透析,每周透析 3 次,每次 4.5h。透析膜采用聚砜膜 F7 型。2 组的年龄、性别组成无统计学差别。做 MDA 检测时,所有患者用药前后在血透前采血,肝素抗凝管采静脉血 3ml,30min 内分离血浆(3 000r/min,10min),-70℃保存,2 周内完成 MDA 检测,采用硫代巴比妥酸反应(TBA)法(按试剂盒说明书操作)。细胞实验采血为透析患者在透析后 2h 动脉端采血,使用真空促凝管采血,采血量为每人 5ml,取血后立即低温离心(4 000r/min,20min),取上层血清 -70℃保存。实验前干预组患者每个人的血清等比混合使用,非干预组患者血清也同样等比混合使用。

1.1.2 试剂与仪器 RIPM1640 培养基、胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)购于 sigma 公司,新生牛血清(杭州四季青公司)。Transwell 小室(美国 Costar 公司)。活性氧测定试剂盒(南京凯基公司),CK40 型倒置显微镜(日本 Olympus),ELX800 型酶标仪(美国 BIO-TEK 公司)。丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 内皮细胞培养及分组 HUVEC 由重庆医科大学组胚教研室惠赠,HUVEC 常规培养于含 10%新生牛血清的 1640 培养基,置于 37℃ 5%CO_2 培养箱中孵育,细胞长至融合状态后无血清 RPMI1640 同步化 24h。实验分为干预组和非干预组,干预组用含 10%干预组患者血清培养基,非干预组用含 10%非干预组患者血清培养基。

1.2.2 管状结构形成实验 把 HUVEC 接种于 24 孔培养板,经上述干预 10、20、30h,200 倍光学显微镜下每孔随机选择 10 个视野记数形成管状结构的数目及面积(Image-Pro-Plus 5.1 图像分析软件),结果取均值。

1.2.3 四甲基偶氮唑蓝比色(MTT)法检测细胞增殖 HUVEC 分别在干预组患者和非干预组患者血清培养基中以 2×10^3 个 /ml 密度接种于 96 孔培养板,每孔总体积 200μl,置于 37℃ 5%CO_2 培养箱中孵育,分别在 10、20、30h 后检测,每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml)20μl,继续孵育 4h,弃上清,每孔加入二甲亚砜 150μl,室温震荡 10min,在波长 570nm 处用酶标仪测量吸光度 A 值。每组、每个检测点设 6 个复孔,重复 2 次,结果取均值。

1.2.4 Transwell 小室检测细胞迁徙能力 Transwell 小室滤膜上先铺以含 25%基质胶的 1640 培养基,紫外光照射过夜后,HUVEC 分别在干预组患者、非干预组患者血清培养基中以 5×10^5 个 /ml 密度种于小室内,总体积 0.4ml,再把小室放入 24 孔培养板孔内,每孔再加入相同培养基 0.6ml,培养 30 h 后用 4%多聚甲醛固定细胞,擦净滤膜内表面细胞,HE 染色,400 倍光学显微镜下随机选择 10 个视野,计数每个视野细胞数目,取平均值。以迁移细胞数目表示细胞的迁徙能力。

1.2.5 比色法检测细胞内活性氧 HUVEC 以 2×10^4 个 /ml 接种于 48 孔培养板,经前述培养及分组干预 10、30h 后,弃上清,每孔加入 200μl 蒸馏水,冰上吹打直至细胞溶解。每孔的 200μl 细胞裂解液按凯基活性氧测定试剂盒说明书检测,计算各孔细胞产生活性氧能力。每组、每个检测点设 6 个复孔,实验重复 2 次,结果取均值。

1.2.6 统计学处理及图像分析 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计学分析采用重复方差分析中的方差分量模型(type=VC)方法。全部数据采用 SAS 9.1 统计软件进行数据处理。图片分析采 ImagePro-Plus 5.1 图像分析软件。

2 结 果

2.1 血透患者血浆氧化应激指标(MDA)水平

在非干预组,实验前后血浆 MDA 水平无统计学差别($P>0.05$),在干预组,治疗后血浆 MDA 水平低于治疗前,有统计学差别($P<0.01$)。治疗前,两组血浆MDA 水平差别无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.2 管状结构形成实验

HUVEC 在干预组患者、非干预组患者血清培养基培养 10、20h 后无血管样结构形成。培养 30h 后,非干预组有双层细胞形成,部分融合层细胞迁移到上面,变为长梭形,迅速生长,并形成管状结

表 1 VitE 对血透患者血浆氧化应激指标(MDA)水平影响(μmol/L)

	干预组		非干预组	
	治疗前	治疗后	实验前	实验后
例数	11	11	11	11
MDA	7.69 ± 2.35	5.24 ± 2.95[ab]	7.54 ± 1.97	7.96 ± 1.80

[a]:$P<0.01$,与治疗前比较;[b]:$P<0.01$,与非干预组比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

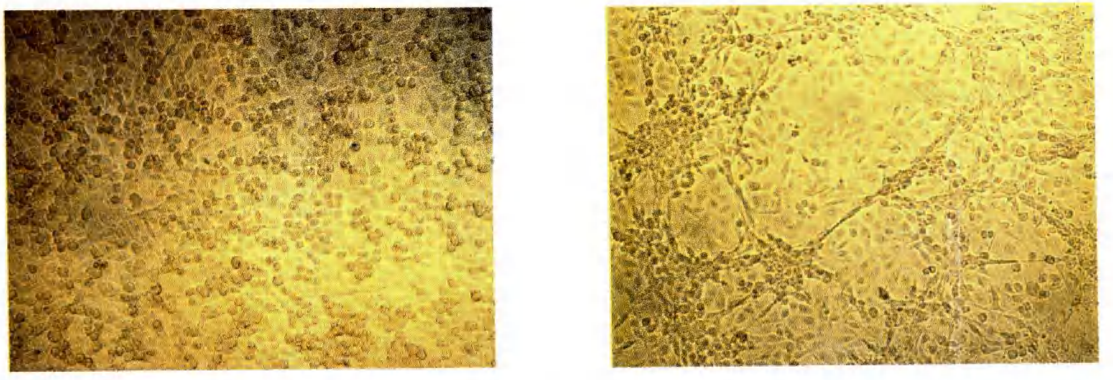
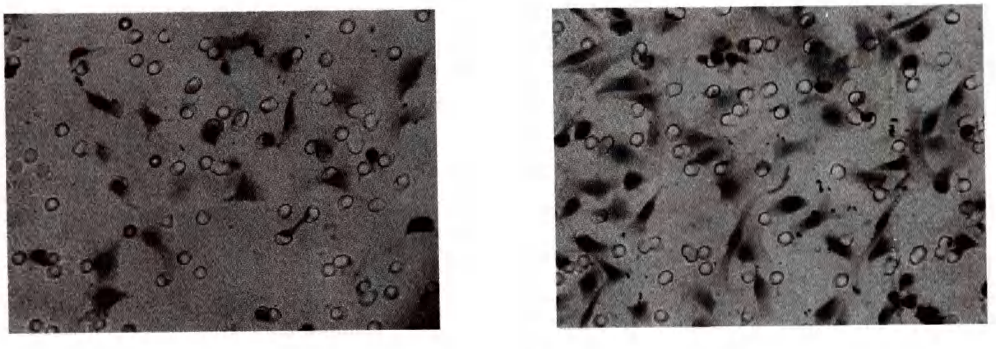


图 1 血清培养基培养 30h 后 HUVEC 血管样结构形成（×200）；左：干预组细胞向双层生长但无管状结构形成；右：非干预组细胞也双层生长，上层有管状结构形成

表 2 MTT 法不同时间两组细胞 570nm 处吸光度 A 值（$x \pm s$）

	10h	20h	30h
干预组	0.448 ± 0.065	0.655 ± 0.056[c]	1.003 ± 0.050[b]
非干预组	0.438 ± 0.044	0.706 ± 0.047[cd]	1.073 ± 0.046[ab]

[a]：P=0.007，与正常组比较；[b]：P<0.001，与 20h 比较；[c]：P<0.001，与 10h 比较 [d]：P=0.011，与对照组比较。



左：干预组迁移过来的细胞较少，右：非干预组迁移过来的细胞较多

图 2 血清培养基培养 30h 后 HUVEC 迁徙能力（HE 染色 ×400）

构；干预组无管状结构形成，细胞生长状态良好；非干预组 200 倍光学显微镜下平均每个视野可见（8.3 ± 3.1）个管状结构，相对管状结构面积（1 438 ± 112）μm^2，与干预组比较差别明显。见图 1。

2.3 MTT 法检测增殖

从 10h 到 30h 干预组与非干预组吸光度值都升高（P<0.001）。在 10h 2 组差异无显著性（P=0.158），20h、30h 非干预组高于干预组，具有统计学差异（P<0.001），说明此时非干预组活细胞数多于干预组，非干预组患者血清比干预组患者血清具有更强的促细胞增生的作用。见表 2。

2.4 Transwell 小室检测细胞迁徙能力

细胞培养 30h 后干预组迁移过滤膜的细胞为 400 倍光学显微镜下平均每视野（13.1 ± 3.4）个，非干预组平均迁移过滤膜的细胞为（63.5 ± 6.2）个，与干预组比较差异具有统计学差异（P<0.05，秩和检验）。见图 2。

2.5 比色法检测细胞内活性氧

表 3 不同时间两组细胞氧化性强度（$x \pm s$）

	10h（U/ml）	30h（U/ml）
短期透析组	11.270 ± 8.356	12.809 ± 8.047
长期透析组	13.056 ± 7.263	25.077 ± 7.860[ab]

[a]：P=0.003，与正常组比较；[b]：P=0.011，与 10h 比较

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞分别培养 10h、30h 后干预组在 2 个检测点，产生活性氧差别无统计学意义(P=0.395 2)，非干预组在 2 个检测点产生活性氧逐渐增多，差异具有统计学意义(P=0.011)，并且在 30h 非干预组比干预组产生更多活性氧，具有统计学差异(P=0.003)，而 10h 2 组无统计学差别(P=0.359 2)。见表 2。

3 讨 论

维持性血液透析患者处于氧化应激状态。维持性血液透析患者氧化应激增强和氧自由基清除系统的严重损伤使 ROS 升高，形成氧化和抗氧化失衡，其氧化应激的机制尚未完全阐明，可能与晚期糖基化终末产物、同型半光氨酸血症等刺激 ROS 生成有关，与尿毒症毒素潴留和自身代谢紊乱导致的抗氧化酶活性降低有关[3]，以及与血液透析本身透析膜不相容性，透析液污染使内毒素(Lipopolysaccharide，LPS)通过透析膜入血，激活单核巨噬细胞，促进细胞内 ROS 产生。而且，透析过程中，维生素 C 等水溶性抗氧化物质丢失和维生素 E 的活化障碍等加重氧化应激有关。活性氧可以促血管新生已被大量的实验报道所证实。心血管组织缺氧、复氧后，都有活性氧产生增加，这是导致这些组织血管新生的主要原因[4]。H_2O_2 直接参予了血管形成反应中的淋巴细胞的活化，并且，从银杏叶中提取的抗氧化剂可以抑制淋巴细胞介导的血管新生。另外，氧自由基清除剂可以抑制源于单核巨噬细胞诱导的血管形成[5]。在体外的实验中也发现，低浓度 H_2O_2 作用于内皮细胞 30min 就可以刺激形成血管样结构[6]。关于氧化应激诱导血管新生的机制，目前认为，首先，氧自由基可以促使巨噬细胞和血管平滑肌细胞分泌 VEGF[7]。临床研究也表明，血液透析患者血浆中 VEGF 水平是升高的[8]。VEGF 是重要的促血管新生的细胞因子。其次，ROS 可以刺激内皮细胞分泌 IL-8，分泌的 IL-8 量足以诱导血管新生。在 ROS 诱导血管新生中，NF-κB 和 NO 是重要的细胞内信号转导物质，然而关于 NO 的作用，目前仍有矛盾结果，可能与其在细胞内产生的量有关。冯利平等报道，口服 VitE 400mg/d，服药 6 周，能有效改善透析患者的氧化应激状态[9]。在本实验中也证明了这一点。在实验中看到，与干预组患者血清比，非干预组患者血清可以促进 HUVEC 增殖及迁移，用非干预组患者的血清培养基培养血管内皮细胞可以有血管样结构形成，而非干预组患者血清培养基中则不出现这种情况，说明非干预组患者的血清有促血管形成的作用。非干预组患者处于氧化应激状态，这是非干预组患者血清诱导血管新生的主要原因。

现在血管内皮细胞内产生的 ROS 更为引起人们的重视，作为细胞内第二信使其具有复杂多样的作用，包括血管新生、内皮细胞调亡等。VEGF 促血管新生可以通过 NADPH 氧化酶—ROS 途径完成[10]。在本实验中，在血管样结构形成之前，两组细胞内 ROS 产生无显著差异，而在 30h 有血管样结构形成时，非干预组细胞内 ROS 产生多于干预组。干预组患者血清不能诱导血管新生，细胞内也无 ROS 产生增多；非干预组患者血清可以诱导血管新生，并且细胞内 ROS 产生增多，说明 ROS 在血管形成中发挥作用。Ikeda 等研究证明，VEGF 可以通过 GDP 结合蛋白 Rac1 激活 NADPH 氧化酶，使细胞内 ROS 产生增加，促进 HUVEC 的增殖与迁徙[11]。因此，在非干预组患者血清诱导血管新生中，ROS 可能也是促进血管内皮细胞增殖与迁徙的重要的细胞内物质。

血液透析患者的氧化应激状态可以诱导血管新生，但这种血管新生不能持续，常出现血管塌陷，加重血管硬化；细胞增殖是血管新生的中重要步骤，细胞增殖可以促使血管内膜增厚，导致管腔狭窄，从而加重了血液透析患者的血管病变。

参 考 文 献

[1] Sakkas G, Derek S, Anthony J, et al. Skeletal muscle morphology and capillarization of renal failure patients receiving different dialysis therapies[J]. Clin Sci, 2004; 107(6): 617-623.

[2] Serradell M, Diaz-Ricart M, Cases A, et al. Uraemic medium accelerates proliferation but does not induce apoptosis of endothelial cells in culture[J]. Nephrol Dial Transplant, 2003; 18(6): 1079-1085.

[3] Hou FF, Owen WF. Beta 2-micmglobulin amyloidosis: role of monocytes or macrophages[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002; 11(4): 417-421.

[4] Sasaki H, Fukuda S, Otani H, et al. Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction[J]. J.Mol. Cell.Cardiol, 2002; 34(3): 335-348.

[5] Koch E, Cho M, Burrows C, et al. Inhibition of production of monocyte/macrophage-derived angiogenic activity by oxygen free radical scavengers[J]. Cell. Biol.Int. Rep, 1992; 16(5): 415-425.

[6] Yasuda M, Ohzeki Y, Shimizu S, et al. Stimulation of in vitro

(下转第 677 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

AML 患者的白血病细胞和体外细胞株 HL60,KG-1 都表达 GM-CSF 受体。此外,近年来国内国外的文献多次发表了用 GM-CSF 结合免疫毒素在治疗难治性和复发性的 AML 方面的研究报导,可见 GM-CSF 作为载体用于免疫导向治疗是完全可行的。它的优势在于重组人 GM-CSF 易得到,不会刺激体内产生抗体而影响疗效,可多次重复使用。由于部分白血病细胞高表达 GM-CSF 受体,故用 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体治疗 AML 可能还有相对选择作用,其疗效可能优于用单抗介导的免疫导向治疗。

本研究中采用 MTT 实验考察各种药物对 HL60 细胞增殖的抑制作用。通过实验发现:DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体对 HL60 细胞具有显著的增殖抑制效应。当药物浓度≥0.025 μg/ml 时,DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体和 DHAQ 脂质体对 HL60 细胞的杀伤作用与 DHAQ 相比均具有显著性差异,而且 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体和 DHAQ 脂质体相比前者的杀伤作用也显著强于后者。说明制成免疫脂质体制剂可能提高 DHAQ 的疗效,同时降低毒副作用,使 DHAQ 发挥更佳的抗 AML 作用。而且,由于较低剂量的免疫脂质体即可发挥强大的杀伤作用,故我们推测 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体还具有克服耐药的作用,但此结论还需进一步的实验结果支持。

通过本研究我们发现 DHAQ-GM-CSF 免疫脂质体具有体外抗白血病作用,为进一步研究打下重要基础。

参 考 文 献

[1] Linda SP,Peter EW,Della F,et al. Interleukin-3,GM-CSF,and G-CSF receptor expression on cell lines and primary leukemia cells:receptor heterogeneity and relationship to growth factor responsiveness[J]. Blood,1989;74(1):56-65.

[2] Frankel AE,Powell BL,Hall PD,et al. Phase Ⅰ trail of a novel diphtheria toxin/granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion protein (DT388GMCSF) for refractory or relapsed acete myeloid leukemia[J]. Clin Cancer Res,2002;8(5):1004-1013.

[3] Burbage C,Tagge EP,Harris B,et al. Fusion toxin targeted to the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor is selectively toxic to acute myeloid leukemia cell[J]. Leuk-Res,1997;21(7):681-690.

[4] Szoke F. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1978;75(9):4194.

[5] 郑筱萸.《中华人民共和国药典》附录Ⅳ B 比色法[Z]. 北京:国家药典委员会,2000.

[6] 汪 冰, 杨翰仪. 单克隆抗体偶联质质体的制备及其及其与胃癌细胞特意结合研究[J]. 沈阳药学院学报,1993;11(1):17.

[7] 汪 冰, 杨翰仪. 用密度梯度离心法分离脂质体-Ig 复合物和游离 Ig[J]. 中华物理医学杂志,1993;1(15):39.

[8] 牛荣丽,薛 弘,李志良.阿苯达唑免疫脂质体的制备[J]. 新疆医科大学学报,2001;24(1):60-62.

[9] Bendas G. Immunoliposomes:a promising approach to targeting cancer therapy[J]. BioDrugs,2001;15(4):215-224.

[10] Jurcic JG,Caron PC,Miller WH J,et al. Seqpuential targeted therapy for relapsed acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anti-CD33 monoclinal antibody M195[J]. Leukemia, 1999;9:244.

[11] 陈 姝,娄世锋,张 颖.GM-CSF 耦联米托蒽醌脂质体的制备及体外抑瘤作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2007;29(10):925-928.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 664 页)

angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells[J]. Life Sci,1999;64(4):249-258.

[7] Pawlak K,Pawlak D,Myliwiec M. Possible association between circulating vascular endothelial growth factor and oxidative stress markers in hemodialysis patients[J]. Med Sci Monit,2006;12(4):181-185.

[8] Pawlak K,Pawlak D,Mysliwiec M,et al. Impaired renal function and duration of dialysis therapy are associated with oxidative stress and proatherogenic cytokine levels in patients with end-stage renal disease[J]. Clin Biochem,2007;40(1-2):81-85.

[9] 冯利平,张 玲,钟 玲,等,VitE 对维持性血液透析患者氧化应激状态的影响[J]. 重庆医科大学学报,2007;32(2):160-162.

[10] Ushio-Fukai M. VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS[J]. Antioxid Redox Signal,2007;9(6):731-739.

[11] Ikeda S,Ushio-Fukai M,Zuo L,et al. Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis [J]. Circ Res,2005;96(4):467-475.

(责任编辑:关蕴良)