DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.035
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
196 2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)02-0196-03

血管内皮生长因子对缺氧诱导内皮细胞凋亡的影响

晋 军,祝善俊,黄 岚,向常青,李 洪 (第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨缺氧对培养人脐静脉内皮细胞凋亡的影响及血管内皮生长因子的干预性影响。方法 ①人脐静脉内皮细胞的培养及鉴定。②建立人脐静脉内皮细胞缺氧模型,TUNEL法观测不同缺氧时间(0、12、24、48 h)对内皮细胞凋亡的影响及血管内皮生长因子的干预作用。结果 随缺氧时间延长,HUVECs凋亡率显著升高,血管内皮生长因子抑制缺氧导致的内皮细胞凋亡。结论 内皮细胞的过度凋亡是引起内皮功能障碍的一个重要因素,血管内皮生长因子通过抑制内皮细胞凋亡,而具有内皮细胞保护作用。

关键词:内皮细胞;缺氧;凋亡;血管内皮生长因子
中图法分类号:R329.25;R349.21 文献标识码:A

Effect of vascular endothelial growth factor on apoptosis of endothelial cells induced by hypoxia

JIN Jun, ZHU Shan-jun, HUANG Lan, XIANG Chang-qing, LI Hong (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the effect of hypoxia on the apoptosis of cultured human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) and the role of vascular endothelial growth factor(VEGF) in inhibition of apoptosis. Methods ①Culture and identification of HUVECs. ②Establishment of hypoxic model(0, 12, 24, 48 h) in HUVECs. ③Incubation of HUVECs with VEGF(0 ng, 100 ng) under hypoxic condition for 24 h. ④Detection of apoptosis of HUVECs with TUNEL method. Results The percentages of apoptosis were different under different hypoxic conditions. The longer hypoxic time was, the higher apoptosis percentage was. VEGF reduced the apoptosis of HUVECs induced by hepoxia. Conclusion Over-apoptosis EVCs in one of the important factors for the impairment of endothelial function. HEGF inhibits the apoptosis of HVCs and having a pretive function on them.

Key words: endothelial cell; hypoxia; apoptosis; vascular endothelial growth factor

缺氧能够加速血管内皮细胞的凋亡,引起血管内皮功能异常,并参与一系列的临床病理过程[1]。对缺氧内皮细胞的保护将阻止内皮功能的进一步恶化,从而达到改善症状,治疗疾病的目的。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)能特异地作用于血管内皮细胞,强烈刺激其生长、增殖,并对受损内皮细胞具有保护作用[2]。但VEGF对内皮细胞凋亡的影响目前还不十分清楚,为此本实验通过离体培养人脐静脉内皮细胞缺氧模型,初步探讨缺氧对内皮细胞凋亡的影响,以及VEGF在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endotheial cells, HUVECs)培养

参照Jaffe等[3]方法,收集无菌胎儿脐带20~30 cm,剪去破损部分,D-Hanks液冲洗至静脉内无血。向静脉腔内注入0.25% 胰蛋白酶5~10 ml,37 ℃下15 min,收集消化液,同时加入小牛血清终止胰蛋白酶的作用,离心5 min,弃去上清,加入RPMI-1640培养液,制成细胞悬液。0.5%台盼蓝染色少许细胞悬液,计数活细胞数达95%以上。调整细胞密度为5×10⁶/L,送入培养箱(5%CO_2-95%空气,37 ℃)培养。

1.2 培养HUVECs的鉴定

相差显微镜下观察。Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色(S-P法)。DAB显色。

1.3 不同缺氧时间对HUVECs凋亡的影响

1.3.1 分组 将培养的HUVECs随机分为4组,A:正常HUVECs对照组;B:缺氧培养HUVECs 12 h组;C:缺氧培养HUVECs 24 h组;D:缺氧培养HUVECs 48 h组。

1.3.2 细胞缺氧模型 将缺氧组细胞放入缺氧培养罐[4]中,持续通入5%CO_2-95% N_2混合气体(5 L/min),多次抽取罐内气体作气体分析,至PO_2为(6.5±0.4) mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),37 ℃培养。

1.3.3 凋亡细胞检测 于上述各时相点,自培养箱中取出各组HUVECs,经PBS冲洗后,以4%多聚甲醛固定20 min,按Gerg等[5]末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP生物素断端标记(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)法测定细胞凋亡,图像分析软件系统图像处理,定量凋亡细胞百分率。

1.4 VEGF对HUVECs凋亡的影响

1.4.1 分组 将培养的HUVECs分为4组,A:正常HUVECs对照组;B:单纯缺氧培养HUVBCs 24 h组;C:正常HUVECs加

作者简介:晋 军(1969—),男,山西省太原市人,博士研究生,主治医师,主要从事冠心病、高血压发病机制方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68755000-74601

收稿日期:2000-03-20;修回日期:2000-07-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

VEGF 100 ng/ml 培养 24 h 组; D: HUVECs 加 VEGF 100 ng/ml 缺氧培养 24 h 组。

1.4.2　凋亡细胞检测　　缺氧模型及凋亡细胞检测方法同前。图像分析软件系统图像处理, 计数细胞总数, 凋亡细胞数, 并计算凋亡细胞百分率。

1.5　统计学处理

所有计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间资料进行 t 检验或方差分析。

2　结果

2.1　培养人脐静脉内皮细胞的鉴定

相差显微镜下观察, 培养细胞呈单层鹅卵石样排列。免疫细胞化学法(S-P 法)染色 Ⅷ因子相关抗原呈阳性(棕黄色), 见图 1。



图 1　Ⅷ因子相关抗原鉴定内皮细胞　(S-P× 200)

Fig 1　Identification of endothelial cells by chemi Ⅷ related antigen　(S-P× 200)

2.2　不同缺氧时间对 HUVECs 凋亡的影响

TUNEL 染色阳性细胞(棕黄色)为凋亡细胞, 见图 2。在缺氧条件下, 随着缺氧时间的延长, HUVECs 凋亡细胞百分率逐渐增加($P<0.01$), 证实缺氧能够加速 HUVECs 凋亡, 且 HUVECs 凋亡率与缺氧时间相关, 0、12、24、48 h 凋亡率分别为 2.81%±0.81%, 19.53%±1.36%, 27.60%±2.51%, 32.62%±1.81%。



图 2　TUNEL 法检测凋亡内皮细胞　(×200)

Fig 2　Detection of endothelial cell apoptosis by TUNEL　(× 200)

2.3　VEGF 对 HUVECs 凋亡的影响

VEGF+Hypoxia 组凋亡细胞数及凋亡细胞百分率均明显低于单纯缺氧组($P<0.01$), 说明 VEGF 能够抑制缺氧诱导的内皮细胞凋亡。Nomal+VEGF 组细胞总数明显高于正常对照组($P<0.01$)。证实 VEGF 作用于 HUVECs, 能促进其生长、繁殖, 见表 1。

表 1　VEGF 对 HUVECs 凋亡的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of VEGF on apoptosis of HUVECs($\bar{x}\pm s$)

Group	Cell count	Apoptosis cell	Rate of apoptosis(%)
Nomal	115.375±13.8	3.375±5.6	2.8±0.8
Hypoxia	86.5±9.4	23.5±3.1	24.4±1.1
Nomal+VEGF	150.125±10.6#	3.625±4.9	2.4±1.0
Hypoxia+VEGF	104.5±11.7	17.25±2.0*	16.36±0.9*

*: $P<0.01$ *vs* hypoxia; #: $P<0.01$ *vs* nomal

3　讨论

组织、细胞缺氧是临床多种疾病发生发展所共有的病理生理基础。April 等[6]研究证实: 在缺氧引起内皮细胞死亡中, 35%~50%是源于细胞凋亡, 说明内皮细胞凋亡是引起内皮功能障碍的一个重要因素。缺氧通过加速内皮细胞凋亡, 破坏内皮结构, 使内皮功能出现异常, 导致血管痉挛、血小板聚集、血栓形成甚至血管阻塞, 尤其在临床心脑血管疾病的发生发展中, 具有重要作用。但如何在病理状态下抑制血管内皮细胞的凋亡, 维持细胞增殖与死亡之间的平衡, 目前还知之不多。

本实验应用离体培养人脐静脉内皮细胞缺氧模型, 观察缺氧对 HUVECs 凋亡的影响, 以及 VEGF 的调控作用, 结果发现: VEGF 对缺氧诱导的 HUVECs 凋亡具有明显的抑制作用; VEGF 对 HUVECs 生长繁殖具有促进作用。在有 VEGF 参与下, HUVECs 在缺氧状态下的凋亡细胞数明显少于单纯缺氧时的细胞凋亡数; 而 HUVECs 在 VEGF 刺激下, 其细胞总数远高于正常对照组。因而本实验结果证实, VEGF 作为一种促内皮细胞增殖的有丝分裂原, 一方面促进内皮细胞增殖; 另一方面抑制内皮细胞在缺氧状态下的凋亡, 通过调节细胞增殖与更新间的平衡, 维持组织器官正常生理功能及细胞数量的稳定, 因而使其具有对受损内皮细胞的保护作用。但值得注意的是: 尽管缺氧刺激可以导致内源性 VEGF 在内皮细胞中的表达增强[7], 但细胞自身所分泌产生的 VEGF 却不足以对抗缺氧所引起的内皮细胞过度凋亡, 因而必须在有外源性的 VEGF 参与下, 其对内皮细胞的抗凋亡保护作用才是显而易见的。

同时本实验结果还证实: 不同的缺氧时间对 HUVECs 凋亡具有不同影响, 且随着缺氧时间的延长(0、12、24、48 h), 其凋亡率逐渐升高, 各组间具有显著的统计学差异, 说明缺氧作为一种致病因素, 对内皮细

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

胞凋亡的促发作用是随缺氧时间的延长而加重的。

尽管已经证实VEGF对缺氧诱导的内皮细胞凋亡具有保护性抑制作用，但其调控机制是如何发挥作用的？VEGF在活体中当如何应用？目前还不十分清楚。对这些问题的深入研究，有望为探索心脑血管疾病的防治开辟一条新的途径。

参考文献：

[1] Maski K, Yuji T, Kenji I, *et al*. Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 253(2): 797—804.

[2] Gera N, Tzafra C, Stela G, *et al*. Vasculalar endothelial growth factor and its receptors[J]. J FASEB, 1999, 13(1): 9—16.

[3] Jaffe E A, Naohman R L, Becked C G, *et al*. Culture of human endothelial cells derived from umbilical cord veins. identification by morphologic and immunolgic criteria[J]. J Clin Invest, 1973, 152(4): 2 745—2 756.

[4] 谢 崧，钱桂生，杨晓静. 一种用于研究的经济实用缺氧小容器[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(2): 92—92.

[5] Geng Y J, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme[J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 251—261.

[6] April S O, Aly K, Carol J C, *et al*. Mechanisms of hypoxia—induced endothelial cell death[J]. J Biol Chem, 1999, 274(7): 8 039—8 051.

[7] Liu Y X, Cox S R, Morita T, *et al*. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells identification of a 5' enhancer[J]. Circ Res, 1995, 77(1): 638—650.

（编辑 薛国文）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2001)02-0198-01

经尿道前列腺电汽化手术术后出血原因及防治与护理

The cause prevention and nursing care of bleeding after transurethral electrovaporization of the prostate

谢小燕，向渝梅 （第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心，重庆 400038）

我科自1997年8月起，采用经尿道前列腺电汽化术。该手术具有损伤小、出血少、疗效显著等优点[1]，但是术后出血仍是医疗、护理的重要问题[2]。本研究分析我科前列腺汽化术后出血原因及其防治与护理。

1 临床资料

本组431例，年龄58～91岁，平均74岁，病程6月～15年。主要症状为进行性排尿困难，夜尿增多。彩超提示，401例前列腺增大，指肛检查：前列腺增大Ⅰ度73例，Ⅱ度196例，Ⅲ度以上137例，另25例前列腺体积不大，但排尿困难明显。所有患者行前列腺电汽化术。431例患者，术后近期出血（术后0～72 h）37例，占9%，1例反复出血致心、肺功能衰竭死亡；16例出现继发性出血（术后4 d至3周），占4%，175例患者术后2～3周内有淡血尿，占41%。

2 出血原因分析及防治与护理

凝血功能差：21例（5%）血小板计数少于50×10^9/L，出凝血时间延长。

高血压：109例（25%）高血压，此外，因手术、紧张、睡眠不足、不良刺激等因素导致血压升高和波动。

引流不畅：17例（4%）入睡或翻身致引流管受压、折叠。或血块、残留组织块堵塞。

膀胱痉挛：21例（5%）膀胱无抑制收缩，或因导尿管气囊刺激引起膀胱阵发性痉挛，从而加重出血。

尿管质量：4例（1%）气囊破损，尿管自行滑脱、中断冲洗。

腹压增加：15例（3%）因便秘、咳嗽、过度活动、搬抬重物等是引起早期及继发性出血的重要原因。

焦痂脱落：术后2～3周是前列腺汽化创面的凝固层脱落的高峰期，而尿路上皮还未充分愈合，易引起继发出血。

术前做好充分的准备：术前了解患者凝血功能情况。血红蛋白、血小板计数降低者，根据病情需要及时纠正贫血，必要时输血小板，将血小板计数提高到50×10^9/L以上。

定时检测血压、脉搏、呼吸，将血压控制在正常水平。

术后定时监测血压、脉搏、呼吸的变化。

保持引流管通畅：妥善固定引流管，防止受压、折叠和堵塞。翻身时动作要慢，同时将引流袋拎起，注意冲洗液和引流液的流速是否同步。

引流液色红且混浊或有鲜血流出，应加快冲洗液流速，加大气囊容量，牵引导管、使气囊压迫膀胱颈。

尿管阻塞，立即用20～50 ml注射器冲洗。如反复冲洗效果不佳，也可用金属尿管冲洗。若有活动性出血或血块潴留，可经尿道冲洗后电凝止血。

抗休克：在行局部处理过程中，同时建立静脉通道，补充血容量，观察生命征变化，及时向医生提供准确的诊疗依据。

高血压：用药物控制血压至正常水平，同时严密监测血压

（下转200页）

作者简介：谢小燕，（1960—），女，江苏省淮阴市人，主管护师。电话：（023）68754035

收稿日期：2000-08-25；修回日期：2000-12-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net