

·论著·

缺氧对血管内皮生长因子诱导主动脉内皮细胞通透性增加的调控研究

张黎¹, 邱彦², 芮耀诚², 李铁军², 刘厚佳³ (1. 第二军医大学附属东方肝胆外科医院; 2. 第二军医大学药学院; 3. 第二军医大学附属长海医院, 上海 200433)

摘要 目的: 为了解缺氧对血管内皮生长因子(VEGF)增强血管内皮细胞通透性作用的影响, 考察正常和缺氧状态下 VEGF 对体外培养牛主动脉内皮细胞(BAEC)脂蛋白通透性的影响及银杏叶提取物(Egb761)的抑制作用。**方法:** 将 VEGF 及 Egb761 加入 BAEC 共孵育, 用 SN-695 型液闪计数器测 [¹²⁵I] 氧化低密度脂蛋白 ([¹²⁵I] O_xLDL) 通过 BAEC 的百分率。**结果:** VEGF 可显著增强 BAEC 对 [¹²⁵I] O_xLDL 的通透性 ($P < 0.01$), 这种增加具有浓度依赖性。缺氧 3 h 可促进 VEGF 所致的通透性增加。Egb761 能显著抑制 VEGF 诱导的通透性升高 ($P < 0.01$)。**结论:** VEGF 在动脉粥样硬化的形成和发展过程中起一定作用。Egb761 对 VEGF 诱导血管内皮通透性升高有显著的抑制作用。

关键词 缺氧; 血管内皮生长因子; 通透性; 银杏叶提取物

中图分类号: R331.3⁺2, R962

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2004)03-0135-03

Hypoxia regulate vascular endothelial growth factor-induced hyperpermeability in bovine artery endothelial cell

ZHANG Li¹, QIU Yan², RUI Yao-cheng², LI Tie-jun², LIU Hou-jia³ (1. Eastern Hepatobiliary Hospital, 2. School of Pharmacy, 3. Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Objective: In order to understand the regulation of hypoxia on the vascular endothelial growth factor (VEGF) permeability action, particularly in relation to the risk of development of atherosclerosis, the effect of recombinant human VEGF on the oxidation low density lipoprotein (OxLDL) permeability of bovine aortic endothelial cells (BAEC) was observed under the hypoxia condition in vitro. **Methods:** Under normal or hypoxia condition, the confluence BAEC monolayers were cultured with normal medium and with medium containing VEGF at various concentrations and for various time periods. The Iodine labeled low density lipoprotein flux across the monolayers was then performed, and the radioactivity was measured by SN-695 automatic liquid scintillation counter. **Results:** Addition of VEGF to the BAEC monolayers significantly increased the permeability of the monolayer to [¹²⁵I] OxLDL ($P < 0.01$). The permeability-increasing activity of VEGF on the BAEC monolayers was concentration dependent. Hypoxia injury on endothelial cells increased VEGF-induced hyperpermeability. **Conclusion:** VEGF plays a role in the formation and development of atherosclerosis.

KEY WORDS hypoxia, vascular endothelial, growth substances, permeability

缺氧是高原环境的主要特征, 几乎能影响机体所有的生理功能。其中, 缺氧对心功能的影响国内外有不少报道, 但其损伤机制尚不十分清楚^[1]。

血管内皮生长因子/血管通透因子(vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, VEGF/VPF)是1989年初发现的一种多功能, 高度特异的血管内皮促分裂因子和血管生成因子^[2]。它的作用没有种属特异性, 在所有已知的生长因子中, 只有 VEGF 可诱导血管通透性增加, 蛋白外渗。我们以前的研究已证实 VEGF 可诱导体外培养的牛主动脉内皮细胞 LDL 通透性升高^[3]。为此, 本实验对

缺氧牛主动脉内皮细胞脂蛋白通透性的影响进行了研究, 以探讨缺氧引发心功能损伤的发病机制。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 人重组 VEGF 为美国 CalBiochen 公司产品(批号 Lot B25830), DMEM 为美国 GIBCO 公司产品, LDL 为美国 Sigma 公司产品, [¹²⁵I] O_xLDL 由中科院原子核所标记(3.7 MBq/g)。可移动式双层细胞培养板 3095 购于美国 Falcon 公司(0.4μm), SN-695 型智能 r 计数器为上海中科院原子核所仪器一厂产品。

1.2 细胞分离培养 消化法^[4] 培养牛主动脉内皮细胞(bovine artery endothelial cells, BAEC)。取 3~5 代培养的内皮细胞用胰酶消化后, 以 1×10^5 个/

mL 密度铺板, 细胞培养在移动式双层培养板(直径 6.5mm)中。该系统由两部分组成, 可移动内层及底孔, 两部分之间由微孔多聚碳酸纤维酯膜(0.4 μ m)分离, 只允许两部分介质之间进行物质交换, 而细胞不能通过。在每个移动式培养板内层内加 100 μ L 细胞液, 细胞密度为 1 \times 10⁵ 个/mL, 底孔加 600 μ L 含 20% 小牛血清的 DMEM。细胞在 37 $^{\circ}$ C CO₂ 孵箱中孵育 3~ 6d, 镜下观察成致密的单层。

1.3 VEGF 影响细胞通透性的量效关系测定 参照我室已建立的方法测定单层细胞通透率^[3]。通透率测定时间的选定^[5]: 取长成致密单层的移动式培养板内层, 加入 100 μ g/L 的 VEGF 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱中孵育 24 h, 然后加入 3.7 kBq/L [¹²⁵I] O_xLDL 100 μ L, 分别测加入 [¹²⁵I] O_xLDL 后 15、30、45、60、90、120min 通透率, 作空白对照, 并检测无细胞移动式培养板内层膜自身通透性。

量效关系测定: 取长成致密单层的移动式培养板内层, 每孔分别加入 10, 25, 50, 100, 200, 400 μ g/L 的 VEGF 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱孵育 24 h, 然后加入 3.7kBq/L [¹²⁵I] O_xLDL 100 μ L, 测加入 [¹²⁵I] O_xLDL 后 1h 的通透率, 同时作空白对照。

1.4 缺氧对 VEGF 影响细胞通透性的调控作用 正常 DMEM 培养基用 95% N₂ 和 5% CO₂ 混合气体平衡 30min 后, 获得缺氧培养基。培养板(或培养瓶)加缺氧培养基后, 置于缺氧仓内(持续通入 95% N₂ 和 5% CO₂ 混合气体维持缺氧环境), 37 $^{\circ}$ C, 孵育 3 h(缺氧时间), 立即更换正常的 DMEM 培养基, 同时加入 100 μ g/L 的 VEGF 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 孵箱中孵育 24h, 加入 3.7kBq/L [¹²⁵I] O_xLDL 100 μ L, 测其 1h 通透率。同时作常氧和空白对照。

1.5 统计学处理 以每次实验前测定 3.7 kBq/g [¹²⁵I] O_xLDL 0.1mg 标准液的放射活性为 100%, 计算放射计数的 $\bar{x} \pm s$ 。显著性检验用 ANOVA 或 student t 检验。

2 结果

2.1 VEGF 增加细胞通透性的量效关系 将长成致密单层的 BAEC 与 100 μ g/L 的 VEGF 共孵育 24 h, 检测加入 [¹²⁵I] O_xLDL 后不同时间段 BAEC 对 [¹²⁵I] O_xLDL 的通透率。从图 1 可见, BAEC 对 [¹²⁵I] O_xLDL 的通透率随时间的延长而增加。30min 开始, VEGF 组的通透率较对照组显著增加。说明 VEGF 能够较快地作用于 BAEC, 增加 BAEC 的通透性。并将通透率的观察时间定在加入 [¹²⁵I] O_xLDL 后 1 h。

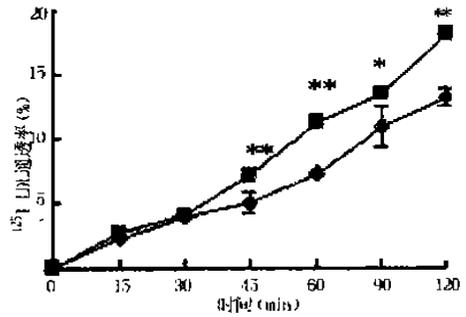


图1 VEGF 增加牛主动脉内皮细胞(BAEC)通透性的量效关系
■-VEGF组; ◆-空白对照组
与空白对照组相比: * P < 0.05, ** P < 0.01

检测不同浓度 VEGF 对 BAEC [¹²⁵I] O_xLDL 通透率的影响, 发现 VEGF 浓度依赖性地增加 BAEC 对 [¹²⁵I] O_xLDL 的通透性。当浓度大于 100 μ g/L 时, 通透率不再随浓度的增加而显著增大(表 1)。

表1 不同浓度 VEGF 对 BAEC [¹²⁵I] O_xLDL 通透率的影响
($\bar{x} \pm s, n = 4$)

VEGF (μ g/L)	[¹²⁵ I] O _x LDL 1h 通透率 (%)
0	11.26 \pm 0.44
10	10.85 \pm 0.35
25	12.13 \pm 0.68
50	17.81 \pm 0.87*
100	25.04 \pm 0.59**
200	23.23 \pm 0.97**
400	24.17 \pm 0.56**

与空白对照组相比: * P < 0.05, ** P < 0.01

2.2 缺氧对 VEGF 通透性作用的调控 由图 2 可知缺氧能增强 VEGF 所致的蛋白通透性增加, 其细胞通透率由正常的(10.65 \pm 1.03) % 增加约一倍, 达到(20.02 \pm 0.80) %。

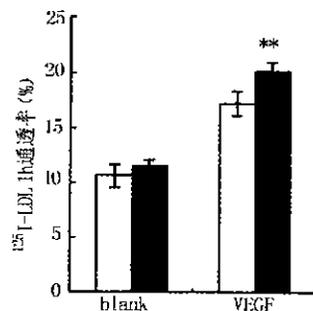


图2 缺氧对 VEGF 诱导 BAEC 通透性的影响
□-正常状态(有氧环境); ■-缺氧状态(无氧环境);
与空白对照组相比: ** P < 0.01.

3 讨论

许多研究表明, 快速进入高原地区时, 机体不可避免会受到不同程度的损伤, 心脏功能损伤也不例外^[6]。而有关缺氧心脏功能损伤机制的研究较少。VEGF 在正常成年组织中表达量减少, 但在某

些病理情况下,如缺血、缺氧时,VEGF表达明显增加^[7]。研究发现当大鼠心、脑组织缺血缺氧时,VEGF mRNA表达增加,提示VEGF可能参与了心脑血管组织缺血缺氧后引起的自身应激反应^[8]。但是其作用机制尚未阐明。

本实验模拟高原缺氧环境,探讨高原缺氧对牛主动脉内皮细胞脂蛋白通透性的影响,为缺氧引发心功能损伤的机制提供新的思路。本文发现VEGF能显著增加BAEC单层对^[125I]OxLDL的通透率,这种增加呈剂量依赖性。该结果进一步证明VEGF促进血管蛋白通透性升高的可能性。同时,由结果可知1h时,BAEC单层的通透率从(7.29±0.26)%升高到(11.25±0.15)%,增幅达56%,表明VEGF对主动脉内皮细胞的影响较强;VEGF在BAEC起效时间较短^[3],说明VEGF对大、中动脉内皮细胞的影响较大。缺氧能显著增强VEGF这种蛋白通透作用。

综上所述,在高原缺氧条件下,VEGF引起内皮细胞对脂蛋白通透性显著增加,可能是引起心脑血管功能损伤的重要原因之一。但值得提出的是,缺氧引起的机体一系列改变是一个十分复杂的系统,不但受各种外界因素的调控,同时组织细胞内各信号传导系统间也存在相互协调作用,这就要求我们在分

析缺氧损伤效应的时候,要充分注意到各信号系统间的相互作用和相互联系。

参考文献:

- [1] 龙超良,周智,尹照云,等.急、慢性缺血对大鼠心功能的影响[J].航天医学与医学工程,1999,12(4):266.
- [2] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. Science, 1989, 246(4935): 1306.
- [3] Qiu Y, Rui YC, Zhang L, et al. VEGF induced hyperpermeability in bovine aortic endothelial cell and inhibitory effect of salvianolic acid B [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(2): 117.
- [4] 司徒正强,吴军正主编.细胞培养[M],世界图书出版公司1996. 69.
- [5] Wang W, Merrill MJ, Borchardt RT. Vascular endothelial growth factor affects permeability of brain microvessel endothelial cells in vitro [J]. Am J Physiol, 1996, 271(6 Pt 1): C1973.
- [6] 刘红刚,王扬宗.高原急性缺氧对大鼠心肌结构的影响[J].首都医科大学学报,2000,21(1):37.
- [7] Marti HH, Risau W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(26): 15809.
- [8] 初桂兰,毕淑英,常丽.缺氧缺血性脑损伤后血管内皮细胞生长因子的表达及检测的意义[J].中华检验医学杂志,2003,26(9):556.

收稿日期:2004-03-22

·药物不良反应·

利福喷丁致剥脱性皮炎1例

曹永红(广西壮族自治区南溪山医院 广西 桂林 541002)

中图分类号:R978.3

文献标识码:D

文章编号:1006-0111(2004)03-0137-01

1 临床资料

患者女,25岁,因患结核性脑膜炎并脊髓蛛网膜炎入院。给予利福喷丁胶囊(无锡山禾集团第一制药公司生产,批号030308)0.45g, qd, po,合并应用异烟肼片(汕头金三石制药厂生产,批号030503)0.3g, qd, po。3d后,患者面部稍肿,全身皮肤散在约粟粒大小红斑,部分融合成片,皮肤干燥,脱屑,瘙痒。停用利福喷丁和异烟肼,改用吡嗪酰胺和乙胺丁醇,同时口服氯雷他定5mg, qd,泼尼松10mg, tid, 硫酸铝1.0g, tid, 外擦氟肤舒松霜抗过敏治疗。第2

天症状减轻。

2 讨论

利福喷丁为半合成利福霉素类抗生素,抗菌谱与利福平相似,不良反应较利福平轻微,通常与其它抗结核药联用。查阅病历后得知,患者3个月前应用利福平、乙胺丁醇、异烟肼治疗结核时并未出现过敏反应,因肝功出现异常而停用利福平,改用利福喷丁,当时也出现过相似症状,但未引起重视。可以肯定,本次出现的全身剥脱性皮炎是利福喷丁所致。

收稿日期:2003-02-18