

## · 实验研究 ·

## 高碳酸酸化预处理对脐静脉血管内皮细胞凋亡的影响\*

罗和国<sup>1</sup>, 常业恬<sup>2△</sup>, 邹望远<sup>2</sup>, 邹定全<sup>2</sup>, 王德明<sup>2</sup>

(1. 江西省人民医院麻醉科, 南昌 330006; 2. 中南大学湘雅二医院麻醉科, 长沙 410011)

**摘要:**目的 研究高碳酸酸化预处理对脐静脉血管内皮细胞(EC)凋亡的影响。方法 脐静脉 EC 培养传代后按处理方式不同分为 6 组( $n=12$ ): 正常对照组(C 组), 缺氧复氧组(H/R 组), 缺氧预处理组(HPC 组), 30%CO<sub>2</sub> 预处理内皮细胞 10、30、60 min 组(10、30、60 min HCA 组)。H/R 组将细胞置于 95%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub> 的缺氧培养箱中缺氧培养 4 h, 再在 21%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、74%N<sub>2</sub> 的正常培养箱中复氧孵育 24 h。HPC 组将细胞置于缺氧培养箱中先行 2 个循环的缺氧 10 min 及正常培养箱中复氧 10 min, 其余处理方法同 H/R 组。10、30、60 min HCA 组将细胞置于 21%O<sub>2</sub>、30%CO<sub>2</sub>、49%N<sub>2</sub> 培养箱中先行高碳酸酸化预处理 10、30、60 min, 其余处理方法同 H/R 组。C 组将细胞置于正常培养箱至实验结束。用流式细胞仪测细胞凋亡指数。结果 HPC 组, 10、30、60 min HCA 组凋亡指数小于 H/R 组, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。30 min HCA 组的凋亡指数小于 10 min HCA 组, 差异有统计学意义( $P<0.01$ )。30 min HCA 组的凋亡指数小于 60 min HCA 组, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 高碳酸酸化预处理可抑制离体 EC 的凋亡, 30 min 的抑制作用最强。

**关键词:**高碳酸; 预处理; 血管内皮细胞; 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.013

中图分类号: R365.54

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)20-2729-03

## Effect of hypercapnia preconditioning on the apoptosis of the umbilical endothelial cells\*

LUO He-guo<sup>1</sup>, CHANG Ye-tian<sup>2△</sup>, ZOU Wang-yuan<sup>2</sup>, et al.

(1. Department of Anaesthesiology, Jiangxi Provincial Hospital, Nanchang, 330006, China;

2. Department of Anaesthesiology, Central South University Xiangya Affiliated No. 2 Hospital, Changsha 410011, China)

**Abstract:** Objective To determine the the effect of hypercapnia preconditioning on the apoptosis of the umbilical endothelial cells. **Methods** Cultured Human umbilical vein cells were randomly divided into six groups ( $n=12$ ): control group (group C), hypoxic and reoxygenation group (group H/R), hypoxia preconditioning group (group HPC), 30%CO<sub>2</sub> preconditioning for 10, 30, 60 minutes group (group 10, 30, 60 min HCA). Cells in group H/R received hypoxia in the 95%N<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub> anaerobic culturing box for 4 hours and reoxygenation in the 21%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 74%N<sub>2</sub> anaerobic culturing box for 24 hours. Cells in HPC groups received 10 minutes hypoxia/10 minutes reoxygenation preconditioning that repeated for two times followed by long time hypoxia/reoxygenation as in group H/R. Cells in HCA groups received 30% CO<sub>2</sub> in 21%O<sub>2</sub>, 30%CO<sub>2</sub>, 49%N<sub>2</sub> culturing box followed by the long time hypoxia/reoxygenation process as in group H/R. Cells in group C were cultured in the normal atmosphere until the test was over. Apoptosis index was obtained by the flow cytometry. **Results** The apoptosis index in the group HPC, 10, 30, 60 min HCA were less than group H/R s( $P<0.01$ ). The apoptosis index in the group 30 min HCA was less than group 10 min HCA( $P<0.01$ ). The apoptosis index in the group 30 min HCA was less than group 60 min HCA( $P<0.05$ ). **Conclusion** Hypercarbic acidosis preconditioning can prohibit the apoptosis of vascular endothelial cells and inhibition of 30 min Hypercarbic acidosis preconditioning is most effective.

**Key words:** hypercapnia; preconditioning; endothelial cells; apoptosis

研究表明缺血缺氧预处理对血管内皮细胞(endothelial cells, EC)具有保护作用, 减少血管内皮细胞的凋亡, 促进慢性缺血心肌内的血管生成。缺血或是缺氧预处理的临床应用受到限制。高碳酸酸化可激活 EC 的 KATP 通道, 保护 EC<sup>[1]</sup>。其对 EC 凋亡的影响尚未可知, 本研究拟通过观测高碳酸酸化预处理后缺氧复氧 EC 凋亡的变化, 来进一步证实高碳酸酸化预处理的血管保护作用。

## 1 材料与方

1.1 材料 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, RNase 购自

美国 Genview 公司, 人脐静脉 EC 来源于人脐静脉内皮细胞系: ECV-304, 30~50 代, 购自中南大学湘雅医学院细胞中心。

## 1.2 实验方法

1.2.1 细胞的培养 细胞复苏: 将 EC 冻存管从液氮罐中取出, 快速于 37℃ 水浴中使其完全融解后, 1 000 r/min 离心 5 min, 将冻存液于超净台中弃去, 将 DMEM 完全培养基逐滴加入冻存管, 将细胞重悬, 再将细胞悬液缓慢加入已加好培养基的培养瓶中, 放入 5%CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱中培养, 24 h 后换液。细胞传代: 当 EC 对数生长至细胞密度达 80% 左右传代。弃去

培养瓶内旧培养基,用 D-Hank's 液漂洗 3 次,加 0.25% 胰蛋白酶 1 mL 于瓶中,使细胞充分接触消化液,镜下见 EC 变圆、分散、部分脱离瓶底后,加 5 mL 完全培养基终止消化,用吸管吹打细胞悬液,将此瓶细胞悬液分成 2 份加入新瓶中,各瓶再加 4 mL 完全培养基,放入培养箱中继续培养。

**1.2.2 实验分组** 脐静脉 EC 培养传代后按处理方式不同分为 6 组( $n=12$ ):正常对照组(C 组),缺氧复氧组(H/R 组),缺氧预处理组(HPC 组),30%CO<sub>2</sub> 预处理 EC 10、30、60 min 组(10、30、60 min HCA 组)。H/R 组将细胞置于 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 的缺氧培养箱中缺氧培养 4 h,再在 21% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、74% N<sub>2</sub> 的正常培养箱中复氧孵育 24 h。HPC 组将细胞置于缺氧培养箱中先行 2 个循环的缺氧 10 h 及正常培养箱中复氧 10 h,其余处理方法同 H/R 组。10、30、60 min HCA 组将细胞置于 21% O<sub>2</sub>、30% CO<sub>2</sub>、49% N<sub>2</sub> 培养箱中先行高碳酸酸化预处理 10、30、60 min,其余处理方法同 H/R 组。C 组将细胞置于正常培养箱至实验结束。

### 1.2.3 检测指标

**1.2.3.1 细胞形态学观察** 光学检查:用倒置显微镜观察细胞,并照相。

**1.2.3.2 Hoechst 33342 染色** 倒去 EC 细胞培养瓶中的液体,PBS 洗 2 次;用 10% 甲醛浸泡 5 min,吸去甲醛,加入 PBS 浸泡 5 min,吸去甲醛,重复 3 次;加入 4 mL PBS,加入 4  $\mu$ L Hoechst 工作液;避光染色 25 min,吸去染液,用 PBS 浸泡 1~2 min,吸去 PBS,重复 3 次;加入适量 PBS 盖住细胞,于荧光显微镜下观察细胞。

**1.2.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡** 将 EC 以  $3 \times 10^4$  个/mL 密度接种于 25 mL 培养瓶中,10% 血清培养过夜,细胞贴壁后换 2% 血清进行不同培养环境的干预,干预结束后继续在正常培养箱中培养 24 h,用胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液,然后 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,将收集的细胞用 4  $^{\circ}$ C 预冷的 70% 冷乙醇固定,4  $^{\circ}$ C 保存,至少固定 18 h,调整细胞浓度为  $10^6$  个/mL,取 1 mL 细胞悬液,用 PBS 洗 3 次,细胞重悬于 1 mL PI 染液中,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 即可进行流式分析。用流式细胞仪检测凋亡细胞占所测细胞总数的百分比,即凋亡指数(AI)。PI 染液终浓度为 50  $\mu$ g/mL,RNase A 终浓度为 20  $\mu$ g/mL。每组样本数量为 12。

**1.3 统计学方法** 全部计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,所有资料输入 SPSS12.0 统计软件进行处理。各组资料分析采用单因素方差分析。检验均为双侧,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 培养 EC 的一般特征** 正常 EC 在倒置生物显微镜下为多角形或短梭形,接种培养 6 h 后 EC 开始贴壁生长,胞浆致密,呈网状,8 h 活细胞已全部贴壁,贴壁后的细胞开始分裂成簇,细胞生长旺盛,细胞簇面积增大,并向周围伸出放射状突起,相互连接成网(彩插 I 图 1、2)。

**2.2 凋亡细胞的形态学改变** 经 Hoechst 染色后可见凋亡细胞的核浓缩、皱裂(彩插 I 图 3、4)。

**2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡** HPC 组,10、30、60 min HCA 组凋亡指数小于 H/R 组, $P < 0.01$ 。30 min HCA 组的

凋亡指数小于 10 min HCA 组, $P < 0.01$ 。30 min HCA 组的凋亡指数小于 60 min HCA 组, $P < 0.05$ (表 1)。

表 1 各组细胞凋亡指数

| 组别( $n=12$ ) | AI(%)                               |
|--------------|-------------------------------------|
| H/R 组        | 12.80 $\pm$ 3.17 <sup>#</sup>       |
| HPC 组        | 7.23 $\pm$ 1.40 <sup>*#</sup>       |
| 10 min HCA 组 | 10.50 $\pm$ 1.99 <sup>*#</sup>      |
| 30 min HCA 组 | 7.10 $\pm$ 1.38 <sup>*#&amp;S</sup> |
| 60 min HCA 组 | 8.63 $\pm$ 1.26 <sup>*#</sup>       |
| C 组          | 0.66 $\pm$ 0.19                     |

与 H/R 组比较,<sup>\*</sup>: $P < 0.01$ ;与 C 组比较,<sup>#</sup>: $P < 0.01$ ;与 10 min HCA 组比较,<sup>S</sup>: $P < 0.01$ ;与 60 min HCA 组比较,<sup>&</sup>: $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

细胞凋亡是生物界重要的生命现象之一,指的是细胞的程序性死亡,表现为细胞核的皱裂、浓缩和水解<sup>[2-4]</sup>。在本研究中观察到,脐静脉 EC 在缺氧复氧的环境下培养后可导致细胞的凋亡,脐静脉 EC 经 Hoechst 染色后表现出细胞凋亡的典型特征:细胞核出现皱裂、浓缩和水解,从而引起血管内皮结构或功能受损。血管内皮结构或功能受损可导致血管通透性增加,加重心肌水肿,同时也会引起血管舒缩异常,张力增加,使血小板黏附和聚集,形成血栓,进而导致心肌灌注不足,加重缺血再灌注损伤<sup>[5-8]</sup>。

本研究亦观察到,经高碳酸酸化预处理的 EC,其凋亡指数小于缺氧复氧组的 EC,30 min HCA 组抑制凋亡的效果最大,这表明高碳酸酸化预处理能够通过抑制 EC 的凋亡来保护细胞。生物体内环境的稳定,不但依赖细胞增殖和分化,也依赖于细胞的凋亡<sup>[9-10]</sup>,凋亡的发生是细胞受促进性和抑制性双向基因共同调节的结果<sup>[11-13]</sup>。有研究表明 KATP 通道的抑制剂能够促进 EC 的凋亡,KATP 通道的开放则能够抑制 EC 的凋亡<sup>[14]</sup>。KATP 通道的开放剂的这一作用与其能够消除缺氧所致的核 c-Fos 和 c-Jun 的表达上调有关<sup>[15]</sup>。已知高碳酸酸化能够激动 KATP 通道,因而高碳酸酸化预处理抑制凋亡的机制可能是通过激动 KATP 通道,上调凋亡促进基因的表达及下降凋亡抑制基因的表达来实现的。

## 参考文献:

- [1] Wang X, Wu J, Li L. Hypercapnic acidosis activates KATP channels in vascular smooth muscles [J]. Circ Res, 2003, 92(11):1225.
- [2] 刘树雷,何威,王儒鹏,等.重组免疫毒素 hIL2-Luffin P1 对 Hut-78 细胞增殖及凋亡的影响[J].重庆医学,2008, 37(8):830.
- [3] 董淑慧,高玉彤,潘彦路.瘦素与结直肠腺癌细胞凋亡的关系[J].安徽医药,2009,13(6):628.
- [4] 孟瑞锋,盛光耀,王利.淋巴细胞凋亡异常在 AITP 患儿中的作用研究[J].医药论坛杂志,2006,27(14):37.
- [5] Hiemann NE, Wellenhofer E, Hetzer R, et al. Small vessel disease after heart transplantation: impact of immunologic and nonimmunologic risk factors[J]. Transpl Int, 2005, 18

(8):908.

[6] Koch A, Bingold TM, Oberlander J, et al. Capillary endothelia and cardiomyocytes differ in vulnerability to ischemia/reperfusion during clinical heart transplantation[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2001, 20(5):996.

[7] 商雄跃, 李敬远, 曾因明. 丙泊酚预处理减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤与其抑制线粒体通透性转换的关系[J]. 安徽医药, 2010, 14(1):33.

[8] 钱洪津, 唐绍辉, 秦伟毅, 等. JNK 抑制剂对缺血/再灌注大鼠心肌梗死面积及心功能的影响[J]. 广东医学, 2009, 30(8):1052.

[9] 高景蓬, 孙丽华, 谷伟, 等. 克仑特罗对 COPD 大鼠膈肌细胞凋亡影响的实验研究[J]. 山东医药, 2009, 49(5):4.

[10] 李德辉, 吴卫华, 刘志刚, 等. 尼膜同对大鼠早期脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的作用[J]. 海南医学, 2009, 20(10):6.

[11] 刘晓春, 蓝娇, 潘莉莉, 等. 芒果甙诱导鼻咽癌 CNE-2 细胞凋亡及其对细胞内钙含量的影响[J]. 广西医学, 2009,

31(5):616.

[12] 钟洁, 何援利, 刘木彪. 地塞米松诱导人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. 广东医学, 2009, 30(3):334.

[13] 李青国, 陈龙舟, 周士福. 新辅助化疗对乳腺癌细胞凋亡和增殖的影响[J]. 重庆医学, 2009, 38(1):58.

[14] Hambrock A, Oliveira FC, Hiller S, et al. Nicorandil inhibits serum starvation-induced apoptosis in vascular endothelial cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2005, 46(6):721.

[15] Jiang KW, Yu ZS, Shui QX, et al. Activation of ATP-sensitive potassium channels prevents the cleavage of cytosolic mucalpain and abrogates the elevation of nuclear c-Fos and c-Jun expressions after hypoxic-ischemia in neonatal rat brain[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 133(1):87.

(收稿日期:2010-04-15 修回日期:2010-05-24)

(上接第 2728 页)

3 例合并少量气胸,螺旋 CT 检查与常规 X 线摄影检出结果为 52、35 例,两者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**3.3.5 其他改变及并发症** 矽肺患者常出现多种不同的并发症,对患者的诊断、治疗及病程发展均有重要影响,因此,及时正确诊断矽肺并发症具有重要意义。螺旋 CT 对矽肺并发症的检出明显优于 X 线胸片。CT 可发现 X 线胸片上未能显示或不易显示的结核病灶,而且对显示结核的钙化、空洞及洞内结构等方面优于 X 线胸片,本组螺旋 CT 检查与常规 X 线摄影检出结果分别为 19、15 例,两者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。螺旋 CT 显示胸膜改变及肺门、纵隔多组淋巴结改变等方面优于 X 线胸片<sup>[15]</sup>,本组螺旋 CT 检查与常规 X 线摄影检出肺门及纵隔淋巴结肿大分别为 45、25 例,检出胸膜改变分别为 49、39 例,两者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

综上所述,螺旋 CT 在矽肺诊断中所提供的影像资料远较 X 线胸片丰富、准确,在判断矽肺肺部病变程度、范围及并发症的检出上具有明显优势,能使矽肺的综合诊断更趋真实、准确。

**参考文献:**

[1] 王莹, 邓国祥. 实验动物矽肺影像研究[J]. 山西医科大学学报, 2008, 39(8):714.

[2] 胡克, 陈喜兰, 杨炯. 弥漫性肺疾病临床诊断学[M]. 北京:科学技术文献出版社, 2003:265.

[3] 中华人民共和国卫生部. GBZ 70-2002 尘肺病诊断标准[S]. 北京:法律出版社, 2002.

[4] 余晨, 齐放, 李霖, 等. 尘肺诊断中读片差异的分析[J]. 中

华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(5):336.

[5] 彭宁, 苗立云, 高奇. 经支气管镜肺活检在弥漫性肺病中的应用[J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32(2):37.

[6] 王天宇, 郝志斌. 螺旋 CT 在尘肺诊断中的应用[J]. 中国现代药物应用, 2009, 23(3):55.

[7] ATS STATEMENT. Adverse effect of crystalline silica exposure[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155(6):761.

[8] 李宝平, 张志浩, 邓茂松, 等. CT 和肺功能检查检出煤工尘肺肺气肿的比较[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2007, 25(9):553.

[9] 李仁战, 刘锦鹏, 洪杰, 等. 矽肺患者 450 例胸部 X 线片及 CT 分析[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(7):1122.

[10] 詹浩辉, 高剑波, 李卫新, 等. 尘肺与粟粒性肺转移瘤的 CT 鉴别诊断[J]. 医学影像学杂志, 2010, 20(3):332.

[11] 梁秀荣, 王素红. 肺部弥漫性结节病变的表现及鉴别诊断[J]. 医学影像与检验, 2009, 1(9):218.

[12] 许天培. CT 诊断尘肺及其合并症 40 例分析[J]. 中国工业医学杂志, 2006, 9(2):87.

[13] 陈蔚娟. 尘肺误诊原因浅析[J]. 中国现代药物应用, 2009, 21(3):128.

[14] 荣独山. X 线诊断学[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社, 2000:161.

[15] 丁长青, 丁爱兰, 王文生. CT 对胸膜弥漫性结节病变的诊断价值[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(13):1532.

(收稿日期:2010-03-18 修回日期:2010-05-09)

**启 事**

《重庆医学》开设博士生专栏,此专栏专为各院(校)博士生服务,本刊将开设绿色通道。欢迎全国医学院校博士生投稿。本刊收稿网址: <http://cqyx.journalserv.com>, 投稿后注明:博士生专栏文章。

《重庆医学》编辑部