

文章编号:1005-6947(2008)01-0051-03

· 基础研究 ·

缺氧诱导因子-1 α 在大鼠门静脉高压胃病中的作用研究

李珂¹, 叶启发¹, 冯留顺², 明英姿¹, 陈晚平¹, 牛英¹, 朱云祥¹

(1. 中南大学湘雅三医院 移植中心、卫生部移植医学工程技术研究中心, 湖南 长沙 410013; 2. 郑州大学第一附属医院 普通外科, 河南 郑州 450052)

摘要:目的 通过检测缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在门静脉高压胃病(PHG)大鼠胃壁中的表达, 探讨其对 PHG 病变所起的作用。方法 通过门静脉部分缩窄方法制备 PHG 大鼠模型, 并设立假手术组(SO)作为对照, 免疫组化法检测 HIF-1 α 和血管内皮生长因子(VEGF)及 CD34 在大鼠胃壁组织中的表达, 并对 CD34 阳性血管进行微血管密度(MVD)计数。结果 HIF-1 α , VEGF 和 CD34 在 PHG 组大鼠胃壁中的表达均明显高于 SO 组($P < 0.01$)。结论 HIF-1 α 的过度表达可能在 PHG 发病机制中起重要作用。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 51-53]

关键词: 高血压, 门静脉; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管内皮生长因子; 微血管密度; 胃黏膜/病理学
中图分类号: R 657.3 **文献标识码:** A

Study of the role of hypoxia inducible factor-1 alpha in portal hypertensive gastropathy of rats

LI Ke¹, YE Qifa¹, FENG Liushun², MING Yingzi¹, CHEN Wanping¹, NIU Ying¹, ZHU Yunxiang¹

(1. Department of Transplantation, The Third Xiang-Ya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China; 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To investigate the role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in portal hypertensive gastropathy through a study of the expression of hypoxia inducible factor-1 alpha in the gastric mucosa of portal hypertensive rats. **Methods** The portal hypertensive gastropathy models were established by portal vein-ligation, and sham-operated rats were used simultaneously as controls. The expression of HIF-1 α , VEGF and CD34 in rat stomach tissues was detected by using immunohistology and MVD was counted under CD34 staining. **Results** The expression level of HIF-1 α , VEGF and CD34 in the portal hypertensive gastropathy group was significantly higher than that in the sham-operated group ($P < 0.01$). **Conclusions** The overexpression of HIF-1 α may play an important role in the pathogenesis of portal hypertensive gastropathy.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1): 51-53]

Key words: Hypertension, Portal; Hypoxia-inducible Factor-1 Alpha; Vascular Endothelial Growth Factor; Microvessel Density; Gastric Mucosa/pathol

CLC number: R 657.3 **Document code:** A

门静脉高压症是临床常见病、多发病, 其所引起的胃黏膜病变——门静脉高压性胃病(portal hypertensive gastropathy, PHG)所致出血的发生率为25%~40%, 仅次于食管静脉曲张破裂出血而居

第二位。因此近年 PHG 备受重视^[1]。胃黏膜缺血缺氧是门静脉高压症的重要病理生理变化, 也是 PHG 的主要发生机制^[2]。作为转录调节因子, HIF-1 α 在多种缺氧状态诱导的相关疾病的发生过程中发挥着重要作用^[3]。但 HIF-1 α 对 PHG 的作用尚不清楚。为此, 笔者检测了 HIF-1 α 在 PHG 大鼠胃壁中的表达情况, 旨在认识其发病机制, 为临床诊治和预防 PHG 提供理论依据。

收稿日期:2007-02-01; 修订日期:2007-07-16。

作者简介:李珂,男,中南大学湘雅三医院博士研究生,主要从事肝胆外科,器官移植方面的研究。

通讯作者:李珂 E-mail:like374@163.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 纯种雄性 Wistar 大鼠 40 只,由河南省医学实验动物中心提供,体重 170~200 g,平均 182 g,饲养在动物房,自由进食标准颗粒饲料及饮水。动物随机分为 PHG 组(20 只)和假手术组(sham-operated, SO, 20 只)。

1.1.2 主要试剂 兔抗大鼠 HIF-1 α 多克隆抗体(浓缩型)为 Boster 公司产品,购自武汉博士德生物工程有限公司。小鼠抗大鼠血管内皮生长因子(VEGF)单克隆抗体(浓缩型)和小鼠抗大鼠 CD34 单克隆抗体(浓缩型)均为美国 Santa Cruz 公司产品,购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 疾病模型的制备 参照段进东等^[4]的一期门静脉缩窄法制备 PHG 模型:PHG 组大鼠术前 24h 禁食,自由饮水,腹腔内注射 10% 水合氯醛 [3 mL/kg(体重)] 麻醉。正中切口入腹,游离门静脉主干,沿其纵轴外置一 21G 钝头注射针头,近肝门处用 3-0 丝线环绕门静脉与 21G 钝头注射针头一并结扎,取出针头,使门静脉横截面积缩窄 90%,造成 PHG 大鼠模型。SO 组仅游离门静脉主干而不结扎,实验与 PHG 组相同。排除因麻醉及手术等因素造成死亡的大鼠,术后 2 周每组大鼠随机 15 只,一次性取材进行各项指标检测。

1.2.2 检测项目

1.2.2.1 测定游离门静脉压力(free portal pressure, FPP)测定 开腹后用 7 号针直接穿刺门静脉;导管经压力换能器,将采集到的压力信号转换成数字信号后输入计算机;采用多道生理记录仪(型号为成都 RM6240B 型)测定 FPP。单位以 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)表示。

1.2.2.2 病理检查 测定 FPP 后处死大鼠,剪取少许胃底组织,经 4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片(约 4 μ m)。HE 染色后,组织切片于光学显微镜下观察胃组织学改变并拍照。

1.2.2.3 免疫组化检测 HIF-1 α , VEGF, CD34 的表达 常规组织切片脱蜡至水,新鲜配制的 3% H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶活性。热修复抗原,正常山羊血清封闭。采用 SABC 法检测胃组织中 HIF-1 α 表达情况。采用 SP 法检测胃组织中 VEGF 和 CD34 表达情况。用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.2.2.4 血管进行微血管密度(microvessel density, MVD)计数 对 CD34 阳性切片先在低倍镜

(100 \times)下全面观察以确定血管密度最密集处(CD34 于微血管内皮部位呈棕黄色染色,血管密集区多位于胃黏膜固有层及黏膜下层),再在高倍镜(200 \times)下随机取 5 个视野,计数微血管数目。以与周围组织细胞和结缔组织成分明显区别的任何棕黄色染色的内皮细胞或细胞丛作为一个血管,只要结构不相连,其分支结构也作为一个血管,分辨不清或染色模糊的细胞不计入计数结果。由 2 名有经验的病理医生采用双盲法分别对同一切片计数,取两者的均值作为该切片的 MVD。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件包处理数据。各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间行独立 *t* 检验。

2 结果

2.1 胃的大体变化及 FPP 结果

PHG 组大鼠经部分门静脉结扎 2 周后,胃黏膜散在分布红点或铁锈色瘀斑,甚至沿黏膜皱壁呈线状排列。PHG 组 FPP 较 SO 组显著升高($P < 0.01$) (表 1)。腹壁及腹腔内肠系膜静脉和胃壁周围血管淤血扩张;并可见腹壁静脉明显曲张,贲门及食管下段周围静脉较 SO 组明显扩张、增多。

2.2 病理形态改变

PHG 组大鼠胃黏膜浅层毛细血管扩张,腺体数量减少,上皮细胞脱落,黏膜有局灶性坏死、出血;黏膜基层和黏膜下层微血管扩张,壁增厚,黏膜下层水肿增厚明显。而上述变化在 SO 组不明显。

2.3 免疫组化结果

2.3.1 HIF-1 α 染色及计数 HIF-1 α 阳性反应为棕黄色颗粒,主要分布于 PHG 大鼠胃黏膜病变部位腺体细胞的细胞浆和细胞核内,血管内皮细胞也有分布。采用单盲法在高倍镜(200 \times)下将每张切片随机选取 5 个视野,计数每视野的 HIF-1 α 阳性细胞百分率,PHG 组 HIF-1 α 蛋白表达较 SO 组显著升高($P < 0.01$) (表 1)。

2.3.2 VEGF 染色及计数 PHG 组大鼠胃黏膜病变部位蛋白定位于腺体细胞的胞浆,血管内皮细胞及间质细胞也可见着色,在成簇的扩张血管的内皮细胞中也有棕褐色颗粒。以细胞浆呈棕黄色染色的胃组织细胞为 VEGF 阳性细胞,采用单盲法在高倍镜(200 \times)下将每张切片随机选取 5 个视野,计算机图像分析系统(PAS-3 000 病理图像分析系统)自动计数每视野的 VEGF 阳性细胞百分率。PHG 组 VEGF 蛋白的表达较 SO 组明显升高($P < 0.01$) (表 1)。

2.3.3 MVD 计算结果 PHG 组 MVD 显著高于 SO 组 ($P < 0.01$) (附表)。

附表 两组 FPP, HIF-1 α , VEGF 阳性细胞测定及 MVD 计数结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	FPP(mmHg)	HIF-1 α (%)	VEGF(%)	MVD(个/视野)
SO	7.7 \pm 1.0	0.03750 \pm 0.05175	0.7 \pm 0.1	9.0 \pm 2.0
PHG	14.3 \pm 1.3	5.8 \pm 1.3	12.0 \pm 3.0	19.0 \pm 2.8
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

门静脉高压时胃黏膜微循环淤血,大量动静脉短路开放,使胃黏膜组织细胞因不能获得充分的氧和营养供应而处于缺氧状态。Tsugawa K 等^[5]发现门静脉高压症大鼠模型胃黏膜血流量降低,动脉血气分析示血氧饱和度(SaO₂)和血氧分压(PaO₂)明显低于对照组。缺氧可导致黏膜有氧代谢发生障碍,三磷酸腺苷含量下降,黏膜脆性增加及对损害因子的敏感性增高,黏膜屏障破坏,最终导致 PHG 发生。而低氧状态诱导一系列特异性的与血管生成、缺氧代谢密切相关的基因,其中起关键作用的是 HIF-1 α 。HIF-1 α 系迄今为止发现的特异性缺氧状态下发挥活性的唯一转录因子,参与 60 余种基因的转录调节。业已证实, HIF-1 α 表达的强弱与缺氧程度有关。HIF-1 α 在 PHG 组胃黏膜中的高表达提示胃黏膜存在明显缺氧。光镜下显示: PHG 组胃黏膜浅层毛细血管扩张,腺体数量减少,上皮细胞脱落,黏膜有局灶性坏死、出血;黏膜基层和黏膜下层微血管扩张,壁增厚,黏膜下层水肿增厚明显,此结果与周东风^[6]的报道一致。提示, HIF-1 α 的高表达与 PHG 的发生相关。故认为,可将 HIF-1 α 作为一个监测 PHG 严重程度的指标,从而可为临床预防和诊断提供有益线索。

VEGF 是一种特异地作用于血管内皮细胞的多功能因子,具有促进微静脉、小静脉通透性增加,血管内皮细胞分裂、增殖、细胞质钙聚集以及诱导血管生成等作用。本研究发现, PHG 组 VEGF 阳性细胞表达与 SO 组有明显差异,此结果与国内外研究基本一致。临床和动物实验均证实胃黏膜 VEGF 的高表达在 PHG 发病机制中的重要意义^[7-8]。

MVD 是评估血管生成的标准之一,也是反映某些疾病生物学行为的重要参数^[9]。应用分子遗传学的方法已证实缺氧可强烈地刺激新生血管生成。研究证实^[10]在血管的发育过程中, HIF-1 α 对血管新生起重要作用。HIF-1 α 通过转录活化编

码 VEGF 基因而刺激血管新生^[11]。本研究发现, PHG 组胃壁中 MVD 明显高于 SO 组,推测可能系因 PHG 胃黏膜缺血缺氧刺激了新生血管形成所致。同时, HIF-1 α 和 VEGF 在 PHG 大鼠胃壁中表达也明显高于对照组,推测缺氧诱导的新生血管形成可能是通过 HIF-1 α 和 VEGF 途径。本实验显示, PHG 组 MVD 较 SO 组高,与之对应的是大鼠胃黏膜缺血缺氧程度加重,黏膜层破坏及水肿加重。提示新生血管的形成并不能改善黏膜缺氧状态,反而由于新生血管通透性的增加,血浆渗出加重了黏膜层水肿,而血管内血液黏滞性增加,加重了被动淤血。

本实验研究表明,实验组动物 HIF-1 α 的过度表达可能导致其靶基因 VEGF 的大量表达,刺激新生血管形成,增加胃黏膜血管通透性,从而引起胃黏膜病变发生,增加胃黏膜出血的几率,在 PHG 的发生中可能起了重要作用,对其深入研究有助于进一步认识 PHG 的发病机制,降低 PHG 引起的消化道出血。

参考文献:

- [1] 黄筵庭. 门静脉高压性胃病[J]. 中华普通外科杂志, 2001, 16(7): 334-335.
- [2] Masuko E, Homma H, Ohta H, et al. Rheologic analysis of gastric mucosal hemodynamics in patients with cirrhosis[J]. Gastrointest Endosc, 1999, 49(3 Pt 1): 371-379.
- [3] Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2004, 30(5): 465-468.
- [4] 段进东, 管洪庚, 陈易人. 一期门静脉缩窄法复制大鼠门静脉高压性胃病模型[J]. 中华实验外科杂志, 2000, 17(4): 356-357.
- [5] Tsugawa K, Hashizume M, Tomikawa M, et al. Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the rat portal hypertensive gastropathy[J]. Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(4): 429-437.
- [6] 周东风, 李兆亭, 靳明英, 等. 门静脉高压胃病大鼠胃黏膜形态学的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2000, 9(1): 25-28.
- [7] Tsugawa K, Hashizume M, Migou S, et al. Role of vascular endothelial growth factor in portal hypertensive gastropathy[J]. Digestion, 2000, 61(2): 98-106.
- [8] 高中华, 刘洵阳, 黄飞舟, 等. 门静脉高压症胃黏膜血管内皮生长因子的变化[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(8): 485-487.
- [9] Ekici S, Cerwinka WH, Duncan R, et al. Comparison of the prognostic potential of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 and microvessel density for prostate cancer[J]. Int J Cancer, 2004, 112(1): 121-129.
- [10] Shi YH, Fang WG. Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(8): 1082-1087.
- [11] Freeburg PB, Abrahamson DR. Hypoxia-inducible factors and kidney vascular development[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(11): 2723-2730.