文章编号:1005 - 6947(2004)01 - 0025 - 04

·实验研究·

细胞凋亡在原发性下肢深静脉功能不全的大隐静脉曲张发病中的作用

胡作军[1], 王深明[1], 吴惠茜[2], 殷恒炜[1], 王劲松[1], 黄雪玲[1]
(1. 中山大学附属第一医院 血管外科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学医学院 病理教研室, 广东 广州 510080)

摘要:目的 探讨细胞凋亡在原发性下肢深静脉功能不全(PDVI)的大隐静脉曲张发病中的作用。**方法** 采用透射电镜、电泳、原位 DNA 片段末端标记(TUNEL)和免疫组织化学法检测原发性下肢深静脉功能不全的大隐静脉第一对瓣窦细胞凋亡及相关基因 Bcl-2 的表达。**结果** 试验组(PDVI)38 例,正常对照组 5 例。试验组大隐静脉第一对瓣膜平均细胞凋亡数 6.30 ± 2.70,平均细胞凋亡率 0.42 ± 2.12,Bcl-2 平均阳性率 0.29 ± 1.80;试验组的细胞凋亡数和细胞凋亡率均明显高于对照组(分别为 1.60 ± 0.81 和 0.21 ± 1.10),差异有显著性(均为 $P < 0.05$)。试验组大隐静脉反流程度为 I°,II°者细胞凋亡率(3.06 ± 1.65)明显低于 III°, IV°者(9.85 ± 2.36)($P < 0.05$)。试验组深静脉第一对瓣膜 Bcl-2 表达明显低于对照组(0.35 ± 1.03)($P > 0.05$)。**结论** 细胞凋亡及 Bcl-2 表达抑制在原发性深静脉功能不全的发病中有重要作用。

关键词:静脉机能不全/病因学; 静脉曲张/病因学; 细胞凋亡
中图分类号:R543.6; R329.2 **文献标识码:**A

Effect of apoptosis in the pathogenesis of the great saphenous varicose resulting from primary deep venous insufficiency

HU Zuo-jun[1], WANG Shen-ming[1], WU Hui-xi[2], YIN Heng-wei[1], WANG Jing-song[1], HUANG Xue-ling[1]
(1. *Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-san University, Guangzhou* 510080, *China*; 2. *Department of Pathology, SUN Yat-san University Medical School, Guangzhou* 510080, *China*)

Abstract: Objective To study the effect of apoptosis in the pathogenesis of great saphenous varicose (GSV) resulting from primary deep venous insufficiency (PDVI). **Methods** Apoptosis and Bcl-2 expression in the segment of first valve sinus of the GSV of PDVI of lower limbs were detected by transmission electron microscopy (TEM), agarose gel electrophoresis, TUNEL and immunohistochemistry. **Results** There were 38 cases of PDVLs in experment group and 5 normal GSV in control group. In experiment group, the apoptosis cells (AC) (6.30 ± 2.70) and apoptosis rate (AR) (0.42 ± 2.12) in the first valve sinus of GSV were significantly higher than those in control group (1.60 ± 0.81, 0.21 ± 1.10, respectively) (all $P < 0.05$). In patients with I°, II° blood reflux of deep venous, the AC (3.06 ± 1.65) and AR (0.36 ± 2.41) were significantly lower than those in patients with III°, IV° blood reflux (9.85 ± 3.26, 0.48 ± 2.96, respectively) (all $P < 0.05$). The Bcl-2 expressions in the segment of first valve sinus of GSV in patient with PDVI (0.29 ± 1.80) was significantly lower than that in control group (0.35 ± 1.03) ($P < 0.05$). **Conclusions** Apoptosis and suppression of Bcl-2 expression have important roles in the pathogenesis of PDVI of lower extremities.

Key words: VENOUS INSUFFICIENCY/etiol; VARICOSE VEINS/etiol; APOPTOSIS
CLC number: R543.6; R329.2 **Document code:** A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870800)。
收稿日期:2003 - 09 - 11; **修订日期:**2003 - 11 - 22。
作者简介:胡作军(1970 -),男,广东广州人,中山大学附属第一医院主治医师,博士,主要从事外周血管方面的研究。

原发性下肢深静脉功能不全(primary deep venous insufficiency,PDVI)的病因至今仍不甚清楚。瓣膜变形皱褶及静脉管壁张力降低是其发病的两种学说。然而,在细胞和蛋白水平上对本病的研究很少。Parra[1]认为结缔组织代谢及酶活性的改变参与了静脉扩张、迂曲的变化。细胞凋亡在动脉硬化闭塞中的作用已被证实[2],但在静脉疾病中的作用尚未能阐明。本研究通过检测PDVI的大隐静脉细胞凋亡及相关基因Bcl-2的表达,以探讨细胞凋亡在PDVI的大隐静脉曲张发病中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源及分组

取我院2001年6月~2002年5月收治的38例PDVI患者的大隐静脉第一对瓣窦段作为试验组实验标本。其中男20例,女18例。年龄36~65岁,中位年龄51岁。深静脉功能不全反流I°8例,II°8例,III°12例,IV°10例。临床分级≥$C_4$17例,$C_{1\sim3}$21例。38例均无深静脉血栓形成病史。血管彩超均未发现血栓形成。5例标本来自意外死亡的正常人大隐静脉第一对瓣窦段为对照组。均为男性,年龄20~40岁,中位年龄28岁。行免疫组织化学(免疫组化)检测的标本常规福尔马林固定,石蜡包埋,4μm厚切片备染,备1张HE染色。需电泳的标本置液氮保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞凋亡的检测及结果判断

(1)透射电镜检查 每例静脉标本切取5块,大小1mm×1mm×2mm,经2.5%戊二醛及1%锇酸双重固定,常规脱水,树脂包埋,超薄切片,铀铅染色。JEM1200-EX型透射电镜检查并照相。电镜下观察示核染色质浓缩,染色质靠边,胞浆空泡化或凋亡小体形成的为凋亡细胞。计算每份标本凋亡细胞平均绝对数。

(2)原位DNA片段末端标记法(TUNEL) 常规石蜡切片。采用细胞凋亡检测试剂盒(INTS7101)。参照Gavrieli标记法[3]。采用连接过氧化物酶的抗地高辛抗体及3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色。细胞内出现棕黄色颗粒沉着为阳性染色。每张切片选择6个高倍视野(10×20),德国KONTRON IBAS 2.5全自动图像分析系统计算平均凋亡率(凋亡细胞数/视野细胞总数)。

(3)凋亡细胞DNA琼脂糖凝胶电泳 每例取冷冻静脉标本约50mg,常规抽提DNA、蛋白酶K消化,脱水、洗涤干燥。置0.9%琼脂糖凝胶电泳,3~5V/cm电压,至溴酚蓝移出7~8cm,紫外灯下观察及拍照。电泳观察下可见典型"梯状带"DNA降解片段。

1.2.2 Bcl-2基因蛋白测定及结果判断 常规石蜡切片,应用Bcl-2单克隆抗体,免疫组化SP法染色,DAB显色。细胞内出现棕黄色颗粒沉着为阳性染色。德国KONTRON IBAS 2.5全自动图像分析系统,采用6个高倍视野(10×20),计算其平均阳性表达率(阳性细胞数/视野细胞总数)。

1.3 统计方法

所测数据以($\bar{x}\pm s$)表示;均数间比较用t检验。

2 结 果

2.1 HE染色光镜观察

曲张大隐静脉壁厚薄不均;外膜纤维组织增生,中膜平滑肌排列紊乱,玻璃样变,黏液样变,内膜内皮细胞连接疏松、有脱落。凋亡细胞核染色质致密浓缩,核碎裂(图1)。

图1 大隐静脉壁厚薄不均,外膜组织增生,中膜排列紊乱,内膜连接疏松(×100)

2.2 透射电镜

凋亡细胞染色质固缩,聚集核膜或呈新月型小体,胞浆空泡化(图2)。

图2 染色质固缩,沿核膜聚集,腔浆空泡化为凋亡细胞(×3 000)

2.3　凝胶电泳

可见典型“梯状带”DNA 裂解片段(图3)。

图3　病人组 DNA 呈 180bp 倍数片段;对照组未见 DNA 片段

2.4　凋亡原位标记

TUNEL 阳性染色位于细胞核内,呈棕黄色。正常大隐静脉壁可见少量凋亡细胞。PDVI 大隐静脉内膜(含瓣膜)、中膜、外膜均可见较多的凋亡细胞;附属小静脉壁亦见较多的凋亡细胞(图4)。

2.5　免疫组化染色

Bcl-2 在正常对照组有较多阳性表达,而 PDVI 组较少阳性表达(图5)。

2.6　结果分析

2.6.1　细胞凋亡　试验组与对照组比较,电镜平均细胞凋亡数和 TUNEL 平均细胞凋亡率明显高于对照组,差异有显著性($P<0.05$)(附表)。

2.6.2　Bcl-2 平均阳性率　试验组明显低于对照组,差异有显著性($P<0.05$)(附表)。

2.6.3　细胞凋亡与临床病理指数相关性　试验组中,不同深静脉反流程度及不同临床分级组间的细胞凋亡指标的差异均有显著性(III°,IV°与 I°,II°反流比较,$P<0.05$;$C_{1\sim3}$与$\geqslant C_4$比较,$P<0.05$)(附表)。所测细胞凋亡各项指标在患者性别、病程方面差异无显著性($P>0.05$)。

图4　大隐静脉内膜、中膜、外膜及附属小静脉均见较多凋亡细胞(×200)

图5　PDVI 组有阳性表达,但密度较少(×200)

附表　细胞凋亡和 Bcl-2 基因表达的检测结果

按病例资料分组	例数	电镜平均凋亡数	*P* 值	TUNEL 平均凋亡率	*P* 值	Bcl-2 平均阳性率	*P* 值
对照组	5	1.60±0.81	<0.05	0.21±1.10	<0.05	0.35±1.03	<0.05
试验组	38	6.30±2.70		0.42±2.12		0.29±1.80	
性别							
男	20	5.90±2.11	>0.05	0.38±1.01	>0.05	0.28±2.20	>0.05
女	18	6.40±1.92		0.42±1.72		0.30±1.70	
深静脉返流							
I°,II°	16	3.06±1.65	<0.05	0.36±2.41	<0.05	0.39±2.10	<0.05
III°,IV°	22	9.85±2.36		0.48±2.96		0.23±2.66	
临床分级							
$C_{1\sim3}$	21	3.10±1.90	<0.05	0.35±2.30	<0.05	0.38±1.98	<0.05
$\geqslant C_4$	17	9.90±2.20		0.47±2.54		0.23±2.41	
病程							
≤5年	9	7.12±1.18	>0.05	0.41±1.90	>0.05	0.31±1.05	>0.05
>5年	29	5.40±2.01		0.39±2.22		0.29±1.25	

3 讨 论

下肢深静脉瓣膜功能不全引起的反流严重干扰下肢深、浅、交通静脉三大系统的正常血流动力学状况[4]。大隐静脉曲张的发病机制与瓣膜、静脉壁及肌泵改变等因素有密切关系,其中以瓣膜及静脉壁改变尤为重要。近年来学者们力图从分子机制阐明静脉功能不全的发生机制。Parra 等[1]证实激素受体等改变与曲张静脉的发生有密切关系。而 Jurukova 等[5]利用超声技术证实静脉曲张中存在胶原蛋白的变性。Venturi 等[6]证实在静脉曲张中存在胶原蛋白及弹性蛋白变性。Pappas 等[7]证实视网膜胶质瘤蛋白作为一分子调节因子存在于下肢静脉功能不全的曲张静脉中。

细胞凋亡是一个非常复杂的,紧密级联反应的过程,以清除已损伤或衰老的细胞为目的。组织细胞自身稳定依赖细胞增殖与细胞凋亡之间的平衡。在血管外科领域,细胞凋亡的研究最早开展于动脉疾病方面。1995 年 Isnar 等[2]证实细胞凋亡现象存在于外周动脉硬化闭塞疾病中,细胞凋亡参与了动脉粥样硬化斑块形成的过程,细胞凋亡在血管壁重塑及血管狭窄中起着重要作用。Henderson 等[8]发现腹主动脉瘤的瘤壁平滑肌及细胞外间质存在细胞凋亡现象。然而,对于细胞凋亡在 PDVI 大隐静脉曲张发病中的作用研究尚未见报道。

PDVI 患者存在深静脉反流,静脉反流产生负向剪切力,使内皮细胞及平滑肌细胞遭到破坏,内皮细胞及平滑肌细胞的修复与增生失衡。反流血流引起静脉瓣窦氧分压(PO_2)下降,造成低氧;瓣窦内皮细胞及平滑肌细胞因缺氧而损伤,从而启动细胞凋亡程序,出现凋亡[9]。本研究发现,PDVI 的大隐静脉瓣窦区组织的细胞凋亡数和细胞凋亡率明显高于正常者,说明 PDVI 的大隐静脉曲张除了血流动力学和物理性因素外,其本身的分子生物学特性也有改变,且可能是发病的主要原因。本实验在细胞水平上观察发现 PDVI 的大隐静脉壁厚薄不均,外膜纤维组织增生,中膜平滑肌排列紊乱,玻璃样变,黏液样变,内膜内皮细胞连接疏松、有脱落。凋亡细胞核染色质致密浓缩,核碎裂。聚集核膜或呈新月型小体;且在电泳下可见典型 DNA 裂解片段“梯带”。上述改变在深静脉瓣膜中是否也有同样改变有待研究证实。

Bcl-2 是最早被认识的抗凋亡基因,是多种诱发凋亡途径中的重要抑制因子;其对细胞凋亡的干扰有选择性,而对细胞周期无明显影响,可选择性阻止细胞死亡的最后通路。为进一步了解细胞凋亡的信息传导途径,笔者检测了 Bcl-2 基因表达水平,发现其在 PDVI 的第一对大隐静脉瓣窦中的表达受到抑制。笔者认为,在发病早期(I°,II°),Bcl-2 基因表达有所增加,较正常对照组高,可能发挥了一定程度的抗凋亡作用。但在发病中后期(III°,IV°),Bcl-2 表达呈下降趋势,从而凋亡作用明显加强。这种调控机制也许能较好地解释 PDVI 的静脉壁及其瓣膜的扩张、松驰的改变。

进一步的统计学分析发现,PDVI 患者的大隐静脉窦细胞凋亡的发生与疾病严重程度有密切关系,当深静脉反流程度增加和临床症状加重时,凋亡作用亦增强。虽然 Parra 发现激素受体在男女患者间存在差异,但本研究并未发现凋亡作用与患者性别和病程的长短有何关系。

本研究结果表明,细胞凋亡作用和 Bcl-2 基因表达抑制与 PDVI 的大隐静脉曲张发病密切相关,细胞凋亡可能参与了其发病过程。

参考文献:

[1] Parra JR, Cambria RA, Hower CD, *et al*. Tissue inhibitor of metalloproteinnase-1 is increased in the saphenous junction of patients with varices in the leg[J]. J Vasc Surg, 1998, 28(4): 669-676.

[2] Isnar JM, Kearney M, Bortman S, *et al*. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis[J]. Circulation, 1995, 91(11): 2703-2711.

[3] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992, 119(3): 493-501.

[4] 王深明,李晓曦,黄雪玲,等. 下肢原发性静脉返流性疾病的综合性外科治疗[J]. 中国实用外科杂志, 2001, 21(1): 51-53.

[5] Jurukova Z, Melenkov C. Ultrasound evidence for collagen degradation in the wall of varicose veins[J]. Exp Mol Pathol, 1982, 37(1): 37-47.

[6] Venturi M, Bonavina L, Annoni F, *et al*. Biochemical assay of collagen and elastin in the normal and varicose vein wall[J]. J Surg Res, 1996, 60(1): 245-248.

[7] Pappas PJ, Gwertzman GA, DeFouw DO, *et al*. Retinoplastoma protein: a molecular regulator of chronic venous insufficiency[J]. J Surg Res, 1998, 76(2): 149-153.

[8] Henderson LE, Geng YJ, Sukhova GK, *et al*. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms[J]. Circulation, 1999, 99(1): 96-104.

[9] Cluthon S. The importance of oxidative stress in apoptosis[J]. Br Med Bull, 1997, 53(3): 662-668.