

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.02.005

缺氧对大鼠脑微血管内皮细胞增殖和凋亡的影响及其机制研究*

李 燕 田 铸 徐梦林 翟 军 谢百发[△]

(陆军军医大学第一附属医院 急救部 重庆 400038)

摘要 目的:探讨缺氧对大鼠脑微血管内皮细胞增殖和凋亡的影响及其可能的分子机制。**方法:**从2周龄的SD大鼠中提取脑微血管内皮细胞。体外模拟脑缺氧微环境,将体外培养的脑微血管内皮细胞分别置于常氧(21% O₂)和低氧环境(1% O₂)下处理6、12和24小时,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法观测不同时间点细胞增殖能力的变化;用AnnexinV-FITC/PI双标流式细胞术观察不同时间点细胞凋亡情况;Real time-PCR和Western blot法检测细胞中(Hypoxia-inducible factor-1 α) HIF-1 α mRNA和蛋白的表达。进一步使用HIF-1 α siRNA靶向沉默HIF-1 α 基因,再检测低氧环境下HIF-1 α mRNA和蛋白表达、细胞增殖以及凋亡水平的变化。**结果:**随着低氧处理时间的延长,大鼠脑微血管内皮细胞的增殖能力被显著抑制,同时凋亡水平显著增加,HIF-1 α mRNA和蛋白表达水平显著升高。使用HIF-1 α siRNA特异性阻断HIF-1 α 表达后,低氧环境下HIF-1 α mRNA和蛋白表达明显降低,同时细胞活性增加,细胞凋亡率显著下降。**结论:**缺氧微环境能够通过上调HIF-1 α 的表达抑制大鼠脑微血管内皮细胞增殖并促进其凋亡。

关键词:缺血性脑卒中;缺氧;低氧诱导因子-1 α ;增殖;凋亡

中图分类号:R-33;R743 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)02-222-05

Effect and Mechanism of Hypoxic Micro-environment on the Proliferation and Apoptosis of Rat Brain Vascular Endothelial Cells*

LI Yan, TIAN Zhu, XU Meng-lin, ZHAI Jun, XIE Bai-fa[△]

(Department of emergency, Southwest Hospital in Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and mechanism of hypoxia on the proliferation and apoptosis of rat brain vascular endothelial cells. **Methods:** Rat brain vascular endothelial cells were isolated from 2 weeks old SD rat. Cells were treated under hypoxia (1% O₂) or normoxia (21% O₂) condition for 6, 12 and 24 hours. MTT assay was performed to detect the cell proliferation rate. AnnexinV-FITC/PI flow cytometry was used to monitor the apoptosis rate of rat brain vascular endothelial cells. The mRNA and protein expression levels of HIF-1 α and β -catenin were detected by RT-PCR and Western blot. Furthermore, HIF-1 α siRNA was used to investigate the role of HIF-1 α on hypoxia-mediated proliferation and invasion of rat brain vascular endothelial cells. **Results:** The results shown that hypoxia could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of rat brain vascular endothelial cells in a time-dependent manner. The mRNA and protein level of HIF-1 α was upregulated by hypoxia treatment. HIF-1 α siRNA could significantly reverse hypoxia-mediated proliferation and apoptosis of rat brain vascular endothelial cells. **Conclusion:** Hypoxia inhibits the proliferation and promotes apoptosis of rat brain vascular endothelial cells through upregulation of HIF-1 α expression.

Key words: Cerebral arterial thrombosis, Hypoxia, HIF-1 α , Proliferation, Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)02-222-05

前言

缺血性脑卒中是常见的脑血管病,具有发病率高、死亡率高和致残率高的特点,也是我国成年人致残的首位原因^[3-5]。这一病变多伴有明显的基底动脉和大脑中动脉重构,既往研究表明这一病理过程中血管重构与血管平滑肌细胞的异常凋亡和增殖失调、受损部位纤维化等密切相关^[6-8]。

人体大脑组织的耗氧量居所有器官之首,约占机体总耗氧

量的20%,而且脑组织对缺血缺氧的耐受性差,在很短的时间内即可造成神经元细胞的不可逆性死亡^[11,12]。低氧微环境参与人类多种疾病的发病,其能够对细胞增殖、分化、凋亡和血管生成等过程进行调控,从而影响多种疾病的转归发展^[13,14]。近年来,国内外专家学者发现缺血性脑卒中的发病多伴随局灶性缺血缺氧^[9,10]。但低氧在大鼠脑微血管内皮细胞增殖和凋亡中的作用目前还不明确。因此,本研究探讨了体外低氧微环境对大鼠脑微血管内皮细胞增殖和凋亡的影响及可能作用机制。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81071537)

作者简介:李燕(1982-),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:主要从事急救、重症工作,电话:023-68773047

[△] 通讯作者:谢百发,副主任医师,E-mail: 13508375528@163.com

(收稿日期:2018-04-07 接受日期:2018-04-30)

1 材料与方法

1.1 材料

特优级胎牛血清购自杭州四季青生物科技公司;磷酸盐缓冲液(PBS)DMEM高糖培养基购自Hyclone生物科技公司;四甲基偶氮唑盐MTT检测试剂购自美国Sigma-Aldrich公司;含0.25%Trypsin-EDTA胰蛋白酶及青链霉素混合液购自天津洁洋盛生物科技公司;小鼠抗人HIF-1 α 、Cleaved Caspase-3多克隆抗体、兔抗人 β -actin单克隆抗体、HRP标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗均购自美国Cell Signaling technology生物公司;Annexin V-FITC/PI双标流式细胞凋亡检测试剂盒购自美国Bio-vision公司;cDNA反转录试剂盒和荧光定量实时PCR试剂盒均购自南京诺维赞生物科技公司;0.45 mm PVDF膜购自硝酸纤维素膜购自碧云天生物技术公司;6孔细胞培养板和T25细胞培养瓶均购自美国Beaver公司。

1.2 方法

1.2.1 原代大鼠脑微血管内皮细胞的分离与培养 从2周龄的SD大鼠中取出大脑皮质部分,使用PBS清洗3次去除包膜和脑脊液。使用眼科剪将洗净的大脑皮质剪碎至1 mm³大小碎片,随后加入0.1% II型胶原酶置于37℃恒温摇床中消化45 min。消化完毕后,往胶原酶中加入含有20%胎牛血清的DMEM高糖培养基终止消化,并1000 r/min离心5 min,弃去上清液,加入20%牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)悬浮混匀后再次离心1000 r/min共5 min。再次弃去上清液,细胞沉淀中加2 mL 0.1%浓度的胶原分散酶重悬混匀之后置于37℃恒温摇床中孵育30 min。赋予完毕后,于1000 r/min离心5 min,弃去上清液,再次加入BSA重悬混匀,随后于1000 r/min离心20 min,留置底部黄白色“微血管层”沉淀。使用移液器轻柔吸出“微血管层”,加入DMEM高糖培养基重悬混匀,于1000 r/min离心5 min,重复两次。最后弃去上清液,加入预先配置好的脑微血管内皮细胞培养液(DMEM高糖培养基+20%胎牛血清+2 mmol/L谷氨酰胺+1 mg/mL肝素+1 ng/mL碱性成纤维细胞生长因子+10 ng/mL血管内皮生长因子+100 U/mL青霉素+100 g/mL链霉素)重悬细胞,待其悬浮后接种于预先涂有明教的塑料培养瓶中,置于37℃、5% CO₂和饱和湿度的细胞培养箱中继续培养。根据细胞生长状态,常规2-3天进行换液处理,待形成单层之后,吸去培养液,使用0.25%胰蛋白酶消化传代,进行后续实验。

1.2.2 细胞增殖实验 四甲基偶氮唑盐(MTT)法细胞活性检测 将处于对数生长期的原代大鼠脑微血管内皮细胞以1×10⁵/mL的密度种植于96孔板,并设置5个复孔。共接种2块板。分别置于低氧培养箱及常氧培养箱中培养,分别于3、6、12、24 h共4个时间点取5个细胞孔及1个空白孔行CCK-8检测,每孔加入20 μ L CCK-8试剂,孵育2 h后取出在酶标仪450 nm处测定其吸光值(A),以时间(Hours)为横坐标,A为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.3 RNA提取和 Real-time PCR 检测 RT-PCR 检测 HIF-1 α 、cleaved caspase-3 mRNA 的表达,将已经过处理的不同分组细胞用冰上预冷 PBS 洗涤 3 次,每孔中加入 1 mL Trizol RNA 提取液,按照一步法提取总 RNA,使用紫外分光光度计检测总

RNA 浓度。按照逆转录试剂盒操作说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 PCR 循环扩增。本研究所有 PCR 引物序列的设计与合成均委托北京天一辉远生物科技公司完成。相关基因引物序列如下: β -actin 上游引物 5'-ACCCAGAAGACTGTG-GATGG-3',下游引物 5'-CTGGACTGGACGGCAGATCT-3';HIF-1 α 上游引物 5'-GTGCCACATCATCACCATA',下游引物 5'-CAAAGCGACAGATAACACG-3';Cleaved Caspase-3 上游引物 5'-CCTTTGCTGCCTGTGTGAAC-3',下游引物 5'-GCTG-GAGGATGAGGATGTGT-3'。实时荧光定量 PCR:反应体系 20 μ L, mixture 10 μ L, 探针引物 1 μ L, cDNA 2 μ L。反应条件均为:95℃, 3 min 预变性;94℃, 30 s; 48℃, 30 s, 72℃, 1 min, 扩增 35 个循环;72℃延伸 10 min。计算各组 HIF-1 α 、Cleaved Caspase-3 的相对表达量。

1.2.4 细胞转染 本实验所使用 siRNA 的设计与合成均委托广州锐博生物科技公司, siRNA 引物序列如下: HIF1- α siRNA 靶序列为 5'-CTGATGACCAGCAACTTGA-3', NC-siRNA 靶序列为 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。根据说明在六孔板中使用 Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent 转染 PDLs, 并设计阴性对照 siRNA 为 NC-Si 组, 终浓度为 50 nM, 培养 48 h, 提取蛋白、RNA 并进行后续研究。

1.2.5 Western blot 检测 将已处理好的原代大鼠脑微血管内皮细胞用 PBS 洗涤 3 次随后加入 RIPA 裂解液并用细胞刮刀刮下来放入 1.5 mL EP 管中冰上裂解 30 min。随后于 12 000 rpm 离心 10 min 并将蛋白上清液冻存于 -20℃。使用 5X 蛋白上样缓冲液混匀蛋白上清后于 95℃中加热 10 分钟, 待其充分变性。上机跑电泳, 随后转膜并置于 5%脱脂牛奶中封闭 1 h。封闭结束后使用 TBST 洗膜 5 min×3 次, 随后将膜置于小鼠抗人 HIF-1 α (浓度 1:1000)、小鼠抗人 Cleaved Caspase-3 多克隆抗体(浓度 1:500)和兔抗人 β -actin 单克隆抗体(浓度 1:2500)中 4℃孵育过夜。次日, 洗膜 5 min×3 次后, 置于辣根酶标记羊抗兔 IgG 中室温孵育 2 h。TBST 洗膜 5 min×3 次后, 采用 ECL 化学发光法金鼎显影。应用 Quantity One 软件分析条带灰度值并作统计分析。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡 将处理好的各组原代大鼠脑微血管内皮细胞的培养基收集至指定的 15 mL 离心管中待用。使用 0.25%胰蛋白酶将细胞消化下来并收集至之前的离心管中。1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。加入 PBS 重悬后再次 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 留置细胞沉淀。加入 200 μ L Binding Buffer 重悬, 并每管依次加入 5 μ L Annexin V-FITC、5 μ L PI, 混匀。室温下避光孵育 15 min; 流式细胞仪上机检测, 记录结果。

1.3 统计学方法

本研究所有数据均采用 SPSS 22.0 软件进行分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 Dunnett t 检验。以 P<0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧对大鼠脑微血管内皮细胞增殖的影响

大鼠脑微血管内皮细胞分别在常氧和低氧条件下培养 6、12、24 h 后, 采用 MTT 法进行细胞增殖能力检测。结果显示:随着

低氧处理时间的延长,大鼠脑微血管内皮细胞细胞的增殖能力被显著抑制,并呈时间依赖性,差异均有显著性($P < 0.05$)(图 1)。

2.2 低氧对大鼠脑微血管内皮细胞凋亡的影响

大鼠脑微血管内皮细胞在低氧条件下培养 24 小时后,采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术进行细胞凋亡水平的检测。结果显示:随着低氧处理时间的延长,大鼠脑微血管内皮细胞细胞的凋亡率明显增高,并呈时间依赖性,差异均有显著性($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 低氧对大鼠脑微血管内皮细胞内 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达的影响

大鼠脑微血管内皮细胞分别在常氧和低氧条件下培养 6、12、24 小时后,采用 RT-PCR 和 Western blot 实验检测 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达水平。结果显示:随着低氧处理时间的延长,HIF-1 α mRNA 和蛋白表达水平显著增高,呈时间依赖性,差异均有显著性($P < 0.05$)(图 3)。

2.4 HIF-1 α siRNA 对 HIF-1 α 表达的影响

在常氧环境下,使用 HIF-1 α 靶向 siRNA 对大鼠脑微血管内皮细胞处理 24 h 后,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测

HIF-1 α mRNA 和蛋白表达水平。结果显示与空白对照组比较,使用 HIF-1 α siRNA 能够显著抑制 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达,差异均有显著性($P < 0.05$)(图 4)。

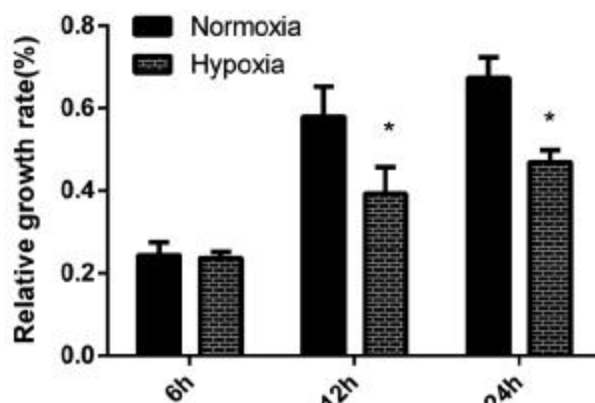


图 1 低氧抑制大鼠脑微血管内皮细胞的增殖

Fig.1 Hypoxia inhibits the proliferation of rat brain vascular endothelial cells

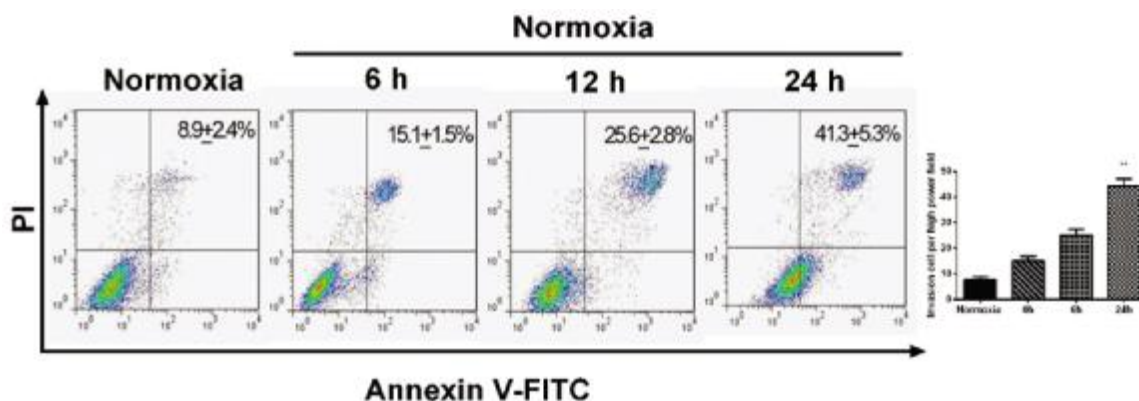


图 2 低氧促进大鼠脑微血管内皮细胞的凋亡

Fig.2 Hypoxia promotes the apoptosis of rat brain vascular endothelial cells

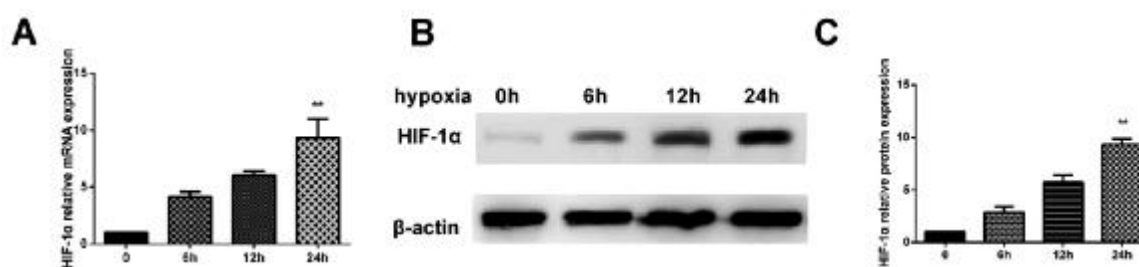


图 3 低氧促进大鼠脑微血管内皮细胞内 HIF-1 α 的表达

A: RT-PCR 检测 HIF-1 α mRNA 表达水平; B: Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达水平; C: Western blot 结果定量分析

Fig.3 Hypoxia increased HIF-1 α expression in the rat brain vascular endothelial cells

A. RT-PCR assay for HIF-1 α mRNA level in rat brain vascular endothelial cells; B. Western blot assay for HIF-1 α protein level in rat brain vascular endothelial cells; C. Quantification of western blot results.

2.5 HIF-1 α siRNA 对低氧诱导的大鼠脑微血管内皮细胞增殖的影响

如图 6 所示,低氧处理能够显著抑制大鼠脑微血管内皮细胞的增殖;而在转染 HIF-1 α siRNA 的细胞中,低氧对大鼠脑微血管内皮细胞增殖的抑制作用被模型减弱,细胞增殖水平明显升高($P < 0.05$),差异均有显著性(图 6)。

2.6 HIF-1 α siRNA 对低氧诱导的大鼠脑微血管内皮细胞凋亡

的影响

Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术结果如图 6 所示,低氧处理能够显著增加大鼠脑微血管内皮细胞的凋亡率,表明低氧微环境促进细胞凋亡;而在转染 HIF-1 α siRNA 的细胞中,低氧对大鼠脑微血管内皮细胞的凋亡率显著下降($P < 0.05$),差异均有显著性(图 6)。

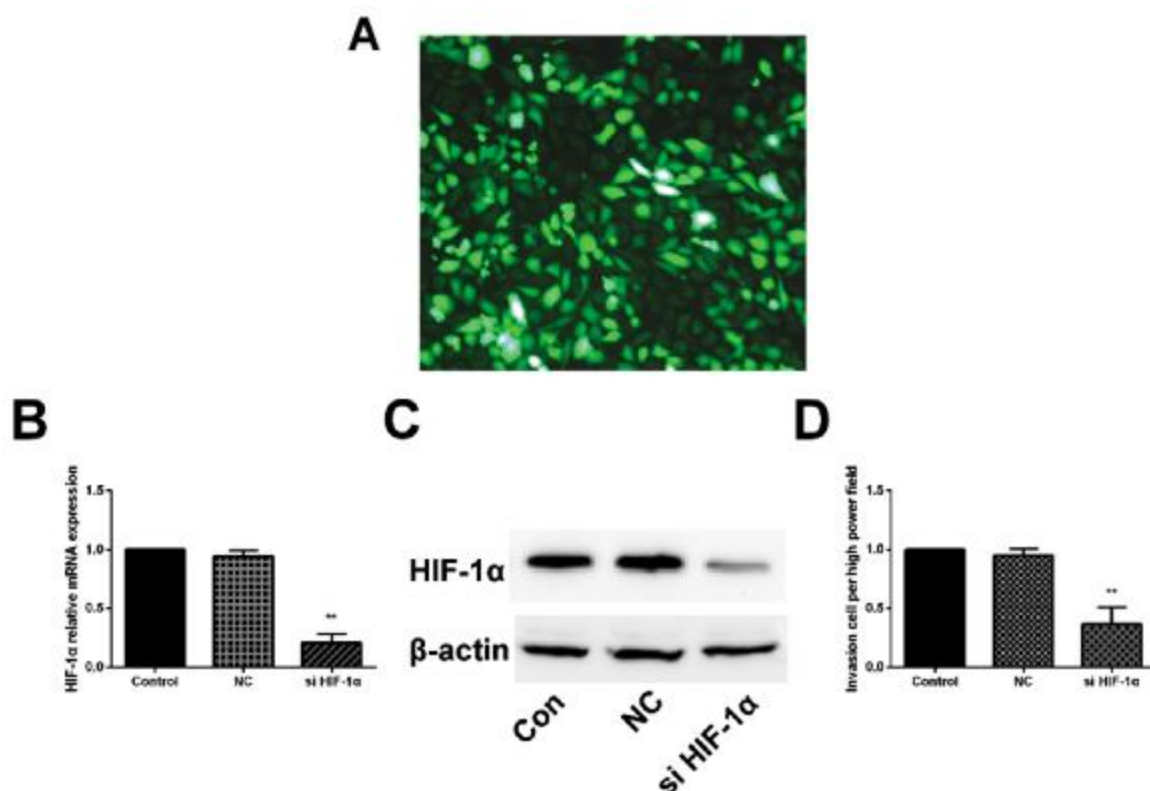


图4 HIF-1 α siRNA 对大鼠脑微血管内皮细胞 HIF-1 α 表达的影响

A:检测 si RNA 转染效率;B:RT-PCR 检测 HIF-1 α mRNA 表达;C:Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达;D:Western blot 结果定量分析

Fig.4 The effect of HIF-1 α siRNA on the expression of HIF-1 α in the rat brain vascular endothelial cells

A: Detection of the transfection efficiency of HIF-1 α siRNA; B: RT-PCR analysis of HIF-1 α mRNA; C: Western blot analysis of HIF-1 α protein;

D: Quantification of western blot results.

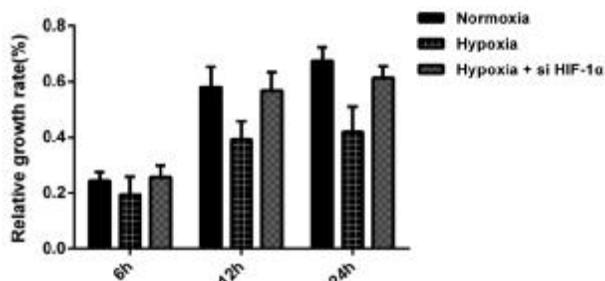


图5 HIF-1 α siRNA 靶向沉默 HIF-1 α 逆转低氧诱导的大鼠脑微血管内皮细胞增殖抑制

Fig.5 HIF-1 α siRNA reverses hypoxia-inhibited proliferation of rat brain vascular endothelial cells

3 讨论

缺血性脑卒中又称脑梗死,是由于各种内源性及外源性因素所致的局部脑组织区域的血流供应存在不足,导致脑组织缺血缺氧,进而出现坏死并产生一系列神经功能缺失的病理过程^[15-17]。脑微血管内皮细胞的增殖和凋亡是缺血性脑卒中发病过程中的重要生物学事件。采用静脉溶栓和血管介入治疗尽快促进梗死部位微血管再通、抑制微血管内皮细胞的凋亡和促进其增殖是缺血性脑卒中的理想治疗目标^[18-20]。因此,探讨影响脑微血管内皮细胞增殖与凋亡的因素以及有效的干预方法对于缺血性脑卒中的防治具有重要意义。

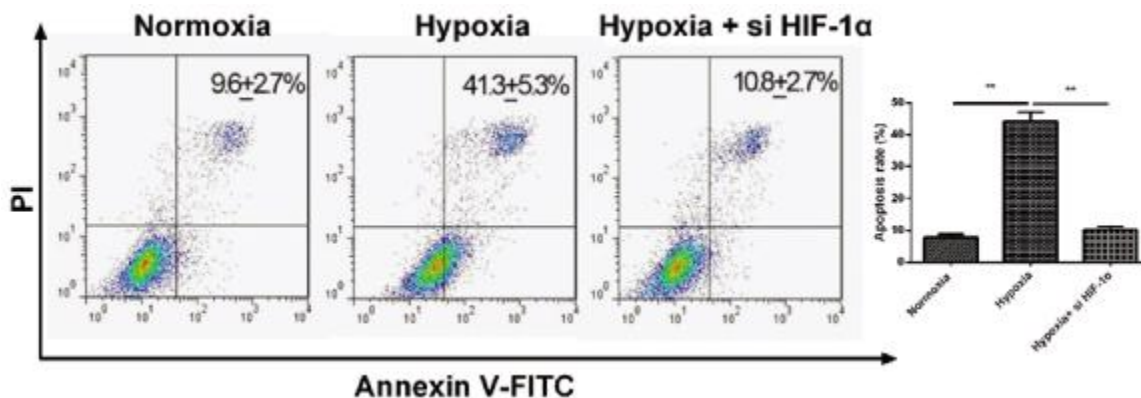


图6 HIF-1 α siRNA 靶向沉默 HIF-1 α 逆转低氧诱导的细胞凋亡增加

Fig.6 HIF-1 α siRNA reverses hypoxia-induced apoptosis of rat brain vascular endothelial cells

缺血性脑卒中发生后局部脑组织存在缺血缺氧的代谢应激微环境。HIF-1 是一种在缺氧环境下激活的关键缺氧应答因子,由一个 α 亚基和一个 β 亚基组成。 β 亚基的表达稳定,而 α 亚基的表达收到细胞氧浓度的密切调控。在常氧条件下,其 C 末端 ODD 上的脯氨酸 402、564 位点被脯氨酸羟化酶羟化,羟基化的 HIF-1 α 通过与 von Hippel-Lindau 蛋白结合,再与泛素蛋白结合形成复合体,HIF-1 α 被泛素化,并经泛素连接酶复合通路降解。低氧环境下,羟基化被抑制,使 HIF-1 α 降解受阻,从而激活下游靶基因的表达^[21-23]。既往研究表明缺血性脑卒中组织中的 HIF-1 α 表达存在显著上调^[24,25]。低氧可诱导局部细胞和组织通过血管内皮生长因子表达增高、无氧代谢等途径增加局部氧供给和减少氧消耗,使之产生适应性调节反应^[26]。然而,缺血性脑卒中患者若短时间内无法实施溶栓和介入再通手术,缺血缺氧微环境的持续存在会导致脑血管内皮细胞凋亡增加、增殖抑制和结构破坏,加重梗死部位病变。在这一过程中 HIF-1 α 的异常高表达也可能是缺氧微环境下细胞凋亡增加和增殖抑制过程中的一个重要媒介。有学者发现 HIF-1 α 敲除的转基因小鼠在缺氧环境下脑细胞的凋亡显著降低,HIF-1 基因敲除小鼠对缺氧引起的脑细胞损伤有保护作用,这提示 HIF-1 在诱导神经元凋亡中起作用,而敲除该基因则对脑细胞损伤有保护作用^[27]。HIF-1 α 可能通过以下机制来发挥对脑细胞的损伤作用:①激活下游凋亡相关基因如 Bax、caspase-1、caspase-3、Nip3 等^[28];②与 p53 基因结合形成 HIF-1 α /p53 复合物,稳定 p53 基因表达从而增加细胞凋亡^[29];③诱导多种炎症因子的分泌如:环氧酶 2(COX-2)、白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)^[30]。

在本实验中,我们首先从 SD 大鼠脑组织中分离提取了原代大鼠脑微血管内皮细胞。随后通过体外模拟低氧微环境来进一步验证了其在大鼠脑微血管内皮细胞增殖与凋亡水平的影响。与常氧相比,低氧微环境能够抑制细胞增殖和促进凋亡,且 HIF-1 α 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高,提示 HIF-1 α 的异常激活可能参与低氧环境下大鼠脑微血管内皮细胞的增殖抑制和凋亡增加过程。为了明确 HIF-1 α 在其中的作用机制。我们采用 HIF-1 α siRNA 来靶向沉默其表达,并进一步检测其对细胞增殖和凋亡的影响。研究结果显示在阻断 HIF-1 α 基因之后,低氧对细胞的增殖抑制和促进凋亡现象被逆转,表明沉默 HIF-1 α 能够发挥细胞保护作用。基于以上研究,我们推测体外低氧微环境通过上调 HIF-1 α 信号通路的表达来抑制大鼠脑微血管内皮细胞的增殖和促进其凋亡,而沉默 HIF-1 α 可部分逆转低氧的作用。

综上,缺氧微环境能够通过上调 HIF-1 α 的表达抑制大鼠脑微血管内皮细胞增殖并促进其凋亡,这一研究发现将有助于进一步了解缺血性脑卒中过程中增殖与凋亡异常的病理生理过程。

参考文献(References)

- [1] Radak D, Katsiki N, Resanovic I, et al. Apoptosis and Acute Brain Ischemia in Ischemic Stroke [J]. *Current vascular pharmacology*, 2017, 15(2): 115-122
- [2] Adil M M, Beslow L A, Qureshi A I, et al. Hypertension is Associated With Increased Mortality in Children Hospitalized With Arterial Ischemic Stroke [J]. *Pediatric neurology*, 2016, 56: 25-29
- [3] Wang H, Chen Y, Guo X, et al. Usefulness of cardiometabolic index for the estimation of ischemic stroke risk among general population in rural China [J]. *Postgraduate medicine*, 2017, 129(8): 834-841
- [4] Hao Y, Yang D, Wang H, et al. Predictors for Symptomatic Intracranial Hemorrhage After Endovascular Treatment of Acute Ischemic Stroke [J]. *Stroke*, 2017, 48(5): 1203-1209
- [5] Yin X, Yang T, Gong Y, et al. Determinants of Emergency Medical Services Utilization Among Acute Ischemic Stroke Patients in Hubei Province in China [J]. *Stroke*, 2016, 47(3): 891-894
- [6] Rodrigo R, Fernandez-Gajardo R, Gutierrez R, et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities [J]. *CNS & neurological disorders drug targets*, 2013, 12 (5): 698-714
- [7] Cevik O, Adiguzel Z, Baykal A T, et al. The apoptotic actions of platelets in acute ischemic stroke [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(12): 6721-6727
- [8] Pirzad Jahromi G, Shabanzadeh Pirsaraei A, Sadr S S, et al. Multipotent bone marrow stromal cell therapy promotes endogenous cell proliferation following ischemic stroke [J]. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 2015, 42(11): 1158-1167
- [9] Nathaniel T I, Williams-Hernandez A, Hunter A L, et al. Tissue hypoxia during ischemic stroke: adaptive clues from hypoxia-tolerant animal models[J]. *Brain research bulletin*, 2015, 114(1-12): 1-12
- [10] Luo L, Chen D, Qu Y, et al. Association between hypoxia and perinatal arterial ischemic stroke: a meta-analysis [J]. *PloS one*, 2014, 9(2): e90106
- [11] De Georgia M A. Brain Tissue Oxygen Monitoring in Neurocritical Care[J]. *Journal of intensive care medicine*, 2015, 30(8): 473-483
- [12] Hummler N, Schneider C, Giessel A, et al. Acute hypoxia modifies regulation of neuroglobin in the neonatal mouse brain[J]. *Experimental neurology*, 2012, 236(1): 112-121
- [13] Prabhakar N R. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics [J]. *The Journal of physiology*, 2013, 591(9): 2245-2257
- [14] Cassavaugh J, Lounsbury K M. Hypoxia-mediated biological control [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 735-744
- [15] Sierra C. Essential hypertension, cerebral white matter pathology and ischemic stroke [J]. *Current medicinal chemistry*, 2014, 21 (19): 2156-2164
- [16] Fernandez-Lopez D, Natarajan N, Ashwal S, et al. Mechanisms of perinatal arterial ischemic stroke [J]. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2014, 34(6): 921-932
- [17] Xing C, Arai K, Lo E H, et al. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke [J]. *International journal of stroke: official journal of the International Stroke Society*, 2012, 7(5): 378-385
- [18] Jacquin G J, Van Adel B A. Treatment of acute ischemic stroke: from fibrinolysis to neurointervention [J]. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 2015, 13 Suppl 1(4): 290-296
- [19] Widimsky P, Koznar B, Stetkarova I. Modern treatment of acute ischemic stroke[J]. *Vnitřní lékařství*, 2014, 60(12): 1086-1089
- [20] Gortler M, Oldag A, Brejova A. Ischemic stroke--diagnosis and treatment [J]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS*, 2014, 49(6): 388-394

(下转第 257 页)

素对屎肠球菌均敏感,大肠埃希菌对碳青霉烯类及加 β -内酰胺酶抑制剂的抗菌药物敏感率为100%,肺炎克雷伯杆菌则对庆大霉素敏感性最高,其次为碳青霉烯类。过去对于尿路感染推荐的喹诺酮类及头孢类药物对上述常见细菌敏感性较差。有报道肠球菌、真菌等条件致病菌的感染日益严重,多与机体主动防御机制的削弱相关^[7],可能与抗生素的大量使用、免疫抑制剂、介入操作等因素相关。因而目前临床培养得到的细菌谱可能与以往有较大改变,需引起相关重视。

综上,上尿路感染、泌尿系统梗阻是尿脓毒症发生的危险因素,尿脓毒症患者相较于非脓毒症患者炎症指标、肌酐、D-二聚体、APACHE II 评分水平更高,白蛋白、血小板及 Glasgow 评分更低,肾功能障碍与凝血功能障碍在尿脓毒症患者中更多见。临床需对中段尿培养肠球菌阳性的患者引起重视。

参考文献(References)

- [1] Nici Markus Dreger, Stephan Degener, et al. Urosepsis—Etiology, Diagnosis, and Treatment [J]. *Deutsches Ärzteblatt International*, 2015, (112): 837-848
- [2] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810
- [3] Katsumi Shigemura, Kazushi Tanaka, Kayo Osawa, et al. Clinical factors associated with shock in bacteremic UTI [J]. *Int Urol Nephrol*, 2013, 45: 653-657
- [4] Shigemura K, Arakawa S, Tanaka K, et al. Clinical investigation of isolated bacteria from urinary tracts of hospitalized patients and their susceptibilities to antibiotics[J]. *Infect Chemother*, 2009, 15: 18-22
- [5] Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, et al. Sepsis: a roadmap for future research[J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15: 581-614
- [6] Fry DE. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues[J]. *Am Surg*, 2012, 78(1): 1-8
- [7] Florian ME Wagenlehner, Christoph Lichtenstern, Caroline Rolfes, et al. Diagnosis and management for urosepsis [J]. *Urology*, 2013, (20): 963-970
- [8] Xin-Hua Qiang, Tie-Ou Yu, Yi-Nan Li, et al. Prognosis risk of urosepsis in critical care medicine: a prospective observational study [J]. *BioMed Research International*, 2016, 9028924
- [9] Fukashi Yamamichi, Katsumi Shigemura, Koichi Kitagawa, et al. Shock due to urosepsis: A multicenter study [J]. *Can Urol Assoc J*, 2017, 11(3-4): E105-109
- [10] 李莉,辛晓妮.血清降钙素原、C 反应蛋白对尿路感染的诊断价值[J]. *山东医药*, 2013, 53(21): 40-42
- [11] 李亚莉,李志军,王东强,等.毛细血管渗漏综合征的治疗进展[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21(1): 77-78
- [12] 谢志超,廖雪莲,康焰.脓毒症相关性脑病的诊疗与研究新进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2015, 15(6): 609-613
- [13] Boffa JJ, Arendshorst WJ. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 117-124
- [14] Alexander Zarbock, Hernando Gomez, John A Kellum. Sepsis-induced AKI revisited: pathophysiology, prevention and future therapies[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2014, 20(6): 588-595
- [15] Chih-Yen Hsiao, Huang-Yu Yang, Meng-Chang Hsiao, et al. Risk Factors for Development of Acute Kidney Injury in Patients with Urinary Tract Infection[J]. *PLOS ONE*, 2015 10(7): 1-11
- [16] Rachele P, Davis, Sarah, Miller-Dorey, et al. Platelets and coagulation in infection [J]. *Clinical & Translational Immunology*, 2016, (5): E89
- [17] Sacha F de Stoppelaar, Cornelis van't Veer, Tom van der Poll. The role of platelets in sepsis [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2014, (112): 666-677
- [18] 高延民,刘红云,张弛,等.感染相关性血小板减少症 273 例临床分析[J]. *血栓与止血学*, 2014, 20(4): 159-163
- [19] 刘芳,周玉宝,马岚,等.尿路感染患者病原菌分布与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(19): 4396-4403
- [20] Gloria Córdoba, Anne Holm, Frank Hansen, et al. Prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from patients with suspected urinary tract infection in primary care, Denmark[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2017, 17: 670
- [21] Kumar H, Choi D K. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: A Cell Survival Pathway? [J]. *Mediators of inflammation*, 2015, 58 (3): 47-58
- [22] Corcoran A, O'Connor J J. Hypoxia-inducible factor signalling mechanisms in the central nervous system [J]. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 2013, 208(4): 298-310
- [23] Greer S N, Metcalf J L, Wang Y, et al. The updated biology of hypoxia-inducible factor[J]. *The EMBO journal*, 2012, 31(11): 2448-2460
- [24] Kasivisvanathan V, Shalhoub J, Lim C S, et al. Hypoxia-inducible factor-1 in arterial disease: a putative therapeutic target [J]. *Current vascular pharmacology*, 2011, 9(3): 333-349
- [25] Shi H. Hypoxia inducible factor 1 as a therapeutic target in ischemic stroke[J]. *Current medicinal chemistry*, 2009, 16(34): 4593-600
- [26] Lukianova L D. Current issues of adaptation to hypoxia. Signal mechanisms and their role in system regulation [J]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*, 2011, 12 (2): 3-19
- [27] Dong Y, Li Y, Feng D, et al. Protective effect of HIF-1 α against hippocampal apoptosis and cognitive dysfunction in an experimental rat model of subarachnoid hemorrhage [J]. *Brain research*, 2013, 15 (17): 114-121
- [28] Greijer A E, Van Der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(10): 1009-1014
- [29] Amelio I, Melino G. The p53 family and the hypoxia-inducible factors (HIFs): determinants of cancer progression [J]. *Trends in biochemical sciences*, 2015, 40(8): 425-434
- [30] Palazon A, Goldrath A W, Nizet V, et al. HIF transcription factors, inflammation, and immunity[J]. *Immunity*, 2014, 41(4): 518-528

(上接第 226 页)