维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0089-03

低分子肝素在缺氧复氧条件下对内皮细胞的保护作用

龙 健[1], 曾 智[2]

(1.重庆医科大学临床学院内分泌科,重庆 400016;2.四川大学华西医院心内科,四川成都 600041)

【摘 要】目的:本实验旨在讨论低分子肝素是否能在缺氧及缺氧复氧的条件下保护内皮细胞的功能。方法:脐静脉内皮细胞株 ECV304 接种于 6 孔板,分为常氧、缺氧、缺氧复氧 3 种不同条件培养,常氧为 1、24h,缺氧为 1h,缺氧 1h 后分别复氧 6h 和 24h,常氧均为对照组,缺氧及缺氧复氧两种条件下又各分两亚组:低分子肝素组(5U/ml)和对照组。取各时点各组上清液以比色法测定一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)的含量,放免法测定内皮素(ET)的含量。结果:缺氧及缺氧复氧刺激 ECV304 生成 MDA 且使 NO 分泌减少而 ET 生成增加,缺氧复氧较单纯缺氧作用更强,但两种条件下低分子肝素均可抑制 MDA 和 ET 的生成,促进 NO 的生成。结论:不论是缺氧还是缺氧复氧条件下,低分子肝素均可减少 MDA 生成,避免氧自由基损伤脐静脉内皮细胞,保护脐静脉内皮细胞功能。

【关键词】低分子肝素;缺氧复氧;内皮细胞

【中国图书分类法分类号】R966 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-07-12

Low molecular weight heparin (LMWH) protect vascular endothelial cells in hypoxia-reoxygenation condition

LONG JIAN, et al

(*Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate whether LMWH can protect the function of umbilical cells in hypoxia and hypoxia-reoxygenation conditions. *Methods*: Human umbilical vein endothelial cells,—ECV304, were planted into 6-well dishes, then cultivated respectively in three conditions: normal, hypoxia and hypoxia-reoxygenation conditions. Cells were grown for 1 hour in hypoxia condition; reoxygenated for 6 or 24 hours after 1 hour hypoxia, respectively. Cells in hypoxia and hypoxia-reoxygenation conditions were divided into two subgroups: LMWH group (5IU/ml) and control group. At each end of incubation time the medium was removed from each well. NO and MDA were measured by chromatometry. ET were measured by radioimmunoassay. *Results*: There was a decrease in the biosythesis and release of NO, while an increase of MDA and ET in hypoxia and hypoxia-reoxygenation conditions. The effect in hypoxia-reoxygenation condition was more remarkable than in hypoxia condition. But in both conditions LMWH could inhibit the productions of MDA and ET, increase the productions of NO. *Conclusion*: In hypoxia and hypoxia-reoxygenation conditions, LMWH can inhibit the production of MDA, and protect endothelial cells from oxygen free radicals.

【Key words】Low molecular weight heparin (LMWH); Hypoxia-reoxygenation; Endothelial cell/Endothelium

肝素作为抗凝剂开始应用于临床,至今已有 70 多年历史。70 年代末,受右旋糖苷的启发开发了低分子肝素(Low moliculer weight heparin, LMWH),低分子肝素抗凝作用强,皮下注射易于吸收,副作用小,使用安全方便,对某些疾病的防治已取代了肝素的应用。低分子肝素作为抗凝剂广泛应用于临床治疗血栓形成性疾病。近年来国内外研究发现肝素具有众多非抗凝活性,如调节免疫、调节血脂、抗炎和保护内皮细胞[1]。那么,低分子肝素是否也具有类似的非抗凝活性呢?目前还知之甚少,尤其是在缺氧及缺氧复氧条件下低分子肝素是否可以作用于内皮细胞调节并保护内皮细胞的功能还未有研究。故本实验将就低分子肝素是否可以在缺氧及缺氧复氧条件下调节内皮依赖的血管舒缩功能的问题进行研究,以进一步揭示低分子肝素的非抗凝药理作用。

1 材料和方法

作者介绍:龙 健(1977-),女,住院医师,
主要研究方向:糖尿病与心血管疾病

维普资讯 http://www.cqvip.co

1.1 ECV304 细胞培养

ECV304 复苏，接种于 50ml 培养瓶内，待生长铺满后传代。传代时，先弃去培养液，用预热的 PBS 液清洗 2 次，加入消化液，刚好形成一浅层液面覆盖细胞，室温下消化，显微镜下见细胞收缩变圆，细胞间隙增宽后，立即翻转培养瓶，弃去消化液，用 PBS 液轻轻清洗 2 次，加入新鲜培养液，轻轻吹打细胞，调整细胞密度接种于培养瓶内，2～3 天换液 1 次，待传代 2－3 代后，用于实验。

1.2 缺氧复氧模型的建立[2,3]

接种于 6 孔板中，待生长成单层后，换为无血清的 DMEM 培养液，培养 24h，24h 后加入干预因素并将培养板置于一可密闭容器中，向该容器持续通入缺氧混合气（含 5%$CO_2$95%N_2）置换容器中的氧气，监测该容器内氧含量，低于 1%后停止通入缺氧混合气，密闭该容器，置于 37℃的 CO_2 恒温孵箱内培养，1h 后打开该密闭容器，将 6 孔板置于常氧环境 37℃、5%CO_2、95%空气的 CO_2 恒温孵箱内培养。

1.3 实验分组

实验分为以下几组，各组均设 4 个复孔。

常氧对照组：脐静脉内皮细胞静置后常氧条件下分别培养 1、24h。

缺氧对照组：脐静脉内皮细胞静置后缺氧培养 1h。

缺氧＋LMWH 组：脐静脉内皮细胞静置后加入 5U/ml 低分子肝素，其他条件与缺氧组相同，缺氧培养 1h。

缺氧复氧组：脐静脉内皮细胞静置后，缺氧 1h 后分别复氧 6、24h。

缺氧复氧＋LMWH 组：脐静脉内皮细胞静置后加入 5IU/ml 的低分子肝素，其他条件与缺氧复氧组相同，缺氧 1h 后分别复氧 6、24h。

1.4 指标测定

1.4.1 NO 测定 利用硝酸还原酶特异性将 NO_3^- 还原为 NO_2^-，通过显色深浅测定 NO_2^- 浓度的高低，反映 NO 的量。NO 单位：μmol/ml。

1.4.2 MDA 测定 过氧化脂质降解产物中的丙二醛（MDA）可与硫代巴比妥酸（TBA）缩和，形成红色产物，在 532nm 处有最大吸收峰，利用比色法可测定 MDA 的含量。MDA 单位：nmol/ml。

1.4.3 ET 测定 采用放射免疫分析技术，测定 ET 的含量。ET 单位：pg/ml。

1.5 统计方法

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用均数比较的 t 检验，相关性分析采用直线相关分析。取 $P<0.05$ 为有统计学意义。统计学处理采用 SPSS10.0 软件包进行

2 结 果

从表 1 中可见

（1）缺氧及缺氧复氧对内皮细胞功能的影响

①与常氧 1h 相比，缺氧 1h 后内皮细胞 MDA 和 ET 产生增加，NO 分泌减少。

②缺氧 1h 复氧 6h 与单纯缺氧 1h 比较发现：复氧后内皮细胞 MDA、ET 的生成较单纯缺氧增加，分泌 NO 减少。

③与单纯缺氧 1h 及缺氧 1h 复氧 6h 比较，复氧 24h 后内皮细胞 MDA、ET 生成的量有所减少，NO 的分泌量有所增加。

④缺氧 1h 复氧 24h 后内皮细胞生成 MDA、ET 的量均较常氧 24h 为高，分泌 NO 的量较常氧 24h 为低。

（2）在缺氧及缺氧复氧条件下 LMWH（5IU/ml）对内皮细胞功能的影响

①缺氧 1h 及缺氧 1h 复氧 6h 时，可见低分子肝素组较未加入组，其培养液中 MDA、ET 产生减少，NO 分泌增加。

②而在缺氧 1h 复氧 24h 时，加入 LMWH 组与未加入组两组 NO 分泌量比较的 P 为 0.055，大于 0.05，无统计学差异。缺氧 1h 复氧 24h 时加入 LMWH 组与未加入组比较，MDA、ET 的分泌量有统计学差异。

（3）常氧 24h 时各指标均较常氧 1h 升高。

表 1 缺氧和缺氧复氧对内皮细胞的影响及 LMWH(5IU/ml)对内皮细胞的保护效应($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

	MDA	NO	ET
常氧 1h	0.82±0.08	33.41±1.82	1.53±0.22
常氧 24h	1.26±0.14$^{\triangle}$	83.3±0.92$^{\triangle}$	6.71±0.33a$^{\triangle}$
缺氧 1h	1.59±0.04$^{=}$	17.49±1.01$^{=}$	5.88±0.13$^{=}$
缺氧 1h＋LMWH	0.49±0.05^{0}	27.37±1.61^{0}	2.95±0.22^{0}
缺氧 1h 复氧 6h	8.52±0.16$^{*\triangle}$	11.56±2.51$^{*\triangle}$	9.44±0.36$^{*\triangle}$
缺氧 1h 复氧 6h＋LMWH	1.99±0.03^{0}	39.34±1.73^{0}	4.22±0.15^{0}
缺氧 1h 复氧 24h	3.16±0.05	57.02±5.17	8.35±0.26
缺氧 1h 复氧 24h＋LMWH	0.82±0.04^{0}	65.40±4.79^{0}	5.28±0.32^{0}

$^{=}P<0.05$ 与常氧 1h 比较；$^{*}P<0.05$ 与缺氧 1h 比较；$^{\triangle}P<0.05$ 与缺氧 1h 复氧 24h 比较；$^{0}P<0.05$ 各加入 LMWH 的组分别和与其相同条件的但未加入 LMWH 的组比较；

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

内皮依赖性的血管舒缩功能失调,即内皮源性的舒血管因子和缩血管因子的分泌调节功能失调是内皮功能异常和内皮细胞受损的主要特征,也是许多心血管疾病的基本病理表现,治疗性干预心血管系统的内分泌紊乱,使内皮源性的舒血管因子和缩血管因子处于相对平衡状态,能有效抑制血管心脏结构的重塑,明显改善高血压、动脉粥样硬化、心衰等严重威胁人类健康的心血管疾病的预后和生存质量[4]。

在缺氧及缺氧复氧中,内皮细胞是组织中受攻击的第一靶器官,其中内皮源性的舒血管因子和缩血管因子的分泌调节功能更是最先受损[5]。本实验也发现,缺氧 1h 内皮细胞分泌 NO 减少,ET 生成增加;复氧 6h 后 NO 分泌进一步减少,ET 生成进一步增加,说明缺氧损伤内皮,使内皮依赖性的血管舒缩功能紊乱,而复氧后进一步加重缺氧带来的损伤,且缺氧及缺氧复氧带来的损伤至少可持续至复氧后 6h,复氧 24h 后内皮依赖的血管舒缩活性有所恢复但未能完全恢复。氧自由基大量产生是目前公认的缺氧及缺氧复氧造成细胞损伤的主要机制之一[6]。本研究也发现,缺氧及缺氧复氧促使 MDA 大量生成,同时伴随内皮依赖的血管舒缩功能紊乱,在 MDA 生成量最大时(复氧 6h 时)紊乱也最严重。除氧自由基外,缺氧及缺氧复氧还可通过其他机制抑制内皮细胞 NO、ET 的生成。缺氧及缺氧复氧可直接作用于一氧化氮合成的限速酶——一氧化氮合酶(NOS),使其活性下降[7];还引起生成 NO 的底物 L-精氨酸大量耗竭,使 L-精氨酸跨膜转运障碍,使 NO 生成减少[8]。同样,缺氧及缺氧复氧可直接作用于 ET 基因,使 ET 转录增加;缺氧及缺氧复氧还刺激凝血系统,使凝血酶生成增加,通过凝血酶刺激 ET 大量生成[9,10]。同时实验发现低分子肝素在缺氧及缺氧复氧条件下均可保护内皮依赖的血管舒缩功能。探讨低分子肝素在缺氧及缺氧复氧情况下保护内皮依赖的血管舒缩功能的机制为:1)减少氧自由基,避免氧化损伤。我们的实验发现低分子肝素可减少 MDA 的生成,减轻氧化损伤。2)直接作用于内皮,调节内皮依赖的血管舒缩功能。我们的另一相关实验表明低分子肝素可直接作用于内皮细胞,调节内皮细胞分泌 NO 和 ET 的能力。

低分子肝素在临床上广泛应用于急性冠脉综合症的病人,但人们对他的了解仅仅局限于其抗凝机制上,通过本实验我们发现低分子肝素还可减少氧自由基的产生,减轻缺血再灌注损伤,同时保护内皮依赖的血管舒缩功能,减轻冠脉痉挛,可能与减少梗塞面积有关。

参 考 文 献

[1] 姬胜利、张天民. 肝素与低分子肝素的研究进展[J]. 中国生化药物杂志,1996;17(5):216-218.

[2] 王 涛,顾玉东,盛民立. 内皮细胞缺血的细胞模型[J]. 中华手外科杂志,1993;9:105-108.

[3] Lesniak, -W; Kolasinska-Kloch, -W; Kiec, -B. Vascular endothelium—function, disorders and clinical modification probes[J]. Folia-Med-Cracov, 2001;42(1-2):5-14.

[4] Lesniak, -W; Kolasinska-Kloch, -W; Kiec, -B. Vascular endothelium—function, disorders and clinical modification probes[J]. Folia-Med-Cracov, 2001;42(1-2):5-14.

[5] Peter, -CK; Young. -DK; et al. Heparin preserves nitric oxide activity in coronary endothelium during ischemia-reperfusion injury[J]. Ann-Thorac-Surg, 1998;Oct, 66(4):1210-1215.

[6] Li, -C; Jackson, -R-M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury[J]. Am-J-Physiol--Cell-Physiol, 2002 Feb;282(2):C227-241.

[7] Mcqullian LP, et al. Hypoixia inhibits expression of enos via transcription and posttranscriptional mechanisms[J]. AM J Physiol, 1994;267:H1921.

[8] Hecker M, et al. The mechanism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium derived factor, cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine [J]. ProcNatl Sci USA, 1990;87:8612.

[9] Medbo-S, Beisvag-V, Tollofsmd-P, et al. Attenuated endothelin-1 mRNA expression with endothelin-1 receptor blockade during hypoxaemia and reoxygenation in newborn piglets[J]. Acta-Paediatrica, -International-Journal-of-Paediatrics, 2000;89(6):698-702.

[10] Bodi, -I: Bishopric, -N-H; Discher, -D-J; et al. Cell-specificity and signaling pathway of endothelin-1 gene regulation by hypoxia[J]. Cardiovasc-Res. 1995 Dec;30(6):975-984.