DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.032
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
1590 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)17-1590-03

妊高征血清对脐静脉内皮细胞影响的研究

李 力[1],朱锡光[2],俞丽丽[1],易 萍[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042;[2]训练部,重庆 400038)

提 要:目的 利用妊高征患者血清致伤培养的正常脐静脉内皮细胞,观察致伤后内皮细胞分泌功能的变化。方法 培养后的脐静脉内皮细胞用中、重度妊高征患者的血清为干预条件,共同培养后,测定NO_2^-/NO_3^-、LDH、SOD、MDA的含量变化。结果 ①LDH的活性、MDA的含量:中、重度妊高征组24 h点及重度妊高征组12 h点均明显高于6 h时间点($P<0.05$),12、24 h两时间点均明显高于对照组相同时间点($P<0.05$);②SOD含量:重度妊高征组12、24 h点均明显低于6 h点($P<0.05$)。中、重度妊高征组24 h点及重度妊高征组12 h点均明显低于对照组相同时间点($P<0.05$);③NO_2^-/NO_3^-含量:中、重度妊高征组内24 h点均明显低于6 h点($P<0.05$)。中、重度妊高征组的24 h点及重度妊高征组12 h点均明显低于对照组相同时间点($P<0.05$)。结论 妊高征时存在着血管内皮细胞的损伤。

关键词:妊娠高血压综合征;内皮细胞;一氧化氮;丙二醛;超氧化物歧化酶
中图法分类号:R322.123;R329.25;R714.246 文献标识码:A

Effects of serum of pregnancy-induced hypertension on umbilical vein endothelial cells

LI Li[1], ZHU Xi-guang[2], YU Li-li[1], YI Ping[1]([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Surgerg Research, Daping Hospital, Chongqing 400042; [2]Division of Educational Affairs, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the changes in secretory functions of cultured umbilical vein endothelial cells injured by serum from pregnancy induced hypertension (PIH). Methods Endothelial cells isolated from the umbilical veins from moderate or severe PIH women (PIH group, $n=10$) and normal pregnant women (control group, $n=8$) were incubated at 37 ℃ in humidified air with 5% CO_2. Cell culture fluids were obtained at 3 and 4 d of primary culture. Contents of nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), lactate dehydrogenase (LDH) in the cell culture fluids were measured. Results LDH activity and MDA contents in the cell culture fluids in PIH group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). SOD activity and NO contents in the cell culture fluids in PIH group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). Conclusion Injury occurs in the umbilical vein endothelial cells from PIH.

Key words: pregnancy-induced hypertension; endothelial cell; nitric oxide; malondialdehyde; superoxide dismutase; lactate dehydrogenase

内皮细胞损伤被认为是妊娠高血压综合征(妊高征)发病机制中的一个重要环节,但其损伤机制目前仍不清楚。有研究表明妊高征患者外周血中舒血管因子一氧化氮(nitric oxide, NO)、纤维结合蛋白(fibronectin, Fn)有明显的改变[1~3],推测系内皮细胞损伤所致。本研究利用妊高征患者血清致伤培养的正常脐静脉内皮细胞,观察致伤后内皮细胞分泌功能的变化,探讨内皮细胞在妊高征发病机制中的作用。

基金项目:全军"八五"医学科技攻关课题(88032?9)
Supported by the Key Medical Sci &Tech Research Projects of the "Eighth Five-year Plan" of PLA (8803279)

作者简介:李 力(1955-),女,河北省青县人,博士,主任医师,教授 主要从事围产医学、不孕症方面的研究,发表论文50余篇,电话:(023)68757249

收稿日期:2003-07-08;修回日期:2003-10-09

1 资料与方法

1.1 血清采集

本例病历全部为我院1995年2月至1999年2月住院病人,中、重度妊高征患者各5例(按全国统一的诊断标准[4]),平均年龄(25.9±5.1)岁。于住院后治疗前采血5 ml,经1 000 r/min,10 min离心后,置于-70 ℃冰箱内待用。同期入院的正常妇女8例为对照组,采血时间均为未临产,入院待产的孕妇,取血量及处理同妊高征妇女。

1.2 细胞培养与鉴定[5]

1.2.1 脐带收集 选择正常晚孕妇女组5例,平均年龄(23.1±2.6)岁,均系同期本院住院分娩的健康孕妇。按无菌要求,于产后即取脐带,在2 h内作细胞培养。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.2　细胞培养　　无菌条件下, 取新生儿脐带 20 cm, 置于已经灭菌的D-Hanks液中保存。插入针头, 用 pH 7.4 的D-Hanks液重复冲洗脐静脉内的残血, 驱净液体, 注入 0.125% 胰蛋白酶 5 ml, 置于37 ℃水浴箱内, 消化5 min。将消化液倒入含有 20% 小牛血清 1640 培养液 5 ml 的尖底离心管内, 1 000× g 离心 10 min。弃上清后, 加入含有 20% 小牛血清 1640 培养液 2 ml, 用吸管轻轻吹打, 制成均匀的细胞悬液。按 9 滴细胞悬液中加入 1 滴 0.4% 台盼蓝染色, 吸管轻轻吹打使之均匀后, 计数活细胞数, 然后调整细胞浓度为 10^5 个/ml, 接种于 24 孔培养板上, 置 37 ℃, 5% CO_2 孵箱中孵育 24、48、72 h 分别换液 1 次, 培养 3 d 后细胞基本融合成单层, 即用于实验观察。

1.3　细胞鉴定

倒置显微镜下观察见培养细胞呈梭形或多边形, 排列呈鹅卵石或铺路石状。

在 4 ℃条件下, 以冷丙酮固定生长于盖玻片上的脐静脉内皮细胞 10 min。取出后, 用PBS (0.01 mol/L, pH 7.4)溶液漂洗 3 次, 待干后, 每片加入羊抗人ⅧR:Ag 血清(原液 1∶16 稀释)50 μl, 放入湿盒 37 ℃ 2 h。0.01 mol/L PBS 充分冲洗后, 加入适量猪抗羊 IgG-FITC (1∶8, 含 1/54 伊文思蓝的 PBS 稀释), 放入湿盒 37 ℃, 30 min, 充分冲洗, 吸干。用纯甘油及 PBS 液 1∶9 配制的缓冲液封片, 镜检。阴性对照将一抗改为 PBS 液, 余步骤同前。荧光显微镜光源为 HB0200, 激光片 BG12、2 mm× 2, 滤光片为 530 nm。

1.4　实验分组

将培养 3 d 已融合的脐静脉内皮细胞分为 3 个组: 正常对照组(C 组)、致伤Ⅰ组(Ⅰ组)、致伤Ⅱ组(Ⅱ组)。

C 组: 正常晚孕妇女血清加入等比例的新鲜 1640 全培养液。

Ⅰ组: 将中度妊高征血清按 1∶1 比例与 1640 全培养液混合后, 加入细胞培养孔内。

Ⅱ组: 将重度妊高征血清按 1∶1 比例与 1640 全培养液混合后, 加入细胞培养孔内。

将上述各组置入 37 ℃, 5% CO_2 孵箱中孵育, 分别于孵育 6、12、24 h 时间点收集细胞培养液标本, 保存于— 70 ℃冰箱备测。

1.5　观测指标

1.5.1　培养液 NO_2^-/NO_3^- 的测定 [1]　NO_2^-/NO_3^- 是 NO 代谢的终产物。由于 NO_2^- 极易被氧化成 NO_3^-, 故 NO 的代谢终产物以 NO_3^- 为主。NO_2^- 能对氨基苯磺酸反应, 生成化学发光物质, 易被敏感的方法测定。因而需要将 NO_3^- 还原为 NO_2^-。还原的有效方法是将待测标本进行镉过柱。

取待测细胞培养液 0.5 ml 过柱, 加入 3.5 ml 洗涤缓冲液洗涤。取过柱液 100 μl, 加 Griess 试剂 100 μl, 反应 15 min 后, 测定 540 nm 波长的光密度值。以 1～100 μmol/L $NaNO_2$ 为标准, 测定方法同上(不过柱)。求出还原曲线, 根据还原曲线计算出标本的 NO_2^- 值。还原曲线为: y= 10.843 49+ 849.829 3x。培养液中 NO 含量以 NO_2^-/NO_3^- 表示, 浓度单位为 μmol/L。

1.5.2　乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的测定　　按常规生化方法进行测定。

1.5.3　超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)的测定　　采用南京建成生物研究所的SOD 检测药盒, 严格按照其说明书进行测定。

1.6　统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对 t 检验。由 SPSS 8.0 统计学软件行方差分析及均数间的多重比较。

2　结果

2.1　各组间细胞培养液中 LDH 活性的变化

组内比较, C 组各时间点间无明显差别($P>0.05$); Ⅰ组、Ⅱ组 24 h 点及Ⅱ组 12 h 点均明显高于 6 h 时间点($P<0.05$)。各组间比较, 6 h 点各组间无明显差别($P>0.05$), Ⅰ组及Ⅱ组的 12、24 h 两时间点均明显高于 C 组相同时间点($P<0.05$); Ⅰ组与Ⅱ组比较, 各时间点间无显著性差别($P>0.05$), 见表 1。

表 1　各组间 LDH 活性的变化

Tab 1　Changes of LDH activity in each group

Group	n	6 h	12 h	24 h
Control	8	109.53±23.16	116.26±24.92	111.18±18.47
Ⅰ	5	129.46±21.38	163.41±31.57▲	185.39±37.61▲▲★
Ⅱ	5	134.52±34.19	194.25±42.35▲▲★	214.14±40.84▲▲★

▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$, *vs* control; ★: $P<0.05$ *vs* 6 h

2.2　各组间细胞培养液中 MDA 含量的变化

组内比较, C 组内各时间点间无明显差别($P>0.05$); Ⅰ组及Ⅱ组内 24 h 点均明显高于 6 h 点($P<0.05$)。各组间比较, 6 h 点各组间无明显差别($P>0.05$); Ⅰ组及Ⅱ组的 12、24 h 两时间点均明显高于 C 组相同时间点($P<0.05$); Ⅰ组与Ⅱ组比较, 各时间点间无显著性差别($P>0.05$), 见表 2。

表 2　各组间 MDA 含量的变化

Tab 2　Changes of MDA content in each group

Group	n	6 h	12 h	24 h
Control	8	5.31±1.25	4.48±1.39	4.58±0.92
Ⅰ	5	6.05±0.84	6.95±1.43▲	7.81±1.08▲▲★
Ⅱ	5	6.28±1.16	8.16±2.06▲▲	10.61±2.57▲▲★★

▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$, *vs* control; ★: $P<0.05$ ★★: $P<0.01$, *vs* 6 h

2.3　各组间细胞培养液中 SOD 活性的变化

组内比较, C 组及Ⅰ组内各时间点间无明显差别($P>0.05$); Ⅱ组 12、24 h 两时相点均明显低于 6 h 点($P<0.05$)。各组间比较, 6 h 点各组间无明显差别($P>0.05$); Ⅰ组及Ⅱ组的 24 h 点及Ⅱ组 12 h 点均明显低于 C 组相同时间点($P<0.05$); Ⅰ组与Ⅱ组比较, 各时间点间无显著性差别($P>0.05$), 见表 3。

表 3　各组间 SOD 活性的变化

Tab 3　Changes of SOD activity in each group

Group	n	6 h	12 h	24 h
Control	8	122.67±37.84	131.54±31.37	138.69±32.75
Ⅰ	5	116.81±32.35	95.39±28.16	80.04±22.62▲
Ⅱ	5	103.40±23.72	64.86±20.46▲▲★	51.76±18.46▲▲★★

▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$, *vs* control; ★: $P<0.05$ ★★: $P<0.01$, *vs* 6 h

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 各组间细胞培养液中 NO_2^-/NO_3^- 含量的变化

组内比较，C组内各时间点间无明显差别（$P>0.05$）；Ⅰ组及Ⅱ组内24 h点均明显低于6 h点（$P<0.05$）。各组间比较，6 h点各组间无明显差别（$P>0.05$），Ⅰ组及Ⅱ组的24 h点及Ⅱ组12 h点均明显低于C组相同时间点（$P<0.05$）；Ⅰ组与Ⅱ组比较，各时间点间无显著性差别（$P>0.05$），见表4。

表4 各组间 NO_2^-/NO_3^- 含量的变化（μmol/L，$\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Changes of NO_2^-/NO_3^- content in each group（μmol/L，$\bar{x}\pm s$）

Group	n	6 h	12 h	24 h
Control	8	4.58±1.04	5.21±0.98	5.38±1.55
Ⅰ	5	4.32±0.84	4.05±1.01	3.02±0.76▲★
Ⅱ	5	4.13±1.14	3.05±0.61▲▲	2.16±0.71▲▲★

▲：$P<0.05$，▲▲：$P<0.01$，*vs* control；★：$P<0.05$，*vs* 6 h

3 讨论

血管内皮细胞功能紊乱被认为是对妊高征时病理改变的特征之一，妊高征的典型临床表现高血压、水肿、蛋白尿均与血管内皮细胞功能的改变有关[1,2]。近年来，妊高征内皮细胞的研究取得了许多的进展。Lockwood等[6]发现先兆子痫患者血浆纤维连接蛋白的浓度显著高于正常孕妇；并且血浆Fn浓度的升高出现在先兆子痫的症状之前。Seligman等[1]结果证实妊高征患者外周血中NO含量较正常晚孕妇女明显降低。我们的研究结果[2]也显示妊高征时子宫及胎盘组织，以及胎儿脐血中NO的含量较正常晚孕时明显降低。Fn是目前公认的内皮细胞损伤的生化指标之一，而NO的代谢与内皮细胞的功能密切相关，因而这些研究结果间接地证明了妊高征时存在着内皮细胞的损伤或/和功能障碍。

本研究通过体外培养的方法，观察到妊高征组脐静脉内皮细胞培养液中LDH活性和MDA含量较正常妊娠组均显著升高，SOD活性和NO含量却明显降低。LDH是糖酵解酶，当细胞受到损伤时可释放出来，损伤越重所释放的量越多。MDA是反映体内氧自由基（O_2^-）活性最重要的指标之一[7]，其含量的增加意味着细胞内O_2^-活性的升高。而SOD的主要作用是清除O_2^-[8]，其活性的降低必致O_2^-清除能力的下降，使细胞内的O_2^-含量增加。O_2^-极易与NO生成过氧亚硝基阴离子$ONOO^-$[9]。O_2^-及$ONOO^-$均是氧化作用很强的自由基，它对靶细胞具有明显的毒性作用，造成细胞功能障碍，终致内皮细胞的损伤。同时，因细胞功能下降致NO合成减少，加之O_2^-与NO生成$ONOO^-$大量消耗NO，故致内皮细胞内舒血管因子NO的含量显著降低。由于内源性NO合成及释放能力下降，使血管平滑肌细胞鸟苷酸环化酶活性降低，cGMP合成减少，蛋白激酶C磷酸化作用增强，引起一系列生物学效应[10]，使Ca^{2+}内流增强，细胞内质网储存的Ca^{2+}释放增加，胞内Ca^{2+}排出减少，造成胞浆游离Ca^{2+}浓度升高；同时收缩蛋白对Ca^{2+}的敏感性也增强，从而导致血管平滑肌收缩，张力增加，体循环血压升高[11]。

因此，作者认为妊高征时存在着血管内皮细胞的损伤，细胞内O_2^-的增加是内皮细胞损伤的原因之一，调节血管内皮细胞功能基因的改变，可能在妊高征的发病中起一定的作用[12]。

参考文献：

[1] Seligman S P, Buyon J P, Clancy R M, *et al*. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 1994, 171(4): 944－948.

[2] 李 力，陈竹钦. 一氧化氮与妊高征关系的研究[J]. 中华妇产科杂志，1996，31(8)：454－457.

[3] De-Jager C A, Shephard E G, Robson S C, *et al*. Degradation of fibronectin in association with vascular endothelial disruption in preeclampsia[J]. J Lab Clin Med, 1995, 125(4): 522－530.

[4] 乐 杰. 妇产科学[M]. 第5版. 北京：人民卫生出版社，2000. 114－116.

[5] 安 静. 胎儿脐静脉内皮细胞培养[J]. 第三军医大学学报，1990，12(3)：222－224.

[6] Lockwood C J, Peters J H. Increased plasma levels of ED1+ cellular fibronectin precede the clinical signs of preeclampsia[J]. Am J Obstet Gynecol, 1990, 162(2): 358－362.

[7] Twardowska Saucha K, Grzeszczak W, Lacka B, *et al*. Lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity and trace element concentration in II and III trimester of pregnancy in pregnant women with diabetes[J]. Pol Arch Med Wewn, 1994, 92(4): 313－321.

[8] 陈竹钦，汪江淮. 不同类型新生儿全血SOD活性变化的临床观察[A]. 丁克祥 主编. SOD临床研究集[M]. 北京：原子能出版社，1992. 247－249.

[9] Haddad I Y, Pataki G, Hu P, *et al*. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury[J]. J Clin Invest, 1994, 94(6): 2407－2413.

[10] 李 力，朱锡光. 妊娠高血压综合征研究进展[J]. 重庆医学，2002，31(9)：882－884.

[11] Henderson A H, Lewis M J, Shah A M, *et al*. Endothelium, endocardium, and cardiac contraction[J]. Cardiovasc Res, 1992, 26(4): 305－308.

[12] 俞丽丽，李 力. 肾素-血管紧张素系统基因与妊娠高血压综合征的新进展[J]. 生殖与避孕，2003，23(1)：46－49.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net