

本文引用: 穆亚萌, 江湧, 徐文仓. 缺氧损伤对人脐静脉内皮细胞抗氧化能力、 $\text{Ca}^{2+}$  依赖的三磷酸腺苷酶活性、 $\text{Ca}^{2+}$  浓度及线粒体膜电位的影响[J]. 新乡医学院学报 2016, 33(9): 752-756. DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.09.003.

【基础研究】

## 缺氧损伤对人脐静脉内皮细胞抗氧化能力、 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖的三磷酸腺苷酶活性、 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度及线粒体膜电位的影响

穆亚萌<sup>1</sup>, 江湧<sup>2</sup>, 徐文仓<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院实验中心, 广东 广州 510405)

**摘要:** 目的 探讨缺氧损伤对离体培养的人脐静脉内皮细胞( ECV304) 抗氧化能力、 $\text{Ca}^{2+}$  依赖的三磷酸腺苷酶(  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) 活性、线粒体膜电位( MMP) 和细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度等的影响。方法 将 ECV304 细胞分为正常组和缺氧组。正常组用无血清培养基培养, 缺氧组用连二亚硫酸钠(  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) 孵育 ECV304 细胞 5 h, 建立缺氧损伤模型。倒置显微镜下观察 2 组细胞形态的变化, 细胞计数试剂盒( CCK-8) 检测细胞活性, 流式细胞仪测定细胞周期、细胞凋亡、细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度及 MMP 的变化, 化学比色法检测超氧化物歧化酶( SOD) 活性、谷胱甘肽( GSH) 和丙二醛( MDA) 含量、一氧化氮( NO) 分泌量及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性。结果 正常组细胞贴壁良好, 细胞饱满、排列紧密, 透明度好; 缺氧组细胞出现皱缩, 细胞间排列疏松、紊乱。缺氧组细胞吸光度值为  $0.91 \pm 0.12$ , 低于正常组的  $1.30 \pm 0.25$  ( $P < 0.05$ )。缺氧组  $G_0/G_1$  期细胞所占比例为  $(88.53 \pm 1.36)\%$ , 高于正常组的  $(81.27 \pm 0.25)\%$  ( $P < 0.05$ ); S 期细胞所占比例为  $(5.17 \pm 0.21)\%$ , 低于正常组的  $(6.07 \pm 0.25)\%$  ( $P < 0.05$ ); 缺氧组细胞凋亡率为  $(19.75 \pm 0.81)\%$ , 高于正常组的  $(9.83 \pm 1.77)\%$  ( $P < 0.05$ )。正常组 MDA、GSH 含量, 一氧化氮( NO) 分泌量, SOD、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性分别为  $(0.40 \pm 0.23)$ 、 $(3.85 \pm 0.18)$ 、 $(14.21 \pm 0.39) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(64.61 \pm 0.05) \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(18.90 \pm 1.09) \text{ U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ ; 缺氧组以上各指标分别为  $(1.65 \pm 0.24)$ 、 $(3.34 \pm 0.13)$ 、 $(78.70 \pm 5.29) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(35.33 \pm 0.04) \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(5.80 \pm 0.31) \text{ U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ ; 与正常组相比, 缺氧组细胞 SOD 活性、GSH 含量及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性均降低, MDA 含量增加, NO 分泌量升高 ( $P < 0.05$ )。缺氧组细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度为  $(572.82 \pm 49.40)\%$ , 高于正常组的  $(505.97 \pm 19.40)\%$  ( $P < 0.05$ )。缺氧组细胞 MMP 为  $(182.07 \pm 6.00)\%$ , 低于正常组的  $(217.60 \pm 16.40)\%$  ( $P < 0.05$ )。结论  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  作用于 ECV304 细胞引起细胞缺氧损伤, 其机制可能与 MMP 降低、细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高和细胞抗氧化能力及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性减弱相关。

**关键词:** 缺氧; ECV304 细胞; 氧自由基; 钙离子浓度; 线粒体膜电位

中图分类号: R543 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2016)09-0752-05

### Effect of hypoxia on antioxidative capacity, $\text{Ca}^{2+}$ adenosine triphosphate enzyme activity, $\text{Ca}^{2+}$ concentration and mitochondrial membrane potential in ECV304 cells

MU Ya-meng<sup>1</sup>, JIANG Yong<sup>2</sup>, XU Wen-cang<sup>1</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; 2. Department of Experimental Center, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of hypoxia on antioxidant capacity,  $\text{Ca}^{2+}$  adenosine triphosphate enzyme (  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) activity,  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and mitochondrial membrane potential( MMP) of ECV304 cells cultured *in vitro*.

**Methods** ECV304 cells were divided into normal group which cultured in serum-free culture medium and hypoxia group which were cultured in  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  for 5 hours to establish hypoxic injury model. Then the change of cell morphology in the two groups was observed by inverted microscope; the cytoactive was evaluated by cell counting kit-8( CCK-8) ; the cellcycle, apoptosis, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and MMP were assayed by flow cytometry; the activity of superoxide dismutase( SOD) and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and the content of glutathione ( GSH), malondialdehyde ( MDA), nitric oxide ( NO) secretion were measured by chemical colorimetry method. **Results** The cells in normal group were well adherent, full of luster, closely spaced and highly pellucidity; while the cells in hypoxia group appeared shrunken and cell arranged loosely disorder. The value of absorbance in

DOI: 10.7683/xyxyxb.2016.09.003

收稿日期: 2016-01-19

作者简介: 穆亚萌(1991-), 女, 河南漯河人, 硕士研究生在读, 研究方向: 创新药物筛选与开发。

通信作者: 江湧(1968-), 女, 山西太原人, 博士, 副研究员, 主要从事中药学及临床药理学研究; E-mail: drjiangyong@163.com。

hypoxia group and normal group was  $0.91 \pm 0.12$ ,  $1.30 \pm 0.25$  respectively; the value of OD in hypoxia group was significantly lower than that in normal group ( $P < 0.05$ ). The proportion of  $G_0/G_1$  and S phase cells in normal group was  $(81.27 \pm 0.25)\%$ ,  $(6.07 \pm 0.25)\%$ ; which in hypoxia group was  $(88.53 \pm 1.36)\%$ ,  $(5.17 \pm 0.21)\%$ ; the proportion of  $G_0/G_1$  phase cells was significantly higher and the S phase cells was significantly lower than that in normal group ( $P < 0.05$ ). The cell apoptosis rate in hypoxia group  $[(19.75 \pm 0.81)\%]$  was significantly higher than that in normal group  $[(9.83 \pm 1.77)\%]$  ( $P < 0.05$ ). The content of MDA and GSH, the content of NO secretion, the activity of SOD and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in normal group was  $(0.40 \pm 0.23)$ ,  $(3.85 \pm 0.18)$ ,  $(14.21 \pm 0.39) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(64.61 \pm 0.05) \times 10^3 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(18.90 \pm 1.09) \text{U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$  respectively; the above indexes in hypoxia group was  $(1.65 \pm 0.24)$ ,  $(3.34 \pm 0.13)$ ,  $(78.70 \pm 5.29) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(35.33 \pm 0.04) \times 10^3 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $(5.80 \pm 0.31) \text{U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$  respectively. Compared with normal group, the content of MDA and content of NO secretion were increased ( $P < 0.05$ ); the activity of SOD,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and the content of GSH were decreased ( $P < 0.05$ ) in hypoxia group. The fluorescence intensity of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in hypoxia group  $[(572.82 \pm 49.40)\%]$  was significantly higher than that in normal group  $[(505.97 \pm 19.40)\%]$  ( $P < 0.05$ ). The MMP in hypoxia group  $[(182.07 \pm 6.00)\%]$  was significantly lower than that in normal group  $[(217.60 \pm 16.40)\%]$  ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** The hypoxia injury of ECV304 cells being induced by  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  is related with the decreasing of MMP and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and the increasing of the intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  and antioxidant capacity.

**Key words:** hypoxia; ECV304 cells; oxygen radicals;  $\text{Ca}^{2+}$ ; mitochondrial membrane potential

人脐静脉内皮细胞 (ECV304) 为生物医学和药学研究的一般模型工具,自 1990 年发现以来已经得到广泛应用<sup>[1]</sup>。尽管 ECV304 作为内皮细胞领域的研究对象广受争议,但其在细胞信号转导和肿瘤的代谢等方面仍有一定的应用价值<sup>[2-3]</sup>。缺氧是导致血管性疾病的重要原因之一,多种血管疾病均存在缺氧状态<sup>[4]</sup>。血管内皮细胞损伤是诸多血管病理性疾病重要病理生理学基础<sup>[5-7]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  是细胞内的重要信使,也是参与细胞代谢的重要元素。钙超载被认为是引起细胞损伤的“最后共同通路”,也是细胞损伤的重要标志之一<sup>[8-11]</sup>。细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度由三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶依赖性钙泵等通道调控<sup>[12]</sup>。正常的线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 是维持线粒体进行氧化磷酸化、产生 ATP 的先决条件, MMP 的稳定有利于维持细胞的正常生理功能和保护细胞结构<sup>[13-14]</sup>。近年来研究发现,多种细胞在不同因子作用下发生凋亡时均伴有 MMP 的下降<sup>[15-17]</sup>。

缺氧是导致血管内皮细胞损伤的极为常见的病理因素。目前,关于缺氧对 ECV304 细胞抗氧化能力及细胞能量代谢的影响报道较少。本研究观察 ECV304 细胞缺氧时细胞形态结构及活性、抗氧化能力及  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的 ATP 酶 ( $\text{Ca}^{2+}$ -adenosine triphosphatase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) 活性、MMP 及细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的变化,以期丰富 ECV304 细胞缺氧损伤的机制研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 ECV304 细胞由广州医科大学第二附

属医院惠赠。特级胎生牛血清、培养基、胰蛋白酶为上海 Invitrogen 生物工程公司产品;一氧化氮 (nitric oxide, NO) 测定试剂盒购自深圳市晶美生物工程公司;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程公司; DNA 凋亡检测试剂盒、碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 购自美国 Beckman Coulter 公司;细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自日本同仁 Dojindo 公司;  $\text{Ca}^{2+}$  浓度检测试剂盒 Fluo3-AM 购自美国 BioRad 公司; MMP 检测试剂盒 Rh123 购自上海 Biochemicals 公司;流式细胞仪配套 EXPO 32 采集分析软件, MultiCycle 分析软件购自美国 Beckman coulter 公司;酶标仪 Multiskan MK3 购自美国 Thermo 公司;倒置显微镜购自美国 Thermo 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及分组** ECV304 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清的高糖达尔伯克改良伊格培培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM),  $37^\circ\text{C}$ , 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养,待细胞培养至对数生长期时,消化离心,重悬成单细胞悬液,按  $10^7 \text{L}^{-1}$  接种于 96 孔板或  $10^8 \text{L}^{-1}$  接种于 24 孔板,于  $37^\circ\text{C}$ , 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养。细胞培养至对数生长期,弃培养基。将细胞分为正常组和缺氧组,正常组用无血清培养基培养,缺氧组参照顾俊菲等<sup>[18]</sup>的方法,加入含  $10 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  连二亚硫酸钠 (natrium hydrosulfurosum,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) 的无血清

培养基,培养 5 h。每组 8 孔,实验重复 3 次。

**1.2.2 形态学观察** 倒置显微镜下观察 2 组细胞形态,待细胞损伤程度达到约 80% 时,拍照记录。

**1.2.3 细胞活性检测** 96 孔板培养细胞至对数生长期时,每孔加入含有 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 的培养基 100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后,450 nm 波长处检测细胞液的吸光度(A)值。CCK-8 试剂能被细胞线粒体中的脱氢酶还原成具有高度水溶性的橙黄色甲臍物,生成的甲臍物的数量与活细胞的数量成正比,A 值越大,培养液颜色越深,表明活细胞数量越多,可通过 A 值反应细胞活性<sup>[19]</sup>。

**1.2.4 细胞周期及凋亡检测** 收集细胞,制成单细胞悬液,1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,弃去培养液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗 2 次,加入体积分数 70% 乙醇 4  $^{\circ}\text{C}$  固定 24 h,用 PBS 洗 2 次,分别加入 RNA 酶、PI,放置 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中避光显色 25 min,用流式细胞仪对细胞周期进行检测,Multi-Cycle 软件分析细胞周期及凋亡。

**1.2.5 抗氧化指标及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性检测** 收集细胞液,按照试剂盒说明书指引,检测 2 组细胞液 SOD 活性、GSH 和 MDA 含量、NO 分泌量及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性变化,酶标仪读取 A 值。样品 NO 分泌量 =  $(A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) / (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

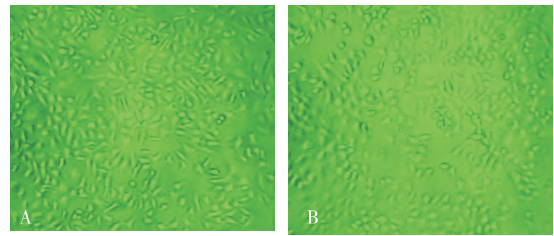
**1.2.6 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  测定**  $1 \times 10^7 \text{L}^{-1}$  的细胞悬液加 Fura-3/AM(终浓度 5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),37  $^{\circ}\text{C}$  恒温振荡 45 min。PBS 洗 2 次,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6 \text{L}^{-1}$ 。流式细胞仪测定单个细胞的荧光强度值,每份标本测 10 000 个细胞,其平均荧光强度值为测定值,用以反映  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化。

**1.2.7 缺氧对细胞 MMP 的影响** 收集细胞,PBS 洗 2 次。加入 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Rh123 于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 去除 Rh123,PBS 洗 2 次,重悬细胞,流式细胞仪检测 ECV304 细胞 MMP 水平,结果以平均荧光值表示。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 12.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,2 组间比较采用独立样本  $t$  检验  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞形态学观察** 结果见图 1。正常组细胞贴壁良好,细胞饱满、排列紧密,透明度好;缺氧组细胞出现皱缩,细胞间排列疏松、紊乱。



A: 正常组; B: 缺氧组。

图 1 2 组细胞形态观察(倒置显微镜,  $\times 40$ )

Fig. 1 Cytomorphology of two groups (inverted microscope,  $\times 40$ )

**2.2 缺氧对细胞活性的影响** 缺氧组细胞 A 值为  $0.91 \pm 0.12$ , 低于正常组的  $1.30 \pm 0.25$ , 差异有统计学意义( $t = 3.671$ ,  $P < 0.05$ )。

**2.3 缺氧损伤对 ECV304 细胞周期及凋亡的影响**

结果见表 1。缺氧组  $G_0/G_1$  期细胞所占比例高于正常组, S 期细胞所占比例低于正常组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ); 缺氧组细胞凋亡率高于正常组( $P < 0.05$ )。

表 1 缺氧损伤对 ECV304 细胞周期及凋亡的影响

Tab. 1 Effect of hypoxia on cell cycle and apoptosis of ECV304 cells ( $n = 8 \bar{x} \pm s$ )

组别	$G_0/G_1$ 期/%	S 期/%	凋亡率/%
正常组	$81.27 \pm 0.25$	$6.07 \pm 0.25$	$9.83 \pm 1.77$
缺氧组	$88.53 \pm 1.36^a$	$5.17 \pm 0.21^a$	$19.75 \pm 0.81^a$

注:与正常组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 缺氧对 ECV304 细胞抗氧化指标以及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的影响** 结果见表 2。与正常组比较, 缺氧组细胞 SOD 活性、GSH 含量及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性均降低, MDA 含量增加, NO 分泌量升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 缺氧对 ECV304 细胞抗氧化能力及  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的影响

Tab. 2 Effect of hypoxia on antioxidant capacity and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in ECV304 cells ( $n = 8 \bar{x} \pm s$ )

组别	SOD/ ( $10^3 \text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	MDA/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	GSH/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	NO/ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase/ ( $\text{U} \cdot \text{mgprot}^{-1}$ )
正常组	$64.61 \pm 0.05$	$0.40 \pm 0.23$	$3.85 \pm 0.18$	$14.21 \pm 0.39$	$18.90 \pm 1.09$
缺氧组	$35.33 \pm 0.04^a$	$1.65 \pm 0.24^a$	$3.34 \pm 0.13^a$	$78.70 \pm 5.29^a$	$5.80 \pm 0.31^a$

注:与正常组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

**2.5 缺氧对细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响** 缺氧组  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度为  $(572.82 \pm 49.40)\%$ , 高于正常组的  $(505.97 \pm 19.40)\%$ , 差异有统计学意义( $t = 2.519$ ,  $P < 0.05$ )。

**2.6 缺氧对 MMP 的影响** 缺氧组细胞 MMP 为  $(182.07 \pm 6.00)\%$ , 低于正常组的  $(217.60 \pm 16.40)\%$ , 差异有统计学意义( $t = 3.524$ ,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

ECV304 细胞是缺血缺氧中多种损伤因子的重要靶点, ECV304 细胞受损也是缺血缺氧病理变化过程中的关键环节<sup>[20-21]</sup>。本研究以 ECV304 细胞为研究对象, 从不同层面探讨其对细胞的影响。

CCK-8 法是一种替代噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 检测细胞活性的方法, 可直接将检测剂加入原培养液中, 省去了 MTT 法在吸出培养液时脱落细胞一并被吸出的可能性, 操作更加简便、灵敏度高、重复性好的细胞活性检测方法。本研究提示, 缺氧损伤造成了细胞活性降低, 这与 XU 等<sup>[22]</sup>的结果一致。

细胞周期不同时间点的转换, 由细胞内部机制调控, 一般调控点在  $G_0/G_1$  期和 S 期。当细胞受到外界刺激时, 一般表现为  $G_1$  停滞, S 期细胞减少<sup>[23]</sup>。本研究中, 缺氧组  $G_0/G_1$  期细胞比正常组增多, S 期细胞减少, 细胞凋亡率升高, 表明缺氧通过抑制细胞由  $G_1$  期进入 S 期导致损伤, 进而引起凋亡。

SOD 为体内主要的氧自由基清除酶, 是机体防御氧化损伤的抗氧化酶体系的一部分<sup>[24]</sup>, 能反映机体内源性抗氧化能力。本研究中, 缺氧组 SOD 活性比正常组下降, 提示细胞缺氧时, 组织中清除氧自由基的酶活性降低, 抗氧化酶系的保护作用减弱, 氧化抗氧化之间的平衡遭到破坏, 从而使细胞膜和生物大分子等受到攻击, 与 ZHANG 等<sup>[25]</sup>的结论一致。GSH 为机体内自由基防御系统中一种重要的生物大分子, 能有效清除生物氧化产生的自由基, 维持细胞内环境稳定, 使组织免受自由基损害<sup>[26]</sup>。本研究结果显示, 缺氧组细胞的 GSH 含量比正常组降低, 表明缺氧导致机体清除氧自由基的能力下降, 细胞受到损害, 与 MÁRCIO 等<sup>[27]</sup>在对蟹由于缺氧复氧形成的抗氧化防御系统的研究结论一致。MDA 是脂质过氧化反应产物之一, 可反映脂质过氧化的程度<sup>[28]</sup>。细胞缺氧时, 活性氧爆发性产生, 组织清除氧自由基的能力下降, 氧自由基堆积, 细胞会由于膜脂质过氧化而损伤。本研究中, 缺氧组 MDA 含量比正常组增加, 提示缺氧后, 细胞脂质过氧化程度加重, 细胞出现损伤, 与 HUANG 等<sup>[29]</sup>研究结论相符。机体内 NO 具有双重作用, 正常情况下, 细胞能分泌一定量的 NO 来维持生理状态, 当细胞受到刺激后, NO 大量产生, 与氧离子生成亚硝酸盐和自由基, 加重组织和细胞损伤<sup>[30]</sup>。本研究中, 缺氧组 NO 分泌量比正常组高, 提示缺氧导致 ECV304 细胞 NO 分

泌量显著增加, 细胞受到损伤。以上研究结果表明, 缺氧能引起细胞抗氧化能力减弱, 进而导致损伤, 与文献<sup>[31-32]</sup>报道结论一致。

正常状态下, 细胞以有氧代谢为主。长期缺氧时, 机体产生氧化应激和炎症反应, 自由基显著增加, 机体内分子、细胞、器官等受到损伤, 使细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性降低。本研究中, 缺氧组  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性比正常组低, 表明细胞在缺氧状态下受到损伤, 与 CHIARELLO 等<sup>[33]</sup>结论一致。

线粒体是细胞生成 ATP 的主要场所<sup>[34]</sup>, 其除了可促进细胞能量转换外, 还参与细胞凋亡。线粒体在呼吸氧化过程中, 将所产生的能量以电化学势能储存于线粒体内膜, 在内膜两侧造成质子及其他离子浓度的不对称分布而形成 MMP。本研究结果显示, 缺氧组 MMP 较正常组显著下降, 提示缺氧损伤可能引起 MMP 下降, 这样不利于细胞维持正常的生理功能和结构, 与辛晓蓉等<sup>[35]</sup>和 POPOVA 等<sup>[36]</sup>研究结果一致。 $\text{Ca}^{2+}$  是细胞内最重要的信号分子之一, 生理状态下主要参与细胞的能量代谢, 在缺氧状态下可以通过钙信号系统的调控, 以便细胞对缺氧作出适应性调整<sup>[37-38]</sup>。本研究显示, 缺氧组细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度显著高于正常组, 提示缺氧后, 细胞受到损伤,  $\text{Ca}^{2+}$  大量内流, 导致细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加<sup>[39]</sup>。因此, 钙超载是缺氧对细胞损伤的环节之一, 也是细胞凋亡的关键信号。

总之, 缺氧可引起 ECV304 细胞抗氧化能力减弱,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性降低,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高及 MMP 降低。

### 参考文献:

- [1] TAKAHASHI K, SAWASAKI Y, HATA J, *et al.* Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, 26(1): 265-274.
- [2] DREXLER H G, QUENTMEIER H, DIRKS W G, *et al.* Bladder carcinoma cell line ECV304 is not a model system for endothelial cells [J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002, 38(4): 185-186.
- [3] KRUSE C, KURZ A R, PÁLFI K, *et al.* Polarity protein scrib facilitates endothelial inflammatory signaling [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(9): 1954-1962.
- [4] CHATTERJEE S S. Venous ulcers of the lower limb: where do we stand [J]. *Indian J Plast Surg*, 2012, 45(2): 266-274.
- [5] TANG Q. Changes of human umbilical venous endothelium due to different degree ischemia-reperfusion injury and the interventional effect of qinglailing [J]. *中国临床康复*, 2005, 9(29): 199-201.
- [6] 邓水秀, 潘伟男. 天然药物与血管内皮细胞的研究概况 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2015, 15(5): 694-696.
- [7] ZHANG J, DENG H, LIU L, *et al.*  $\alpha$ -Lipoic acid protects against

- hypoxia/reoxygenation-induced injury in human umbilical vein endothelial cells through suppression of apoptosis and autophagy [J]. *Mol Med Rep* 2015, 12(1): 180-186.
- [8] GENIUS J, GEIGER J, BENDER A *et al.* Creatine protects against excitotoxicity in an *in vitro* model of neurodegeneration [J]. *PLoS One* 2012, 7(2): e30554.
- [9] VANNUCCI R C, BRUCKLACHER R M, VANNUCCI S J. Intracellular calcium accumulation during the evolution of hypoxic-ischemia brain damage in the immature rat [J]. *Brain Res Dev Brain Res* 2001, 126(1): 117-120.
- [10] STANIKA R I, PIVOVAROVA N B, BRANTNER C A *et al.* Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106(24): 9854-9859.
- [11] 田云云, 刘智智, 张婷. 胞浆型肌酸激酶 cDNA 的克隆及其对兴奋毒性神经细胞钙超载的保护作用 [J]. *生物物理学报*, 2015, 31(2): 105-115.
- [12] 江小萍, 李海全, 潘少霞, 等. 三七总皂苷对缺氧再给氧血管内皮细胞钙离子浓度及肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性的影响 [J]. *中华中医药学刊* 2011, 29(4): 758-760.
- [13] 陈慧莉. 线粒体跨膜电位和细胞凋亡相关性的研究 [J]. *医学综述* 2007, 13(14): 41-43.
- [14] HE X, BI X Y, LU X Z *et al.* Mitochondria-endoplasmic reticulum interactions by acetylcholine protects human umbilical vein endothelial cells from hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015, 35(7): 1623-1634.
- [15] HAEBERLEIN S L. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death [J]. *Neurochem Res* 2004, 29(3): 521-530.
- [16] GALLUZZI L, MORSELLI E, KEPP O *et al.* Targeting postmitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection [J]. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1787(5): 402-413.
- [17] LI M M, WU L Y, LEI T Z *et al.* The protective role of 5-HMF against hypoxic injury [J]. *Cell Stress Chaperones* 2011, 16(3): 267-273.
- [18] 顾俊菲, 封亮, 袁嘉瑞, 等. 赤芍总苷、川芎总酚酸组分组成结构对缺氧损伤人脐静脉内皮细胞的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(5): 920-926.
- [19] 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较 [J]. *激光生物学报* 2007, 16(5): 559-562.
- [20] ENDEMANN D H, SCHIFFRIN E L. Endothelial dysfunction [J]. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15(8): 1983-1992.
- [21] VALUJSKIKH A, HEEGER P S. Emerging roles of endothelial cells in transplant rejection [J]. *Curr Opin Immunol* 2003, 15(5): 493-498.
- [22] XU T X, ZHAO S Z, DONG M *et al.* Hypoxia responsive miR-210 promotes cell survival and autophagy of endometrial cells in hypoxia [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016, 20(3): 399-406.
- [23] GRAEBER T G, OSMANIAN C, JACKS T *et al.* Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours [J]. *Nature* 1996, 379(6560): 88-91.
- [24] 薛大喜, 张毅, 杜玲玲, 等. 超氧化物歧化酶与年龄相关性白内障关系的研究 [J]. *眼科新进展* 2013, 33(8): 740-742.
- [25] ZHANG Y Y, ZHOU H F, YANG J H *et al.* Effects of Danhong injection and its main components on anticoagulation and fibrinolysis in cultured vein endothelial cells [J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(4): 276-283.
- [26] KASTRUG A, THOMAS C, HARTMANN C *et al.* Cerebral blood flow and  $\text{CO}_2$  reactivity in interictal migraineurs: a transcranial Doppler study [J]. *Headache* 1998, 38(8): 608-613.
- [27] MÁRCIO A G, MARCELO A V, FÁBIO E M *et al.* Effects of hypoxia and reoxygenation on the antioxidant defense system of the locomotor muscle of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae) [J]. *J Comp Physiol B* 2016. [Epub ahead of print].
- [28] 秦波, 成洪波, 黄丽娜, 等. 牵拉性视神经损伤后视神经中 MDA、SOD 水平的改变 [J]. *眼科新进展* 2007, 27(4): 283-284.
- [29] HUANG H, LAI S, WAN Q *et al.* Astragaloside IV protects cardiomyocytes from anoxia/reoxygenation injury by upregulating the expression of Hes1 protein [J]. *Can J Physiol Pharmacol* 2016, 94(5): 542-553.
- [30] 张铭, 黄跃生, 张琼. 不同浓度 NO 对缺氧心肌细胞损害的影响 [J]. *第三军医大学学报* 2007, 29(11): 1017-1019.
- [31] 郭斌, 范钦华, 牛超, 等. 缺氧条件下移植培养视网膜分泌 NO、ET-1 和 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  的变化 [J]. *眼科新进展* 2010, 30(1): 24-27.
- [32] 王晓丽, 李玉梅, 张大方. 附子人参不同配伍比例对缺糖缺氧/复糖复氧损伤大鼠心肌细胞的保护作用 [J]. *中国新药与临床药理* 2015, 26(2): 148-152.
- [33] CHIARELLO D I, MARIN R, PROVERBIO F *et al.* Effect of hypoxia on the calcium and magnesium content, lipid peroxidation level, and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of syncytiotrophoblast plasma membranes from placental explants [J]. *Biomed Res Int* 2014, 2014: 597357.
- [34] 朱宏伟, 张晶. 运动性心肌肥厚与病理性肥厚大鼠模型中线粒体膜电位的差异 [J]. *新乡医学院学报* 2015, 32(8): 718-721.
- [35] 辛晓蓉, 巩天祥. 缺氧对脑脊液-视神经屏障中脑膜上皮细胞内质网和线粒体膜电位的影响 [J]. *眼科新进展* 2014, 34(11): 1009-1012.
- [36] POPOVA T G, MILLIS B, CHUNG M C *et al.* Anthrolysin O and fermentation products mediate the toxicity of *Bacillus anthracis* to lung epithelial cells under microaerobic conditions [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011, 61(1): 15-27.
- [37] PARK S I, PARK E J, KIM N H *et al.* Hypoxia delays the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  clearance by  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in human adult cardiac myocytes [J]. *Yonsei Med J* 2001, 42(3): 333-337.
- [38] 陈红勤, 陈鹏慧. 缺氧对大鼠心肌细胞钙通道的影响 [J]. *高原医学杂志* 2001, 11(2): 12-15.
- [39] WAN J, YAMAMURA A, ZIMNICKA A M *et al.* Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2 [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013, 305(2): L154-L164.

(本文编辑: 孟月 英文编辑: 孟月)