

低分子肝素改善子痫前期中的内皮损伤的机制研究

邓乾葆^{1*}, 张忠霞¹, 王茹¹, 韦秋圆¹, 邓思思²

基金项目: 海南卫生计生行业科研项目(项目编号: 1801320712A2081)

作者单位: 1. 570311 海南 海口, 海南医学院第二附属医院产科; 2. 571100 海南 海口, 海南医学院基础医学院

作者简介: 邓乾葆, 毕业于海南医学院, 本科, 主治医师, 主要研究方向为产科

* 通信作者, E-mail: 94164133@qq.com

【摘要】目的 探讨低分子肝素对子痫前期(preeclampsia, PE)患者胎盘组织中血管内皮细胞的 Notch 信号通路配体 Delta 样配体 4(Delta-like ligand 4, DLL4)表达的影响, 及其对内皮细胞损伤的作用及相关机制。**方法** 选取 2018 年 3 月至 2019 年 4 月在海南医学院第二附属医院妇产科住院分娩的早发型重度 PE 患者 60 例, 按随机数字表法将其分为 PE 组(单用硫酸镁)与低分子肝素组(联合使用硫酸镁与低分子肝素), 各 30 例。选取同期正常妊娠剖宫产妇女 30 例为对照组。免疫组织化学法观察对比 3 组产妇胎盘组织中 DLL4 的表达水平; ELISA 检测 3 组孕产妇外周血中内皮损伤相关细胞因子内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)的表达; 体外培养脐静脉内皮细胞, 预先应用低分子肝素进行干预, 再应用 PE 患者血清进行刺激, TUNEL 染色, 内皮细胞通透性检测观察低分子肝素对 PE 血清诱导的内皮细胞凋亡, 内皮细胞完整性的影响; Western blot 检测低分子肝素对 PE 血清诱导的内皮细胞中凋亡蛋白 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 表达的影响, 并使用 Notch 信号通路阻滞剂 MK-0752 进行干预, 观察低分子肝素是否通过 Notch/DLL4 信号通路抑制 PE 血清诱导的内皮细胞凋亡。**结果** DLL4 主要表达于胎盘组织的血管内皮细胞中, 且与对照组(63.5%)相比, PE 组及低分子肝素组的胎盘组织中 DLL4 的表达阳性率(分别为 14.7%、36.9%)均明显更低, 而低分子肝素组较 PE 组中 DLL4 的表达明显更高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 与对照组相比, PE 组及低分子肝素组产妇血清中 ET-1、sVCAM-1 表达水平明显更高; 与 PE 组相比, 低分子肝素组产妇血清中上述细胞因子的表达水平明显更低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。预先使用低分子肝素处理可显著抑制 PE 血清诱导的内皮细胞凋亡, 并改善 PE 血清对其的通透性影响, 从而保护内皮细胞的完整性。Western blot 结果表明, 低分子肝素能够通过促进抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达, 抑制促凋亡蛋白 Bax、Cleaved caspase-3 的表达来改善 PE 血清对内皮细胞损伤, 而使用 Notch 信号通路抑制剂 MK-0752 能显著逆转低分子肝素对凋亡相关蛋白的上述影响。**结论** 联合使用低分子肝素能够通过促进胎盘组织内皮细胞中 DLL4 的表达, 其可能通过 Notch/DLL4 信号通路抑制内皮细胞的凋亡, 从而保护内皮细胞的完整性, 改善 PE 的临床预后。

【关键词】 子痫前期; 内皮损伤; 低分子肝素; DLL4

【中图分类号】 R 714.24⁺⁴

【文献标志码】 A

【文章编号】 1674-4020(2021)09-068-06

doi: 10.3969/j.issn.1674-4020.2021.09.17

Mechanism of low molecular heparin in improving endothelial injury in preeclampsia

Deng Ganbao^{1*}, Zhang Zhongxia¹, Wang Ru¹, Wei Qiuyuan¹, Deng Sisi²

1. Department of Obstetrics, Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou Hainan 570311; 2. School of Basic Medicine, Hainan Medical College, Haikou Hainan 571100, P. R. China

* Corresponding author, E-mail: 94164133@qq.com

[Abstract] Objective To explore the effect of low molecular weight heparin (LMWH) on the expression of Notch signaling pathway ligand DLL4 in vascular endothelial cells in the placenta tissue of patients with preeclampsia (PE), and its effect on endothelial cell damage and related mechanisms. **Methods** Selected 60 patients with early-onset severe PE who were hospitalized in the Department of Obstetrics and Gynecology of the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College from March 2018 to April 2019 were divided into the PE group (using magnesium sulfate alone) and the LMWH group (combined use of magnesium sulfate and LMWH) according to the random number table, with 30 cases in each group. 30 cases of normal pregnant women with cesarean section during the same period were selected as the control group. Immunohistochemical method was used to observe and compare the expression level of DLL4 in the placenta tissues of the three groups; ELISA was used to detect the expression of endothelial injury-related cytokine endothelin-1 (endothelin-1, ET-1) and soluble vascular cell adhesion molecules-1 (sVCAM-1) in the peripheral blood of the three groups. HUVEC was cultured in vitro, pre-intervention with LMWH, the effects of LMWH on endothelial cell apoptosis and integrity induced by PE serum were observed by stimulation, TUNEL staining and endothelial cell permeability test to observe the LMWH induced endothelial cell apoptosis and endothelial cell integrity. Western blot was used to detect the effect of LMWH on the expression of Bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 in endothelial cells induced by PE serum, and the Notch signal pathway blocker MK-0752 was used for intervention to observe whether LMWH can inhibit the apoptosis of endothelial cells induced by PE serum through the Notch/DLL4 signal pathway. **Results** DLL4 was mainly expressed in the vascular endothelial cells of the placenta tissue, and compared with the control group (63.5%), the positive rate of DLL4 expression in the placenta tissue of the PE group and the LMWH group (14.7%, 36.9%, respectively) was significantly decreased, and the expression of DLL4 in the LMWH group was significantly higher than that in the PE group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression levels of ET-1 and sVCAM-1 in the maternal serum of the PE group and the LMWH group were significantly increased; compared with the PE group, the expression levels of the above-mentioned cytokines in the maternal serum of the LMWH group were significantly reduced, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Pre-treatment with LMWH can significantly inhibit the apoptosis of endothelial cells induced by PE serum and improve the permeability of PE serum to protect the integrity of endothelial cells. Western blot results show that LMWH can improve the damage of PE serum to endothelial cells by promoting the expression of anti-apoptosis-related protein Bcl-2 and inhibiting the expression of pro-apoptotic proteins Bax and Cleaved caspase-3, while using Notch signaling pathway inhibitor MK-0752 can significantly reverse the above-mentioned effects of LMWH on apoptosis-related proteins. **Conclusion** The combined use of LMWH can promote the expression of DLL4 in placental endothelial cells, which may inhibit endothelial cell apoptosis through the Notch/DLL4 signaling pathway, thereby protecting the integrity of endothelial cells and improving the clinical prognosis of PE.

[Key words] preeclampsia; endothelial injury; low molecular weight heparin; DLL4

子痫前期 (preeclampsia, PE) 是妊娠期特有的疾病, 在妊娠妇女中的发病率约为 5% ~ 7%, 是导致孕产妇及新生儿死亡的主要原因之一^[1]。迄今为止, 其具体病因及发病机制尚未阐明, 主流观点认为胎盘发育不全、滋养细胞浸润异常、血管内皮细胞损伤、氧化应激、遗传和免疫等均参与调控 PE 的发生发展^[2-3]。其中全身血管内皮细胞的活化及功能障碍被认为是 PE 发病机制中重要因素之一。大量数据显示联合使用低分子肝素能够显著改善 PE 的临床预后^[4-8], 但关于低分子肝素对 PE 患者的血管内皮细胞保护机制尚无相关报道。Delta 样配体 4 (Delta-like ligand 4, DLL4) 属于 Notch 信号通路 Delta 样配体家族成员之一^[9]。既往研究发现, 唯一特异性存在于血管内皮细胞的 DLL4 配体能够通过 DLL4/Notch 信号通路影响血管生成, 并调控血管萌发及分支的形态^[10-13]。本实验通过观察 PE 患者在经低分子肝素联合硫酸镁治疗后胎盘组织中 DLL4 的变化以评价其对内皮细胞的影响及作用机制, 以期对 PE 孕妇的临床治疗提供理论依据及实验室基础。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

选取 2018 年 3 月至 2019 年 4 月在海南医学院第二

附属医院妇产科住院分娩的早发型重度 PE 患者 60 例, 按随机数字表法将其分为 PE 组与低分子肝素组, 各 30 例。两组明确 PE 诊断后 (诊断标准按照第 9 版《妇产科学》^[14]) 予以充分卧床休息及硫酸镁注射液 (辽宁齐齐, 国药准字 H20051795, 注射剂, 规格 10 mL: 2.5 g) 常规解痉, 减压治疗, 即首剂 20 mL 硫酸镁加入 10% 葡萄糖注射液 100 mL, 30 min 静脉快速滴注, 随后给予相同规格的硫酸镁 20 mL 加入 5% 葡萄糖注射液 500 mL 中, 2.0 g/h 静脉持续滴注。每个孕妇 24 h 硫酸镁总量不超过 30 g。低分子肝素组在此基础上每日经皮下注射 5 000 U 的低分子肝素钠 (齐鲁制药, 国药准字 H20030429, 注射剂, 规格 0.4 mL: 5 000 IU)。PE 组与低分子肝素组孕产妇至少连续上述治疗 5 天。选取同期因相对头盆不称行剖宫产的正常妊娠孕产妇 30 例为对照组。3 组孕产妇均为经腹剖宫产分娩, 并实时应用地塞米松促进胎肺成熟, 其一般临床资料比较详见 71 页表 1。

所有孕产妇均排除对肝素过敏及过敏体质者, 无合并原发性高血压、肝肾疾病、心脏疾病、糖尿病、甲状腺疾病、胎盘早剥、前置胎盘、自身免疫性疾病及经阴道分娩者, 且孕期末使用避孕药、免疫调节剂及其他激素类

药物,妊娠前或孕期末使用阿司匹林或低分子肝素者。本研究所有研究对象均签署知情同意书。

1.2 细胞系及主要试剂

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)购自中国科学院上海细胞库。RPMI1640、0.25%胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);胎牛血清(FBS)、青链霉素混合液(均为 100 U/mL)(杭州四季青生物公司);DAPI 试剂、Notch 信号通路抑制剂 MK-0752(美国 sigma 公司);TUNEL 凋亡检测试剂盒(美国 Roche 公司);检测 ET-1、sVCAM-1 的 ELISA 试剂盒(美国 BD 公司);兔抗 Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、GAPDH 单克隆抗体(美国 Abcam 公司);辣根过氧化酶标记(HRP)的山羊抗兔 IgG(广州晶彩);二胺基联苯胺(DAB)显色试剂盒(中杉金桥);其他试剂均为国产分析纯。电泳槽、电泳仪及化学发光荧光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 样本采集 于剖宫产手术当日采集 3 组产妇的晨起空腹肘静脉血 5 mL,1 200 rpm/min 离心 5 min 后收集血清,置于 -80℃ 冰箱中储存,以备后续实验使用;术中胎盘娩出后立即在无菌条件下于胎盘母体面取大小约 1 cm × 1 cm × 1 cm 蜕膜组织 5~10 块,置于预冷的无菌生理盐水中并迅速带回实验室,再次使用无菌生理盐水进行充分漂洗,以去除残存血迹,置于 4% 的多聚甲醛中进行固定。

1.3.2 免疫组织化学(immunohistochemical, IHC)染色

取固定于 4% 的多聚甲醛溶液中的胎盘组织,梯度酒精脱水,二甲苯透化,石蜡包埋后,切片至 4 mm 厚度,脱蜡水化后,应用柠檬酸缓冲液微波进行抗原修复,冷却至室温后,PBS 漂洗组织,加入 5% BSA 于室温下孵育 20 min 进行封闭,滴加适当稀释后的兔抗 DLL4 单克隆抗体(1:100)4℃ 过夜,次日于室温下复温 20 min,PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。再加入 HRP 标记的二抗,37℃ 恒温反应半小时,PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min。加 DAB 显色液显色(棕色),显微镜下观察,以及时终止显色。苏木精轻微复染,返蓝后,再次脱水,透化,中性树脂封片,显微镜下观察并参考相关文献^[15]进行结果判定及分析。

1.3.3 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测血清中内皮素-1、可溶性血管细胞黏附分子-1 表达水平 按照内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、可溶性血管细胞黏附分子-1(soluble vascular cell adhesion molecule-1, sVCAM-1)的 ELISA 试剂盒使用说明方法检测 3 组孕妇产妇血清中上述细胞因子表达水平。上述实验单独重复 3 次。

1.3.4 内皮细胞的培养及分组 常规复苏 HUVEC 后使用含 10% FBS、1% 青链霉素的 RPMI1640 培养基于

37℃、5% CO₂ 恒温培养箱进行培养。待细胞生长融合至 80%~90% 时用 0.25% 的胰酶进行消化传代。按实验目的并参考相关文献^[16-18]将内皮细胞分为 4 组:阴性对照(negative control, NC)组,正常培养,无任何特殊处理的 HUVEC;PE 血清组,使用含 20% PE 组孕产妇血清的 RPMI1640 培养基进行处理的 HUVEC;PE 血清组 + 低分子肝素组,使用含 20% PE 患者血清与 10 IU/mL 的 RPMI1640 培养基进行处理的 HUVEC;PE 血清组 + 低分子肝素组 + MK-0752 组,使用含 20% PE 患者血清与 10 IU/mL 及 25 μM 的 RPMI1640 培养基进行处理的 HUVEC。

1.3.5 TUNEL 染色检测凋亡 选取处于对数生长期的 HUVEC,常规消化后,细胞计数,取约 1 × 10⁵ 个细胞接种至 15 mm 的细胞爬片上,按上述条件于培养箱中培养 24 h 后,按方法 1.3.4 进行处理,并将细胞分为 NC 组,PE 血清组,PE 血清组 + 低分子肝素组,再次置于培养箱中培养 24 h 后,使用 4% 的多聚甲醛于室温下固定 30 min,PBS 轻轻洗涤细胞,根据 TUNEL 试剂盒使用说明方法进行染色,每张爬片滴加 50 μL 的 TUNEL 染色液,室温下避光孵育 1 h,PBS 充分洗涤后加入 DAPI 进行染核,PBS 再次洗涤细胞,最后加入封片液于荧光显微镜观察。

1.3.6 单层内皮细胞膜通透系数的检测 取生长状态良好的 HUVEC,计数后按 1 × 10⁵ 个/孔接种于 24 孔板的 Transwell 小室中,分别于上室及下室中加入 100 μL、600 μL 的 RPMI1640 培养液,于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养 24 h 待细胞生长融合至单层内皮细胞后,更换上、下室的培养液为不含 FBS 与酚红的 RPMI1640 培养液,培养 4 h 后进行透光性检测。按方法 1.3.4 中对 HUVEC 进行不同的分组处理,同时在上室加入 100 μL FITC 标记的葡聚糖 FD40(1 μg/mL),培养 5 min 后取下室培养液 200 μL 于荧光分光光度计中检测葡聚糖 FD40 的荧光强度作为基础值,下室中补充等体积的 RPMI1640。于培养箱中培养 24 h 时,再次取 200 μL 的下室培养液按上述方法检测葡聚糖 FD40 的荧光强度。每组设置 5 个复孔。应用各组最终检测值减去基础值作为葡聚糖 FD40 的荧光强度,计算分析各组细胞的葡聚糖 FD40 荧光强度值变化。

1.3.7 Western blot 实验 取方法 1.3.4 中不同处理的各组细胞,RIPA 细胞裂解液及蛋白酶抑制剂进行提取内皮细胞中的总蛋白。BCA 法进行蛋白定量,按照 1:4 向上清液中加入 5 × 上样缓冲液,并于沸水中加热变性 10 min。取 35 μg 的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳进行蛋白分离,采用湿转法将分离的蛋白转至 PVDF 膜上,5% 的脱脂牛奶于室温下封闭 2 h 后,分别加入 Bax(1:500)、Bcl-2(1:500)、Cleaved caspase-3(1:500)、GAPDH(1:1 000)一抗,4℃ 摇床孵育过夜。TBST 溶液清洗 3 次,5 min/次,以辣根酶标记的二抗

(1:5 000)室温孵育 1 h,以 TBST 溶液清洗 3 次,5 min/次。最后均匀滴加 ECL 发光液后于凝胶成像仪进行曝光拍照。Image J 软件测定条带灰度值,以目标蛋白与内参 GAPDH 的比值作为其相对含量。以上实验单独重复 3 次。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,所有数据在分析前均进行正态性检验,符合正态分布的计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验方差齐性后,采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行多组间分析,两组间比较采用独立样本 t 检验;非正态分布的计量资料以 $M(P25, P75)$ 表示,采用 Kruskai-Wallis 检验。显著性检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组产妇的一般情况比较

3 组产妇的年龄、孕周及体质质量指数比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),PE 组和低分子肝素组产妇的舒张压、收缩压、24 h 尿蛋白均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 3 组产妇的一般情况 ($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组 (30 例)	PE 组 (30 例)	低分子肝素组 (30 例)
年龄(岁)	26.57 \pm 0.27	27.24 \pm 0.58	26.32 \pm 0.13
孕周(周)	34.21 \pm 1.20	34.17 \pm 1.62	33.89 \pm 3.15
体质质量指数(kg/m ²)	21.13 \pm 3.31	22.27 \pm 2.47	21.87 \pm 4.62
舒张压(mmHg)	71.10 \pm 3.10	105.40 \pm 6.50 *	103.62 \pm 7.01 *
收缩压(mmHg)	108.24 \pm 4.10	152.17 \pm 8.90 *	149.31 \pm 10.57 *
尿蛋白(g/24 h)	0.16 \pm 0.09	3.41 \pm 0.55 **	3.09 \pm 0.83 **

注:与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.2 低分子肝素对子痫前期患者血清中 ET-1、sVCAM-1 表达的影响

与对照组相比,PE 组及低分子肝素组产妇血清中 ET-1、sVCAM-1 表达水平明显更高;与 PE 组相比,低分子肝素组产妇血清中上述细胞因子的表达水平明显更低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),详见表 2。

表 2 低分子肝素对 PE 患者血清中 ET-1、sVCAM-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ET-1 (ug/L)	sVCAM-1 (mg/L)
对照组	1.64 \pm 0.52	391.18 \pm 102.37
PE 组	7.71 \pm 1.19 *	876.09 \pm 153.10 *
低分子肝素组	3.86 \pm 0.65 **	511.43 \pm 127.83 **
F 值	27.31	157.40
P 值	0.024	< 0.001

注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与 PE 组相比,** $P < 0.05$ 。

2.3 低分子肝素对子痫前期患者胎盘组织中 DLL4 表达的影响

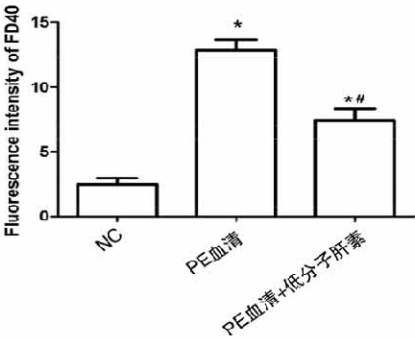
IHC 检测结果显示 DLL4 主要表达于胎盘组织的血管内皮细胞中,且与对照组 (63.5%) 相比,PE 组及低分子肝素组的胎盘组织中 DLL4 的表达阳性率 (分别为 14.7%、36.9%) 均明显更低 ($\chi^2 = 8.263, P = 0.031$),而低分子肝素组较 PE 组中 DLL4 的表达明显更高,差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 12.541, P = 0.027$),见图 1 (彩插 1)。

2.4 低分子肝素对子痫前期血清诱导的内皮细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果显示,与 NC 组相比,PE 血清组处理后内皮细胞的凋亡率明显更高 ($P < 0.05$),而与 PE 血清组相比,PE 血清 + 低分子肝素组的细胞凋亡率明显更低 ($P < 0.05$),见图 2 (彩插 1)。

2.5 低分子肝素对子痫前期血清诱导的内皮细胞完整性的影响

通过内皮细胞通透性试验来检测低分子肝素对 PE 血清诱导的内皮细胞的完整性影响,实验结果显示,与 NC 组相比,HUVEC 在 PE 血清处理 24h 后,细胞的通透性明显更高 ($P < 0.05$),而与 PE 血清组相比,PE 血清 + 低分子肝素组的细胞通透性明显更低 ($P < 0.05$),见图 3。



注:与 NC 相比,* $P < 0.05$;与 PE 血清组相比,** $P < 0.05$ 。

图 3 各组内皮细胞通透性改变

2.6 低分子肝素对子痫前期血清诱导的内皮细胞中凋亡蛋白表达的影响

应用 Notch 通路阻滞剂 MK-0752 检测低分子肝素是否主要通过 Notch/DLL4 信号通路发挥抗 PE 血清诱导的内皮细胞凋亡的作用,Western blot 实验检测不同处理情况下的 HUVEC 中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及 Cleaved-caspase-3 的表达,结果显示,与 NC 组相比,HUVEC 在 PE 血清处理后,细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显更低 ($P < 0.05$),而蛋白 Bax 及 Cleaved-caspase-3 的表达均明显更高 ($P < 0.05$);而与 PE 血清 + 低分子肝素组相比,PE 血清组与 PE 血清 + 低分子肝素 + MK-0752 组中抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显更低 ($P < 0.05$),Bax 及 Cleaved caspase-3 蛋白明显更高 ($P < 0.05$),见下页图 4。

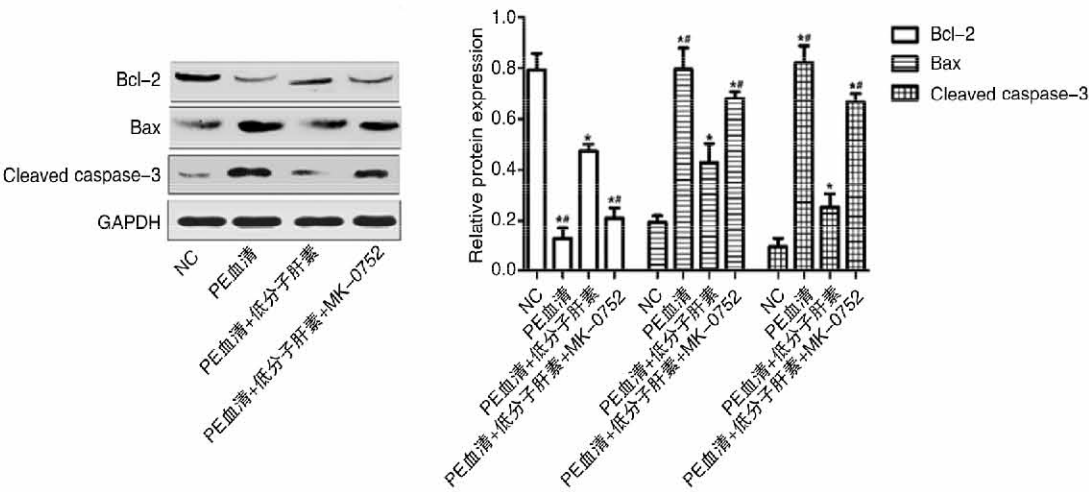


图4 低分子肝素通过 Notch/DLL4 信号通路抑制 PE 血清诱导的内皮细胞中凋亡蛋白

3 讨论

近年来,随着生活习惯的改变与妊娠平均年龄的不断增多,PE 的发生率也随之升高^[2]。低分子肝素因其具有抗炎、抗血栓、安全性较高等特点,理论上能够改善处于高凝、炎症因子大量释放及血管内皮受损的 PE 患者临床症状。同时,国内外大量研究证实对 PE 患者加用低分子肝素能够明显减少抽搐的发生,延长妊娠时间并改善预后^[8,19]。Notch 基因最早在研究果蝇的神经系统发育中被发现,在果蝇中该基因的局部功能缺失会导致其翅膀边缘形成一些缺刻(Notch)而得名。在哺乳动物体内,Notch 信号通路拥有 4 种受体及 5 种配体,分别为 Notch1-4 受体与配体 Jagged1、Jagged2 及 Delta 样配体 DLL1、DLL3、DLL4^[20]。在小鼠心外膜血管生成的研究中发现富含低分子肝素的舒洛地平能够通过抑制 Notch1/DLL4 信号通路的活化,进而下调血管内皮生长因子的表达,最终抑制心外膜组织中血管的生成^[21]。而 DLL4 是唯一特异性存在于血管内皮细胞的 Notch 信号配体,其能通过 Notch 信号通路影响血管生成,尤其是在调控胚胎血管发育与肿瘤血管形成中具有重要的地位。正常生理情况 Notch/DLL4 信号通路主要通过抑制内皮细胞的活性,下调其迁移、分化能力,进而抑制血管的萌发及分支的生成,维持血管形态及稳定^[22]。在既往的研究发现 DLL4 在 PE 患者胎盘组织中的表达显著降低^[13-14],提示炎症因子及氧化应激等不良刺激通过 Notch/DLL4 信号通路可能参与 PE 血管内皮损伤的发生发展。

硫酸镁作为预防及治疗 PE 的临床一线用药,能够通过减少患者体内乙酰胆碱的释放,松弛骨骼肌以预防子痫发作,然而临床工作中发现单用硫酸镁治疗 PE 的疗效并不理想,因此常常采用硫酸镁与拉贝洛尔等其他降压药物进行联合治疗。在本研究中我们通过观察对比单用硫酸镁与联合应用硫酸镁与低分子肝素进行治疗的 PE 患者中胎盘组织 DLL4 的表达发现,较正常妊娠

的胎盘组织相比,PE 患者中的 DLL4 表达显著降低,而联合使用硫酸镁与低分子肝素治疗的 PE 患者胎盘组织中 DLL4 的表达显著增加,且 DLL4 主要定位于胎盘组织的内皮细胞中。这提示低分子肝素对 PE 的治疗可能与内皮细胞中 DLL4 表达增加有关。ELISA 检测受试者血清中内皮损伤相关细胞因子 ET-1 与 sVCAM-1 的表达显示,PE 患者中 ET-1、sVCAM-1 表达较正常妊娠产妇明显增加,而联合使用低分子肝素后 PE 患者中的上述细胞因子水平较单用硫酸镁的患者明显降低。ET-1、sVCAM-1 是血管内皮激活或损伤的标志性细胞因子,当内皮细胞损伤时其表达将显著增加^[23]。为进一步明确低分子肝素是否通过 DLL4 对内皮细胞发挥保护作用,本研究应用 PE 患者血清刺激不同处理情况下的 HUVEC,结果证实预先使用低分子肝素处理可显著抑制 PE 血清对内皮细胞的促凋亡作用,并改善 PE 血清对其通透性的影响,进而保护内皮细胞的完整性。最后 Western blot 结果表明,低分子肝素能够通过促进抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达,抑制促凋亡蛋白 Bax、Cleaved caspase-3 表达来改善 PE 血清对内皮细胞损伤,而使用 Notch 信号通路抑制剂 MK-0752 能显著逆转低分子肝素对凋亡相关蛋白的上述影响,即降低抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达,而促进 Bax、Cleaved caspase-3 表达。Bax 是分布于细胞质中的重要促凋亡蛋白,其在接受上游传导的凋亡信号后被激活并发生分子构象的改变,随即进入线粒体并破坏线粒体膜的完整性,其还可以与凋亡抑制蛋白 Bcl-2 相结合,对抗其抗凋亡作用。凋亡蛋白酶 Caspase-3 是各种凋亡途径的枢纽分子,也是细胞凋亡的指示剂,它的激活表示细胞已进入凋亡早期,并最终发生细胞死亡^[24]。

综上,本研究发现联合使用低分子肝素能够通过促进胎盘组织内皮细胞中 DLL4 的表达,其可能通过 Notch/DLL4 信号通路抑制内皮细胞的凋亡,从而保护内皮细胞的完整性。本研究从内皮细胞损伤层面论证了

低分子肝素在 PE 患者治疗中的有效性,为临床低分子肝素在临床治疗中的推广提供新的依据。

【参考文献】

- [1] Cornelius, Denise C. Preeclampsia: From inflammation to immunoregulation [J]. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 2018,11:1179545X1775232.
- [2] Yu Z, Wang J, Zhang P, et al. Ulinastatin attenuates vascular endothelial cell damage in pregnant women with severe preeclampsia [J]. *An Acad Bras Cienc*, 2019,91(3):e20180746.
- [3] Tomimatsu T, Mimura K, Endo M, et al. Pathophysiology of preeclampsia: an angiogenic imbalance and long-lasting systemic vascular dysfunction [J]. *Hypertens Res*, 2017,40(4):305-310.
- [4] Hao C, Xu H, Yu L, et al. Heparin: An essential drug for modern medicine [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019,163:1-19.
- [5] Wat JM, Hawrylyshyn K, Baczyk D, et al. Effects of glycol-split low molecular weight heparin on placental, endothelial, and anti-inflammatory pathways relevant to preeclampsia [J]. *Biol Reprod*, 2018,99(5):1082-1090.
- [6] 黄江萍,黄黎霞,施素然. 低分子肝素联合硫酸镁治疗早发型重度子痫前期合并胎儿生长受限的效果观察 [J]. *中国妇幼保健*, 2020,35(2):233-236.
- [7] 蒋维贞. 子痫前期抗凝治疗的研究进展 [J]. *实用妇产科杂志*, 2019,35(12):910-914.
- [8] Roberge S, Demers S, Nicolaidis KH, et al. Prevention of preeclampsia by low-molecular-weight heparin in addition to aspirin: a meta-analysis [J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2016, 47 (5) : 548-553.
- [9] Pagie S, Gérard N, Charreau B. Notch signaling triggered via the ligand DLL4 impedes M2 macrophage differentiation and promotes their apoptosis [J]. *Cell Communication and Signaling*, 2018, 16 (1):4.
- [10] Xie F, Zhang X, Luo W, et al. Notch signaling pathway is involved in bFGF-induced corneal lymphangiogenesis and hemangiogenesis [J]. *J Ophthalmol*, 2019,2019:9613923.
- [11] Pierscianek D, Wolf S, Keyvani K, et al. Study of angiogenic signaling pathways in hemangioblastoma [J]. *Neuropathology*, 2017,37(1):3-11.
- [12] Spuul P, Daubon T, Pitter B, et al. VEGF-A/Notch-induced podosomes proteolyse basement membrane collagen-IV during retinal sprouting angiogenesis [J]. *Cell Rep*, 2016, 17 (2) : 484-500.
- [13] 赵先兰,陶雅,王永红,等. Notch 信号通路配体 Jagged1、Dll4 在子痫前期胎盘组织中的表达 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2017,52(3):359-363.
- [14] 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学 [M]. 第 9 版. 北京:人民卫生出版社,2018:83-89.
- [15] Wei J, Fu Y, Mao X, et al. Decreased Filamin b expression regulates trophoblastic cells invasion through ERK/MMP-9 pathway in pre-eclampsia [J]. *Ginekologia Polska*, 2019,90(1):39-45.
- [16] 汪洪友,钱雷,邹应芬,等. IL-35 对重度子痫前期孕妇血清诱导的脐静脉内皮细胞凋亡的作用 [J]. *中华妇产科杂志*, 2019,54(8):552-556.
- [17] 张园,钟梅,刘凤岩. 低分子肝素抑制子痫前期样大鼠胎盘细胞凋亡 [J]. *南方医科大学学报*, 2012,32(6):862-866.
- [18] 刘涛,何志军,宋渊,等. 消肿止痛合剂通过 VEGF-Dll4/Notch 信号通路减轻大鼠血管内皮细胞缺氧损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019,35(10):1736-1742.
- [19] 胡慧慧,王茹敏,胡晓红,等. 硫酸镁联合低分子肝素治疗重度子痫前期患者的临床应用效果及其对新生儿预后的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2019,34(20):4673-4676.
- [20] Levin HI, Sullivan-Pyke CS, Papaioannou VE, et al. Dynamic maternal and fetal Notch activity and expression in placentation [J]. *Placenta*, 2017,55:5-12.
- [21] Niderla-Bielińska J, Bartkowiak K, Cizek B, et al. Sulodexide inhibits angiogenesis via decreasing Dll4 and Notch1 expression in mouse proepicardial explant cultures [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2019,33(2):159-169.
- [22] Liu X, Luo Q, Zheng Y, et al. The role of Delta-like 4 ligand/Notch-ephrin-B2 cascade in the pathogenesis of preeclampsia by regulating functions of endothelial progenitor cell [J]. *Placenta*, 2015,36(9):1002-1010.
- [23] 张展,王会平,石瑛,等. IFI16 在子痫前期孕妇胎盘组织和血清中的表达及其与子痫前期发病的相关性 [J]. *现代妇产科进展*, 2017,26(1):11-14.
- [24] Chu WW, He XY, Yan AL, et al. Ischemic postconditioning lightening ischemia/reperfusion apoptosis of rats via mitochondria pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (14) : 6307-6314.

(收稿日期:2020-08-08 编辑:杨叶)