

# 雌激素对血液凝固与纤维蛋白溶解的影响 及对心血管的保护作用

张 莹 朱广瑾 段岩平

(中国医学科学院基础医学研究所 中国协和医科大学基础医学院, 北京100005)

主题词 雌激素; 纤维蛋白原; 纤溶酶原激活物,组织型; 纤溶酶原激活物抑制剂-1; 内皮,血管; 脐静脉

摘 要 为了探讨雌激素促纤溶、抗凝血的心血管保护作用及其细胞和分子生物学机制,应用全自动血凝/纤溶分析仪和发色底物显色测定、组织和细胞原位杂交及激光共聚焦扫描显微镜等技术,观察去卵巢大鼠纤维蛋白原、组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂-1活性及基因表达,以及补充雌激素的影响。同时观察人脐静脉内皮细胞中雌激素对组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂-1基因表达和活性的影响以及单个内皮细胞胞内游离钙离子的变化。结果发现,去卵巢大鼠血浆纤维蛋白原含量和纤溶酶原激活物抑制剂-1活性高于对照组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),血浆组织型纤溶酶原激活物活性低于对照组,补充雌激素后,血浆纤维蛋白原含量和组织型纤溶酶原激活物活性接近对照组。去卵巢大鼠冠状动脉及心肌组织中纤溶酶原激活物抑制剂-1 mRNA 明显增高。还发现,当雌激素浓度为 $10^{-8}$ 和 $10^{-6}$  mol/L 时内皮细胞培养液中组织型纤溶酶原激活物活性高于对照组( $P<0.05$ );内皮细胞中组织型纤溶酶原激活物 mRNA 水平随雌激素浓度而升高;而纤溶酶原激活物抑制剂-1 mRNA 水平在各组中无统计学差异;内皮细胞胞内游离钙离子浓度在雌激素浓度为 $10^{-8}$  mol/L 时降低, $10^{-6}$  mol/L 时上升。以上结果提示,雌激素缺乏时凝血激活、纤溶抑制,补充雌激素使纤溶活性增高,说明雌激素通过影响凝血及纤溶活性改善内皮细胞功能。此外,雌激素还影响人脐静脉内皮细胞胞内游离钙离子浓度。

## The Effect of Estrogen on Coagulation and Fibrinolysis and Cardiovascular Protection

ZHANG Ying, ZHU Guang-Jin and DUAN Yan-Ping

(Institute of Basic Medical Science, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China)

**MeSH** Estrogens; Fibrinogen; Plasminogen Activators, Tissue; Plasminogen Activator Inhibitor-1; Endothelium, Vascular; Umbilical Veins

**ABSTRACT** **Aim** To study the effect and mechanism of cardiovascular protection of 17 beta-estrodial on coagulative and fibrinolytic system in animal model and cultured human umbilical vein endothelial cell. **Methods** The activity changes of tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) both in vivo and in vitro were measured by spectrophotometric assay, and the level of message RNA of them were examined by in situ hybridization. In addition, the level of fibrinogen in plasma was investigated by the instrument of automobile analysing coagulative and fibrinolytic system. The intracellular free calcium concentration in single human umbilical vein endothelial cell (hUVEC) was also determined by kinetic observation with Laster Confocal Microscope. **Results** In vivo, the t-PA activity was decreased significantly in the group that the rats were ovariectomized for 5 weeks (OVX2 group) ( $P<0.05$ ) and PAI-1 activity was increased significantly in both OVX1 (the rats ovariectomized for 3 weeks) and OVX2. Fibrinogen of plasma in OVX1 was also increased ( $P<0.05$  vs Control). In the two groups of OVX treated with 17 beta-estrodial, PAI-1 activity was decreased ( $P<0.01$ , respectively) and t-PA activity was increased in OVX+17 beta-estrodial ( $P<0.05$ ). In situ hybridization showed PAI-1 mRNA in OVX1 tissue was higher than the control. In vitro, the t-PA activity and gene expression were increased with the raising concentration of 17 beta-estrodial. PAI-1 mRNA was changeless between different concentrations of 17beta-estrodial. The concentration of intracellular calcium-free of HUVEC was decreased in physical 17 beta-estrodial. **Conclusions**

The effect of cardiovascular protect of estrogen was associated with decrease in PAI-1, fibrinogen, and  $[Ca^{2+}]_i$ , as well as increase in t-PA activity and gene expression.

患心血管疾病为绝经后妇女主要死亡原因,降低缺血性心脏病的发生对提高妇女平均寿命及生活质量有重要意义。流行病学研究表明,绝经前妇女心血管病死亡率低于同龄男性,绝经后此差别消失。进行雌激素替代治疗,不仅减轻绝经症状而且降低心

血管疾病的危险性<sup>[1]</sup>。提示雌激素有保护心血管作用,而这方面的作用机制尚未阐明。已有的研究较多涉及雌激素对脂质代谢和血管舒缩等方面的作用,关于雌激素对凝血与纤溶功能方面的影响机制研究鲜见报道。维持凝血与纤溶系统动态平衡是降低血

栓性疾病发生的重要环节,其中内皮功能稳定是至关重要的。本工作研究了整体去卵巢(ovariectomized, OVX)及补充17 $\beta$ -雌二醇大鼠纤维蛋白原(fibrinogen, FIB)含量、组织型纤溶酶原激活物(tissue-type plasminogen activator, t-PA)和纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)活性及其mRNA变化,同时观察雌激素对体外培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical endothelial cell, hUVEC) t-PA及PAI-1活性、mRNA和胞内游离钙离子浓度(intracellular calcium-free,  $[Ca^{2+}]_i$ )的变化,从内皮细胞抗血栓功能方面探讨雌激素对心血管系统保护作用及其细胞分子生物学机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂及器材

含t-PA和PAI-1的cDNA质粒分别由上海医科大学宋后燕教授和荷兰Gaubius实验室van Hinsbergh博士馈赠。限制性内切酶EcoRI和DNA参照物均购自协和医科大学友谊开发公司,非放射性Dig DNA标记检测试剂盒购自德国Boehringer Mannheim生物公司,t-PA、PAI-1活性发色底物测定盒由上海医科大学提供。其他主要试剂中I型胶原酶、17 $\beta$ -雌二醇、RNase、DEPC、溶菌酶、十二烷基磺酸钠等均购于美国Sigma公司,M-199培养基、胎牛血清等为Gibico公司生产。

ACL-3000plus全自动血凝/纤溶分析仪为美国Coulter公司产品,激光共聚焦扫描显微镜(Acas Ultima 212)是美国Merigin公司生产,细胞培养箱为美国Napco公司制造,此外还有德国SIGMA的3K30型高速低温离心机,英国slee恒冷切片机,DG3022型酶联免疫检测仪。

### 1.2 实验分组

选用150~200 g雌性wistar大鼠(中国医科院实验动物研究所提供)复制去卵巢(OVX)动物模型<sup>[2]</sup>。实验分成五组(每组动物10只),即假手术对照组(Control);去卵巢三周组(OVX1);去卵巢五周组(OVX2);补充17 $\beta$ -雌二醇三周组(OVX+E1),去卵巢后一周肌注苯甲酸雌二醇(1 g/L),3天注射1次,共21天;补充17 $\beta$ -雌二醇五周组(OVX+E2),去卵巢一周后,补充苯甲酸雌二醇(剂量、时间间隔同前)共36天。

### 1.3 血浆凝血纤溶指标测定

实验结束自腹主动脉采集血样,4℃ 3000 r/min

分离血浆,采用全自动血凝/纤溶分析仪测定纤维蛋白原含量(结果以g/L表示),发色底物显色法测定盒检测t-PA、PAI-1活性,酶标仪读数后,计算结果,分别以kIU/L、kAU/L表示,意义为在25℃时,20 min内抑制1.0国际单位t-PA的PAI-1酶量,即为1.0 AU(Arb. Unit)。

### 1.4 冠状动脉及周围心肌组织纤溶因子基因表达

取各组动物冠状动脉及周围心肌组织,置液氮保存,按分子克隆实验指南<sup>[3]</sup>制备t-PA和PAI-1 cDNA探针,并根据非放射性地高辛精DNA(Dig DNA)标记试剂盒提供的条件,用地高辛精以随机插入法标记两种目的cDNA(t-PA cDNA和PAI-1 cDNA),然后采用酶联免疫杂交法检测标记效率。液氮取出的冠状动脉及周围心肌组织经过低温切片,用多聚甲醛固定,加入标记好的探针进行预杂交、杂交和免疫显色、封片等过程,在显微镜下分析杂交颗粒以反映目的基因表达情况。

### 1.5 内皮细胞纤溶因子活性及基因表达的测定

在正常生产的婴儿脐带的脐静脉中灌入0.1%胶原酶,用含20%胎牛血清的M-199培养基悬浮消化后收集内皮细胞,接种于24孔板中( $10^6$ /孔),置孵箱中培养,用荧光免疫组织化学法进行鉴定。在融合生长的内皮细胞培养基中不加入(对照组)或分别加入 $10^{-10}$  mol/L(E1组)、 $10^{-8}$  mol/L(为生理浓度,E2组)和 $10^{-6}$  mol/L(E3组)17 $\beta$ -雌二醇,孵育48 h,用发色底物试剂盒测定细胞培养液中t-PA、PAI-1活性(每组6样孔),细胞作原位杂交实验:以未加探针作阴性对照,通过对细胞的固定、预杂交、杂交、显色步骤,对杂交颗粒计数,进行t-PA和PAI-1 mRNA变化的半定量分析。

### 1.6 单个内皮细胞内游离钙离子浓度测定

以Fluo-3/AM为探针,在激光共聚焦扫描显微镜下观察上述不同浓度17 $\beta$ -雌二醇对人脐静脉内皮细胞胞内游离钙离子浓度的影响,计算以记录的荧光变化曲线反映胞内游离钙离子浓度改变的瞬时结果。

### 1.7 数据的统计处理

所有数据都以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较采用 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 大鼠血浆凝血和纤溶因子的变化

大鼠去卵巢后血浆纤维蛋白原的浓度( $1.82 \pm 0.56$  g/L)比对照组( $1.27 \pm 0.47$  g/L)高,差异显著

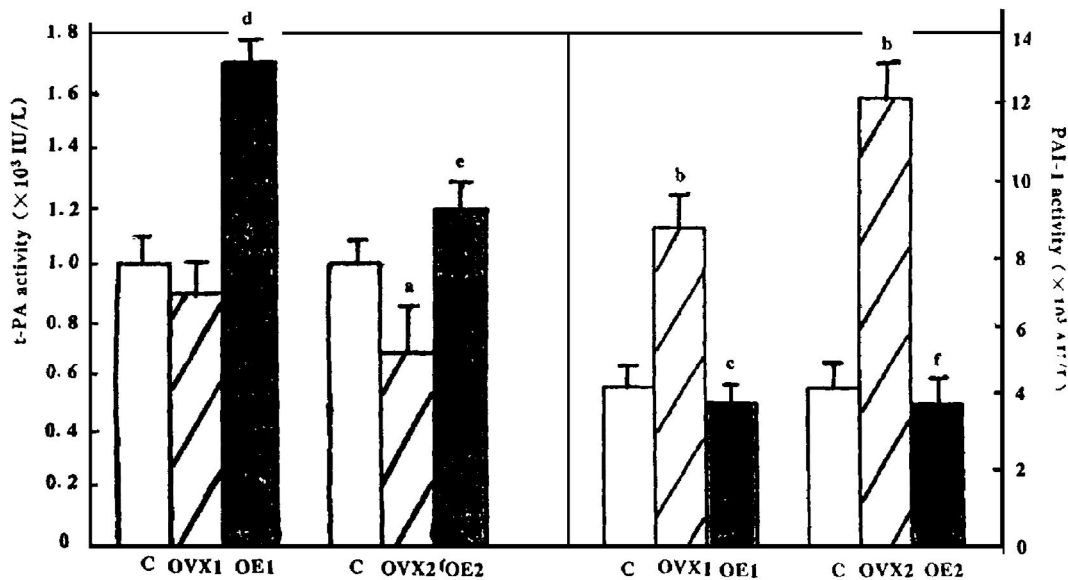


图1. 大鼠血浆纤溶酶原激活物和抑制剂活性的变化

Figure 1. Changes of plasma t-PA and PAI-1 activity in OVX or replacing  $17\beta$ -estradiol rats. C: control group; OVX1 or OVX2: 3 weeks group or 5 weeks group after ovariectomized; OE1 or OE2: treated with  $17\beta$ -estradiol at 3 weeks group or at 5 weeks group after ovariectomized. a:  $P<0.05$ , b:  $P<0.01$ , compared with control group; c:  $P<0.05$ , d:  $P<0.01$ , compared with OVX1 group; e:  $P<0.05$ , f:  $P<0.01$ , compared with OVX2 group

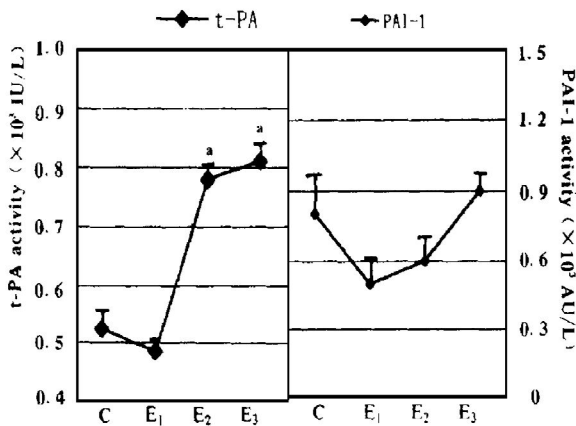


图2. 雌激素对人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物和抑制剂活性的影响

Figure 2. Effect of  $17\beta$ -estradiol on activity of t-PA and PAI-1 in hUVEC. C: control group; E1 or E2 or E3: concentration of  $17\beta$ -estradiol treated was  $10^{-10}$  or  $10^{-8}$  or  $10^{-6}$  mol/L, respectively. a:  $P<0.05$ , compared with control group

( $P<0.05$ ); 补充雌激素后接近对照组( $1.36 \pm 0.21$  g/L)。血浆 t-PA 活性下降,其中去卵巢五周组较对照组有明显差异 ( $P<0.05$ ); 补充雌激素三周或五周后都增高,并均接近对照组。

血浆 PAI-1 活性明显高于对照组 ( $P<0.01$ ), 补充雌激素三周或五周后下降, 并均接近对照组(图 1, Figure 1)。同时在冠状动脉及周围心肌组织原位杂交中观察到, 去卵巢五周组 PAI-1 mRNA 水平增高。

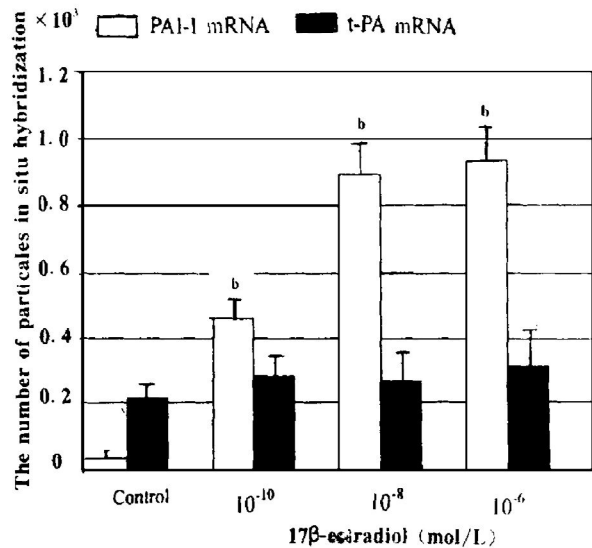


图3. 雌激素对人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物和抑制剂 mRNA 表达的影响

Figure 3. Effect of  $17\beta$ -estradiol on mRNA expression of t-PA and PAI-1 in hUVEC. b:  $P<0.01$  compared with control group

## 2.2 内皮细胞纤溶因子活性及基因表达结果

$10^{-10}$  mol/L  $17\beta$ -雌二醇对内皮细胞 t-PA 活性无明显影响。 $10^{-8}$  mol/L 以及  $10^{-6}$  mol/L 浓度时, t-PA 活性高于对照组, 差异显著 ( $P<0.05$ ) (图 2, Figure 2); 细胞原位杂交结果与此一致。在显微镜 (100 $\times$ ) 下进行杂交颗粒计数, 可见随着雌激素浓度的升高, 杂交颗粒逐渐增加, 给激素各组较未加雌

激素组均有极显著差异( $P < 0.05$ ), 反映 t-PA mRNA 水平随着雌激素浓度而升高(图3, Figure 3)。各组 PAI-1 活性变化随浓度升高而呈增高趋势, 但无统计学差异。细胞原位杂交在各组虽无显著性差异, 但对照和给激素各组均表现 PAI-1 表达。

### 2.3 单个内皮细胞胞内游离钙离子变化

激光共聚焦扫描显微镜下单个内皮细胞胞内钙离子水平在记录开始80 s 后趋于稳定, 350 s 时加入  $10^{-8}$  mol/L  $17\beta$ -雌二醇, 可见其胞内钙离子水平迅速下降(图4, Figure 4)。

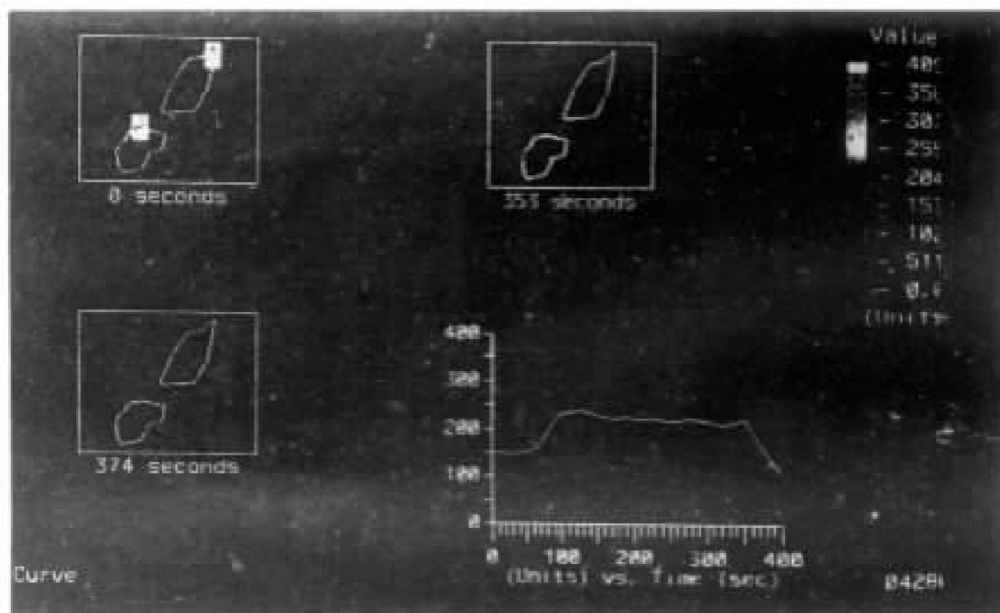


图4. 用  $10^{-8}$  mol/L  $17\beta$ -雌二醇刺激人脐静脉内皮细胞时单个细胞内游离钙离子变化

Figure 4. Change of concentration of intracellular free  $\text{Ca}^{+2}$  in hUVEC stimulated with  $10^{-8}$  mol/L  $17\beta$ -estradiol

## 3 讨论

流行病学和基础理论研究均发现, 各种危险因素最终会通过纤维蛋白原和凝血因子 VII 起作用, 造成血液粘滞度增高、血栓形成, 最后导致缺血性心脏病的发生乃至死亡<sup>[4,5]</sup>。由此认为, 纤维蛋白原增加伴随总死亡危险增加和冠心病事件危险增加, 纤维蛋白原是冠心病的一个主要、独立的危险因素<sup>[6]</sup>。雌激素水平是否影响血浆中纤维蛋白原的含量? Lee 等<sup>[7]</sup>报道, 绝经后妇女血浆纤维蛋白原较绝经前或接受雌激素替代治疗后显著升高。本文动物实验结果表明, 去卵巢模型动物血浆纤维蛋白原显著高于对照组( $P < 0.05$ ), 术后补充雌激素接近正常, 与临床结果颇为一致。这提示: 绝经后或去卵巢机体纤维蛋白原升高可能是由于内源性雌激素浓度改变所致, 补充雌激素可能改善雌激素缺乏引起凝血、纤溶改变。此外, 一些资料显示绝经妇女血浆凝血因子增加同时伴随某些抗凝因子活性加强, 如血浆蛋白 C 和蛋白 S<sup>[8]</sup>, 反映雌激素对机体凝血的影响是复杂的、多方面的。

除了凝血因子以外, 纤溶因子异常、纤溶活性降低也与心肌梗死危险性增加有密切关系。t-PA 和 PAI-1 是一对重要的纤溶因子, 雌激素水平变化与它

们的关系引起人们极大关注。Framingham 等<sup>[9]</sup>报道, 绝经前妇女血浆 PAI-1 水平比同龄男性低, 绝经后此种性别差别消失。同时绝经妇女 PAI-1 水平明显低于雌激素替代治疗妇女, 后者保持绝经前低 PAI-1 水平。本文实验发现, 大鼠去卵巢后血浆 t-PA 活性下降, PAI-1 活性明显升高, 与假手术对照组相比均呈显著性差异; 补充  $17\beta$ -雌二醇的去卵巢两组 PAI-1 活性显著低于去卵巢两组, 而 t-PA 活性较去卵巢两组高( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。心肌组织原位杂交实验中, 去卵巢五周组冠状动脉及心肌组织切片中 PAI-1 mRNA 显著增加。说明雌激素缺乏引起纤溶能力下降可能与纤溶抑制因子基因表达增加有关。在心肌缺血的血管局部, PAI-1 mRNA 水平也显著上升<sup>[10]</sup>。反映纤溶抑制因子基因表达增加与心血管危险因素增高有关。t-PA 表达信号未在各组中观察到, 可能是在整体实验中  $17\beta$ -雌二醇主要通过对 PAI-1 作用影响纤溶活性。

正常机体中 t-PA 和 PAI-1 保持着动态平衡。内皮细胞不仅合成和分泌 t-PA, 也合成和分泌 PAI-1。本文在培养的人脐静脉内皮细胞中加入不同浓度的  $17\beta$ -雌二醇, 直接观察雌激素对细胞纤溶活性的影响。测得细胞培养液 t-PA 活性随雌激素浓度升高而

呈上升趋势,PAI-1活性无明显改变。可能在体外实验中 t-PA 受雌激素的影响更大。原位杂交结果支持这一观点。这提示,雌激素可能通过影响纤溶因子基因表达而调节纤溶系统活性。值得注意的是,尽管 PAI-1表达在各组无显著变化,但未加雌激素组也有 PAI-1表达。

内皮细胞衬贴于血管内壁,对维持机体内环境稳定具有十分重要的意义。生理情况下内皮细胞表面的凝血—抗凝血平衡略微倾向于抗凝血,当某些炎性物质作用激活内皮,使平衡偏向凝血一边,血管内易发生凝血。但如果纤溶活性急剧提高,说明纤溶激活因子被大量合成分泌,也表明内皮细胞被活化。雌激素改善纤溶能力是否构成细胞毒性作用?胞内钙离子浓度的变化作了回答。本文实验观察到培养的单个人脐静脉内皮细胞胞内钙离子水平在生理浓度的 $17\beta$ -雌二醇下降低,并有一定的细胞形态的改变。提示高浓度 $17\beta$ -雌二醇对细胞已有细胞毒性作用。为解释雌激素的某些副作用提供线索,如同 Winkler<sup>[11]</sup>提出,雌激素影响凝血纤溶活性具有剂量依赖性,高浓度时促凝血作用大于促纤溶作用,而低浓度时调节纤溶活性的效应高于凝血作用。至于雌激素补充治疗中的剂量问题,除了存在个体差异外,还涉及与孕激素、雄性激素的配比关系,需要进行大量的临床和基础研究证实。

#### 参考文献

- Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heartdisease; a quantitative assessment of the epidemio-

- logic evidence. *Prev Med*, 1991, **20**: 47-63
  - 左萍萍,林守清,隋亚平,等. 切除卵巢大鼠脑内单胺类含量及应激的影响. *基础医学与临床*, 1995, **15**(2): 37-39
  - J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1995, 16-34
  - WHO MONICA Project. Ecological analysis of the association between mortality and major risk factors of cardiovascular disease. *Int J Epidemiol*, 1994, **23**(3): 505-516
  - Heinrich J, Balleisen L, Schultle H, et al. Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROLAM study in healthy men. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 54-59
  - Meade TW. Fibrinogen in ischaemic heart disease. *Eur Heart J*, 1995, **16**(Suppl A): 31-35
  - Lee AJ, Lowe GDO, Smith WCS, et al. Plasma fibrinogen in women: relationships with oral contraception, the menopause and hormone replacement therapy. *Br J Haem*, 1993, **83**: 616-621
  - Henkens CMA, Bom VJJ, van der Schaaf W, et al. Plasma levels of protein S, protein, and factor X; effects of sex, hormonal state and age. *Thromb & Haem*, 1995, **74**(5): 1 271-275
  - Gebara OC, Mittleman MA, Sutherland P, et al. Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study. *Circulation*, 1995, **91**(7): 1 952-958
  - 朱广瑾,武文心,段岩平,等. 预处理对大鼠缺血冠状动脉等组织 t-PA、PAI-1基因表达的影响. *中国医学科学院报*, 1997, **19**(5): 319-324
  - Winkler UN. Menopause, hormone replacement therapy and cardiovascular disease; a review of haemostaseological findings. *Fibrinolysis*, 1992, **6** (Suppl 3): 5-10
- (此文1998-06-13收到, 1998-10-11修回)  
(此文编辑 胡必利)