

## 川芎嗪抗血栓形成的机制研究

阮秋蓉 宋建新 邓仲端

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

### Study on Mechanism of Ligustrazini Against Thrombosis

RUAN Qiu-Rong, SONG Jian-Xin and DENG Zhong-Duan

(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

#### ABSTRACT

**Aim** To understand the mechanism of Chinese medicine ligustrazini against thrombosis and the effects of ligustrazini on plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) expression in normal endothelial cells (EC) and EC exposed to lipopolysaccharide (LPS).

**Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured by trypsin digestion method. PAI-1 protein in HUVEC conditioned medium was measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and PAI-1 mRNA expression was determined by Northern blot analysis. HUVEC nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) nuclear translocation was assessed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

**Results** LPS treatment of cultured HUVEC resulted in a significant increase in PAI-1 protein and mRNA expression by these cells. However, when HUVEC were incubated with LPS plus ligustrazini, the upregulation of PAI-1 by LPS was abated. Moreover ligustrazini was able to decrease the basal level of PAI-1 protein and mRNA as compared to control. Nuclear extracts prepared from LPS stimulated HUVEC demonstrated increased binding to the NF- $\kappa$ B oligonucleotide as compared to unstimulated cells, but ligustrazini did not change those binding in the absence or

presence of LPS.

**Conclusion** Ligustrazini inhibited both basal and LPS-induced PAI-1 protein and mRNA expression in EC, and the modulation of PAI-1 in HUVEC by ligustrazini might have other mechanisms rather than NF- $\kappa$ B pathway.

**KEY WORDS** Ligustrazini; Plasminogen activator inhibitor type-1; Lipopolysaccharide; Endothelial cell; Thrombosis

**摘要** 纤溶酶原激活物抑制剂-1是一种重要的促凝血因子,内毒素脂多糖通过刺激血管内皮细胞分泌纤溶酶原激活物抑制剂-1导致炎症过程中血栓形成。为探讨其机制,本文采用酶联免疫吸附试验法、Northern 印迹法和电泳迁移法观察中药川芎嗪对内毒素脂多糖所致内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1表达的影响及可能机制进行探讨。结果发现,川芎嗪不仅抑制内毒素脂多糖所致内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1蛋白分泌和 mRNA 表达,而且抑制内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1基础水平的表达。此结果提示,川芎嗪并非通过核因子 NF- $\kappa$ B 途径抑制内毒素脂多糖所致内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1表达增强的作用。

**关键词** 川芎嗪; 纤溶酶原激活物抑制剂-1; 脂多糖; 内皮细胞; 血栓形成

血管内皮细胞(endothelial cell, EC)既可分泌组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA),又可分泌纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1)。t-PA 与 PAI-1 之间的平衡对维持血凝纤溶系统的稳定至关重要。因此,EC 对维持正常的血液状态起关键作用。文献[1,2]报道,培养的 EC 可受内毒素脂多糖(lipopolysaccharide)等多种因子的刺激而表达过多的 PAI-1,使其凝血活性增加。脂多糖是一

种格兰氏阴性菌感染的常见毒素,在炎症过程中脂多糖通过刺激 EC 产生过多的 PAI-1 而诱发血栓形成。临床上,严重感染和败血症性休克病人以及心肌梗死和动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)疾病患者血浆中纤溶酶原激活物抑制剂-1 的浓度也明显高于正常<sup>[3,4]</sup>。因此,纤溶酶原激活物抑制剂-1 的抑制剂对严重感染和心血管疾病等将具有潜在的治疗作用。

中药川芎嗪(ligustrazini)具有活血化瘀,降低血液粘滞性和抗血栓形成等作用,临床上广泛应用于抗感染性休克和心血管疾病的治疗等。但其作用的分子机制不太清楚。本文首次对川芎嗪是否影响 EC PAI-1 分泌和 mRNA 表达,是否抑制脂多糖诱导 EC PAI-1 表达增强及其作用的可能通路进行了探讨,为其临床应用寻找理论和实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

用酶消化法分离的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)<sup>[5]</sup>种于明胶包被的 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内静置培养。培养基为含 20% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、50 ng/L 内皮细胞生长添加剂(endothelial cell growth supplement, ECGS)和 0.005 u/L 肝素的 M199 (Sigma 公司)。待 HUVEC 融合后,以 1:3 比例传代培养。细胞呈典型铺石样形态。实验所用细胞为 2~3 代。

### 1.2 条件培养基的制备

待生长于 24 孔板内 HUVEC 融合后,用 Hanks 平衡盐溶液洗 2 次,换成含 1.25% FBS、50 ng/L ECGS 的 M199,每孔 0.5 mL。试验分为四组:①对照组:只加培养基;②脂多糖组:加入 1 ng/L 脂多糖;③川芎嗪组:加入 0.1 ng/L 川芎嗪(国家药物和生物制剂研究所);④脂多糖+川芎嗪组:同时加入 1 ng/L 脂多糖和 0.1 ng/L 川芎嗪。置 37℃ 培养箱内继续孵育 18 h,收集各组细胞培养上清液,离心去除细胞碎屑,贮存于-70℃ 待用。用细胞计数器计量每孔细胞总数。

### 1.3 条件培养基中 PAI-1 蛋白量的测定

用夹心酶联免疫吸附试验(sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测各组 HU-

VEC 条件培养基中 PAI-1 的蛋白含量。所用抗体为兔抗人 PAI-1 的单克隆抗体(Technoclone, Austria),方法按药盒说明书进行。实验结果用 *t* 检验进行统计学处理。

### 1.4 Northern 印迹分析

待生长于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶的 HUVEC 融合后,用 Hanks 平衡盐溶液洗 2 次,换成含 1.25% FBS、50 ng/L ECGS 的 M199。按以上试验同样分为四组,继续温育 18 h。用异硫氰酸胍法提取各组细胞总 RNA。各 RNA 样本经 1.2% 凝胶电泳后转移到 Duralon-UV<sup>TM</sup> 尼龙膜(Stratagene, USA)上,57℃ 预杂交 2 h,然后换成含 10<sup>9</sup> Ci/(min·L) α-<sup>32</sup>P 标记 cDNA 探针的新鲜杂交液(50 mmol/L PIPES、100 mmol/L NaCl、50 mmol/L 凝酸钠、1 mmol/L EDTA 和 5% SDS),57℃ 杂交过夜。杂交膜在室温下用 5% SDS,1 XSSC 洗 10 min,再于 57℃ 下用同样溶液洗 3 次。置杂交膜于暗盒,用 XAR-5 X 光片于-70℃ 下自显影 12~48 h。自显影图像用密度仪扫描,测量各杂交带相对吸光度,以衡量各组细胞特异 mRNA 表达强度。杂交膜经煮沸的 0.5% SDS 水溶液处理后用于再杂交。本实验所用探针为 3.2 kbp 和 2.2 kbp 人 PAI-1 cDNA 探针(University of Vienna, Austria)。再杂交探针为鼠 GAPDH cDNA 探针(Boehringer, Germany)。探针用随机引物法按药盒说明书进行标记。

### 1.5 电泳迁移检测

将生长于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶的融合 HUVEC 培养于含 1.25% FBS 的 M199 16 h,使细胞同步。再用 1 ng/L 脂多糖和/或 0.1 ng/L 川芎嗪刺激 4 h。然后分别提取各组细胞核成分:先用胰蛋白酶消化,1000 r/min 离心,收集细胞,再用冷缓冲液 A (pH 7.9、10 mmol/L Hepes, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF)重悬细胞,离心后弃上清,加入含 0.1% NP40 冷缓冲液 A 30 μL,混匀,冰上孵育 10 min,4℃ 15 000 r/min 离心 10 min 得细胞核,加入 30 μL 冷缓冲液 B (pH 7.9 20 mmol/L Hepes, 25% Glycerol, 0.42 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, 5 ng/L Leupeptin, 5 ng/L Pepstain, 0.5 mmol/L Spermidine, 0.15 mmol/L Spermine, 5 ng/L Aprotinin),冰上孵育 15 min,4℃ 15 000 r/min 离心 10 min,用 20 μL 冷缓冲液 C (20 mmol/L Hepes, 20% Glycerol, 0.2 mmol/L EDTA, 50 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF)稀释所得含细胞核蛋白成分的上清液<sup>[6]</sup>。其蛋白含量用微量蛋白检测法(Mi-

crossassay Procedure, Biorad Laboratories GmbH, Germany)进行检测,用高纯度牛血清白蛋白(Boehringer, Germany)作为标准品。

NF-κB 寡核苷酸探针(University of Vienna, Austria)用 α-<sup>32</sup>P (3×10<sup>6</sup> Ci/mol, Amersham)按药盒说明书进行末端标记和纯化(Boehringer Mannheim)。蛋白结合于<sup>32</sup>P 标记的 NF-κB 寡核苷酸探针在下列反应液中室温下作用 30 min: 5 μg 核蛋白样本, 100 ng/L poly (dI-dC), 20 mmol/L HEPES, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 10% Glycerol 和 5×10<sup>3</sup> Ci/(min·L) <sup>32</sup>P 标记的 NF-κB 探针。竞争组中,用经脂多糖刺激 4 h 的 EC 核蛋白作样本,在加入<sup>32</sup>P 标记的探针前,先加入 100 倍未标记的 NF-κB 探针。然后将反应液点样于 5% 聚丙烯酰胺凝胶(acrylamide to bisacrylamide, 30:1)上,150 V 电泳约 2 h,电泳缓冲液为 0.5×TBE (45 mmol/L Tris-borate, 1 mmol/L EDTA)。然后干胶,-70℃放射自显影于 X 光片上。

### 2 结果

由图 1(Figure 1)可知,脂多糖组条件培养基 PAI-1 抗原含量明显增加,约为对照组的 2.5 倍,川芎嗪组条件培养基 PAI-1 抗原含量明显降低,约为对照组的 45.5%。脂多糖+川芎嗪组条件培养基 PAI-1 抗原含量明显低于脂多糖组,约为脂多糖组的 50.5%(*P*均<0.01),略高于对照组(*P*>0.05)。

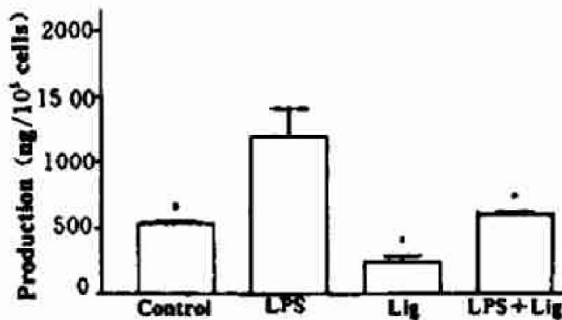


Figure 1. PAI-1 antigen production by HUVEC.

Northern 印迹结果显示,脂多糖组吸光度为对照组的 284%,川芎嗪组吸光度为对照组的 61%。脂多糖+川芎嗪组吸光度为对照组的 128%,为脂多糖组的 45%(图 2 和图 3, Figure 2 and 3)。以上结果表明脂多糖可诱导 HUVEC

PAI-1 mRNA 的表达,川芎嗪不仅可以抑制 HUVEC PAI-1 mRNA 基础水平的表达,而且还可抑制脂多糖诱导 HUVEC PAI-1 mRNA 的表达。Northern 印迹结果与 ELISA 结果基本一致。

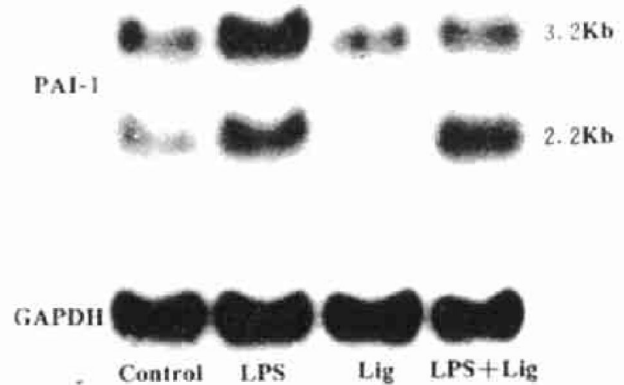


Figure 2. Expression of PAI-1 mRNA by HUVEC.

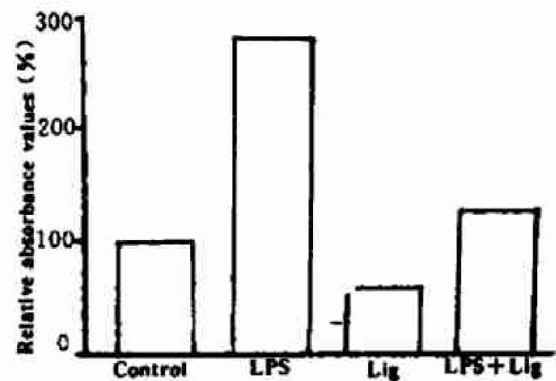


Figure 3. Densitometry scans of Northern blots of PAI-1 mRNA.

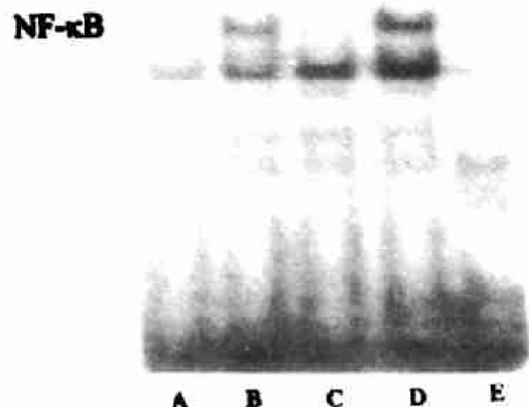


Figure 4. NF-κB in nuclei of HUVEC. A: control; B: LPS; C: Lig; D: LPS+Lig; E: competition.

电泳迁移检测法(EMSA)结果显示,对照

组和川芎嗪组 HUVEC 细胞核中未检测到 NF- $\kappa$ B; 脂多糖组 HUVEC 细胞核中 NF- $\kappa$ B 呈明显阳性反应, 脂多糖+川芎嗪组 HUVEC 细胞核中 NF- $\kappa$ B 也呈阳性反应; 在未标记 NF- $\kappa$ B 探针竞争组中细胞核 NF- $\kappa$ B 阳性反应消失, 说明此 EMSA 系统是成功的(图 4, Figure 4)。

### 3 讨论

血液存在着相互拮抗的凝血系统和纤溶系统。凝血系统和纤溶系统的动态平衡, 既保证了血液有潜在的可凝固性, 又保证了血液的流体状态。然而, 在某些促凝血因素作用下, 这种动态平衡被破坏, 便可触发凝血过程, 形成血栓。PAI-1 是一种重要的促凝血因子。在机体内, 血管内皮细胞是循环血液中 PAI-1 主要来源之一。血管 EC 分泌 PAI-1 增加则导致血栓性疾病发生, 也是 As 及心脑血管合并症的危险因素。已知 EC PAI-1 合成可受多种因素调节。由于其分布位置, EC 易受血液中有毒物质影响。脂多糖刺激各种组织血管 EC 分泌 PAI-1 与格兰氏阴性菌感染引起的休克及弥漫性血管内凝血(DIC)的发生关系密切<sup>[1]</sup>。多种心血管疾病合并感染易诱发血栓形成也可能与脂多糖所致血管 EC 分泌 PAI-1 增加有关<sup>[7,8]</sup>。因此, 有效地降低血管 EC 合成 PAI-1 将有重要的临床意义。本文在国内外首次报道中药川芎嗪不仅抑制血管 EC 表达 PAI-1, 而且对脂多糖诱导 EC PAI-1 的表达有明显的抑制作用, 这种抑制作用发生在转录水平上。一般来说, 发生在转录水平上的基因调节通常由核内核因子结合基因的启动子或其它部位来调节相应基因的转录。在各种生理和病理的刺激下, 核因子 NF- $\kappa$ B 从细胞浆进入细胞核, 结合于相应基因某一位点, 对多种细胞的不同基因表达都具有调节作用。文献[9]报道, 炎症过程中细胞因子和脂多糖可能通过 NF- $\kappa$ B 介导引起目的基因的转录。本文用 EMSA 法检测 HUVEC 细胞核提取物 NF- $\kappa$ B 的结合活性。结果显示, 脂多糖促进 HUVEC NF- $\kappa$ B 向细胞核内转移, 与文献报道一致, 但川芎嗪并不影响脂多糖所致 NF- $\kappa$ B 向细

胞核内转移, 提示川芎嗪可能通过 NF- $\kappa$ B 以外的途径抑制脂多糖所致 HUVEC 高水平表达 PAI-1。另外, 通过光镜观察及台盼蓝拒染试验, 证实了川芎嗪对 EC 并非其毒性作用, 因为川芎嗪并没有引起 EC 损伤。因此, 认为川芎嗪可以通过抑制血管 EC PAI-1 的表达来促进纤溶, 阻止血栓的形成, 从而发挥其活血化瘀、抗感染性休克及治疗心血管疾病等作用。当然, 血栓形成还与其它多种因素有关, 关于川芎嗪是否也作用于其它促凝因子及其抑制脂多糖诱导血管 EC PAI-1 mRNA 表达的机制有待进一步研究。

### 参考文献

- 1 Loskutoff DJ. Regulation of PAI-1 gene expression. *Fibrinolysis*, 1991, 5(2): 197.
- 2 Emeis JJ, Kooistra T. Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. *J Exp Med*, 1986, 163(5): 1 260~266.
- 3 Pralong G, Calandra T, Glauser MP, et al. Plasminogen activator inhibitor 1: a new prognostic marker in septic shock. *Thromb Haemost*, 1989, 61(3): 459~462.
- 4 Lupu F, Bergonzelli GE, Heim DA, et al. Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13(7): 1 090~100.
- 5 阮秋蓉, 邓仲端, 徐增绶, 等. 培养的人脐静脉内皮细胞产生单核细胞趋化因子的研究. *中华病理学杂志*, 1991, 20(3): 205~208.
- 6 Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989, 86(7): 2 336~340.
- 7 Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, et al. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1992, 89(15): 6 998~7 002.
- 8 Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest*, 1993, 68(4): 499~508.

(此文 1998-06-11 收到, 1998-11-08 修回)

(此文编辑: 文玉珊)