

山莨菪碱下行调节培养的内皮细胞表达 纤溶酶原激活物抑制剂 1

阮秋蓉¹, 宋建新², 邓仲端¹, 瞿智玲¹, 倪娟¹

(华中科技大学同济医学院 1. 病理学教研室; 2. 附属同济医院; 武汉 430030)

[关键词] 山莨菪碱; 纤溶酶原激活物抑制剂 1; 内皮, 血管; 核因子 KB

[摘要] 为了探讨山莨菪碱对正常及内毒素脂多糖刺激过的内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 表达的作用及机制。本文采用酶消化法培养人脐静脉内皮细胞; 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法检测人脐静脉内皮细胞条件培养基纤溶酶原激活物抑制剂 1 和组织型纤溶酶原激活物蛋白量; 用 Northern 印迹方法检测人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 的 mRNA 表达; 用电泳迁移检测法对人脐静脉内皮细胞的核因子 KB 核内转移情况进行研究。结果发现, 脂多糖能使人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 蛋白及 mRNA 表达显著增强, 但加入山莨菪碱后, 脂多糖的这种作用明显减弱。而且, 山莨菪碱还能抑制人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 基础水平的表达。经脂多糖刺激的人脐静脉内皮细胞核提取物与核因子 KB 探针结合明显增强, 而山莨菪碱则能阻止脂多糖致核因子 KB 的核内转移现象。提示山莨菪碱不仅下行调节脂多糖所致内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 的蛋白分泌和 mRNA 表达, 而且下行调节其纤溶酶原激活物抑制剂 1 基础水平表达, 这种调节可能通过核因子 KB 途径而发挥作用。

[中图分类号] R285.1

[文献标识码] A

Anisodamine Downregulates PAI-1 Expression of Cultured Endothelial Cells

RUAN Qiu Rong¹, SONG Jianxin², DENG Zhongduan¹, QU Zhi Ling¹, NI Ju¹.

(1. Department of Pathology, 2. Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

MeSH Anisodamine; Plasminogen Activator Inhibitor-1; Endothelium, Vascular; Nuclear Factor KB

ABSTRACT **Aim** To investigate the effects and mechanisms of anisodamine on plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) expression in normal endothelial cells (EC) and lipopolysaccharide (LPS)-treated EC. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) were cultured by trypsin digestion method. PAI-1 and tissue plasminogen activator (tPA) proteins in hUVEC conditioned medium were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and their mRNA expressions were determined by Northern blot analysis. Using electrophoretic mobility shift assay (EMSA), we assessed hUVEC nuclear factor-kappa B (NF- κ B) nuclear translocation. **Results** LPS treatment of cultured hUVEC resulted in a significant increase in PAI-1 protein as well as mRNA expression by these cells. However, when hUVEC were incubated with LPS plus anisodamine, the upregulation of PAI-1 by LPS was abated. Moreover anisodamine 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- κ B oligonucleotide as compared to unstimulated cells, and anisodamine could block those binding in the presence of LPS. **Conclusion** Anisodamine downregulated both basal and LPS-induced PAI-1 protein and mRNA expression in EC, and the mechanism of the modulation might be via NF- κ B pathway.

血液正常的流动性有赖于凝血—纤溶系统的动态平衡, 组织型纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, tPA) 和纤溶酶原激活物抑制剂 1 (plasminogen

activator inhibitor type-1, PAI-1) 对维持这种动态平衡至关重要。血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 既可以分泌 tPA 又可分泌 PAI-1。EC 分泌 PAI-1 受内毒素脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 等多种因子的上行调节^[1]。脂多糖是革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 而易诱发血栓形成。临床上, 严重感染、败血

[基金项目] 国家自然科学基金 (编号 985003086) 和武汉市科委晨光计划基金 (编号 39730220) 资助

[作者简介] 阮秋蓉, 女, 1964 年 9 月出生, 湖北省人, 医学博士, 副教授。宋建新, 男, 1965 年出生, 副教授, 副主任医师。邓仲端, 男, 1927 年出生, 教授, 博士研究生导师。

症性休克、心肌梗死和动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等疾病患者血浆中 PAF-1 的浓度明显高于正常^[2,3]。因此, PAF-1 的抑制剂对严重感染及心血管疾病等都可能具有潜在治疗作用。

中药山莨菪碱(anisodamine, Ani) 具有活血化瘀, 降低血液粘滞性, 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等。因此, 对 Ani 抗血栓形成的机制进行研究, 探讨其是否影响 EC 的 PAF-1 和 tPA 表达, 是否抑制脂多糖诱导的 EC 的 PAF-1 表达增强, 及其作用的可能通路, 有极重要的临床意义。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

用酶消化法分离新鲜脐带的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC)^[4] 种于明胶包被的 75 cm² 培养瓶, 于 37℃、5% CO₂ 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(ECGS) 和 5 μg/L 肝素的 M199 (Sigma)。待 hUVEC 融合后, 以 1:3 的比例传代培养。细胞呈典型铺石样形态。实验所用细胞为 2 至 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) Ani 组加入 0.1 μg/L Ani (国家药物和生物制剂研究所); (4) 脂多糖 + Ani 组同时加入 1 ng/L 脂多糖和 0.1 μg/L Ani。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 条件培养基中组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂 1 蛋白含量的测定

用酶联免疫吸附试验(ELISA) 检测各组 hUVEC 条件培养基中 PAF-1 和 tPA 的蛋白含量。所用抗体为兔抗人 PAF-1 和 tPA 的单克隆抗体, 方法按药盒说明书进行(Technoclone, 奥地利)。实验结果用方差分析进行统计学处理。

1.4 Northern 印迹分析

待生长于 75 cm² 培养瓶 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 1.2 步骤同样分为 4 组。分别加或不加脂多糖、山莨菪碱, 继续温育 18 h。用

异硫氰酸胍方法提取各组细胞总 RNA。各 RNA 样本经 1.2% 凝胶电泳后转移到 Duralon-UVTM 尼龙膜上(Stratagene, 美国), 57℃条件下预杂交 2 h, 然后换成含 10⁹ cpm/L α-³²P 标记 cDNA 探针的新鲜杂交液(50 mmol/L PIPES、100 mmol/L NaCl、50 mmol/L 磷酸钠、1 mmol/L EDTA、5% SDS), 57℃杂交过夜。杂交膜在室温下用 5% SDS、1×SSC 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^[6]。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 kb 和 2.2 kb 人 PAF-1 的 cDNA 探针(维也纳大学, 奥地利)。再杂交探针为鼠 GAPDH 的 cDNA 探针。探针用随机引物法按药盒说明书进行标记(Boehringer, 德国)。

1.5 电泳迁移检测(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

将生长于 225 cm² 培养瓶的融合 hUVEC 培养于含 1.25% FBS 的 M199 16 h, 继用 1 ng/L 脂多糖和/或 0.1 μg/L Ani 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, 离心 1 000 r/min, 收集细胞, 再用冷的缓冲液 A (10 mmol/L Hepes, pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl₂, 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 30 μL 冷的含 0.1% NP40 缓冲液 A, 混匀, 冰上孵育 10 min, 15 000 r/min、4℃离心 10 min 得细胞核, 加入 30 μL 冷的缓冲液 B (20 mmol/L hepes, pH 7.9, 25% glycerol, 0.42 mol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, 5 ng/L leupeptin, 5 ng/L pepstatin, 0.5 mmol/L spermidine, 0.15 mmol/L spermine, 5 ng/L aprotinin), 冰上孵育 15 min, 15 000 r/min、4℃离心 10 min, 用 20 μL 冷的缓冲液 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^[5]。其蛋白含量用微量蛋白检测法进行检测(Microassay Procedure, Biorad Laboratories GmbH, 德国), 用高纯度牛血清白蛋白(Boehringer, 德国) 作为标准品。核因子 KB 寡核苷酸探针(维也纳大学, 奥地利) 用 α-³²P (3 MCi/mol, Amersham) 按药盒说明书进行末端标记和纯化(Boehringer 德国)。蛋白结合于³²P 标记的核因子 KB 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 MgCl₂, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 10% Glycerol 和 5×10^9 cpm/L ³²P 标记的核因子 κB 探针。竞争组中,用脂多糖组的核蛋白作样本,在加入³²P 标记的核因子 κB 探针前,先加入 100 倍未标记的核因子 κB 探针。然后将反应液点样于 5% 聚丙烯酰胺凝胶上(30: 1, acrylamide to bisacrylamide), 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 °C 放射自显影于 X 光片上。

2 结果

2.1 条件培养基中纤溶酶原激活物抑制剂 1 和组织型纤溶酶原激活物蛋白量

培养的人脐静脉内皮细胞经 1 ng/L 脂多糖作用 18 h, 其条件培养基中 PAI-1 抗原量明显增加, 约为对照组的 2.5 倍 ($P < 0.01$, $n = 9$); Ani 组条件培养基中 PAI-1 抗原量明显低于对照组, 约为对照组的 74% ($P < 0.01$, $n = 9$); 若将 Ani 与脂多糖同时加入人脐静脉内皮细胞, 其条件培养基中 PAI-1 抗原量明显低于脂多糖组, 约为脂多糖组的 30 % ($P < 0.01$, $n = 9$), 为对照组的 75% ($P < 0.01$, $n = 9$)。而 tPA 的含量不随 Ani 的加入而有明显变化(表 1, Table 1)。

表 1. 人脐静脉内皮细胞条件培养基中纤溶酶原激活物抑制剂 1 和组织型纤溶酶原激活物蛋白含量($\bar{x} \pm s$, ng/10⁵ 个细胞)

Table 1. PAI-1 and tPA proteins in hUVEC conditioned media ($\bar{x} \pm s$, ng/10⁵ cells)

Group	PAI-1	tPA
Control	536.1 ± 16.4	12.3 ± 2.4
LPS	1 336 ± 151 ^a	11.8 ± 0.9
Ani	396.7 ± 21.6 ^a	10.8 ± 0.6
LPS+ Ani	402.1 ± 38.2 ^{ac}	10.9 ± 0.8

a: $P < 0.01$, compared with control group. c: $P < 0.01$, compared with LPS group.

2.2 条件培养基中纤溶酶原激活物抑制剂 1 mRNA 的表达

脂多糖可诱导人脐静脉内皮细胞表达 PAI-1 mRNA, 其 PAI-1 相对吸光度值为对照组的 284%; Ani 可抑制人脐静脉内皮细胞表达 PAI-1 mRNA, 其吸光度值为对照组的 70%; 脂多糖+ Ani 组的吸光度值为对照组的 68%, 为脂多糖单独处理组的 24% (图 1 和表 2, Figure 1 and Table 2)]。

2.3 电泳迁移检测核因子 κB 结果

对照组和 Ani 组人脐静脉内皮细胞细胞核中未检测到核因子 κB; 但经脂多糖刺激后, 细胞核中核因

子 κB 呈明显阳性反应; 脂多糖和 Ani 同时作用于 hUVEC, 其细胞核中核因子 κB 则呈阴性反应; 在未标记核因子 κB 探针竞争组中, 细胞核中核因子 κB 呈阴性反应, 说明此 EMSA 系统是成功的(图 2, Figure 2)。

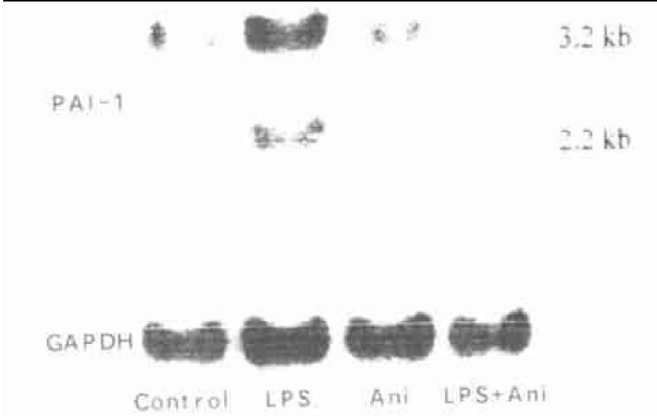


图 1. 人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 mRNA 的表达

Figure 1. Expression of PAI-1 mRNA by hUVEC

表 2. 人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂 1 mRNA 相对吸光度值(%)

Table 2. Relative absorbance values of PAI-1 mRNA in hUVEC(%)

Groups	Relative absorbance values
Control	100
LPS	284
Ani	70
LPS+ Ani	68

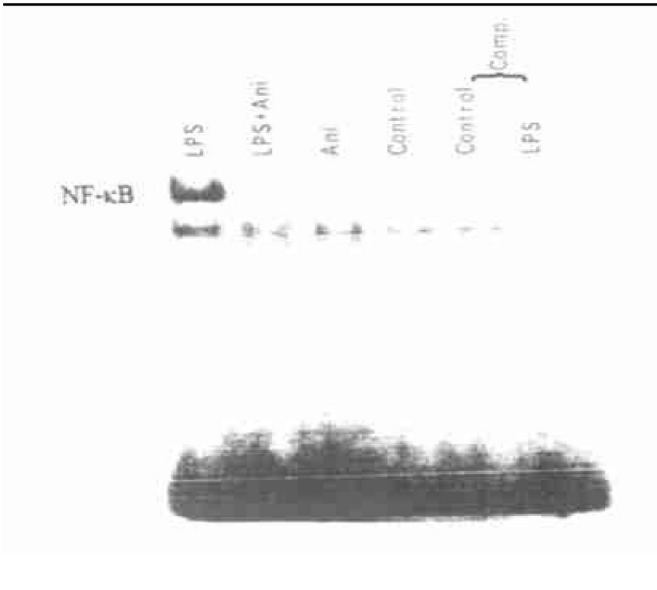


图 2. 电泳迁移检测人脐静脉内皮细胞核内核因子 κB

Figure 2. Nuclear fac tor κB in nuclei of hUVEC

3 讨论

血液中存在相互拮抗的凝血系统和纤溶系统。在生理状态下,血液中的凝血因子不断地被激活,从而产生凝血酶,形成微量纤维蛋白,沉着于血管内膜上,但这些微量的纤维蛋白又不断地被激活了的纤溶酶所溶解。上述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,有时在某些促凝血因素作用下,打破了上述动态平衡,便可触发凝血过程,形成血栓。纤溶酶原激活物抑制剂 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纤溶酶原激活物抑制剂 1 主要来源之一。血管 EC 分泌纤溶酶原激活物抑制剂 1 异常增加则导致血栓性疾病发生,也是 As 及其心脑血管合并症的危险因素。已知 EC 合成纤溶酶原激活物抑制剂 1 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 分泌纤溶酶原激活物抑制剂 1 与格兰氏阴性菌感染引起的休克,以及弥漫性血管内凝血(DIC)的发生关系密切^[1]。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致血管 EC 分泌纤溶酶原激活物抑制剂 1 增加有关^[6,7]。因此,若能有效地降低血管 EC 合成纤溶酶原激活物抑制剂 1 将有重要的临床意义。本课题组首次报道中药山莨菪碱不仅下行调节血管 EC 表达纤溶酶原激活物抑制剂 1,而且对脂多糖诱导的 EC 纤溶酶原激活物抑制剂 1 表达也有明显抑制作用,但对 EC 表达 tPA 并无明显影响,说明其对纤溶酶原激活物抑制剂 1 作用的特异性。这种下调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于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 κB 从胞浆进入胞核,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。文献报道,炎症过程中细胞因子和脂多糖可能通过核因子 κB 介导,引起目的基因的转录^[8]。本研究中,我们用 EMSA 法检测 hUVEC 核提取物核因子 κB 结合活性。结果发现,脂多糖促进 hUVEC 中核因子 κB 向核内

转移,与文献报道一致,但当山莨菪碱与脂多糖同时作用于 hUVEC 时,脂多糖所致核因子 κB 向核内转移则被阻断,提示山莨菪碱可能通过核因子 κB 途径下行调节脂多糖所致 hUVEC 高水平表达纤溶酶原激活物抑制剂 1。

另外,通过光镜观察及胎盼蓝拒染试验,我们证实山莨菪碱对 EC 的作用并非毒性作用,因为山莨菪碱的作用并没有引起 EC 损伤。因此,我们认为山莨菪碱可能通过核因子 κB 途径,下调血管 EC 纤溶酶原激活物抑制剂 1 的表达,而促进纤溶,阻止血栓的形成,发挥活血化淤、抗感染性休克、治疗心血管疾病等作用。

参考文献

- [1] Loskutoff DJ. Regulation of PAI-1 gene expression [J]. *Fibrinolysis*, 1991, **5**: 197- 202
 - [2] Held C, Hjerdahl P, Rehnqvist N, et al. Fibrinolytic variables and cardiovascular prognosis in patients with stable angina pectoris treated with verapamil or metoprolol: results from the angina prognosis study in Stockholm [J]. *Circulation*, 1997, **95**: 2 380- 386
 - [3] Iwai N, Shimoike H, Nakamura Y, et al. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor gene is associated with the time course of progression to acute coronary syndromes [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **136**: 109- 114
 - [4] 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[J]. *中华病理学杂志*, 1991, **20**: 205 - 208
 - [5] 阮秋蓉,宋建新,邓仲端. 川芎嗪抗血栓形成的机制研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6**: 297- 300
 - [6] Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, et al. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 6 998 - 7 002
 - [7] Kohler HP, Grant PJ. Mechanisms of disease: plasminogen activator inhibitor type 1 and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2000, **342**: 1 792- 801
 - [8] Collins T. Endothelial nuclear factor- κB and the initiation of the atherosclerotic lesion [J]. *Lab Invest*, 1993, **68**: 499- 508
- (此文 2000- 12- 14 收到, 2001- 07- 06 修回)
(此文编辑 胡必利)