

山莨菪碱对血管内皮细胞表达组织因子的影响

阮秋蓉¹, 宋建新², 邓仲端¹, 倪娟¹, Johann Wojta³

(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, 湖北省武汉市 430030; 3. 奥地利维也纳大学)

[关键词] 病理学; 山莨菪碱对内皮细胞的作用; 分子杂交; 组织因子; 脂多糖; 休克; 核因子 KB

[摘要] 通过研究山莨菪碱对内毒素脂多糖致血管内皮细胞组织因子表达的影响, 探讨山莨菪碱抗血栓形成以及治疗感染性休克的机制。采用酶消化法培养人脐静脉内皮细胞; 用一步凝固法检测培养的内皮细胞组织因子活性; Northern blot 检测内皮细胞组织因子 mRNA 的表达; 为了评估上述作用是否通过核因子 KB 途径转导, 采用电泳迁移变动检测法检测培养的内皮细胞核提取物核因子 KB DNA 结合活性。结果发现, 内毒素脂多糖使内皮细胞组织因子活性及其 mRNA 表达显著增强; 加入山莨菪碱后, 内毒素脂多糖的这种作用明显减弱, 并与山莨菪碱呈量效关系。且山莨菪碱能完全阻止内毒素脂多糖致内皮细胞核提取物核因子 KB DNA 结合活性。结果提示, 山莨菪碱治疗感染性休克的机制之一是通过拮抗内毒素脂多糖致血管内皮细胞组织因子的表达, 且这种拮抗作用可能通过、至少部分通过核因子 KB 途径转导。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Effect of Anisodamine on Tissue Factor Expression in Vascular Endothelial Cells

RUAN Qiu-Rong¹, SONG Jian-Xin², DENG Zhong-Duan¹, NI Juan¹, and Wojta J³

(1. Department of Pathology, 2. Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 3. Department of Internal Medicine II, University of Vienna, A-1090 Vienna, Austria)

[KEY WORDS] Tissue Factor; Lipopolysaccharide; Shock; Nuclear Factor KB; Anisodamine; Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of anisodamine on lipopolysaccharide (LPS)-induced expression of tissue factor (TF) in vascular endothelial cells (EC). **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) were cultured by trypsin digestion method. TF activity was measured in the lysates of hUVEC by using a single step clotting assay. Specific mRNA expressions were determined by Northern blotting. In order to evaluate a possible contribution of the nuclear factor KB (NF-KB) pathway on anisodamine effects, electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed using nuclear extracts from hUVEC and NF-KB binding oligonucleotides. **Results** Treatment of hUVEC with LPS resulted in a significant increase in TF activity. Anisodamine dose-dependently inhibited LPS induced upregulation of TF. These effects were also confirmed on the level of specific TF mRNA expression by Northern blotting. Furthermore, anisodamine completely abolished LPS induced NF-KB DNA binding activity in nuclear extracts from hUVEC treated with LPS together with anisodamine. **Conclusions** Anisodamine counteracts endothelial cell activation by inhibiting LPS-induced TF expression in these cells. Its interference with the NF-KB pathway might at least partly contribute to this effect. The ability of anisodamine to counteract the effect of LPS on endothelial cells might be one underlying mechanism explaining its antithrombosis and efficacy in the treatment of bacteraemic shock.

由革兰阴性菌产生内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)所引起的感染性休克是一种非常危险的临床现象, 其死亡率可达 50%~80%^[1]。脂多糖通过刺激某些细胞因子释放, 激活凝血纤溶和补体系统, 而导致弥漫性血管内凝血^[2,3]。在感染性休克及血栓形成病理过程中, 除单核细胞外, 内皮细胞是

脂多糖的主要靶细胞。脂多糖直接或间接作用于内皮细胞, 使之过度表达组织因子(tissue factor, TF)、纤溶酶原激活物抑制剂 1(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)及粘附分子等细胞因子, 而使其凝血活性增加^[4,6]。

中药山莨菪碱(anisodamine)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, 能显著降低感染性休克的死亡率, 还能改善微循环。本文主要探讨山莨菪碱是否拮抗脂多糖致内皮细胞组织因子表达, 而抑制脂多糖对内皮细胞的激活, 以及这种拮抗作用是否通过核因子 KB(nuclear factor KB, NF-KB)途径来转导。

1 材料与方法

[收稿日期] 2002-06-13

[修回日期] 2003-03-10

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

[作者简介] 阮秋蓉, 女, 1964 年 8 月出生, 湖北省荆州市人, 医学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化发病机制。E-mail: ruanqiuorong@sina.com。宋建新, 男, 1965 年 4 月出生, 湖北省鄂州市人, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为感染性疾病。邓仲端, 男, 1927 年 10 月出生, 广西省南宁市人, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化发病机制。

1.1 细胞培养

用酶消化法^[7]分离新鲜人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC), 种于明胶包被的 75 mL 培养瓶, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱内静置培养。培养基为含 20% 胎牛血清(FBS)、50 ng/L 内皮细胞生长添加剂(ECGS)和 0.005 u/L 肝素的 M199 (Sigma)。待 hUVEC 汇合后, 以 1:3 的比例传代培养。细胞呈典型铺石样形态。实验所用细胞为第 2~3 代。

1.2 实验分组

待生长于 24 孔板内 hUVEC 汇合后, 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。实验分为四组: 对照组: 不加实验药物; ④脂多糖组: 加入 1 mg/L 脂多糖; ④山莨菪碱组: 加入 100 mg/L 山莨菪碱(国家药物和生物制剂研究所); 脂多糖+山莨菪碱组: 同时加入 1 mg/L 脂多糖和 100 mg/L 山莨菪碱或不同浓度山莨菪碱(10、50 及 100 mg/L), 37℃培养箱内继续孵育一定时间后, 进行下面实验。同时用细胞计数器计量每孔细胞总数。

1.3 组织因子活性检测

待生长于 24 孔板内 hUVEC 汇合后, 按以上方法分为四组, 孵育 4 h。然后用 PBS 洗 3 次, 每孔加入 200 μ L 凝血缓冲液(12 mmol/L 醋酸钠、8 mmol/L 巴比妥钠、130 mmol/L 氯化钠, pH 7.4), 刮下细胞, 加入正常人血清 100 μ L 和 20 mmol/L CaCl₂ 100 μ L, 用凝血计测量凝血时间, 与标准曲线比较, 即可检测出每孔 hUVEC 组织因子活性。若在细胞溶解物中加入兔抗人组织因子抗体(100 mg/L; American Diagnostica, Greenwich, Conn.), 凝血活性则完全阻断, 说明细胞溶解物中的凝血活性可代表组织因子活性。

1.4 Northern blot 检测组织因子 mRNA 的表达

待生长于 75 mL 培养瓶 hUVEC 汇合后, 用 Hanks 平衡盐溶液洗 2 次, 换成含 1.25% FBS、50 ng/L ECGS 的 M199。按以上方法同样分为四组, 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 \times SSC 洗 10 min, 再于 57℃下用同样溶液洗 3 次。杂交膜置于暗盒, 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。本实验所用探针为人组织因子 cDNA 探针(维也纳大学, 奥地利)。再杂交探针为鼠 GAPDH cDNA 探针(Boehringer, 德国)。探针用随机引物法按药盒说明书进行标记。

1.5 电泳迁移变动检测核因子- κ B DNA 结合活性

将生长于 225 mL 培养瓶的汇合 hUVEC 培养于含 1.25% FBS 的 M199 16 h, 分别用 1 mg/L 脂多糖和 1 mg/L 脂多糖加 100 mg/L 山莨菪碱刺激 4 h。然后按文献[8]方法分别提取各组细胞核成分。其蛋白含量用微量蛋白检测法(Biorad Laboratories GmbH, 德国)进行检测, 用高纯度牛血清白蛋白(Boehringer, 德国)作为标准品。核因子- κ B (NF- κ B) 寡核苷酸探针(维也纳大学, 奥地利)用 α -³²P (3 \times 10⁶ Ci/mol, Amersham) 按药盒说明书(Boehringer, 德国)进行末端标记和纯化。蛋白结合于³²P 标记的 NF- κ B 寡核苷酸探针在反应液中室温下作用 30 min。反应液含下列物质: 5 μ g 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 \times 10⁹ cpm/L ³²P 标记的 NF- κ B 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 NF- κ B 探针前, 先加入 100 倍未标记的 NF- κ B 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 \times TBE (45 mmol/L Tris-borate 和 1 mmol/L EDTA)。然后干胶, -70℃放射自显影于 X 光片上。

1.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 组织因子活性及其 mRNA 表达

未经刺激 hUVEC 中, 只能检测到微弱的组织因子活性; 经 1 mg/L 脂多糖作用 4 h, hUVEC 的组织因子活性约增强 20 倍; 当山莨菪碱与脂多糖同时作用于 hUVEC, 其组织因子活性在一定范围内随山莨菪碱浓度增加而降低, 山莨菪碱浓度增至 100 mg/L 时, 其组织因子活性接近对照组; 而山莨菪碱单独作用于 hUVEC 时, 并不影响其组织因子活性(表 1, Table 1)。山莨菪碱与脂多糖共同刺激 hUVEC 18 h, 组织因子 mRNA 表达明显低于脂多糖单独作用组(图 1, Figure 1)。

表 1. 培养的人脐静脉内皮细胞组织因子活性

Table 1. TF activity in cultured hUVEC	
分 组	组织因子活性
对照组	0.52 ±0.02
脂多糖组	10.12 ±3.2
山莨菪碱组	0.54 ±0.05
1 mg/L 脂多糖+ 10 mg/L 山莨菪碱组	8.86 ±2.13
1 mg/L 脂多糖+ 50 mg/L 山莨菪碱组	2.77 ±1.62
1 mg/L 脂多糖+ 100 mg/L 山莨菪碱组	0.55 ±0.02

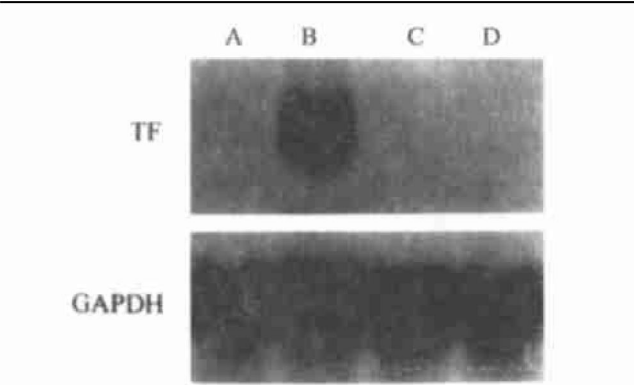


图 1. 山莨菪碱对脂多糖诱导培养的人脐静脉内皮细胞组织因子 mRNA 表达的作用 A: 对照组; B: 脂多糖组; C: 山莨菪碱组; D: 脂多糖+ 山莨菪碱组。

Figure 1. Effects of anisodamine on LPS-induced TF mRNA expression in cultured hUVEC A: control group; B: LPS group; C: anisodamine group; D: LPS+ anisodamine group.

2.2 核因子-κB DNA 结合活性

电泳迁移变动检测结果发现, 对照组 hUVEC 细胞核蛋白中未检测到 NF-κB DNA 结合活性; 但经脂多糖刺激后, 细胞核蛋白 NF-κB DNA 结合活性显著增强; 当脂多糖和山莨菪碱同时作用于 hUVEC, 其细胞核蛋白 NF-κB DNA 结合活性则完全被抑制。在加入未标记 NF-κB 探针竞争组中, 细胞核蛋白 NF-κB DNA 结合活性未能被检测到, 说明此电泳迁移变动检测系统是成功的(图 2, Figure 2)。

3 讨论

存在于革兰阴性菌外膜的脂多糖在革兰阴性菌引起的感染性休克中起重要作用。感染性休克常因凝血纤溶系统失调, 产生弥漫性血管内凝血, 微血管血栓形成和栓塞, 导致重要器官衰竭, 最终致患者死亡。脂多糖通过激活血管内皮细胞的凝血活性, 使内皮细胞 PAI-1 和组织因子表达增强, 从而使内皮细胞的抗凝血功能转变为抗纤溶功能。内皮细胞凝

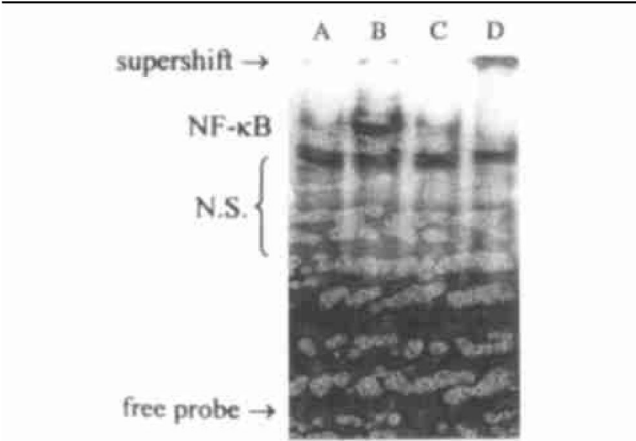


图 2. 山莨菪碱对脂多糖刺激的人脐静脉内皮细胞核提取物核因子-κB 活性的抑制作用 A: 对照组; B: 脂多糖组; C: 脂多糖+ 山莨菪碱组; D: 脂多糖+ 抗体组。

Figure 2. Inhibition of NF-κB activation in the nucleus of LPS stimulated hUVEC by anisodamine A: control group; B: LPS group; C: LPS+ anisodamine group; D: LPS+ antibody group.

血因子可受多种因素调节。我们曾报道山莨菪碱抗脂多糖诱导内皮细胞表达 PAI-1^[9], 氧化脂蛋白抑制内皮细胞组织因子通路抑制子 mRNA 的表达^[10]。本研究结果发现, 脂多糖可使培养的 hUVEC 组织因子活性增强 20 倍左右。然而, 当山莨菪碱与脂多糖同时作用于培养的 hUVEC 时, 脂多糖诱导 hUVEC 组织因子表达的作用则被减弱, 且减弱程度随山莨菪碱浓度增加而增大。山莨菪碱若单独作用于 hUVEC, 对其组织因子活性影响不大。Northern blot 显示, 山莨菪碱对 hUVEC 组织因子的作用, 同样反映在 mRNA 水平, 山莨菪碱与脂多糖同时作用于 hUVEC 时, 脂多糖诱导的组织因子 mRNA 表达几乎下降到未受刺激的对照组水平。感染性休克时, 微循环血栓栓塞可致多器官衰竭, 本研究结果说明山莨菪碱抗感染性休克的作用, 至少部分是通过抑制脂多糖激活内皮细胞的凝血活性, 使内皮细胞保持其抗凝血活性, 发挥抗血栓形成作用。曾有文献^[11]报道, 临床上用山莨菪碱抗休克, 可改善患者微循环功能。实验研究也发现山莨菪碱具有抗血栓形成和血小板聚集的作用^[12, 13]。本研究为山莨菪碱的临床应用及抗血栓形成的机制提供了新的实验依据。

为了进一步探讨山莨菪碱抗脂多糖诱导内皮细胞活性的机制, 本文观察了山莨菪碱对 NF-κB 的影响。在各种生理和病理的刺激下, NF-κB 从胞质进入胞核, 结合于相应基因特异位点, 对多种基因表达都具有调节作用。文献^[14]报道, 炎症过程中细胞因子和脂多糖可能通过 NF-κB 介导, 激活内皮细胞, 引

起目的基因,如粘附分子、趋化因子和组织因子的转录。有人曾用抗NF- κ B诱导剂如肿瘤坏死因子 α 或脂多糖抗体治疗感染性休克^[15]。本研究显示脂多糖诱导的hUVEC核提取物NF- κ B DNA结合活性可以完全被山莨菪碱所阻断,说明山莨菪碱能干扰NF- κ B途径。因此认为山莨菪碱可能通过,至少部分通过NF- κ B途径,下调脂多糖诱导hUVEC组织因子表达,促进纤溶,阻止血栓形成,从而发挥其改善微循环、抗感染性休克等作用。

[参考文献]

- [1] Parker MM, Parillo JE. Septic shock: Hemodynamics and pathogenesis. *JAMA*, 1983, **250** (24): 3 324-327
- [2] Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med*, 1991, **115** (6): 457-469
- [3] Cybulsky MI, Chan MK, Movat HZ. Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin 1, and tumor necrosis factor and their implication in gram-negative infection. *Lab Invest*, 1988, **58** (4): 365-378
- [4] Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial activation. *Physiol Rev*, 1990, **70**: 427-451
- [5] 阮秋蓉, 宋建新, 邓仲端. 川芎嗪抗血栓形成的机制研究. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (4): 297-300
- [6] Colucci M, Paramo JA, Collen D. Generation in plasma of a fast acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation. *J Clin Invest*, 1985, **75**: 818-824
- [7] 阮秋蓉, 邓仲端, 徐增媛. 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**: 205-208
- [8] Schneideman J, Sawdey MS, Keeton MR, Bordin GM, Bernstein EF, Dilley RB, et al. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (15): 6 998-7 002
- [9] 阮秋蓉, 宋建新, 邓仲端, 瞿智玲, 倪娟. 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. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (3): 194-197
- [10] 王国平, 倪娟, 邓仲端. 氧化型低密度脂蛋白抑制人内皮细胞组织因子通路抑制子 mRNA 的表达. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 288-291
- [11] Su JY. Cell protection mechanism of antishock action of anisodamine. *Chin Med J*, 1992, **105**: 976-979
- [12] Li XJ, Gray BM, Oliver JR. Delayed thromboxane synthesis inhibition, but not cholinergic blockade, reverses group B streptococcus-induced pulmonary hypertension. *Dev Pharmacol Ther*, 1992, **19**: 40-49
- [13] Xiu RJ, Hammerschmidt DE, Coppo PA. Anisodamine inhibits thromboxane synthesis, granulocyte aggregation, and platelet aggregation. A possible mechanism for its efficacy in bacteraemic shock. *JAMA*, 1982, **247**: 1 458-460
- [14] Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest*, 1993, **68**: 499-508
- [15] Greeman RL, Schein RM, Martin MA. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. *JAMA*, 1991, **1 266**: 1 097-102

(此文编辑 文玉珊)

•作者•作者•编者•

关于改[主题词]为[关键词]并规范关键词选择的告示

本刊编辑部

遵照中国科协学会学术部的指示,自2003年第11卷第1期起,本刊将学术论文中的中文[主题词]改为[关键词],编排位置不变。现就有关事项告知于众。

1 关于关键词的个数

本刊认为,文章类别不同,关键词个数应有所差别。本刊对各类文章规定标引的关键词是:①实验研究论文不少于7个;其它研究论文、研究简报和快报不少于6个;②临床诊治经验、文献综述、评论和其它文章不少于5个。

2 关于关键词的选择

第一个关键词列出该文主要工作或内容所属二级学科名称。与本刊有关的二级学科是:细胞生物学、生理学、生物化学、分子生物学、神经生物学和生物工程;流行病学、营养学、毒理学、中医学、民族医学、中西医结合医学、中药学、人体解剖学、组织胚胎学、病理学、药理学、放射医学、医学实验动物学、生物医学工程学、临床诊断学、内科学、外科学、儿科学、妇产科学、眼科学、神经病学、药物化学、生物药理学、药理学、医药工程和特种医学。

二级学科的选择,由作者根据论文内容和所在科室来决定,一篇文章只能选择属于一个二级学科。作者选择好二级学科后,编辑部一般不作修改。

第二个关键词列出该文研究得到的成果名称或文内若干个成果的总类别名称。

文章的研究成果名称或研究成果总类别名称应简单明确,一般不超过15个汉字,应由作者自己根据文章主要内容来决定,编辑部可作适当修改。

第三个关键词视文章种类有别:对于实验研究、临床研究和流行病学研究等论文,列出该文在得到上述成果或结论时采用的科学研究方法的具体名称。一篇论文往往采用多种研究方法,此处只列最主要的一种。对于综述和评述性论文,此处只写“综述”或“评论”。对于方法学论文,此处只写应用方法名称,不写被研究的方法名称。后者出现于第二个关键词的位置。

第四个以后的关键词必须列出在前三个关键词中没有出现的,但被该文作为主要研究的事件或物质名称。这些关键词应在题目和摘要中出现过,作者认为读者用这些词就能很快找到这篇文章的词。

作者在选择关键词时应注意:①集合名词、动词、动名词、形容词和副词等单独存在时不能用作关键词;中文关键词只能用汉字或数字,不能用英文缩写词或全英文。

以上规定,请广大作者遵照执行。