

# 外源性硫化氢对氧化型低密度脂蛋白诱导组织因子和组织因子途径抑制物表达的影响

邓华菲<sup>1,2</sup>, 任重<sup>1</sup>, 索荣<sup>1</sup>, 屈顺林<sup>1</sup>, 唐志晗<sup>1</sup>, 刘录山<sup>1</sup>, 郭芳<sup>1</sup>, 王佐<sup>1</sup>, 姜志胜<sup>1</sup>

(1. 南华大学心血管疾病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湘南学院病理生理学教研室, 湖南省郴州市 423000)

[关键词] 硫化氢; 氧化型低密度脂蛋白; 组织因子; 组织因子途径抑制物; 内皮细胞

[摘要] **目的** 研究外源性硫化氢对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导内皮细胞组织因子(TF)和组织因子途径抑制物(TFPI)表达的影响。**方法** 培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 分别以不同浓度 NaHS(25、50、100 及 200  $\mu\text{mol/L}$ )和 50 mg/L ox-LDL 共孵育, RT-PCR 和 ELISA 分别检测 TF 和 TFPI mRNA 表达和蛋白含量。**结果** 用 50 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC 24 h 后, TF mRNA 表达上调 8 倍, 蛋白含量增加 7 倍( $P < 0.01$ ); 而 TFPI mRNA 表达降低 73%, 蛋白含量减少 65% ( $P < 0.01$ )。用 25、50、100 及 200  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 预孵育 HUVEC 1 h, 再与 ox-LDL 共同孵育, 与 ox-LDL 组相比, 加入不同浓度 NaHS 组 TF mRNA 分别降低 12%、31%、63% 和 80% ( $P < 0.05$ ), 蛋白含量分别降低 13%、30%、62% 和 77%; TFPI mRNA 表达分别升高 0.6、1.2、2.0 和 2.6 倍, 蛋白含量分别升高 0.3、0.7、1.1 和 1.6 倍。**结论** NaHS 能抑制 ox-LDL 对内皮细胞 TF 表达的诱导作用, 减轻 ox-LDL 对内皮细胞 TFPI 表达的抑制作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Hydrogen Sulfide on the Expression of Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor Induced by ox-LDL

DENG Hua-Fei<sup>1,2</sup>, REN Zhong<sup>1</sup>, SUO Rong<sup>1</sup>, QU Shun-Lin<sup>1</sup>, TANG Zhi-Han<sup>1</sup>, LIU Lu-Shan<sup>1</sup>, GUO Fang<sup>1</sup>, WANG Zuo<sup>1</sup>, and JIANG Zhi-Sheng<sup>1</sup>

(1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Pathophysiology, Xiangnan College, Chenzhou, Hunan 423000, China)

[KEY WORDS] Hydrogen Sulfide; Oxidized Low Density Lipoprotein; Tissue Factor; Tissue Factor Pathway Inhibitor; Endothelial Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ) on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced expression of tissue factor (TF) and tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in endothelial cells. **Meth-**

**ods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured and treated with ox-LDL (50 mg/L) in the absence or presence of NaHS for 24 h. The mRNA expression and protein content of TF and TFPI in HUVEC were determined by RT-PCR and ELISA, respectively. **Results** Treatment with ox-LDL for 24 h caused an increased TF mRNA and protein expression by 8 and 7 times, respectively ( $P < 0.01$ ), and a decreased TFPI mRNA and protein expression by 73% and 65%, respectively ( $P < 0.01$ ).

However, pretreatment of HUVEC with different concentrations (25, 50, 100 and 200  $\mu\text{mol/L}$ ) of NaHS (the donor of  $\text{H}_2\text{S}$ ) for 1 h before ox-LDL stimulation resulted in a marked inhibition of ox-LDL-induced TF mRNA and protein expression by 12%, 31%, 63%, 80% and 13%, 30%, 62%, 77%, respectively ( $P < 0.05$ ), and an increase of ox-LDL-induced inhibition in TFPI mRNA and protein expression by 0.6, 1.2, 2.0, 2.6 times and 0.3, 0.7, 1.1, 1.6 times, respectively ( $P < 0.05$ ). **Conclusion**  $\text{H}_2\text{S}$  can inhibit ox-LDL-induced TF expression and increases ox-LDL-inhibited TFPI expression in endothelial cells.

[收稿日期] 2011-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30971169, 81170277)项目; 湖南省应用基础研究计划重点项目(30971169); 湖南省普通高校科技创新团队支持计划(2008-244); 南华大学留学归国人员科研启动基金

[作者简介] 邓华菲, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化发生机制与防治, E-mail 为 denghuafei@126.com。通讯作者姜志胜, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的病因发病学与防治, E-mail 为 zsjiang2005@163.com。

血栓形成与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生发展密切相关。组织因子(tissue factor, TF)是因子Ⅶ的辅因子和受体,在启动外源性及内源性凝血过程中起非常重要的作用。正常状态下内皮细胞并不表达TF,但在血管壁受损或某些病理条件下可刺激内皮细胞表达TF。引起内皮细胞损伤的原因有很多,常见的如炎症因子<sup>[1]</sup>和高脂血症<sup>[2]</sup>可诱导内皮细胞表达TF。组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)是TF-FⅦa复合物最重要的生理性抑制物,正常情况下主要表达于血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和外膜层的微血管内皮。在某些病理情况下,TFPI的表达会发生改变。Jin等<sup>[3]</sup>研究发现,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )降低内皮细胞TFPI mRNA和蛋白表达,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)可以减少人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)TFPI的表达<sup>[2]</sup>。有关TF及TFPI表达的调控因素仍未完全明了,深入开展TF及TFPI表达的调控研究有助于进一步阐明凝血过程以及As血栓形成的机制,具有十分重要的意义。

硫化氢( $H_2S$ )是继一氧化氮和一氧化碳之后的又一气体信号分子。临床研究发现低 $H_2S$ 水平与冠心病的病情严重程度、冠状动脉血管病变情况、冠心病危险因素密切相关<sup>[4,5]</sup>。大量动物实验和细胞模型研究表明, $H_2S$ 具有明显的抗As作用;抑制自发性高血压大鼠的血管重构<sup>[6]</sup>;抑制主动脉平滑肌细胞增殖和促进其凋亡<sup>[7,8]</sup>;影响炎症反应<sup>[9]</sup>;抑制各种激动剂诱导的血小板聚集等<sup>[10]</sup>。最近本室发现,外源性 $H_2S$ 能抑制ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡和巨噬细胞内脂质蓄积<sup>[11,12]</sup>。本研究拟观察外源性 $H_2S$ 对ox-LDL诱导内皮细胞TF和TFPI表达的影响,旨在初步探索 $H_2S$ 对凝血系统活性的调控作用,为As血栓形成的干预提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和材料

$H_2S$ 供体NaHS购自Sigma公司,ox-LDL购自广州奕源生物科技有限公司,RT试剂盒购自Promega公司,Taq PCR MasterMix和DNA marker购自北京天根公司,胰蛋白酶和胎牛血清购自杭州四季青公司,TF、TFPI和内参引物由上海生工生物工程有限公司合成,TF和TFPI ELISA试剂盒购自美国RD公司。

### 1.2 细胞培养

HUVEC-12细胞株来源于中南大学湘雅医学院细胞中心。HUVEC-12贴壁生长于含10%胎牛血清DMEM培养液中,在37℃、5%  $CO_2$ 培养箱中静置培养。每2~3天更换培养基并传代。取对数生长期细胞进行实验。每次实验前24 h换无血清培养基同步化后加处理因素。

### 1.3 实验分组

细胞分组处理:①正常对照组用含10%胎牛血清DMEM培养液培养24 h;②ox-LDL组在DMEM培养液中加入终浓度50 mg/L ox-LDL培养24 h;③ox-LDL + NaHS组分别经不同终浓度(25、50、100及200  $\mu$ mol/L) NaHS预孵育1 h后再与50 mg/L ox-LDL共同培养24 h;④NaHS组在DMEM培养液中加入终浓度200  $\mu$ mol/L NaHS培养24 h。

### 1.4 RT-PCR检测TF和TFPI mRNA的表达

收集细胞,使用Trizol试剂提取细胞总RNA,融于无RNase水中,紫外分光光度计测定 $OD_{260}/OD_{280}$ 的比值在1.8~2.0之间,并计算RNA浓度。各标本取0.2  $\mu$ g总RNA用M-MuLV反转录酶合成cDNA。人TF引物序列上游5'-AGA GGA TAG AAT ACA TGG AAA CGC-3',下游5'-CTA AAG CAT GTT ATG TGC AAA AGG-3',产物长度210 bp;TFPI引物序列上游5'-TTT GAA TAC AGA GAA TGA ACA AAG C-3',下游5'-CAA GAA AGA CAT ATA CTG AGA TGG C-3',产物长度201 bp;PCR反应条件:94℃预变性4 min,94℃下变性30 s,56.5℃退火30 s,72℃延伸1 min,32个循环,72℃继续延伸10 min。内参照采用GAPDH,引物序列上游5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG -3',下游5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG -3',产物长度为697 bp。PCR反应条件:94℃预变性5 min,94℃变性下30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,26个循环,72℃继续延伸5 min。反应结束后,取RT-PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶电泳中电泳,TF和TFPI加样量均为5  $\mu$ L, GAPDH的加样量为1  $\mu$ L,溴化乙锭染色。用凝胶成像分析系统对电泳条带拍照以及分析,以各组目的基因与内参基因吸光度值的比值比较目的基因mRNA表达差异。每组实验重复3次。

### 1.5 ELISA检测TF和TFPI的蛋白含量

细胞培养后,收集细胞培养上清液检测TFPI蛋白含量。细胞于37℃与-80℃间反复冻融3次,以获取细胞冻融液检测TF蛋白含量。TF和TFPI蛋白测定采用双夹心ELISA,其原理是吸附在固体测定板上的多克隆抗体与被测蛋白结合,加入酶连接的单克隆抗

体与已被多克隆抗体结合的蛋白结合,最后加入发色底物,15 min 内在酶标仪上 450 nm 波长处读取吸光值。标准曲线可通过以不同浓度 TF 标准品或者 TFPI 标准品的吸光值对相应浓度作图得到纵、横坐标分别为  $A_{450}$ 、TF 或 TFPI 浓度,样品的浓度即可从曲线上查得,具体操作过程按试剂盒说明进行。

1.6 统计学方法

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。用 One-way ANOVA 进行统计学处理,组间差异采用 Newman-Student 多重比较  $t$  检验。双侧  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NaHS 对 ox-LDL 诱导 TF mRNA 表达的影响

与正常对照组相比,50 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC 24 h 后 TF mRNA 的表达上调 8 倍( $P < 0.01$ )。而用不同浓度的 NaHS 预孵育 HUVEC 1 h,再用 50 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC,能显著抑制 ox-LDL 诱导的 TF mRNA 表达,与 ox-LDL 组相比,TF mRNA 分别降低 12%、31%、63% 和 80% (图 1)。用 200  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 单独孵育 HUVEC 24 h 没有明显影响 TF mRNA 表达(数据未显示)。

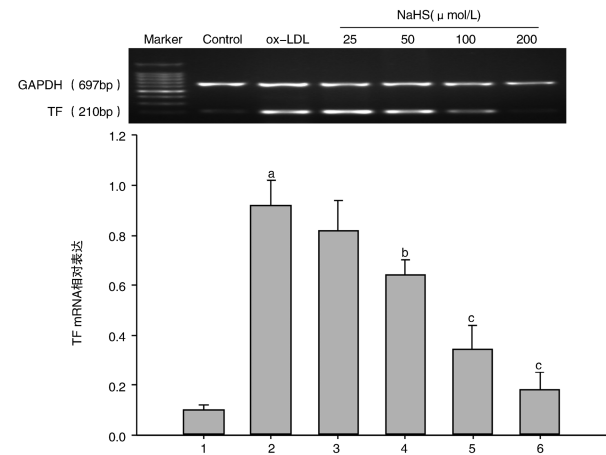


图 1. 不同浓度 NaHS 对 ox-LDL 诱导的 HUVEC TF mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) 1-6 分别为正常对照组、ox-LDL 组、ox-LDL + 25  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组、ox-LDL + 50  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组、ox-LDL + 100  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组、ox-LDL + 200  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组。a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,c 为  $P < 0.01$ ,与 ox-LDL 组比较。

Figure 1. Effects of different concentrations of NaHS on the expression of HUVEC TF mRNA induced by ox-LDL

2.2 NaHS 对 ox-LDL 抑制 TFPI mRNA 表达的影响

与正常对照组相比,用 50 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC 24 h 后 TFPI mRNA 表达降低 73% ( $P < 0.01$ )。而用不同浓度 NaHS 预孵育 HUVEC1 h,再用

50 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC 24 h,能明显拮抗 ox-LDL 对 TFPI mRNA 表达的抑制作用,与 ox-LDL 组相比,TFPI mRNA 分别升高 0.6、1.2、2.0 和 2.6 倍(图 2)。用 200  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 单独孵育 HUVEC 24 h 没有明显改变 TFPI mRNA 表达(数据未显示)。

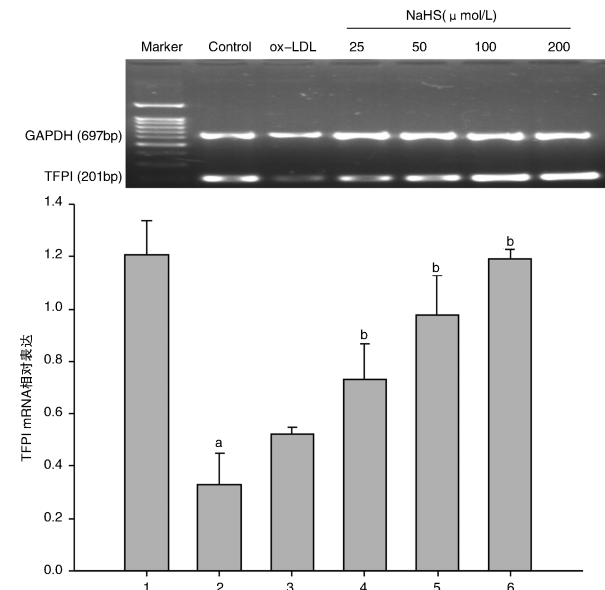


图 2. 不同浓度 NaHS 对 ox-LDL 抑制 HUVEC TFPI mRNA 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) 1-6 分别为正常对照组、ox-LDL 组、ox-LDL + 25  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组、ox-LDL + 50  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组、ox-LDL + 100  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组、ox-LDL + 200  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组。a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 ox-LDL 组比较。

Figure 2. Effects of different concentrations of NaHS on the expression of HUVEC TFPI mRNA inhibited by ox-LDL

2.3 不同浓度 NaHS 对 ox-LDL 诱导 TF 和 TFPI 蛋白表达的影响

与正常对照组相比,用 50 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC 24 h 后 TF 蛋白含量增加 7 倍,而 TFPI 蛋白含量减少 65%;用不同浓度 NaHS 预孵育 1 h,再用 50 mg/L ox-LDL 处理 HUVEC 24 h,与 ox-LDL 组相比,TF 蛋白含量分别降低 13%、30%、62% 和 77%;而 TFPI 蛋白含量增加,分别为 ox-LDL 组的 0.3、0.7、1.1 和 1.6 倍(图 3)。用 200  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 单独孵育 HUVEC 24 h 没有明显影响 TF 和 TFPI 蛋白含量(数据未显示)。

3 讨论

血栓形成在 As 发生发展过程中起重要作用,而 TF 是血栓形成的关键因子。TF 即凝血因子Ⅲ,是一种细胞膜结合蛋白,一旦与凝血因子Ⅶa(FⅦa)结合即启动外源性凝血途径,但它在完整的血管内

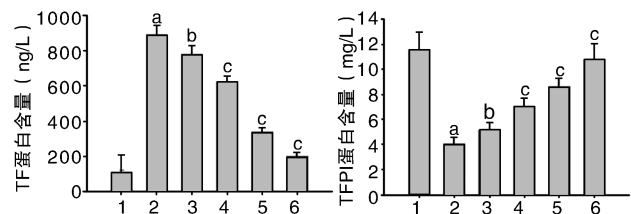


图3. 不同浓度 NaHS 对 ox-LDL 抑制 HUVEC TF 和 TFPI 蛋白含量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ ) 1-6 分别为正常对照组、ox-LDL 组、ox-LDL + 25  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组、ox-LDL + 50  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组、ox-LDL + 100  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组、ox-LDL + 200  $\mu\text{mol/L}$  NaHS 组。a 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与 ox-LDL 组比较。

**Figure 3. Effects of different concentrations of NaHS on the concentrations of HUVEC TF and TFPI protein induced by ox-LDL**

皮中并不表达,在病理条件下则可诱发表达<sup>[1,2]</sup>。TF-FⅦa 复合物最重要的生理性抑制物是 TFPI,系一种 Kunitz 结构域型的丝氨酸蛋白酶抑制剂,可直接抑制 FⅩa,诱导 TF-FⅦa 催化复合物的反馈抑制,起到抑制血栓形成的作用。正常情况下 TFPI 主要由内皮细胞结构性地合成和分泌,通过蛋白多糖结合在细胞表面上。本研究中,正常对照组 HUVEC TF 表达量极少,而 TFPI 具有一定的表达量,与上述结论一致。

ox-LDL 是 As 的独立危险因素,它除了具有诱导血管平滑肌细胞增殖、促使泡沫细胞形成、促进血小板聚集等作用外,还可作用于血管内皮,导致局部凝血功能紊乱。ox-LDL 能诱导培养的 HUVEC TF 表达,而抑制 TFPI 表达<sup>[2]</sup>,从而使血管内凝血增强,导致凝血酶生成,促进 As 与血栓形成。本研究中也得到相似的结果,用 50 mg/L ox-LDL 孵育 HUVEC 24 h 后,TF mRNA 的表达增加,蛋白含量增多,而 TFPI mRNA 的表达降低,蛋白含量减少。

鉴于 ox-LDL 在血栓形成中的重要作用,因此预防 ox-LDL 诱导的血栓形成已成为处理 As 等心脑血管疾病的手段之一。H<sub>2</sub>S 是继 NO 和 CO 之后的又一新的具有心血管调节功能的气体信号分子。H<sub>2</sub>S 能通过改善血管内皮功能<sup>[13]</sup>、促进血管平滑肌细胞凋亡和抑制其增殖<sup>[7,8]</sup>等来实现抗 As 作用。但 H<sub>2</sub>S 是否影响凝血尚不清楚。本研究结果发现,预先用外源性 H<sub>2</sub>S 的供体 NaHS 孵育能明显抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞 TF mRNA 表达和蛋白含量的增加,拮抗 ox-LDL 对内皮细胞 TFPI mRNA 和蛋白表达的抑制作用。

综上所述,本研究发现 NaHS 能抑制 ox-LDL 对 TF 表达的诱导作用,并减弱 ox-LDL 对 TFPI 表达的

抑制作用,提示 H<sub>2</sub>S 具有一定的抗凝作用,为 H<sub>2</sub>S 防治血栓性疾病和 As 血栓形成的干预提供了新的思路和策略。H<sub>2</sub>S 的这种作用机制尚不明确,可能与其减少细胞内活性氧的产生,干扰 TF 和 TFPI 表达的信号转导通路有关,其确切调控机制有待于进一步深入研究。

**[参考文献]**

[1] Zhang W, Wang J, Wang H, et al. Cadesine inhibits tissue factor induction and thrombus formation by activating the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30 (5): 1 000-006.

[2] 刘伟,朱自强,祖淑玉,等. 脐静脉内皮细胞组织因子及其抑制物表达中银杏内酯 B 的干预效应[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11 (6): 1 053-056.

[3] Jin H, Qiu WB, Mei YF, et al. Testosterone alleviates tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated tissue factor pathway inhibitor downregulation via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B in endothelial cells[J]. *Asian J Androl*, 2009, 11 (2): 266-271.

[4] 江海龙,吴宏超,李志梁,等. 冠心病病人血浆中新型气体信号分子硫化氢的变化[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25 (8): 951-954.

[5] 据长霖,高大胜. 血浆硫化氢水平与冠心病的相关性研究[J]. *中华全科医学*, 2010, 8 (3): 280-281.

[6] Zhao X, Zhang LK, Zhang CY, et al. Regulatory effect of hydrogen sulfide on vascular collagen content in spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertens Res*, 2008, 31 (8): 1 619-630.

[7] Baskar R, Sparatore A, Del Soldato P, et al. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative inhibit rat vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 594 (123): 128.

[8] Yang G, Wu L, Wang R. Pro-apoptotic effect of endogenous H<sub>2</sub>S on human aorta smooth muscle cells[J]. *FASEB J*, 2006, 20 (3): 553-555.

[9] Oh GS, Pae HO, Lee BS, et al. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- $\kappa$ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41 (2): 106-119.

[10] Zagli G, Patacchini R, Trevisani M. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 559 (1): 65-68.

[11] 任重,赵战芝,彭湘萍,等. 硫化氢对抗氧化型低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (7): 586.

[12] Zhao ZZ, Wang Z, Li GH, et al. Hydrogen sulfide inhibits macrophage-derived foam cell formation[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236 (2): 169-176.

[13] Pan LL, Liu XH, Gong QH, et al. Hydrogen sulfide attenuated tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammatory signaling and dysfunction in vascular endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6 (5): e19766.

(此文编辑 文玉珊)