

· 实验研究 ·

山莨菪碱对血管内皮细胞组织因子和纤溶酶原
激活物抑制剂 1 表达的影响及其机制研究阮秋蓉¹ 宋建新² 邓仲端¹ 瞿智玲¹

摘要 目的 通过研究山莨菪碱对内毒素脂多糖(LPS)致血管内皮细胞组织因子(TF)和纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI-1)表达的影响,探讨山莨菪碱治疗感染性休克的机制。**方法** 用酶消化法培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC);ELISA 方法检测 HUVEC 条件培养液 PAI-1 蛋白量;用一步凝固法检测 HUVEC TF 活性;Northern blot 检测 HUVEC TF 和 PAI-1 的 mRNA 表达;为了评估上述作用是否通过 NF- κ B 途径而转导,用电泳迁移变动检测法(EMSA)检测 HUVEC 核提取物 NF- κ B DNA 结合活性。**结果** LPS 能使 HUVEC PAI-1 蛋白和 TF 活性及其 mRNA 表达显著增强,加入山莨菪碱后,LPS 的这种作用明显减弱,并与山莨菪碱呈量效关系。山莨菪碱能完全阻止 LPS 致内皮细胞核提取物 NF- κ B DNA 结合活性。**结论** 山莨菪碱治疗感染性休克的机制之一可能是通过拮抗 LPS 致 HUVEC TF 和 PAI-1 的表达。而且这种拮抗作用可能通过 NF- κ B 途径来转导。

关键词 山莨菪碱;内毒素;血管内皮细胞;组织因子;纤溶酶原激活物抑制剂 1;核因子- κ B

Study on Effect of Anisodamine on Expressions of Tissue Factor and Plasminogen Activator-1 Inhibitor in Vascular Endothelial Cells and Its Mechanisms RUAN Qiu-rong, SONG Jian-xin, DENG Zhong-duan, et al *Department of Pathology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030)*

Objective To explore the mechanism of anisodamine in treating infectious shock through studying effect of anisodamine on endotoxin lipopolysaccharide (LPS) induced expression of tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in vascular endothelial cells (EC). **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were cultured by trypsin digestion method. PAI-1 was measured in the conditioned medium of HUVEC by a specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), whereas TF activity was measured in the lysates of these cells 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-kappa B (NF- κ B) pathway on the transductive effects observed, electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed using nuclear extracts from HUVEC and NF- κ B binding oligonucleotides. **Results** LPS could significantly strengthen the expression of HUVEC PAI-1 protein and TF activity and its mRNA, this effect of LPS could be markedly weakened after adding Anisodamine dose-dependently. Anisodamine could also completely block the LPS induced NF- κ B DNA binding activity in nuclear extracts from HUVEC. **Conclusion** The possible mechanism of anisodamine in treating infectious shock may be through antagonizing LPS induced HUVEC TF and PAI-1 expression, and the antagonism might be, at least partially, transduced by path of NF- κ B.

Key words anisodamine; endotoxin; vascular endothelial cell; tissue factor; plasminogen activator inhibitor type 1; nuclear factor- κ B

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 39730220);武汉市科委晨光计划项目(No. 985003086)

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

通讯作者:阮秋蓉, Tel: 027-83692619, Fax: 027-83692550, E-mail: ruanqiorong@sina.com

格兰氏阴性菌产生内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引起的感染性休克是一种非常危险的临床现象,其病死率可达 50%~80%^[1,2]。LPS 通过刺激某些细胞因子的释放,激活凝血纤溶和补体系统,而导致弥漫性血管内凝血(DIC)^[3,4]。在感染性休克病理过程

中,除单核细胞外,内皮细胞(endothelial cell, EC)是 LPS 的主要靶细胞。LPS 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 type-1 PAI-1)及黏附分子等细胞因子,而使其凝血活性增加^[5,6]。

山莨菪碱(anisodamine, Ani)具有活血化瘀,降低血液黏滞性,抗血栓形成等作用^[7]。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病死率,还能改善患者的微循环。本研究对山莨菪碱抗感染性休克的机制进行研究,探讨其是否拮抗 LPS 致 EC 的 TF 和 PAI-1 表达,而抑制 LPS 对 EC 的激活,以及这种拮抗作用是否通过核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)途径来转导,为其临床应用寻找实验依据。

材料与方法

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)^[8]种于明胶包被的 75cm² 培养瓶,置 37℃、5%CO₂ 培养箱内静置培养。培养液为含 20%胎牛血清(FBS)、50ng/L 内皮细胞生长添加剂(endothelial cell growth supplement, ECGS)和 0.005U/L 肝素的 M199(Sigma 公司产品)。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 2~3 代。

2 内皮细胞条件培养液的制备 待生长于 24 孔板内 HUVEC 融合后,用 Hank's 平衡盐溶液洗 2 次,换成含 1.25% FBS、50ng/L ECGS 的 M199,每孔 0.5ml。实验分为:(1)对照组:不加实验药物;(2)LPS 组:加入 1mg/L LPS;(3)山莨菪碱组:加入 100mg/L 山莨菪碱;(4)LPS 加山莨菪碱组:同时加入 1mg/L LPS 和不同浓度山莨菪碱(10、100、500mg/L,国家药物和生物制剂研究所),37℃ 培养箱内继续孵育 18h。另将实验分为(1)对照组:不加实验药物;(2)LPS 组:加入 1mg/L LPS;(3)LPS 加山莨菪碱组:同时加入 1mg/L LPS 和 100mg/L 山莨菪碱,37℃ 培养箱内继续孵育 6、12、18、24h,分别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。

3 条件培养液中 PAI-1 和组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)抗原含量的测定 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组 HUVEC 条件培养液中 PAI-1 和 t-PA 的抗原含量。所用抗体为兔抗人 PAI-1 和 t-PA 的单克隆抗体(Technoclone, 奥地利),方法按药盒说明书进行。实验结果进行方差

分析。

4 TF 活性检测 待生长于 24 孔板内 HUVEC 融合后,用 Hank's 平衡盐溶液洗 2 次,换成含 1.25% FBS、不同浓度山莨菪碱(10、50、100mg/L)和(或)1mg/L LPS 的 M199,孵育 4h。然后用 PBS 洗 3 次,每孔加入 200 μ l 凝血缓冲液(12mmol/L 醋酸钠、8mmol/L 戊巴比妥钠、130mmol/L 氯化钠, pH 7.4),刮下细胞,加入 100 μ l 健康人血清和 100 μ l 20mmol/L CaCl₂,用凝血计测量凝血时间,与标准曲线比较,即检测出每孔 HUVEC 的 TF 活性。若在细胞溶解物中加入兔抗人 TF 抗体(100 μ g/ml,美国),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 TF 活性。实验结果进行方差分析。

5 Northern blot 待生长于 75cm² 培养瓶 HUVEC 融合后,用 Hank's 平衡盐溶液洗 2 次,换成含 1.25% FBS、50ng/L ECGS 的 M199。按以上试验同样分为 4 组,分别加或不加 1mg/L LPS、100mg/L 山莨菪碱,继续温育 2h 或 18h。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 2h,然后换成含 10⁹cpm/L α -³²P 标记 cDNA 探针的新鲜杂交液(50mmol/L PIPES、100mmol/L NaCl、50mmol/L 磷酸钠、1mmol/L EDTA、5% SDS),57℃ 杂交过夜。杂交膜在室温下用 5% SDS、1 $\times$ SSC 洗 10min,再于 57℃ 下用同样溶液洗 3 次。置杂交膜于暗盒,用 XAR-5X 线片于 -70℃ 下自显影 12~48h^[9]。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 3.2kb 和 2.2kb 人 PAI-1 的 cDNA 探针及人 TF 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)。

6 电泳迁移变动检测(electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 将生长于 15cm $\times$ 15cm 培养瓶的融合 HUVEC 培养于含 1.25% FBS 的 M199 16h,继用 1mg/L LPS 和(或)100mg/L 山莨菪碱刺激 4h。然后按文献^[10]方法分别提取各组细胞核成分。其蛋白含量按微量蛋白检测药盒说明书(Microassay Procedure, 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。

NF- κ B 寡核苷酸探针(维也纳大学,奥地利)用 α -³²P(3000 Ci/mmol, Amersham)按药盒说明书进行末

端标记和纯化(Boehringer, 德国)。蛋白与³²P 标记的 NF-κB 寡核苷酸探针在下列反应液中室温下作用 30min: 5μg 核蛋白样本, 100ng/L poly (dI-dC), 20mmol/L Hepes, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L Mg-Cl₂, 50mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 10% Glycerol 和 5×10⁹ cpm/L ³²P 标记的 NF-κB 探针。竞争组中, 用 LPS 组的核蛋白作样本, 在加入³²P 标记的 NF-κB 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% 聚丙烯酰胺凝胶上(30:1 acrylamide to bisacrylamide), 150V 电泳约 2h, 电泳缓冲液为 0.5×TBE(45mmol/L Tris-borate, 1 mmol/L EDTA)。然后干胶, -70℃ 放射自显影于 X 线片上。

结 果

1 条件培养液中 PAI-1 和 t-PA 抗原含量的测定 见表 1。培养的 HUVEC 经 1mg/L LPS 作用 18h, 其条件培养液 PAI-1 抗原含量明显增加, 与对照组比较差异有显著性($P<0.01$); LPS 和山莨菪碱同时作用于 HUVEC 时, 在一定浓度范围内, 山莨菪碱对 LPS 诱导 HUVEC PAI-1 表达的抑制作用随其浓度的增加而增强, 山莨菪碱单独作用于 HUVEC, 则对其 PAI-1 抗原含量影响不大。结果显示, t-PA 的抗原含量不随山莨菪碱的作用而有明显变化。

表 1 HUVEC 条件培养液 PAI-1 和 t-PA 抗原含量及 HUVEC 的 TF 活性 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	PAI-1 (ng/10 ⁵ 个细胞)	t-PA (ng/10 ⁵ 个细胞)	TF (mU/10 ⁶ 个细胞)
对照	721.5±81.5 **	13.8±2.0	0.52±0.02 **
LPS	1830.2±61.3	12.5±1.3	10.12±3.20
山莨菪碱(Ani)	756.3±89.7 **	11.8±1.0	0.56±0.32 **
LPS 加 10mg/L Ani	1648.1±80.3	12.0±0.8	8.34±1.25
LPS 加 50mg/L Ani	—	—	2.72±0.64 *
LPS 加 100mg/L Ani	1174.2±109.9 *	10.8±0.9	0.55±0.02 **
LPS 加 500mg/L Ani	901.3±53.9 **	11.0±0.7	—

注: * 与 LPS 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2 山莨菪碱对 HUVEC 作用的时效关系 见表 2。HUVEC 经 1mg/L LPS 和 100mg/L 山莨菪碱作用后, 在一定时间范围内, 山莨菪碱对 LPS 诱导 HUVEC PAI-1 分泌有明显的抑制作用, 且随时间的延长, 这种抑制作用增强。

表 2 山莨菪碱对 HUVEC PAI-1 作用的时效关系 (ng/10⁵ 个细胞, $n=9, \bar{x} \pm s$)

组别	PAI-1 抗原含量			
	6h	12h	18h	24h
对照	225.3±21.2	724.5±36.8	786.5±40.6	984.2±70.6
LPS	712.4±22.6	1478.2±41.6	2016.4±94.4	3024.3±102.4
LPS 加 Ani	235.6±30.1	726.6±24.4	1174.2±86.5	2014.5±97.6

3 PAI-1 mRNA 表达 见图 1。Northern blot 显示 LPS 可诱导 HUVEC 表达 PAI-1 mRNA, 其 PAI-1 相对吸光度值为对照组的 284%; 山莨菪碱能抑制 LPS 诱导 HUVEC 表达 PAI-1 mRNA, 其吸光度值为 LPS 单独处理组的 24%。Northern blot 结果与 ELISA 结果基本一致。

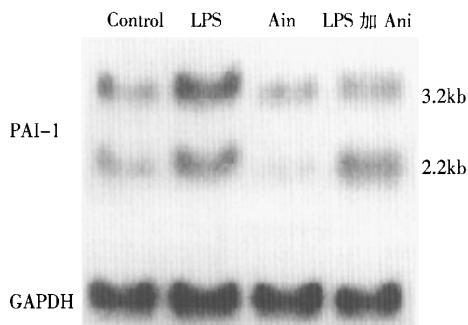


图 1 HUVEC PAI-1 和 GAPDH Northern 印迹

注: Control: 对照, LPS: 内毒素脂多糖, Ani: 山莨菪碱; LPS 组 HUVEC PAI-1 mRNA 表达明显强于对照组, LPS 加山莨菪碱组 PAI-1mRNA 表达明显弱于 LPS 组。

4 TF 活性及 mRNA 检测 未经刺激的 HUVEC 中, 只能检测到微弱的 TF 活性[对照组: (0.52±0.02)mU/10⁶ 个细胞]; 经 1μg/ml LPS 作用 4h, HUVEC 的 TF 活性约增强 20 倍[LPS: (10.12±3.20)mU/10⁶ 个细胞]; 当山莨菪碱与 LPS 同时作用于 HUVEC, 其 TF 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 100mg/L 时, HUVEC 的 TF 活性接近对照组[(0.55±0.02)mU/10⁶ 个细胞]; 而山莨菪碱单独作用于 HUVEC, 并不影响其 TF 活性(见表 1)。山莨菪碱的这种作用同样表现在 mRNA 水平。山莨菪碱与 LPS 共同刺激 HUVEC 2h, HUVEC TF mRNA 表达明显低于 LPS 单独作用组(见图 2)。

5 EMSA 结果 见图 3。对照组和山莨菪碱单独作用组 HUVEC 细胞核蛋白中未检测到 NF-κB DNA 结合活性; 但经 LPS 刺激后, 细胞核蛋白 NF-κB DNA 结合活性显著增强; 当 LPS 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 EMSA 系统是成功的。

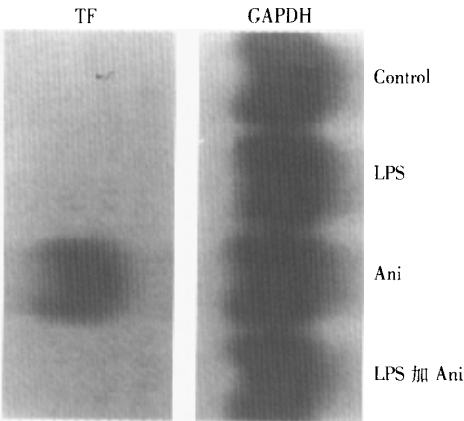


图 2 HUVEC TF 和 GAPDH Northern 印迹

注:Control:对照,LPS:内毒素脂多糖,Ani:山莨菪碱;LPS

加 Ani 组 HUVEC TF mRNA 表达明显低于 LPS 组

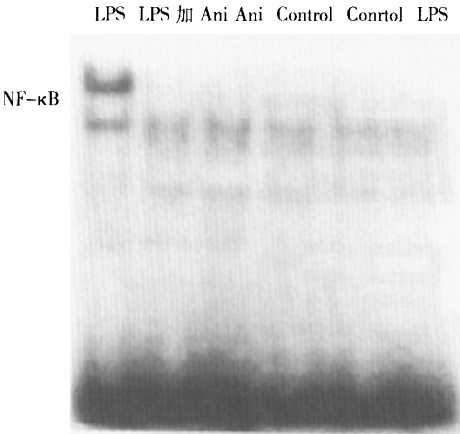


图 3 EMSA 检测 HUVEC 核提取物 NF-κB DNA 结合活性

注:Control:对照,LPS:内毒素脂多糖,Ani:山莨菪碱。对

照组、山莨菪碱组和 LPS 加山莨菪碱组 HUVEC 细胞核蛋白中未检测到 NF-κB DNA 结合活性;LPS 组细胞核蛋白 NF-κB DNA 结合活性显著增强

讨 论

存在于革兰氏阴性菌外膜的 LPS 在革兰氏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,微血管的血栓形成和栓塞,导致重要器官的衰竭,最终致患者死亡。LPS 通过激活血管内皮细胞的凝血活性,使内皮细胞 PAI-1 和 TF 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。本研究结果显示 LPS 可

使培养的 HUVEC PAI-1 抗原含量增高 2.5 倍,TF 活性增强 20 倍左右。然而,当山莨菪碱与 LPS 同时作用于培养的 HUVEC 时,LPS 诱导 HUVEC PAI-1 和 TF 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,其对 PAI-1 抗原水平和 TF 活性影响不大。实验中,HUVEC 的 t-PA 抗原水平不因山莨菪碱的加入而有所改变。Northern blot 显示,山莨菪碱对 HUVEC PAI-1 和 TF 的作用,同样反映在 mRNA 水平,山莨菪碱与 LPS 同时作用于 HUVEC 时,LPS 诱导的 PAI-1 和 TF mRNA 表达几乎下降到未受刺激的对照组水平,说明山莨菪碱在 PAI-1 和 TF 的转录水平即发挥了作用。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,至少一部分是通过抑制 LPS 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。

为了进一步探讨山莨菪碱抗 LPS 诱导内皮细胞凝血活性的机制,我们观察了山莨菪碱对内皮细胞 NF-κB 的影响。在各种生理和病理的刺激下,NF-κB 从胞浆进入胞核,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。有文献报道,炎症过程中细胞因子和 LPS 可能通过 NF-κB 介导,激活内皮细胞,引起目的基因,如黏附分子、趋化因子和 TF 的转录^[11]。有人曾用抗 NF-κB 的诱导剂,如肿瘤坏死因子 α 或 LPS 的抗体治疗感染性休克^[12]。本研究结果显示山莨菪碱可以完全阻断 LPS 诱导的 HUVEC 核提取物 NF-κB DNA 结合活性,说明山莨菪碱可能有类似抗 NF-κB 抗体的某些作用,至少能干扰 NF-κB 途径。因此,我们认为山莨菪碱可能通过,至少部分通过 NF-κB 途径,下调 LPS 诱导的 HUVEC PAI-1 和 TF 表达,促进纤溶,阻止血栓的形成,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;250:3324—3327.
- 2 Shubin H, Weil MH. Bacterial shock. JAMA 1976;235:412—424.
- 3 Bone RC. The pathogenesis of sepsis. Ann Intern Med 1991;115:457—469.
- 4 Cybulsky MI, Chan MKW, 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;58:365—378.
- 5 Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial activation.

- Physiol Rev 1990;70:427—451.
- 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 Su JY. Cell protection mechanism of antishock action of anisodamine. Chin Med J (Engl) 1992;105:976—979.
- 8 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;20:205—208.
- Ruan QR, Deng ZD, Xu ZS, et al. Monocyte chemotactic factor produced by human umbilical vein endothelial cells in vitro. Chin J Pathol 1991;20:205—208.
- 9 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;6:297—300.
- Ruan QR, Song JX, Deng ZD. Study on mechanism of ligustrazine against thrombosis. Chin J Arteriosclerosis 1998;6:297—300.
- 10 Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, et al. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:6998—7002.
- 11 Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. Lab Invest 1993;68:499—508.
- 12 Greeman RL, Schein RM, Martin MA, et al. A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. JAMA 1991;266:1097—1102.
- (收稿:2003-07-05 修回:2004-10-12)

双虎清肝主治乙型肝炎 中国中医研究院研制 免费赠送《乙肝康复》手册及 VCD 光盘
按医生处方购买和使用 批准文号:国药准字 Z-10980118 京药广审(文)第 2003070233

防治乙肝“家庭医生” 普及工程启动

“家庭医生”诚聘顾问(兼职医生、包括乡医)协会制度,颁发证书

主办单位:中国中医研究院 北京华神制药有限公司

北京双虎清肝医学研究中心

通讯地址:北京东直门内南小街 16 号中国中医研究院华神制药有限公司

邮政编码:100700;联系人:杜主任,武小姐

电话:010-84032002;64014411 转 3186;64022649 转 307(周六、日休息)