

·博士之窗·

青蒿琥酯对脂多糖致血管内皮细胞活化及损伤的保护作用

何晓琳[△] 刘 志

摘要 目的 观察中药青蒿提取物青蒿琥酯(artemunate, AR)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)活化及损伤状态下的保护作用及相关机制。方法 建立人脐静脉内皮细胞培养,细胞生长至融合状态后分别加入 LPS 及不同浓度的 AR(0.04 mg/L、0.2 mg/L、1 mg/L、5 mg/L 及 20 mg/L)共同孵育 24h。ELISA 方法检测培养上清中血管假性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)含量,Western blot 法检测细胞间黏附分子(ICAM-1)蛋白表达,原位杂交方法检测肿瘤坏死因子(TNF α)mRNA 表达。结果 暴露于 1 μ g/ml LPS 后, HUVECs 的 vWF 及 ICAM-1 表达较对照组明显增加,加入 AR 后,随 AR 浓度增加明显下调 LPS 升高的 vWF 及 ICAM-1 表达,至 AR 为 1 mg/L 时,其 vWF 与 ICAM-1 表达与 LPS 组比较差异均有显著性($P < 0.05$)。AR 抑制 LPS 升高的 vWF 及 ICAM-1 表达呈一定的浓度依赖方式。原位杂交显示在 AR 0.2 mg/L 及 1 mg/L 时明显下调 TNF α mRNA 表达,与 LPS 组比较差异有显著性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 青蒿琥酯对脂多糖诱导的 HUVECs 的活化及损伤有保护作用,可能与 AR 抑制 TNF α mRNA 表达有关。

关键词 内皮;血管;脂多糖类;青蒿琥酯;肿瘤坏死因子;呼吸窘迫综合征;急性

Protection of Artesunate on Activation and Injury of Vascular Endothelial Cells Induced by Lipopolysaccharide
HE Xiao-lin, LIU Zhi Department of Emergency, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang (110001)

Objective To investigate the protective effects and mechanism of artemunate (AR) on the activation and injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** After HUVECs were cultured and turned to fusion manner, LPS and different concentration of AR (0.04 mg/L, 0.2 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L and 20 mg/L) were added respectively and co-incubated for 24 hrs. The expression of von Willebrand factor (vWF) in the conditioned media was tested by ELISA, the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) protein was determined by Western blot method and the expression of tumor necrosis factor α (TNF α) mRNA was determined by in situ hybridization. **Results** After being exposed to 1 μ g/ml LPS, vWF and ICAM-1 expression were higher than those in the control group. AR could significantly down-regulate the increased expressions concentration-dependently, significant difference showed as the concentration of AR reached 1 mg/L ($P < 0.05$). In situ hybridization showed that AR in 0.2 mg/L and 1 mg/L could markedly down-regulate the TNF α mRNA expression, showing significant difference as compared with that in LPS group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** AR has protective effect on LPS induced HUVECs activation and injury, which might be related with its inhibition on TNF α mRNA expression.

Key words endothelium, blood vessel, lipopolysaccharide, artemunate, tumor necrosis factor α , respiratory distress syndrome, acute

青蒿为传统的清热解暑药,自 20 世纪 70 年代初分离鉴定出抗疟有效成分青蒿素以来,对青蒿素及其衍生物青蒿琥酯等进行了多方面的研究,如治疗卡氏肺孢子虫肺炎,改善免疫细胞活性的作用^[1]、抗菌作

作者单位:中国医科大学附属第一医院急诊科(沈阳 110001)

[△]博士研究生,现在沈阳医学院附属中心医院呼吸内科

通讯作者:刘 志, Tel: 024 - 23256666 转 6076, E-mail: hxlcnu@

hotmail.com

用^[2]及实验研究中的抗内毒素作用^[3]。但是,青蒿琥酯是否具有内皮细胞保护作用及其机制如何目前尚未见报道。本研究通过体外培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),观察细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 HUVECs 活化及损伤的状态下,青蒿琥酯(artesunate, AR)对其的保护作用,并探讨其可能的机制。

材料与方法

1 人新鲜脐带 由沈阳市铁西区妇婴医院提供。

2 药物 青蒿琥酯注射液(60 mg/ml)为桂林南药股份有限公司赠送,批号 030101。

3 试剂 DMEM 培养基购于美国 GIBCO-BRL 公司;脂多糖(LPS,来源于 Escherichia, coli serotype O 127:B8)为美国 Sigma 公司产品;新生牛血清购自郑州佰安生物工程有限公司;胰蛋白酶购自华美公司;vWF 的 ELISA 检测试剂盒购自上海太阳生物公司;兔抗人 ICAM-1 多克隆抗体、TNF α 原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

4 方法

4.1 人脐静脉内皮细胞的培养 采用改良 Jaffe 等^[4]法。用 0.25% 的胰蛋白酶灌注消化脐静脉后,离心收集内皮细胞,调整细胞浓度在 3×10^8 个/L,接种于 0.2% 明胶包被的 75cm² 培养瓶,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的孵箱中培养,2 天换液 1 次,培养液为含 20% 新生牛血清的 DMEM。待细胞长满 2/3 瓶底后进行传代。倒置相差显微镜(NIKON-TMS 型)观察 HUVECs 为呈铺路石状的单层多角型细胞,Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色阳性,证实为内皮细胞。

4.2 实验分组 将单细胞悬液接种到预先放有 8mm×8mm 盖玻片的 24 孔培养板中,待细胞生长融合后,用 0.1 mol/L PBS 溶液清洗 2 次,换成无血清的 DMEM 培养液,每孔 1 ml。实验分为 3 组:对照组:常规无血清 DMEM 培养;LPS 组:1 μ g/ml LPS;AR + LPS 组:根据 AR 浓度的不同(20 mg/L、5 mg/L、1 mg/L、0.2 mg/L 及 0.04 mg/L)分为 5 个亚组,在每个亚组中 AR 和 LPS 同时加入。LPS 及 AR 各浓度预先制成母液,细胞换液后加入到无血清 DMEM 中使其成相应的终浓度。37℃ 孵箱内继续孵育 24h,收集各组细胞培养上清液,1 000 r/min 离心去除细胞碎屑,贮存于 -70℃ 待用。每次实验均复式 2 孔,所有实验重复 3 次。

4.3 细胞培养上清血管假性血友病因子(von

Willebrand factor, vWF)的测定 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组培养上清中 vWF 的抗原含量(%)。抗体为兔抗人 vWF 的单克隆抗体,方法按试剂盒说明书进行。

4.4 Western blot 方法检测 HUVECs 的细胞间黏附分子-1(ICAM-1)蛋白表达 实验分组同上。收集生长于 100ml 培养瓶中的各组 HUVECs,提取蛋白。每个样品取 50 μ g,用 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜上,洗膜,封闭,杂交后加入 ECL 化学发光系统显影,X 片感光,洗片。用 Fluro Chemv 2.0 电泳凝胶成像分析仪(美国 ALPHA 公司产品)进行 ICAM-1 蛋白定量分析。

4.5 原位杂交方法检测 HUVECs 的肿瘤坏死因子(TNF) mRNA 表达 含地高辛标记的 TNF α mRNA 寡核苷酸探针序列为:5'-AAAGCAT-GATCCGAGACGTGGAAGTGGCCGAGGAG-3' 按照 TNF α mRNA 原位杂交试剂盒操作方法进行。培养于盖玻片的各组内皮细胞用 4% 多聚甲醛(含有 1/1 000 DEPC)室温固定 20 min。胃蛋白酶于 37℃ 消化 60s。37℃ 预杂交 4h,37℃ 杂交过夜。以 $2 \times$ SSC、 $0.5 \times$ SSC、 $0.2 \times$ SSC 洗片,封闭液 37℃ 封闭 30min,生物素化鼠抗地高辛 37℃ 孵育 1h,SABC 孵育 20 min,DAB 显色 20~30 min,苏木素轻度复染,封片。阴性对照用预杂交液替代探针工作液。镜下观察并采用 Meta-Morph/DP10/BX41 型细胞图像分析仪进行 TNF α mRNA 的半定量分析。

5 统计学方法 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较用方差分析,组间比较用 q 检验。

结 果

1 各组 HUVECs 培养上清中 vWF-Ag 含量的变化 见表 1。培养的 HUVECs 经 1 μ g/ml LPS 作用 24h,其上清中 vWF-Ag 含量较对照组明显增加($P < 0.05$),若将 AR 和 LPS 同时加入条件培养液中,随着 AR 浓度的增加,其上清中 vWF-Ag 含量逐渐降低;AR 达到 1 mg/L 时,vWF-Ag 含量降为 LPS 单独处理组的 77.2%($P < 0.05$)。

2 各组 HUVECs 的 ICAM-1 蛋白表达的变化 见表 1、图 1。Western blot 方法检测结果显示 1 μ g/ml LPS 作用后,HUVECs 的 ICAM-1 蛋白表达强度较对照组明显增加($P < 0.05$),加入 AR 后,各组细胞 ICAM-1 蛋白表达强度随 AR 浓度的增加明显下调。在 AR 为 1 mg/L 时,其 ICAM-1 蛋白表达降为 LPS 单独处理组的 78.7%($P < 0.05$)。

表 1 各组 HUVECs 的 vWF、ICAM-1 蛋白
表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	vWF(%)	ICAM-1(AVG)
对照	6	107.24 ± 8.38	44.26 ± 3.04
LPS(1 μg/ml)	6	180.99 ± 16.41 *	237.01 ± 10.23 *
LPS(1 μg/ml) + AR(0.04 mg/L)	6	167.18 ± 12.73	202.92 ± 11.04
LPS(1 μg/ml) + AR(0.2 mg/L)	6	156.87 ± 13.04	196.83 ± 8.21
LPS(1 μg/ml) + AR(1 mg/L)	6	139.72 ± 9.82 [△]	186.54 ± 9.19 [△]
LPS(1 μg/ml) + AR(5 mg/L)	6	131.24 ± 10.64 ^{△△}	136.62 ± 5.12 ^{△△}
LPS(1 μg/ml) + AR(20 mg/L)	6	126.57 ± 9.15 ^{△△}	73.41 ± 5.08 ^{△△}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

3 各组 HUVECs 的 TNFα mRNA 表达的变化见表 2、图 2。原位杂交结果显示胞浆中的棕黄色颗粒为 TNFα mRNA 表达的阳性部位。图像分析发现,予 1 μg/ml LPS 作用后,胞浆中 TNFα mRNA 表达强度明显强于对照组($P<0.05$)。加入 AR 后,各组细胞胞浆 TNFα mRNA 表达强度亦随 AR 浓度的增加有下降趋势。在 AR 达到 0.2 mg/L 时,其 HUVECs 的 TNFα mRNA 表达与 LPS 单独处理组比较差异有显著性($P<0.05$, $P<0.01$)。

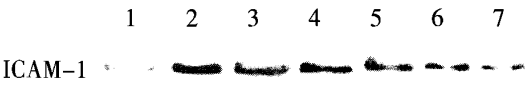


图 1 Western blot 方法显示各组 HUVECs 的
ICAM-1 的蛋白表达

注:1.对照组;2.LPS(1μg/ml)组;3.LPS(1μg/ml)+AR(0.04mg/L);4.
LPS(1μg/ml)+AR(0.2mg/L);5.LPS(1μg/ml)+AR(1mg/L);6.LPS(1μg/ml)
+AR(5mg/L);7.LPS(1μg/ml)+AR(20mg/L)

表 2 各组 HUVECs 的 TNFα mRNA 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNFα mRNA(吸光度值)
对照	6	11.06 ± 1.24
LPS(1 μg/ml)	6	34.27 ± 4.17 *
LPS(1 μg/ml) + AR(0.04 mg/L)	6	28.59 ± 3.48
LPS(1 μg/ml) + AR(0.2 mg/L)	6	26.31 ± 3.01 [△]
LPS(1 μg/ml) + AR(1 mg/L)	6	25.08 ± 2.77 ^{△△}
LPS(1 μg/ml) + AR(5 mg/L)	6	21.73 ± 2.60 ^{△△}
LPS(1 μg/ml) + AR(20 mg/L)	6	17.68 ± 2.32 ^{△△}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 LPS 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

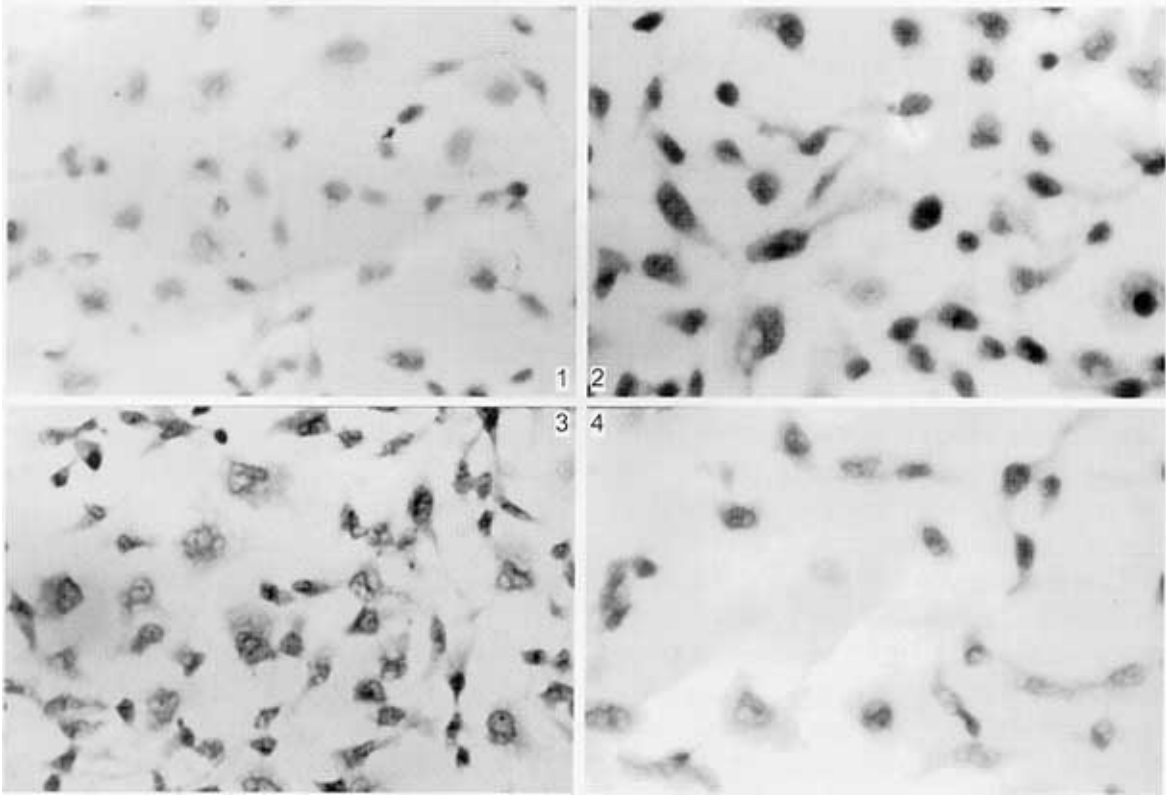


图 2 原位杂交方法显示各组 HUVECs 的 TNFα mRNA 表达(DAB,×260)

注:1.对照组;2.LPS(1μg/ml)组;3.LPS(1μg/ml)+AR(0.2mg/L)组;4.LPS(1μg/ml)+AR(1mg/L)组

讨 论

vWF 和 ICAM-1 均是与成人呼吸窘迫综合征 (ARDS) 相关的血管内皮细胞活化及损伤的标志物。vWF 是一种大分子量的抗原, 在刺激因素作用下其表达升高不仅可反映内皮细胞损伤的程度, 也是内皮屏障损伤的标志。ICAM-1 是一种小分子量的黏附分子, 其表达升高主要促进白细胞的黏附, 微血栓形成。临床研究^[5]及动物实验^[6]均表明内皮细胞活化及损伤标志物的检测与急性肺损伤成人呼吸窘迫征 (ALI/ARDS) 病情进展密切相关, 在一定程度上反映疾病的严重程度。本研究结果表明 LPS 可导致 HUVECs 培养上清中 vWF 明显升高及细胞 ICAM-1 蛋白表达明显增强, 提示 HUVECs 出现明显的活化及损伤。与 AR 共同孵育后, 随 AR 浓度的增加, 显著下调升高的 vWF 及 ICAM-1 表达, 并呈现一定的剂量依赖关系。在 AR 1 mg/L 时, 其 vWF 及 ICAM-1 表达与 LPS 单独处理组比较存在明显差别, 说明 AR 能减轻 LPS 引起的 HUVECs 的活化及损伤程度, 提示 AR 具有内皮细胞保护作用。

TNF α 是内毒素休克及 ARDS 等炎症发病过程为特征的疾病中关键性的促炎因子, 其与 IL-1 协同激活肺的免疫细胞和非免疫细胞的炎症反应调节剂 NF- κ B 产生细胞因子, 启动炎症的级联反应, 诱导多形核白细胞的迁移、聚集, 从而不仅启动早期炎症反应, 而且维持炎症。在内毒素休克中, 抑制内源性 TNF 能明显减轻炎症、减轻多器官损伤、降低死亡率。为探讨 AR 减轻 LPS 引起的 HUVECs 损伤过程中是否有 TNF α 的参与, 本实验检测了各实验因素条件下 TNF α mRNA 表达情况。结果显示: 较低浓度的 AR (0.2 mg/L), 其表现的拮抗 HUVECs 的 TNF α mRNA 表达的结果与 LPS 单独处理组比较已存在明显的差别, 且在 AR 较高浓度时 (1 mg/L), 差别更加明显。而 AR 与 vWF 及 ICAM-1 蛋白表达的抑制是在其浓度为 1 mg/L 时, 即 AR 在其较低浓度即出现了对 TNF α mRNA 表达的提前抑制。TNF α 是 ICAM-1、E-选择素等黏附分子的上游因子, 可能藉此进一步下调 ICAM-1 的蛋白表达, 因此我们认为 AR 具有内皮细胞保护作用的原因中可能存在直接的抗炎机制参与, 但是否通过抑制 NF- κ B 来实现, 值得进一步深入的研究。

综上所述, 青蒿琥酯对 LPS 所致的血管内皮细胞活化及损伤具有保护作用, 与其调控 TNF α mRNA 表达及 vWF、ICAM-1 的蛋白表达有关, 这一结果为青蒿琥酯的内皮细胞保护作用的机理提供了重要依据, 对其在 ARDS 治疗中的应用提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- 1 李文桂, 陈雅棠, 刘成伟, 等. 双氢青蒿素对卡氏肺孢子虫肺炎大鼠脾细胞凋亡的影响. 中国人兽共患病杂志 2003; 19 (2): 55—59.
Li WG, Chen YT, Liu CW, et al. Effects of dihydroartemisinin on apoptosis of spleen cells in rats infected with *Pneumocystis carinii* pneumonia. Chin J Zoonoses 2003; 19 (2): 55—59.
 - 2 金慧玲, 张汝芝, 高玉祥, 等. 青蒿琥酯抗真菌、抗细菌的实验研究. 中国微生态学杂志 2003; 15 (1): 26—27.
Jin HL, Zhang RZ, Gao YX, et al. The study of antibacterial and antifungal role of artesunate. Chin J Microecol 2003; 15 (1): 26—27.
 - 3 梁爱华, 薛宝云, 王金华, 等. 青蒿琥酯对内毒素诱导的炎症因子合成抑制作用的研究. 中国中西医结合急救杂志 2001; 5 (5): 262—265.
Liang AH, Xue BY, Wang JH, et al. Study on inhibitory effect of artesunate on endotoxin-induced production of inflammatory mediators. Chin J Integr Tradit West Med Intens Crit Care 2001; 5 (5): 262—265.
 - 4 Jaffe EA, Nochman RL, Becher CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 1993; 52 (12): 2745—2756.
 - 5 李 琦, 钱桂生, 陈正堂, 等. 急性呼吸窘迫综合征患者的血液及肺组织中血管内皮细胞标记物的变化. 中华结核和呼吸杂志 1999; 22 (9): 533—535.
Li Q, Qian GS, Chen ZT, et al. A preliminary study on the markers of pulmonary vascular endothelial cells in patients with ARDS. Chin J Tuberc Respir Dis 1999; 22 (9): 533—535.
 - 6 彭文鸿, 毛宝龄, 邹霞英, 等. ACEI 对大鼠缺氧性肺动脉高压血管内皮细胞保护作用的研究. 中国病理生理杂志 2003; 19 (7): 901, 991.
Peng WH, Mao BL, Zou XY, et al. The protective effects of ACEI on the vascular endothelial cells in hypoxic pulmonary hypertension rats. Chin J Pathophysiol 2003; 19 (7): 901, 991.
- (收稿: 2004-04-05 修回: 2004-09-02)