

脂多糖诱导大鼠主动脉内皮细胞蛋白 C 受体和蛋白酶活化受体 1 的表达及血必净注射液的干预作用

郑贵军 武子霞 李银平 姚咏明

【摘要】 目的 观察脂多糖(LPS)诱导的大鼠主动脉内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)和蛋白酶活化受体 1 (PAR1)的表达,并探讨血必净注射液对其的干预作用。方法 采用组织贴块法培养 Wistar 大鼠主动脉内皮细胞,培养 1 周后用流式细胞仪鉴定内皮细胞纯度。按 1:3 传代至 3~4 代时,随机将细胞分为空白对照组、LPS 刺激组(1 mg/L)、血必净干预组(LPS 1 mg/L,血必净注射液 10 g/L)、活化蛋白 C(APC)干预组(LPS 1 mg/L,APC 0.1 mg/L)。分别在 12、24、48、72 h 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定内皮细胞 EPCR 和 PAR1 的 mRNA 表达;用流式细胞仪检测 EPCR 和 PAR1 的蛋白表达。结果 12 h 时各组间 EPCR 和 PAR1 蛋白表达水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);LPS 刺激组 EPCR 和 PAR1 mRNA 表达则均降低,APC 和血必净干预后两值均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。24~72 h LPS 刺激组 EPCR 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显低于空白对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),EPCR 的表达随 LPS 作用时间延长而减少,呈明显的负相关;而血必净干预组 EPCR 表达明显高于 LPS 刺激组(P 均 < 0.01)。LPS 刺激组 PAR1 的 mRNA 和蛋白表达水平较空白对照组有所降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),用血必净干预后,PAR1 的 mRNA 和蛋白表达水平有所增加(P 均 < 0.01)。与 APC 干预组比较,血必净干预组 EPCR 和 PAR1 的蛋白表达增加更为明显。结论 血必净注射液能从基因和蛋白水平增加由 LPS 诱导大鼠主动脉 EPCR 和 PAR1 的表达作用,可能与其保护内皮细胞的功能抑制其凋亡有关。

【关键词】 脂多糖; 主动脉内皮细胞; 内皮细胞蛋白 C 受体; 蛋白酶活化受体 1; 血必净注射液; 大鼠

Effect of Xuebijing injection (血必净注射液) on expression of endothelial protein C receptor and protease activated receptor 1 mRNA and protein in endothelial cells induced by lipopolysaccharide ZHENG Gui-jun*, WU Zi-xia, LI Yin-ping, YAO Yong-ming. * Tianjin Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China (ZHENG Guijun studies in Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)
Corresponding author: LI Yin-ping, Email: cccm.23042150@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of Xuebijing injection (血必净注射液) on expression of endothelial protein C receptor (EPCR) and protease activated receptor 1 (PAR1) mRNA and protein in rat aortic endothelial cells (RAECs) after lipopolysaccharide (LPS) challenge. **Methods** RAECs were cultured for one week, and the purity was determined with flow cytometry. ARECs were randomly divided into four groups: control group, LPS stimulation group (1 mg/L LPS), Xuebijing injection treatment group (LPS: 1 mg/L, Xuebijing injection: 10 g/L) and activated protein C (APC) treatment group (LPS: 1 mg/L, APC: 0.1 mg/L). The RAECs were collected at 12, 24, 48, and 72 hours after being stimulated by LPS. EPCR and PAR1 mRNA of RAECs were assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). EPCR and PAR1 protein were assessed by flow cytometry. **Results** At 12 hours, EPCR and PAR1 protein expressions were not significantly different among groups (all $P > 0.05$). The level of EPCR and PAR1 mRNA were decreased in LPS stimulation group, but they were elevated in both APC and Xuebijing injection treatment groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). From 24 to 72 hours, compared to control group, the levels of EPCR mRNA and protein expression were significantly decreased after LPS stimulation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The levels of EPCR expression were decreased and negatively correlated with the time of LPS treatment. Also, compared to LPS stimulation group, treatment with Xuebijing markedly elevated the levels of EPCR ($P < 0.01$). The levels of PAR1 expression were significantly decreased by LPS stimulation compared with those of control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After the treatment with Xuebijing, the expression of PAR1 was gradually increased (all $P < 0.01$). Compared with APC treatment group, Xuebijing could increase the PAR1 expression better. **Conclusion** Xuebijing could raise EPCR and PAR1 mRNA and protein expression of RAECs after LPS challenge, and it may be related to its protection of endothelial cell from undergoing apoptosis.

【Key words】 lipopolysaccharide; aortic endothelial cell; endothelial protein C receptor; protease activated receptor 1; Xuebijing injection; rat

越来越多的研究表明,血管内皮细胞在脓毒症(sepsis)和多器官功能障碍综合征(MODS)的发生发展过程中具有重要的作用。它不仅是脓毒症发生时受损的靶器官,同时还通过其广泛的生物学功能主动参与了器官功能的损伤^[1]。在生理状态下,血管内皮细胞不仅是血液与组织之间的屏障,而且具有多种生物活性,它在血管形成、创伤愈合、凝血和抗凝血及炎症反应等方面发挥多种生理功能。相关研究表明,脂多糖(LPS)作为内毒素的主要成分,在炎症性疾病中诱导多种基因的表达,引起血管内皮细胞的损伤或凋亡,可使血管屏障的结构和功能破坏,最终导致炎症反应加剧,引发多脏器损伤^[2]。如何拮抗LPS的作用,控制血管内皮细胞在感染性炎症疾病中的损伤,是防止疾病恶化的关键。本课题组在前期研究基础上,通过采用活血化瘀中药血必净注射液干预LPS诱导的血管内皮细胞,从蛋白和基因水平上观察了血必净注射液对LPS诱导的动脉内皮细胞蛋白C受体(EPCR)和蛋白酶活化受体1(PAR1)表达的影响,以进一步阐明血必净注射液在治疗脓毒症中的作用靶点,为临床用药提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器:DMEM培养基购自北京Solarbio公司,内皮细胞生长添加剂(ECGs)购自美国ScienCell公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗大鼠PAR1抗体购自美国Stanta Cruz公司,抗大鼠CD31单克隆抗体购自英国AbD公司,大鼠单克隆EPCR抗体购自美国Bioreagents公司,藻红蛋白(PE)标记和FITC标记的山羊抗大鼠二抗购自美国Caltag公司,LPS(大肠杆菌血清型O111:B4)、锥虫蓝均购自美国Sigma公司,总RNA提取试剂购自美国Promega公司,活化蛋白C(APC)购自美国Sigma公司,质量分数为0.25%的胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液购自美国Hyclone公司,FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司),奥林巴斯倒置显微镜(日本Olympus公司),CO₂培养箱(日本NAPCO公司),

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.03.014

基金项目:天津市医药卫生中西医结合科研项目(2005088);天津市科技创新专项基金项目(06F22DSH00403);国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602)

作者单位:300050天津市天和医院(郑贵军、武子霞、李银平,郑贵军为天津中医药大学硕士研究生);100037北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所(姚咏明)

通信作者:李银平,Email:cccm.23042150@yahoo.com.cn

血必净注射液(天津红日药业股份有限公司,批准文号Z20040033,生产批号080215)。

1.2 实验动物:雄性Wistar大鼠5只,体重200~250g,购自中国医学科学院实验动物研究所,适应性饲养1~2周,实验前禁食12h,自由饮水。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞分离及培养:用颈椎脱臼法处死大鼠后浸泡于体积分数为75%的乙醇中5min,逐层打开胸、腹腔,充分暴露胸、腹主动脉,分离其周围组织,从近心端分离主动脉至髂总动脉分支处,放入含有D-Hank液的培养皿中,无菌剥离血管外膜的脂肪组织和纤维组织,D-Hank液冲洗血管腔。将主动脉切成1.5mm×1.5mm的小块,用眼科镊将组织块内膜面朝下平铺于25cm²的塑料培养瓶内,将培养瓶放入培养箱内干贴壁2h,加入DMEM培养液(含体积分数为20%的胎牛血清,100kU/L青霉素,100mg/L链霉素,质量分数为1%的ECGs,90kU/L肝素),置37℃、体积分数为5%的CO₂饱和湿度培养箱内培养,3d后可见内皮细胞由组织块边缘爬出并逐渐向外延伸,呈扁平短梭形或多角形,去除组织块,更换培养液继续培养3~4d。此时可见大部分细胞融合成层,呈鹅卵石样排列。此时用0.25%胰蛋白酶和1mmol/L EDTA消化液消化,按1:3的比例在25cm²的培养瓶中传代,用第4~5代细胞进行实验。

1.3.2 内皮细胞的纯度鉴定:用无菌吸管吸弃培养液,用D-Hank液冲洗3次,加入0.25%胰蛋白酶-EDTA 2ml,37℃消化3min,在倒置显微镜下观察大部分细胞收缩变圆时,立即加入含有20%胎牛血清的DMEM培养液2ml终止消化,用吸管轻轻吹散细胞,吸入离心管中,离心后留取细胞。取少量的细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至1×10⁹/L,加入CD31一抗4μl,室温孵育10min,继而加入FITC标记的羊抗大鼠IgG二抗1μl,4℃孵育10min,同时设阴性对照,用流式细胞仪检测内皮细胞的纯度。0.4%锥虫蓝对内皮细胞进行染色,观察细胞活性。

1.3.3 分组:以含20%胎牛血清的DMEM培养液重悬内皮细胞,调整浓度为1×10⁹/L,96孔培养板中每孔加200μl。分为空白对照组、LPS刺激组、血必净干预组、APC干预组,每孔设6个平行孔对照。LPS组加入1mg/L的LPS;血必净干预组在加入LPS后30min加入10g/L的血必净注射液;APC干预组在加入LPS后30min时加入0.1mg/L的APC。将板放入37℃、5%CO₂培养箱内,各组分别

在 12、24、48、72 h 4 个时间点留取上清液，-70 °C 保存备检。培养板孔内的细胞用 D-Hank 洗 2 次，每次 3 min，用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化后分为两部分，一部分用于逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测，一部分用于流式细胞仪检测。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 EPCR 和 PAR-1 的 mRNA 检测：取经胰酶消化的内皮细胞，使用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA，采用半定量 RT-PCR 技术对转录产物进行扩增，扩增产物经质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳、照相，电泳结果用计算机图像分析系统 (Gel-pro) 进行扫描，以灰度表示电泳带的强度。

以三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 作为内参对照，大鼠 GAPDH 序列 (扩增产物大小 309 bp)：上游 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'，下游 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'；EPCR 序列 (扩增产物大小 341 bp)：上游 5'-CGA CGT GGT CTT TCC TCT GAC-3'，下游 5'-TCA GGA TAC CCA GGA CCA GTG-3'；RAR1 序列 (扩增产物大小 394 bp)：上游 5'-CCC GCT CAT TTT TTC TCA GGA-3'，下游 5'-GCC AAT CGG TCG CGG AGA AGT-3'。

1.4.2 EPCR 和 PAR1 的蛋白检测：取消化好的内皮细胞，用 PBS 洗 3 次，加入 4 μl 抗大鼠 EPCR 单克隆抗体，4 °C 孵育 20 min，再加入 PE 标记的羊抗大鼠 IgG 二抗，同时加入 FITC 标记的抗 PAR1 抗体，4 °C 避光孵育 15 min。流式细胞仪检测 EPCR 和 PAR1 的平均荧光强度。

1.5 统计学分析：检测指标以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，SPSS 13.0 统计软件包对数据进行单因素方

差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮细胞的纯度和成活率 (图 1)：用组织贴块法培养的内皮细胞，其表面表达 CD31 特异性标记，鉴定纯度平均为 98%，所获得的内皮细胞经锥虫蓝检测活性为 96%，可满足进一步实验的要求。

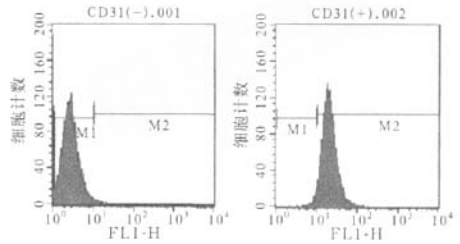


图 1 组织贴块法培养的内皮细胞

2.2 各组 EPCR 和 PAR1 的 mRNA 表达 (表 1)：空白对照组内皮细胞有一定量的 EPCR 和 PAR1 mRNA 表达。与空白对照组比较，LPS 刺激组 EPCR mRNA 表达 12 h 时差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，24~72 h 则明显低于空白对照组 (P 均 < 0.05)；而 PAR1 mRNA 表达于 12~48 h 均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，72 h 无明显变化 ($P > 0.05$)。血必净干预组 12~72 h EPCR 和 PAR1 的 mRNA 表达均明显高于 LPS 刺激组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与 APC 干预组比较则差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

2.3 各组 EPCR 和 PAR1 的蛋白表达 (表 2)：空白对照组内皮细胞膜上均有一定量的 EPCR 和 PAR1 蛋白表达。各组 12 h 时 PAR1 和 EPCR 的蛋白表达变化并不明显 (P 均 > 0.05)；LPS 刺激组 24~72 h

表 1 各组大鼠各时间点 EPCR 和 PAR1 的 mRNA 表达变化比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	EPCR mRNA				PAR1 mRNA			
	12 h	24 h	48 h	72 h	12 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	0.665±0.036	0.683±0.070	0.654±0.062	0.612±0.048	0.412±0.034	0.423±0.054	0.447±0.086	0.416±0.030
LPS 刺激组	0.607±0.026	0.578±0.325 ^a	0.536±0.037 ^a	0.504±0.057 ^a	0.341±0.042 ^a	0.327±0.048 ^a	0.285±0.060 ^b	0.340±0.056
APC 干预组	0.687±0.041 ^c	0.792±0.054 ^{ad}	0.728±0.029 ^d	0.698±0.033 ^{ad}	0.496±0.041 ^{ad}	0.438±0.017 ^d	0.616±0.095 ^{bd}	0.583±0.067 ^{bd}
血必净干预组	0.705±0.057 ^c	0.767±0.040 ^{ad}	0.734±0.060 ^{ad}	0.725±0.063 ^{bd}	0.433±0.050 ^d	0.465±0.055 ^d	0.585±0.025 ^{ad}	0.547±0.062 ^{bd}

注：与空白对照组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与 LPS 刺激组比较，^c $P < 0.05$ ，^d $P < 0.01$

表 2 各组大鼠各时间点 EPCR 和 PAR1 的蛋白表达变化比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	EPCR 蛋白				PAR1 蛋白			
	12 h	24 h	48 h	72 h	12 h	24 h	48 h	72 h
空白对照组	40.16±2.84	41.75±0.87	39.75±0.41	36.59±0.87	22.38±0.89	22.19±0.78	23.60±0.61	21.88±0.95
LPS 刺激组	39.85±1.55	33.70±1.59 ^b	25.07±1.22 ^b	16.65±0.94 ^b	24.29±1.22	19.61±0.72 ^b	16.72±0.91 ^b	14.84±1.13 ^b
APC 干预组	39.23±2.40	39.94±0.81 ^{bd}	39.75±1.26 ^d	29.66±1.15 ^{bd}	23.60±1.79	25.08±1.29 ^d	24.95±1.02 ^d	20.42±0.74 ^d
血必净干预组	41.34±3.21	40.92±1.18 ^{bde}	42.61±0.63 ^{bd}	32.29±2.33 ^{bd}	21.99±1.86	23.54±0.94 ^{bde}	30.65±0.87 ^{bdf}	22.87±1.28 ^{df}

注：与空白对照组比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ；与 LPS 刺激组比较，^c $P < 0.05$ ，^d $P < 0.01$ ；与 APC 干预组比较，^e $P < 0.05$ ，^f $P < 0.01$

时 EPCR 和 PAR1 的蛋白表达明显低于空白对照组 (P 均 < 0.01)。血必净干预组 24~72 h 时 EPCR 和 PAR1 的蛋白表达均明显高于 LPS 刺激组 (P 均 < 0.01)；与 APC 干预组比较均有明显差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

内皮细胞是覆衬于全身血管内面的单层扁平细胞,它作为组织与血液间的第一道屏障,参与血液-组织之间的物质交换,具有构建维持正常的非血栓形成的膜表面以及参与合成多种血管活性物质和炎症介质的功能。内皮细胞作为最先感受机体内环境变化的细胞之一,其能表达多种炎症和凝血相关的蛋白和受体,在凝血、炎症、纤溶、免疫反应等方面发挥重要的作用。

EPCR 是构成蛋白 C(PC)系统的重要受体之一,主要位于大血管的内皮细胞上,属于 I 型跨膜蛋白。EPCR 在 PC 的活化过程中起重要作用,PC 与 EPCR 结合并将其呈递给凝血酶-血栓调节蛋白(T-TM)复合物,可以提高 PC 的活化效率。被激活后的 APC 与 EPCR 也有同样的亲和力和失活速度^[3]。EPCR 作为 PC 和 APC 的共同受体,它除了具有传统的抗血栓、促纤溶特性外,晚近研究还认为其在炎症反应过程中相互协调整合,参与抗炎和抗凋亡作用^[4]。蛋白酶受体家族(PARs)属于 G 蛋白耦联受体超家族,存在于细胞膜上,参与细胞信号转导。PARs 可被体内多种蛋白酶激活,参与细胞因子和炎症介质的释放;激活血小板,促进其聚集与凝血过程;增加血管渗出以及中性粒细胞趋化^[5]。在 APC-EPCR-PARs 通路中,APC 只有通过 PAR1 发挥对内皮细胞的保护作用^[6]。凝血酶是通过激活 PARs 发挥促凝血或促凋亡作用的,研究发现,当血浆中凝血酶浓度升高时,凝血酶先与血栓调节蛋白结合并抑制其对 PARs 的激活,从而抑制凝血酶介导的 PARs 信号转导通路,使凝血酶只能专一激活 PC,通过 PC 通路激活 PARs、转导 PC 通路的信号,发挥对内皮细胞的保护作用^[7]。APC 通过 EPCR 和 PAR1 通路下调组织因子、肿瘤坏死因子、核转录因子等炎症因子表达,抑制炎症反应,还可直接抑制内皮细胞抑癌基因 p53 转录,减小 Bax/Bcl-2 比值,从而减少蛋白酶的激活,最终抑制细胞凋亡,发挥细胞保护作用。用抗 PC 结合 EPCR 位点的单克隆抗体可明显阻断 APC 的保护效应^[8]。

在本课题组前期体内实验中已发现,血必净注射液能增加脓毒症大鼠体内 APC 的生成,显著改善

脓毒症大鼠的凝血功能^[9-12];下调炎症介质水平,明显降低脓毒症大鼠死亡率^[13-14]。本研究用 LPS 体外刺激内皮细胞,同时用 APC 和血必净进行干预,结果发现,两药均对内皮细胞有保护作用,可降低内皮细胞内促凝物质和促炎介质的释放,并能抑制内皮细胞凋亡(实验数据未显示,结果待发表)。由于 APC-EPCR-PAR1 通路介导移位所需的胞膜信号和人核方式以及两种受体下游路径之间的关系还不清楚,血必净注射液对内皮细胞保护作用的具体机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, 2003, 101(10): 3765-3777.
- [2] Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med*, 2002, 30(5 Suppl):S207-213.
- [3] Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*, 2003, 124(1):26.
- [4] Van de Wouwer M, Collen D, Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system; integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(8):1374-1383.
- [5] Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors; contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*, 2004, 84(2):579-621.
- [6] Taylor FB Jr, Peer GT, Lockhart MS, et al. Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood*, 2001, 97(6):1685-1688.
- [7] Feistritz C, Lenta R, Riewald M. Protease-activated receptors-1 and-2 can mediate endothelial barrier protection; role in factor Xa signalling. *Thromb Haemost*, 2005, 3(12): 2789-2805.
- [8] Cheng T, Liu D, Griffin JH, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nat Med*, 2003, 9(3):338-342.
- [9] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠组织肿瘤坏死因子- α 及凝血功能的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(2):104-107.
- [10] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠血栓调节蛋白及内皮蛋白 C 受体基因表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(6):365-368.
- [11] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠蛋白 C 及肿瘤坏死因子基因表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(8):488-491.
- [12] 李银平, 郑贵军, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠活化蛋白 C 及凝血功能的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(6):361-364.
- [13] 武子霞, 乔佑杰, 李银平, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠器官功能及死亡率的影响. *天津中医药大学学报*, 2007, 26(2):68-70.
- [14] 王文江, 姚咏明, 威力明, 等. 血必净注射液对烧伤延迟复苏大鼠器官功能及死亡率的影响. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(1):16-18.

(收稿日期:2008-10-28)

(本文编辑:保健媛)