

活化蛋白 C 对脂多糖诱导大鼠主动脉内皮细胞表达血管性血友病因子及其裂解酶的影响

郑贵军 武子霞 朱海云 殷冬梅 孙茜 李银平

【摘要】 目的 探讨活化蛋白 C (APC) 对脂多糖 (LPS) 诱导大鼠主动脉内皮细胞 (RAECs) 血管性血友病因子抗原 (vWFAg) 及其裂解酶 (ADAMTS-13) 蛋白表达的影响。方法 采用组织贴块法培养 Wistar 大鼠的 RAECs, 1 周后传代至第 4~5 代用于实验。将细胞分为对照组、LPS 刺激组 (1 mg/L) 以及 APC 干预组 (在 LPS 刺激后分别加入终浓度为 0.1、1、10 mg/L 的 APC); 分别于 12、24、48、72 h 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定 RAECs 培养上清液中 vWFAg 和 ADAMTS-13 蛋白的表达水平。结果 对照组仅有少量的 vWFAg 和 ADAMTS-13 蛋白表达。随 LPS 刺激时间延长, vWFAg 表达 12 h 即明显增多, 48 h 达峰值 [(285.45 ± 30.13)%], ADAMTS-13 蛋白表达 (μg/L) 呈降低趋势, 72 h 降至最低 (13.32 ± 2.37), 与对照组 [vWFAg: (94.53 ± 7.83)%, ADAMTS-13: 115.76 ± 2.36] 比较差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。APC 可逆转 LPS 刺激后对 vWFAg 的促进作用和对 ADAMTS-13 的抑制作用, 且剂量越大, 逆转效果越明显。10 mg/L APC 干预后可使 LPS 刺激 48 h 时达峰值的 vWFAg 明显降低 [(198.43 ± 17.92)% 比 (285.45 ± 30.13)%], 使 LPS 刺激 72 h 时降至最低的 ADAMTS-13 (μg/L) 明显升高 (125.25 ± 2.70 比 13.32 ± 2.37), 差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。结论 LPS 刺激 RAECs 后 vWFAg 明显升高, ADAMTS-13 蛋白表达明显降低, 具有时间依赖性; 用不同浓度 APC 干预后, 随浓度增加和作用时间延长, vWFAg 明显降低, ADAMTS-13 蛋白表达明显升高, 具有剂量依赖性和时间依赖性。

【关键词】 脂多糖; 主动脉内皮细胞; 活化蛋白 C; 血管性血友病因子; 血管性血友病因子裂解酶; 大鼠

The effects of activated protein C on the von Willebrand factor and von Willebrand factor cleaving protease of rat aortic endothelial cell induced by lipopolysaccharide ZHENG Gui-jun*, WU Zi-xia, ZHU Hai-yun, YIN Dong-mei, SUN Qian, LI Yin-ping. *Department of Critical Care Medicine, Zhuozhou City Hospital of Hebei Province, Zhuozhou 072750, Hebei, China

Corresponding author: LI Yin-ping, Tianjin Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China, Email: cccm.23042150@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the activated protein C (APC) on the von Willebrand factor antigen (vWFAg) and von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) protein expression in rat aortic endothelial cells (RAECs) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** RAECs from Wistar rats were cultured with the tissue explants adherence method. RAECs were cultured for one week, After one week culture, RAECs in 4-5 generations were divided into control group, LPS stimulation groups (1 mg/L) and APC intervention groups (0.1, 1 and 10 mg/L APC was added after LPS stimulation). The supernatants were obtained at 12, 24, 48, and 72 hours after LPS stimulated to determine the vWFAg and protein of ADAMTS-13 expression by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** In the control group, RAECs expressed little vWFAg and protein of ADAMTS-13. With stimulation of LPS, the vWFAg was significantly increased at 12 hours, and reached the peak at 48 hours [(285.45 ± 30.13)%], and the level of ADAMTS-13 (μg/L) was gradually decreased, and reached the nadir at 72 hours (13.32 ± 2.37), there was significant difference compared with control group [vWFAg: (94.53 ± 7.83)%, ADAMTS-13: 115.76 ± 2.36, both $P < 0.01$]. The effects on vWFAg promoting and ADAMTS-13 inhibition after LPS stimulation could be dose-dependently reversed by APC. 10 mg/L of APC could decrease the peak of vWFAg at 48 hours of LPS stimulation [(198.43 ± 17.92)% vs. (285.45 ± 30.13)%], and increase the minimize of ADAMTS-13 (μg/L) at 72 hours of LPS stimulation (125.25 ± 2.70 vs. 13.32 ± 2.37), with significant difference (both $P < 0.01$). **Conclusions** After stimulation with LPS, the level of vWFAg was time-dependent increased, as the protein of ADAMTS-13 was decreased. APC could attenuate the effect of LPS on vWFAg and protein of ADAMTS-13 with dose-dependent and time-dependent patterns.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Aortic endothelial cell; Activated protein C; Von Willebrand factor; Von Willebrand factor cleaving protease; Rat

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.08.011

基金项目:天津市医药卫生科研基金资助项目(09KZ62);天津市中西医结合科研项目(2005088)

作者单位:072750 河北省涿州市医院重症医学科(郑贵军);300050 天津市天和医院(武子霞、孙茜、李银平);天津市药物研究院附属医院(朱海云);天津市第一中心医院(殷冬梅) 通信作者:李银平, Email: cccm.23042150@yahoo.com.cn

血管内皮细胞单层是血液与组织之间的重要门户,参与调节血管紧张度、免疫反应、脂质代谢及内皮下基质合成等生理活动,在炎症、免疫、凝血激活中起主要作用。内皮细胞既是细胞因子的产生者,也是其作用的靶器官。脓毒症时炎症反应和凝血“瀑布”相继被激活,并与多种免疫细胞相互影响,共同参与多器官功能的损害,内皮细胞在其中起重要的促进作用^[1-2]。本研究中原有实验基础上探讨活化蛋白 C(APC)对脂多糖(LPS)刺激大鼠主动脉内皮细胞(RAECs)后血管性血友病因子抗原(vWFAg)及其裂解酶(ADAMTS-13)蛋白表达的影响,旨在为临床应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物:雄性 Wistar 大鼠 5 只,体重 200 ~ 250 g,购自河北医科大学实验动物中心,合格证号:DK102047。动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 细胞分离与培养:取大鼠近心端主动脉,采用组织贴块法^[3]培养血管内皮细胞,3 d 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,大小均匀,胞核清晰呈卵圆形,胞质丰富;去除组织块,更换培养基继续培养 3 ~ 4 d,至大部分细胞融合成层,呈“鹅卵石样”排列后,用 0.25% 胰蛋白酶 -0.02% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 消化液 (美国 Gibco 公司)消化、传代,取第 4 ~ 5 代细胞进行实验。

1.3 细胞鉴定:取培养后血管组织细胞,用胰蛋白酶 -EDTA 消化,经漂洗、离心、去除含血清的培养液后,细胞悬液涂于玻片上,甲醇固定,磷酸盐缓冲液(PBS,北京 Solarbio 公司)冲洗,顺序加入 1 : 50 兔抗人 VIII 因子相关抗原抗血清(华美生物公司) 50 μl 和 1 : 25 荧光标记的羊抗兔 IgG(华美生物公司) 50 μl 后孵育;甘油封片,荧光显微镜下观察;对照玻片的一抗用 PBS 代替。VIII 因子相关抗原间接免疫荧光染色样品片呈明亮的黄绿色荧光为阳性,对照为阴性。

1.4 实验分组:以含 20%胎牛血清(杭州四季青公司)的 DMEM 培养液(培养基购自北京 Solarbio 公司)重悬内皮细胞,调整浓度为 1 × 10⁶ 个 /ml,每孔加 200 μl 于 96 孔培养板中。分为对照组、LPS 刺激组、LPS+APC 干预组,每孔设 6 个平行孔对照。LPS 刺激组加入 1 mg/L LPS (大肠杆菌血清型 O111:B4);LPS+APC 组分别加入 1 mg/L 的 LPS 和 APC (美国 Sigma 公司),APC 终浓度分别为 0.1、1、10 mg/L。充分振荡摇匀后放入 37 °C、5%CO₂ 培养箱内,分别在 12、24、48、72 h 留取上清用于测定。

1.5 vWFAg、ADAMTS-13 蛋白测定:用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(vWFAg:上海太阳生物技术公司,ADAMTS-13:武汉中美科技有限公司)检测细胞培养液上清内 vWFAg 及 ADAMTS-13 蛋白表达,将样品吸光度值代入标准曲线,计算出 vWFAg (%) 和 ADAMTS-13 蛋白表达(μg/L)。

1.6 统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计软件,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行单因素方差分析和 t 检验,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 APC 对 LPS 刺激 RAECs 表达 vWFAg 的时间 - 效应和剂量 - 效应关系(表 1):对照组 RAECs 仅有少量 vWFAg 表达。LPS 刺激组 12 h vWFAg 表达即较对照组明显增高;随刺激时间延长表达量逐渐升高,48 h 达峰值后下降,72 h 仍显著高于对照组 (P < 0.05 或 P < 0.01)。APC 干预组 12 h vWFAg 表达高于 LPS 刺激组,24 ~ 72 h 表达量则低于 LPS 刺激组,随干预时间延长,低剂量干预组表达量于 48 h 达峰值,并随 APC 干预浓度升高而下降,高剂量干预组表达量逐渐升高至 72 h 达峰值,且表达量显著低于低剂量组 (P < 0.05 或 P < 0.01)。

2.2 APC 对 LPS 刺激 RAECs 表达 ADAMTS-13 蛋白的时间 - 效应和剂量 - 效应关系(表 1):对照组 RAECs 有少量 ADAMTS-13 蛋白表达。LPS 刺激组 24 h 起 ADAMTS-13 蛋白表达即明显低于对照组,

表 1 不同浓度 APC 对 LPS 刺激大鼠不同时间点主动脉内皮细胞 vWFAg 及 ADAMTS-13 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	vWFAg (%)				ADAMTS-13 (μg/L)			
		12 h	24 h	48 h	72 h	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组	6	94.53 ± 7.83	94.53 ± 7.83	94.53 ± 7.83	94.53 ± 7.83	115.76 ± 2.36	115.76 ± 2.36	115.76 ± 2.36	115.76 ± 2.36
LPS 刺激组	6	105.72 ± 6.75 ^a	241.76 ± 23.60 ^b	285.45 ± 30.13 ^b	275.24 ± 27.42 ^b	113.56 ± 1.36	103.64 ± 1.89 ^b	34.83 ± 1.97 ^b	13.32 ± 2.37 ^b
LPS+APC 0.1 mg/L 组	6	154.52 ± 20.31	215.36 ± 10.24 ^c	235.13 ± 20.41 ^d	205.46 ± 16.83 ^d	115.36 ± 3.69	117.50 ± 4.79 ^c	117.56 ± 3.88 ^c	128.54 ± 3.70 ^d
LPS+APC 1 mg/L 组	6	160.36 ± 10.24 ^c	208.52 ± 16.90 ^c	216.74 ± 18.67 ^{de}	210.25 ± 14.80 ^d	115.98 ± 4.78	120.32 ± 4.66 ^{ce}	125.62 ± 2.67 ^{df}	126.74 ± 3.11 ^{df}
LPS+APC 10 mg/L 组	6	159.34 ± 20.41 ^c	190.58 ± 14.79 ^{de}	198.43 ± 17.92 ^{df}	201.51 ± 16.17 ^{df}	117.42 ± 4.61 ^{ce}	123.81 ± 5.80 ^{ce}	127.75 ± 3.84 ^{df}	125.25 ± 2.70 ^{df}

注:APC:活化蛋白 C,LPS:脂多糖,vWFAg:血管性血友病因子抗原,ADAMTS-13:血管性血友病因子裂解酶;与对照组比较,^aP < 0.05,

^bP < 0.01;与 LPS 刺激组比较,^cP < 0.05,^dP < 0.01;与 LPS+APC 0.1 mg/L 组比较,^eP < 0.05,^fP < 0.01

且随刺激时间延长表达量逐渐下降(均 $P < 0.01$)。APC 干预后 ADAMTS-13 蛋白表达即高于 LPS 刺激组,随 APC 浓度升高,ADAMTS-13 蛋白表达逐渐升高。其中低剂量组升高时间和达峰时间均晚于高剂量组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

内源性的 APC 是由肝脏产生的无生物学活性的蛋白 C (PC) 分泌于血浆中,与内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)、凝血酶-血栓调节蛋白复合物(T-TM) 等结合,发生酶解反应转化而来。APC 不但通过直接灭活凝血因子 FVa、FVIIIa 和促纤溶等维持体内凝血系统平衡,还可通过 APC-EPCR-凝血酶受体-1 (PAR1) 通路发挥抗炎和抗细胞凋亡等作用^[4-6]。脓毒症时由于多种细胞因子均可导致凝血调节蛋白和 EPCR 表达降低,影响 APC 生成^[7]。补充外源性 APC 是否可行,已在动物实验^[8]和临床研究^[9]中得到证实。

血管性血友病因子(vWF)主要由内皮细胞内质网合成,在高尔基体内形成特殊的韦伯尔-帕拉德小体^[10]。vWF 有基础性分泌和调节性分泌两种释放形式。正常内皮细胞分泌新合成的小分子多聚物,属于基础性分泌;当内皮细胞受刺激或损伤时,从韦伯尔-帕拉德小体中释放大分子 vWF 多聚物(UL-vWF),属于调节性分泌^[11]。这种 UL-vWF 直接与血小板膜糖蛋白结合,诱导血小板聚集,沉积在血管壁上,加剧了内皮细胞膜及其细胞器结构的破坏,因此,vWF 释放不但可以看作是内皮受损的标志,其表达水平还可以反映内皮的受损程度^[12-13]。

本实验结果表明,正常内皮细胞能表达少量的 vWF;LPS 刺激后 12 h 即可在细胞培养液中检测到大量 vWFAg,并随 LPS 作用时间延长而明显升高,但 48 h 和 72 h 相比变化不大。考虑可能是由于内皮细胞受 LPS 刺激后,在短时间内大量释放 vWF,造成韦伯尔-帕拉德小体排空,因而 vWF 相对减少。用不同浓度 APC 干预后 12 h 时,vWFAg 水平仍高于 LPS 刺激组,24 ~ 72 h 时则明显降低,可能与 APC 作用于内皮细胞后要与相应的受体结合,发生复杂的化学反应需要一定的时间有关。

在本课题组前期的实验中发现,从正常培养的内皮细胞培养上清液中可检测到 ADAMTS-13 蛋白表达,表现为 LPS 刺激后 ADAMTS-13 表达有明显变化,随 LPS 刺激浓度的增加和作用时间的延长,ADAMTS-13 蛋白水平较正常组有明显变化^[14]。说

明血管内皮细胞有合成和分泌 ADAMTS-13 的功能,LPS 可影响其蛋白表达。本实验在原有基础上用不同浓度 APC 干预,12 h 变化不明显,但随时间延长 ADAMTS-13 表达较 LPS 刺激组升高。但 APC 对内皮细胞 ADAMTS-13 表达的影响是否通过 APC 的抗细胞凋亡作用使内皮细胞存活,从而能较 LPS 刺激组分泌更多的 ADAMTS-13 有待实验证实。

参考文献

- [1] Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, 2003, 101: 3765-3777.
- [2] 郑贵军,孙茜,李银平.炎症、内皮、凝血与脓毒症. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 573-576.
- [3] 郑贵军,武子霞,李银平,等.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. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 175-178.
- [4] Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 2000, 407: 258-264.
- [5] 武子霞,李银平,姚咏明.活化蛋白 C 的生物学活性及其作用机制研究进展. *中国危重病急救医学*, 2007, 19: 182-185.
- [6] Xue M, Campbell D, Sambrook PN, et al. Endothelial protein C receptor and protease-activated receptor-1 mediate induction of a wound-healing phenotype in human keratinocytes by activated protein C. *J Invest Dermatol*, 2005, 125: 1279-1285.
- [7] Faust SN, Levin M, Harrison OB, et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med*, 2001, 345: 408-416.
- [8] van Veen SQ, Levi M, van Vliet AK, et al. Peritoneal lavage with activated protein C alters compartmentalized coagulation and fibrinolysis and improves survival in polymicrobial peritonitis. *Crit Care Med*, 2006, 34: 2799-2805.
- [9] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 2001, 344: 699-709.
- [10] Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost*, 2009, 7 Suppl 1: 24-27.
- [11] Giblin JP, Hewlett LJ, Hannah MJ. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood*, 2008, 112: 957-964.
- [12] Zheng X, Chung D, Takayama TK, et al. Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*, 2001, 276: 41059-41063.
- [13] Moore JC, Hayward CP, Warkentin TE, et al. Decreased von Willebrand factor protease activity associated with thrombocytopenic disorders. *Blood*, 2001, 98: 1842-1846.
- [14] 郑贵军,殷冬梅,武子霞,等.脂多糖诱导大鼠主动脉内皮细胞表达血管性血友病因子裂解酶的研究. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 482-485.

(收稿日期:2012-05-23)

(本文编辑:李银平)