

利伐沙班对内毒素干扰人脐静脉内皮细胞损伤的影响

施梦 黄杰春 孙笑天 汪昉睿 储祥麟 姜容容 王宜青 庞烈文

复旦大学附属华山医院心胸外科, 上海 200040

通信作者: 庞烈文, Email: huashan_heart@sina.cn

【摘要】 目的 探讨凝血因子Xa (FXa)抑制剂利伐沙班对内毒素诱导的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 损伤的作用及其机制。方法 体外培养 HUVEC, 待细胞生长至 80% 融合时, 按随机数字表法分为 4 组: 空白对照组 (DMEM 培养基)、脂多糖 (LPS) 组 (100 $\mu\text{g/L}$ LPS 培养 16 h)、FXa+LPS 组 (100 nmol/L FXa 预处理 24 h 后加入 LPS)、FXa+RIV+LPS 组 (100 nmol/L FXa+1 $\mu\text{mol/L}$ 利伐沙班预处理 24 h 后加入 LPS)。各组细胞处理后用 CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测细胞活性, 用细胞划痕实验检测细胞迁移能力, 用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 用 Transwell 小室法及伊文思蓝检测单层内皮细胞屏障通透性, 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL-1 β 、IL-6) 水平, 用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测细胞核转录因子- κB (NF- κB) 和丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 炎症信号通路关键蛋白的表达。结果 与空白对照组比较, LPS 组细胞活性降低, 细胞迁移能力增加, 凋亡细胞增多, 单层内皮细胞屏障通透性增加, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎因子分泌增加, 炎症信号通路关键蛋白磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (p-JNK)、磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK)、磷酸化转化生长因子激酶 1 (p-TAK1) 和磷酸化 NF- κB p65 (p-NF- κB p65) 表达增加, 说明 LPS 可以刺激血管内皮细胞的炎症反应, 从而对细胞活性、凋亡及功能有明显影响。FXa+LPS 组除 IL-6 水平显著高于 LPS 组外, 其他指标与 LPS 组比较差异均无统计学意义。与 FXa+LPS 组比较, FXa+RIV+LPS 组细胞活性明显提高 (A 值: 0.42 ± 0.02 比 0.33 ± 0.02), 细胞迁移能力明显下降 (倍: 1.78 ± 0.17 比 2.24 ± 0.20), 凋亡细胞明显减少 [(11.30 ± 0.70)% 比 (21.03 ± 0.19)%], 单层内皮细胞通透性明显降低 [(149 ± 12)% 比 (253 ± 15)%], 炎症因子水平明显降低 [IL-1 β (ng/L): 163.2 ± 20.7 比 477.8 ± 20.2 , IL-6 (ng/L): 69.3 ± 0.5 比 238.0 ± 24.1 , TNF- α (ng/L): 117.0 ± 13.1 比 196.2 ± 4.5], 炎症信号通路中 p-TAK1 和 p-NF- κB p65 蛋白表达水平明显降低 (p-TAK1/TAK1: 0.74 ± 0.09 比 1.85 ± 0.15 , p-NF- κB p65/NF- κB p65: 1.15 ± 0.17 比 2.36 ± 0.20), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 而 p-JNK 和 p-p38MAPK 蛋白表达水平差异无统计学意义 (p-JNK/JNK: 1.64 ± 0.12 比 1.65 ± 0.15 , p-p38MAPK/p38MAPK: 2.31 ± 0.32 比 2.35 ± 0.20 , 均 $P > 0.05$)。结论 利伐沙班可以有效缓解内毒素刺激 HUVEC 的炎症反应, 其作用机制可能与抑制 NF- κB 信号通路激活而非 MAPK 信号通路有关。

【关键词】 利伐沙班; 血管内皮细胞; 内毒素; 核转录因子- κB ; 丝裂素活化蛋白激酶

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目 (18140903400)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.04.019

Effect of rivaroxaban on the injury during endotoxin-induced damage to human umbilical vein endothelial cells

Shi Meng, Huang Jiechun, Sun Xiaotian, Wang Fangrui, Chu Xianglin, Jiang Rongrong, Wang Yiqing, Pang Liewen

Department of Cardiothoracic Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: Pang Liewen, Email: huashan_heart@sina.cn

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effect and mechanism of rivaroxaban, an inhibitor of coagulation factor Xa (FXa), on endotoxin-induced injury to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** When cultured HUVEC grow to 80% fusion, they were divided into four groups according to the random number method: blank control group (DMEM medium), lipopolysaccharide (LPS) group (cells were challenged by 100 $\mu\text{g/L}$ LPS for 16 hours), FXa+LPS group (cells were challenged by LPS for 16 hours after they were cultured with 100 nmol/L FXa for 24 hours), and FXa+RIV+LPS group (cells were challenged by LPS for 16 hours after they were cultured with 100 nmol/L FXa and 1 $\mu\text{mol/L}$ rivaroxaban for 24 hours). After each group of cells were challenged with LPS, the cell activity was detected by the cell proliferation and toxicity kit (CCK-8); the cell migration ability was detected by cell scratch experiments; the abilities of cells migration were measured by scratch-wound-healing assay; the apoptosis of cells were evaluated using flow cytometry; the endothelial barrier of cells was assessed by Transwell and Evans blue; the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL-1 β , IL-6) were detected by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); the expressions of nuclear factor- κB (NF- κB) and mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway were detected by Western Blot. **Results** Compared with blank control group, the cell viability in LPS group was significantly decreased, and the migration ability, number of apoptotic cells, and barrier permeability of endothelial cells was significantly increased, the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were significantly increased, and the expressions of phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase (p-JNK), phosphorylation of p38MAPK (p-p38MAPK), phosphorylation

of transforming growth factor kinase 1 (p-TAK1) and phosphorylation of NF- κ Bp65 (p-NF- κ Bp65) were significantly increased. It indicated that LPS could stimulate the inflammatory response of vascular endothelial cells, and had a significant impact on cell activity, apoptosis and function. There was no significant difference in above indexes between FXa+LPS group and LPS group, except for the level of IL-6 being higher in FXa+LPS group. Compared with FXa+LPS group, in FXa+RIV+LPS group, the cell activity was significantly increased (*A* value: 0.42 ± 0.02 vs. 0.33 ± 0.02), and migration ability was significantly decreased (folds: 1.78 ± 0.17 vs. 2.24 ± 0.20), the number of apoptotic cells was significantly decreased [$(11.30 \pm 0.70)\%$ vs. $(21.03 \pm 0.19)\%$], and permeability of monolayers endothelial cells was significantly decreased [$(149 \pm 12)\%$ vs. $(253 \pm 15)\%$], the levels of inflammatory cytokines were significantly decreased [IL-1 β (ng/L): 163.2 ± 20.7 vs. 477.8 ± 20.2 , IL-6 (ng/L): 69.3 ± 0.5 vs. 238.0 ± 24.1 , TNF- α (ng/L): 117.0 ± 13.1 vs. 196.2 ± 4.5], the expressions of p-TAK1 and p-NF- κ Bp65 were significantly decreased (p-TAK1/TAK1: 0.74 ± 0.09 vs. 1.85 ± 0.15 , p-NF- κ Bp65/NF- κ Bp65: 1.15 ± 0.17 vs. 2.36 ± 0.20), with statistically significant differences (all *P* < 0.05). There was no significant difference in the p-JNK, p-p38MAPK expressions between FXa+RIV+LPS group and FXa+LPS group (p-JNK/JNK: 1.64 ± 0.12 vs. 1.65 ± 0.15 , p-p38MAPK/p38MAPK: 2.31 ± 0.32 vs. 2.35 ± 0.20 , both *P* > 0.05). **Conclusion** Rivaroxaban can effectively relieve the inflammatory response of HUVEC stimulated by LPS, which may be related to the inhibition of NF- κ B signaling pathway activation rather than MAPK signaling pathway.

[Key words] Rivaroxaban; Vascular endothelial cell; Endotoxin; Nuclear factor- κ B; Mitogen-activated protein kinase

Fund program: Shanghai Science and Technology Planning Project (18140903400)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.04.019

异常的血液凝固和凝血级联反应在炎症及组织损伤修复方面起关键作用^[1]。凝血反应和炎症反应在组织损伤过程中相互促进^[2]。炎性损伤的一个主要原因是血管内皮细胞功能失调,血管内皮细胞屏障破坏^[3-5]。目前能够有效保护血管屏障及恢复血管内皮细胞功能的治疗方法较少,需要更多的基础研究探索。除了凝血功能外,凝血因子Xa(FXa)在其他生理过程中也起重要作用,例如炎症反应调节、血管重构和组织纤维化等^[6-7]。FXa可增加炎性因子mRNA表达^[8-9]。利伐沙班是一种新型的口抗凝药物,可直接抑制FXa和促凝血酶原复合物的活性^[10-11]。有研究表明,利伐沙班可以通过抑制FXa而减少炎性介质的分泌^[9]。本研究旨在验证利伐沙班能否抑制内毒素脂多糖(LPS)诱导的血管内皮细胞损伤,是否通过核转录因子- κ B(NF- κ B)或丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)炎症信号通路抑制内毒素对血管内皮细胞的损伤。

1 材料和方法

1.1 实验药品及主要试剂:利伐沙班购自德国拜耳药业。人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购自中国科学院细胞库。DMEM培养基和胎牛血清购自美国Gibco公司;凝血因子FXa购自美国Hematologic Technologies公司;细菌内毒素和伊文思蓝购自美国Sigma公司;BCA蛋白浓度测量试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;p38MAPK、磷酸化p38MAPK(p-p38MAPK)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、磷酸化JNK(p-JNK)、NF- κ Bp65、磷酸化NF- κ Bp65(p-NF- κ Bp65)、转化生长因子激酶1(TAK1)、磷酸化TAK1(p-TAK1)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)

单克隆抗体购自美国赛信通公司;酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国R&D公司。

1.2 细胞培养及分组处理:用含1%青链霉素和10%胎牛血清的DMEM培养基培养HUVEC,常规5%CO₂、37℃孵育3d,于直径100mm或60mm的培养皿中传代培养,隔夜培育后按随机数字表法分成4组,当细胞生长至80%融合度时,给予相应的干预措施,以探讨利伐沙班对HUVEC促炎症反应的作用。①空白对照组:用不含血清、FXa、利伐沙班或LPS的DMEM培养基培养细胞;②LPS组:用含100μg/L LPS的培养基培养细胞16h;③FXa+LPS组:于LPS刺激前用含100nmol/L FXa的乏血清DMEM培养基培养细胞24h;④FXa+RIV+LPS组:于LPS刺激前用含100nmol/L FXa及1μmol/L利伐沙班(RIV)的乏血清DMEM培养基培养细胞24h。

1.3 检测指标及方法:于LPS刺激后16h收集细胞和培养基备检。

1.3.1 CCK-8细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测细胞活性:将 1×10^4 个细胞接种96孔板中培养,每孔含100μL培养基。在每个孔中加入CCK-8检测液10μL,继续培养2h,用微孔板检测仪检测吸光度(A)值。

1.3.2 细胞划痕实验:应用细胞划痕实验证实利伐沙班对血管内皮细胞迁移能力的影响^[11]。将 1×10^5 个细胞接种于12孔板中,培养48h,直到内皮细胞充分融合。细胞经过FXa和利伐沙班处理后,用无菌枪头在每个培养皿中间进行划痕,然后用100μg/L LPS刺激16h。使用Image J软件测量划痕愈合的距离即细胞迁移距离,以空白对照组迁移

距离为1,计算各处理组与空白对照组迁移距离的比值,实验重复3次。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡情况:收集各组细胞,用100 μL缓冲液重悬,膜联蛋白V (Annexin V) 4℃下避光染色20 min;碘化丙啶(PI)染色10 min。用流式细胞仪检测细胞所携带的荧光情况。用FlowJo V10软件获取并分析数据。根据介质的荧光强度确定凋亡细胞所占的百分比。

1.3.4 Transwell小室法检测单层血管内皮细胞的通透性:应用Transwell小室及分光光度仪,通过检测白蛋白结合的伊文思蓝浓度来表示单层血管内皮细胞的渗透性^[12-13]。将 2×10^5 个细胞悬液加入Transwell板的上层小室中,用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养过夜,然后换成乏血清的培养基;加入含有FXa或利伐沙班的培养基培养24 h;然后加入LPS达到终浓度100 μg/L培养16 h;同时,将600 μL含有4%胎牛血清的培养基加入Transwell板的下层小室中;37℃温箱培养1 h,取下室100 μL培养基,在波长620 nm处测量A值。以空白对照组A值为100%,计算各组处理细胞与空白对照组的A值比值。

1.3.5 ELISA 试验检测细胞培养基中炎症因子水平:收集各组细胞培养上清液,按ELISA试剂盒说明书步骤测定白细胞介素(IL-1β、IL-6)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α)等促炎因子水平。

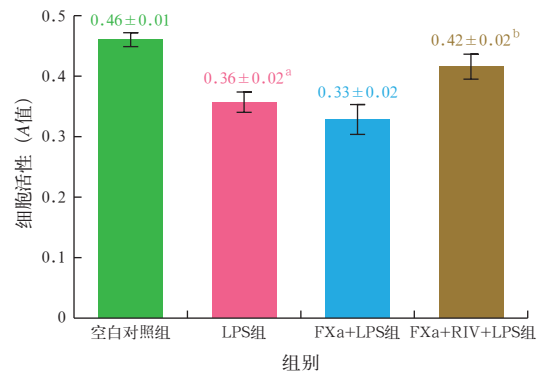
1.3.6 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测NF-κB、MAPK 通路蛋白表达:用裂解液裂解细胞,收集裂解液后4℃、14 000×g离心5 min留取上清液。用BCA法测定蛋白浓度,高温变性,分装上清液保存于-20℃冰箱中。提取的蛋白样品与加样缓冲液混合,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),分离的蛋白转移到聚乙二烯膜上,用5%脱脂牛奶室温封闭2 h后,用一抗4℃孵育过夜,二抗室温孵育振荡1.5 h,显影、拍照。以GAPDH作为内参用于蛋白定量。使用Image J软件检测蛋白灰度值,以目标蛋白与未磷酸化蛋白的灰度值比值代表目标蛋白表达量。

1.4 统计学分析:用GraphPad Prism软件对数据进行统计学分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用Student非配对t检验和单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 利伐沙班对LPS诱导的HUVEC损伤后细胞

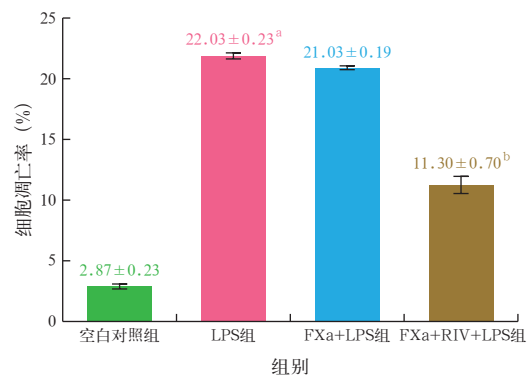
活性的影响(图1):与空白对照组比较,LPS刺激后可明显抑制HUVEC活性($P < 0.05$);在细胞培养液中加入FXa预处理后,细胞活性较LPS组进一步下降;而利伐沙班可以明显缓解LPS与FXa诱导的细胞活性下降($P < 0.05$)。说明利伐沙班对内毒素诱导的HUVEC活性下降有保护作用。



注:HUVEC为人脐静脉内皮细胞,LPS为脂多糖,FXa为凝血因子Xa,RIV为利伐沙班;与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与FXa+LPS组比较,^b $P < 0.05$

图1 各组HUVEC细胞活性比较

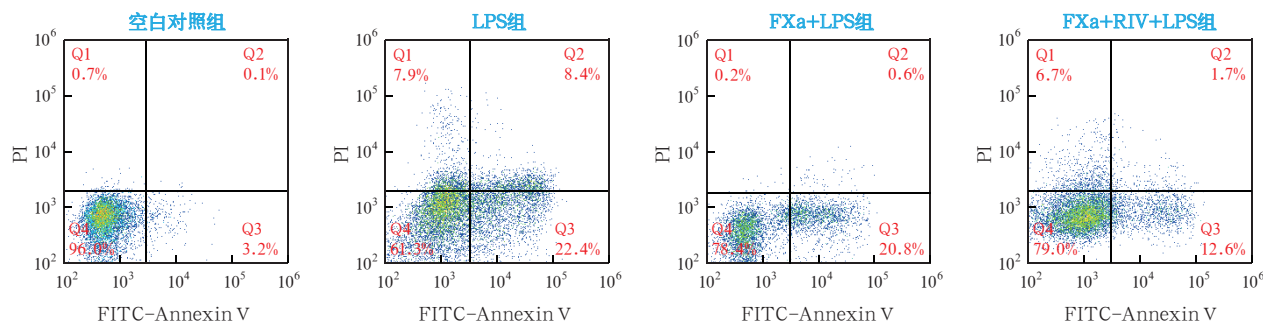
2.2 利伐沙班对LPS诱导的HUVEC损伤后细胞凋亡的影响(图2~3):与空白对照组相比,LPS组凋亡细胞明显增加($P < 0.05$);加入FXa预处理后凋亡细胞数量与LPS组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);而利伐沙班可显著抑制LPS与FXa诱导的凋亡细胞增加($P < 0.05$)。



注:HUVEC为人脐静脉内皮细胞,LPS为脂多糖,FXa为凝血因子Xa,RIV为利伐沙班;与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与FXa+LPS组比较,^b $P < 0.05$

图2 各组HUVEC细胞凋亡率比较

2.3 利伐沙班对LPS诱导HUVEC损伤后细胞迁移能力的影响(图4~5):LPS刺激后细胞迁移能力增加,迁移距离是空白对照组的(2.17 ± 0.22)倍($P < 0.05$);FXa预处理后细胞迁移能力与LPS组无明显差异;FXa+RIV+LPS组细胞迁移距离较FXa+LPS组明显减小($P < 0.05$)。证明利伐沙班抑制了内毒素对血管内皮细胞迁移运动的刺激作用。



注: HUVEC 为人脐静脉内皮细胞, LPS 为脂多糖, FXa 为凝血因子 Xa, RIV 为利伐沙班, FITC-Annexin V 为异硫氰酸荧光素-膜联蛋白 V, PI 为碘化丙啶; Q1 为坏死细胞, Q2 为晚期凋亡细胞, Q3 为早期凋亡细胞, Q4 为正常细胞

图 3 流式细胞仪检测各组 HUVEC 细胞凋亡情况

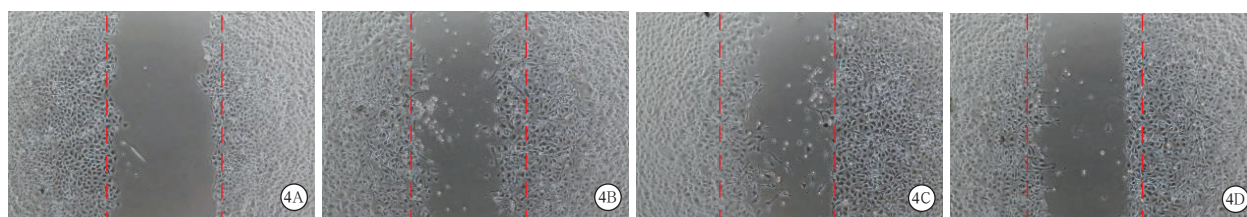
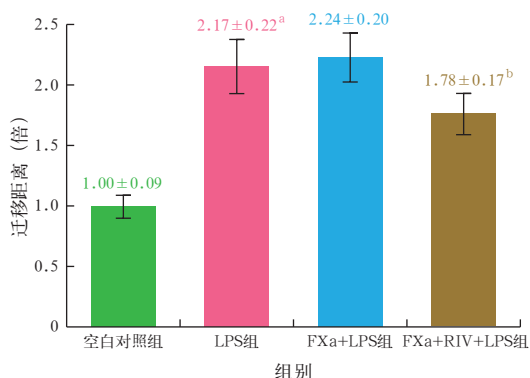
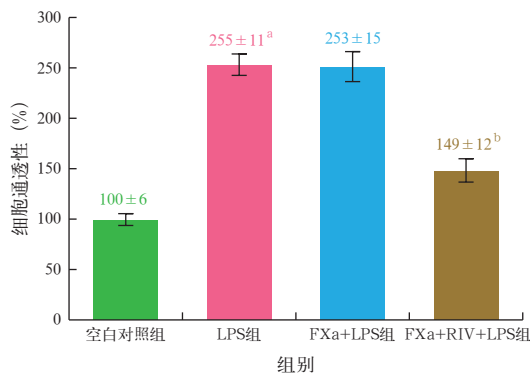


图 4 细胞划痕实验检测各组人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 迁移情况 双虚线代表实验划痕; 空白对照组 (A) 细胞无明显迁移; 脂多糖 (LPS) 组和凝血因子 Xa (FXa)+LPS 组细胞逐渐愈合, 迁移距离较大; FXa+ 利伐沙班 (RIV)+LPS 组细胞迁移距离较小 低倍放大



注: HUVEC 为人脐静脉内皮细胞, LPS 为脂多糖, FXa 为凝血因子 Xa, RIV 为利伐沙班; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 FXa+LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

图 5 各组 HUVEC 细胞迁移距离比较



注: HUVEC 为人脐静脉内皮细胞, LPS 为脂多糖, FXa 为凝血因子 Xa, RIV 为利伐沙班; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 FXa+LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

图 6 各组 HUVEC 细胞通透性比较

2.4 利伐沙班对 LPS 诱导 HUVEC 损伤后内皮细胞屏障破坏的影响 (图 6): 与空白对照组相比, LPS 诱导后单层内皮细胞屏障通透性明显增加 ($P < 0.05$), 细胞间连接破坏; 与 LPS 组相比, FXa+LPS 组单层内皮细胞屏障通透性无明显变化 ($P > 0.05$); 而 FXa+RIV+LPS 组血管内皮细胞屏障通透性较 FXa+LPS 组明显改善 ($P < 0.05$)。说明利伐沙班可以通过改善内毒素对血管内皮细胞屏障的影响来减轻炎性损伤。

2.5 利伐沙班对 LPS 诱导 HUVEC 损伤后细胞炎症反应的影响 (表 1): 与空白对照组比较, LPS 组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎性细胞因子水平明显升高 (均 $P < 0.05$)。与 LPS 组比较, FXa+LPS 组 IL-1 β 、TNF- α 水平无明显变化, 但是 IL-6 水平明显升高

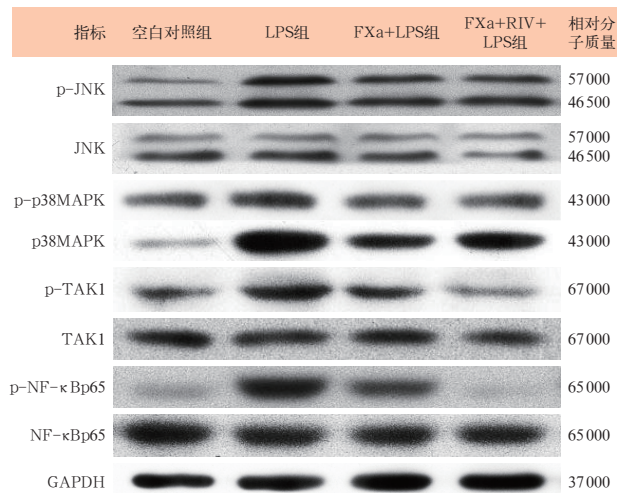
($P < 0.05$); 而 FXa+RIV+LPS 组炎性细胞因子水平明显被抑制, 且与 FXa+LPS 组比较差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。说明利伐沙班预处理可以抑制内毒素刺激细胞炎症反应所导致的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 分泌。

表 1 各组 HUVEC 细胞炎性因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (次)	IL-1 β (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
空白对照组	3	66.1 ± 2.9	19.4 ± 5.9	31.3 ± 17.0
LPS 组	3	389.6 ± 8.6 ^a	124.9 ± 7.7 ^a	204.7 ± 12.2 ^a
FXa+LPS 组	3	477.8 ± 20.2 ^a	238.0 ± 24.1 ^{ab}	196.2 ± 4.5 ^a
FXa+RIV+LPS 组	3	163.2 ± 20.7 ^{abc}	69.3 ± 0.5 ^{abc}	117.0 ± 13.1 ^{abc}

注: HUVEC 为人脐静脉内皮细胞, LPS 为脂多糖, FXa 为凝血因子 Xa, RIV 为利伐沙班, IL-1 β 为白细胞介素-1 β , IL-6 为白细胞介素-6, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$, 与 FXa+LPS 组比较, ^c $P < 0.05$

2.6 利伐沙班对 LPS 诱导 HUVEC 损伤后细胞 MAPK、NF-κB 信号通路激活的影响(图 7; 表 2):与空白对照组比较, LPS 刺激后可以明显增加血管内皮细胞 MAPK 和 NF-κB 信号通路关键蛋白 p-JNK、p-p38MAPK、p-TAK1、p-NF-κBp65 的表达(均 $P < 0.05$),说明内毒素可以直接激活 MAPK 和 NF-κB 信号通路。与 LPS 组比较, FXa 预处理后上述 4 种蛋白表达均明显下降(均 $P < 0.05$); 利伐沙班预处理可明显降低 LPS 与 FXa 诱导的 NF-κBp65 和 TAK1 磷酸化(均 $P < 0.05$),但对炎症反应相关的 MAPK 信号通路 JNK 和 p38MAPK 磷酸化的影响却不大(均 $P > 0.05$)。说明利伐沙班通过抑制 NF-κB 信号通路来缓解内毒素刺激血管内皮细胞损伤而非 MAPK 信号通路。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, HUVEC 为人脐静脉内皮细胞, MAPK 为丝裂素活化蛋白激酶, NF-κB 为核转录因子-κB, LPS 为脂多糖, FXa 为凝血因子 Xa, RIV 为利伐沙班, p-JNK 为磷酸化 Jun 氨基末端激酶(JNK), p-p38MAPK 为磷酸化 p38MAPK, p-TAK1 为磷酸化转化生长因子激酶 1 (TAK1), p-NF-κBp65 为磷酸化 NF-κBp65, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 7 Western Blot 检验各组 HUVEC 中 MAPK 和 NF-κB 信号通路关键蛋白的表达

表 2 各组 HUVEC 细胞 MAPK 和 NF-κB 信号通路蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(次)	p-JNK/JNK	p-p38MAPK/p38MAPK	p-TAK1/TAK1	p-NF-κBp65/NF-κBp65
空白对照组	3	1.00±0.13	1.00±0.09	1.00±0.15	1.00±0.14
LPS 组	3	2.62±0.25 ^a	3.85±0.35 ^a	2.33±0.17 ^a	3.55±0.40 ^a
FXa+LPS 组	3	1.65±0.15 ^{ab}	2.35±0.20 ^{ab}	1.85±0.15 ^{ab}	2.36±0.20 ^{ab}
FXa+RIV+LPS 组	3	1.64±0.12 ^{ab}	2.31±0.32 ^{ab}	0.74±0.09 ^{bc}	1.15±0.17 ^{bc}

注: HUVEC 为人脐静脉内皮细胞, MAPK 为丝裂素活化蛋白激酶, NF-κB 为核转录因子-κB, LPS 为脂多糖, FXa 为凝血因子 Xa, RIV 为利伐沙班, p-JNK 为磷酸化 Jun 氨基末端激酶(JNK), p-p38MAPK 为磷酸化 p38MAPK, p-TAK1 为磷酸化转化生长因子激酶 1 (TAK1), p-NF-κBp65 为磷酸化 NF-κBp65; 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 FXa+LPS 组比较, ^c $P < 0.05$

3 讨论

FXa 和凝血酶等几种凝血蛋白酶除具有促凝血功能外,也可诱导多种促炎因子的分泌^[14]。本研究用 LPS 刺激 HUVEC,模拟细菌分泌的内毒素刺激引起的血管内皮细胞炎症反应变化,用于评价利伐沙班对血管内皮细胞损伤的影响。结果证实,利伐沙班除具有抗凝作用外,还可以抑制细胞炎症反应,因此对内毒素诱导的血管内皮细胞功能损伤及凋亡有保护作用。利伐沙班可以直接抑制 FXa,缓解内毒素引起的血管内皮细胞损伤和血管内皮细胞功能失调;同时减少内毒素刺激引起的血管内皮细胞炎症因子分泌,如 IL-1β、IL-6 和 TNF-α。利伐沙班通过 NF-κB 炎症信号通路抑制血管内皮细胞损伤引起的炎症反应。

血管内皮细胞损伤和高渗透性在内毒素诱导的全身炎症损伤中起重要作用^[15]。血管内皮细胞屏障的完整性在维持血管和组织功能稳定方面起着关键作用^[16]。本研究中用 CCK-8 试剂盒检测血管内皮细胞活性;用流式细胞仪分析血管内皮细胞的凋亡情况;用细胞划痕实验来评价细胞迁移能力;用 Transwell 小室及蛋白结合的伊文思蓝复合物来评价单层内皮细胞屏障的通透性。结果显示,内毒素可以通过引起细胞凋亡、功能障碍以及改变细胞间隙和跨细胞屏障来增加单层血管内皮细胞屏障的通透性。在细胞培养基中加入 FXa 和利伐沙班预处理后,被 LPS 抑制的内皮细胞活性明显改善。有研究证实,血管内皮细胞凋亡在不同炎症性疾病中起重要作用^[17]。利伐沙班可以减少 LPS 引起的内皮细胞凋亡。本研究显示,内毒素刺激后内皮细胞的迁移能力增加,而加入利伐沙班后内皮细胞的迁移能力降低,但具体机制尚不清楚。血管内皮细胞屏障功能反映内皮细胞的功能及细胞间连接,本研究显示,利伐沙班可以减少下层培养系统中白蛋白结合伊文思蓝复合物的浓度,说明它可以改善内毒素对单层血管内皮细胞屏障的破坏。IL-1β、IL-6 和 TNF-α 是常见的炎症反应的重要标志物,本研究显示,利伐沙班可以减少血管内皮细胞分泌这些炎症因子。利伐沙班通过改善内皮细胞活性、减少内皮细胞凋亡、降低血管内皮细胞屏障通透性、抑制内皮细胞炎症因子分泌,从而改善内毒素刺激引起的内皮细胞结构及功能损害。

NF-κB 信号通路已经被证实在内毒素引起的炎症反应过程中起重要作用^[18]。MAPK 信号通路

与细菌性炎症反应过程中的细胞因子和介质分泌密切相关,一些炎性因子的释放与 MAPK 信号通路中的 JNK 和 p38MAPK 蛋白激活相关^[19-20]。已有研究证实, FVII α /FX α 可以激活 NF- κ B、MAPK 信号通路以及刺激细胞分泌大量炎性介质^[6,8]。本研究表明,内毒素可以通过 NF- κ B 和 MAPK 信号通路增加炎症反应;而应用利伐沙班预处理可以缓解内毒素诱导的 HUVEC 损伤,进一步推测其作用机制可能与 NF- κ B 或 MAPK 信号通路相关。另外,本研究结果还显示,利伐沙班可以抑制 NF- κ B 信号通路激活,但对 MAPK 信号通路的关键蛋白分泌却没有明显影响。说明利伐沙班通过对 NF- κ B 信号通路而非 MAPK 信号通路的抑制来改善内毒素诱导的 HUVEC 损伤,证明它可以通过抑制 NF- κ B 信号通路对内毒素刺激血管内皮细胞炎症反应起保护作用。

综上所述,本研究通过内毒素刺激 HUVEC 证实,内毒素和 FXa 通过激活炎症信号通路 NF- κ B 及 MAPK 引起血管内皮细胞炎症反应。FXa 抑制剂利伐沙班仅可以通过 NF- κ B 炎症信号通路来抑制内毒素刺激血管内皮细胞所引起的炎症反应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fouassier M, Souweine B, Sapin AF, et al. Increase in proinflammatory cytokines in peripheral blood without haemostatic changes after LPS inhalation [J]. *Thromb Res*, 2009, 124 (5): 584-587. DOI: 10.1016/j.thromres.2009.06.014.
- [2] Anthoni C, Russell J, Wood KC, et al. Tissue factor: a mediator of inflammatory cell recruitment, tissue injury, and thrombus formation in experimental colitis [J]. *J Exp Med*, 2007, 204 (7): 1595-1601. DOI: 10.1084/jem.20062354.
- [3] 韩凤. 肺微血管内皮细胞屏障功能损伤与急性呼吸窘迫综合征 [J]. *中国急救医学*, 2015, 35 (11): 1048-1053. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2015.11.021.
Han F. The damage of pulmonary microvascular endothelial cell barrier and acute respiratory distress syndrome [J]. *Chin J Crit Care Med*, 2015, 35 (11): 1048-1053. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2015.11.021.
- [4] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353 (16): 1685-1693. DOI: 10.1056/NEJMoa050333.
- [5] Goldenberg NM, Steinberg BE, Slutsky AS, et al. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis [J]. *Sci Transl Med*, 2011, 3 (88): 88ps25. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002011.
- [6] Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease [J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14 (10): 429-440. DOI: 10.1016/j.molmed.2008.08.001.
- [7] Schwientek P, Ellinghaus P, Steppan S, et al. Global gene expression analysis in nonfailing and failing myocardium pre- and postpulsatile and nonpulsatile ventricular assist device support [J]. *Physiol Genomics*, 2010, 42 (3): 397-405. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00030.2010.
- [8] Bukowska A, Zacharias I, Weinert S, et al. Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 718 (1-3): 114-123. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.09.006.
- [9] Hara T, Fukuda D, Tanaka K, et al. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 242 (2): 639-646. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.023.
- [10] 任小婵, 罗选娟, 杨欢, 等. 新型口服抗凝药的临床应用研究进展 [J]. *中华全科医学*, 2018, 16 (4): 615-619, 666. DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000171.
Ren XC, Luo XJ, Yang H, et al. New oral anticoagulants clinical application progress [J]. *Chin J General Pract*, 2018, 16 (4): 615-619, 666. DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000171.
- [11] Galley HF, Dhillon JK, Paterson RL, et al. Effect of ciprofloxacin on the activation of the transcription factors nuclear factor kappaB, activator protein-1 and nuclear factor-interleukin-6, and interleukin-6 and interleukin-8 mRNA expression in a human endothelial cell line [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2000, 99 (5): 405-410. DOI: 10.1042/cs0990405.
- [12] Lee W, Kim KM, Bae JS. Ameliorative Effect of aspalathin and nothofagin from rooibos (*Aspalathus linearis*) on HMGB1-induced septic responses *in vitro* and *in vivo* [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43 (5): 991-1012. DOI: 10.1142/S0192415X15500573.
- [13] Shelton JL, Wang L, Cepinskas G, et al. Albumin leak across human pulmonary microvascular vs. umbilical vein endothelial cells under septic conditions [J]. *Microvasc Res*, 2006, 71 (1): 40-47. DOI: 10.1016/j.mvr.2005.11.003.
- [14] Madoiwa S. Recent advances in disseminated intravascular coagulation: endothelial cells and fibrinolysis in sepsis-induced DIC [J]. *J Intensive Care*, 2015, 3: 8. DOI: 10.1186/s40560-015-0075-6.
- [15] 潘鹏飞, 张雄峰, 于湘友. 全身炎症反应综合征: 何去何从? [J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27 (6): 591-593. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.06.004.
Pan PF, Zhang XF, Yu XY. Systemic inflammatory response syndrome: where to go? [J]. *Chin J Emerg Med*, 2018, 27 (6): 591-593. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2018.06.004.
- [16] 陈红伟, 周姝, 李新伟. LPS 引起的炎症状态下免疫分子 A20 降低人脐静脉内皮细胞损伤及机制研究 [J]. *免疫学杂志*, 2018, 34 (2): 115-119.
Chen HW, Zhou S, Li XW. Study on the mechanism of reducing human umbilical vein endothelial cell injury with immune molecule A20 induced by LPS [J]. *Immunol J*, 2018, 34 (2): 115-119.
- [17] 游婷婷, 陈刚. 血管内皮细胞中 NF- κ B 和 p38MAPK 的激活 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2007, 27 (4): 533-536. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4416.2007.04.029.
You TT, Chen G. Activation of NF- κ B and p38MAPK in vascular endothelial cells [J]. *Int J Urol Nephrol*, 2007, 27 (4): 533-536. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4416.2007.04.029.
- [18] Komarova Y, Kruse KJ, Mehta D, et al. Response by Komarova et al to letter regarding article, "protein interactions at endothelial junctions and signaling mechanisms regulating endothelial permeability" [J]. *Circ Res*, 2017, 120 (5): e28. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310647.
- [19] Banfi C, Brioschi M, Barbieri SS, et al. Mitochondrial reactive oxygen species: a common pathway for PAR1- and PAR2-mediated tissue factor induction in human endothelial cells [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7 (1): 206-216. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2008.03204.x.
- [20] Rothmeier AS, Ruf W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation [J]. *Semin Immunopathol*, 2012, 34 (1): 133-149. DOI: 10.1007/s00281-011-0289-1.

(收稿日期: 2018-12-04)

广告声明

按照广告审批的相关规定,本刊刊登广告图片和内容均按广告审查批准文号的原件刊出,故广告内容中“适应症”未按标准医学名词术语修改为“适应证”,部分药品计量单位仍出现了双斜线。特此声明!