

• 论著 •

穿心莲内酯对脂多糖刺激下大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞促凝和纤溶抑制相关因子表达的影响研究

杨贵霞 李想 沈锋 郑兴昊 何天慧 李书文 程玉梅 李清 李伟 秦进成

贵州医科大学附属医院重症医学科, 贵阳 550004

通信作者: 沈锋, Email: doctorshenfeng@163.com

【摘要】 目的 明确穿心莲内酯(AD)对脂多糖(LPS)刺激下大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞(AECⅡ)表达促凝和纤溶抑制相关因子的影响。**方法** 将对数生长期的大鼠 AECⅡ细胞 RLE-6TN 分为正常对照(NC)组、LPS 组及 6.25、12.5、25 mg/L AD 组(AD 6.25 组、AD 12.5 组、AD 25 组)5 组。NC 组用 RPMI 1640 常规培养基培养; LPS 组在 RPMI 1640 常规培养基中加入 5 mg/L 的 LPS 进行刺激; 不同剂量 AD 组细胞分别用 6.25、12.5、25 mg/L 的 AD 处理 1 h 后给予 LPS 刺激培养。于 LPS 刺激细胞 24 h 后收集细胞及细胞培养上清液, 用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)、实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)分别检测细胞中组织因子(TF)、组织因子途径抑制剂(TFPI)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)的蛋白及 mRNA 表达; 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞上清液中Ⅲ型前胶原肽(PⅢP)、凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)、抗凝血酶Ⅲ(AT-Ⅲ)、活化蛋白 C(APC)水平。**结果** 与 NC 组相比, LPS 组 TF、PAI-1 的蛋白及 mRNA 表达显著升高, TFPI 蛋白及 mRNA 表达显著降低; 同时细胞上清液中 PⅢP、TAT 水平明显升高, AT-Ⅲ、APC 水平明显降低。与 LPS 组相比, AD 6.25 组、AD 12.5 组、AD 25 组 TF、PAI-1 的蛋白及 mRNA 表达均明显降低[TF/GAPDH: 0.86 ± 0.08 、 0.45 ± 0.04 、 0.44 ± 0.04 比 1.32 ± 0.10 , TF mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.59 ± 0.25 、 2.27 ± 0.05 、 1.95 ± 0.04 比 4.60 ± 0.26 , PAI-1/GAPDH: 2.11 ± 0.07 、 1.45 ± 0.04 、 0.86 ± 0.09 比 2.56 ± 0.09 , PAI-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.50 ± 0.22 、 2.23 ± 0.29 、 1.84 ± 0.09 比 6.60 ± 0.27 , 均 $P < 0.05$], TFPI 蛋白及 mRNA 表达明显升高[TFPI/GAPDH: 0.78 ± 0.05 、 0.81 ± 0.03 、 0.84 ± 0.07 比 0.36 ± 0.02 , TFPI mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.46 ± 0.09 、 0.69 ± 0.07 、 0.91 ± 0.08 比 0.44 ± 0.06 , 均 $P < 0.05$], 细胞上清液中 PⅢP、TAT 水平明显降低, AT-Ⅲ、APC 水平明显增加[PⅢP($\mu\text{g/L}$): 13.59 ± 0.23 、 12.66 ± 0.23 、 10.59 ± 0.30 比 15.82 ± 0.29 , TAT(ng/L): 211.57 ± 6.41 、 205.69 ± 4.04 、 200.56 ± 9.85 比 288.67 ± 9.84 , AT-Ⅲ($\mu\text{g/L}$): 102.95 ± 3.86 、 123.92 ± 2.63 、 128.67 ± 1.67 比 92.93 ± 3.36 , APC($\mu\text{g/L}$): 1188.95 ± 14.99 、 1366.12 ± 39.93 、 1451.15 ± 29.69 比 1145.55 ± 21.07 , 均 $P < 0.05$]; 随着 AD 剂量的增加, 上述促进及抑制作用越加明显, AD 25 组 TF、PAI-1 的蛋白及 mRNA 表达降低、TFPI mRNA 表达升高、上清液中 PⅢP 水平降低和 AT-Ⅲ、APC 水平增加与 AD 6.25 组比较差异具有统计学意义, 且 PAI-1 蛋白表达降低及上清液中 PⅢP 水平降低与 AD 12.5 组比较差异也具有统计学意义。**结论** AD 在 6.25 ~ 25 mg/L 的剂量范围内, 能剂量依赖性地抑制 LPS 刺激下 AECⅡ细胞 RLE-6TN 表达及分泌促凝和纤溶抑制相关因子, 促进抗凝因子的分泌, 以 25 mg/L 作用最明显。

【关键词】 穿心莲内酯; 肺泡上皮细胞, Ⅱ型; 急性呼吸窘迫综合征; 凝血/纤溶**基金项目:** 贵州省科技计划项目(2019-1261)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200923-00647

Effects of andrographolide on the expression of procoagulant and fibrinolytic inhibition factors in rat type II alveolar epithelial cells stimulated by lipopolysaccharideYang Guixia, Li Xiang, Shen Feng, Zheng Xinghao, He Tianhui, Li Shuwen, Cheng Yumei, Li Qing, Li Wei, Qin Jincheng
Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China
Corresponding author: Shen Feng, Email: doctorshenfeng@163.com

【Abstract】 Objective To determine the effect of andrographolide (AD) on the expression of procoagulant and fibrinolytic inhibitory factors in rat type II alveolar epithelial cells (AECⅡ) stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The AECⅡ cells RLE-6TN in the logarithmic growth phase were divided into 5 groups: the normal control (NC) group, the LPS group, and the 6.25, 12.5, and 25 mg/L AD groups (AD 6.25 group, AD 12.5 group, AD 25 group). The NC group was cultured with RPMI 1640 conventional medium. In the LPS group, 5 mg/L LPS was added to the RPMI 1640 conventional medium for stimulation. Cells in the AD groups were treated with 6.25, 12.5, and 25 mg/L AD in advance for 1 hour and then given LPS to stimulate the culture. The cells and cell culture supernatant were collected 24 hours after LPS stimulation. The protein and mRNA expressions of tissue factor (TF), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), and plasminogen activator inhibition-1 (PAI-1) in cells were detected by Western blotting and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The levels of procollagen III peptide (PⅢP), thrombin-antithrombin complex (TAT), antithrombin III (AT-Ⅲ) and activated protein C

(APC) in the cell supernatant were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the NC group, the protein and mRNA expressions of TF and PAI-1 in the LPS group were significantly increased, and the protein and mRNA expressions of TFPI were significantly reduced. At the same time, the levels of PⅢP and TAT in the cell supernatant were significantly increased, the levels of AT-Ⅲ, APC were significantly reduced. Compared with the LPS group, the protein and mRNA expressions of TF and PAI-1 in AD 6.25 group, AD 12.5 group, AD 25 group were significantly reduced [TF/GAPDH: 0.86 ± 0.08 , 0.45 ± 0.04 , 0.44 ± 0.04 vs. 1.32 ± 0.10 , TF mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.59 ± 0.25 , 2.27 ± 0.05 , 1.95 ± 0.04 vs. 4.60 ± 0.26 , PAI-1/GAPDH: 2.11 ± 0.07 , 1.45 ± 0.04 , 0.86 ± 0.09 vs. 2.56 ± 0.09 , PAI-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.50 ± 0.22 , 2.23 ± 0.29 , 1.84 ± 0.09 vs. 6.60 ± 0.27 , all $P < 0.05$], while the protein and mRNA expressions of TFPI were significantly increased [TFPI/GAPDH: 0.78 ± 0.05 , 0.81 ± 0.03 , 0.84 ± 0.07 vs. 0.36 ± 0.02 , TFPI mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.46 ± 0.09 , 0.69 ± 0.07 , 0.91 ± 0.08 vs. 0.44 ± 0.06 , all $P < 0.05$]. Also the levels of PⅢP and TAT in the cell supernatant were significantly reduced, and the levels of AT-Ⅲ and APC were significantly increased [PⅢP ($\mu\text{g/L}$): 13.59 ± 0.23 , 12.66 ± 0.23 , 10.59 ± 0.30 vs. 15.82 ± 0.29 , TAT (ng/L): 211.57 ± 6.41 , 205.69 ± 4.04 , 200.56 ± 9.85 vs. 288.67 ± 9.84 , AT-Ⅲ ($\mu\text{g/L}$): 102.95 ± 3.86 , 123.92 ± 2.63 , 128.67 ± 1.67 vs. 92.93 ± 3.36 , APC ($\mu\text{g/L}$): 1188.95 ± 14.99 , 1366.12 ± 39.93 , 1451.15 ± 29.69 vs. 1145.55 ± 21.07 , all $P < 0.05$]. With the increase of the dose of AD, the above-mentioned promotion and inhibition effects became more obvious. In the AD 25 group, TF, PAI-1 protein and mRNA expressions decreased, TFPI mRNA expression increased, PⅢP level in the supernatant decreased and AT-Ⅲ, APC levels increased compared with AD 6.25 group, the difference was statistically significant, and the decrease of PAI-1 protein expression and PⅢP level in the supernatant were also statistically significant compared with AD 12.5 group. **Conclusions** Andrographolide in the dose range of 6.25-25 mg/L can dose-dependently inhibit the expression and secretion of procoagulant and fibrinolytic inhibitor-related factors in AEC II cells RLE-6TN stimulated by LPS, and promote the secretion of anticoagulant factors. 25 mg/L has the most obvious effect.

【Key words】 Andrographolide; Alveolar epithelial cell, type II; Acute respiratory distress syndrome; Coagulation/fibrinolysis

Fund program: Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project of China (2019-1261)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200923-00647

肺泡促凝亢进和纤溶抑制是急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 重要的病理特征,其结果引起肺泡内大量蛋白沉积、肺组织纤维成分增加以及广泛肺微血栓形成,导致通气/血流比例失衡、动静脉短路、弥散功能障碍等,是引起 ARDS 顽固性低氧血症的重要原因^[1-4]。有研究证实,Ⅱ型肺泡上皮细胞(type II alveolar epithelial cell, AEC II)对 ARDS 肺泡促凝和纤溶抑制具有重要的调节作用^[5-8]。本课题组前期研究显示,在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激下人 AEC II 细胞 A549 分泌组织因子(tissue factor, TF)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)明显增加,而分泌具有抗凝作用的活化蛋白 C(activated protein C, APC)却减少^[9];进一步通过大鼠 AEC II 细胞也得到相同研究结果^[10-11]。但目前针对 ARDS 肺泡促凝活性增强和纤溶过度抑制,尚缺乏有效防治药物。

穿心莲内酯(andrographolide, AD)是天然植物穿心莲的主要有效成分。我们在预实验中发现,腹腔注射 AD 可明显抑制 LPS 诱导 ARDS 小鼠肺组织 TF、PAI-1 表达,降低支气管肺泡灌洗液中Ⅲ型前胶原肽(precollagen Ⅲ peptide, PⅢP)、凝血酶-抗凝血酶复合物(thrombin-antithrombin complex, TAT)等

促凝物质水平,而促进抗凝血酶Ⅲ(antithrombin Ⅲ, AT-Ⅲ)及 APC 等生成,提示 AD 能纠正 ARDS 肺泡促凝和纤溶异常,并表现出较好的肺保护作用。但该药的作用靶点是否与 AEC II 有关,有待于细胞水平的实验验证。本研究旨在探讨 AD 对 LPS 刺激下 AEC II 细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制相关因子的影响,为有效防治 ARDS 肺泡促凝活化和纤溶过度抑制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂:大鼠 AEC II 细胞 RLE-6TN 从湘雅医学院中南大学细胞库购买。LPS(货号:L2880)、AD(货号:365645)均购自美国 Sigma 公司。TF(货号:NBP2-67731)一抗购自美国 NOVUS 公司;PAI-1(货号:ab222754)、组织因子途径抑制剂(tissue factor pathway inhibitor, TFPI;货号:ab186747)一抗及山羊抗兔二抗均购自美国 Abcam 公司。TF、TFPI、PAI-1 引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。TAT(货号:F3299-A)、AT-Ⅲ(货号:F8612-A)、PⅢP(货号:F-2915-A)、APC(货号:F3116-A)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒均购自上海泛柯实业有限公司。

1.2 实验分组及处理:将对数生长期 AEC II 细胞

RLE-6TN 分为 5 组。正常对照 (normal control, NC) 组: 用 RPMI 1640 常规培养基培养 24 h; LPS 组: 根据本课题组前期研究方法^[10], 在常规培养基中加入 5 mg/L LPS 损伤刺激细胞 24 h; 6.25、12.5、25 mg/L AD 组 (AD 6.25 组、AD 12.5 组、AD 25 组): 预先分别用 6.25、12.5 及 25 mg/L 的 AD 处理, 1 h 后加入 LPS 刺激培养 24 h。

本研究符合医学伦理学标准, 已取得贵州医科大学实验动物伦理委员会批准 (审批号: 01900560)。

1.3 检测指标及方法: LPS 损伤刺激 24 h 后, 提取细胞和细胞上清液备检。

1.3.1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测 AD 对 RLE-6TN 细胞的毒性作用: 用 AD 处理细胞后, 每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养 4 h, 用酶标仪在波长 450 nm 处检测吸光度 (absorbance, A) 值, 实验重复 3 次, 取均值。

1.3.2 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测 RLE-6TN 细胞中 TF、TFPI、PAI-1 的蛋白表达: LPS 刺激细胞 24 h 后加入 RIPA 细胞裂解液 + 苯甲基磺酰氟 100 μ L, 冰上裂解 10 min, 转移至 1.5 mL 试管中, 离心后取上清, Bradford 比色法定量蛋白, 蛋白上样缓冲液与蛋白裂解液上清液按 1:4 比例充分混匀, 沸水浴中煮 10 min。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 分别用 TF、TFPI、PAI-1 相应一抗在 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜, 之后用含吐温 20 的 Tris- 盐酸洗膜缓冲液 (Tris-HCl buffered saline+Tween 20, TBST) 洗脱 3 次 (每次 5 min), 再加入二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗脱 3 次 (每次 5 min) 后加化学发光, 并在化学发光成像系统上曝光显影。然后用 Image J 软件分析条带灰度值, 以 3- 磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH; 1:3 000) 作为内参, 计算目的蛋白相对表达量, 实验重复 3 次, 取均值。

1.3.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 RLE-6TN 细胞中 TF、TFPI、PAI-1 的 mRNA 表达: 用 LPS 刺激细胞 24 h 后, 每孔加入 TRIzol 裂解剂 1 mL, 静置 10 min, 转移到 1.5 mL 试管; 加入 200 μ L 氯仿混匀 15 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 15 min, 取上清 450 μ L; 加入等体积即 450 μ L 异丙醇混匀、离心, 倒出上清, 沉淀即为总 mRNA, 用 75% 乙醇清洗 2 遍, 放置通风橱晾干, RNA-free

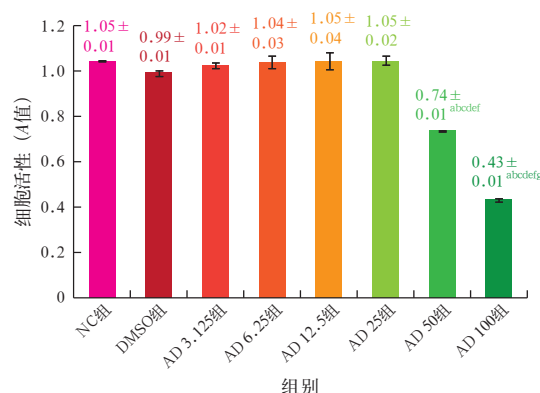
水溶解, 使用 NanoDrop-2000 光谱 / 分光光度计测定 RNA 浓度后进行反转录, 以 cDNA 为模板进行聚合酶链反应扩增。溶解和记录基因的扩增曲线后进行基因扩增, 特异性评价反应, Ct 值根据溶解度和分解曲线计算, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因表达量^[12]。

1.3.4 ELISA 检测 RLE-6TN 细胞上清液中 TAT、APC、AT-III、PⅢP 水平: 取适量 RLE-6TN 细胞上清液存放于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中, 按照 ELISA 试剂盒操作说明书进行检测, 用酶标仪在波长 450 nm 处测定 A 值, 通过标准曲线计算 RLE-6TN 细胞上清液中 PⅢP、APC、AT-III、TAT 水平。

1.4 统计学方法: 使用 SPSS 26.0 统计软件分析数据。计量资料均呈正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量 AD 对 RLE-6TN 细胞活性的影响 (图 1): 将 AD 剂量从 3.125 mg/L 增加到 100 mg/L, 检测细胞活性显示, 当 AD 剂量超过 25 mg/L 时, 细胞逐渐出现死亡; 当剂量达到 100 mg/L 时, 细胞活性明显下降; 而当剂量 $\leq$ 25 mg/L 时, 对细胞活性无影响。因此将 AD 剂量确定为 6.25、12.5、25 mg/L 进行后续实验。

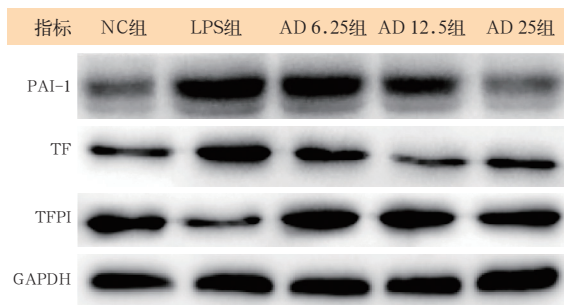


注: 因穿心莲内酯 (AD) 需要用二甲亚砜 (DMSO) 溶解, 故设置 DMSO 组; AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞; AD 3.125 组、AD 6.25 组、AD 12.5 组、AD 25 组、AD 50 组、AD 100 组分别为 AD 3.125、6.25、12.5、25、50、100 mg/L 组; 与正常对照 (NC) 组比较, ^aP<0.05; 与 DMSO 组比较, ^bP<0.05; 与 AD 3.125 组比较, ^cP<0.05; 与 AD 6.25 组比较, ^dP<0.05; 与 AD 12.5 组比较, ^eP<0.05; 与 AD 25 组比较, ^fP<0.05; 与 AD 50 组比较, ^gP<0.05

图 1 各组大鼠 AEC II 细胞 RLE-6TN 的活性

2.2 各组 RLE-6TN 细胞中 PAI-1、TF、TFPI 的蛋白表达 (图 2; 表 1): LPS 刺激后, RLE-6TN 细胞中 PAI-1 和 TF 的蛋白表达量明显高于 NC 组, TFPI 蛋白表达量明显低于 NC 组 (均 P<0.05)。不同剂量

AD 组 RLE-6TN 细胞中 PAI-1 和 TF 的蛋白表达量均较 LPS 组降低, TFPI 反之(均 $P < 0.05$), 且随着 AD 剂量的增加作用更加明显。



NC 组为正常对照组, LPS 组为脂多糖损伤刺激组, AD 6.25 组、AD 12.5 组、AD 25 组分别为穿心莲内酯 6.25、12.5、25 mg/L 组; AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, PAI-1 为纤溶酶原激活物抑制剂 -1, TF 为组织因子, TFPI 为组织因子途径抑制剂, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组大鼠 AEC II 细胞 RLE-6TN 中 PAI-1、TF、TFPI 的蛋白表达

表 1 各组大鼠 AEC II 细胞 RLE-6TN 中 PAI-1、TF、TFPI 的蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(个)	PAI-1/ GAPDH	TF/ GAPDH	TFPI/ GAPDH
NC 组	3	0.41 ± 0.01	0.41 ± 0.01	1.20 ± 0.09
LPS 组	3	2.56 ± 0.09 ^a	1.32 ± 0.10 ^a	0.36 ± 0.02 ^a
AD 6.25 组	3	2.11 ± 0.07 ^{ab}	0.86 ± 0.08 ^{ab}	0.78 ± 0.05 ^{ab}
AD 12.5 组	3	1.45 ± 0.04 ^{abc}	0.45 ± 0.04 ^{bc}	0.81 ± 0.03 ^{ab}
AD 25 组	3	0.86 ± 0.09 ^{abcd}	0.44 ± 0.04 ^{bc}	0.84 ± 0.07 ^{ab}

注: NC 组为正常对照组, LPS 组为脂多糖损伤刺激组, AD 6.25 组、AD 12.5 组、AD 25 组分别为穿心莲内酯 6.25、12.5、25 mg/L 组; AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, PAI-1 为纤溶酶原激活物抑制剂 -1, TF 为组织因子, TFPI 为组织因子途径抑制剂, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 AD 6.25 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 AD 12.5 组比较, ^d $P < 0.05$

2.3 各组 RLE-6TN 细胞 PAI-1、TF、TFPI 的 mRNA 表达(表 2): 与 NC 组比较, LPS 刺激后 RLE-6TN 细胞中 PAI-1 和 TF 的 mRNA 表达量明显升高, TFPI mRNA 表达量明显降低(均 $P < 0.05$)。不同剂量 AD 组 RLE-6TN 细胞中 PAI-1 和 TF 的 mRNA 表达量均较 LPS 组显著降低, TFPI 则出现相反的变化(均 $P < 0.05$), 且随着 AD 剂量的增加, 作用更加明显。

2.4 各组 RLE-6TN 细胞上清液中 TAT、AT-III、APC 及 PⅢP 水平(表 3): LPS 刺激后, RLE-6TN 细胞上清液中 AT-III、APC 水平明显低于 NC 组, TAT、PⅢP 水平明显高于 NC 组(均 $P < 0.05$)。不同剂量 AD 组 RLE-6TN 细胞上清液中 AT-III、APC 水平明显高于 LPS 组, TAT、PⅢP 水平明显低于 LPS 组(均 $P < 0.05$), 且随着 AD 剂量的增加, 其升高或降低更加明显。

表 2 各组大鼠 AEC II 细胞 RLE-6TN 中 PAI-1、TFPI、TF 的 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(个)	PAI-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	TF mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	TFPI mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
NC 组	3	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.19
LPS 组	3	6.60 ± 0.27 ^a	4.60 ± 0.26 ^a	0.44 ± 0.06 ^a
AD 6.25 组	3	3.50 ± 0.22 ^{ab}	2.59 ± 0.25 ^{ab}	0.46 ± 0.09 ^a
AD 12.5 组	3	2.23 ± 0.29 ^{ab}	2.27 ± 0.05 ^{abc}	0.69 ± 0.07 ^a
AD 25 组	3	1.84 ± 0.09 ^{abc}	1.95 ± 0.04 ^{bc}	0.91 ± 0.08 ^{bc}

注: NC 组为正常对照组, LPS 组为脂多糖损伤刺激组, AD 6.25 组、AD 12.5 组、AD 25 组分别为穿心莲内酯 6.25、12.5、25 mg/L 组; AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, PAI-1 为纤溶酶原激活物抑制剂 -1, TF 为组织因子, TFPI 为组织因子途径抑制剂; 与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 AD 6.25 组比较, ^c $P < 0.05$

表 3 各组大鼠 AEC II 细胞 RLE-6TN 上清液中 TAT、AT-III、APC、PⅢP 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(个)	TAT (ng/L)	AT-III (μg/L)
NC 组	3	186.49 ± 9.58	138.19 ± 1.74
LPS 组	3	288.67 ± 9.84 ^a	92.93 ± 3.36 ^a
AD 6.25 组	3	211.57 ± 6.41 ^b	102.95 ± 3.86 ^{ab}
AD 12.5 组	3	205.69 ± 4.04 ^b	123.92 ± 2.63 ^{abc}
AD 25 组	3	200.56 ± 9.85 ^b	128.67 ± 1.67 ^{bc}

组别	样本数(个)	APC (μg/L)	PⅢP (μg/L)
NC 组	3	1475.52 ± 52.20	10.16 ± 0.36
LPS 组	3	1145.55 ± 21.07 ^a	15.82 ± 0.29 ^a
AD 6.25 组	3	1188.95 ± 14.99 ^a	13.59 ± 0.23 ^{ab}
AD 12.5 组	3	1366.12 ± 39.93 ^{bc}	12.66 ± 0.23 ^{ab}
AD 25 组	3	1451.15 ± 29.69 ^{bc}	10.59 ± 0.30 ^{bcd}

注: NC 组为正常对照组, LPS 组为脂多糖损伤刺激组, AD 6.25 组、AD 12.5 组、AD 25 组分别为穿心莲内酯 6.25、12.5、25 mg/L 组; AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, TAT 为凝血酶抗凝血酶复合物, AT-III 为抗凝血酶 III, APC 为活化蛋白 C, PⅢP 为 III 型前胶原肽; 与 NC 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 LPS 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 AD 6.25 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 AD 12.5 组比较, ^d $P < 0.05$

3 讨论

肺泡促凝增强及纤溶过度抑制是 ARDS 重要病理生理特征, 是引起肺小血管广泛微血栓形成、肺纤维组织增多、肺泡内大量纤维蛋白沉积的直接因素^[13], 也是导致 ARDS 顽固性低氧血症、治疗效果差及高病死率的重要原因。因此, 加强对肺泡促凝和纤溶抑制的有效药物防治研究, 将对有效提高 ARDS 治愈率、降低病死率等具有重要作用。

本课题组在前期预实验中观察到, 腹腔注射 AD 可有效纠正 LPS 诱导 ARDS 小鼠肺泡促凝和纤溶的异常状态, 具有较好的肺保护效应。因此深入研究 AD 的作用环节和靶点, 可有利于该药对 ARDS 有效的临床应用转化提供理论依据。

本课题组前期研究已证实, 在 LPS 刺激下 AEC II 细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制因子明显增强, 抗凝因子的表达及分泌却受到抑制^[10], 表明该

细胞对 ARDS 肺泡促凝和纤溶抑制具有重要调节作用。因此在本实验中我们选择 AEC II 细胞作为研究对象,结果显示,在细胞培养基中预先加入 AD 可显著抑制由 LPS 刺激引起的 TF、PAI-1 表达上调,促进 TFPI 表达;同时可显著降低上清液中 TAT、PⅢP 水平,增加 AT-Ⅲ、APC 含量。

TF 是体内主要的外源性凝血途径启动因子,与 VII、IX、X 因子结合,通过外源性凝血途径启动凝血系统^[14]。PAI-1 则是机体最主要的纤溶抑制因子,通过抑制纤维的溶解而导致肺纤维组织增多,并造成肺血管微血栓的形成,导致肺弥散功能障碍、通气/血流比例失调等^[15]。TFPI 是在生理状态下拮抗 TF 的抗凝因子,两者共同维持体内凝血的稳定^[16]。AT-Ⅲ 通过抑制凝血酶及其他凝血因子的活性来维持体内凝血与抗凝平衡^[17]。PⅢP 则是反映机体组织纤维化程度的因子,其水平高低反映了体内纤维组织的含量^[18]。TAT 是凝血酶生成的直接证据,其升高提示有血栓形成倾向,是促凝因子^[19]。APC 是天然的抗凝剂^[20]。本研究显示,用 AD 预处理细胞,可显著抑制 LPS 刺激下 AEC II 细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制因子,促进了抗凝因子的表达和分泌;同时实验结果也提示, AEC II 细胞可能是 AD 直接作用的靶点之一,即该药通过作用于 AEC II 细胞进而对 ARDS 肺泡促凝和纤溶抑制发挥治疗作用。

AD 为穿心莲的主要有效成分^[21]。研究证实,AD 可下调 LPS 和 γ -干扰素诱导下大鼠血管平滑肌细胞中诱导型一氧化氮合酶的表达^[22],抑制机体炎症反应程度^[23-24],以及能延缓二磷酸腺苷诱导的肺动脉血栓形成^[25]等。本实验结果显示,AD 可有效纠正 LPS 刺激下 AEC II 细胞内促凝和纤溶抑制因子的异常表达及分泌。提示 AEC II 细胞有望成为 AD 防治 ARDS 肺泡促凝和纤溶抑制的有效靶点。AD 是否还作用于其他细胞,如血管内皮细胞等,仍有待于进一步研究。

本研究中我们先通过细胞毒性实验(CCK-8)观察了 AD 的安全剂量范围,并在安全范围内选取了不同药物剂量,因此可排除药物本身对细胞的毒性作用。同时我们发现,在所选取的药物剂量范围内,随着剂量增加,AD 的作用逐渐增强,提示该药的作用效果可能存在一定剂量依赖关系,但其最佳有效剂量有待于进一步摸索。此外,AD 对 LPS 刺激下 AEC II 细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制相关因子的作用机制也有待进一步研究。

本实验的不足之处:由于细胞实验与临床存在一定差异,本实验通过 LPS 刺激 AEC II 细胞对凝血和纤溶反应得出的结论不一定完全符合临床,因此还需要进一步的临床研究证实。

综上所述,AD 可以剂量依赖性地抑制 LPS 刺激下 AEC II 细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制相关因子,促进抗凝因子分泌,本实验结果为 ARDS 有效药物防治提供了新的线索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hasday JD, Bachwich PR, Lynch JP 3rd, et al. Procoagulant and plasminogen activator activities of bronchoalveolar fluid in patients with pulmonary sarcoidosis [J]. *Exp Lung Res*, 1988, 14 (2): 261-278. DOI: 10.3109/01902148809115128.
- [2] Ozolina A, Sarkele M, Sabelnikovs O, et al. Activation of coagulation and fibrinolysis in acute respiratory distress syndrome: a prospective pilot study [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2016, 3: 64. DOI: 10.3389/fmed.2016.00064.
- [3] Sebag SC, Bastarache JA, Ware LB. Therapeutic modulation of coagulation and fibrinolysis in acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12 (9): 1481-1496. DOI: 10.2174/138920111798281171.
- [4] Glas GJ, Van Der Sluijs KF, Schultz MJ, et al. Bronchoalveolar hemostasis in lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. *J Thromb Haemost*, 2013, 11 (1): 17-25. DOI: 10.1111/jth.12047.
- [5] Bastarache JA, Wang L, Geiser T, et al. The alveolar epithelium can initiate the extrinsic coagulation cascade through expression of tissue factor [J]. *Thorax*, 2007, 62 (7): 608-616. DOI: 10.1136/thx.2006.063305.
- [6] Bastarache JA, Fremont RD, Kropski JA, et al. Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297 (6): L1035-1041. DOI: 10.1152/ajplung.00214.2009.
- [7] Bastarache JA, Wang L, Wang Z, et al. Intra-alveolar tissue factor pathway inhibitor is not sufficient to block tissue factor procoagulant activity [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294 (5): L874-881. DOI: 10.1152/ajplung.00372.2007.
- [8] Wang L, Bastarache JA, Wickersham N, et al. Novel role of the human alveolar epithelium in regulating intra-alveolar coagulation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36 (4): 497-503. DOI: 10.1165/rcmb.2005-0425OC.
- [9] 刘雨晴, 刘博, 姚玲, 等. 不同液体培养对脂多糖刺激后人 II 型肺泡上皮细胞 A549 产生凝血及纤溶因子的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2016, 23 (3): 294-298. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.018.
- [10] Liu B, Wu Y, Wang Y, et al. NF- κ B p65 knock-down inhibits TF, PAI-1 and promotes activated protein C production in lipopolysaccharide-stimulated alveolar epithelial cells type II [J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44 (4-5): 241-251. DOI: 10.1080/01902148.2018.1505975.
- [11] Liu B, Wang Y, Wu Y, et al. IKK β regulates the expression of coagulation and fibrinolysis factors through the NF- κ B canonical pathway in LPS-stimulated alveolar epithelial cells type II [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18 (4): 2859-2866. DOI: 10.3892/etm.2019.7928.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [13] Chambers RC. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153 (Suppl 1): S367-378. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707603.
- [14] Gando S. Disseminated intravascular coagulation in trauma patients [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2001, 27 (6): 585-592. DOI: 10.1055/s-2001-18864.
- [15] Whyte CS, Morrow GB, Mitchell JL, et al. Fibrinolytic abnormalities in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and versatility of

- thrombolytic drugs to treat COVID-19 [J]. *J Thromb Haemost*, 2020, 18 (7): 1548-1555. DOI: 10.1111/jth.14872.
- [16] Gando S, Kameue T, Matsuda N, et al. Imbalances between the levels of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in ARDS patients [J]. *Thromb Res*, 2003, 109 (2-3): 119-124. DOI: 10.1016/s0049-3848(03)00151-8.
- [17] Kienast J, Juers M, Wiedermann CJ, et al. Treatment effects of high-dose antithrombin without concomitant heparin in patients with severe sepsis with or without disseminated intravascular coagulation [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4 (1): 90-97. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01697.x.
- [18] 尹石华, 陈光连, 乔学仁, 等. 肺结核患者血清Ⅲ型前胶原肽的检测分析 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1995, 18 (4): 215-217, 254-255.
Yin SH, Chen GL, Qiao XR, et al. Measurement and analysis of serum procollagen peptide Ⅲ in patients with pulmonary tuberculosis [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 1995, 18 (4): 215-217, 254-255.
- [19] Azhar A, Singh P, Rashid Q, et al. Antiangiogenic function of antithrombin is dependent on its conformational variation: implication for other serpins [J]. *Protein Pept Lett*, 2013, 20 (4): 403-411. DOI: 10.2174/0929866511320040004.
- [20] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344 (10): 699-709. DOI: 10.1056/NEJM200103083441001.
- [21] Liang E, Liu X, Du Z, et al. Andrographolide ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice by blockage of oxidative damage and NF- κ B-mediated inflammation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 9086747. DOI: 10.1155/2018/9086747.
- [22] Hsieh CY, Hsu MJ, Hsiao G, et al. Andrographolide enhances nuclear factor- κ B subunit p65 Ser536 dephosphorylation through activation of protein phosphatase 2A in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (8): 5942-5955. DOI: 10.1074/jbc.M110.123968.
- [23] Li Y, He S, Tang J, et al. Andrographolide inhibits inflammatory cytokines secretion in lps-stimulated RAW264.7 cells through suppression of NF- κ B/MAPK signaling pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 8248142. DOI: 10.1155/2017/8248142.
- [24] Wu T, Peng Y, Yan S, et al. Andrographolide ameliorates atherosclerosis by suppressing pro-inflammation and ros generation-mediated foam cell formation [J]. *Inflammation*, 2018, 41 (5): 1681-1689. DOI: 10.1007/s10753-018-0812-9.
- [25] Lu WJ, Lee JJ, Chou DS, et al. A novel role of andrographolide, an NF- κ B inhibitor, on inhibition of platelet activation: the pivotal mechanisms of endothelial nitric oxide synthase/cyclic GMP [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89 (12): 1261-1273. DOI: 10.1007/s00109-011-0800-0.

(收稿日期: 2020-09-23)

• 科研新闻速递 •

新型冠状病毒感染诱导的肿瘤坏死因子- α 和 γ -干扰素可导致炎性细胞死亡并影响疾病进程

新型冠状病毒肺炎(新冠肺炎)的特征是促炎细胞因子的过量产生以及与患者病死率相关的急性肺损伤。尽管在新型冠状病毒(2019 novel coronavirus, 2019-nCoV)感染过程中先天免疫细胞会产生多种促炎细胞因子,但我们发现只有肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)联合才能诱导炎性细胞死亡。从机制上讲, TNF- α 与 IFN- γ 共同作用可激活 Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 1/干扰素调节因子 1 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 1/interferon regulator 1, JAK/STAT1/IRF1)信号通路,诱导产生一氧化氮(nitric oxide, NO)并驱动天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8/Fos 相关死亡域蛋白(caspase-8/Fos related death domain protein, caspase-8/FADD)介导的细胞坏死(PANoptosis)。TNF- α 和 IFN- γ 在小鼠中可引起致命的“炎症风暴”,并可导致与新冠肺炎相似的组织损伤和炎症反应;同时,抑制 PANoptosis 可预防小鼠出现上述病理改变和死亡。此外,在 2019-nCoV 感染、嗜血细胞性淋巴组织细胞增生症(hemophylic lymphohistiocytosis, HLH)和脓毒症小鼠模型中发现,抗 TNF- α 和 IFN- γ 的中和抗体对小鼠有明显的保护作用。总体而言,研究人员的结果表明,阻断促炎细胞因子介导的炎性细胞死亡信号通路能减轻组织损伤和炎症反应,从而使新冠肺炎或其他感染性和自身炎症性疾病患者获益。

罗红敏,编译自《Cell》, 2021, 184 (1): 149-168. e17

抗体鸡尾酒 REGN-COV2 疗法可显著降低新型冠状病毒肺炎患者病毒载量

最近有研究表明,新型冠状病毒肺炎(新冠肺炎)患者并发症发生率和病死率与体内病毒载量相关。而抗体鸡尾酒疗法可以降低体内病毒载量,从而改善患者预后。为此,有学者进行了一项针对抗体鸡尾酒 REGN-COV2(由 2 种新型冠状病毒特异性抗体组成)疗法的临床试验。研究对象为确诊为新冠肺炎的非住院患者,研究人员将受试对象随机分为安慰剂组、2.4 g REGN-COV2 治疗组和 8.0 g REGN-COV2 治疗组 3 组。主要终点事件包括用药后 1~7 d 病毒载量的时间加权平均变化,29 d 内因新冠肺炎问题到医院就诊以及安全性评价。结果显示:275 例患者参与了该研究。与安慰剂组相比,REGN-COV2 治疗组(两个剂量组合并)患者用药后 1~7 d 病毒载量显著降低。对于基线血清抗体阴性人群,两组患者病毒载量平均相差 $-0.56 \log_{10}$ 拷贝/mL [95% 可信区间(95% confidence interval, 95%CI)为 $-1.02 \sim -0.11$];对于整个受试人群(不区分基线血清抗体是否为阴性),两组患者病毒载量平均相差 $-0.41 \log_{10}$ 拷贝/mL (95%CI 为 $-0.71 \sim -0.10$)。在所有受试者中,安慰剂组有 6% 的患者至少有 1 次因新冠肺炎问题到医院进行就诊,而 REGN-COV2 组有 3%;对于基线血清抗体阴性人群,安慰剂组有 15% 的患者以及 REGN-COV2 组有 6% 的患者进行了相关医疗咨询(相差 -9% , 95%CI 为 $-29\% \sim 11\%$)。REGN-COV2 组与安慰剂组相比,超敏反应、输液相关反应及其他不良事件发生率差异无统计学意义。研究人员据此得出结论:抗体鸡尾酒 REGN-COV2 疗法可降低新冠肺炎病毒载量,对于基线病毒抗体阴性或载量高的患者作用更为明显,且安全性良好。

罗红敏,编译自《N Engl J Med》, 2020, 384 (3): 238-251