

[文章编号] 1000-4718(2007)09-1845-03

红花含药血清对缺氧复氧条件下大鼠肺动脉内皮细胞 P-选择素及 ICAM-1 表达的影响*

张建初, 张晓菊, 杨卫兵, 夏蕾, 陶晓南, 白明
(华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸科, 湖北 武汉 430022)

[摘要] 目的: 观察红花含药血清在缺氧复氧条件下对大鼠肺动脉内皮细胞 P-选择素(Ps)及细胞间黏附因子-1(ICAM-1)基因表达的影响。方法: 用细胞培养、RT-PCR、Western blotting、中药血清药理学方法、免疫细胞化学染色法等技术, 观察在常氧、缺氧、复氧及红花含药血清干预等不同条件下大鼠肺动脉内皮细胞 P-选择素及细胞间黏附因子-1 基因的表达变化。结果: 缺氧组 1、6 和 12 h 各个时点 P-选择素及 ICAM-1 mRNA 及蛋白水平与同时点常氧组明显差异。缺氧 1 h 后再给氧(缺氧复氧组)1、6 和 12 h 后 P-选择素及 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达均明显高于同时点缺氧组及常氧组; 缺氧 1 h 后再给氧同时给予红花含药血清干预各个时点 P-选择素及 ICAM-1 mRNA 及蛋白明显低于单纯缺氧复氧组($P < 0.05$)。结论: 缺氧复氧条件下 P-选择素及 ICAM-1 过度表达, 可能参与肺栓塞溶栓后缺血再灌注损伤的机制, 红花注射液对其有显著缓解作用。

[关键词] P-选择素; 胞间黏附分子 1; 肺; 血管内皮细胞; 红花

[KEY WORDS] P-selectin; Intercellular adhesion molecule-1; Lung; Vascular endothelial cell; Flos carthami

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

肺血栓栓塞(pulmonary thrombembolism, PTE)是以肺部血流动力学障碍为特征的血栓性疾病, 血管内皮细胞损伤和/或功能改变是肺血栓栓塞发病的重要环节, PTE 发生后, 肺血管内皮受损, 释放出大量血管收缩物质; 可造成血管炎症反应, 又进一步使血小板激活, P-选择素(Ps)是血小板释放过程中整合到血小板膜上的糖蛋白, 因而也是反映血小板释放功能变化的特异性指标, 细胞间黏附分子 ICAM-1 表达的异常能促进或加剧 PTE 发生和发展, 肺血栓栓塞溶栓后有局部的缺氧和缺血再灌注, 既可直接损伤内皮细胞本身, 又可诱导内皮细胞表达多种黏附分子, 这些均可促进血小板激活, 缺血缺氧与血小板激活后产生的级联反应互为因果, 进一步影响肺血流动力学的改变。本研究分析肺栓塞溶栓后缺血再灌注损伤的部分机制, 为临床提供实验基础。

材 料 和 方 法

1 实验材料

细胞培养基 M199 购自 Gibco 公司。胎牛血清购自 Hyclone 公司, RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司。Trizol 试剂购自 Gibco 公司。红花注射液三九药业有限公司生产(批号为 Z14021640, 每支 5 mL)。兔抗 P-选择素多克隆抗体、兔抗 ICAM-1 多克隆抗体、羊抗兔、兔/鼠 PAP、DAB 均购自美国 DAKO 公司。兔抗人 VIII 因子相关抗原抗体为深圳晶美生物制品有限公司产品。SABC 试剂盒为武汉博士德公司产品。

2 大鼠肺动脉内皮细胞(rat pulmonary artery endothelial cells)的原代培养制备及鉴定

按文献^[1]的方法进行大鼠肺动脉内皮细胞原代培养, 免

疫组化检测 VIII 因子相关抗原表达以鉴定肺动脉内皮细胞, 具体方法按 SABC 试剂盒说明进行。免疫组化染色肺动脉内皮细胞阳性, 胞浆呈清晰棕黄色弥漫分布, 说明 VIII 因子相关抗原蛋白表达, 证实为肺动脉内皮细胞。

3 红花含药血清的制备

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 10 只自尾静脉注射红花注射液 2 mL/kg, 以后每天 1 次, 共 3 d, 最后 1 次注射后 1 h 处死, 从腹腔静脉取血, 分离血清, -20 °C 保存。

4 按给氧情况随机分组

常氧组: 持续通入空气 12 h; 缺氧组: 细胞置于密闭容器, 通入 95% N₂、5% CO₂ 混合气 150 mL/min 持续 12 h, 30 min 时测容器内 O₂ 浓度为 0.5% 左右, 分别在 1、6 和 12 h 收集细胞。缺氧再复氧组: 置于密闭容器, 150 mL/min 持续通入 95% N₂、5% CO₂ 混合气 1 h 后, 改通 95% O₂、5% CO₂ 混合气复氧 12 h, 分别在复氧 1、6 和 12 h 收集细胞。红花含药血清干预组: 在内皮细胞培养液中加入红花含药血清 2 mL, 处理同缺氧再复氧组。观察各组 P-选择素及 ICAM-1 mRNA 和蛋白的变化。

5 RT-PCR 检测 RPAECs 表达 P-选择素、ICAM-1 mRNA 水平

提取各组细胞总 RNA, 用紫外分光光度计测定处理组及对照组细胞抽提总 RNA 浓度。取 3 μg RNA 进行逆转录反应, 反应体系为: 5 μL M-MLV 5 × reaction buffer, 1 μL rRNase ribonuclease inhibitor (2×10^7 U/L), 10 mmol/L dNTP 2 μL, 1 μL oligo(dT) (1 g/L), 1 μL M-MLV RT (2×10^8 U/L), 加入 ddH₂O 至总体积 20 μL, 混匀各管, 37 °C 5 min; 42 °C 1 h; 70 °C 19 min。反应结束后, 各管置冰上冷却, 取 1 μL

[收稿日期] 2005-12-06 [修回日期] 2006-03-23

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 50347009)

Tel: 027-85726012; E-mail: whzjc@public.wh.hb.cn

cDNA 用于做 PCR, 剩余 -20 °C 保存。用于扩增 Ps 的引物序列如下: P1 (1 897 - 1 917 nt); 5' - TCC AGT AAC ACA GAC AGT GC - 3'; P2 (2 660 - 2 680 nt); 5' - GAG GTG ATG TCC AGG AAG AA - 3'。以 β -actin 做为内参照, 其引物序列为: P5: 5' - ATC TGG CAC CAC ACC TTC TA - 3'; P6: 5' - CTC CTT AAT GTC ACG CAC GA - 3'; ICAM - 1 引物序列: 上游 5' - AGG TGT GAT ATC CGG TAG AA - 3'; 下游 5' - CCT TCT AAG TGG TTG GAA CA - 3'。冰浴中调配各成分, 15 000 r/min 离心 10 s, 然后立即放于 PCR 仪上进行反应。PCR 反应参数为: (1) 94 °C 5 min; (2) 94 °C 30 s; 58 °C 30 s; 72 °C 1 min; 28 个循环; (3) 72 °C 10 min。反应完毕后取 PCR 产物 5 μ L 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在 SX - 100 凝胶成像仪成像并进行灰度扫描分析。

6 Western blotting 检测各组 P - 选择素、ICAM - 1 蛋白质表达

提取各组细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定细胞总蛋白质浓度。上样前加入 2 \times SDS 加样缓冲液煮沸 10 min, 50 μ g 蛋白质样品用 12% SDS - PAGE 电泳分离后电转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜), 3% BSA 室温封闭 1 h, 大鼠抗人 ps/ ICAM - 1 多克隆抗体 (1: 500) 室温孵育 1 h, 含 0. 05% Tween20 的 TBS 洗 15 min \times 3 次, 碱性磷酸酶标记的羊抗大鼠 IgG (1: 5 000) 室温孵育 1 h, 含 0. 05% Tween20 的 TBS 洗 15 min \times 3 次, 加入化学发光试剂, 暗室曝光。冲片观察结果。利用 Kodak DS1D 软件分析条带的积分吸光度值。

7 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11. 5 版统计软件对数据进行统计学处理, 各组间比较采用配对 *t* 检验和方差分析。

结 果

1 各组培养 RPAECs P - 选择素及 ICAM - 1 mRNA 的表达变化

常氧组及缺氧组细胞 1、6 和 12 h P - 选择素及 ICAM - 1 mRNA 表达没有明显差异, 而缺氧 1 h 后再给氧 (缺氧复氧组) 1、6 和 12 h P - 选择素及 ICAM - 1 mRNA 的表达均明显上调, 显著高于常氧组及缺氧组 (均 $P < 0. 05$); 缺氧 1 h 后再给氧同时给予红花含药血清干预组各个时点 P - 选择素及 ICAM - 1 mRNA 表达水平显著低于缺氧复氧组 ($P < 0. 05$); 而与同时点常氧组及缺氧组水平相近 (图 1、2)。

2 各组培养 RPAECs P - 选择素及 ICAM - 1 蛋白的表达变化

与 P - 选择素及 ICAM - 1 mRNA 的变化一致, 常氧组及缺氧组细胞 1、6 和 12 h P - 选择素及 ICAM - 1 蛋白表达没有明显差异, 而缺氧 1 h 后再给氧 (缺氧复氧组) 1、6 和 12 h P - 选择素及 ICAM - 1 蛋白表达均明显上调, 显著高于常氧组及缺氧组 (均 $P < 0. 05$); 缺氧 1 h 后再给氧同时给予红花含药血清干预组各个时点 P - 选择素及 ICAM - 1 蛋白表达水平显著低于缺氧复氧组 ($P < 0. 05$); 而与同时点常氧组及缺氧组水平相近 (图 3)。

讨 论

急性肺动脉栓塞是内源性或外源性栓子堵塞肺动脉引起肺循环障碍的临床和病理生理综合征。除机械性阻塞因素外, 体液因素亦参与了肺缺血缺氧过程, 肺血管扩张血管

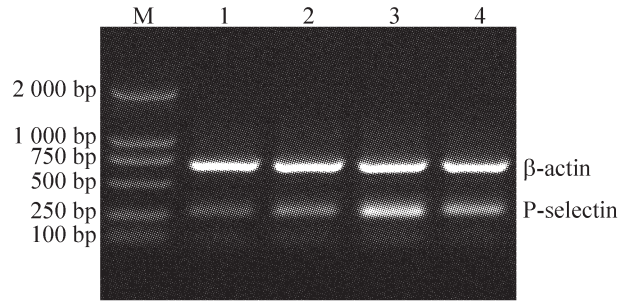


Fig 1 Expression of Ps mRNA in different groups (6 h). M: marker; 1: normoxia group; 2: anoxia group; 3: reoxygenation group; 4: safflor group.

图 1 各组 Ps mRNA 的 mRNA 表达 (6 h)

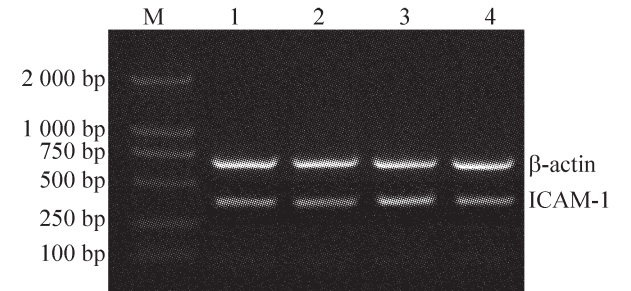


Fig 2 Expression of ICAM - 1 mRNA in different groups (6 h). M: marker; 1: normoxia group; 2: anoxia group; 3: reoxygenation group; 4: safflor group.

图 2 各组 ICAM - 1 mRNA 的表达 (6 h)

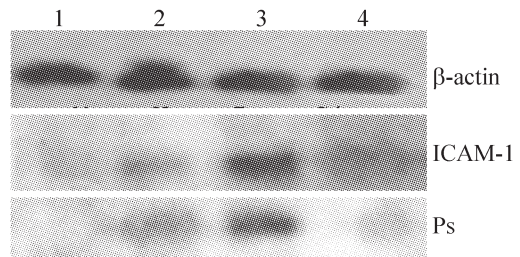


Fig 3 Expression of ICAM - 1 and Ps protein in different groups (6 h). M: marker; 1: normoxia group; 2: anoxia group; 3: reoxygenation group; 4: safflor group.

图 3 各组 Ps/ ICAM - 1 蛋白的表达

与缩血管物质的失衡, 进一步加剧了肺缺血缺氧的改变^[2]。经溶栓治疗和自身的纤溶系统能将血栓不同程度地溶解, 但溶栓后仍有不同程度的炎症反应。本试验在体外模拟肺血管内皮细胞缺氧复氧过程, 分析 P - 选择素及 ICAM - 1 肺缺血再灌注损伤的部分机制。

正常情况下, 血管内皮细胞可少量表达 ICAM - 1, 在缺氧创伤及炎症时, 受内毒素、IL - 1 或 TNF 等细胞因子的刺激, 其在血管内皮细胞的表达可明显增加, ICAM - 1 的过量表达是血管通透性增高, 血屏障破坏的重要因素。在本实验中培养的单层 RPAECs 经分别处理的结果显示, 常氧组细胞其 P - 选择素及 ICAM - 1 表达同缺氧组各个时点无明显差异, 而缺氧 1 h 再给氧 12 h (即缺氧复氧) ICAM - 1 的表达明显增加, 缺氧再复氧引起 ICAM - 1 表达增加的机制尚不明确, 可能与炎症介质增加、核因子 - κ B (NF - κ B) 的激活等因素有关^[3]; 表明用 ICAM - 1 的激活剂白介素 - 1 和肿瘤坏死

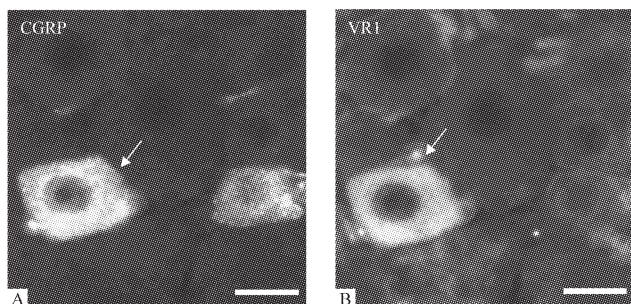


Fig 4 The co-expression of CGRP and VR1 on L3 DRG. Double labelled neuron was shown by the arrow. Scale bar = 20 μ m.

图4 L3 DRG上CGRP和VR1的共表达

异常。另有研究发现,急性胃肠道感染所致黏膜一过性损伤后常发生胃肠功能紊乱,表现为内脏感觉和运动功能的异常。黏膜损伤通常在2周左右即可恢复正常,但是用腹壁肌电图结合直肠扩张刺激发现,内脏感觉和运动功能异常可持续存在至17周。

本研究表明结肠局部炎症可以致敏支配这一肠段的感覺神经元以及神经纤维,表现为内脏伤害性刺激受体VR1和初级传入神经感觉性神经递质CGRP的表达增高,这种异常高表达可以持续存在至局部炎症完全消退后。VR1是一种重要的内脏伤害性刺激受体,可以感受多种有害性刺激,因此它被看作是各种引起疼痛的理化刺激的作用位点。VR1也可以非感觉性组织表达,能够被炎症多肽缓激肽激活,介导炎症反应。各种有害刺激如VR1激活、扩张或酸中毒等可以引起肠道外来神经元释放CGRP,炎症时释放的CGRP

对组织具有保护作用,可以增加损伤部位的血流量。如给予TNBS灌肠大鼠CGRP拮抗剂后可以使结肠炎的症状加重。这些研究表明CGRP和VR1可以调节结肠炎时肽能神经元的功能,增强其在炎症过程中的作用。

[参 考 文 献]

- [1] Mayer EA, Gebhart GF. Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia[J]. *Gastroenterology*, 1994, 107(1): 271-293.
- [2] Gebhart GF. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278(6): G834-G838.
- [3] Al Chaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1276-1285.
- [4] Collins SM, Piche T, Rampal P. The putative role of inflammation in the irritable bowel syndrome [J]. *Gut*, 2001, 49(6): 743-745.
- [5] McCafferty DM, Wallace JL, Sharkey KA. Effects of chemical sympathectomy and sensory nerve ablation on experimental colitis in the rat [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1997, 272(2 Pt 1): G272-G280.
- [6] Wallace JL. Glucocorticoid induced gastric mucosal damage in inhibition of leukotriene, but not prostaglandin biosynthesis [J]. *Prostaglandins*, 1987, 34(2): 311-323.

(上接第1846页)

因子 α 刺激组织细胞后,可使ICAM-1的表达增加并导致中性粒细胞与内皮细胞的黏附加强,组织中的中性粒细胞浸润增多,引起组织的损伤加剧。有学者在大鼠肝缺血再灌注损伤中使用ICAM-1的单克隆抗体时,由于其生物效应被阻断,中性粒细胞的浸润减少,氧自由基的产物也明显减少^[4]。说明ICAM-1在缺氧再灌注损伤时造成组织损伤的机制,主要是介导中性粒细胞的浸润以及氧自由基的产生^[5]。由于氧自由基的产生可激活核转录因子 κ B(NF- κ B),而NF- κ B的激活又可反过来上调ICAM-1的表达,从而可形成一个细胞内的正反馈过程。

P-选择素通常储存于内皮细胞的分泌颗粒中,当内皮细胞受到凝血酶或组胺等刺激后P-选择素迅速表达于细胞表面,在炎症发生最早期其介导中性粒细胞的滚动、粘着继而聚集到受损部位^[6]。本研究在体外模拟缺氧复氧过程观察了P-选择素的表达变化,结果表明同ICAM-1的变化一致,给予红花含药血清干预后由缺氧再复氧引起ICAM-1及P-选择素表达水平显著下降,提示红花注射液可通过抑制缺氧复氧条件下P-选择素及ICAM-1的过度表达,从而保护血管内皮,明显减少大鼠肺血栓再通时白细胞的浸润,并显著减轻肺组织的损伤。

[参 考 文 献]

- [1] 姜泊,张亚历,周殿元,主编. 分子生物学常用实验

方法[M]. 北京:人民军医出版社,1996. 86-94.

- [2] Doggrel SA. The role of 5-HT on the cardiovascular and renal system and the clonical potentiation of 5-HT modulation [J]. *Expert Opin Investing Drugs*, 2003, 12(5): 805-823.
- [3] Howard EF, Chen Q, Cheng C, et al. NF- κ B is activated and ICAM-1 gene expression is upregulated during reoxygenation of human brain endothelial cells [J]. *Neurosci Lett*, 1998, 248(3): 199-203.
- [4] Marubyashi S, Oshiro Y, Maeda T, et al. Protective effect of monoclonal antibodies molecules to adhesion on rat liver ischemia reperfusion injury [J]. *Surgery*, 1997, 122(1): 45-52.
- [5] 安冬艳,赵祯,曹宇. HSP70对大鼠肝脏局部缺血再灌注后炎症反应的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(9): 1820-1824.
- [6] Panes J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: Molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114(5): 1066-1090.