

[文章编号] 1000-4718(2008)09-1856-03

# 人参皂苷 Rb1 对白消安诱导人脐静脉内皮细胞表达 PAI-1、TF 和 TGF- $\beta_1$ 的影响

谢 薇, 夏凌辉<sup>△</sup>, 方 峻, 陈红霞, 魏文宁

(华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所, 湖北 武汉 430022)

**[摘要]** 目的: 探讨人参皂苷 Rb1 对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的保护作用机制。方法: 体外培养 HUVECs, 分别用白消安(BU)和人参皂苷 Rb1 干预, 以 RT-PCR、实时荧光定量 PCR 以及 ELISA 方法检测其 PAI-1、TF 和 TGF- $\beta_1$  mRNA 和蛋白的表达。结果: 60 mg/L BU 使 HUVECs PAI-1、TF 和 TGF- $\beta_1$  蛋白水平明显增高及 mRNA 表达显著增强, 80 mg/L 人参皂苷 Rb1 则可明显抑制 BU 对 HUVECs 的这种作用。结论: BU 可能通过激活 TGF- $\beta_1$  信号转导途径而上调 PAI-1 及 TF 的表达, 增强 HUVECs 促凝活性; 人参皂苷 Rb1 则可能通过抑制这一途径降低 PAI-1 及 TF 表达, 保护 HUVECs, 纠正其高凝、低纤溶活性的异常状态。

**[关键词]** 人脐静脉内皮细胞; 白消安; 人参属; 纤溶酶原激活物抑制物 1; 凝血致活酶; 转化生长因子  $\beta$

**[KEY WORDS]** Human umbilical vein endothelial cells; Busulfan; Panax; Plasminogen activator inhibitor 1; Thromboplastin; Transforming growth factor beta

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

肝静脉闭塞病 (hepatic veno-occlusive disease, HVOD) 是造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 后常见的并发症。预处理中白消安 (busulfan, BU) 的使用与 HVOD 发生有着密切的关系<sup>[1]</sup>, 可通过上调内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 和组织因子 (tissue factor, TF) 表达促进 HVOD 的发生发展<sup>[2]</sup>, 而转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 是调控这一过程的主要因子。人参皂苷 Rb1 是一种内皮保护剂, 其作用机制尚未阐明。本实验旨在观察 Rb1 对 BU 所致人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) TGF- $\beta_1$  表达的影响以及其下游信号分子 PAI-1 和 TF 水平的表达, 为进一步探讨 HVOD 的发病机制和采用 Rb1 防治 HVOD 提供理论基础和实验依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 试剂

HUVECs、内皮细胞完全培养基 (ECM) 购自 ScienCell 公司; 白消安注射液购自 ESP Pharma Inc.; 人参皂苷 Rb1 标准品购自江西本草天工科技有限责任公司 (批号: 1130-050102; 纯度  $\geq 98\%$ ); 随机引物由 Invitrogen 公司设计合成; 逆转录酶 M-MLV、Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自 Promega 公司; PAI-1、TF、TGF- $\beta_1$  ELISA 试剂盒购自 Assaypro 公司。

### 2 方法

**2.1 HUVECs 的培养** 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 和 95% 空气培养箱中以 ECM 培养基培养, 用 0.1% 胰酶加 0.1% EDTA 消化传代, 取 4-8 代用于实验。

**2.2 实验分组** BU 浓度梯度实验分组依次为 0、30、60、90、120、150 (mg/L BU)。Rb1 和 BU 共同干预实验分组为 0、80 mg/L Rb1、60 mg/L BU、20 mg/L Rb1 + 60 mg/L BU、40 mg/L Rb1 + 60 mg/L BU、60 mg/L Rb1 + 60 mg/L BU、80 mg/L Rb1 + 60 mg/L BU, 各组加入 Rb1 30 min 后再加入 BU。24 h 后收集各孔细胞培养液上清及细胞。

**2.3 RT-PCR 检测 BU 干预后的 HUVECs PAI-1、TGF- $\beta_1$  mRNA 的表达**

①引物序列设计 PAI-1: 188 bp, 正义链 5' - GCTGGT-GAATGCCCTCTACT - 3', 反义链 5' - GCAGTTCAGGAT-GTCGTACT - 3'; TF: 210 bp, 正义链 5' - TAAGCACTAAGT-CAGGAGATTGG - 3', 反义链 5' - GGTTTGTCTCCAGGTAAG-GTG - 3'; TGF- $\beta_1$ : 126 bp, 正义链 5' - CTGGCGATACCT-CAGCAACC - 3', 反义链 5' - CTAAGCGCAAAGCCCTCAAT - 3';  $\beta$ -actin: 159 bp, 正义链 5' - CTTAGTTGCGTTACAC-CCTTTCTTG - 3', 反义链 5' - CTGCTGTCACCTTCACCGTTCC - 3'。

②检测方法简述 (1) RT 反应条件: 70 °C 5 min; 42 °C 60 min; 95 °C 5 min。(2) PCR 反应体系: cDNA 1  $\mu$ L, TaqDNA 聚合酶 ( $5 \times 10^6$  U/L) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 17.4  $\mu$ L, 10  $\times$  buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2  $\mu$ L, 上下游引物 (50 pmol/ $\mu$ L) 各 0.3  $\mu$ L。反应条件: 首先 95 °C 5 min 变性, 接着 35 个循环, 包括 95 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 最后 72 °C 7 min 延伸。产物在含有 0.05 mL/L gold view 染料的 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 采用凝胶成像系统拍照并用凝胶图像分析软件进行图像信号分析。

[收稿日期] 2007-05-08

[修回日期] 2007-12-10

△通讯作者 Tel: 027-85726387; E-mail: xlh64@medmail.com.cn

**2.4 实时荧光定量 PCR 检测 Rb1 和 BU 干预后 HUVECs PAI-1、TF、TGF- $\beta_1$  mRNA 的表达** 细胞总 RNA 的提取、RT 方法及引物设计合成同前。实时荧光定量 PCR 反应体系: cDNA 2  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 14.5  $\mu$ L、SYBR Green I 荧光染料 0.5  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L、上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 余同 PCR。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 变性, 56  $^{\circ}$ C 退火, 余同 PCR。全过程在实时荧光定量 PCR 仪 (FTC-2000) 中完成, 同时观测并记录扩增曲线, 分析 Ct 值, 根据 Ct 值计算出各扩增产物的相对表达量。

**2.5 ELISA 方法检测细胞上清中 PAI-1、TF、TGF- $\beta_1$  蛋白水平** 所用抗体为鼠抗人 PAI-1、TF 及 TGF- $\beta_1$  单克隆抗体, 方法按试剂盒说明书进行。实验重复 3 次, 每次每组 3 份样本。

### 3 统计学处理

每种处理方式设 3 个复孔, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 以 SPSS12.0 软件进行统计分析。两组间 mRNA 以及蛋白表达量的比较采用 *t* 检验, 各组间的两两比较采用 *q* 检验。

## 结 果

### 1 不同浓度 BU 对 HUVECs PAI-1 和 TGF- $\beta_1$ 的影响

PAI-1 和 TGF- $\beta_1$  mRNA 均在 60 mg/L BU 刺激时升高最显著 ( $P < 0.01, n = 3$ ), 随着 BU 浓度增加 mRNA 表达反而下降, 见图 1。因此, 我们选择 60 mg/L 为后续实验的 BU 干预浓度。

### 2 人参皂苷 Rb1 对 BU 致 HUVECs PAI-1、TF 和 TGF- $\beta_1$ mRNA 和蛋白表达水平的影响以及 Rb1 最佳浓度的确定

与对照组相比, 单用人参皂苷 Rb1 作用的 HUVECs 其 PAI-1、TGF- $\beta_1$ 、TF mRNA 和蛋白表达并不增加 ( $P > 0.05$ )。60 mg/L BU 刺激 HUVECs 24 h 后 PAI-1、TGF- $\beta_1$ 、TF mRNA 和蛋白表达均增加 ( $P < 0.05$ ), 而一定浓度的人参皂苷 Rb1 抑制其增加, 且不同浓度 Rb1 抑制作用不同, 见图 2。与 BU 组相比, 20 mg/L Rb1 对 PAI-1 和 TGF- $\beta_1$  mRNA 和蛋白表达无显著影响 ( $P > 0.05$ ), 但可显著降低 TF 的表达 ( $P < 0.05$ ); 而 40、60、80 mg/L Rb1 均可显著降低 3 个指标的表达水平 ( $P < 0.05$ )。其中, 80 mg/L 组的这 3 个指标的蛋白和 mRNA 水平与其它各组之间差别显著 ( $P < 0.05$ )。

## 讨 论

HVOD 是 HSCT 术后常见并发症, 发病率达 10% - 40%, 重症患者死亡率高达 100%, 移植术后 100 d 内死亡的患者有 24% 源自 HVOD<sup>[3]</sup>。因此, 有效防治 HVOD 以提高 HSCT 成功率和疗效, 成为亟待解决的重大课题。

研究表明, HVOD 病理过程与肝窦内皮细胞 (sinusoidal endothelial cells, SECs) 损伤、炎症反应和纤溶凝血机制异常密切相关, 其中, SECs 损伤是其发生的始动因素和中心环节。DeLeve 等十年前已在鼠模型中证明 SECs 损伤是 HVOD 的早期病理改变。引起 SECs 损伤的因素主要包括 HSCT 预处理化疗药物的毒性、炎症反应及组织缺氧。例如, BU、野百合碱及环磷酸胺等可直接损伤 SECs<sup>[1]</sup>。损伤的 SECs 高表达 PAI-1 和 TF, 造成肝血管局部纤溶活性减低和凝血激活, 导

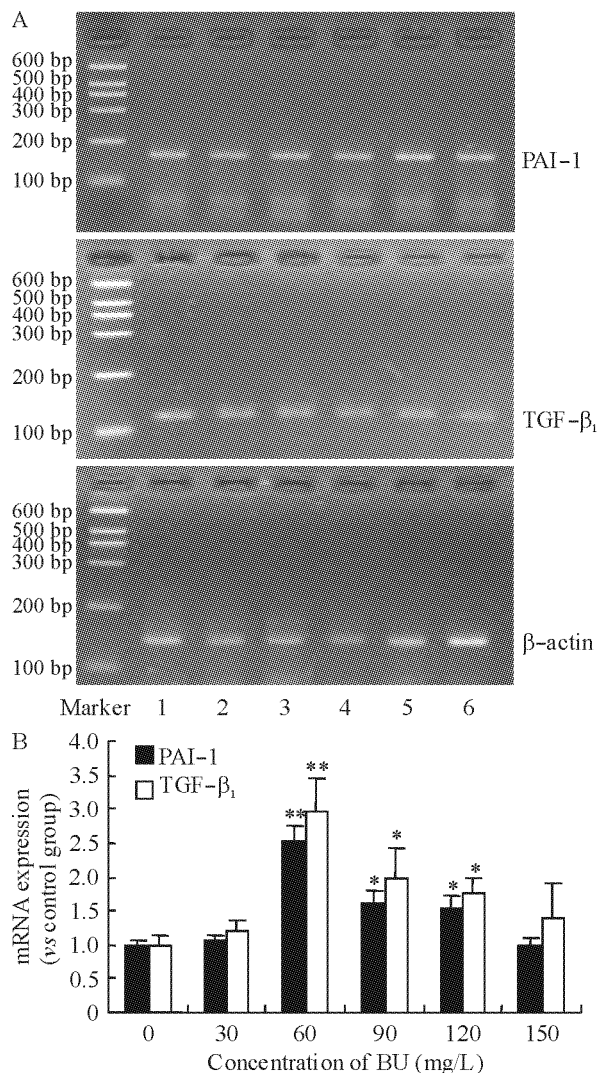


Fig 1 Effect of busulfan at different concentrations on expression of PAI-1 and TGF- $\beta_1$  mRNA in HUVECs. A: electropherogram of PCR product; Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6 represent 0, 30, 60, 90, 120, 150 mg/L of BU intervention for 24 h, respectively; B: statistical bar-graph: the expression of PAI-1 and TGF- $\beta_1$  mRNA in every group refers to corresponding  $\beta$ -actin.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

图 1 不同浓度 BU 对 HUVECs PAI-1 和 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达的影响

致肝窦静脉血栓形成。研究表明, 重症 HVOD 患者均有 PAI-1 抗原水平及活性的显著升高, PAI-1 水平异常增高成为临床诊断 HVOD 的标志和重要预测因素<sup>[4]</sup>。TGF- $\beta_1$  则可通过激活 Smads 和 MAPK 信号途径上调内皮细胞 PAI-1 和 TF 的表达<sup>[2,5]</sup>。临床研究表明, HSCT 患者移植前血清 TGF- $\beta_1$  水平升高是预测 HVOD 的重要指标之一。

本实验以 HUVECs 作为研究对象, 通过体外实验证实: ①一定浓度的 BU (60、90、120 mg/L) 可刺激内皮细胞 PAI-1 和 TGF- $\beta_1$  mRNA 高表达 ( $P < 0.05$ ), 而极低浓度 (30 mg/L) 和极高浓度 (150 mg/L) 对其并无显著影响 ( $P > 0.05$ ); ②不同浓度 BU 刺激内皮细胞表达 PAI-1 和 TGF- $\beta_1$  mRNA 的

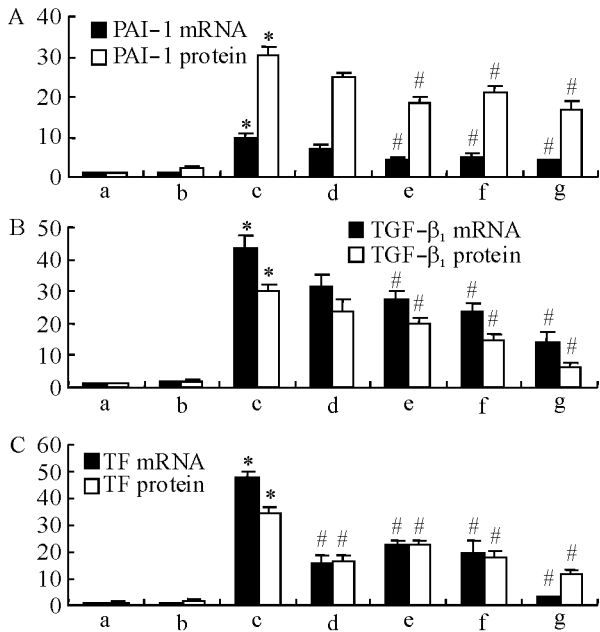


Fig 2 Effect of ginsenoside Rb1 on busulfan - induced expression of PAI - 1, TGF -  $\beta_1$ , TF mRNA and protein in HUVECs. A, B, C are statistical bar - graph of PAI - 1, TGF -  $\beta_1$ , TF mRNA and protein level, respectively. a, b, c, d, e, f, g are control group, Rb1 group, BU group, BU + Rb1 (20 mg/L), BU + Rb1 (40 mg/L), BU + Rb1 (60 mg/L), BU + Rb1 (80 mg/L), respectively.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs BU group (c).

图2 不同浓度 Rb1 对 BU 诱导 HUVECs PAI - 1、TGF -  $\beta_1$ 、TF mRNA 以及蛋白表达的影响

变化趋势具有一致性,证明 TGF -  $\beta_1$  相关信号通路可能是上调内皮细胞 PAI - 1 表达的方式之一,与上述国外学者报道一致。

目前临床上 HVOD 的治疗手段极其有限,故预防 HVOD 发生具有重要意义。新近研究发现,人参皂苷单体 Rb1 对内皮细胞具有明显保护作用:可阻断同型半胱氨酸抑制内皮细胞增殖的作用<sup>[6]</sup>。本实验预先用人参皂苷 Rb1 处理 30 min 后再用 BU 刺激 HUVECs,结果发现:①一定浓度的 BU 可刺

激 HUVECs 高表达 PAI - 1、TGF -  $\beta_1$ 、TF,而用 Rb1 预处理可拮抗上述效应,初步证实 Rb1 可能通过抑制 TGF -  $\beta_1$  相关信号转导对 HUVECs 发挥保护作用;②80 mg/L Rb1 的抑制作用最强,可能是保护 HUVECs 的理想浓度。

[参 考 文 献]

[1] Lee JH, Choi SJ, Lee JH, et al. Decreased incidence of hepatic veno - occlusive disease and fewer hemostatic derangements associated with intravenous busulfan vs oral busulfan in adults conditioned with busulfan + cyclophosphamide for allogeneic bone marrow transplantation [J]. Ann Hematol, 2005, 84(5) : 321 - 330.

[2] Pihusch V, Pihusch M, Penovici M, et al. Transforming growth factor beta - 1 released from platelets contributes to hypercoagulability in veno - occlusive disease following hematopoietic stem cell transplantation [J]. Thromb Res, 2005, 116(3) : 233 - 240.

[3] Kalayoglu - Besisik S, Yenerel MN, Caliskan Y, et al. Time - related changes in the incidence, severity, and clinical outcome of hepatic veno - occlusive disease in hematopoietic stem cell transplantation patients during the past 10 years [J]. Transplant Proc, 2005, 37(5) : 2285 - 2289.

[4] Sartori MT, Spiezia L, Cesaro S, et al. Role of fibrinolytic and clotting parameters in the diagnosis of liver veno - occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation in a pediatric population [J]. Thromb Haemost, 2005, 93(4) : 682 - 689.

[5] Saura M, Zaragoza C, Herranz B, et al. Nitric oxide regulates transforming growth factor -  $\beta$  signaling in endothelial cells [J]. Circ Res, 2005, 97(25) : 1115 - 1123.

[6] Ohashi R, Yan S, Mu H, et al. Effects of homocysteine and ginsenoside Rb1 on endothelial proliferation and superoxide anion production [J]. J Surg Res, 2006, 133(2) : 89 - 94.

(上接第 1855 页)

[8] Li XT, Dyachenko V, Zuzarte M, et al. The stretch - activated potassium channel TREK - 1 in rat cardiac ventricular muscle [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(1) : 86 - 97.

[9] Joy H, Weihong L, David A. Differential expression of the mechanosensitive potassium channel TREK - 1 in epicardial and endocardial myocytes in rat ventricle [J]. Exp Physiol, 2003, 89(3) : 237 - 242.

[10] Cheng LX, Su FC, Ripen Z, et al. Changes of expression of stretch - activated potassium channel TREK - 1 mRNA and protein in hypertrophic myocardium [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2006, 26(1) : 31 - 33.

[11] Mbalaviele G, Anderson G, Jones A, et al. Inhibition of p38 mitogen - activated protein kinase prevents inflammatory bone destruction [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 317(3) : 1044 - 1053.

[12] Lisnock J, Tebben A, Frantz B. Molecular basis for p38 protein kinase inhibitor specificity [J]. Biochemistry, 1998, 37(47) : 16573 - 16581.

[13] Johansen C, Funding AT, Otkjaer K, et al. Protein expression of TNF - alpha in psoriatic skin is regulated at a posttranscriptional level by MAPK - activated protein kinase 2 [J]. J Immunol, 2006, 176(3) : 1431 - 1438.