

川芎嗪对脂多糖诱导的内皮细胞损伤的保护作用

杨锡兰, 李言, 王盼, 赵士弟, 陈前芬

[摘要] **目的:** 探讨川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) RhoA、Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 2(Rho associated coiled coil forming protein kinase, ROCK2)、肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)磷酸化及细胞骨架连接蛋白(ezrin-radixin-moesin, ERM)磷酸化水平的影响。**方法:** 以体外培养的 HUVEC 为实验对象,分为对照组、LPS 组和 TMP 组(0.5、1.0、1.5 mg/mL),荧光定量 PCR 测定内皮细胞 RhoA、ROCK2 和信使 RNA(p-Ezr mRNA)的表达,Western blot 法测定内皮细胞 RhoA、ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 蛋白水平的表达。**结果:** 与对照组比较,LPS 组 RhoA、ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 蛋白及 RhoA、ROCK2 和 p-Ezr mRNA 表达均显著升高($P < 0.01$);与 LPS 组比较,TMP 3 组 RhoA 蛋白表达与 mRNA 表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 蛋白及 ROCK2、p-Ezr mRNA 表达均降低($P < 0.05 \sim P < 0.01$),且 TMP 3 组之间 ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 的分子表达差异均有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。**结论:** TMP 对 LPS 诱导的 HUVEC 损伤的保护作用可能是通过抑制 Rho/ROCK 信号通路中 ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 的表达,以减弱 LPS 对内皮细胞骨架的损伤。

[关键词] 内皮,血管;川芎嗪;脂多糖;细胞骨架;Rho/ROCK 通路

[中图分类号] R 322.12;R 284.1 [文献标志码] A DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.03.002

Protective effect of tetramethylpyrazine on the injury endothelial cell induced by lipopolysaccharide

YANG Xi-lan, LI Yan, WANG Pan, ZHAO Shi-di, CHEN Qian-fen

(Department of Pathophysiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of tetramethylpyrazine(TMP) on the levels of RhoA, Rho associated coiled coil forming protein kinase 2(ROCK2), myosin light chain(MLC) phosphorylation and ezrin-radixin-moesin(ERM) phosphorylation in the injury of human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) induced by lipopolysaccharide(LPS). **Methods:** The HUVECs were cultured *in vitro*, and divided into the control group, LPS group and TMP groups(0.5, 1.0, 1.5 mg/mL). The mRNA levels of RhoA, ROCK2 and p-EZR in endothelial cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, and the protein levels of RhoA, ROCK2, p-MLC and p-ERM were examined using western blotting. **Results:** Compared with the control group, the protein levels of RhoA, ROCK2, p-MLC and p-ERM, and the mRNA levels of RhoA, ROCK2 and p-Ezr in LPS group significantly increased($P < 0.01$). The differences of the protein and mRNA levels of RhoA between LPS group and 3 TMP groups were not statistically significant($P > 0.05$). Compared with the LPS group, the protein levels of ROCK2, p-MLC and p-ERM, and the mRNA levels of ROCK2 and p-Ezr decreased significantly in 3 TMP groups($P < 0.01$). The differences of the expression of ROCK2, p-MLC and p-ERM within 3 TMP groups were statistically significant($P < 0.05$ to $P < 0.01$). **Conclusions:** TMP may protect the HUVECs against LPS-induced injury by inhibiting the expressions of ROCK2, p-MLC and p-ERM in Rho/ROCK signaling pathways, and reducing the injury of LPS on endothelial cell skeleton.

[Key words] endothelial, vascular; tetramethylpyrazine; lipopolysaccharide; cytoskeleton; Rho/ROCK pathway

内毒素与脓毒血症的发生、发展密切相关,血管内皮通透性增高和大分子物质渗出是其重要的病理

生理过程,主要由炎症介质和细胞骨架改变共同介导。肌动蛋白细胞骨架已被认为是细胞外信号启动和调控细胞内信号时的首要靶蛋白,是调节内皮细胞通透性的重要机制^[1]。研究^[2]证实,Rho/Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(ROCK)信号通路是介导细胞骨架重构的重要信号通路。多种因子和介质可作用于 Rho/ROCK 信号通路使 Rho 活化,Rho 激活 ROCK,进一步使磷酸化的肌球蛋白轻链(myosin light chain,MLC)和细胞骨架连接蛋白(ezrin-radixin-moesin,ERM)水平升高,肌球蛋白交联增加,微丝骨

[收稿日期] 2015-01-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202833);安徽省自然科学基金项目(1308085MH140);蚌埠医学院研究生科研创新计划项目(Byyex1306)

[作者单位] 蚌埠医学院 病理生理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 杨锡兰(1988-),女,硕士研究生。

[通信作者] 陈前芬,硕士研究生导师,副教授。E-mail: cqf14621@126.com

架收缩增强,从而使血管内皮细胞收缩,通透性增加。川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)是中药川芎的主要活性成分,在临床上被广泛应用于心脑血管疾病的治疗^[3-4]。有研究^[5]表明, TMP 能减轻内皮细胞损伤,修复内皮细胞屏障功能。本实验拟建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)损伤模型,从分子水平探讨 Rho/ROCK 信号通路是否参与 LPS 引起的内皮细胞损伤,探讨 TMP 对内皮细胞损伤的保护作用以及 TMP 干预 Rho/ROCK 信号通路的具体分子学机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及药品

健康足月剖宫产新生儿脐带,标本取自蚌埠医学院第一附属医院产科(均征得产妇同意);ECM 培养基(Sciencell 公司);胶原酶 I 型、 β -actin 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(Biosharp 公司);胰酶(碧云天生物技术研究);LPS(0111 美国 Sigma 公司);TMP(中国食品药品检定研究院标准品);VIII 因子相关抗原原抗人抗体、SABC 免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司);RhoA 抗体(Santa Cruz biotechnology);兔抗人 ROCK2 抗体、p-MLC 抗体、p-ERM 抗体(Cell Signaling 公司);逆转录第一链 cDNA 合成试剂盒(Thermo 公司);Super Real 荧光定量预混试剂(Tiangen 公司)。

1.2 原代人脐静脉内皮细胞培养、传代

无菌条件下,取新生儿脐带(>20 cm),剪去损伤部分,用 37 °C 预热的 PBS 冲洗 3 次。注入预热的 0.1% 胶原酶约 15 mL,置 37 °C 培养箱中孵育 10 min,充分消化脐静脉内皮。收集消化液,然后注入含 5% 胎牛血清的 ECM 培养基冲洗管腔,将消化液与冲洗液一并收集于离心管,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清。加入 3 mL 完全培养液,用吹打管吹打均匀,按 1×10^6 个接种于 25 cm² 培养瓶,置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。待 3~5 d,细胞生长成单层细胞,达到 70%~80% 融合后,弃去培养瓶中的培养液,然后加入 0.25% 胰蛋白酶消化、传代培养,经 VIII 因子抗体免疫组织化学鉴定为血管内皮细胞后,将 2~3 代用于实验。

1.3 分组与处理

实验分组($n=6$):(1)对照组不加特殊处理因素;(2)LPS 组:只加 LPS(0.1 μ g/mL);(3)TMP 组:I 组(0.5 mg/mL TMP + 0.1 μ g/

mL LPS), II 组(1.0 mg/mL TMP + 0.1 μ g/mL LPS), III 组(1.5 mg/mL TMP + 0.1 μ g/mL LPS)。实验处理:LPS 组和 TMP 组分别加入药物处理 24 h(对照组加等体积的培养基)。处理时间结束后分别提取细胞总 RNA 和总蛋白。

1.4 检测指标和方法

1.4.1 荧光定量 PCR 检测内皮细胞 RhoA、ROCK2、信使 RNA(p-Ezr mRNA)的表达

Trizol 法提取细胞总 RNA,按照逆转录合成说明书合成 cDNA,Real-Time PCR 反应操作按 Super Real 荧光定量预混试剂盒说明书进行,每份标本均检测 3 次。反应体系:20 μ L;反应条件:预变性 95 °C 15 min \rightarrow 变性 95 °C 10 s,退火 52~60 °C(RhoA、57 °C; ROCK2、53 °C;p-Ezr、59 °C),延伸 72 °C 30 s(收集荧光信号),循环 40 次 \rightarrow 溶解曲线分析。引物序列:RhoA 上游 5'-TGG ATG GAA AGC AGG TAG AGT-3',下游 5'-GTT GGG ACA GAA ATG CTT GAC-3';ROCK2 上游 5'-TGA CAT TGG ACA GTA AAG ACA GTG-3',下游 5'-AGT GTT GTT TCG TAC AGG CAA T-3';p-Ezr 上游 5'-TGC ACA AGT CTG GGT ACC TCA-3',下游 5'-CAT TTC CAG GTC CTG AGC AAT-3';内参 GAPDH 上游 5'-CAG CCT CAA GAT CAT CAG CA-3',下游 5'-TGT GGT CAT GAG TCC TTC CA-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对结果进行相对定量分析。得到的 RQ 值进行统计分析。平行实验重复 3 次。

1.4.2 Western blot 法测定内皮细胞 RhoA、ROCK2、p-MLC、p-ERM 蛋白表达

用胰酶消化下细胞,与旧培养基一并收集至于离心管内,加入 RIPA 裂解液 + PMSF 重悬 5×10^6 个细胞,置于冰上裂解 30 min,不时弹动管壁使充分裂解。裂解后 4 °C,12 000 r/min 离心 15 min。样品采用 BCA 法测定上清蛋白浓度。加上样缓冲液煮沸变性后,取 38 μ g 蛋白样品于 SDS-PAGE 电泳后转移到 PVDF 膜上,用 5% BSA 室温封闭 2 h,然后一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次,每次 10 min;然后二抗孵育 2 h, TBST 洗 3 次后显影, BIO-RAD 凝胶成像系统照相、拍照。用 quantity one 进行积分光密度(integral optical density, IOD)值分析,与 β -actin 蛋白积分光密度值之比作为蛋白相对表达量。平行实验重复 3 次。

1.5 统计学方法

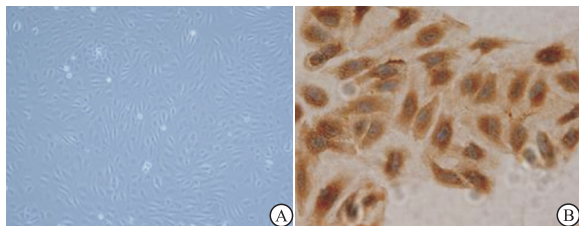
采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 内皮细胞的鉴定

细胞长至 70%~80% 融合时,倒置显微镜观察显示融合的内皮细胞为多角形

或短梭形,呈典型的鹅卵石样或铺路石样紧密排列,无重叠生长现象;内皮细胞爬片后,第Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学法检测培养的正常内皮细胞,阳性结果为胞质内出现大量红棕色颗粒积聚、浓染(见图1)。



A:倒置显微镜下观察正常内皮细胞;
B:第Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学鉴定

图1 内皮细胞形态及鉴定

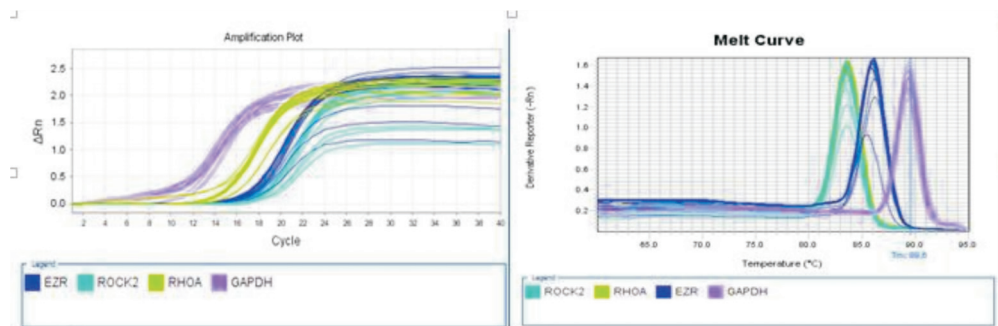


图2 内皮细胞GAPDH及RhoA、ROCK2、p-Ezr基因Real-Time PCR扩增曲线和溶解曲线

表1 各组 RhoA mRNA、ROCK2 mRNA 和 p-Ezr mRNA 相对表达量比较 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	RhoA mRNA 相对表达量	ROCK2 mRNA 相对表达量	p-Ezr mRNA 相对表达量
对照组	1.000 ± 0.258	1.000 ± 0.725	1.000 ± 0.984
LPS 组	1.615 ± 0.225 ^{##}	5.438 ± 1.062 ^{##}	6.033 ± 0.394 ^{##}
TMP I 组	1.493 ± 0.048 ^{##}	3.204 ± 0.534 ^{##*}	3.266 ± 0.539 ^{##*}
TMP II 组	1.687 ± 0.151 ^{##}	1.815 ± 1.136 ^{△△*}	2.200 ± 0.437 ^{△△*}
TMP III 组	1.577 ± 0.356 ^{##}	1.229 ± 0.301 ^{△△*}	1.515 ± 0.982 ^{△△*}
<i>F</i>	8.39	30.40	46.47
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	0.054	0.664	0.514

q 检验:与对照组比较[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 LPS 组比较 *

* $P < 0.01$;与 TMP I 组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

TMP 组与 LPS 组比较,RhoA 蛋白表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),而 ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 蛋白的表达均显著下调($P < 0.05 \sim P < 0.01$),且 TMP 3 组之间呈剂量依赖性下降($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(见图3、表2)。

3 讨论

血管内皮屏障功能障碍是脓毒血症的病理基

础。革兰阴性细菌细胞壁成分 LPS 可能通过影响内皮屏障的功能参与了脓毒血症的早期发病环节^[6]。当内皮细胞骨架受到血管紧张素 II 和白细胞介素-1 等^[7]的作用,细胞内纤维状网架结构产生变化,进而引起内皮细胞收缩,内皮屏障功能受损^[8]。Rho/ROCK 信号通路在调节肌动蛋白骨架的聚合状态方面扮演重要角色。有研究^[9]表明,抑制 Rho/ROCK 信号通路能取得较显著的内皮保护作用。激活状态的 Rho 蛋白与细胞膜相结合,进一步激活 ROCK2,活化的 ROCK2 能使肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase,MLCP)失活,也可直接作用于 MLC 和 ERM 家族,使二者磷酸化水平增高。p-MLC 的高表达能诱使肌动-肌球蛋白交联增加,从而导致了肌动蛋白微丝骨架的聚合^[10];而 p-ERM 能进一步诱导细胞周边应力纤维的形成,二者共同作用最终导致内皮通透性增加。本实验将 LPS 作为诱导剂,检测到 LPS 组与对照组比较,RhoA、ROCK2 和 p-Ezr mRNA 的表达和 RhoA、ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 蛋白表达均显著升高($P < 0.01$),说明 Rho/ROCK 通路可能参与了 LPS 诱导内皮细胞损伤过程,LPS 作用于 Rho/ROCK 信号通路且上调了 RhoA、ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 的

2.2 各组内皮细胞 RhoA、ROCK2、p-Ezr mRNA 的表达比较 扩增曲线和溶解曲线提示产物纯度高;LPS 组与对照组比较,RhoA、ROCK2 和 p-Ezr mRNA 表达均显著升高($P < 0.01$),与 LPS 组比较,TMP 各组 RhoA mRNA 表达差异均无统计学意义($P > 0.05$),而 ROCK2 和 p-Ezr mRNA 表达均呈明显的剂量依赖性下降($P < 0.01$);TMP II 组和 TMP III 组 ROCK2 和 p-Ezr mRNA 的表达均低于 TMP I 组($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(见图2、表1)。

2.3 内皮细胞 RhoA、ROCK2、p-MLC、p-ERM 蛋白表达比较 与对照组比较,LPS 组 RhoA、ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 蛋白表达均显著上调($P < 0.01$);

础。革兰阴性细菌细胞壁成分 LPS 可能通过影响内皮屏障的功能参与了脓毒血症的早期发病环节^[6]。当内皮细胞骨架受到血管紧张素 II 和白细胞介素-1 等^[7]的作用,细胞内纤维状网架结构产生变化,进而引起内皮细胞收缩,内皮屏障功能受损^[8]。Rho/ROCK 信号通路在调节肌动蛋白骨架的聚合状态方面扮演重要角色。有研究^[9]表明,抑制 Rho/ROCK 信号通路能取得较显著的内皮保护作用。激活状态的 Rho 蛋白与细胞膜相结合,进一步激活 ROCK2,活化的 ROCK2 能使肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase,MLCP)失活,也可直接作用于 MLC 和 ERM 家族,使二者磷酸化水平增高。p-MLC 的高表达能诱使肌动-肌球蛋白交联增加,从而导致了肌动蛋白微丝骨架的聚合^[10];而 p-ERM 能进一步诱导细胞周边应力纤维的形成,二者共同作用最终导致内皮通透性增加。本实验将 LPS 作为诱导剂,检测到 LPS 组与对照组比较,RhoA、ROCK2 和 p-Ezr mRNA 的表达和 RhoA、ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 蛋白表达均显著升高($P < 0.01$),说明 Rho/ROCK 通路可能参与了 LPS 诱导内皮细胞损伤过程,LPS 作用于 Rho/ROCK 信号通路且上调了 RhoA、ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 的

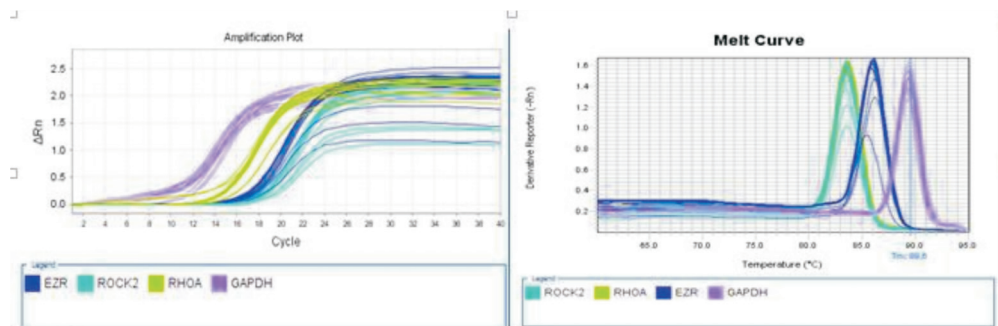


图2 内皮细胞GAPDH及RhoA、ROCK2、p-Ezr基因Real-Time PCR扩增曲线和溶解曲线

表2 各组 RhoA、ROCK2、p-ERM、p-MLC 蛋白相对表达量比较 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	RhoA 蛋白 相对表达量	ROCK2 蛋白 相对表达量	p-ERM 蛋白 相对表达量	p-MLC 蛋白 相对表达量
对照组	0.210 ± 0.029	0.187 ± 0.026	0.915 ± 0.020	0.785 ± 0.084
LPS 组	0.517 ± 0.046 ^{##}	0.665 ± 0.081 ^{##}	0.563 ± 0.049 ^{##}	2.227 ± 0.187 ^{##}
TMP I 组	0.531 ± 0.068 ^{##}	0.513 ± 0.073 ^{***}	0.404 ± 0.035 ^{**}	1.675 ± 0.100 ^{##}
TMP II 组	0.539 ± 0.068 ^{##}	0.388 ± 0.029 ^{**}	0.226 ± 0.038 ^{**}	1.188 ± 0.154 ^{**}
TMP III 组	0.468 ± 0.077 ^{##}	0.293 ± 0.177 ^{**}	0.163 ± 0.024 ^{**}	1.465 ± 0.507 ^{**}
<i>F</i>	31.78	23.39	451.00	26.23
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	0.004	0.009	0.001	0.067

q 检验:与对照组比较^{##} $P < 0.01$;与LPS组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与TMP I组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与TMP II组比较⁺ $P < 0.01$

表达,造模成功。

TMP 是从伞形科植物川芎中提取的一种酰胺类生物碱,化学结构为 2,3,5,6-四甲基吡嗪。有研究^[11]提示 TMP 具有抑制机体过度炎症反应,改善微循环和抗凝血等作用。TMP 在抗动脉粥样硬化中能保护受损的内皮细胞^[12]。近年有报道^[13] TMP 对 LPS 诱导的内皮细胞损伤也有保护作用,但对于内皮细胞上其他受体及信号转导系统的研究均较少涉及。本实验建立 LPS 诱导的 HUVEC 损伤模型,从 Rho/ROCK 通路入手,探讨 TMP 对内皮细胞的保护作用。TMP 组和 LPS 组相比,RhoA 蛋白表达与 mRNA 表达差异均无统计学意义,可能是由于 RhoA 处于信号通路的上游,其表达较少受作用于下游的药物影响,而 TMP 组整体升高的趋势可能只是单一受 LPS 的影响所致;ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 蛋白及 ROCK2 和 p-Ezr mRNA 表达均明显降低($P < 0.01$),提示 TMP 保护内皮细胞的分子机制可能与抑制 ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 的表达有关,且 TMP 能剂量依赖性地减弱由 LPS 诱导的 ROCK2、p-MLC 和 p-ERM 激活。

综上所述,Rho/ROCK 通路可能参与了 LPS 引起的内皮细胞损伤的病理过程,TMP 可能通过降低

Rho/ROCK 通路信号分子的表达,对受损的内皮细胞起到保护作用。TMP 的保护作用可为临床实验提供基础,但其在 LPS 诱导的内皮细胞损伤和细胞骨架蛋白重构中其他信号通路的作用尚不完全清楚,仍需要进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] ETIENNE-MANNE VILLE S, HALL A. RhoGTPases in cell biology [J]. Nature, 2002, 420 (6 916): 629.
- [2] TAKAI Y, SASAKI T, MATOZAKI T. Small GTP-binding proteins [J]. Physiol Rev, 2001, 81 (1): 153.
- [3] XU H, SHI DZ, GUAN CY, *et al.* Clinical application and pharmacologic action of tetramethylpyrazine [J]. Chin J Integr Med, 2003, 23 (5): 376.
- [4] ZHAO L, WEI MJ, HE M, *et al.* The effects of tetramethylpyrazine on learning and memory abilities of mice with Alzheimer disease and its possible mechanism [J]. Chin Pharmacol Bull, 2008, 24 (8): 1088.
- [5] 姚义安, 张抒扬. 内皮细胞与动脉粥样硬化 [J]. 中华内科杂志, 2008, 47 (1): 63.
- [6] SUZUKI K, NEMOTO K, NINOMIYA N, *et al.* Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates lipopolysaccharide-induced vascular hyperpermeability and colonic muscle relaxation in guinea pigs [J]. J Surg Res, 2012, 178 (1): 352.
- [7] WETTSCHURECK N, OFFERMANN S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology [J]. J Mol Med, 2002, 80 (10): 629.
- [8] 王高频, 杨雪佳, 王继红, 等. 盐酸法舒地尔对血管紧张素 II 诱导的人脐静脉内皮细胞骨架损伤的保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (10): 795.
- [9] 国伟, 孟建中, 陈宇. Rho/Rho 激酶信号通路及血管内皮通透性的研究 [J]. 生物医学工程研究, 2009, 28 (2): 154.
- [10] LOIRAND G, GURIN P, PACAUD P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology [J]. Circ Res, 2006, 98: 322.
- [11] 郑红, 徐庆连, 韩之勋, 等. 中药川芎嗪对烫伤豚鼠肾脏保护作用的实验研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2005, 40 (1): 13.
- [12] CUI L, WANG SX, LIU XY. The effective mechanism of tetramethylpyrazine in anti-atherosclerosis [J]. Med Recap, 2008, 14 (22): 3491.
- [13] 李文明, 刘洪涛, 李秀英, 等. 川芎嗪对脂多糖诱导的血管内皮细胞损伤的影响 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25 (11): 1516.