

凝血酶对脑微血管内皮细胞的损害及水蛭素的保护作用

樊红¹ 冯新民² 田元³

[摘要] **目的:**探讨凝血酶对大鼠脑微血管内皮细胞(BMVEC)的损伤以及凝血酶抑制剂水蛭素的保护作用。**方法:**分离新生大鼠脑微血管内皮细胞并进行培养,取第二或第三代内皮细胞进行实验。实验分成3组:对照组、凝血酶组和水蛭素组。通过透射电镜和流式细胞术检测3组细胞凋亡的情况。利用TRITC-鬼笔环肽对细胞进行染色观察3组细胞骨架的形态变化。**结果:**凝血酶可以增加血管内皮细胞凋亡并导致细胞骨架重排、紊乱,而水蛭素可以减轻凝血酶的这种作用。**结论:**凝血酶可以损害血管内皮细胞骨架,引起细胞收缩、变形,同时增加内皮细胞凋亡,破坏血脑屏障。水蛭素可以减轻这种改变。

[关键词] 内皮;凝血酶;水蛭素;凋亡;细胞骨架

[中图分类号] R329 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1009-5918(2009)06-348-04

The protective effect of hirudin on the brain microvascular endothelial cell injury induced by thrombin

FAN Hong¹ FENG Xinmin² TIAN Yuan³

(¹Department of Emergency, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; ²Department of Chinese Medical, ³Department of Surgery)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of thrombin on brain microvascular endothelial cells (BMVEC) and the protective effect of hirudin. **Method:** brain microvascular endothelial cell were isolated from neonatal SD rat cerebral cortex and cultured. BMVEC was incubated with thrombin or hirudin+thrombin for 48h. F-actin was examined with fluorescence staining of Tritic-phalloidine. The apoptosis was determined by flow cytometric analysis and transmission electron microscope. **Result:** thrombin promotes F-actin remodeling and the apoptosis of BMVEC. Hirudin partially reverses this process. **Conclusion:** Thrombin causes cytoskeleton remodeling which may lead to retraction of endothelial cells and change endothelial cell morphology and promotes BMVEC apoptosis. both effects increases endothelial cell permeability and disrupt the blood brain barrier. Hirudin can partially inhibit this effect.

Key words brain microvascular endothelial cell; thrombin; hirudin; apoptosis; cytoskeleton

脑出血后血肿周围出现严重的脑水肿。脑水肿的形成除了与血肿的占位效应有关外,出血后局部大量生成的凝血酶也是导致脑水肿的重要因素。凝血酶可以直接损害脑组织细胞导致细胞毒性脑水肿,还能损害脑微血管内皮细胞,破坏血脑屏障,增加血脑屏障的通透性引起血管源性脑水肿,而凝血酶抑制剂水蛭素可以抑制凝血酶的作用。本实验观察凝血酶对体外培养脑微血管内皮细胞的损害及水蛭素的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂、仪器与动物

1640 培养基、新生胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、凝血酶(sigma 公司)、水蛭素(sigma 公司)、

TRITC-鬼笔环肽(sigma 公司)、Ⅷ因子相关抗原抗体、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(晶美生物工程有限公司)、倒置相差显微镜(Olympus)、倒置荧光显微镜(Olympus)。SD 乳鼠购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 微血管内皮细胞培养 取3~5 d 龄的SD 乳鼠6只,无菌条件下取出大脑,立即放入盛有冰冷D-Hank's 液的平皿中。去除大血管、软脑膜、脑干和小脑。将收集到的的脑组织转入盛有D-Hank's 液的无菌小瓶中剪碎,将脑组织置于玻璃匀浆器内上下碾磨十余次后,匀浆液依次通过孔径为100目、200目的筛网,收集网上的微血管段。用少量D-Hank's 液冲洗匀浆器,匀浆液再次通过筛网以增加血管段数。1 000 r/min 离心5 min,弃上清液。加入D-Hank's 液洗涤,离心去上清液,将含有血管段的沉淀物接种于培养瓶中,置于37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。微血管段贴壁

¹ 华中科技大学同济医学院附属协和医院急诊科(武汉, 430022)

² 华中科技大学同济医学院附属协和医院中医科

³ 华中科技大学同济医学院附属协和医院外科

通信作者:樊红(Email:xhfh@163.com)

后 24 h 后换液,之后每 3 d 换液 1 次直至细胞长满瓶底后传代。用 0.25% 胰蛋白酶消化 10 min, 加培养液终止消化,离心去上清液,收集细胞接种于含有玻璃爬片的培养瓶内。采用免疫组化法检测 VIII 因子相关抗原进行细胞鉴定。取第三代细胞接种于 24 孔培养板内(检测细胞骨架的培养板内预先放置玻璃爬片),细胞生长 80% 融合后进行试验。

1.2.2 实验分组 分为对照组、凝血酶组、水蛭素组。对照组加入含胎牛血清 1640 培养液进行培养。凝血酶组加入 30×10^3 U/L 的凝血酶。水蛭素组先加入水蛭素 30×10^3 U/K 孵育 0.5 h 后再加入凝血酶 30×10^3 U/L。3 组孵育 48 h 后检测。

1.2.3 透射电镜检测 将 0.25% 胰蛋白酶加入培养孔内消化 10 min, 加入培养液终止消化, $1\,000 \times 10$ min 离心, 去上清液。加入少量 PBS 液, 吹打, 转入 EP 管内, $1\,000 \times 10$ min 再次离心, 去上清液, 加入少量 2.5% 戊二醛-多聚甲醛固定, 送华中科技大学同济医学院超微病理室。经脱水、固定、包埋后, 常规超薄切片, 透镜下观察。

1.2.4 细胞骨架微丝肌动蛋白(F-actin)检测 取出细胞爬片, 置于 4% 的多聚甲醛中固定 30 min, PBS 冲洗 30 min $\times 2$ 次, 然后放入用 0.1% Triton X-100 中 10 min, 再次用 PBS 冲洗 30 min $\times 2$ 次, 加入 TRITC-鬼笔环肽避光孵育 40 min, 用 PBS 冲洗 2 次, 90% 甘油封片, 荧光显微镜下观察并照相。

1.2.5 细胞凋亡检测 使用 Annexin V 及 PI 双标流式细胞术检测细胞凋亡。按 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书, 收集 10^6 /L 的细胞于结合缓冲液内, 行 Annexin V 和 PI 染色, 流式细胞术检测细胞凋亡的百分数。

1.3 统计学处理

应用 SPSS11.0 统计学软件包分析处理。实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据比较采用方差分析。

2 结果

2.1 微血管内皮细胞的形态和鉴定

倒置显微镜下观察获得的微血管段管壁较光滑, 长短不等, 形态各异, 成单支或多分支状(图 1A)。大部分微血管段在培养 24 h 后贴壁。7~10 d 后有大量的细胞从微血管段中长出。倒置显微镜下细胞成“铺路石”样外观(图 1B)。VIII 因子相关抗原免疫组化鉴定, 细胞的胞浆及核膜周围呈棕褐色, 证明为内皮细胞(图 1C)。

2.2 F-actin 的形态学变化

F-actin 经染色后呈红色荧光物质, 正常对照组膜荧光较强, 胞浆内可见少量肌动蛋白纤维, 方向不规则且长短不一, 部分细小呈网状分布(图 2A)。凝血酶组胞浆内 F-actin 明显增加, 增粗且排列紊乱(图 2B)。水蛭素组胞膜荧光较强, 胞浆

内也可见少量肌动蛋白纤维, 部分呈网状分布(图 2C)。

2.3 细胞凋亡

正常对照组细胞凋亡率为 $(4.54 \pm 1.32)\%$ 。凝血酶组细胞凋亡率为 $(27.65 \pm 2.36)\%$, 明显高于正常对照组和水蛭素组 ($P < 0.01$)。水蛭素组细胞凋亡率为 $(17.08 \pm 2.67)\%$, 高于正常对照组 ($P < 0.01$), 但低于凝血酶组 ($P < 0.01$)。

2.4 电镜下细胞形态改变

正常对照组电镜下细胞膜、细胞核完整, 细胞器发育良好, 细胞核内染色质完整(图 3A)。凝血酶刺激 48 h 后电镜下可见细胞浆内空泡变性, 粗面内质网、线粒体肿胀明显。细胞核膜虽然完整, 但染色质不均匀, 染色质部分边集(图 3B)。水蛭素组电镜下也可见细胞胞浆内空泡变性, 粗面内质网、线粒体肿胀, 但细胞核膜完整、核内染色质均匀, 未发现细胞坏死的征象。

3 讨论

脑出血后血液在凝固的过程中释放大量的凝血酶, 凝血酶可以破坏血脑屏障, 增加血脑屏障的通透性, 导致血管源性脑水肿^[1]。凝血酶增加血脑屏障通透性的原因之一是促使微血管内皮细胞发生变形、收缩, 因而破坏细胞间连接, 细胞间隙增大。Nagy 等^[2]将人脑毛细血管内皮细胞进行体外培养, 在培养液中加入凝血酶后观察到内皮细胞发生收缩, 体积变小, 收缩的程度呈剂量和时间依赖性, 去除凝血酶后 30 min 细胞形态恢复正常。细胞-细胞间、细胞-基质间正常连接以及细胞形态由细胞骨架调节。细胞骨架是真核细胞中的蛋白纤维网络结构, 主要由微丝、微管和中间纤维组成。细胞骨架的破坏或重排会损害血管内皮细胞间的紧密连接, 引起细胞收缩、变形, 细胞间隙增大, 血管通透性增加^[3]。微丝确定细胞表面特征, 使细胞能够运动和收缩, 而肌动蛋白(F-actin)是构成微丝的主要成分。我们的研究发现凝血酶可以引起血管内皮细胞骨架 F-actin 排列紊乱, 重新分布, 而水蛭素可以减轻凝血酶对细胞骨架的破坏。

凝血酶引起细胞骨架重排或破坏主要通过激动血管内皮细胞上的凝血酶受体-1(PAR-1), 促进细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 在 Ca^{2+} /钙调蛋白的参与下肌球蛋白轻链激酶被激活, 肌球蛋白轻链磷酸化, 从而导致细胞骨架收缩和重排^[4-6]。新近发现凝血酶还可以激活微血管内皮细胞上的 PAR-1, 通过 Rho/Rho 激酶途径, 抑制肌球蛋白轻链磷酸酶的活性, 使肌球蛋白轻链持续磷酸化, 引起微丝收缩, 此途径为非钙依赖性的^[7-8]。

凝血酶导致血管通透性增加的另一原因是直接损伤血管内皮细胞。近年来发现血管内皮细胞凋亡可以损害血管内皮的完整性, 增加血管的通透

性^[8-9]。我们的研究发现凝血酶明显增加脑微血管内皮细胞的凋亡,而水蛭素能减轻凝血酶的作用。

凝血酶对细胞的影响非常复杂,依其剂量以及作用的细胞种类不同,凝血酶既可以引起细胞的凋亡,又可以促进细胞增值^[10]。目前的研究表明凝血酶导致细胞凋亡仍然是通过凝血酶受体介导的,促进 caspase-3、caspase-9 过度表达,引起细胞凋亡的发生^[11-12],但凝血酶导致细胞凋亡的具体的细胞内信号通路还有待进一步研究。

总之,凝血酶可以通过影响微血管内皮细胞细胞骨架的分布,改变细胞形态;增加内皮细胞凋亡,损害血管壁的完整性,破坏血脑屏障,增加血脑屏障的通透性,导致脑水肿。凝血酶破坏细胞骨架,增加细胞凋亡都是通过 PAR-1 介导的。凝血酶特异性拮抗剂水蛭素可以减轻凝血酶的破坏作用。PAR-1 被激动后通过多种途径使肌球蛋白轻链磷酸化,导致细胞骨架重排;但其诱导内皮细胞凋亡的具体信号通路和作用环节还有待进一步研究。

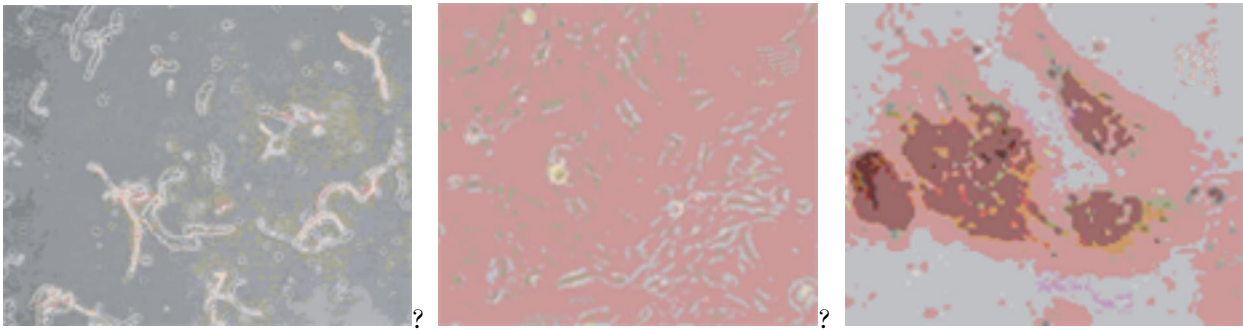


图 1 细胞培养及鉴定

? 分离微血管段;? 正常细胞呈梭形、三角形、多边形;? 免疫组化染色胞浆呈棕黄色

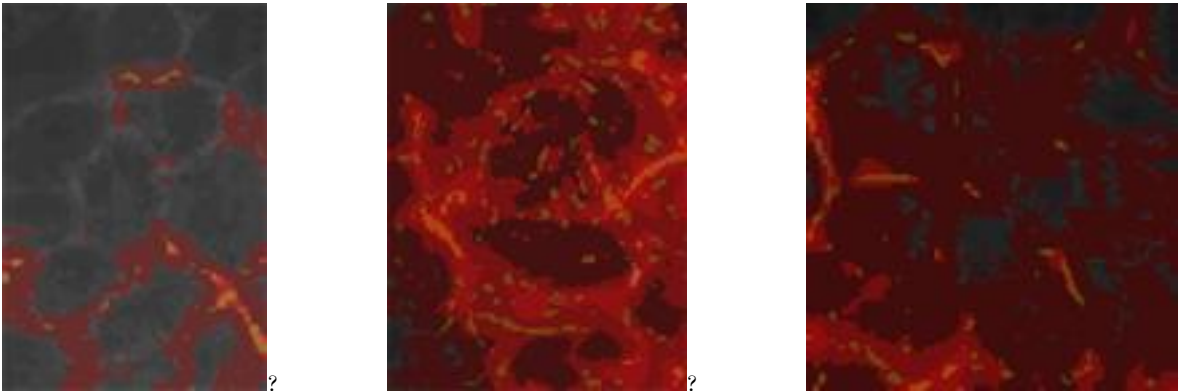


图 2 凝血酶及水蛭素组 F-actin 的形态学改变

? A:对照组;? 凝血酶组;? 水蛭素组

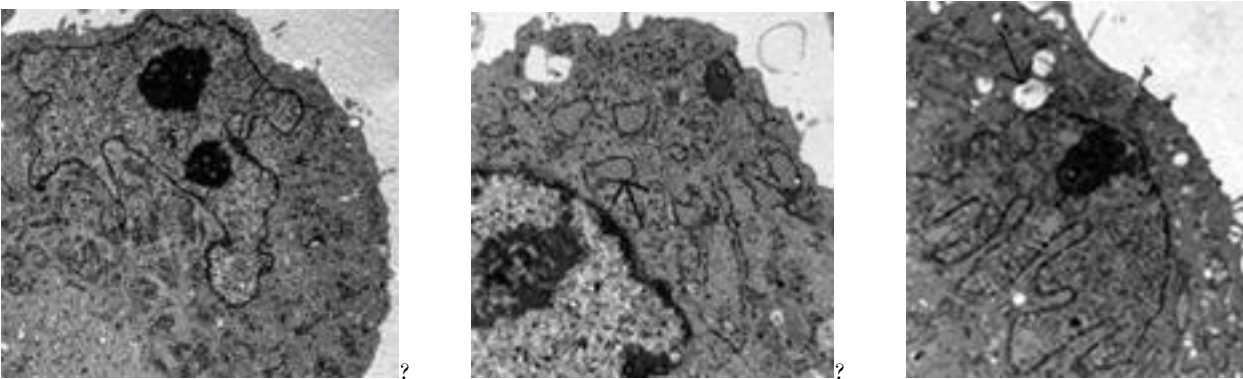


图 3 凝血酶及水蛭素干预后电镜观察结果

? 正常对照组:细胞膜、细胞核完整,细胞器发育良好,细胞核内染色质均匀完整;? 凝血酶组:细胞浆内空泡变性,粗面内质网、线粒体肿胀明显,细胞核膜虽然完整,但染色质不均匀,部分边集;? 水蛭素组:细胞浆内可见较多空泡变性,部分粗面内质网、线粒体肿胀,细胞核完整,核内染色质均匀。

参考文献

[1] GUAN J X, SUN S G, CAO X B, et al. Effect of thrombin on blood brain barrier permeability and its mechanism[J]. Chin Med J(Engl), 2004, 117: 1677—1681.

[2] NAGY Z, KOLEV K, CSONKA E, et al. Contraction of human brain endothelial cells induced by thrombotic and fibrinolytic factors[J]. Stroke, 1995, 26: 265—270.

[3] LAI C H, KUO K H, LEO J M. Critical role of actin in modulating BBB permeability[J]. Brain Res Brain Res Rev, 2005, 50: 7—13.

[4] MURPHY J T, DUFFY S L, HYBKI D L. Thrombin-mediated permeability of human microvascular pulmonary endothelial cells is calcium dependent[J]. J Trauma, 2001, 50: 213—222.

[5] Tiruppathi C, Minshall R D, Paria B C, et al. Role of Ca^{2+} signaling in the regulation of endothelial permeability[J]. Vascu Pharmacol, 2002, 39: 173—185.

[6] Thrombin-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II in cultured bovine corneal endothelial cells[J]. Exp Eye Res, 2004, 79: 477—486.

[7] BIRUKOVA A A, SMUROVA K, BIRUKOV K G, et al. Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction[J]. Microvasc Res, 2004, 67: 64—77.

[8] VAN NIEUW AMERONGEN G P, MUSTERS R J, ERINGA E C, et al. Thrombin-induced endothelial barrier disruption in intact microvessels: role of RhoA/Rho kinase-myosin phosphatase axis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294: C1234—C1241.

[9] 刘学民, 刘青光, 潘承恩, 等. 血管内皮凋亡对大鼠重症急性胰腺炎肺损伤的影响[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(18): 1667—1679.

[10] YU QING L I, PAUL CHEN, ADRIANA HAIMOV-ITZ-Friedman, et al. Endothelial Apoptosis Initiates Acute Blood-Brain Barrier Disruption after Ionizing Radiation[J]. Cancer Research, 2003, 15: 5950—5956.

[11] FLYNN A N, BURET A G. Proteinase-activated receptor 1 (PAR-1) and cell apoptosis[J]. Apoptosis, 2004, 9: 729—737.

[12] CHIN A C, VERGNOLLE N, MACNAUGHTON WK, et al. Proteinase-activated receptor 1 activation induces epithelial apoptosis and increases intestinal permeability[J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100: 11104—11109.

[13] SUZUKI T, MORAES T J, VACHON E, et al. Proteinase-Activated Receptor-1 Mediates Elastase-Induced Apoptosis of Human Lung Epithelial Cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33: 231—247.

(收稿日期: 2009-04-30)

《急危重症疾病诊断流程与治疗策略》书讯

科学出版社最新推出《今日临床丛书》之《急危重症疾病诊断流程与治疗策略》,《今日临床丛书》学术委员会由陈灏珠、陈洪铎、陈香美、樊代明、高润霖等院士和众多教授组成。该书在编写上突破传统著作写作模式,注重实用性,密切关注当今医学动态;遵循循证医学程序,强调临床思维能力培养;帮助医师解决临床上可能遇到的实际问题。提出有关疾病诊断和治疗的具体可行的方案。对疾病的诊断和治疗尽量列出流程图,使读者一目了然;能帮助中青年临床医师迅速走上成熟和成功之路。

定价 128.00 元。

邮购联系人: 温晓萍

电话: 010—64034601 传真: 010—64019761

E-mail: wenxiaoping@mail.sciencep.com

地址: 100717 北京市东黄城根北街 16 号 科学出版社温晓萍(请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)