

· 论著摘要 ·

凝血酶致脑微血管内皮细胞凋亡作用

高春林 范生尧 贾俊亚 王枫涛 熊喻

脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cell, BMVEC)在脑疾病发生、发展中占重要地位^[1]。近年来, BMVEC的体外培养方法已获成功^[2]。凝血酶是一种血清丝氨酸蛋白酶,除参与凝血外,它还促进 BMVEC 收缩并增加其通透性^[3],并与肺动脉内皮细胞及神经元凋亡相关^[4-6]。本实验用体外原代培养的大鼠 BMVEC 研究凝血酶的作用,并用其受体拮抗剂水蛭素探讨致病机制。

1 材料和方法

1.1 试剂 M199 培养基(Gibco 公司产品),胰蛋白酶(进口分装)、凝血酶、兔抗大鼠因子Ⅷ相关抗原多克隆抗体、水蛭素购自美国 Sigma 公司。IV 型胶原酶、TUNEL 试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 方法 (1)细胞培养:取 3~5 d 龄 SD 乳鼠,按照文献提供的方法培养^[2]。传代培养第 7 天相差显微镜下观察其形态学特点,因子Ⅷ相关抗原免疫细胞化学方法鉴定内皮细胞。实验取第 3 代细胞。(2)实验分组:对照组为含 10% 胎牛血清的 M199 培养基。凝血酶组设 3 个浓度,分别为 50, 150, 300 U/ml。凝血酶 + 水蛭素组先加入含水蛭素的 M199 培养基(水蛭素终浓度为 100 μmol/L),孵育 30 min 后再加入凝血酶,使凝血酶终浓度为 300 U/ml。孵育 18 h 后检测。(3)TUNEL 检测凋亡:取细胞爬片常规固定后,按 TUNEL 试剂盒说明书操作。在显微镜下观察,阳性细胞核呈棕褐色染色。每组 5 片,每片随机取 3 个不同高倍镜视野计数 100 个细胞中的阳性细胞并计算其百分率。(4)核 DNA 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。(5)透射电子显微镜检查:300 U/ml 凝血酶组细胞经常规固定、脱水、渗透、包埋、超薄切片、铀铅染色后,透射电镜观察。

1.3 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计学软件包分析处理。

2 结果

2.1 脑微血管内皮细胞的鉴定 脑微血管段为单层贴壁生长,7~10 d 后有细胞长出。镜下呈多角型“铺路石”样外观。Ⅷ 因子相关抗原染色胞浆呈黄褐色,胞核呈蓝色。

2.2 TUNEL 检测结果 对照组与低剂量 50 U/ml 组 HMVEC

凋亡率分别为 $(3.79 \pm 0.51)\%$ 与 $(6.32 \pm 1.26)\%$, 差别无显著性 ($P > 0.05$)。150 U/ml 和 300 U/ml 组凋亡率明显增多,分别为 $(14.01 \pm 1.94)\%$ 、 $(22.04 \pm 3.25)\%$, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。凝血酶 + 水蛭素组凋亡率为 $(6.41 \pm 1.04)\%$, 与对照组相比,差别无显著性 ($P > 0.05$)。

2.3 核 DNA 凝胶电泳 150 U/ml 和 300 U/ml 凝血酶组细胞核 DNA 裂解为 170~200 bp 及其整倍数的寡核苷酸片段,形成梯状条带。

2.4 细胞形态学变化 300 U/ml 凝血酶刺激 18 h 后,胞浆收缩,染色质在核周边凝集,可见核碎裂、空泡和凋亡小体形成。

3 讨论

内皮细胞具有维持管壁通透性、防止凝血和血栓形成等重要生理功能,其凋亡是内皮功能障碍的重要因素。凝血酶能使 BMVEC 中 actin 等细胞骨架重排,细胞收缩,间隙增宽,通透性增加,促进脑水肿形成。这些作用主要由蛋白酶活化受体(protease activated receptor, PAR)介导^[3]。Frances 等^[4]报道凝血酶可作用于 PAR 后进一步激活酪氨酸激酶和 RhoA 通路,诱导神经元和神经胶质细胞凋亡,这种作用可被水蛭素阻断。大剂量凝血酶与内皮细胞凋亡的相关性在其他组织中已有报道^[5,6],但在脑微血管内皮细胞中目前尚未见报道。本研究应用体外培养的 BMVEC,观察到凝血酶能诱导 BMVEC 凋亡,且存在一定的剂量依赖关系。提示凝血酶还可能通过诱导 BMVEC 凋亡而参与脑水肿的发生、发展。本研究还证实,使用凝血酶特异性受体 PAR 阻断剂水蛭素后, BMVEC 凋亡受到明显抑制,说明凝血酶的促凋亡作用依赖于 PAR 受体的激活。但是,其具体信号转导机制尚需进一步研究。

参考文献

- 1 Joo F. The blood-brain barrier *in vitro*: the second decade. *Neurochem Int*, 1993, 23:499-521.
- 2 Joo K. The cerebral microvessels in culture, an update. *J Neurochem*, 1992, 58:1-17.
- 3 Garcia JG, Verin AD, Schaphorst KL. Regulation of thrombin-mediated endothelial cell contraction and permeability. *Semin Thromb Hemost*, 1996, 22:309-315.
- 4 Frances M, Christian J. Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci*, 1997, 17:5316-5326.
- 5 Debra W, Taylor A, Michael W. Effects of monocrotaline pyrole and thrombin on pulmonary endothelial cell junction and matrix adhesion proteins. *Toxicology*, 2003, 184:240.
- 6 Laurence J. Endothelial cell activation and apoptosis in the thrombotic microangiopathies. *Bri J Haematol*, 2004, 125:415-421.

收稿日期:2004-12-20

基金项目:泸州医学院附属医院科研基金资助项目(项目编号:院发 2004-46-0418)

作者单位:646000 泸州,泸州医学院附属医院(高春林、范生尧、王枫涛、熊喻);430060 武汉市,武汉大学人民医院(贾俊亚)

作者简介:高春林,女,1975年3月生,山西省汾阳市人,在读硕士研究生,主治医师。E-mail: youshalei@yahoo.com.cn