

水蛭提取液对培养的大鼠脑皮质微血管内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活剂抑制物 1 的影响

吴文斌¹, 胡长林², 董凌琳¹, 余能伟¹, 孙红斌¹, 郭富强¹

1. 四川省人民医院神经内科, 四川省成都市 610072

2. 重庆医科大学第二临床学院神经内科, 重庆市 400010

摘 要:目的 探讨水蛭提取液(HEL)对培养的大鼠脑皮质微血管内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物(tPA)、纤溶酶原激活剂抑制物 1(PAI-1)的影响。方法 建立大鼠大脑皮质微血管内皮细胞培养实验模型。MTT 法筛选 HEL 的有效浓度。检测培养上清液的 tPA、PAI-1 含量与活性变化, RT-PCR 检测经 HEL 治疗组与生理盐水对照组处理后的微血管内皮细胞 tPA 与 PAI-1 的表达, 免疫组化检测两组微血管内皮细胞 tPA 的表达。结果 HEL 在一定浓度范围内(0.25 ~ 1 mg/ μ l)可促进微血管内皮细胞的生长, 有剂量依赖关系($P < 0.05$)。HEL 治疗组较生理盐水对照组能促进培养的大鼠脑皮质微血管内皮细胞分泌 tPA, 同时提高其活性, 促进 tPA mRNA 的表达及 tPA 免疫活性表达, 且呈剂量依赖性表达增强($P < 0.01$)。结论 HEL 在体外能激活内源性纤溶系统。

关键词:水蛭提取液; 组织型纤溶酶原激活物; 纤溶酶原激活剂抑制物 1; 脑皮质微血管内皮细胞

Effects of hirudo extract liquor on tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells from rat cerebral cortex

WU Wen-Bin, HU Chang-Lin, DONG Ling-Lin, YU Nen-Wei, SUN Hong-Bing, GUO Fu-Qian. Department of Neurology, Sichuan Province Peoples' Hospital, Chengdu 610072, China

Abstract: Objective To study the effect of hirudo extract liquor (HEL) on activities of tissue-type plasminogen activator (tPA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and levels of tPA and PAI-1 in microvascular endothelial cells of the rat cerebral cortex.

Methods The experimental model of brain microvascular endothelial cells (BMEC) of Wistar rat cerebral cortex was prepared *in vitro*. Cell morphology was observed under the inverted phase contrast microscope and cell activity was measured with MTT assay after BMEC exposure to the concentrations of HEL ranging from 0.0625 to 8 mg/ μ l. The biochemical index, including activities and levels of tPA and PAI-1 in cultured supernatants, as well as variation of semi-quantification of tPA, PAI-1 mRNA levels were measured in BMEC by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the HEL treatment group and the control group normal saline treatment. The activities of tPA and PAI were measured by colorimetric assay. The contents of tPA and PAI-1 were determined using specific ELISA. The expression of tPA protein in BMEC was measured by immunohistochemistry. **Results** HEL of the concentrations ranging from 0.25 to 1 mg/ μ l promoted BMEC proliferation in a dose-dependent manner. Compared with the control group, HEL treatment increased the content, and activity of tPA in cultured supernatants and tPA mRNA expression in BMEC, and also increased the expression of tPA protein immunoreactivity. **Conclusions** HEL could activate local endogenous fibrinolytic system *in vitro*.

Key words: Hirudo extract liquor; tissue-type plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor-1; brain microvascular endothelial cells

在已有的体内动物实验中发现水蛭提取液 (hirudo extract liquor, HEL) 有激活内源性纤溶物组织型纤溶酶原激活物 (tissue-type plasminogen activator, tPA) 的作用, 而 tPA 主要由内皮细胞合成与分

泌。在体外是否也有此作用目前尚未见报道。为进一步探索 HEL 促进脑内血肿吸收的作用机制,我们选用大鼠脑皮质微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMEC) 培养为实验模型,从体外直接观察 HEL 能否激活内源性纤溶系统。

1 材料与方法

1.1 材料

anti-tpa (N-14) pAb (sc-5241) (购自 Santa Cruz Biotechnology, Inc); 山羊 SP Kit (SP-9003)、DAB 显色试剂盒 (购自北京中山生物技术有限公司); tPA 活性测定试剂盒 (A110)、tPA 含量测定试剂盒 (A111)、纤溶酶原激活剂抑制物 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 活性测定试剂盒 (A120)、PAI-1 含量测定试剂盒 (A121) (购自太阳生物技术公司); PAI-1、tPA、 β -action 引物 (由上海生工生物技术公司合成并纯化); 异硫氰酸胍、寡脱氧胸苷酸 Oligo (dT)₁₆、逆转录酶 AMV-RT、三磷酸核苷酸 (dNTP)、Taq DNA 聚合酶、总 RNA 提取试剂盒 (购自 Promega); PBR322/Msp I DNA Markers (MG3071) (SABC)、核糖核酸酶抑制剂 (RNasin) (购自华美生物公司); HEL (由重庆中药研究院提供); 胎牛血清、M199 (购自 Hyclone Laboratories, Inc.)。

倒置显微镜 (Olympus)、二氧化碳培养箱 (M2300) (美国 Sheldon)、核酸定量仪 (Gene Quant RNA/DNA calculator) (Pharmacia Biotech, England)、PCR 扩增系统 (Gene/PCR System 2400) (Perrin Elmer, USA)、酶标仪 (美国 Bio-Rad 2550 型)。

1.2 方法

大鼠脑皮质 BMEC 培养模型的建立: 取 10~12 只 1~5 d 的 Wistar 大鼠 (重庆医科大学提供), 雌雄兼用, 于超净工作台上操作者左手拇食二指持乳鼠颈部稍下处, 常规消毒头皮后, 右手持眼科剪沿正中中线剪开头皮与颅骨, 用眼科弯镊取出鼠脑, 然后按吴文斌等^[1]建立的大鼠脑皮质微血管内皮细胞培养的方法收集大鼠皮质, 获取血管段, 进行大鼠脑皮质微血管内皮细胞的原代、传代培养和鉴定。

1.3 干预药物浓度的确定、时间点的选择与观察指标

1.3.1 HEL 对大鼠脑皮质 BMEC 生长的影响及干预药物浓度范围的初步确定 将 HEL 冻干粉在临用前用生理盐水配成以下 8 种工作浓度: 8 mg/ μ l、4 mg/ μ l、2 mg/ μ l、1 mg/ μ l、0.5 mg/ μ l、0.25 mg/ μ l、0.125 mg/ μ l、0.0625 mg/ μ l, 抽滤灭菌备用。

按吴文斌等^[1]用 MTT 法测内皮细胞生长率的方法, 逐一加上上述不同浓度的 HEL 干预后, 显微镜下观察 BMEC 生长情况, 作好记录, 必要时照相, 同时参照内皮细胞生长规律, 于细胞刚达生长高峰时间 7 d 时 (其间换液 1 次, 换液时补足丢失的 HEL 量), 测定 OD₅₇₀ 值, 即可筛选出 HEL 促进内皮细胞生长的有效范围为 0.25~4 mg/ μ l。

1.3.2 时间点、观察指标的选择与取材 大鼠脑皮质 BMEC 按同源、相同数量分组, 传代培养至第 3 代, 按接种密度为 3×10^4 /ml 接种于 35 ml 塑料培养瓶中, 或接种于 24 孔培养板中 (若留作免疫组化用者, 需先将消毒好的盖玻片置于 24 孔培养板孔内并加少量多聚赖氨酸, 置于超净台上吹干备用), 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱孵育, 干预后取标本作相应的检测。①不同浓度组: 上述细胞生长至第 6 d 基本融合时, 用 PBS 洗 2 次, 换成 M199, 再加入含不同浓度 (4 mg/ μ l、2 mg/ μ l、1 mg/ μ l、0.5 mg/ μ l、0.25 mg/ μ l) 的 HEL (按每 200 μ l 培养液加 20 μ l), 对照组加相同体积的生理盐水, 孵育 24 h。②不同时间组: 细胞生长至第 6 d 基本融合时, 用 PBS 洗 2 次, 换成 M199, 再用 1 mg/ μ l 的 HEL 分别与 BMEC 孵育 8 h、16 h、24 h、32 h、48 h, 并同时在每个时间点设立对照组 (加相同体积的生理盐水)。以上每一浓度组或时间点重复 3 次, 每次重复 3 孔 (瓶), 每瓶加培养液 8 ml, 每孔加培养液 1 ml, 在试验终点分别收集培养上清液 200 μ l 分装, -70℃ 保存, 待测 t-PA、PAI-1 含量与活性; 细胞用于提取总 RNA 进行基因表达水平或免疫组化的检测。

1.4 大鼠脑皮质 BMEC tPA mRNA 和 PAI-1 mRNA 表达

1.4.1 提取总 RNA 将各组各时相点细胞加 0.5 ml Tripure 至瓶中, 吹打, 使细胞完全裂解, 采用 Tripure 一步抽提法得到总 RNA, 放于 -70℃ 低温冰箱保存。

1.4.2 RNA 浓度和纯度的测定 将装有 RNA 的离心管加入 15 ml 0.1% DEPC 处理过的去离子水, 溶解 RNA, 吸出 4 ml 于另一管中, 加入 996 ml 0.1% DEPC 处理过的去离子水稀释 250 倍, 用核酸定量仪测 RNA 含量, 若 R ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) 在 1.772~1.985 之间, 表示纯度好, 可用于逆转录。

1.4.3 逆转录 cDNA 的合成 20 ml 逆转录体系,

总 RNA 2 mg, Oligo (dT)₁₆ 0.5 mg, 加双蒸水至 10 ml, 65℃, 5 min; 5 × Buffer 4 ml, 10 mM dNDPs 2 ml, DTT 2 ml, RNAsin 0.5 ml, AMV 2 ml (20 u), 42℃, 1 h。-20℃低温冰箱保存备用。此过程设立阴性对照, 即总 RNA 这步不加 RNA, 以 DEPC 替代。

1.4.4 引物设计^[2-4] 依据基因库 GenBank 中检索出大鼠内皮细胞 tPA cDNA 与 PAI-1 cDNA 的完整序列 (分别为 3422 bp 和 3053 bp)。应用 Oligo 5.0 PCR 引物设计软件, 根据引物合成原则, 设计大鼠 PCR 引物。mRNA 定量采用半定量的逆转录聚合酶链反应 (reverse-transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 法。按逆转录试剂盒 (Promega) 方法进行 RT-PCR。引物由上海生工生物技术公司合成, 序列如下: 大鼠 PAI-1 引物序列上游引物: 5'-GCCATGGAACAAGGATGAGA-3', 下游引物: 5'-GCGTGGTGAAGTCTAGTATAG-3', 扩增长度 395 bp; 大鼠 tPA 引物序列上游引物: 5'-AATACATTGTC-CATAAGGAA-3', 下游引物: 5'-AGGCCCCAGCT-GATGATGCCCA-3', 扩增长度 432 bp; β-action 上游引物: 5'-TCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAAG-3', 下游引物: 5'-CCTAGAAGCATTTCGCGTG-CACGATGGAGG-3', 扩增长度 291 bp。

1.4.5 PAI-1、tPA 及 β-action PCR 扩增 ①PAI-1 50 ml 扩增体系: 双蒸水 31 ml, 10 × Buffer 5 ml, 2.5 mM 4 × dNTP_s 2 ml, MgCl₂ 3 ml, 乳化剂 5 ml, 25 pmol/ml PAI-1 上游引物 1 ml, 25 pmol/ml PAI-1 下游引物 1 ml, cDNA 2 ml, Taq DNA 聚合酶 1 u, 95℃, 变性 5 min, 然后 94℃, 45 s 变性, 50℃, 60 s 退火, 72℃, 80 s 延伸, 35 个循环, 72℃, 5 min 保温完成反应。②tPA、β-action 50 ml 扩增体系: 双蒸水 33 ml, 10 × Buffer 5 ml, 2.5 mM 4 × dNTP_s 4 ml, 25 pmol/m 上游引物 1 ml, 125 pmol/ml 下游引物 1 ml, cDNA 6 ml, Taq DNA 聚合酶 2 u, 95℃, 变性 5 min, 然后 94℃, 45 s 变性, 58℃, 60 s 退火, 72℃, 80 s 延伸, 35 个循环, 72℃, 5 min 保温完成反应。

1.4.6 RT-PCR 鉴定及电泳分析 RT-PCR 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (恒压 110 mV, 电泳 40 min), 最后用凝胶图像分析仪照相和扫描分析各条带, 测定其光密度值 (A)。用以恒量表达的 β-action mRNA 为内参照进行校正, 各样本的基因表达量用该样本扩增后产物在凝胶上条带的光密度值与 β-action 基因条带的光密度值之比半定量

表示, 即 tPA、PAI-1 mRNA 的相对表达水平用 A_{tPA/β-action} (A_{t/β}) 和 A_{PAI-1/β-action} (A_{p/β}) 表示, 最后将比值进行统计分析。

1.5 大鼠脑皮质 BMEC tPA、PAI-1 含量测定

严格试剂盒说明书操作采用酶联免疫吸附法测定培养上清液 tPA、PAI-1 含量。

1.6 大鼠脑皮质 BMEC tPA、PAI 活性测定

严格按试剂盒说明书操作采用发色底物法测定培养上清液 tPA、PAI 活性。

1.7 大鼠脑皮质 BMEC tPA 免疫组化检测

将长有细胞的盖玻片取出, 用 0.01 mmol/L PBS 漂洗后, 4℃丙酮固定 10 min, 置于 4℃冰箱保存备用。按北京中山生物技术有限公司提供的免疫组化染色步骤 (LAB-SA 法, DAB 显色) 进行免疫组化染色 (一抗为 tPA 抗体), 每批实验中均设立阳性与阴性对照。

1.8 统计学处理

数值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。多组间均数的两两比较用 One-way ANOVA (Dunnett) 分析; 同一时间不同剂量或不同时间同一剂量的治疗组与相应的对照组比较用 *t* 检验; *P* < 0.05 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HEL 对大鼠脑皮质 BMEC 生长的影响

在一定浓度范围内 (0.25 ~ 1 mg/μl), HEL 能促进内皮细胞生长, 且呈剂量依赖性增加 (*P* < 0.05), 低于 0.25 mg/μl 的 HEL 对内皮细胞的生长无影响, 而高于 1 mg/μl 的 HEL 也不进一步促进内皮细胞生长, 见表 1。

表 1 不同浓度水蛭提取液 (HEL) 与 BMEC 孵育 7 d 后用 MTT 法测定的 OD₅₇₀ 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

HEL (mg/μl)	OD ₅₇₀ 值
0	0.226 ± 0.002
0.0625	0.229 ± 0.003
0.125	0.232 ± 0.003
0.25	0.239 ± 0.006***
0.5	0.246 ± 0.005***
1	0.354 ± 0.004***
2	0.352 ± 0.002**
4	0.352 ± 0.002**
8	0.353 ± 0.004**

注: **为与对照组比较, *P* < 0.01; #为与前一浓度组比较, *P* < 0.05。

2.2 HEL 对大鼠脑皮质 BMEC tPA、PAI-1 含量的影响

在一定浓度范围内(0.25 ~ 1 mg/μl),HEL 能诱导内皮细胞培养上清液中 t-PA 抗原呈剂量依赖性增加,见表 2。HEL(1 mg/μl)可刺激内皮细胞上清液中 t-PA 抗原积聚呈时间依赖性。与同一时相的对照组比较,HEL 与内皮细胞孵育 8 h 即可引起上清液 tPA 抗原含量增加,在 24 h 时抗原增幅最大,为 8 h 时的 1.5 倍,此种刺激效应至少持续 48 h,见表 3。PAI-1 抗原则不受水蛭提取液刺激的影响,见表 2、表 3。

表 2 不同浓度 HEL 与 BMEC 孵育 24 h 后 tPA、PAI-1 含量的变化 (x̄ ± s)

HEL (mg/μl)	tPA 抗原 (ng/ml)	PAI-1 抗原 (ng/ml)
0	2.83 ± 0.03	84.07 ± 2.87
0.25	2.94 ± 0.09**	81.82 ± 2.39
0.5	3.10 ± 0.12**#	82.05 ± 1.55
1	6.30 ± 0.24**#	81.66 ± 1.75
2	6.28 ± 0.12**	82.46 ± 1.91
4	6.29 ± 0.12**	82.70 ± 2.33

注:※为与对照组比较,P<0.05;#为与前一浓度组比较,P<0.05。

表 3 HEL(1 mg/μl) 与 BMEC 孵育不同时间后 tPA、PAI-1 含量的变化 (x̄ ± s)

时间(h)	tPA 抗原 (ng/ml)		PAI-1 抗原 (ng/ml)	
	Con	HEL	Con	HEL
0	2.73 ± 0.06	2.73 ± 0.03	83.31 ± 2.98	83.31 ± 3.02
8	2.74 ± 0.03	2.80 ± 0.05**	83.34 ± 1.78	82.71 ± 1.96
16	2.77 ± 0.07	2.90 ± 0.05***#	83.29 ± 1.64	82.40 ± 1.46
24	2.98 ± 0.06	7.07 ± 0.06***#	83.36 ± 1.53	81.95 ± 1.67
32	3.01 ± 0.07	7.06 ± 0.17***	83.37 ± 2.03	82.19 ± 1.97
48	3.05 ± 0.04	7.06 ± 0.19***	83.35 ± 1.67	82.18 ± 2.67

注:※为与对照组比较,P<0.05;※※为与对照组比较,P<0.01;#为与前一浓度组比较,P<0.05。

2.3 HEL 对大鼠脑皮质 BMEC tPA、PAI 活性的影响

在一定浓度范围内(0.25 ~ 1 mg/μl),水蛭提取液能诱导内皮细胞培养上清液中 t-PA 活性呈剂量依赖性增加,见表 4。HEL(1 mg/μl)可刺激内皮细胞上清液中 t-PA 活性积聚呈时间依赖性。与同一时相的对照组比较,HEL 与内皮细胞孵育 8 h 即可引起上清液 tPA 活性含量增加,在 24 h 时活性增幅最大,增加近 1.1 倍,此种刺激效应至少持续 48 h,见表 5。PAI-1 活性则不受 HEL 刺激的影响,见表 4、表 5。

表 4 不同浓度 HEL 与 BMEC 孵育 24 h 后 tPA、PAI 活性的变化 (x̄ ± s)

HEL(mg/μl)	tPA (IU/ml)	PAI (AU/ml)
0	15.19 ± 0.21	21.91 ± 1.63
0.25	17.23 ± 0.38***	20.80 ± 1.59
0.5	26.20 ± 1.07***#	20.82 ± 1.91
1	35.67 ± 1.14***#	20.71 ± 1.68
2	35.10 ± 2.20***	20.34 ± 2.48
4	35.41 ± 1.89***	20.16 ± 1.59

注:※※为与对照组比较,P<0.01;#为与前一浓度组比较,P<0.05。

表 5 HEL (1mg/μl) 与 BMEC 孵育不同时间后 tPA、PAI 活性的变化 (x̄ ± s)

时间(h)	tPA (IU/ml)		PAI (AU/ml)	
	Con	Test	Con	Test
0	15.20 ± 1.02	15.30 ± 1.16	21.60 ± 1.76	21.61 ± 1.76
8	15.34 ± 0.95	16.40 ± 0.87**	21.58 ± 1.30	20.91 ± 1.66
16	15.67 ± 0.78	19.73 ± 0.88***#	21.57 ± 1.45	20.49 ± 1.48
24	15.65 ± 1.12	32.05 ± 2.10***#	21.61 ± 1.09	20.32 ± 1.45
32	16.70 ± 0.69	31.95 ± 1.75***	21.63 ± 1.38	20.56 ± 1.08
48	16.82 ± 1.21	31.86 ± 1.84***	21.60 ± 1.25	20.47 ± 1.39

注:※为与相应的对照组比较,P<0.05;※※为与对照组比较,P<0.01;#为与前一浓度组比较,P<0.05。

2.4 HEL 对大鼠脑皮质 BMEC tPA mRNA 和 PAI-1 mRNA 表达的影响

在一定浓度范围内 (0.25 ~ 1 mg/μl), 水蛭提取液诱导 t-PA mRNA 水平呈剂量依赖性增加, 见表 6。与同一时相的对照组比较, HEL (1 mg/μl) 对 t-

PA mRNA 的诱导表达在 8 h 开始增加 (约为对照组的 1.0 倍), 24h 达最大效应 (约为对照组的 1.9 倍), 此效应至少持续 48 h, 见表 7。PAI-1 mRNA 的表达不受 HEL 刺激的影响, 见表 6、表 7。见图 1、图 2。

表 6 HEL 与 BMEC 孵育 24 h 后 tPA mRNA、PAI-1 mRNA 相对表达量的比较 (x̄ ± s)

HEL (mg/μl)	A _{tPA}		A _{PAI-1}	
	HEL	Con	HEL	Con
0.25	0.47 ± 0.01	0.53 ± 0.02**	0.52 ± 0.02	0.51 ± 0.01
0.5	0.46 ± 0.03#	0.88 ± 0.02**#	0.51 ± 0.03	0.50 ± 0.01
1	0.47 ± 0.02#	1.37 ± 0.02**#	0.52 ± 0.01	0.53 ± 0.03
2	0.46 ± 0.03	1.35 ± 0.05**	0.51 ± 0.03	0.51 ± 0.02
4	0.47 ± 0.01	1.36 ± 0.01**	0.51 ± 0.02	0.52 ± 0.01

注: **为与相应的对照组比较, P < 0.05; #为与前一浓度组比较, P < 0.05。

表 7 HEL (1mg/μl) 与 BMEC 孵育不同时间后 tPA mRNA、PAI-1 mRNA 相对表达量的比较 (x̄ ± s)

时间 (h)	A _{tPA}		A _{PAI-1}	
	HEL	Con	HEL	Con
8	0.46 ± 0.02	0.95 ± 0.03**	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.01
16	0.49 ± 0.01	1.21 ± 0.02**#	0.38 ± 0.04	0.37 ± 0.02
24	0.51 ± 0.02	1.47 ± 0.02**#	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.03
32	0.50 ± 0.03	1.46 ± 0.02**	0.38 ± 0.03	0.37 ± 0.01
48	0.51 ± 0.02	1.45 ± 0.02**	0.38 ± 0.01	0.36 ± 0.02

注: **为与相应的对照组比较, P < 0.05; #为与前一浓度组比较, P < 0.05。

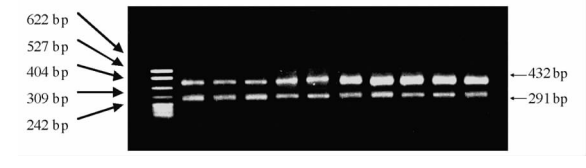


图 1 不同浓度 HEL 加入 BMEC 中培养 24 h tPA mRNA 的表达 (RT-PCR 法)。从左到右依次为 Marker, 分别与 0.25、0.5、1、2、4 mg/μl HEL 相对应的生理盐水对照组, 0.25、0.5、1、2、4 mg/μl HEL 治疗组。



图 2 1 mg/μl HEL 加入 BMEC 中培养 8 h ~ 48 h tPA mRNA 的表达 (RT-PCR 法)。从左到右依次为 Marker, 分别与 1 mg/μl HEL 培养 8 h、16 h、24 h、32 h、48 h 相对应的生理盐水对照组, 8 h、16 h、24 h、32 h、48 h HEL 治疗组。

2.5 HEL 对大鼠脑皮质 BMEC tPA 免疫组化的影响

在一定浓度范围 (0.25 ~ 1 mg/μl) HEL 与脑

皮质 BMEC 孵育 24 h 后 tPA 在胞浆中呈阳性表达, 且呈剂量依赖性表达增强, 见图 3。而生理盐水对照组呈阴性或弱阳性表达, 见图 4。

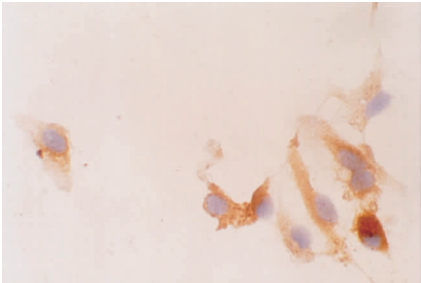


图 3 0.5 mg/μl HEL 与脑皮质 BMEC 孵育 24 h 后 tPA 在胞浆的阳性表达 (× 200)。

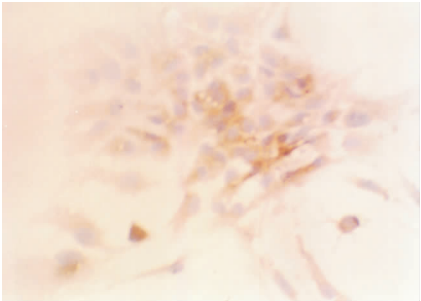


图 4 生理盐水对照组与脑皮质 BMEC 孵育 24 h 后 tPA 在胞浆弱阳性表达 (× 200)。

3 讨论

纤溶系统由纤溶酶原、纤溶酶、纤溶酶原激活剂(PA)和激活物的特异性抑制剂(PAI)等组成。PA分为组织型(tPA)和尿激酶型(uPA)两种。在tPA或uPA作用下纤溶酶原肽链Arg561-Val562之间断裂,形成由二硫键相连的双链结构,即活性的纤溶酶。tPA主要由内皮细胞合成与分泌,uPA在肾脏合成,也存在于内皮细胞。脑内的纤溶酶原激活物以tPA为主,也主要由内皮细胞合成与分泌,神经元或神经胶质细胞也有少量产生和分泌^[5-6]。在正常生理条件下,其蛋白水解作用涉及神经细胞、神经胶质细胞迁移及轴突的生长。PAI可分为4种,其中PAI-1的作用最重要。PAI-1主要由血管内皮细胞、平滑肌细胞及肝细胞等合成,也存在于血小板 α 颗粒。PAI-1是tPA和uPA的主要生理性抑制剂,PAI-1与二者1:1结合,快速将其灭活。PAI-1与tPA是纤溶功能的主要调节者,PAI-1/tPA之间的平衡决定着纤溶状态^[7-9]。

血管内皮遍布全身,位于整个循环系统的内表面,它不仅是血管的被动衬里,而且是肌体最大的内分泌腺^[10]。由于它所处的特殊位置,可通过不同的机制和生化信息,来释放血管活性物质、细胞因子和生长因子,以调节免疫反应、血液流动性、凝血过程、血管床张力及通透性,参与正常和新生组织的血管形成。BMEC是位于毛细血管微循环的一种特殊细胞,具有极其重要的功能。它是构成血脑屏障的主要成分,同时与脑水肿、脑血管疾病的发生发展、脑肿瘤的浸润和扩散相关。本研究选用大鼠脑皮质BMEC培养为实验模型,从体外直接观察HEL对BMEC的作用,首次发现HEL在一定浓度范围内(0.25~1 mg/ μ l)可促进BMEC的生长,通过对tPA的转录、翻译及合成蛋白的加工修饰来激活内源性纤溶系统,即它能促进培养的大鼠大脑皮质BMEC分泌tPA,同时增强其活性,促进tPA mRNA的表达及tPA免疫活性表达,且呈剂量依赖性表达增强,对PAI-1的含量、活性及mRNA的表达无影响。本研究表明HEL具有促进BMEC

生长,从分子水平可刺激tPA的表达,增强其活性,但不影响PAI-1的表达,不会因过度刺激纤溶而导致再出血危险,对这种tPA/PAI-1的调节有利于脑内血肿的吸收。

参 考 文 献

- [1] 吴文斌,胡常林,汤为学. 大鼠脑皮质微血管内皮细胞的培养. 重庆医科大学学报, 2002, 27(2): 151-152, 155.
- [2] Feng P, Ohlsson M, Ny T. The structure of the TATA-less rat tissue-type plasminogen activator gene. Species-specific sequence divergences in the promoter predict differences in regulation of gene expression. J Biol Chem, 1990, 265(4): 2022-2027.
- [3] Zeheb R, Gelehrter TD. Cloning and sequencing of cDNA for the rat plasminogen activator inhibitor-1. Gene, 1988, 73(2): 459-468.
- [4] 马磊,舒宁,谢昌平,等. RT-PCR法检测大鼠脑组织及C6细胞中 β -APP的表达. 细胞生物学, 1997, 19(2): 92-94.
- [5] Zlokovic BV, Wang L, Sun N, et al. Expression of tissue plasminogen activator in cerebral capillaries: possible fibrinolytic function of the blood-brain barrier. Neurosurgery, 1995, 37(5): 955-961.
- [6] Sappino AP, Madani R, Huarte J, et al. Extracellular proteolysis in the adult murine brain. J Clin Invest, 1993, 92(2): 679-685.
- [7] Izuhara Y, Takahashi S, Nangaku M, et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1: its mechanism and effectiveness on coagulation and fibrosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(4): 672-677.
- [8] Izuhara Y, Yamaoka N, Kodama H, et al. A novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1 provides antithrombotic benefits devoid of bleeding effect in nonhuman primates. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(5): 904-912.
- [9] Heberlein K, Straub AC, Best AK, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates myoendothelial junction formation. Circ Res, 2010, 106(6): 1092-1102.
- [10] Inagami T, Naruse M, Hoover R. Endothelium as an endocrine organ. Annu Rev Physiol, 1995, 57(1): 171-189.