

## 水蛭素对凝血酶诱导血管内皮细胞与中性粒细胞表达黏附分子的影响\*

王敏<sup>1</sup>, 崔连群<sup>2</sup>, 王晓军<sup>2</sup>, 韩秋霞<sup>1</sup>, 刘鲁宁<sup>3</sup>

(1 山东科技大学信电学院生物医学系, 济南 250031;

2 山东大学临床医学院省立医院, 济南 250021; 3 山东大学生命科学院, 济南 250100)

**[摘要]** 目的: 研究水蛭素对凝血酶诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)表达细胞黏附分子(ICAM-1)和中性粒细胞表达膜整合素 CD11b 的影响。方法: 用酶消化法获得 HUVEC, 密度梯度离心和重力沉降法分离人外周血细胞中性粒细胞。用酶联免疫吸附测定 HUVEC 在凝血酶、水蛭素作用下 ICAM-1 的变化, 同时以免疫荧光流式细胞术检测中性粒细胞表达 CD11b 水平的变化。结果: 与对照组相比, 凝血酶诱导的 HUVEC 表达 ICAM-1 显著增多, 随时间延长, ICAM-1 的表达递增, 高峰在 24 h。凝血酶使中性粒细胞 CD11b 的表达也显著上调, 6 h 平均荧光强度明显增加, 随时间延长逐渐升高, 高峰在 24 h。水蛭素和肝素对凝血酶诱导的 HUVEC 表达 ICAM-1 和中性粒细胞表达 CD11b 均有明显的抑制作用, 且水蛭素抑制 ICAM-1 的表达强于肝素, 尤其在 ICAM-1 表达的高峰期, 对 CD11b 表达的抑制作用水蛭素与肝素无明显差别。结论: 水蛭素可以明显抑制凝血酶诱导的 HUVEC 表达 ICAM-1 和中性粒细胞表达 CD11b。

**[关键词]** 凝血酶; 水蛭素; 细胞黏附分子

**[中图分类号]** R965.1, R973.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2005)08-0989-04

## Effects of hirudin for the thrombin-induced expression of adhesive molecules in neutrophils and human umbilical vein endothelial cells

WANG Min<sup>1</sup>, CUI Liang-Qun<sup>2</sup>, WANG Xiao-jun<sup>2</sup>, HAN Qiu-xia<sup>1</sup>, LIU Lu-ning<sup>3</sup>

(1 Department of Biological Medicine, Shandong University of Science and Technology,

Jinan 250031, China; 2 Department of Cardiology, The Provincial Hospital Affiliated

to College of Clinical Medicine, Shandong University, Jinan 250021, China;

3 Institute of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effects of hirudin for the thrombin-induced expression of intercellular adhesive molecules-1 (ICAM-1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and cluster of differentiation (CD) 11b in neutrophil granulocytes. **Methods:** The HUVEC was purified by digestion with collagenase type I. An enzyme linked immunosorbent assay was used to analyze the expression of ICAM-1 thrombin promoted in the HUVEC. The neutrophil granulocytes were purified by density gradient centrifugation and gravimetric sedimentation. An immunofluorescence flow cytometry was utilized to observe the expression of CD11b thrombin induced in the neutrophil granulocytes. Hirudin was incubated with the HUVEC and neutrophil granulocytes, and the changes of ICAM-1 and CD11b were monitored, respectively. **Results:** Thrombin significantly increased both CD11b and ICAM-1 levels with the maximal peak values at 24 hours, which were positively proportional to the time thrombin exposed to the HUVEC and neutrophil granulocytes. Hirudin inhibited the expression of ICAM-1 in the HUVEC more greatly than heparin, and CD11b in the neutrophil granulocytes the same as heparin. **Conclusion:** Hirudin inhibited the generation of both ICAM-1 and CD11b by altering leukocyte adhesion and migration, which suggested affecting the atherosclerotic process.

**[Key words]** thrombin; hirudin; intercellular adhesive molecules

\* 基金项目: 山东省自然科学基金资助项目(Y2003C01)

凝血酶作为一种重要的血管活性物质,通过损伤内皮细胞、促进平滑肌细胞增殖及血管壁细胞释放细胞因子和基质金属蛋白酶<sup>[1-5]</sup>等,在动脉粥样硬化(Atherosclerosis, As)的发生、发展过程起到了举足轻重的作用。在研究 As 过程中,凝血酶与黏附分子的关系也日益受到重视。血液中白细胞穿过内皮迁移至血管壁间隙是 As 形成的必要步骤,白细胞与内皮细胞黏附是此过程中重要的一环。本研究检测了凝血酶诱导体外培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)表达细胞黏附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和中性粒细胞表达膜整合素 CD11b,及其水蛭素对此过程的抑制作用,旨在探索凝血酶与 As 发生、发展的分子机制,为防治 As 的新途径提供理论基础。

## 材料与方 法

### 1 试剂与仪器

凝血酶,胶原酶 I 型,胰蛋白酶,DMEM 培养基, Sigma 公司产品。重组水蛭素( $12\ 500\ \text{u}\ \cdot\ \text{mL}^{-1}$ )由山东阿华生物药物有限公司馈赠。胎牛血清,杭州四季青公司产品。淋巴细胞分离液[密度( $1.077 \pm 0.002$ )  $\text{g}\ \cdot\ \text{mL}^{-1}$ ],上海荣盛生物技术有限公司产品。粒细胞分离液(Dextran T500 溶液),美国 Pharma 公司产品。鼠抗人 FITC(异硫氰酸荧光素)标记 CD11b 单克隆抗体及 FITC 标记羊抗鼠-IgG,法国 Immunotech 公司产品。ELISA 法检验 ICAM-1 试剂盒,美国 R&D 产品。超净工作台(JHT)、CO<sub>2</sub> 培养箱(Nuare)、倒置相差显微镜(Olympus)酶联免疫检测仪(BIORAD 550)、低温超速离心机(IEC, miceoman RF)。

### 2 方 法

**2.1 HUVEC 的体外培养** 无菌取分娩 4h 内健康新生儿脐带,用 D-Hanks 液冲洗脐静脉腔,注入 0.1% 胶原酶溶液,封闭两端置 37 的 D-Hanks 液中消化 10 min。离心,弃上清液。加入含 20% 胎牛血清 DMEM 的培养液,调整至细胞密度为  $2 \times 10^9$  个  $\cdot\ \text{L}^{-1}$ ,接种于培养瓶中,在 CO<sub>2</sub> 孵育箱内 37 时培养。用因子相关抗原免疫细胞化学鉴定内皮细胞。第 2~5 代细胞作为实验用细胞。用培养液调整细胞密度为  $2 \times 10^9$  个  $\cdot\ \text{L}^{-1}$ ,接种在培养瓶或培养板内的盖玻片上,培养至 80% 的细胞呈汇合状态,换无血清 DMEM 同步 24 h 后进行实验。实验分 4 组:凝血酶 ( $4.0\ \text{ku}\ \cdot\ \text{L}^{-1}$ ) 组;凝血酶 ( $4.0\ \text{ku}\ \cdot\ \text{L}^{-1}$ ) + 水蛭素 ( $6.0\ \text{ku}\ \cdot\ \text{L}^{-1}$ ) 组;凝血酶 ( $4.0\ \text{ku}\ \cdot\ \text{L}^{-1}$ ) + 肝素

( $6.0\ \text{ku}\ \cdot\ \text{L}^{-1}$ ) 组;以无血清的 DMEM 培养液为空白对照组。按温育时间再分为 6, 12, 24 和 48 h 亚组。每组实验重复 3 次。

**2.2 多形核粒细胞分离<sup>[6]</sup>** 在健康成年男性志愿者(抽血前 2 周末服用过任何药物)肘前静脉采血 40 mL,加入含 3.09% 枸橼酸钠无菌瓶中。第一步用淋巴细胞分离液按密度梯度离心法分离血细胞。第二步用 5% Dextran T500 溶液按重力沉降法分离粒细胞。最后加入 0.2% NaCl 溶液 5 mL 以裂解残存的红细胞,30s 后加入等体积的 1.6% NaCl 溶液使渗透压恢复至等渗。在  $1\ 000\ \text{r}\ \cdot\ \text{min}^{-1}$  离心 10 min,弃上清。沉淀用  $0.01\ \text{mol}\ \cdot\ \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.40)洗 2 次,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液悬浮。用台盼蓝法计数细胞计算存活率,活细胞比率 > 95%。细胞涂片作瑞氏染色检测细胞纯度 > 98%。用培养液配成密度为  $5 \times 10^6$  个  $\cdot\ \text{mL}^{-1}$  接种于 24 孔培养板。20% 胎牛血清的 DMEM 培养液置 37, CO<sub>2</sub> 培养箱。分组同上。

**2.3 流式细胞术检测中性粒细胞 CD11b 表达** 将各组细胞悬液分别置于不同的洁净试管中,  $2\ 000\ \text{r}\ \cdot\ \text{min}^{-1}$  离心 20 min。分离细胞,并用 PBS 液洗涤 3 次。将细胞浓度调整为  $1 \times 10^6$  个  $\cdot\ \text{mL}^{-1}$ ,每份取 250  $\mu\text{L}$   $\times 3$  分装 3 个试管。首先加入 FITC-CD11b 10  $\mu\text{L}$  于 4 反应 30 min,然后加 FITC-IgG1 10  $\mu\text{L}$ ,避光反应 30 min, PBS 洗涤 2 次。洗涤后用 0.5 mL PBS 悬浮细胞,上机检测。以 PBS 替代 CD11b 单抗作阴性对照。上机前以标准荧光微球调整仪器,使变异系数稳定在 2% 以内。利用设门(Gating)的方法将中性粒细胞从单核细胞及淋巴细胞分离出来。收集  $1 \times 10^4$  个细胞,荧光强度以对数放大。用 Cell Quest Plot 软件分析平均荧光强度。以平均荧光强度代表细胞表达 CD11b 水平。

**2.4 酶联免疫吸附测定(ELISA) HUVEC 表达 ICAM-1** 采用双抗夹心 ELISA 法。将标准品 100  $\mu\text{L}$  及按不同分组的细胞悬液 100  $\mu\text{L}$  加入 96 孔酶标反应板孔之中。混匀封板,37 反应 20 min。洗板 5 次。每孔加入 50  $\mu\text{L}$  anti ICAM-1 和 Biotin HRP,封板,37 反应 15 min。洗板 5 次。每孔加入 50  $\mu\text{L}$  底物 A 和 50  $\mu\text{L}$  底物 B,室温避光。每孔加入 100  $\mu\text{L}$  终止液,轻轻混匀。30 min 内在 450 nm 处读吸收度值。ICAM-1 的浓度与吸收度成正比。通过绘制标准曲线求出标本中 ICAM-1 的浓度。

### 3 统计学处理

测定结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,应用

SAS 软件系统分别进行,用方差分析(单/双因素),组间两两比较用 *q* 检验。

## 结 果

### 1 HUVEC 表达 ICAM-1

在正常体外培养的条件下, HUVEC 有 ICAM-1

的少量表达,并保持在一相对稳定的水平。在凝血酶的诱导下, HUVEC 表达 ICAM-1 明显增多 ( $P < 0.05$ )。随时间延长,逐步升高,高峰在 24 h。水蛭素能降低 ICAM-1 的表达,但不能降至正常水平。肝素不及水蛭素,尤其是在 ICAM-1 表达高峰期。结果见表 1。

表 1 ELISA 检测凝血酶、水蛭素对 HUVEC 表达 ICAM-1 的影响

组 别	<i>n</i>	不同温育时间的 ICAM-1 含量/ $\mu\text{g mL}^{-1}$			
		6h	12h	24h	48h
对 照	6	0.374 $\pm$ 0.231	0.394 $\pm$ 0.034	0.389 $\pm$ 0.141	0.366 $\pm$ 0.114
凝血酶	6	0.923 $\pm$ 0.109 <sup>a</sup>	1.415 $\pm$ 0.171 <sup>a</sup>	1.633 $\pm$ 0.046 <sup>a</sup>	1.223 $\pm$ 0.183 <sup>a</sup>
凝血酶 + 水蛭素	6	0.699 $\pm$ 0.023 <sup>b</sup>	0.701 $\pm$ 0.058 <sup>b</sup>	0.620 $\pm$ 0.046 <sup>b</sup>	0.613 $\pm$ 0.219 <sup>b</sup>
凝血酶 + 肝素	6	0.623 $\pm$ 0.129 <sup>b</sup>	0.987 $\pm$ 0.222 <sup>b</sup>	0.819 $\pm$ 0.174 <sup>b</sup>	0.833 $\pm$ 0.091 <sup>b</sup>

与对照组比较, a:  $P < 0.05$ ; 与凝血酶组比较, b:  $P < 0.05$  (下同)

### 2 多形核粒细胞 CD11b 表达

在正常体外培养的情况下,随着时间延长中性粒细胞表面 CD11b 轻微增高。在凝血酶的作用下,与对照组相比, CD11b 的表达显著上调, 6 h 平均荧光强度增加明显,提示其中性粒细胞被激活,黏附性增加。随时间延长逐渐升高。48 h 呈现下降趋势 ( $P < 0.05$ )。同时水蛭素、肝素显示出良好的抑制作用,但两者无明显差别。结果见表 2。

表 2 凝血酶及水蛭素对人多形核粒细胞表达 CD11b 水平的影响

组 别	<i>n</i>	不同温育时间的平均荧光强度 (MFI)			
		6 h	12 h	24 h	48 h
对 照	6	66.8 $\pm$ 7.3	71.2 $\pm$ 6.0	89.1 $\pm$ 8.9	91.1 $\pm$ 6.4
凝血酶	6	101.3 $\pm$ 8.9 <sup>a</sup>	116.8 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>	138.5 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup>	121.3 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>
凝血酶 + 水蛭素	6	88.1 $\pm$ 5.4 <sup>b</sup>	91.2 $\pm$ 5.1 <sup>b</sup>	101.2 $\pm$ 9.5 <sup>b</sup>	100.1 $\pm$ 7.8 <sup>b</sup>
凝血酶 + 肝素	6	81.2 $\pm$ 6.8 <sup>b</sup>	91.8 $\pm$ 9.3 <sup>b</sup>	119.3 $\pm$ 8.7 <sup>b</sup>	111.3 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>

## 讨 论

本实验结果显示凝血酶既诱导 HUVEC 表达 ICAM-1 又促进体外培养的血液中性粒细胞表达 CD11b。在凝血酶的作用下,与对照组相比,内皮细胞 HUVEC 表达 ICAM-1 增多,随时间延长,逐步升高。这与 Kaplanski 的结果一致<sup>[6]</sup>。同时中性粒细胞 CD11b 的表达显著上调, 6 h 平均荧光强度增加明显,提示其中性粒细胞被激活,黏附性增加。随时间延长逐渐升高。在时间上,凝血酶诱导 HUVEC 表达 ICAM-1 与中性粒细胞表达 CD11b 基本同步,在一定的范围内均呈时间效应关系。说明凝血酶对于这两种细胞的作用一致性。

近年来研究发现,内皮细胞受到刺激后,不仅形态学发生改变,影响血管内膜的完整性,而且还能合成多种黏附分子,导致微循环内形成白细胞栓和血小板栓,影响微循环血液流变学,加重组织细胞缺氧。另外,黏附分子过度上调,使白细胞得以与内皮细胞由滚动形成牢固黏附,并穿过内皮细胞间隙,向

炎症部位浸润。如果这一生理过程失控,形成白细胞-内皮细胞黏附瀑布反应,导致白细胞大量聚集,释放炎症介质和组织溶解酶,就会对细胞造成新的损伤。从本实验结果分析,水蛭素可以通过抑制黏附分子表达来降低凝血酶诱导的白细胞-内皮细胞黏附瀑布反应,从而保护血管。水蛭素对内皮细胞表达 ICAM-1 的抑制作用较肝素强,而水蛭素与肝素均显示出对多形核粒细胞表达 CD11b 的抑制作用,二者未呈现明显差异。说明水蛭素、肝素对过程的干预作用存在不同的途径。Peter 等<sup>[7]</sup>认为肝素通过封闭 CD11b/CD18 的结合位点来抑制白细胞的活化和 ICAM-1 表达。Rahman 等<sup>[8]</sup>则认为是启动了核转录因子 (NF- $\kappa$ B) 信号传导途径。更确切的途径有待于进一步探索。

用 DNA 重组技术生产的水蛭素是作用最强的特异性凝血酶抑制剂,它与凝血酶以等摩尔比形成非共价键紧密结合的稳定复合物,从而使凝血酶失活。实验证实水蛭素可以高效地阻止凝血酶诱导中性粒细胞活化后对内皮细胞的损伤,这为动脉粥样硬化的防治开辟了新的途径,并为临床合理应用水蛭素等药物提供实验基础。

[作者简介] 王敏 (1959 - ) 女,教授,医学博士,主要从事冠心病及再狭窄机制研究。联系电话: (0531) 5903198, 13789870636, E-mail: minwang859@hotmail.com。

### [参 考 文 献]

[1] Minami T, Sugiyama A, Wu SQ, et al. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(1) 41 - 53.  
 [2] 王敏, 崔连群, 张承俊, 等. 凝血酶诱导血管内皮细胞生长因子的表达及水蛭素的抑制作用 [J]. *中国新药杂志*, 2004, 13(3) 226 - 230.  
 [3] 王敏, 崔连群, 张承俊, 等. 水蛭素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *中国动脉硬化*, 2003, 11(7) 609 - 612.  
 [4] 王敏, 张维东, 崔连群, 等. 水蛭素抑制人脐静脉内皮细胞基

- 质金属蛋白酶-2 的生成及活化[J]. 细胞生物学杂志, 2004, 26(4) 409 - 412.
- [5] 王敏, 崔连群, 张承俊, 等. 核因子在凝血酶诱导血管内皮产生细胞基质金属蛋白酶-2 中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(3) 325 - 329.
- [6] Kaplanski G, Marin V, Fabrigule M, *et al.* Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion *in vitro* following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106) [J]. *Blood*, 1998, 92(4) 1259 - 1267.
- [7] Peter K, Schwarz M, Conradt C, *et al.* Heparin inhibits ligand binding to the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) [J]. *Circulation*, 1999, 100(14) 1533 - 1539.
- [8] Rahman A, Anwar K N, True A L, *et al.* Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF- $\kappa$ B site of the promoter mediates endothelial ICAM - 1 expression and neutrophil adhesion [J]. *J Immunol*, 1999, 162(5) 5466 - 5476.

(接受日期: 2005 - 04 - 15)

## 纤维素硫酸酯体内抗凝血活性的实验研究\*

王兆梅, 李琳, 蔡妙颜, 桂林

(华南理工大学食品与生物工程学院, 广州 510640)

**[摘要]** 目的: 研究纤维素硫酸酯对动物体内的抗凝血活性。方法: 用试管法测凝血时间(CT), 用凝固法测定活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)和凝血酶时间(TT), 以肝素和硫酸化右旋糖酐为阳性对照, 考察其抗凝血活性的量效性和时效性。结果: 纤维素硫酸酯能显著延长 CT, APTT 和 TT, 且呈剂量依赖性, 但在所试剂量范围内对 PT 无明显影响, 其抗凝血活性在给药 2 h 时达到最大。结论: 纤维素硫酸酯具有明显抗凝血作用, 强于现有同类抗凝血药硫酸化右旋糖酐, 略低于 150 IU  $\text{mg}^{-1}$  的肝素。

**[关键词]** 纤维素硫酸酯; 抗凝血活性; 大鼠

**[中图分类号]** R965.1; R973.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 3734(2005)08 - 0992 - 03

### Anticoagulant activity of cellulose sulfate *in vivo*

WANG Zhao-mei, LI Lin, CAI Miao-yan, GUI Lin

(College of Food &amp; Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**[Abstract]** **Objective:** To assess the anticoagulant activity of cellulose sulfate *in vivo*. **Methods:** Coagulation time (CT) was measured using a test tube method. Activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), and pro-thrombin time (PT) were monitored via a coagulation method. Heparin and dextran sulfate were used as positive controls. **Results:** CT, APTT and TT were significantly prolonged by cellulose sulfate in a dose-dependent manner. No significant difference in PT was observed. The maximal anticoagulant potency achieved in 2 hours after the administration of cellulose sulfate. **Conclusion:** Cellulose sulfate presents an obvious anticoagulant activity. The anticoagulant potency of cellulose sulfate was more powerful than dextran but less than heparin of 150 IU/mg.

**[Key words]** cellulose sulfate; anticoagulant activity; rats

抗凝血剂是阻止血液凝固、维护血液动态平衡的有效物质。在临床上, 抗凝血剂用于抗凝治疗 DIC 综合征、阻止手术后血管内凝血、治疗深度静脉栓塞以及预防心肺系统凝血的发生; 抗凝血剂也是活血化淤药物的重要组成部分。在体外, 抗凝血剂用于血液离体透析与体外保存; 抗凝血剂还广泛用于生物相容性医用材料领域。纤维素硫酸酯是纤维素经硫酸酯化修饰得到的半合成硫酸酯多糖, 研究

表明, 纤维素硫酸酯在体外具有突出的抗凝血作用<sup>[1,2]</sup>。本实验在体外抗凝血研究的基础上, 进一步研究纤维素硫酸酯在动物体内的抗凝血作用, 为研制新型抗凝血制剂提供参考。

### 材料与方法

#### 1 材料

SD 大鼠, 180 ~ 200 g, 雌雄各半, 由广州军区总

\* 基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(000453)