

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2015) 05 - 0409 - 04

尖吻蝮蛇毒 PCA 对人脐静脉血管内皮细胞的影响

桑金凤¹ 张根葆^{1, 2} 周淑艳¹

(皖南医学院 1. 病理生理学教研室; 2. 蛇毒研究室, 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 观察皖南尖吻蝮蛇毒蛋白 C 激活剂(PCA) 对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC) 的影响并分析其可能机制。方法: 常规培养 HUVEC, 在倒置显微镜下观察细胞形态变化, 用 MTT 法检测细胞活性。实验分为对照组、LPS 损伤组和 PCA 实验组。将 HUVEC 接种在 96 孔板内加药处理, 对照组加入 PBS 缓冲液, LPS 损伤组加入 0. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, PCA 实验组分别加入 0. 16、0. 32、0. 63、1. 25、2. 50、5. 00、10. 00、20. 00、40. 00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PCA 溶液和 0. 16、0. 32、0. 63、1. 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PCA 与 0. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 的混合液。每个浓度设 5 个复孔, 每孔加药 200 μL , 作用 12 h 后进行细胞活性测定并观察细胞形态。结果: PCA 浓度低于 2. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 HUVEC 活性和形态没有明显影响, 但可减轻 LPS 引起的 HUVEC 活性抑制和形态改变。高于 2. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 PCA 可抑制 HUVEC 的活性并引起其形态改变。结论: 低浓度 PCA 在一定程度上可减轻 LPS 引起的 HUVEC 损伤。

【关键词】蛇毒; PCA; HUVEC; 细胞活性**【中图分类号】**R 996. 3 **【文献标识码】**A**【DOI】**10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 05. 001

Effects of protein-C activator from *Agkistrodon Acutus* venom on human umbilical vein endothelial cells

SANG Jinfeng ZHANG Genbao ZHOU Shuyan

Department of Pathophysiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To observe the effects protein-C activator(PCA) extracted from the venom of *Agkistrodon acutus* on the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and investigate the potential mechanisms of this effects. **Methods:** HUVECs were conventionally cultured and observed under the inverted microscope for their morphologically changes. MTT method was used to detect the cell activity. The experiment consisted of control group, LPS-induced injury group and PCA treatment group. HUVECs were initially inoculated into separate 96-well plate. Then control group were treated with PBS buffer, LPS injury was induced with LPS in dose of 0. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and PCA group were treated with PCA in dose of 0. 16, 0. 32, 0. 63, 1. 25, 2. 50, 5. 00, 10. 00, 20. 00 and 40. 00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and mixed solution of 0. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS and PCA dosed by 0. 16, 0. 32, 0. 63 and 1. 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Five duplicated wells were set for individual plate into which 200 μL of the cell solution was added. After 12 hours of culturing, the cell activity and its morphology were determined and observed. **Results:** PCA level lower than 2. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ had no effect on the activity of HUVECs, yet reduced the damage of LPS to HUVEC. Contrarily, PCA concentration over 2. 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ significantly inhibited the activity of HUVECs and modified their morphology. **Conclusion:** Low concentration of PCA can to a certain extent reduce the injury of HUVECs caused by LPS.

【Key words】snake venom; PCA; HUVEC; cell activity

蛇毒富含多种蛋白质、多肽等活性物质, 大量资料显示其具有抗凝、抗血栓及抗肿瘤等临床应用价值。PCA 是一种抗血栓作用的蛇毒蛋白组分, 在 1986 年由 Klein 等^[1] 从蛇毒中第一次分离纯化得到, 本实验室在 2008 年从皖南尖吻蝮蛇毒中也分离得到该组分, 测得其分子量为 18. 5 ku, 等电点为 pI

4. 9^[2], 查阅国内外文献发现关于其作用机制的报道并不多见。前期实验除证实 PCA 具有改善内毒素、梗死等造成的大鼠心肌损伤, 抑制大鼠微血栓形成^[3] 等作用外, 还可引起大鼠血浆中 EPCR、TM 等血管内皮细胞(VEC) 分泌的活性物质的改变^[4], 因此推测 PCA 可能是通过影响 VEC 的功能来发挥其抗血栓等作用。本实验欲在体外培养的 HUVEC

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金重点项目(KJ2011A266)

收稿日期: 2015-02-05

作者简介: 桑金凤(1989-), 女, 2013 级硕士研究生, (电话) 18325326198, (电子信箱) 972952842 @ qq. com;

张根葆, 男, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) zgb858@ 163. com, 通讯作者。

基础上更直观地观察 PCA 对 VEC 的影响,为后续 PCA 抗凝血机制的研究和临床应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 皖南尖吻蝮蛇毒 PCA 组分(由本实验室蛇毒研究室从皖南尖吻蝮蛇粗毒中分离得到的一种蛋白组分,其分子量为 18.5 ku,等电点为 pl 4.9),PBS 缓冲液、DMEM 完全培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司),0.25% 胰蛋白酶 + 0.02EDTA(上海吉诺生物科技有限公司),胎牛血清(杭州四季青公司) 5% CO₂ 培养箱(Thermo),倒置相差显微镜(OLYMPUS IX51),内毒素(LPS),MTT、DMSO(Sigma)。

1.2 方法

1.2.1 HUVEC 细胞培养 HUVEC 购自南京凯基生物公司,培养液选取高糖 DMEM 培养基加含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素溶液,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。用 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 对细胞进行消化,按 1:2 比例进行传代,在倒置显微镜下观察细胞形态及生长状况,选取生长状态良好、形态正常的细胞用于实验。

1.2.2 在倒置显微镜下观察药物处理前后 HUVEC 形态的改变。

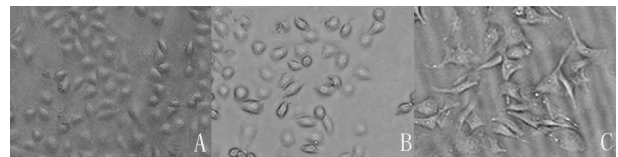
1.2.3 检测 HUVEC 活性 待 HUVEC 铺板率达 80% 经胰酶消化后用含 10% 胎牛血清的 DEME 悬浮 HUVEC 在细胞计数仪下计数并调整细胞浓度至 3 × 10⁴ 个/mL 接种于一次性 96 孔板中,每孔 200 μL。将 96 孔板放入 CO₂ 培养箱内培养,待细胞贴壁生长状态良好时,弃去原培养液,对照组加入 PBS 缓冲溶液,LPS 损伤组加入 0.1 μg/mL 的 LPS 溶液,PCA 实验组分别加入浓度为 0.16、0.32、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00、40.00 μg/mL 的 PCA 溶液和 0.16、0.32、0.63、1.25 μg/mL 的 PCA 与 0.1 μg/mL 的 LPS 的混合溶液,每个浓度组设 5 个复孔,每孔 200 μL。继续培养细胞 12 h,于结束前 4 h 加入 20 μL MTT(5 mg/mL),后吸净细胞上液每孔加入 150 μL DMSO,振荡摇匀 10 min,490 nm 测定光密度(OD 值),计算细胞生长抑制率。生长抑制率(IR) = (1 - 用药组平均 OD 值/对照组 OD 值) × 100%。

1.2.4 统计学分析 用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析,各实验数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCA 对细胞形态的影响

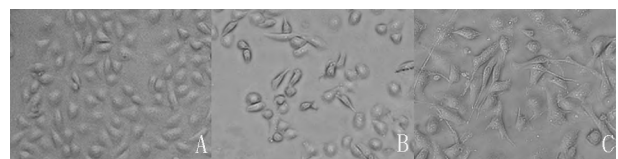
2.1.1 PCA 对 HUVEC 形态的影响 正常 HUVEC 为椭圆形、多角形或短梭形,胞浆均匀,边界清晰,呈铺路石样贴壁生长。在 0.16 ~ 1.25 μg/mL 间的 PCA 作用下 HUVEC 形态仍然为椭圆形、多角形或短梭形,边界清楚,胞浆丰富,呈铺路石样排列。但浓度 > 2.50 μg/mL 的 PCA 则会使 HUVEC 形态发生改变,细胞体积增大,发出分枝或出芽样改变,边界模糊,胞浆内出现颗粒样改变,细胞排列不规则(见图 1)。



A: 对照组, B: PCA(1.25 μg/mL) 组, C: PCA(40 μg/mL) 组
图 1 不同 PCA 浓度对 HUVEC 形态的影响(×200)

Fig 1 Different concentration of PCA on the morphology of HUVEC(×200)

2.1.2 PCA 和 LPS 联合作用对 HUVEC 形态的影响 0.1 μg/mL 的 LPS 使细胞呈明显的梭形化,细胞体积缩小,边界清晰,排列紊乱。将 0.63 ~ 1.25 μg/mL 的 PCA 和 0.1 μg/mL 的 LPS 共同作用于 HUVEC 后,细胞仍为椭圆形或梭形,胞浆丰富,边界清晰,呈铺路石样改变(见图 2)。



A: 对照组, B: LPS(0.1 μg/mL) 组, C: LPS(0.1 μg/mL) + PCA(1.25 μg/mL) 组

图 2 PCA 和 LPS 联合作用对 HUVEC 形态的影响(×200)

Fig 2 Combined PCA with LPS on the morphology of HUVEC(×200)

2.2 PCA 对细胞活性变化的影响

2.2.1 PCA 对细胞活性的影响 用 MTT 法测定细胞活性,从表 1 可看出,随浓度增加 PCA 对细胞的抑制率增大,OD 值减小。PCA 为 2.50 μg/mL 组细胞的 OD 值和对照组 OD 值比较差异有统计学意义(P < 0.05),PCA > 2.50 μg/mL 组细胞的 OD 值和对照组 OD 值间差异更加显著(P < 0.01)。

表1 不同浓度 PCA 作用后 HUVEC 的 OD 值和 IR ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

Tab 1 OD value and inhibition rate for HUVECs after treatment with PCA in different concentration ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

组别	PCA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD 值	IR(%)
对照组	-	0.533 \pm 0.021	-
PCA 实验组			
	0.16	0.528 \pm 0.022	0.93
	0.32	0.526 \pm 0.038	1.40
	0.63	0.520 \pm 0.029	2.41
	1.25	0.511 \pm 0.022	4.01
	2.50	0.494 \pm 0.019*	7.38
	5.00	0.450 \pm 0.032**	15.59
	10.00	0.403 \pm 0.013**	24.40
	20.00	0.328 \pm 0.017**	38.33
	40.00	0.272 \pm 0.014**	48.96
F 值	-	74.952	-
P 值	-	0.000	-

* 表示与对照组比较 $P < 0.05$, ** 表示与对照组比较 $P < 0.01$

2.2.2 PCA 和 LPS 共同作用前后细胞活性的变化

由表 2 可知,与对照组比较,LPS 损伤组细胞的 OD 值显著降低($P < 0.01$)。PCA 实验组中 PCA 浓度 0.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组细胞的 OD 值明显大于 LPS 损伤组($P < 0.05$)。

表2 不同浓度 PCA 和 LPS 共同作用后 HUVEC 的 OD 值和 IR ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

Tab 2 OD value and inhibition rate for HUVECs after combined treatment with different concentration of PCA and LPS ($\bar{x} \pm s$ $n=5$)

组别	LPS 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	PCA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD 值	IR(%)
对照组	-	-	0.526 \pm 0.017	-
LPS 损伤组	0.10	-	0.422 \pm 0.029**	19.74
PCA 实验组	0.10	0.16	0.428 \pm 0.021	18.61
	0.10	0.32	0.444 \pm 0.028	15.46
	0.10	0.63	0.470 \pm 0.022#	10.52
	0.10	1.25	0.481 \pm 0.014 Δ	8.47
F 值	-	-	15.043	-
P 值	-	-	0.000	-

** 表示与对照组比较 $P < 0.01$, # 表示与 LPS 损伤组比较 $P < 0.05$, Δ 表示与 LPS 损伤组比较 $P < 0.01$

3 讨论

随着我国人口老龄化程度日益加剧,血栓性疾病的发病率呈逐年上升趋势,已经严重危害到人们

的健康且降低了人们的生活质量,而现有抗血栓药物存在效果不稳定等弊端,因此,新型抗血栓药物的研发一直倍受关注。目前临床所用的许多抗血栓药物都是血管内皮细胞合成的抗栓物质或其衍生物,如前列环素^[5]、AT-III 与肝素^[6]、组织纤溶酶原激活物^[7]等。大量研究证实生理状态下血管内皮细胞通过分泌多种抗凝、促凝因子及粘附分子等维持血液的流动状态,而当血管内皮细胞受到损伤时则释放大量的促凝物质促进血栓的形成^[8],可见血栓性疾病的发生、发展与治疗都和血管内皮细胞密切相关。这些均提示从血管内皮细胞的角度出发来研发抗血栓药物有着重要意义。蝮蛇毒中的 PCA 组分可通过激活血浆蛋白 C 发挥抗凝作用,有研究证实 PCA 对心肌梗死、脑梗死等血栓性疾病也有改善作用^[3],可见将 PCA 开发为一种天然的抗血栓药物具有很大的应用前景,但又因蛇毒组分复杂且毒副作用大,所以探明 PCA 抗凝机制、最佳抗凝剂量等具有非常重要的意义。

本实验利用 MTT 法检测 PCA 作用前后 HUVEC 的活性显示,PCA 在 0.16 ~ 2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 HUVEC 活性无明显影响,且浓度在 0.63 ~ 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可减轻 LPS 对 HUVEC 的活性抑制,PCA > 2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时明显抑制 HUVEC 的活性,并呈剂量依赖性。于倒置显微镜下观察 PCA 作用前后 HUVEC 的形态变化,0.63 ~ 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PCA 不会引起明显的细胞形态变化,且可减轻内毒素引起的细胞形态改变,而 > 2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PCA 会引起明显的细胞形态改变。NatrIn 和 BF-CT1 都是由蛇毒中分离纯化得到的蛋白质^[9],有关研究发现两者均可通过阻断细胞增殖周期诱导细胞凋亡^[10-11],PCA 也是一种蛇毒蛋白组分,本实验结果提示高浓度 PCA 可抑制 HUVEC 活性并引起其形态改变,PCA 这种作用的机制也可能是通过阻断细胞增殖周期从而诱导内皮细胞凋亡。熊晶等^[12]研究得出蛇毒 pENW 可通过抑制 NO 的分泌减轻 LPS 对内皮细胞的损伤作用,本实验结果 PCA 在 0.63 ~ 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时也可减轻 LPS 对 HUVEC 的损伤作用,其机制也可能是通过抑制 LPS 引起的内皮细胞分泌功能改变,但 PCA 对血管内皮细胞的具体作用机制还有待进一步研究。

(下转第 415 页)

【参考文献】

- [1] 陈意志, 赵学智, 吴俊, 等. 从局灶节段性肾小球硬化的哥伦比亚病理分型到足细胞病的分类 [J]. 中华肾脏病杂志, 2009, 25(9): 734-738.
- [2] Cheng Huifang, Harris RC. The glomerulus—a view from the outside the podocyte [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(9): 1380-1387.
- [3] LOwik MM, Groenen PJ, Levchenko EN, *et al.* Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis—a review [J]. *Eur J Pediatr*, 2009, 168(11): 1291-1304.
- [4] Perysinaki GS, Moysiadi DK, Beasias G, *et al.* Podocytin slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology [J]. *Lupus*, 2011, 20(8): 781-791.
- [5] Kato T, Mizuno S, Kamimoto M. The decreases of nephrin and nuclear WT1 in podocytes may cause albuminuria during the experimental sepsis in mice [J]. *Biomed Res*, 2010, 31(6): 363-369.
- [6] Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, *et al.* PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 12959-12970.
- [7] 郑君, 龚晶, 张爱青, 等. 蟾蜍灵对阿霉素肾病大鼠蛋白尿的影响及机制研究 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(11): 1605-1609.
- [8] 周晓菊, 李宇宁, 李卫国, 等. 苦参碱对阿霉素损伤足细胞的干预作用及 mTOR 的表达 [J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(8): 757-761.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] 李卫国. Desmin 和 TGF- β 1 在阿霉素损伤足细胞的表达及活性维生素 D 的干预作用 [J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28(8): 645-646.
- [11] 孙雯, 朱智, 愈建, 等. 槐杞黄颗粒对阿霉素肾病大鼠肾组织 nephrin 和 podocin 表达的影响 [J]. 中西医结合学报, 2011, 9(5): 546-552.
- [12] Takai N, Ueda T, Nishida, *et al.* Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(5): 637-643.
- [13] Han Keqi, Huang Guang, Gu Wei, *et al.* Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(24): 3374-3379.
- [14] 李善文, 甘卫华, 陈荣华, 等. 蟾蜍灵对大鼠肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质分泌的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(14): 506-509.
- [15] 曾智凤, 甘卫华, 龚晶, 等. 蟾蜍灵对高糖诱导大鼠系膜细胞过表达纤维连接蛋白和结缔组织生长因子的影响 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(10): 1421-1424.
- [16] Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K, *et al.* Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(9): 2690-2701.
- [17] Huber TB, Kottgen M, Schilling B, *et al.* Interaction with podocin facilitates nephrin signaling [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(45): 41543-41546.

(上接第 411 页)

【参考文献】

- [1] Klein JD, Walker FJ. Purification of a protein C activator from the venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*) [J]. *Biochemistry*, 1986, 25(15): 4175-4179.
- [2] 张根葆, 张毅, 孔岩, 等. 五步蛇毒蛋白 C 激活剂的纯化与活性分析 [J]. 蛇志, 2008, 20(4): 249-251.
- [3] 李曙, 张根葆, 洪云, 等. 蝮蛇毒蛋白 C 激活物改善急性心肌梗死大鼠心功能的机制研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(2): 141-146.
- [4] 王斐, 张根葆, 黄璐, 等. 尖吻蝮蛇毒 PCA 在急性心肌梗死诊断中的应用 [J]. 皖南医学院学报, 2013, 32(5): 352-355.
- [5] Barbieri SS, Amadio P, Gianellini S, *et al.* Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin re-regulates arterial thrombus formation by suppressing tissue factor in a sirtuin-1-dependent manner [J]. *Circulation*, 2012, 126(11): 1373-1384.
- [6] Yi X, Chi W, Wang C, *et al.* Low-molecular-weight heparin or dual antiplatelet therapy is more effective than aspirin alone in preventing early neurological deterioration and improving the 6-month outcome in ischemic stroke patients [J]. *J Clin Neurol*, 2015, 11(1): 57-65.
- [7] Docagne F, Parcq J, Lijnen R, *et al.* Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke [J]. *Stroke*, 2015, 46(1): 314-320.
- [8] Holy EW, Besler C, Reiner MF, *et al.* High-density lipoprotein from patients with coronary heart disease loses anti-thrombotic effects on endothelial cells: impact on arterial thrombus formation [J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112(5): 1024-1035.
- [9] Wang J, Shen B, Guo M, *et al.* Blocking effect and crystal structure of natrin toxin, a cysteine-rich secretory protein from *Naja atra* venom that targets the BKCa channel [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(33): 10145-10152.
- [10] 宋慧, 徐星新, 李映新, 等. 广西眼镜蛇毒蛋白 Natrin 在体外诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(1): 118-121.
- [11] Bhattacharya S, Das T, Biswas A, *et al.* A cytotoxic protein (BF-CT1) purified from *Bungarus fasciatus* venom acts through apoptosis, modulation of PI3K/AKT, MAPK pathway and cell cycle regulation [J]. *Toxicon*, 2013, 74: 138-150.
- [12] 熊晶, 白莉, 方伟蓉, 等. 蛇毒三肽 pENW 对血管内皮的保护作用及机制探讨 [J]. 药学进展, 2011, 35(8): 367-372.