

蝎毒素 IV 对血管内皮细胞介导纤溶作用的影响

王巧云¹, 吕欣然² (1. 滨州医学院药理教研室, 山东 滨州 256603; 2. 潍坊医学院应用药物研究所, 山东 潍坊 261042)

摘要:目的 研究蝎毒素 IV 纤溶作用的内皮细胞介导机制。方法 培养的人脐静脉血管内皮细胞分别与剂量为 0, 1, 2, 4, 8 mg/L 的蝎毒素 IV 孵育后, 测定蝎毒素 IV 对内皮细胞释放组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、组织型纤溶酶原激活剂抑制物(PAI-1)的影响。结果 蝎毒素 IV 在低剂量能降低 t-PA 和 PAI-1 活性, 但 t-PA/PAI-1 比值较对照组相比明显升高。结论 蝎毒素 IV 能够通过影响内皮细胞功能, 发挥纤溶作用, 提示其为纤溶促进剂。

关键词:蝎毒素 IV; 血管内皮细胞; 组织型纤溶酶原激活剂; 组织型纤溶酶原激活剂抑制物

基金项目: 本课题为山东省卫生厅自然科学基金资助项目(No. 960668)

作者简介: 王巧云, 女, 32 岁, 讲师, 药理学硕士, 主要从事心血管药理研究。Tel: 0543-3256243, E-mail: wqy@bzmc.edu.cn

Effects of scorpion venom component IV on fibrinolysis mediated by vascular endothelial cells

WANG Qiaoyun¹, LU Xirran² (1. Department of Pharmacology, Binzhou Medical College, Binzhou, 256603, China; 2. Department of Applied Pharmacology, Weifang Medical College, Weifang, 261042, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The mechanic research of scorpion venom component IV into fibrinolysis was carried out in endothelial cells. **METHOD** Cultured confluent human umbilical vein endothelial cells were incubated with scorpion venom component IV at the concentration of 0, 1, 2, 4, 8 mg/L, respectively. The releases of tissue-type plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) were determined. **RESULTS** The activity of t-PA and PAI-1 decreased, however, the ratio of t-PA to PAI-1 increased at the low concentration of scorpion venom component IV when compared with the control. **CONCLUSION** Scorpion venom component IV can stimulate fibrinolysis by influencing the function of endothelial cell.

KEY WORDS scorpion venom component IV; vascular endothelial cell; tissue-type plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor-1

蝎毒源自我国传统名贵药材东亚钳蝎,研究证明它有镇痛、抗肿瘤、抗凝、纤溶等多种功效。现认为发挥药理活性的为其主要成分蛋白质,经蛋白质进行分离纯化后,获得数种分子量不等、药理活性亦不同的蛋白多肽。笔者探讨蝎毒素 IV 纤溶的内皮细胞介导机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与试剂

蝎毒冻干粉(潍坊医学院应用药物研究所); MI99 培养基(GIBCO); 内皮细胞生长因子(Boehringer Mannheim); 胶原酶(Sigma); t-PA 及 PAI-1(上海太阳生物试剂公司); 胰蛋白酶(Difco 产品进口分装); 谷氨酰胺(Sigma)。

1.2 仪器

Biosys-2000 型 Proscale 蛋白纯化系统(Beckman), CO₂ 培养箱(美国 Format scientific Co), multiskan 酶标仪(日本 Epson), 倒置相差显微镜(中国上海显微镜厂), FA2004 型电子天平(上海天平仪器厂)。

1.3 方法

1.3.1 蝎毒素 IV 的制备^[3,4] 以 Proscale 蛋白纯化系统对蝎毒进行分离纯化,收集到分子量为 7 200 的蝎毒素 IV,将蝎毒素 IV 放入浓缩离心管(截留分子量为 3 000)中,低温离心以脱盐浓缩,干燥后以紫外可见分光光度计扫描并测定其在 280nm 和 260nm 的吸光度,据公式:蛋白质浓度(mg/mL) = 1.45 A₂₈₀ - 0.74 A₂₆₀,计算其蛋白质含量为 98%。干燥品低温保存备用。

1.3.2 人脐静脉内皮细胞的培养^[3,4] 脐静脉内注入 0.1% 胶原酶消化后,加完全培养液(含 20% 胎牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺,青霉素 50 U/mL,链霉素 50 μg/L,肝素 50 μg/L, 50 mg/L 内皮细胞生长因子及 Hapes 液的 MI99 培养基)于内皮细胞中,细胞计数为 1.7×10^5 个/mL,放入 CO₂ 培养箱中,37℃ 孵育。细胞传至 3 代用于研究,细胞铺满平皿后,加入无血清培养液(含抗生素,谷氨酰胺,蝎毒素 IV),蝎毒素 IV 浓度分别为 0, 1, 2, 4, 8 mg/L,培养 4h 后收集培养液,10

000 × g 离心除去脱落细胞和细胞碎片,用于测定 t-PA 和 PAI-1。

1.3.3 t-PA 和 PAI-1 测定^[5] 参照文献及产品说明书,采用发色底物法测定。

1.4 统计方法

所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间差异用方差分析。

2 结果

蝎毒素 IV 在培养 4h 后,各剂量与对照组相比, t-PA 和 PAI-1 活性都降低($P < 0.01$),但 t-PA/PAI-1 比值在 1, 2 mg/L 与对照组相比显著升高($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 蝎毒素 IV 对血管内皮细胞分泌 t-PA, PAI-1 及 t-PA/PAI-1 比值的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 1 Effects of scorpion venom IV on activity of t-PA, PAI-1 and the ration of t-PA/PAI-1 in cell culture medium($\bar{x} \pm s, n = 6$)

蝎毒素 IV 浓度(mg/L)	t-PA ($\times 10^{-2}$ IU/mL)	PAI-1 ($\times 10^{-2}$ IU/mL)	t-PA/PAI-1 ($\times 10^{-2}$ IU/mL)
0	0.288 ± 0.019	3.061 ± 0.319	0.094 ± 0.012
1	0.172 ± 0.022 ¹⁾	1.080 ± 0.053 ¹⁾	0.159 ± 0.016 ²⁾
2	0.205 ± 0.013 ¹⁾	0.756 ± 0.113 ¹⁾	0.283 ± 0.043 ²⁾
4	0.197 ± 0.014 ¹⁾	1.775 ± 0.033 ¹⁾	0.114 ± 0.003
8	0.191 ± 0.019 ¹⁾	4.235 ± 0.400 ²⁾	0.045 ± 0.004 ¹⁾

注: ¹⁾ $P < 0.01$ (低于对照组), ²⁾ $P < 0.01$ (高于对照组)

Note: ¹⁾ $P < 0.01$ (low vs control), ²⁾ $P < 0.01$ (high vs control)

3 讨论

t-PA、PAI-1 是内皮细胞释放的纤溶系统的关键物质, PAI-1 对 t-PA 有快速抑制效应,二者的动态平衡对调节纤溶系统起着决定性作用。任何影响 t-PA、PAI-1 动态平衡的因素,都能影响纤溶过程。此外, PAI-1 是血栓性疾病的一种危险因素,在缺血性疾病中起重要作用,升高的 PAI-1 能够影响溶栓药物的疗效。在我们的研究中发现,蝎毒素 IV 通过影响内皮细胞明显降低 PAI-1,即减少了 PAI-1 这一危险因素,同时在低剂量亦明显升高 t-PA/PAI-1 比值而表现纤溶

活性。可见,蝎毒素 IV 在低浓度就能经内皮细胞介导实现纤溶,即具有促内源性的纤溶作用;但在较高浓度时,纤溶活性趋于降低。通过更深入、全面研究,妥当掌握其有效剂量范围,有望使其成为一较理想纯天然的新型溶栓剂。

参考文献

- [1] Borne man J, Hanin R. Purification of protein toxin from leiurus quinquestriatus hebraeus that modify Na channels[J]. Toxicon, 1993 ;31(8) :1019 .
- [2] Gong J, Kini RM, Gwee MC, *et al*. Makatoxin I, a novel toxin isolated from the venom of scorpion Buthus Martensi Karsch exhibits nitrenergic actions[J]. J Biol Chem, 1997 ;272(13) :8320 .

- [3] 鲁子贤. 蛋白质和酶学研究方法[M]. 北京:科学出版社, 1989 :1 ~ 2 .
- [4] 鄂征主编. 组织培养和分子生物学技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 1995 :126 .
- [5] Mccirmack LJ , Semple JJ , Stickand MH , *et al*. The effect of number of days in culture and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G genotype on PAI-1 antigen release by cultured human umbilical vein endothelial cells[J]. Thromb Res, 1998 ;92 (5) :199 .
- [6] 王结义, 贾海燕, 宋后燕. 人血浆组织纤溶酶原激活剂及其抑制物活性的测定[J]. 中华医学检验杂志, 1989 ;12(3) :163 .

收稿日期:2002-09-04