

榆干离褶伞溶栓酶对内皮细胞损伤大鼠模型的保护作用

王玉娇, 周广亮, 沈明花*
(延边大学医学院, 延吉 133000)

摘要: **目的** 探讨榆干离褶伞溶栓酶对肾上腺素致血管内皮细胞损伤的保护作用。**方法** 采用注射肾上腺素结合冰浴的方法制备大鼠血管内皮细胞损伤模型, 检测血液循环内皮细胞数(CEC)和血浆血栓素 B₂ (TXB₂)、6-酮-前列腺素 E_{1α}(6-keto-PGE_{1α})、组织纤溶酶原激活物(t-PA)以及抗凝酶III(AT-III)的含量。**结果** 模型组的 CEC 和 TXB₂ 水平较正常组明显增高, 且 t-PA 和 AT-III 含量下降。用药组可减少 CEC 和 TXB₂ 水平, 提高 6-keto-PGE_{1α}、t-PA 和 AT-III 含量。**结论** 榆干离褶伞溶栓酶对血管内皮细胞起保护作用。

关键词: 榆干离褶伞; 溶栓酶; 血管内皮细胞

Protective effects of fibrinolytic enzyme from *Lyophyllum ulmarium* on vascular endothelial cells injury in rats

WANG Yu-Jiao, ZHOU Guang-Liang, SHEN Ming-Hua*
(Medical College of Yanbian University, Yanji 133000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the protective effect of fibrinolytic enzyme from *Lyophyllum ulmarium* on endothelial cell injury induced by adrenaline. **Methods** Rats were injected with adrenaline and made swim in ice-cold water. Then the number of circulating endothelial cells, and the levels of plasma thromboxane B₂ (TXB₂), 6-ketone-prostaglandin E_{1α} (6-keto-PGE_{1α}), tissue-plasminogen activator (t-PA) and anticoagulant enzyme III (AT-III) in plasma were measured. **Results** The number of circulating endothelial cells and TXB₂ were increased in model group, and the levels of t-PA and AT-III were decreased compared with the normal group. Compared with the model group, the numbers of circulating endothelial cells and TXB₂ content were decreased, and the levels of t-PA and AT-III were increased in treatment groups. **Conclusion** The fibrinolytic enzyme from *Lyophyllum ulmarium* presents the protective effect on vascular endothelial cells.

KEY WORDS: *Lyophyllum ulmarium*; fibrinolytic enzyme; vascular endothelium

1 引言

近年来, 随着食用菌生物活性的深入研究, 发

现有些食用菌具有溶栓活性, 并从中分离纯化了不同的溶栓酶^[1-3]。因食用菌中分离的溶栓酶具有安全性高、可以口服、比较经济等特点, 越来越受到研究

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760150, 81360088)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (30760150, 81360088)

*通讯作者: 沈明花, 博士, 主要研究方向为食用菌生物活性。E-mail: sdjjch@ybu.edu.cn

*Corresponding author: SHEN Ming-Hua, Ph.D., Medical College Yanbian University, Yanji 133000, China. E-mail: sdjjch@ybu.edu.cn

者的关注。但是目前,这些食用菌溶栓酶的研究大部分仅限于酶学特征及体外溶栓活性上,而在体内的溶栓机制方面的研究较少。

血栓的形成与诸多因素有关,如血管内膜损伤、血小板功能异常等。血管内皮细胞不仅作为血液和血管平滑肌之间的屏障,又作为机体最大的内分泌器官^[4],在调节血管紧张度、抗血小板聚集以及抗凝促纤溶等过程中起着重要的作用^[5]。因此,保护血管内皮细胞并调节其分泌功能对血栓性疾病的预防及治疗具有非常重要的意义。在先前研究中我们已从榆干离褶伞(*Lyophyllum ulmarium*)菌丝体中分离纯化了分子量约为 50 kDa 的溶栓酶,其在体外可水解纤维蛋白和纤维蛋白原^[6]。后续还发现其发酵液具有溶栓作用^[7]。在此基础上本文研究榆干离褶伞溶栓酶对血管内皮细胞影响,并从保护血管内皮细胞的角度阐明其溶栓机制。

2 材料与方 法

2.1 材 料

榆干离褶伞溶栓酶:由延边大学医学院生物化学与分子生物学研究室提供。

2.2 试 剂

Factor VIII 兔抗体、FITC-IgG 羊抗兔荧光二抗,购买自凯基试剂公司;血浆血栓素 B₂ (plasma thromboxane B₂, TXB₂)、6-酮-前列腺素 E_{1α} (6-ketone-prostaglandin E_{1α}, 6-keto-PGE_{1α})、组织纤溶酶原激活物(tissue-plasminogen activator, t-PA)以及抗凝酶III(anticoagulant enzyme III, AT-III)试剂盒,购自上海市严谨生物科技有限公司。

2.3 实验动物

180~220 g 体重范围的 SD 大鼠 48 只,雌雄不拘,由延边大学实验动物中心提供。

2.4 仪 器

奥林巴斯 BX53 倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯株式会社);RT-2100 型酶标仪(深圳雷杜公司)。

2.5 方 法

2.5.1 动物分组及给药

将大鼠随机分为 6 组,即正常组、模型组、阳

性对照组、用药高、中、低剂量组,每组 8 只。阳性对照组以 23 mg/100 g(以体质量计)剂量灌胃复方丹参片溶液,用药组按 5 mg/100 g、25 mg/100 g、50 mg/100 g(以体质量计)的剂量灌胃榆干离褶伞溶栓酶,正常组和模型组灌胃等容生理盐水,每日 1 次,连灌 7 d。用生理盐水将 1 mg/mL 的盐酸肾上腺素稀释 1.5 倍,以 0.05 mL/100 g 标准,于 d 3 开始每日的 8:00、12:00、16:00 给模型组、阳性对照组和用药组大鼠在皮下注射盐酸肾上腺素,正常组以生理盐水代替。连续注射 5 d,并在最后 2 天每 2 次注射间隔将大鼠放入冰水中 5 min,共 4 次。

终止给药后第 2 天,用 20%乌拉坦麻醉大鼠,心脏取血,用于血浆指标和循环内皮细胞数检测。

2.5.2 测定方法

以 Hladovec^[8]法和免疫荧光法^[9]检测循环内皮细胞,其他指标均按试剂盒说明书操作。

2.5.3 统计学处理

用 SPSS 统计软件处理,组间比较采用 *t* 检验,多组比较进行单因素方差分析,数据以均数±标准差表示。

3 结果与分析

3.1 循环内皮细胞数变化

如图 1 和表 1 所示,模型组的循环内皮细胞数(circulating endothelial cells, CEC)比正常组明显增多,两组具有显著性差异($P < 0.05$),这就提示肾上腺素结合冰浴的不良刺激引起大量血管内皮细胞的脱落,内皮细胞损伤大鼠模型复制成功。与模型组相比,阳性对照组和中、高剂量用药组的 CEC 显著减少,具有统计学意义,这就说明本实验中所用的剂量范围下复方丹参片和榆干离褶伞溶栓酶具有保护血管内皮细胞的功能。

3.2 榆干离褶伞溶栓酶对 6-keto-PGE_{1α}、TXB₂、t-PA 含量和 AT-III 活性的影响

结果表明,模型组 t-PA 含量和 AT-III 活性显著低于正常组,而 TXB₂ 水平高于正常组。用药组和阳性对照组的 6-keto-PGE_{1α}、AT-III 活性以及高剂量组的 t-PA 含量显著高于模型组,而 TXB₂ 水平下降(见表 2)。

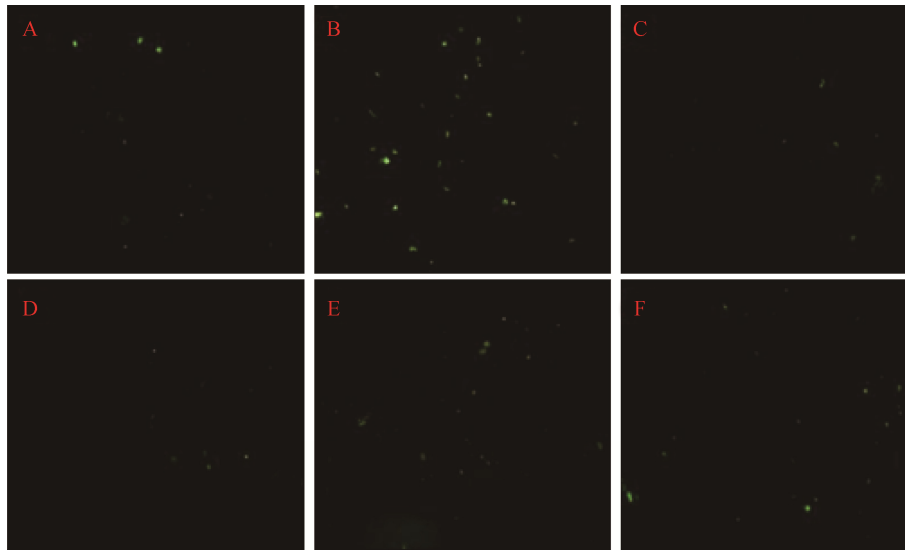


图 1 免疫荧光法观察循环内皮细胞数(×40)

Fig. 1 The number of circulating observed with immunofluorescence method(×40)

A: 正常组, B: 模型组, C: 阳性对照组, D: 低剂量组, E: 中剂量组, F: 高剂量组

A: normal group, B: model group, C: positive control group, D: low dose group, E: middle dose group, F: high dose group

表 1 *Lyophyllum ulmarium* 溶栓酶对循环内皮细胞数的影响

Table 1 The effect of fibrinolytic enzyme from *Lyophyllum ulmarium* on the number of circulating endothelial cells

组别	浓度(mg/100 g)	动物数(只)	循环内皮细胞数(×10 ³ /mL)
正常组	—	8	3.9 ± 0.7**
模型组	—	8	7.8 ± 0.9 [△]
阳性对照组	23	8	4.2 ± 0.9**
用药组	5	8	6.6 ± 1.4 ^{△△}
	25	8	5.4 ± 1.2**
	50	8	4.3 ± 1.00**

注: 与模型组相比, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$; 与阳性对照组相比[△]表示 $P < 0.05$, ^{△△}表示 $P < 0.01$

表 2 *Lyophyllum ulmarium* 溶栓酶对大鼠 6-keto-PGE_{1α}、TXB₂、t-PA 和 AT-III 的影响

Table 2 The effect of ibrinolytic enzyme from *Lyophyllum ulmarium* on levels of t-PA, AT-III, 6-keto-PGE_{1α} and TXB₂

组别	剂量(mg/100 g)	6-keto-PGE _{1α} (ng/L)	TXB ₂ (ng/L)	t-PA(μg/L)	AT-III(U/mL)
正常组	—	44.2±2.3	15.0±1.6**	9.2±0.4*	8.1±0.6**
模型组	—	42.2±2.1 [△]	19.5±2.0 [△]	8.5±0.5	6.2±0.5 ^{△△}
阳性对照组	23	48.3±4.8*	16.9±2.0*	9.0±0.5	8.3±0.5**
用药组	5	46.1±2.6*	18.3±2.6	8.5±0.4	7.7±0.6*** [△]
	25	50.5±3.3**	16.6±1.9**	8.8±0.5	8.2±0.7**
	50	49.8±4.1**	15.5±2.2**	9.5±0.6*** ^{△△}	8.2±0.6**

注: 与模型组相比, *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$; 与阳性对照组相比[△]表示 $P < 0.05$, ^{△△}表示 $P < 0.01$

4 讨论

血管内皮细胞在心脑血管性疾病的发生及治疗中发挥重要作用。很多因素影响血管内皮细胞的功能,如高血脂、高血糖、氧化应激及一些炎症性病变等。在本研究中采用肾上腺素结合冰浴的方法^[10]建立血管内皮细胞损伤动物模型,观察了榆干离褶伞溶栓酶对血管内皮细胞的保护作用。

血管内皮细胞是心、血管和淋巴管内膜上的一层扁平上皮细胞,在病理状态下可从血管壁脱落并进入血液循环,成为循环内皮细胞。正常情况下,外周血中循环内皮细胞的数量很少,而发生血管损伤、肿瘤、炎症、感染或心血管疾病等情况下其数量可明显增加,而这种数量的增加可反映血管内皮细胞损伤程度。目前认为,循环内皮细胞是特异而直接判断血管内皮细胞损伤的指标^[11-13]。本实验显示肾上腺素和冰浴的不良刺激使内皮细胞脱落增多,致模型组的循环内皮细胞数明显升高。肾上腺素具有强烈的缩血管作用,加上冰浴不良刺激产生的内源性肾上腺素水平升高,导致血管痉挛加重,血压升高,造成大鼠血管内皮细胞损伤并脱落进入血液循环。榆干离褶伞溶栓酶处理后,用药组的循环内皮细胞数降低,表明榆干离褶伞溶栓酶可减轻不良刺激对血管内皮细胞的损伤。我们的前期研究表明,榆干离褶伞具有抗氧化、抑制凋亡^[14,15]等生物学活性。由此我们认为,榆干离褶伞溶栓酶有可能通过此种机制抵抗肾上腺素、冰浴等不良刺激对血管内皮细胞的损伤。

在各种物理、化学因素的作用下血管内皮细胞受到损伤时,其分泌功能也随之发生变化。t-PA、PAI、AT-III和 PGI₂ 等作为血管内皮细胞分泌的活性物质,在抗凝促纤溶过程中起重要作用。当肾上腺素和低温刺激作用于血管内皮细胞时其分泌功能减弱,导致模型组血浆的 t-PA 和 AT-III活性下降,但对 PGI₂ 的代谢产物-6-keto-PGE_{1α} 水平的影响并不明显。本实验中我们还测定了 t-PA 的抑制剂 PAI 的含量,但因各组之间没有显著性差异所以没有列出其实验数据。与模型组相比,用药组血浆 6-keto-PGE_{1α}、t-PA 和 AT-III 水平升高,这就说明榆干离褶伞溶栓酶对血管内皮细胞的保护作用下,可以减轻不良刺激对血管内皮细胞分泌功能的影响。TXB₂ 的前体-TXA₂ 是强烈的缩血管物质,并具有活化血小板的作用^[1]。内皮细胞

分泌的 PGI₂ 通过一些机制使 TXA₂ 合成减少,从而抑制血小板聚集。本研究结果表明,用药组的 6-keto-PGE_{1α} 水平高于模型组,即用药以后 PGI₂ 水平升高。高水平的 PGI₂ 可抑制血小板磷脂酶 A₂ 和环加氧酶,致使 TXA₂ 合成减少,这就可解释用药组 TXA₂ 的代谢产物-TXB₂ 水平下降的原因。

综上所述,榆干离褶伞溶栓酶可调节内皮细胞的分泌功能,并具有保护血管内皮细胞的作用。此作用可能作为榆干离褶伞的抗血栓机制之一。

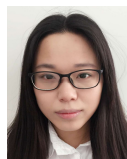
参考文献

- [1] Cha WS, Park SS, Kim SJ, *et al.* Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(16): 6475-6481.
- [2] Shen MH, Kim JS, Sapkota K, *et al.* Purification, characterization and cloning of fibrinolytic metalloprotease from *Pleurotus ostreatus* Mycelia [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(8): 1271-1283.
- [3] 沈明花, 金梅花, 金成. 黄侧耳溶栓酶的分离纯化及特性分析 [J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(9): 7-10.
Shen MH, Jin MH, Kim SJ. Purification of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Pleurotus cornucopiae* [J]. *Food Ferment Ind*, 2011, 37(9): 7-10.
- [4] Pries AR, Kuebler WM. Normal endothelium [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2006, 176 Pt1, 1-40.
- [5] 胡哲一, 王秋娟, 丁选胜. 动脉粥样硬化过程中内皮细胞功能障碍及药物治疗 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2006, 11(5): 481-484.
Hu ZY, Wang QJ, Ding XS. Review on endothelial dysfunction in atherosclerosis and drug therapy [J]. *Chin J Clin Pharm Therap*, 2006, 11(5): 481-484.
- [6] 沈明花, 金成俊. 榆干离褶伞溶栓酶的纯化及酶学性质研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(8): 45-47.
Shen MH, Kim SJ. Purification of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Lyophyllum ulmarium* [J]. *Food Ferment Ind*, 2007, 33(8): 45-47.
- [7] 沈明花, 彭瀛, 宋晓琳. 榆干离褶伞发酵液的溶栓与降血脂作用 [J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(10): 28-30.
Shen MH, Peng Y, Song XL. Studies on fibrinolytic and hypolipidemic function of *Lyophyllum ulmarium* fermentation broth [J]. *Food Ferment Ind*, 2011, 37(10): 28-30.
- [8] Hladovec J, Rossmann P. Circulating endothelial cells isolated together with platelets and the experimental modification of their counts in rats [J]. *Thromb Resh*, 1973, 3(6): 665-674.
- [9] 李凤文, 张立石, 刘红, 等. 水蛭、丹参及其复方对血瘀大鼠

- 血管内皮细胞保护作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 703-706.
- Li FW, Zhang LS, Liu Hong, *et al.* Study of protective effect of leech, radix salviae miltiorrhizae and its composite recipe on vascular endothelial cells in rats with blood stasis syndrome [J]. China J Chin Mate Medic, 2001, 26(10): 703-706.
- [10] 赵建宏, 林琳, 高继发, 等. SD 大鼠血管内皮细胞损伤模型的制作方法[J]. 微循环杂志, 2000, 10(2): 20-21.
- Zhao JH, Lin L, Gao JF, *et al.* To establish a model of vascular endothelial cell injury in SD rats [J]. Chin J Microcir, 2000, 10(2): 20-21.
- [11] Eleftheriou D, Ganesan V, Hong Y, *et al.* Endothelial injury in childhood stroke with cerebral arteriopathy: a cross-sectional study [J]. Neurology, 2012, 79(21): 2089-96.
- [12] 向平超, 阮英茆, 姚震, 等. 重度慢性阻塞性肺疾病稳定期患者血循环内皮细胞数量的变化[J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(10): 724-725.
- Xiang PC, Ruan YM, Yao Z, *et al.* Circulating endothelial cells in stable severe chronic obstructive pulmonary diseases [J]. Int J Respirat, 2007, 27(10): 724-725.
- [13] Zhang HX, Wang JX, Zhang ZB, *et al.* Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process [J]. Int J Pharm, 2009, 374: 106-113.
- [14] 孙权, 沈玉秀, 沈明花. 榆干离褶伞发酵液体外抗氧化性能研究[J]. 食品科技, 2010, 35(1): 156-158.
- Sun Q, Shen YX, Shen MH. Study on the antioxidant activity of *Lyophyllum ulmarium* medea *in vitro* [J]. Food Sci Technol, 2010, 35(1): 156-158.
- [15] 彭瀛, 周广亮, 沈明花. 榆干离褶伞发酵液对血管内皮细胞的保护作用[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(2): 177-180.
- Peng Y, Zhou GL, Shen MH. Protective effects of fermentation broth of *Lyophyllum ulmarium* on vascular endothelial cells [J]. J Food Sci Biotechnol, 2014, 33(2): 177-180.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



王玉娇, 硕士研究生, 主要研究方向为天然物质活性成分研究。
E-mail: 553214938@qq.com



沈明花, 副教授, 主要研究方向为食用菌抗血栓活性研究。
E-mail: sdjjch@ybu.edu.cn