

基于Notch信号通路的黄芩素抑制急性肺栓塞模型大鼠血小板聚集及肺组织保护作用机制研究[△]

吴忠勇*,王金忠#,周森,林明,王小智(海南医学院第二附属医院重症医学科,海口 570311)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)09-1091-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.09.13

摘要 目的:探索黄芩素抑制急性肺栓塞模型大鼠血小板聚集及肺组织保护作用的机制。方法:将36只大鼠随机分为正常对照组($n=6$)和造模组($n=30$),造模组大鼠采用自体血栓法复制急性肺栓塞模型,正常对照组大鼠行假手术。将造模成功的30只大鼠随机分为模型对照组、阳性药物组(低分子肝素钙0.01 mL/kg,皮下注射)和黄芩素低、中、高剂量组(25、50、100 mg/kg,腹腔注射),每组6只。正常对照组和模型对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,各给药组大鼠给予相应药物,每天1次,连续给药7 d。给药结束后,检测大鼠血浆二磷酸腺苷(ADP)和花生四烯酸(AA)活化后的血小板聚集率及血小板活化指数(RPI);采用苏木精-伊红染色法观察大鼠肺组织病理学变化;采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清中血小板活化标志物血小板颗粒膜蛋白(CD62P)和溶酶体颗粒膜蛋白(CD63)以及生长分化因子15(GDF-15)、N端B型利钠肽(NT-proBNP)水平;采用实时荧光定量聚合酶链式反应法检测大鼠肺组织中Notch2、Notch3及Notch信号配体DLL1、JAG2 mRNA表达水平;分别采用免疫组化法和Western blotting法检测大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2蛋白表达水平。结果:与正常对照组比较,模型对照组大鼠血浆ADP活化后血小板聚集率、AA活化后血小板聚集率、RPI值以及血清中CD62P、CD63、GDF-15、NT-proBNP水平均显著升高($P<0.05$);肺组织处于严重炎症浸润状态;肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 mRNA及蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。与模型对照组比较,黄芩素各剂量组大鼠上述指标变化均显著改善($P<0.05$)。结论:黄芩素能够降低急性肺栓塞模型大鼠血小板聚集,改善大鼠肺组织病理状态;其机制可能与激活Notch信号通路有关。

关键词 黄芩素;急性肺栓塞;Notch信号通路;血小板聚集;大鼠;机制

Study on Mechanism of Platelet Aggregation Inhibitory Effects and Lung Tissue Protective Effects of Baicalein in Model Rats with Acute Pulmonary Embolism Based on Notch Signaling Pathway

WU Zhongyong, WANG Jinzhong, ZHOU Sen, LIN Ming, WANG Xiaozhi (Dept. of Critical Medicine, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the mechanism of baicalein platelet aggregation inhibitory effect and lung tissue protective effect of baicalein in model rats with acute pulmonary embolism. METHODS: Totally 36 rats were randomly divided into normal control group ($n=6$) and modeling group ($n=30$). The acute pulmonary embolism model was established by autologous thrombus replication in modeling group, and the sham operation of rats in normal control group was carried out. After modeling, 30 model rats were randomly divided into model control group, positive drug group (low molecular weight heparin calcium 0.01 mL/kg, subcutaneous injection), baicalein low-dose, middle-dose and high-dose groups (25, 50, 100 mg/kg, intraperitoneal injection), with 6 rats in each group. Normal control group and model control group were intraperitoneally injected constant volume of normal saline; administration groups were given relevant medicine, once a day, for consecutive 7 d. After medication, platelet aggregation rates of rats after activated with adenosine diphosphate (ADP) and arachidonic acid (AA) and platelet activation index (RPI) were detected; lung histopathology was observed by HE staining; serum platelet activation markers granule membrane (CD62P) and lysosomal membrane glycoprotein (CD63), growth differentiation factor-15 (GDF-15) and N-terminal B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) were measured by ELISA. The mRNA expression levels of Notch2, Notch3 and Notch signaling ligand PLL1, JAG2 were detected by RT-PCR method. The protein expression levels of Notch2, Notch3, DLL1 and JAG2 in lung tissue were detected by immunohistochemistry and Western blotting assay. RESULTS: Compared with normal control group, plasma ADP-activated platelet aggregation rate, AA-activated platelet aggregation rate, RPI, serum levels of CD62P, CD63, GDF-15 and NT-proBNP were increased significantly ($P<0.05$). The lung tissue of rats was in a state of severe inflammatory infiltration. mRNA and protein expression levels of Notch2, Notch3, DLL1 and JAG2 in lung tissue decreased significantly ($P<0.05$). Compared with model control group, changes of above indexes of rats were improved significantly in baicalein groups ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Baicalein can reduce platelet aggregation and improve the pathological state of lung

[△] 基金项目:海南省自然科学基金面上项目(No.SQ2018MSXM-0270)

* 主治医师。研究方向:脓毒血症。E-mail:18610349@qq.com

通信作者:主治医师,硕士。研究方向:脓毒血症。E-mail:wj-zh269@163.com

tissue in rats with acute pulmonary embolism. Its mechanism may be related to activating Notch signal pathway.

KEYWORDS Baicalein; Acute pulmonary embolism; Notch signal pathway; Platelet aggregation; Rat; Mechanism

急性肺栓塞是指由于体循环的各种栓子脱落阻塞肺动脉及其分支引起肺循环障碍的临床病理生理综合征,其发病率仅次于冠心病及高血压,目前临床上主要采用低分子肝素进行治疗^[1-3]。Notch信号通路广泛存在于脊椎动物和无脊椎动物的多个物种之中,主要通过调控细胞分化、增殖和凋亡来影响细胞的正常生长,在调节机体内稳态中起重要作用^[4-5]。据相关文献报道,该信号通路及其相关蛋白的水平异常与肺组织的发育和损伤修复密切相关^[6-7]。黄芩素是从唇形科植物高黄芩(*Scutellaria altissima* L.)中提取分离得到的单体化合物。研究表明,黄芩素具有抗炎、抗免疫、抗氧化应激、抗肿瘤、修复肺组织损伤及保护肺功能等药理作用^[8-10]。随着研究的深入,还有学者发现黄芩素与地塞米松、长春新碱、来那度胺等药物联合使用后,能够通过调节Notch信号通路,进而发挥对白血病、骨髓瘤等疾病的治疗作用^[11]。但有关黄芩素对急性肺栓塞模型大鼠Notch信号通路的调节作用,目前尚无文献明确报道。因此,本研究通过考察黄芩素对急性肺栓塞模型大鼠血小板聚集的抑制及对肺组织的保护作用,并从Notch信号通路角度探讨其作用机制,为黄芩素的药理作用研究提供新的思路和参考。

1 材料

1.1 仪器

AD340型酶标仪(美国Beckman Coulter公司);DY-CZ-24DN型双垂直电泳仪、DYCZ-40G型转印电泳仪(北京海天友诚科技有限公司);T-100型聚合酶链反应(PCR)仪、Gel Doc XR型凝胶成像仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];DFC360 FX型荧光显微镜(德国Leica公司)。

1.2 药品与试剂

黄芩素对照品(武汉远启医药化工有限公司,批号:20180623,纯度: $>98\%$);低分子肝素钙注射液[葛兰素史克(中国)投资有限公司,批号:20180726,规格:0.5 mL];肝素(上海甄准生物科技有限公司,批号:20190622,纯度: $>98\%$);Notch2、Notch3兔单克隆抗体以及RIPA蛋白裂解液、超敏ECL化学发光试剂盒、RNA提取试剂盒、cDNA反转录试剂盒2X PCR Master Mix(碧云天生物科技有限公司,批号:AF7590、AF7592、P0013B、P0018S、R0011、D7170M、D7228);Notch信号配体DLL1兔单克隆抗体、Notch信号配体JAG2兔单克隆抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:20230-1-AP、19696-1-AP、10494-1-AP、SA00001-2);血浆二磷酸腺苷(ADP)溶液(上海榕柏生物技术有限公司,批号:RBX-82154);花生四烯酸(AA)溶液(上海沪峥生物科技有限公司,批号:HZD-2312);血小板颗粒膜蛋白(CD62P)、血小板溶酶体颗粒膜蛋白(CD63)酶联免疫

吸附(ELISA)检测试剂盒(上海博麦德生物技术有限公司,批号:201853062、201847218);生长分化因子15(GDF-15)、N端B型利钠肽(NT-proBNP)ELISA检测试剂盒(上海蓝基生物科技有限公司,批号:20352614、19263357);Notch2、Notch3、DLL1、JAG2、 β -肌动蛋白(β -actin)的特异性引物均由上海生物工程股份有限公司合成。

1.3 动物

清洁级健康成年SD大鼠36只,雄性,6周龄,体重(180 \pm 20)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0003。大鼠于温度(22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度(50 \pm 10)%的动物房中适应性喂养1周后进行实验。

2 方法

2.1 急性肺栓塞大鼠模型的建立

将36只SD大鼠随机分为正常对照组($n=6$)和造模组($n=30$)。参照文献方法^[12],造模组大鼠采用自体血栓法复制急性肺栓塞模型:先从小鼠自身眼眶静脉取血,制成直径为0.5 mm大小的颗粒状血栓混悬液;然后腹腔注射7%水合氯醛对大鼠进行麻醉,钝性分离右颈静脉,迅速从右颈总静脉注入0.5 mL血栓混悬液(约15~20个血栓)。当大鼠出现明显发绀和呼吸加快、加深时,则视为造模成功。正常对照组大鼠行假手术(除不注入血栓混悬液外,其余与造模组同法操作)。将造模成功的大鼠采用随机数字表法分为模型对照组、阳性药物组和黄芩素低、中、高剂量组,每组6只。黄芩素低、中、高剂量组大鼠分别腹腔注射25、50、100 mg/kg黄芩素^[13](以生理盐水为溶剂),阳性药物组大鼠皮下注射0.01 mL/kg低分子肝素钙^[14],正常对照组和模型对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,每天1次,连续给药7 d^[14]。末次给药24 h后进行各项指标检测。

2.2 大鼠血浆血小板聚集率和血小板活化指数(RPI)测定

自大鼠眼眶后静脉丛取血,置于含有肝素的抗凝管中,一部分血液样本以800 r/min离心10 min,取上清液,即得富血小板血浆(PRP);剩余部分血浆以3 000 r/min离心10 min,取上清液,即得贫血小板血浆(PPP)。对血浆中的血小板进行计数后,用PPP调PRP中血小板数至 $3\times 10^9\sim 4\times 10^9\text{ L}^{-1}$,然后取调节后血浆250 μL ,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中温育5 min,分别加入诱导剂ADP溶液(5 $\mu\text{mol/L}$)和AA溶液(5 mmol/L)各10 μL ,用血小板聚集仪测量血小板最大聚集率。另一部分血液样本分别用乙二胺四乙酸(EDTA)及含4%甲醛的EDTA溶液稀释,并通过全自动血细胞分析仪对血液样本中红细胞和血小板进行计数,然后计算PRI: $\text{PRI} = \frac{\text{血小板计数}_{(\text{EDTA})}}{\text{血小板计数}_{(\text{EDTA-4\%甲醛})}} \times K$ 。式中 K 为校正系数, $K = \frac{\text{红细胞计数}_{(\text{EDTA})}}{\text{红细胞计数}_{(\text{EDTA-4\%甲醛})}}$ 。

2.3 大鼠血清中CD62P和CD63水平检测

采用ELISA法进行检测。自大鼠眼眶后静脉丛取血,置于干净离心管中,4℃下静置4h,然后在4℃下以3500 r/min离心10 min。取上层血清,按照ELISA试剂盒说明书操作,检测血小板活化标志物CD62P和CD63水平。

2.4 大鼠血清中GDF-15和NT-proBNP水平检测

采用ELISA法进行检测。大鼠眼眶采血后,用7%水合氯醛进行麻醉,腹主动脉取血,置于干净离心管中,4℃下静置4h,然后在4℃下以3500 r/min离心10 min。取上层血清,按照ELISA试剂盒说明书操作,检测GDF-15和NT-proBNP水平。

2.5 大鼠肺组织病理学变化观察

采用苏木精-伊红染色(HE)法进行观察。大鼠腹主动脉取血后处死,迅速分离肺组织,用4℃预冷的生理盐水冲洗干净表面血液,并用滤纸吸干表面水分后,放入10%中性甲醛中固定24h,常规制备5μm组织切片并行HE染色后,在显微镜下进行组织病理学观察。

2.6 大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 mRNA表达水平检测

采用实时荧光定量PCR法进行检测。取大鼠肺组织,按照RNA提取试剂盒说明书操作提取总RNA,检验其纯度后,按反转录试剂盒说明书操作反转录合成cDNA后进行PCR扩增。PCR反应体系:cDNA 5μL,2X PCR Master Mix 10μL,上、下游引物各0.4μL,双蒸水定容至20μL。反应参数:95℃预变性10 min;95℃变性10 s,60℃退火20 s,72℃延伸20 s,40个循环。以β-actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 mRNA的表达水平。引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 引物序列及扩增产物长度

Tab 1 Primer sequence and amplification product length

基因	引物名称	引物序列	产物长度, bp
Notch2	正向引物	5'-GATTACAAGTTGCCGCCATC-3'	92
	反向引物	5'-CTTTGACCACCGTTCTCCTC-3'	
Notch3	正向引物	5'-CACCATCGGGAATGAACACTTC-3'	138
	反向引物	5'-CTGTGACGAATGCCTGGTA-3'	
DLL1	正向引物	5'-AGGAACAGGATGTCCAATCG-3'	219
	反向引物	5'-AAGGGCATCCACATCACTCGGT-3'	
JAG2	正向引物	5'-CAATCGGCTAAGAAGTCTGTC-3'	201
	反向引物	5'-AGGTGGGTACAGTGTAGCCT-3'	
β-actin	正向引物	5'-GTGATTCATGCCGACGGCAG-3'	186
	反向引物	5'-CAGGAGCATGGATTGGAGT-3'	

2.7 大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2蛋白表达水平检测

2.7.1 免疫组化法检测 将大鼠肺组织用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,常规制备3μm切片。切片常规脱蜡至水,以3%双氧水室温下封闭20 min,以枸橼酸盐缓冲液加热抗原修复,以5%胎牛血清(BSA)封闭,在37℃下

放置30 min;滴加Notch2、Notch3、DLL1、JAG2一抗(1:200),4℃过夜。次日使用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,依操作顺序加入二抗(1:100),37℃下孵育15 min, PBS冲洗;滴加辣根酶标记链霉卵白素(试剂C),37℃下孵育15 min, PBS冲洗;室温下以二氨基联苯胺(DAB)显色,封片。采用显微镜观察,在细胞质或细胞核内出现黄、棕色颗粒为阳性细胞,并根据染色强度计算免疫组化积分。将阳性细胞按染色强度进行评分:无色为0分,淡黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分(染色深浅需与背景比较)。再将阳性细胞按所占的百分比进行评分:阴性为0分,阳性细胞比例≤10%为1分,阳性细胞比例在>10%~50%之间为2分,阳性细胞比例在>50%~75%之间为3分,阳性细胞比例>75%为4分。两者评分的乘积即为免疫组化表达积分^[15]。

2.7.2 Western blotting法检测 取大鼠肺组织放入玻璃匀浆器中,加入RIPA蛋白裂解液(每20 mg组织加入200 μL蛋白裂解液),匀浆,直至充分裂解。将匀浆液在4℃下以12000 r/min离心10 min,将上清液移至另一干净离心管中,并加入上样缓冲液,混匀,100℃下水浴5 min,采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。取50 μg蛋白上样后,在300 mA、80 V条件下电泳至指示剂溴酚蓝迁移至分离胶与浓缩胶的分界处,调节电压为120 V,继续电泳至蛋白分离。根据蛋白质分子量切割目标蛋白,并在300 V、170 mA条件下转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。封闭液室温下封闭1 h,分别经Notch2、Notch3、DLL1、JAG2和GAPDH抗体(1:1000)孵育后,4℃下过夜。PBST充分洗膜后,加入二抗(1:2000),室温下孵育1 h。PBST清洗后显色液显影,采用凝胶成像仪成像,应用Image J软件进行灰度值检测,以目的蛋白条带与内参蛋白(GAPDH)条带的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件对数据进行分析,采用Graphpad Prism 5.0软件进行作图。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩素对急性肺栓塞模型大鼠血浆血小板聚集率及RPI的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠血浆ADP活化后血小板聚集率、AA活化后血小板聚集率及RPI值均显著升高($P < 0.05$)。与模型对照组比较,黄芩素各剂量组以及阳性药物组大鼠血浆ADP活化后血小板聚集率、AA活化后血小板聚集率及RPI值均显著降低($P < 0.05$),且黄芩素的作用呈现出一定的剂量依赖趋势。各组大鼠血浆血小板聚集率及RPI测定结果见表2。

3.2 黄芩素对急性肺栓塞模型大鼠血清中CD62P和CD63水平的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠血清中

表2 各组大鼠血浆血小板聚集率及RPI值测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Results of platelet aggregation rate in plasma and RPI of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	ADP活化后血小板聚集率, %	AA活化后血小板聚集率, %	RPI
正常对照组	26.48 ± 3.15	17.46 ± 2.58	40.61 ± 3.44
模型对照组	76.44 ± 4.66*	91.25 ± 2.28*	82.19 ± 4.01*
黄芩素低剂量组	60.19 ± 3.61*	79.73 ± 3.11*	71.11 ± 3.86*
黄芩素中剂量组	52.83 ± 3.17*	68.25 ± 2.13*	62.82 ± 2.97*
黄芩素高剂量组	43.86 ± 2.97*	60.88 ± 3.44*	48.11 ± 2.26*
阳性药物组	27.68 ± 4.05*	19.95 ± 3.73*	40.87 ± 3.96*

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, # $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model control group, # $P < 0.05$

CD62P、CD63水平显著升高($P < 0.05$);与模型对照组比较,黄芩素各剂量组以及阳性药物组大鼠血清中CD62P、CD63水平均显著降低($P < 0.05$),且黄芩素的作用呈现出一定的剂量依赖趋势。各组大鼠血清中CD62P、CD63水平测定结果见表3。

表3 各组大鼠血清中CD62P、CD63、GDF-15、NT-proBNP水平测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/mL}$)

Tab 3 Results of serum levels of CD62P, CD63, GDF-15, NT-proBNP of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6, \text{ng/mL}$)

组别	CD62P	CD63	GDF-15	NT-proBNP
正常对照组	9.28 ± 1.22	33.79 ± 2.17	19.82 ± 1.67	12.71 ± 0.84
模型对照组	22.66 ± 2.36*	59.71 ± 3.14*	31.36 ± 0.97*	19.71 ± 1.04*
黄芩素低剂量组	17.41 ± 1.03*	49.91 ± 2.67*	27.03 ± 1.41*	16.88 ± 1.12*
黄芩素中剂量组	14.38 ± 0.76*	41.08 ± 1.74*	24.13 ± 0.68*	14.08 ± 0.73*
黄芩素高剂量组	10.11 ± 1.13*	34.71 ± 2.59*	20.08 ± 1.37*	11.89 ± 1.06*
阳性药物组	9.77 ± 1.85*	34.03 ± 2.37*	21.27 ± 2.46*	13.38 ± 1.88*

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, # $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model control group, # $P < 0.05$

3.3 黄芩素对急性肺栓塞模型大鼠血清中GDF-15和NT-proBNP水平的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠血清中GDF-15、NT-proBNP水平显著升高($P < 0.05$);与模型对照组比较,黄芩素各剂量组以及阳性药物组大鼠血清中GDF-15、NT-proBNP水平均显著降低($P < 0.05$),且黄芩素的作用呈现出一定的剂量依赖趋势。各组大鼠血清中GDF-15、NT-proBNP水平测定结果见表3。

3.4 黄芩素对急性肺栓塞模型大鼠组织病理学的影响

正常对照组大鼠肺组织结构正常,未发现明显病理学变化。与正常对照组比较,模型对照组大鼠肺组织肺泡渗出较多,肺泡间隔内有炎性细胞浸润,可见肺组织水肿。与模型对照组比较,黄芩素低、中剂量组大鼠肺泡水肿减轻,但肺泡间隔内仍有大量炎性细胞聚集;黄芩素高剂量组及阳性药物组大鼠肺泡组织结构明显改善,肺泡渗出和间质炎症细胞浸润明显减少。各组大鼠肺组织病理学检查显微图见图1。

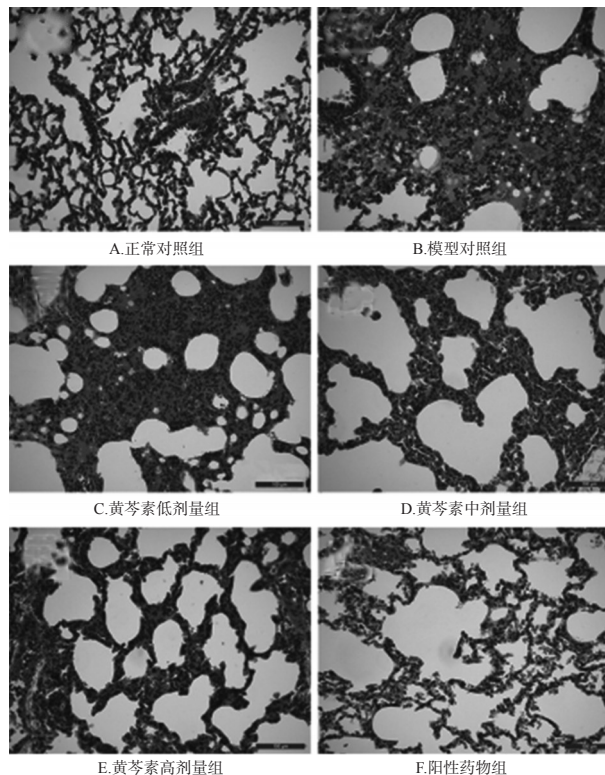


图1 各组大鼠肺组织病理学检查显微图(HE染色, ×100)

Fig 1 Pathological micrographs of lung tissue of rats in each group(HE staining, ×100)

3.5 黄芩素对急性肺栓塞模型大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 mRNA表达水平的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$);与模型对照组比较,黄芩素各剂量组及阳性药物组大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$),且黄芩素的作用呈现出一定的剂量依赖趋势。各组大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 mRNA表达水平测定结果见表4。

表4 各组大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 mRNA水平测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 4 Results of mRNA expressions levels of Notch2, Notch3, DLL1 and JAG2 in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Notch2	Notch3	DLL1	JAG2
正常对照组	3.63 ± 0.38	2.65 ± 0.26	5.98 ± 0.35	3.49 ± 0.28
模型对照组	0.86 ± 0.21*	0.65 ± 0.14*	1.06 ± 0.06*	0.65 ± 0.11*
黄芩素低剂量组	1.21 ± 0.16*	1.08 ± 0.09*	3.74 ± 0.25*	1.64 ± 0.17*
黄芩素中剂量组	2.19 ± 0.20*	1.56 ± 0.17*	4.51 ± 0.46*	2.29 ± 0.26*
黄芩素高剂量组	3.18 ± 0.37*	2.38 ± 0.36*	5.16 ± 0.26*	2.94 ± 0.34*
阳性药物组	3.54 ± 0.41*	2.45 ± 0.31*	5.68 ± 0.34*	3.15 ± 0.31*

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与模型对照组比较, # $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. model control group, # $P < 0.05$

3.6 黄芩素对急性肺栓塞模型大鼠肺组织中 Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型对照组大鼠肺组织中 Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$);与模型对照组比较,黄芩素各剂量组及阳性药物组大鼠肺组织中 Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 蛋白

表达水平均显著升高 ($P<0.05$),且黄芩素的作用呈现出一定的剂量依赖趋势。各组大鼠肺组织中 Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 蛋白表达免疫组化法检测染色显微图见图 2,免疫组化表达积分检测结果见表 5;上述蛋白表达 Western blotting 法检测电泳图见图 3,蛋白表达水平检测结果见表 6。

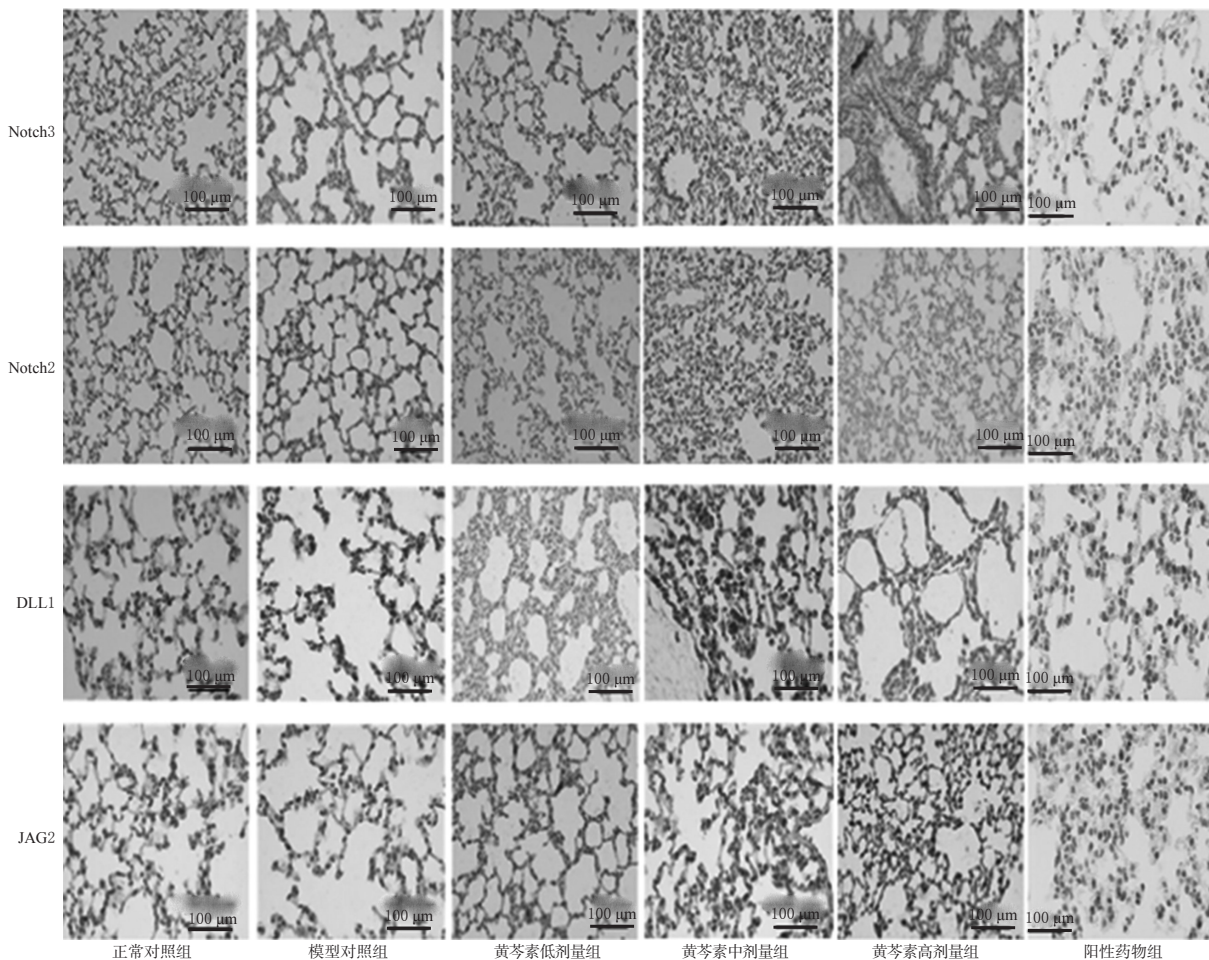


图 2 各组大鼠肺组织 Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 检测的免疫组化染色显微图 ($\times 100$)

Fig 2 Immunohistochemical micrographs of Notch2, Notch3, DLL1 and JAG2 in lung tissue of rats in each group ($\times 100$)

表 5 各组大鼠肺组织中 Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 蛋白表达的免疫组化积分检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 5 Immunohistochemical integration results of the protein expressions of Notch 2, Notch 3, DLL1 and JAG2 in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Notch2	Notch3	DLL1	JAG2
正常对照组	7.92 ± 0.34	8.62 ± 0.61	8.05 ± 0.53	7.89 ± 0.37
模型对照组	3.01 ± 0.46 [*]	3.18 ± 0.73 [*]	3.11 ± 0.43 [*]	3.60 ± 0.68 [*]
黄芩素低剂量组	5.82 ± 0.31 [#]	5.61 ± 0.44 [#]	6.05 ± 0.36 [#]	5.13 ± 0.55 [#]
黄芩素中剂量组	6.25 ± 0.48 [#]	7.73 ± 0.52 [#]	7.42 ± 0.48 [#]	7.43 ± 0.53 [#]
黄芩素高剂量组	7.84 ± 0.55 [#]	8.39 ± 0.48 [#]	8.04 ± 0.68 [#]	8.04 ± 0.61 [#]
阳性药物组	7.73 ± 0.51 [#]	8.30 ± 0.62 [#]	8.30 ± 0.66 [#]	8.12 ± 0.48 [#]

注:与正常对照组比较, $*P<0.05$;与模型对照组比较, $#P<0.05$

Note: vs. normal control group, $*P<0.05$; vs. model control group, $#P<0.05$

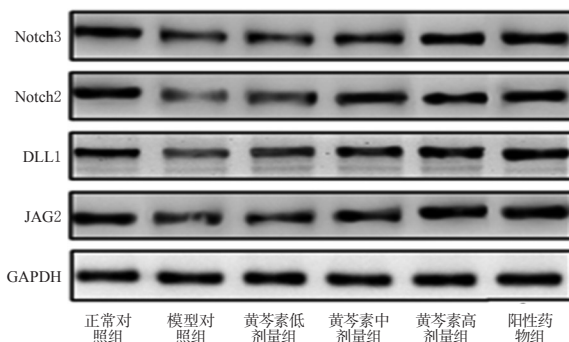


图 3 各组大鼠肺组织中 Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 蛋白表达电泳图

Fig 3 Electrophoretograms of Notch2, Notch3, DLL1 and JAG2 protein expressions in lung tissue of rats in each group

表6 各组大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2蛋白表达水平检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 6 Protein expression levels of Notch 2, Notch 3, DLL1 and JAG2 in lung tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Notch2	Notch3	DLL1	JAG2
正常对照组	1.05±0.13	1.13±0.09	0.93±0.12	1.08±0.11
模型对照组	0.35±0.08*	0.28±0.04*	0.32±0.02*	0.50±0.03*
黄芩素低剂量组	0.52±0.04 ^a	0.49±0.06 ^a	0.50±0.06 ^a	0.71±0.08 ^a
黄芩素中剂量组	0.74±0.11 ^a	0.75±0.07 ^a	0.73±0.09 ^a	0.87±0.09 ^a
黄芩素高剂量组	0.96±0.17 ^a	1.01±0.11 ^a	0.84±0.14 ^a	1.04±0.11 ^a
阳性药物组	0.92±0.12 ^a	1.00±0.13 ^a	0.91±0.13 ^a	1.06±0.10 ^a

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型对照组比较,^a $P<0.05$

Note: vs. normal control group, * $P<0.05$; vs. model control group, ^a $P<0.05$

4 讨论

急性肺栓塞患者体内血栓阻塞肺动脉后,一方面会伴有肺组织坏死等病理过程,进而导致疾病进一步恶化;另一方面,血栓会使肺组织血管的血流动力学发生改变,诱导血小板活化,引起血小板聚集,导致血栓进一步加重、肺组织坏死范围不断扩大^[1-3]。目前,临床常采用皮下注射低分子肝素的方法进行急性肺栓塞的治疗,故本研究采用低分子肝素钙作为阳性药物。GDF-15和NT-proBNP是心肌组织病理性损伤的重要标志物^[15]。急性肺栓塞发病后,通常会引起心肌组织细胞损伤、心衰等变化^[16]。研究表明,急性肺栓塞患者血清中GDF-15、NT-proBNP水平的升高会使患者的死亡风险增加^[2-5]。CD62P和CD63是血小板活化释放的特异性标志物,可反映机体血小板的活化程度及血栓形成倾向,CD62P、CD63的异常升高标志着机体内血小板的高度活化,可诱发或进一步加重血栓性疾病^[17]。

Notch通路的激活及信号传递是通过相邻细胞的Notch配体与受体的相互作用,Notch蛋白经过3次剪切,由胞内段(NICD)释放入胞质,并进入细胞核与转录因子CSL结合,形成NICD/CSL转录激活复合体,进而激活HES、HEY、HERP等碱性-螺旋-环-螺旋转录抑制因子家族的靶基因,从而发挥生物学作用^[4-7]。近年来的研究表明,Notch信号通路的表达异常与多种疾病的发生关系密切:Notch信号通路的过度激活可以诱发肺癌、肝癌等多种肿瘤细胞的增殖及血管生成,导致肿瘤进一步恶化、转移;同时,Notch信号通路相关蛋白的异常表达与心肌缺血再灌注损伤、脑梗死、肺纤维化、肾缺血再灌注损伤等多种疾病的发生密切相关^[4-5, 18]。Notch2、Notch3、DLL1、JAG2是Notch信号通路中重要的受体蛋白,其在哺乳动物肺组织中均有不同程度的表达,且参与肺泡、气道表皮细胞损伤修复等生理过程^[6-7]。

本研究结果显示,连续给药7 d后,黄芩素各剂量组大鼠血浆中ADP活化后血小板聚集率、AA活化后血小

板聚集率、RPI值、血清血小板活化标志物CD62P和CD63水平以及血清GDF-15、NT-proBNP水平均显著降低。这提示黄芩素能够显著降低急性肺栓塞模型大鼠的血小板颗粒膜蛋白水平、抑制血小板进一步活化聚集,进而抑制大鼠肺栓塞症状及肺栓塞的进一步加重,并且可修复急性肺栓塞引起的心肌细胞损伤,降低急性肺栓塞大鼠心衰等并发症发生的风险。组织病理学检查结果表明,黄芩素各剂量组大鼠组织病理学状态均有不同程度的改善。同时,黄芩素各剂量组大鼠肺组织中Notch2、Notch3、DLL1、JAG2 mRNA和蛋白表达水平均显著升高,这提示黄芩素能够升高急性肺栓塞模型大鼠肺组织Notch通路相关蛋白水平,改善急性肺栓塞疾病状态下Notch通路的过度抑制,激活Notch通路,恢复相关蛋白的正常表达,进而发挥对急性肺栓塞模型大鼠的改善作用。

综上所述,黄芩素能够抑制急性肺栓塞模型大鼠血小板的聚集,改善大鼠肺组织病理状态,其机制可能与激活Notch信号通路有关。

参考文献

- [1] 许坤,赵弘卿,冯金萍,等.低分子肝素钙和利伐沙班联合阿托伐他汀对急性肺栓塞患者相关指标的影响[J].中国药房,2017,28(21):2940-2943.
- [2] LEE DW, GOPALRATNAM K, FORD HJ, et al. The value of bedside echocardiogram in the setting of acute and chronic pulmonary embolism[J]. *Clin Chest Med*, 2018, 39(3):549-560.
- [3] KUSAYAMA T, FURUSHO H, KINOSHITA M, et al. Characteristics of synthesized right-sided chest electrocardiograms in patients with acute pulmonary embolism[J]. *J Cardiol*, 2019, 73(4):313-317.
- [4] ZHANG X, LU Y, WANG J, et al. Overexpression of Brg1 alleviates high glucose-induced retinal ganglion cell apoptosis through regulating Notch/Hes1 signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(4):1160-1166.
- [5] YE K, HE D, SHAO Y, et al. Exogenous mesenchymal stem cells affect the function of endogenous lung stem cells (club cells) in phosgene-induced lung injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(3):586-592.
- [6] WANG K, ZHANG H, ZHANG J, et al. Prediction of immune factors and signaling pathways in lung injury induced by LPS based on network analysis[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2019, 26(8):2068-2073.
- [7] BRUNO A, DI SANO C, LORUSSO F, et al. Notch-1 decreased expression contributes to leptin receptor downregulation in nasal epithelium from allergic turbinates[J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 2019. DOI: 10.1016/j.bbadis.2019.03.016.

沙苑子多糖促进兔半月板纤维软骨细胞增殖的作用机制研究[△]

沈骅睿^{1*}, 敖亮¹, 王立胜¹, 汪国友¹, 郝琦¹, 李婷²(1.西南医科大学附属中医医院关节外科, 四川泸州 646000; 2.西南医科大学药学院, 四川泸州 646000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)09-1097-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.09.14

摘要 目的:研究沙苑子多糖促进兔半月板纤维软骨细胞(以下简称“软骨细胞”)增殖的作用机制。方法:分离1月龄新西兰大白兔软骨细胞。将软骨细胞分为正常对照组(PBS)、阳性对照组(硫酸氨基葡萄糖,10 mg/mL)和沙苑子多糖高、中、低(40、20、10 mg/mL)剂量组,分组给药干预。采用光学显微镜观察软骨细胞的形态学特征;采用MTT法检测软骨细胞增殖抑制率,并用流式细胞术观察细胞周期;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测软骨细胞中Ⅱ型胶原蛋白(Col Ⅱ)、碱性磷酸酶蛋白(ALP)的表达水平;采用逆转录-聚合酶链式反应和Western blotting法检测转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、骨形态发生蛋白2(BMP-2)mRNA及蛋白的表达水平。结果:软骨细胞培养72 h后,细胞融合成单层,多数呈现细长梭型外观。与正常对照组比较,阳性对照组和沙苑子多糖高、中、低剂量组软骨细胞的增殖抑制率、G₁/G₀期细胞百分比均显著降低($P < 0.05$),S期细胞百分比和Col Ⅱ、ALP蛋白表达水平及TGF- β_1 、BMP-2 mRNA及蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,沙苑子多糖高剂量组软骨细胞的增殖抑制率、G₁/G₀期细胞百分比均显著降低($P < 0.05$),S期细胞百分比和Col Ⅱ、ALP蛋白表达水平及TGF- β_1 、BMP-2 mRNA及蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.05$);沙苑子多糖低剂量组软骨细胞的增殖抑制率、G₁/G₀期细胞百分比均显著升高($P < 0.05$),S期细胞百分比和Col Ⅱ、ALP蛋白及TGF- β_1 、BMP-2 mRNA和蛋白的相对表达水平均显著降低($P < 0.05$);沙苑子多糖中剂量组上述指标差异均无统计学意义。结论:沙苑子多糖可促进软骨细胞增殖,降低G₁/G₀期细胞百分比,促进细胞向S期转化;其作用机制可能与上调TGF- β_1 、BMP-2 mRNA及蛋白表达,促进Col Ⅱ、ALP蛋白表达水平升高有关。

关键词 沙苑子多糖;半月板;纤维软骨细胞;增殖;Ⅱ型胶原蛋白;碱性磷酸酶蛋白;转化生长因子 β_1 ;骨形态发生蛋白2;机制

- [8] 刘骥飞,苏刚,高娟,等.黄芩素神经保护作用机制的研究进展[J].中国临床药理学杂志,2019,35(21):2773-2776.
- [9] ZHOU YF, MAO SG, ZHOU MX. Effect of the flavonoid baicalein as a feed additive on the growth performance, immunity, and antioxidant capacity of broiler chickens[J]. *Poultry Sci*, 2019, 98(7):2790-2799.
- [10] DEGHANIFARD A, KAVIANI S, ABROUN S, et al. Various signaling pathways in multiple myeloma cells and effects of treatment on these pathways[J]. *Cl Lymph Myelom Leuk*, 2018, 18(5):311-320.
- [11] HAIJUN C, YU G, JIANLEI W, et al. Exploring therapeutic potentials of baicalin and its aglycone baicalein for hematological malignancies[J]. *Cancer Letters*, 2014, 354(1):5-11.
- [12] 黄立权,邝晶,王灵聪.姜黄素对急性肺栓塞大鼠TXA₂、CX3CR1、NF- κ B蛋白表达水平的影响[J].全科医学临床与教育,2018,16(5):489-492,504.
- [13] 朱迪颖,王畅,付乃洁,等.黄芩素对野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠血管壁增厚的抑制作用[J].中国病理生理杂志,2018,34(5):899-903.
- [14] 顾小飞,李恒,杨桐桦,等.低分子肝素通过促进SUMO2/31蛋白的表达及核转移对脑缺血再灌注大鼠发挥脑保护作用[J].第三军医大学学报,2017,39(11):1123-1129.
- [15] 刘露,胡天佑,胡晓晨,等.丹参川芎嗪注射液对急性肺栓塞大鼠血清生长分化因子-15及NT-proBNP的影响[J].临床肺科杂志,2019,24(10):1771-1774.
- [16] KUSAYAMA T, FURUSHO H, KINOSHITA M, et al. Characteristics of synthesized right-sided chest electrocardiograms in patients with acute pulmonary embolism[J]. *J Cardiol*, 2019, 73(4):313-317.
- [17] YE S, WANG H, ZHAO FH, et al. Evaluating platelet activation related to the degradation of biomaterials using molecular markers[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019. DOI:10.1016/j.colsurfb.2019.110516.
- [18] 李伟,卢军,阿依提拉·麦麦提江,等.刺山柑总生物碱对系统性硬皮病模型小鼠Notch通路的影响[J].中国药房,2019,30(23):3205-3209.

△ 基金项目:四川省科学技术厅与泸州市人民政府、泸州医学院联合科研专项资金计划项目(No.14JC0162)

* 副主任中医师。研究方向:关节置换及运动创伤。电话:0830-3161901。E-mail:aibowii@sina.com

(收稿日期:2019-12-31 修回日期:2020-02-21)

(编辑:林静)