

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.015.html>

## 同型半胱氨酸对实验性结肠炎大鼠 血栓调节蛋白和内皮细胞蛋白 C 受体表达的影响

陈 义, 丁少桢, 梅 俏, 刘晓明, 胡 静, 韩 玮, 许建明

**摘要** 目的 探讨同型半胱氨酸(Hcy)对实验性结肠炎大鼠结肠黏膜中可溶性血栓调节蛋白(sTM)、蛋白C(PC)、游离蛋白S(fPS)水平及血栓调节蛋白(TM)、内皮细胞蛋白C受体(EPCR)mRNA表达的影响。方法 SD大鼠分为正常组:组1[生理盐水(NS)皮下注射+NS灌肠]、组2(Hcy皮下注射+NS灌肠);TNBS模型组:组1(NS皮下注射+TNBS灌肠)、组2(Hcy皮下注射+TNBS灌肠)。实验结束时采用ELISA法检测大鼠结肠黏膜中sTM、fPS、PC水平,采用RT-qPCR法检测大鼠结肠黏膜中TM、EPCR mRNA的表达水平。结果 与TNBS模型组1相比,TNBS模型组2大鼠血浆及结肠Hcy水平均显著增高,大鼠结肠黏膜中sTM、PC和fPS水平降低( $P < 0.05$ ),大鼠结肠黏膜中TM、EPCR mRNA表达水平降低( $P < 0.05$ )。结论 Hcy可以加重大鼠结肠炎症损伤,其机制可能是影响PC的抗炎与抗凝功能,引起肠道微循环血栓前状态。

**关键词** 同型半胱氨酸;可溶性血栓调节蛋白;蛋白C;游离蛋白S;内皮细胞蛋白C受体

中图分类号 R 322; R 322.45; R 341.7; R 364.5; R 574.62; R 977.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1621-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.015

在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的病理生理过程中,肠道炎症合成的炎症介质加重炎症损伤,同时刺激内皮细胞激活机体凝血系统,形成血栓前状态,内皮细胞在炎症与血栓前状态之间具有重要作用。在生理条件下,由血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)、内皮细胞蛋白C受体(endothelial protein C receptor, EPCR)、蛋白C(protein C, PC)和蛋白S(protein S, PS)等组成的PC系统是机体调控凝血机制的重要途径。TM是表达于血管内皮细胞表面的一种糖蛋白, TM与凝血酶结合,在PS和EPCR的作用下激活PC转化为具有抗凝和抗炎作用的活性蛋白C(activated protein C, aPC)<sup>[1]</sup>。因此, PC途径在IBD的发病机制中发挥抗凝和抗炎的重要作用。同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含硫氨基酸,是体内蛋氨酸代谢的重要中间产物。IBD患者血栓性疾病发生率较高,可能与IBD患者血浆和结肠黏膜组织中Hcy含量增高有关<sup>[2]</sup>。研究<sup>[3-5]</sup>表明, Hcy可以损伤血管内皮细胞,引起血管

2016-06-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81470809); 安徽省自然科学基金(编号: 1308085MH146)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院消化内科, 合肥 230022

作者简介: 陈 义, 男, 主治医师, 硕士研究生;

梅 俏, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: meiqiao@hotmail.com

QLT0267(10 nmol/L) for 1 hour, then treated with TGF- $\beta$ 2(100 ng/L) for 48 h. The HLECs in the control group were cultured in serum-free medium. The expressions of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, p-Akt and p-GSK-3 $\beta$  were analyzed by Western blot. The expressions of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, p-Akt and p-GSK-3 $\beta$  were detected by cell fluorescence immunoassay. **Results** Compared with the control group, the expression of E-cadherin was decreased significantly, while the expressions of  $\alpha$ -SMA, p-Akt and p-GSK3 $\beta$  were increased significantly in TGF- $\beta$ 2 group. Compared with TGF- $\beta$ 2 group, the expressions of  $\alpha$ -SMA, p-Akt and p-GSK3 $\beta$  were decreased significantly, while the expression of E-cadherin was increased significantly in ILK inhibitor group( $F = 12.325, 17.686, 8.547, 6.812$ , all  $P < 0.001$ ). QLT0267 partly reversed TGF- $\beta$ 2 induced expressions of E-cadherin,  $\alpha$ -SMA, p-Akt and p-GSK3 $\beta$ . **Conclusion** These results suggest that Akt signal pathway mediated by ILK may be involved in the procedure of EMT of HLECs induced by TGF- $\beta$ 2. QLT0267 can specifically bind ILK and partly inhibit the process of EMT. Akt signal pathway may play an important role in the progress of PCO.

**Key words** ILK; Akt signal pathway; human lens epithelial cells; epithelial mesenchymal transition; transforming growth factor- $\beta$ 2

平滑肌细胞增生和血小板凝集等作用,同时 Hcy 参与血管内皮细胞炎症,上调血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) 和单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 的表达,促进 p38 磷酸化<sup>[6]</sup>。Hcy 作为促凝血因子,通过抑制 TM 和 EPCR 的表达,降低 PC 抗凝和抗炎作用,在心脑血管系统疾病的血栓形成过程中具有重要影响。由于 IBD 患者肠道黏膜中 Hcy 水平较高,并且微血栓形成在 IBD 病理进程中具有重要作用<sup>[7]</sup>,Hcy 是否通过影响肠道黏膜组织中微血栓形成过程中的相关因素如可溶性血栓调节蛋白 (soluble thrombomodulin, sTM)、PC、游离蛋白 S (free protein S, fPS) 及 EPCR 的表达,加重结肠炎症过程目前尚不明确,因此,该研究拟在建立大鼠三硝基苯磺酸 (trinitro-benzene-sulfonic acid, TNBS) /乙醇结肠炎模型的基础上,探讨 Hcy 对实验性结肠炎大鼠结肠黏膜中 sTM、PC、fPS 水平和 EPCR 表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与药品** SD 大鼠,SPF 级,雄性, (200 ± 20) g,由安徽医科大学实验动物中心提供,在室温、光照周期 12 h:12 h 条件下适应性饲养 1 周后使用。TNBS (货号:031M5021)、DL-同型半胱氨酸 (货号:121M39044) 均购自美国 Sigma 公司。

**1.2 实验分组** 大鼠分为 4 组,每组 8 只。正常组:组 1 [生理盐水 (NS) 皮下注射 + NS 灌肠]、组 2 (Hcy 皮下注射 + NS 灌肠);TNBS 模型组:组 1 (NS 皮下注射 + TNBS 灌肠)、组 2 (Hcy 皮下注射 + TNBS 灌肠)。各组给药剂量见下文。

**1.3 模型制备和给药方法** 参照文献<sup>[8]</sup>方法,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,用橡胶管经肛门插入大鼠结肠内约 8 cm,注入以等体积乙醇溶解的 TNBS (100 mg/kg) 溶液。正常组灌肠等体积 NS。DL-Hcy 溶于 NS,滴定 pH 至 7.4,参照文献<sup>[9]</sup>剂量自 TNBS 模型制备后第 1 天起皮下注射 Hcy (0.03 μmol/g),每天 2 次,间隔 8 h,连续 30 d。正常组 1 及 TNBS 模型组 1 皮下注射等体积 NS。

**1.4 标本采集** 大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,腹主动脉采血后以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液保存于 -80 ℃。分别切取远端结肠,沿纵轴剪开肠管,冰生理盐水冲洗干净后取部分结肠进行检测。

**1.5 样品检测** ELISA 法检测大鼠结肠黏膜中 sTM、PC、fPS 水平。实时荧光扩增检测 (Real-Time

quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 法检测大鼠结肠黏膜组织 TM 和 EPCR mRNA 表达:提取结肠黏膜组织 mRNA、去除基因组 DNA、合成 cDNA 后,按试剂盒说明书进行加样:95 ℃ 5 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 10 s 退火,72 ℃ 延伸,40 个循环。分析方法为:相对定量试验,分析指标为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。TM 引物序列 F: 5'-TGCAAAGGATGTGTTGTCT-3', R: 5'-ACGACCCATAGGACACTTCC-3',产物长度 122 bp; EPCR 引物序列 F: 5'-GGACACCTGTGTGCAG-TACC-3', R: 5'-TGAAACAGCCCATCAGGATA-3',产物长度 113 bp。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD/Dunnett-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠血浆和结肠黏膜组织中 Hcy 水平的变化** 与正常组 1 比较, TNBS 模型组 1 的大鼠血浆 (3.59 ± 0.49 vs 11.40 ± 0.94) 和结肠组织 Hcy (1.22 ± 0.10 vs 1.69 ± 0.20) 的水平明显增高 ( $P < 0.01$ )。与正常组 2 比较, TNBS 模型组 2 大鼠血浆 (20.73 ± 0.94 vs 2.26 ± 0.16) 及结肠组织 Hcy 水平 (23.44 ± 1.40 vs 3.06 ± 0.30) 显著增加 ( $P < 0.01$ )。各组血浆 Hcy 水平比较差异有统计学意义 ( $F = 432.915$ ,  $P < 0.01$ ); 各组结肠 Hcy 水平比较差异有统计学意义 ( $F = 69.819$ ,  $P < 0.01$ )。

**2.2 Hcy 对结肠炎大鼠结肠黏膜中 sTM、fPS 和 PC 水平的影响** 与正常组 1 相比, TNBS 模型组 1 大鼠结肠黏膜 sTM、PC 水平明显降低, fPS 水平亦降低,但差异无统计学意义,与 TNBS 模型组 1 相比, TNBS 模型组 2 大鼠结肠黏膜 sTM、PC、fPS 水平显著下降 ( $P < 0.05$ )。各组间 sTM 水平差异有统计学意义 ( $F = 5.633$ ,  $P < 0.01$ ); 各组间 PC 水平差异有统计学意义 ( $F = 6.97$ ,  $P < 0.01$ ); 各组之间 fPS 水平差异有统计学意义 ( $F = 10.542$ ,  $P < 0.01$ )。见表 1。

**2.3 Hcy 对结肠炎大鼠结肠黏膜中 TM 和 EPCR mRNA 表达的影响** 经单因素方差分析,各组结肠黏膜中 TM 和 EPCR mRNA 表达的差异有统计学意义 ( $F = 11.112$ ,  $P < 0.05$ )。见图 1、2。

## 3 讨论

正常血管内皮细胞表面表达 TM,与凝血酶结

表1 Hcy 对实验性结肠炎大鼠结肠黏膜 sTM、PC、fPS 水平的影响( $\mu\text{mol/L}$ ,  $n=8$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	sTM	PC	fPS
正常组 1	0.632 $\pm$ 0.022	1.042 $\pm$ 0.090	0.914 $\pm$ 0.083
正常组 2	0.556 $\pm$ 0.045 **	0.900 $\pm$ 0.062 **	0.835 $\pm$ 0.066
TNBS 模型组 1	0.554 $\pm$ 0.022	0.994 $\pm$ 0.083	0.847 $\pm$ 0.058
TNBS 模型组 2	0.508 $\pm$ 0.106 <sup>#</sup>	0.890 $\pm$ 0.081 <sup>#</sup>	0.746 $\pm$ 0.062 <sup>##</sup>

与正常组 1 比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TNBS 模型组 1 比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$

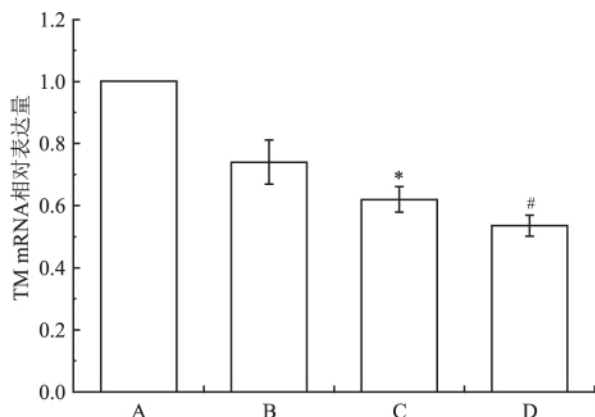


图1 Hcy 对实验性结肠炎大鼠结肠黏膜中 TM mRNA 表达的影响

A: 正常组 1; B: 正常组 2; C: TNBS 模型组 1; D: TNBS 模型组 2; 与正常组 1 比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 TNBS 模型组 1 比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$

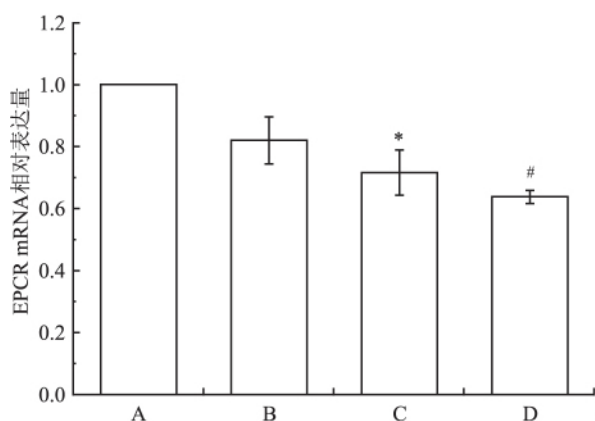


图2 Hcy 对实验性结肠炎大鼠结肠黏膜中 EPCR mRNA 表达的影响

A: 正常组 1; B: 正常组 2; C: TNBS 模型组 1; D: TNBS 模型组 2; 与正常组 1 比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 TNBS 模型组 1 比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$

合激活 PC 系统,形成 aPC 发挥抗凝和抗炎功能,PS 可增强 PC 的抗凝功能。aPC 具有抑制核转录因子 kappaB( NF- $\kappa$ B) 活性,降低血管内皮细胞凋亡和稳定血管内皮细胞屏障作用,抑制炎细胞对血管内皮细胞的黏附等<sup>[10]</sup>。降低 TM 表达可引起低水平 aPC,促进肠道局部炎症和凝血紊乱状态。炎症条件加重时,PS 和 PC 水平降低,凝血级联反应增强,炎性介质可引起血管内皮细胞合成和释放纤溶酶原激活抑制物,促进血栓形成。

IBD 具有局部微循环高凝和血栓前状态的特征,肠道炎症和凝血机制存在相互联系。肠道炎症通过合成促凝物质,抑制抗凝物质等机制加重微循环高凝状态,肠道炎症加重时可出现凝血物质水平改变,如包括凝血因子 V、VIII 以及 vWF 因子水平增加,抗凝物质(包括 PC、PS 以及抗凝血酶)水平降低以及纤溶系统紊乱。同时,凝血酶通过促进 MCP-1 合成以及 IL-6、IL-8 等炎症介质形成<sup>[2]</sup>。IBD 中肠道炎症与凝血功能是互相影响的生理和病理过程,通过 PC 系统调控肠道黏膜微血管炎症过程。研究<sup>[11]</sup>显示,IBD 患者肠道微血管 TM 及 EPCR 等表达降低,经 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  处理人肠微血管内皮细胞(HIMEC),发现 HIMEC 中 TM 和 EPCR 表达水平下降<sup>[12]</sup>。aPC 可通过抑制 TNF- $\alpha$  上调细胞黏附分子(CAM)表达发挥抗炎作用。因此,PC 系统对 IBD 肠道局部高凝状态和炎症具有重要的调节作用。

研究<sup>[13]</sup>表明,Hcy 处理血管内皮细胞可引起 VCAM-1 和 MCP-1 表达增加以及 p38 磷酸化,使血管内皮细胞与炎细胞更易黏附。同时,Hcy 可以改变血管屏障功能,引起组织因子(TF)表达增加,降低 TM、组织型纤溶酶元复合物(tPA)及 aPC 表达发挥促凝作用。Hcy 可以抑制人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中 TM 表达,降低 aPC 水平。有高 Hcy 血症的动物表现出 TM 活性降低,Hcy 同时影响 TM 活化,促进血栓形成<sup>[14]</sup>。

本研究显示,与 TNBS 模型组 1 比较,TNBS 模型组 2 大鼠结肠黏膜中 sTM、fPS、PC 水平降低,大鼠结肠黏膜中 TM 与 EPCR mRNA 表达降低,初步提示 Hcy 可能通过影响 PC 途径,引起肠道局部抗炎和抗凝功能紊乱,加重结肠炎大鼠肠道微循环高凝状态和炎症损伤,但 Hcy 如何调控肠道中 PC 途径的具体机制有待进一步研究,因此,降低 IBD 中肠道黏膜 Hcy 水平有助于改善肠道 PC 系统功能,可能成为调控肠道炎症的新靶点。

## 参考文献

[1] Lust M, Vulcano M, Danese S. The protein C pathway in inflam-

- matory bowel disease: the missing link between inflammation and coagulation[J]. *Trends Mol Med* 2008 ,14( 6) : 237 – 44.
- [2] Zazos P , Kouklakis G , Saibil F. Inflammatory bowel disease and thromboembolism [J]. *World J Gastroenterol* , 2014 , 20 ( 38 ) : 13863 – 78.
- [3] Austin R C , Lentz S R , Werstuck G H. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease [J]. *Cell Death Differ* , 2014 , 11( 1) : S56 – 64.
- [4] Ricart J M , Vayá A , Todolí J , et al. Thrombophilic risk factors and homocysteine levels in Behcet's disease in eastern Spain and their association with thrombotic events [J]. *Thromb Haemost* , 2006 , 95( 4) : 618 – 24.
- [5] Macy P A. Homocysteine: predictor of thrombotic disease [J]. *Clin Lab Sci* 2001 ,14( 4) : 272 – 5.
- [6] Danese S , Sgambato A , Papa A , et al. Homocysteine triggers mucosalmicrovascular activation in inflammatory bowel disease [J]. *Am J Gastroenterol* 2005 ,100( 4) : 886 – 95.
- [7] Bjerregaard L T , Norderby N J , Fredholm L , et al. Hyperhomocysteinemia , coagulation pathway activation and thrombophilia in patients with inflammatory bowel disease [J]. *Scand J Gastroenterol* , 2002 , 37( 1) : 62 – 7.
- [8] Morris G P , Beck P L , Herridge M S , et al. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon [J]. *Gastroenterology* , 1989 , 96( 3) : 795 – 803.
- [9] Scherer E B , da Cunha A A , Kolling J , et al. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage [J]. *Int J Dev Neuroscience* , 2011 , 29( 7) : 693 – 9.
- [10] D'Alessio S , Genua M , Vetrano S. The protein C pathway in intestinal barrier function: challenging the hemostasis paradigm [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2012 , 1258: 78 – 85.
- [11] Scaldaferri F , Sans M , Vetrano S , et al. Crucial role of the protein C pathway in governing microvascular inflammation in inflammatory bowel disease [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2012 , 52( 3) : 753 – 60.
- [12] Danese S , Papa A , Saibeni S , et al. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens [J]. *Am J Gastroenterol* 2007 ,102( 1) : 174 – 86.
- [13] Xu S , Song H , Huang M , et al. Telmisartan inhibits the proinflammatory effects of homocysteine on human endothelial cells through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\delta$  pathway. [J]. *Int J Mol Med* 2014 , 34( 3) : 828 – 34.
- [14] Harpel P C , Zhang X , Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis [J]. *J Nutr* , 1996 , 126( 4 Suppl) : 1285S – 9S.

## Effects of homocysteine on the expression of TM and EPCR in rats colitis

Chen Yi , Ding Shaozhen , Mei Qiao , et al

( *Dept of Gastroenterology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,  
The Key Laboratory of Digestive Diseases of Anhui Province , Hefei 230022* )

**Abstract Objective** To investigate the effects of homocysteine( Hcy) on level of soluble thrombomodulin( sTM) , protein C( PC) , free protein S( fPS) and mRNA expressions of thrombomodulin( TM) and endothelial protein C receptor( EPCR) in rats with experimental colitis. **Methods** SD rats were divided into 4 groups: normal group , normal + Hcy group , TNBS/ethanol group , TNBS/ethanol + Hcy group. Experimental colitis model with hyperhomocystinemia was established in rats with intracolonic administration of TNBS and subcutaneous injection of Hcy. The mRNA expression of TM and EPCR was detected by RT-qPCR method. The levels of sTM , PC and fPS in colon mucosa tissues of rats were measured by ELISA method. **Results** Compared with the normal group , the levels of Hcy in plasma and colon mucosa were increased remarkably in TNBS-induced colitis rats with Hcy injection simultaneously. Furthermore , the levels of sTM , PC and fPS in colon mucosa were decreased significantly. RT-qPCR method showed significant decrease in mRNA expressions of TM and EPCR in colon mucosa tissues in TNBS/ethanol + Hcy group. **Conclusion** Hcy could promote pathological damage in TNBS-induced colitis rats , which may be related to its effects on the anti-inflammatory and anticoagulation of PC system , resulting in prothrombosis condition in colonic mucosal microcirculation.

**Key words** homocysteine; soluble thrombomodulin; protein C; protein S; endothelial protein C receptor