

## 小檗碱抑制组织因子活性和静脉血栓形成的实验研究

陈 玲, 寇俊萍, 余伯阳\*

中国药科大学 中药复方研究室, 江苏 南京 211198

**摘要:**目的 研究小檗碱体内外对抑制组织因子(tissue factor, TF)活性和静脉血栓形成的影响。方法 采用肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )活化人单核细胞株 THP-1 细胞模型,应用发色底物法测定 TF 的促凝活性,Western blotting 检测 TF 蛋白表达,考察小檗碱体外对 TF 的作用;采用下腔静脉结扎致小鼠血栓模型,考察小檗碱体内给药对血浆 TF 活性及血栓形成的影响。结果 TNF- $\alpha$ (25 ng/mL)作用 5 h 能明显诱导 THP-1 细胞 TF 表达和活性增强,小檗碱(10~1 000 nmol/L)明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 TF 蛋白表达和促凝活性的增强,其 IC<sub>50</sub> 约 25.71 nmol/L;阳性药姜黄素 1 000 nmol/L 也具有明显抑制作用。小檗碱(1、10、100 mg/kg)单次 ig 给药,显著或非常显著降低下腔静脉结扎 6 h 致血栓模型小鼠升高的血浆 TF 促凝活性,并可明显减少血栓干、湿质量,阳性药华法林钠片 1 mg/kg 也有明显抑制作用。结论 小檗碱体内外给药均显著降低 TF 促凝活性及其蛋白表达,并可抑制 TF 相关的静脉血栓形成。

**关键词:**小檗碱;组织因子;THP-1 细胞;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;静脉血栓

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:0253-2670(2011)07-1389-04

## Inhibition of berberine on tissue factor activity and venous thrombosis

CHEN Ling, KOU Jun-ping, YU Bo-yang

Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

**Key words:** berberine; tissue factor (TF); THP-1 cells; tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); venous thrombosis

组织因子(tissue factor, TF)作为凝血级联反应的启动因子,是介导血栓形成和炎症反应的关键蛋白之一,参与深静脉血栓、动脉粥样硬化、肿瘤转移等多种重大疾病的发生与发展过程,干预 TF 途径已成为防治心血管疾病的一种新治疗策略<sup>[1-3]</sup>。小檗碱(berberine)是从黄连等中药中分离出的一种异喹啉类生物碱,具有抗炎、调血脂、抗肿瘤等广泛药理活性<sup>[4-7]</sup>,临床用于治疗心脑血管疾病,疗效确切<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究发现,小檗碱可抑制脂多糖(LPS)诱导的人外周血单核细胞 TF 促凝活性的增加<sup>[9]</sup>,鉴于肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )诱导的单核细胞表达 TF 在心血管疾病中的重要作用<sup>[10-11]</sup>,本研究拟考察小檗碱对 TNF- $\alpha$  诱导的人单核细胞株 THP-1 细胞的 TF 促凝活性及其蛋白表达的影响,继而观察其对 TF 参与的静脉血栓模型的效应,为阐释其防治心血管疾病提供新证据。

### 1 材料

#### 1.1 药物与试剂

小檗碱(质量分数 98%)、姜黄素(质量分数 98%),均为南京青泽医药科技开发有限公司产品;RPMI 1640 液体培养基(Hyclone 公司),胎牛血清(澳大利亚 PAA 公司),重组人肿瘤坏死因子- $\alpha$ (美国 HumanZyme 公司),凝血因子 Xa 发色底物(美国 Sigma 公司),人凝血酶原复合物(华兰生物工程股份公司),牛血清白蛋白(BSA,罗氏公司),TF 单克隆抗体(美国 R&D 公司),GAPDH(上海康城生物工程有限公司),HRP 标记的山羊抗小鼠第二抗体(武汉博士德生物工程有限公司),ECL 发光试剂盒(碧云天生物技术研究),华法林钠片(芬兰 Orion Corporation),其余试剂均为分析纯。

#### 1.2 细胞

THP-1 细胞(人外周血单核细胞株)购自中国

收稿日期:2010-11-01

基金项目:中国药科大学中央高校基本科研业务费专项资金重点项目(JKZ2009010)

作者简介:陈玲(1986—),女,江苏淮安人,硕士研究生,研究方向为中药物质基础与活性相关性研究。

Tel: (025)86185157 E-mail: chenling863@gmail.com

\*通讯作者 余伯阳 Tel: (025)81685158 E-mail: boyangyu59@163.com

科学院上海细胞生物研究所。

### 1.3 动物

雄性 ICR 小鼠, 清洁级, 体质量 25~30 g, 由扬州大学比较医学中心提供, 合格证号: SCXK(苏) 2007-0001。

### 1.4 仪器

细胞培养箱(德国 Heraeus 公司), 超净工作台(苏州苏净集团安泰公司), Z-323K 冷冻离心机(德国 Hermle 公司), 酶标仪 Sunrise(奥地利 Tecan 公司), 电泳仪、凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司), 电子分析天平(上海 Mettler Toledo 公司)。

## 2 方法

### 2.1 体外对 TF 活性的影响

**2.1.1 THP-1 细胞培养** THP-1 细胞以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基(含 50  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -巯基乙醇、2.05 mmol/L 谷氨酰胺、100 U/mL 青霉素、100  $\mu\text{g/mL}$  链霉素)在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。当细胞密度达到  $8 \times 10^5/\text{mL}$  时, 进行传代培养(离心法), 即以 1 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 沉淀用新鲜的 10% RPMI 1640 培养基以  $2 \times 10^5/\text{mL}$  的密度传代接种。

**2.1.2 诱导表达 TF** 将 THP-1 细胞用 10% RPMI 1640 培养基悬浮, 以  $1 \times 10^6/\text{mL}$  的细胞密度接种于 96 孔培养板(150  $\mu\text{L}/\text{孔}$ )或者 6 孔培养板(2 mL/孔), 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养 24 h 后, 吸取培养基, 换成无血清 RPMI 1640 培养基, 同步化 1 h。实验分为对照组、模型组、给药组。小檗碱不同浓度(10、100、1 000 nmol/L)或姜黄素 1 000 nmol/L 作用 1 h, 再加入 TNF- $\alpha$  (25 ng/mL), 共同孵育 5 h 后, 将 96 孔板内培养基吸去, 每孔加无血清 RPMI 1640 培养液 100  $\mu\text{L}$ , -70  $^{\circ}\text{C}$  至室温反复冻融 3 次, 待测。收集 6 孔板中的细胞, 加入适量细胞裂解液, 于冰上裂解 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 BCA 蛋白测定试剂盒测定, -70  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

小檗碱先溶于二甲基亚砜(DMSO)中, 配成 100 mmol/L 的高浓度母液, 临用前以 RPMI 1640 培养基稀释到所需浓度, DMSO 的最终体积分数均为 0.1%。

**2.1.3 TF 活性的测定** 吸取 45  $\mu\text{L}$  细胞裂解液接种于 96 孔板中, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 5 min, 加入新鲜配制的人凝血酶原复合物(PPSB)溶液(0.01 g/mL, 5  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 含有  $\text{CaCl}_2$  100 mmol/L), 温育 15 min, 再加入

新鲜配制的发色底物溶液(0.5 mmol/L, 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 含 100 mmol/L EDTA), 温育 3 min, 用酶标仪于 405 nm 测定吸光度(A)值<sup>[10]</sup>。

**2.1.4 Western blotting 测定 TF 蛋白表达** 总蛋白 40  $\mu\text{g}$  与样品缓冲液作用, 沸水变性 5 min 后, 以 12.5% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 再以 100 V 恒压转移至 PVDF 膜; 置于含有 3% BSA 的 PBST 溶液室温封闭 2 h; 再分别用相应的鼠抗人 TF 单克隆抗体(1:800)、GAPDH(1:5 000), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 次日用 PBST 洗涤 3 次, 10 min/次, 采用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(1:5 000), 室温孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次, 10 min/次, 加入 ECL 显色试剂, 置于凝胶成像系统中拍照保存。

### 2.2 体内对静脉血栓形成的影响

**2.2.1 下腔静脉结扎致小鼠血栓形成模型** 雄性 ICR 小鼠 48 只, 25~30 g, 随机分为 6 组, 每组 8 只, 分别为对照组(蒸馏水)、模型组(蒸馏水)、小檗碱(1、10、100 mg/kg)组和阳性对照华法林钠片(1 mg/kg)组。各组分别单次 ig 给药 1 h 后, ip 给予 4% 水合氯醛溶液(10 mL/kg)麻醉小鼠, 仰卧固定, 于腹正中线切开皮肤约 1.5 cm, 从腹白线切开腹膜, 分离下腔静脉, 于左肾静脉下方用粗丝线结扎下腔静脉, 缝合腹膜, 对照组分离下腔静脉后只穿线不结扎。6 h 后眼眶取血, 分离血浆待测; 并重新打开腹腔, 在结扎线下方 2 cm 处用止血钳夹住血管, 剪取该段血管, 观察有无血栓形成, 若已形成, 将血栓取出称湿质量, 然后放入烘箱内, 60  $^{\circ}\text{C}$  干燥 24 h, 称血栓干质量。

**2.2.2 小鼠血浆 TF 活性的测定** 取小鼠血浆, 按“2.1.3”项下方法测定 TF 的活性。

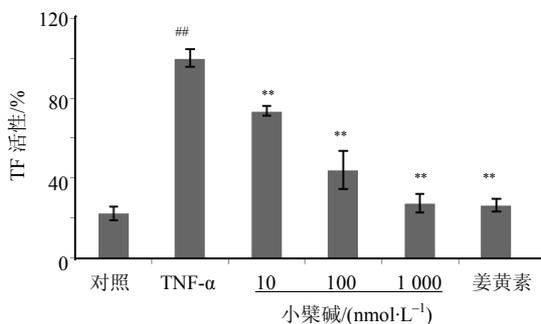
### 2.3 统计学分析

所有数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组数据比较采用方差分析。

## 3 结果

### 3.1 对 TNF- $\alpha$ 诱导的 THP-1 细胞 TF 促凝活性的影响

由图 1 可见, TNF- $\alpha$  (25 ng/mL) 刺激 THP-1 细胞 5 h 后, 能使其促凝活性非常显著地增加; 10~1 000 nmol/L 小檗碱可明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 THP-1 细胞 TF 活性, 与模型组比较, 具有非常显著差异 ( $P < 0.01$ ), 小檗碱对 TF 的  $\text{IC}_{50}$  为 25.71 nmol/L; 1 000 nmol/L 小檗碱与同浓度姜黄素的抑制率相当(分别为 93.45%、94.65%)。



与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$   
<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs TNF- $\alpha$  group

图 1 小檗碱对 TNF- $\alpha$  诱导的 THP-1 细胞 TF 促凝活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of berberine on TF procoagulant activity in THP-1 cells induced by TNF- $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.2 对 TNF- $\alpha$ 诱导的 THP-1 细胞 TF 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示 (图 2), TNF- $\alpha$  (25 ng/mL) 作用 5 h 后能明显增加 THP-1 细胞 TF 蛋白的表达, 当小檗碱 (10~1 000 nmol/L) 预处理 1 h, 再与 TNF- $\alpha$  (25 ng/mL) 共孵育 5 h 后, 能明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 THP-1 细胞 TF 蛋白的表达, 阳性对照药姜黄素 1 000 nmol/L 也呈明显抑制作用。

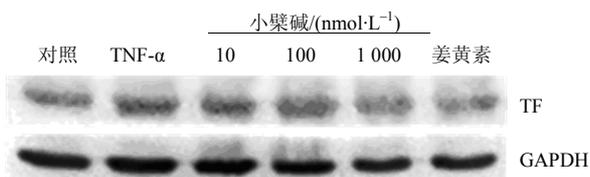


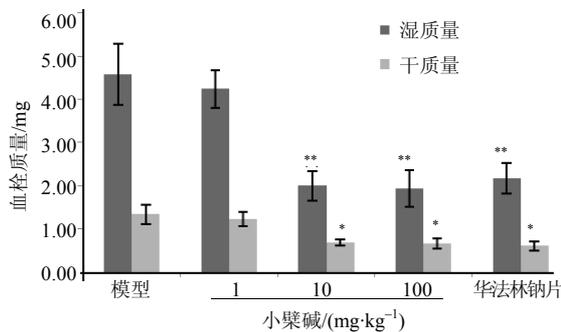
图 2 小檗碱对 TNF- $\alpha$  诱导的 THP-1 细胞 TF 蛋白表达的影响  
 Fig. 2 Effect of berberine on TF expression in THP-1 cells induced by TNF- $\alpha$

### 3.3 对下腔静脉结扎模型小鼠血栓形成的影响

由图 3 可见, 小檗碱 10、100 mg/kg 对小鼠下腔静脉结扎血栓形成均具有明显的抑制作用, 与模型组比较具有显著或非常显著的差异 ( $P < 0.05$ 、0.01)。阳性药华法林钠片 1 mg/kg 也能明显减少血栓质量。

### 3.4 对下腔静脉结扎模型小鼠血浆 TF 活性的影响

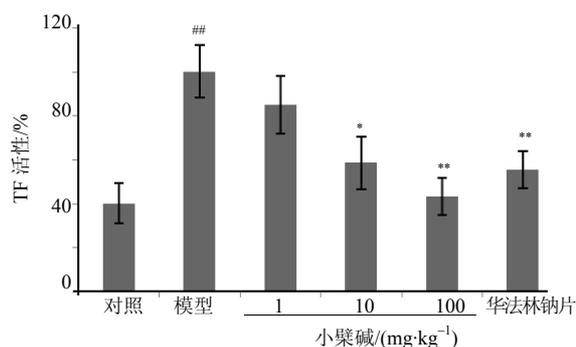
由图 4 可见, 下腔静脉结扎模型组小鼠血浆 TF 活性明显增强, 与对照组比较差异非常显著 ( $P < 0.01$ ); 10、100 mg/kg 小檗碱能使升高的 TF 活性明显下降, 高剂量组的抑制率为 95.00%; 阳性药华法林钠片 1 mg/kg 也能使升高的 TF 活性下降, 抑制率为 74.28%。



与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$   
<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

图 3 小檗碱对下腔静脉结扎模型小鼠血栓形成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Effect of berberine on venous thrombosis induced by IVC ligation in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )



与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$   
<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

图 4 小檗碱对下腔静脉结扎模型小鼠血浆 TF 促凝活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 Effect of berberine on plasma TF procoagulant activity in venous thrombosis induced by IVC ligation in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

## 4 讨论

单核细胞是血液循环中影响凝血和止血过程的主要细胞<sup>[11]</sup>, 在正常生理状态下, 单核细胞不能引发血液凝固, 但在 TNF- $\alpha$  等一些炎症介质及 LPS、佛波酯等刺激下, 可诱导单核细胞大量表达 TF, 介导动脉血栓、脓毒血症、肿瘤等多种疾病的病理过程。干预单核细胞 TF 表达或活性, 有利于上述疾病的防治<sup>[12]</sup>。

本实验首先采用 TNF- $\alpha$  诱导 THP-1 细胞, 考察了小檗碱体外给药对 TF 的影响。Western blotting 结果显示, 正常培养的 THP-1 细胞仅少量表达 TF, TNF- $\alpha$  25 ng/mL 刺激 5 h, 可明显上调 THP-1 细胞的 TF 表达; 小檗碱 10~1 000 nmol/L 可明显抑制

升高的 TF 表达。同时,也明显降低 TF 的促凝活性,其 IC<sub>50</sub> 约 25.71 nmol/L。与文献报道类似<sup>[13]</sup>,姜黄素也显示出明显的抑制 TF 活性,证实小檗碱体外加药具有显著抑制单核细胞表达 TF 作用。

已有研究显示,大鼠下腔静脉结扎可快速诱导 TF 表达增加<sup>[14]</sup>,临床深静脉血栓(DVT)患者单核细胞和血浆 TF 活性明显升高,二者呈正相关<sup>[15]</sup>,进一步证实单核细胞诱导的 TF 是诱导 DVT 的重要发病机制之一<sup>[16]</sup>。本实验采用下腔静脉结扎致小鼠血栓模型,考察小檗碱体内给药对 TF 的影响。结果显示,小檗碱 10、100 mg/kg 单次 ig 给药,可显著或非常显著降低 DVT 模型小鼠血浆升高的 TF 促凝活性,同时也明显抑制静脉血栓的形成。与已有研究类似<sup>[17]</sup>,口服抗凝血药华法林钠片也能够显著降低 TF 活性和血栓质量,证实小檗碱体内给药具有明显抑制 TF 活性和静脉血栓形成作用。

综上所述,抑制 TF 的表达及活性,可能是小檗碱防治心血管疾病的作用机制之一,该研究结果为其临床应用提供新的依据。小檗碱调节 TF 的信号转导途径值得深入研究。

#### 参考文献

- [1] Chu A J. Role of tissue factor in thrombosis. Coagulation-inflammation-thrombosis circuit [J]. *Front Biosci*, 2006, 11(1): 256-271.
- [2] Mackman N. The many faces of tissue factor [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(Suppl 1): 136-139.
- [3] Steffel J, Luscher T F, Tanner F C. Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications [J]. *Circulation*, 2006, 113(5): 722-731.
- [4] 王静,张艳军,常亮堂.小檗碱对 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 损伤大鼠皮层神经元的保护作用 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 728-733.
- [5] 章涛,李苾清,杨俊卿,等.小檗碱抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖及其与过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  的关系 [J]. *中草药*, 2009, 40(2): 244-247.
- [6] Jin J L, Hua G Q, Meng Z, *et al.* Antibacterial mechanisms of berberine and reasons for little resistance of bacteria [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(1): 27-35.
- [7] Sun Y, Xun K, Wang Y, *et al.* A systematic review of the anticancer properties of berberine, a natural product from Chinese herbs [J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20(9): 757-769.
- [8] Li B, Zhu W L, Chen K X. Advances in the study of berberine and its derivatives [J]. *Acta Pharm Sin*, 2008, 43(8): 773-787.
- [9] 孙祺,邵方娴,李晶晶,等.调节组织因子功能的中草药有效成分研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(3): 488-491.
- [10] Jiang W W, Kou J P, Zhang Z, *et al.* Effects of twelve representative flavonoids on tissue factor expression in human monocytes: structure-activity relationship [J]. *Thromb Res*, 2009, 124(6): 714-720.
- [11] Shantsila E, Lip G Y. Monocytes in acute coronary syndromes [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10): 1433-1438.
- [12] Zhang H, Park Y, Wu J, *et al.* Role of TNF- $\alpha$  in vascular dysfunction [J]. *Clin Sci*, 2009, 116(3): 219-230.
- [13] Pendurthi U R, Williams J T, Rao V M. Inhibition of tissue factor gene activation in cultured endothelial cells by curcumin. Suppression of activation of transcription factors Egr-1, AP-1, and NF-kappa B [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(12): 3406-3413.
- [14] Zhou J, May L, Liao P, *et al.* Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(6): 863-869.
- [15] Vieira L M, Dusse L M, Fernandes A P, *et al.* Monocytes and plasma tissue factor levels in normal individuals and patients with deep venous thrombosis of the lower limbs: Potential diagnostic tools? [J]. *Thromb Res*, 2007, 119(2): 157-165.
- [16] Lopez J A, Kearon C, Lee A Y. *Deep Venous Thrombosis* [M]. Washington: The American Society of Hematology, 2004.
- [17] Edwards R L, Schreiber E, Brande W. The effect of sodium warfarin on rabbit monocyte tissue factor expression [J]. *Thromb Res*, 1986, 42(2): 125-137.