

蛇毒三肽 pENW 对 LPS 诱导人脐静脉内皮细胞中 NOS 表达的影响

白莉¹, 宋宇², 方伟蓉³, 孔毅³, 李运曼^{3*}

(1. 河南中医学院 药学院, 郑州 450046; 2. 西峡县食品药品检验所, 河南 西峡 474500;
3. 中国药科大学 药学院, 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨焦谷氨酸-天冬酰胺-色氨酸(蛇毒三肽 pENW)对外脂多糖(LPS)诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护机制。方法:采用 LPS($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)模拟人脐静脉内皮细胞炎症损伤模型,实验分为空白组、LPS 模型组、蛇毒三肽 pENW 高、中、低剂量组($10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、N-甲基-L-精氨酸组(L-NMMA, $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);除空白组外,其余各试验组加入 LPS,蛇毒三肽 pENW 高、中、低剂量组和 L-NMMA 组同时给予不同浓度的药物,孵育 24 h 后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测人脐静脉内皮细胞活力;Griess Reagent 法用于检测一氧化氮(NO)的含量;比色法测定一氧化氮合酶(NOS)分型的活力;Western blot 分析内皮型一氧化氮合酶(eNOS),诱导型一氧化氮合酶(iNOS)蛋白表达的变化。结果:与空白组比较,模型组 LPS 显著性损伤人脐静脉内皮细胞并诱导 NO 大量释放,tNOS,iNOS 的活性明显增强($P < 0.01$),iNOS 蛋白表达显著上调($P < 0.01$),eNOS 的活性和蛋白表达并无差异;与模型组比较,蛇毒三肽 pENW 高、中、低剂量能够剂量依赖性的抑制 LPS 对人脐静脉内皮细胞的损伤,并且能够明显降低 NO 的释放,同时,蛇毒三肽 pENW 高、中、低剂量能够降低 LPS 诱导人脐静脉内皮细胞中的 tNOS,iNOS 的活性及 iNOS 的蛋白表达($P < 0.05, P < 0.01$),与 L-NMMA 组作用一致,但蛇毒三肽 pENW 对人脐静脉内皮细胞中 eNOS 的活性及蛋白表达无显著性影响。结论:蛇毒三肽 pENW 可降低 LPS 对人脐静脉内皮细胞的损伤作用,其保护机制可能与逆转 LPS 诱导的 iNOS 蛋白表达上调及 NO 的释放相关。

[关键词] 蛇毒三肽 pENW; 脂多糖; 人脐静脉内皮细胞; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0125-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020125

Effect of Snake Venom Tripeptide pENW on NOS Expression of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by LPS BAI Li¹, SONG Yu², FANG Wei-rong³, KONG Yi³, LI Yun-man^{3*} (1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Xixia Institute for Food and Drug Control, Xixia 474500, China; 3. Department of Physiology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of snake venom tripeptide pENW on the injury of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by lipopolysaccharide (LPS) *in vitro* and to explore its underlying mechanism. **Method:** HUVECs were treated with pENW ($10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NMMA ($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), then induced with LPS ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) for 24 h. The cell viability was evaluated by MTT assay. Nitric oxide (NO) content was measured by Griess Reagent. The nitric-oxide synthase (NOS) activity was assessed by commercially available kits. The NOS expression was measured by Western blot. **Result:** Compared with normal control group, vascular endothelial cells were obviously damaged and NO release increased by LPS, which could be protected by pENW in a concentration-dependent manner ($P < 0.05, P < 0.01$). L-NMMA and pENW could increase the cell viability rates and decrease NO production ($P < 0.05, P < 0.01$). Meanwhile, iNOS activity and protein expression were inhibited by pENW

[收稿日期] 20140703(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173088);河南省科技攻关重点项目(102102310320);河南中医学院博士科研基金(BSJJ2012-01)

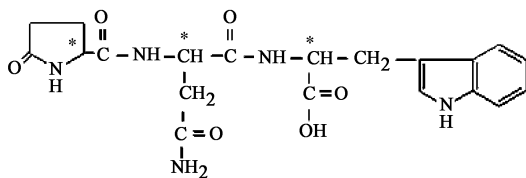
[第一作者] 白莉,博士,讲师,从事抗血栓药物研究,Tel:0371-65962746,E-mail:baili64@163.com

[通讯作者] *李运曼,博士,教授,从事心脑血管药理学研究,Tel/Fax:025-83271173,E-mail:yucaoren@sina.com

($P < 0.05$, $P < 0.01$). However, there was no significant effect on eNOS activity and protein expression. **Conclusion:** The results show that pENW has protective effect on HUVECs induced by LPS. Its mechanism may be related to the suppression of iNOS expression along with decreasing levels of NO and iNOS activity.

[Key words] pENW; lipopolysaccharide; human umbilical vein endothelial cells; nitric oxide; nitric-oxide synthase

血栓性疾病是常见病和多发病,其致残率和病死率居所有疾病之首,给社会和人民生活带来极大的危害。在众多抗血栓药物中,蛇毒提取物是重要的一类药物。蛇毒作为天然的药用资源,其主要成分为多种活性蛋白类或多肽类的酶,蛇毒中毒性物质的研究为治疗性药物的发现提供了新的思路。目前,蛇毒的有效成分中已经开发出多种治疗心脑血管疾病的药物,它们的主要药理作用包括抗凝血作用、溶栓和抑制血栓形成等。本研究受试药蛇毒三肽 pENW(焦谷氨酸-天冬酰胺-色氨酸,图 1)最初是从尖吻蝮蛇的蛇毒中提取发现,目前已能够采用化学方法进行人工合成。其相对分子质量小,结构简单,化学性质稳定。在前期研究中,笔者通过对多个结构类似的化合物进行盲法筛选,发现蛇毒三肽 pENW 显著性抑制血栓形成^[1-2],因此,蛇毒三肽 pENW 可能具有很大的开发前景,有潜力成为抗血栓的新型药物。前期的实验结果表明^[3-4],蛇毒三肽 pENW 能够有效抑制多种动物血栓模型中血栓的形成,同时蛇毒三肽 pENW 可减轻血栓形成部位的血管内皮细胞的损伤,表现为超微结构的改变^[1],但是蛇毒三肽 pENW 对血栓形成部位的血管内皮细胞的保护机制未深入研究。本研究拟在前期研究的基础上,采用 LPS 诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)模拟炎症损伤模型,评价蛇毒三肽 pENW 对血管内皮细胞炎症损伤的保护作用,通过考察蛇毒三肽 pENW 对人脐静脉内皮细胞中一氧化氮释放水平以及一氧化氮合酶表达的影响,为蛇毒三肽 pENW 成为新型抗血栓药物的开发提供理论依据。



* 手性碳分子
图 1 蛇毒三肽 pENW 的分子结构式
Fig.1 Molecular structure of pENW

1 材料

1.1 细胞株 人脐静脉内皮细胞株(HUVEC),南京凯基生物技术发展有限公司提供。

1.2 药物及试剂 蛇毒三肽 pENW(相对分子质量 429,中国药科大学生命科学与技术学院提供,纯度 99.95%)。小牛血清、DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(南京生兴生物技术有限公司,批号 0925S03),MTT(美国 Fluka 公司),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司),*N*-甲基-*L*-精氨酸组(*L*-NMMA,总 NOS 抑制剂)、RIPA 裂解液(强)、彩色预染蛋白质相对分子质量标准(上海碧云天生物技术研究所),一氧化氮合酶分型(NOS)试剂盒、一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20111025,20111031),诱导型一氧化氮合酶(iNOS),内皮型一氧化氮合酶(eNOS)一抗(美国 Santa Cruz 公司),PMSF,DTT,丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,SDS,TEMED,PMSF,DTT,溴酚蓝(美国 Amresco 进口分装)。AP,聚山梨酯 20(上海卓康生物科技有限公司),Tris-base(南京博全科技有限公司),甘氨酸(北京拜尔迪生物技术公司)。化学发光试剂 SuperSignal(吉泰生物科技有限公司),PVDF 膜(德国麦迪特公司)。

1.3 仪器 Model 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),IX70-81FZ 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),150i 型 CO₂ 细胞恒温培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),DYY-7C 型电泳仪电源,DYCZ-24 型双垂直蛋白电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞株,用含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养液,放入 CO₂ 孵箱中培养(37 °C,5% CO₂,95% 空气,保持一定湿度),于倒置显微镜下观察细胞生长情况,根据细胞生长情况,给予换液;约 1 ~ 2 d,细胞生长汇合成单层,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:3 或 1:4 传代。实验过程中采用生长汇合成单层的内皮细胞。

2.2 MTT 法测定蛇毒三肽 pENW 对 LPS 诱导 HUVEC 损伤的保护作用 细胞培养于 96 孔板,设空白对照组,LPS 模型组(经预实验确定终质量浓度

为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 蛇毒三肽 pENW 不同浓度给药组(终浓度分别为 $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。除空白组外, 其余各组再加入 LPS(空白组加入等容量 PBS), 蛇毒三肽 pENW 组同时再加入等容积不同浓度的蛇毒三肽 pENW, 空白组和模型组加入等容量 PBS, 药物与 LPS 共同孵育 24 h。MTT 显色测定反映细胞活力, 置于酶标仪上于波长 490 nm 处读取吸光度 A , 计算药物对细胞存活率的影响。存活率计算方法如下:

$$\text{存活率} = \frac{A_{\text{模型组或给药组}}}{A_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

2.3 对 LPS 诱导 HUVEC 损伤后 NO 含量及 NOS 分型活力的测定 取对数生长期的人脐静脉内皮细胞, 以 1×10^5 个/mL 密度接种于 50 mL 培养瓶中。实验分为空白组, 模型组, L-NMMA 组 ($5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 蛇毒三肽 pENW 高、中、低剂量组(终浓度分别为 $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 本实验给药及造模方式同 2.2。实验结束后收集上清液用于 NO 浓度的检测。收集细胞用于测定细胞内 NOS 的活力, 方法如下, 胰酶消化后收集细胞, 弃去上清, 将细胞重新悬浮于含 DTT, PMSF 的 PBS 中, 调整细胞数为 1×10^6 个/mL, 取 2 mL 在冰浴中以 40 Hz 超声波破碎细胞, 至显微镜下观察细胞膜完全破裂, 无完整细胞, 以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后留取上清备用。BCA 试剂盒测定总蛋白含量。实验按试剂盒说明书操作测定 NO 及 NOS。

2.4 Western blot 分析 eNOS, iNOS 蛋白表达的变化 按照 2.3 分组造模后, 收集细胞并提取蛋白用于 Western blot 测定 eNOS, iNOS 蛋白表达的变化, 方法如下, 胰酶消化、离心收集细胞, 弃上清液, 用冷的 PBS 洗涤 2 次, 每次 10 min。用移液枪吸弃上清后, 加 100 μL 含 PMSF 的裂解液冰上裂解 40 min, 其间反复吹打 3~4 次, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 将上清液转移至另一 1.5 mL 离心管中。细胞裂解后, 按照 BCA 蛋白测定试剂盒说明书检测蛋白质含量。取等量蛋白上样, 电泳条件为: 浓缩胶 60 V 电压, 分离胶电压 100 V。电泳至溴酚蓝刚跑出即可终止电泳, 进行转膜。小心将丙烯酰胺凝胶从玻璃板上剥离, 按尺寸剪取合适大小的滤纸及 PVDF 膜, 上下各 3 层滤纸, 中间为膜和胶, 胶在负极, 膜在阳极, 用细玻璃棒赶除气泡, 采用湿法转膜。将膜用 TBS 从下向上浸湿后, 移至含有封闭液(5% 脱脂奶粉 TBST 溶液)的平皿中, 室温下脱色摇床上摇动封闭 1 h, 以封闭 PVDF 膜的免疫球蛋白结合位

点。用 TBST 将膜上的残余液体洗干净, 然后用封口机将膜置于自封袋中, 封好后, 加入用 TBST 稀释至适当浓度的一抗, 尽可能排出气泡, 封闭袋口, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。剪开自封袋, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。然后将膜置于封闭袋中, 加入适量适当浓度的二抗, 封闭袋口, 室温下孵育 1 h。剪开自封袋, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。等体积混合化学发光试剂 A 液和 B 液, 将膜蛋白面向下与此混合液充分接触; 5 min 后, 用凝胶成像系统进行分析, 以吸光度值代表相应蛋白质的表达量, 将待测蛋白质表达量与内参照 β -actin 表达量进行对比, 表示蛋白质的相对表达水平。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 11.0 进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析。若组间有差异, 则各组之间用双尾的 Dunnett t 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 蛇毒三肽 pENW 对 LPS 诱导 HUVEC 损伤的保护作用 与空白组比较, 模型组内皮损伤较明显 ($P < 0.05$), 与模型组相比, 蛇毒三肽 pENW ($10^{-4} \sim 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够显著抑制 LPS 诱导的内皮损伤 ($P < 0.01, P < 0.05$), 蛇毒三肽 pENW 对血管内皮细胞具有保护作用, 能对抗 LPS 诱导的人脐静脉内皮细胞损伤(表 1)。

表 1 蛇毒三肽 pENW 对 LPS 诱导 HUVEC 损伤的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Protective effect of pENW on endothelial cells induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	浓度/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	存活率/%
空白	-	$0.408 \pm 0.043^{1)}$	100
模型	-	0.303 ± 0.071	62.5
pENW	10^{-4}	$0.434 \pm 0.056^{2)}$	89.4
	10^{-5}	$0.407 \pm 0.049^{1)}$	83.8
	10^{-6}	$0.376 \pm 0.040^{1)}$	77.5

注: 与模型组相比 $^{1)} P < 0.05, ^{2)} P < 0.01$ (表 2, 图 2, 3 同)。

3.2 对 LPS 诱导 HUVEC 损伤后 NO 释放及 NOS 活性的调节 与空白组比较, LPS ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与人脐静脉内皮细胞孵育后, 模型组 NO, 人脐静脉内皮细胞总 NOS (tNOS), 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的含量及活性明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, L-NMMA 组为非选择性 NOS 抑制剂, 能够显著抑制 iNOS 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 的活力, 从而抑制 NO 的释放 ($P < 0.01$)。蛇毒三肽 pENW 能显著性逆转 LPS 诱导的

NO 大量释放 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。蛇毒三肽 pENW 10^{-4} , 10^{-5} mol·L⁻¹ 能够抑制 LPS 诱导的

iNOS 的活力增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 蛇毒三肽 pENW 对 eNOS 活力的影响无统计学差异。见表 2。

表 2 蛇毒三肽 pENW 对 LPS 诱导 HUVEC 中 NO 释放及 NOS 活性的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of pENW on NO production from HUVEC induced by LPS by inhibiting iNOS activity ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	浓度/mol·L ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹	tNOS/U	iNOS/U	eNOS/U
空白	-	13.58 \pm 0.97 ²⁾	0.235 \pm 0.011 ²⁾	0.164 \pm 0.013 ²⁾	0.071 \pm 0.023
模型	-	21.36 \pm 2.03	0.424 \pm 0.019	0.340 \pm 0.045	0.084 \pm 0.029
L-NMMA	5×10^{-4}	13.00 \pm 3.30 ²⁾	0.223 \pm 0.035 ²⁾	0.170 \pm 0.022 ²⁾	0.054 \pm 0.017 ²⁾
pENW	10^{-4}	13.44 \pm 2.62 ²⁾	0.288 \pm 0.023 ²⁾	0.205 \pm 0.023 ²⁾	0.084 \pm 0.009
	10^{-5}	16.06 \pm 0.79 ²⁾	0.296 \pm 0.034 ¹⁾	0.229 \pm 0.015 ¹⁾	0.067 \pm 0.020
	10^{-6}	18.01 \pm 1.46 ¹⁾	0.337 \pm 0.042 ¹⁾	0.258 \pm 0.024	0.079 \pm 0.038

3.3 对 LPS 诱导 HUVEC 损伤后 eNOS/iNOS 蛋白表达的调节 与空白组相比, LPS 诱导内皮细胞损伤后, iNOS 的蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 蛇毒三肽 pENW 10^{-4} mol·L⁻¹ 可以显著抑制 LPS 诱导 iNOS 高表达 ($P < 0.01$); LPS 诱导内皮细胞损伤后, 内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 与空白组相比, 表达略有降低, 但无统计学差异, 蛇毒三肽 pENW 对 LPS 诱导内皮细胞的 eNOS 表达没有显著影响。蛇毒三肽 pENW 逆转 LPS 诱导的 iNOS 高表达与抑制 iNOS 的活性具有一致性。L-NMMA 为非选择性 NOS 的抑制剂, 对 LPS 诱导内皮细胞内 eNOS/iNOS 的表达均有显著的抑制作用。见图 2, 3。

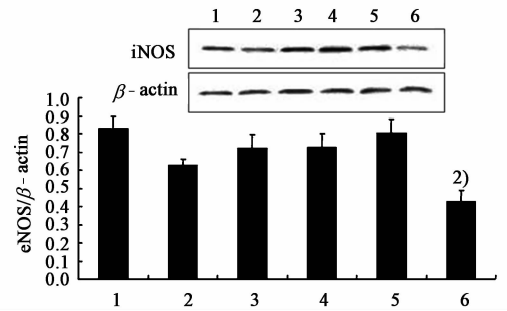
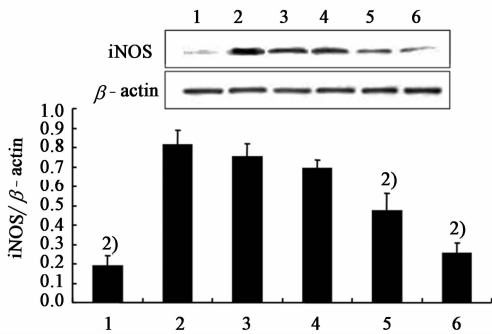


图 3 蛇毒三肽 pENW 对人脐静脉内皮细胞中 eNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effects of pENW on eNOS expression induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



1. 空白组; 2. 模型组; 3. 蛇毒三肽 pENW 10^{-6} mol·L⁻¹ 组; 4. 蛇毒三肽 pENW 10^{-5} mol·L⁻¹ 组; 5. 蛇毒三肽 pENW 10^{-4} mol·L⁻¹ 组; 6. L-NMMA 5×10^{-4} mol·L⁻¹ 组 (图 3 同)

图 2 蛇毒三肽 pENW 对 HUVEC 中 iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of pENW on iNOS expression induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

4 讨论

正常生理情况下, 血管内皮细胞在维持体内出血-血栓平衡中发挥着至关重要的作用。一方面, 内皮细胞提供抗凝血的表面, 阻止血小板的黏附和募集; 另一方面, 内皮细胞能够生成血管活性物质, 如 NO, 血管紧张素、内皮素和前列腺素等, 以保持血管张力从而保证适宜的器官血流^[5]。病理学研究证明, 血管内皮细胞的损伤是多种心脑血管疾病发生

的始动环节。引起内皮细胞损伤是一个复杂的病理过程, 参与的因素很多, 炎症与血管内皮细胞损伤关系密切。炎症细胞的浸润, 释放具有活性的氧代谢产物和蛋白水解酶, 引起内皮细胞的损伤或脱落, 加重血管壁的炎症反应, 进一步造成血管内皮细胞的损伤^[6-7]。目前研究表明内皮细胞功能的降低通常与内皮性 NO 生成的减少有关^[8], 而内皮细胞释放的 NO 对于维持血管内出血-凝血状态的稳定是至关重要的^[9]。NO 是一种生物信使分子, 分布于生物体内各组织中, 具有广泛的生物学活性, 其生成依赖于 NOS。NOS 有 3 个亚型, 包括 eNOS, iNOS 和神经型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS)。NO 能够调节血小板功能和血管张力, 有效地抑制血栓形成过程^[10]。血管中 NO 的生物活性与很多疾病的发生有关, 因此, 采用基因调控或药物促进 NO 生成有助于强化内皮功能并预防心血管并发症的发生, 有可能成为一种新的治疗血栓性疾病的手段^[11]。

本研究在细胞水平上评价了蛇毒三肽 pENW 对 LPS 诱导血管内皮细胞损伤的保护作用。实验选取了 LPS 模拟炎症因子损伤血管内皮细胞模型, 实验结果显示 LPS 作用后, 血管内皮细胞均出现了

不同程度的损伤改变,而其损伤作用可被蛇毒三肽 pENW 逆转,其保护作用与调节血管内皮细胞 NO 的释放和 NOS 表达水平有相关。

在正常生理条件下,eNOS 是血管系统内 NO 释放的主要催化酶^[12],NO 的含量增加可以舒张血管平滑肌,抑制血管平滑肌细胞增殖,抑制血小板活化,从而抑制血栓形成过程。而当感染因素(如 LPS)诱发炎症使血管内皮功能受损后,eNOS 表达或活性下降,内源性 NO 产生减少。但血管内皮细胞中 iNOS 表达量增多,继而打破了原先血管内皮细胞的平衡,由此产生大量 NO 自由基并与过氧阴离子反应形成过氧化亚硝酸盐,引起内皮细胞凋亡和组织损伤,促进血栓的形成和发展^[13]。在前期体内实验中^[3],蛇毒三肽 pENW 能够刺激 NO 的生成,这种作用与提高血管内皮组织中 eNOS 的活性相关。前期药效学结果提示蛇毒三肽 pENW 保护血栓形成过程中的内皮损伤与调节 NO 及 NOS 具有关联性。然而蛇毒三肽 pENW 如何调节内皮细胞 NO 的生成,对 NOS 各亚型有何种调节作用则需要进一步的研究。

在本研究中,蛇毒三肽 pENW 能够抑制 LPS 诱导的 NO 释放和 iNOS 活性上调;Western blot 结果也显示,蛇毒三肽 pENW 可以有效抑制 LPS 诱导的 iNOS 蛋白表达上调,而对 eNOS 的蛋白表达影响不大。综合体内、外实验结果,提示蛇毒三肽 pENW 可能通过调节不同的 NOS 亚型的活性,双向调节 NO 在血管壁的释放;生理情况下,蛇毒三肽 pENW 可上调 eNOS 的活性,促进 NO 释放,从而维持适宜的血管张力和器官血流灌注量;病理情况下,如感染发生时,蛇毒三肽 pENW 可下调 iNOS 活性,抑制 NO 的大量释放,从而减轻 NO 引起的细胞凋亡和组织损伤。这说明蛇毒三肽 pENW 可以调节血管内皮细胞中的双向调节分子,平衡血管细胞的稳态,从而维持正常的血管内皮细胞功能。

综上所述,本研究提示蛇毒三肽 pENW 能够逆转 LPS 诱导的 iNOS 表达上调及 NO 的释放,对 eNOS 的影响不大。因此蛇毒三肽 pENW 可以平衡内皮细胞的功能紊乱,对内皮细胞的炎症损伤具有保护作用。由于 LPS 信号转导通路复杂,涉及信号分子众多,蛇毒三肽 pENW 对 iNOS 的信号通路调节以及是否同时影响其他炎症因子尚有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Xiong J, Fang W, Bai L, et al. Anticoagulant and antithrombotic activity of a new peptide pENW (pGlu-

Asn-Trp) [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61(1): 89-94.
[2] Xiong J, Bai L, Fang W, et al. New peptide pENW (pGlu-Asn-Trp) inhibits platelet activation by attenuating Akt phosphorylation [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45(5):552-558.
[3] 白莉, 钮晓淑, 熊晶, 等. 蛇毒三肽 pENW 对 FeCl₃ 诱导的大鼠动脉血栓形成的抑制作用及其机制 [J]. *中国药科大学学报*, 2012, 43(1):75-78.
[4] 熊晶, 白莉, 方伟蓉, 等. 蛇毒三肽 pENW 对血管内皮的保护作用及机制探讨 [J]. *药学进展*, 2011, 35(8):367-372.
[5] Rex S, Beaulieu L M, Perlman D H, et al. Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 102(1):97-110.
[6] Yang Y, Shin H C, Kim S H, et al. 6,6'-Bieckol, isolated from marine alga *Ecklonia cava*, suppressed LPS-induced nitric oxide and PGE production and inflammatory cytokine expression in macrophages; the inhibition of NFkappaB [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(3):510-517.
[7] Hwang J S, Lee S A, Hong S S, et al. Phenanthrenes from *Dendrobium nobile* and their inhibition of the LPS-induced production of nitric oxide in macrophage RAW 264.7 cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(12):3785-3787.
[8] John S, Schlaich M, Langenfeld M, et al. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients; a randomized, placebo-controlled, double-blind study [J]. *Circulation*, 1998, 98(3):211-216.
[9] Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis [J]. *Nature*, 2008, 451(7181):914-918.
[10] Stancu C, Toma L, Sima A. Dual role of lipoproteins in endothelial cell dysfunction in atherosclerosis [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(2):433-446.
[11] Stewart M W. The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology [J]. *Mayo Clin Proc*, 2012, 87(1):77-88.
[12] Qin W, Chen X, Liu P. Inhibition of TGF-beta1 by eNOS gene transfer provides cardiac protection after myocardial infarction [J]. *J Biomed Res*, 2010, 24(2):145-152.
[13] Tamura E K, Cecon E, Monteiro A W, et al. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells [J]. *J Pineal Res*, 2009, 46(3):268-274.

[责任编辑 周冰冰]