·论著·

黄连素剂量依赖性抑制脂多糖刺激下大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞促凝和纤溶抑制因子的表达

李想 杨贵霞 沈锋 郑兴昊 何天慧 李书文 程玉梅 李清 李伟 秦进成
贵州医科大学附属医院重症医学科，贵阳 550004
通信作者：沈锋，Email：docotorshenfeng@163.com

【摘要】 目的 探讨黄连素对脂多糖（LPS）刺激下大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞（AECⅡ）表达及分泌促凝和纤溶抑制相关因子的影响。**方法** 体外培养大鼠AECⅡ细胞株RLE-6TN，取对数生长期细胞，用细胞增殖与毒性检测试剂盒（CCK-8）检测黄连素对细胞的毒性作用，根据半数抑制浓度（IC_{50}）确定药物浓度范围。将对数生长期细胞分为5组：空白对照组使用DMEM培养基常规培养；LPS组在培养基中加入5 mg/L的LPS刺激细胞；黄连素预处理组先分别加入20、50、80 μmol/L黄连素预处理1 h后，再加入5 mg/L的LPS共培养。LPS刺激24 h后收集细胞，采用蛋白质免疫印迹试验（Western blotting）及实时荧光定量反转录-聚合酶链反应（RT-qPCR）检测细胞组织因子（TF）、组织因子途径抑制物（TFPI）、纤溶酶原激活物抑制剂-1（PAI-1）的蛋白和mRNA表达；采用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测细胞上清液中活化蛋白C（APC）、Ⅲ型前胶原肽（PⅢP）、凝血酶-抗凝血酶复合物（TAT）及抗凝血酶Ⅲ（ATⅢ）的含量。**结果** 根据抑制率曲线计算得出黄连素对RLE-6TN细胞的IC_{50}为81.16 μmol/L，故选择20、50、80 μmol/L作为黄连素的干预浓度。与空白对照组相比，LPS刺激24 h后RLE-6TN细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制相关因子异常，表现为TF、PAI-1的蛋白及mRNA表达水平均明显升高，TFPI的蛋白及mRNA表达水平明显降低；同时细胞上清液中APC、ATⅢ含量均明显降低，而PⅢP、TAT含量均明显升高。给予黄连素预处理后，LPS刺激诱导的RLE-6TN细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制相关因子异常情况得到纠正，并呈现一定的剂量依赖性，以80 μmol/L时作用更为显著；与LPS组相比，黄连素80 μmol/L预处理组细胞中TF、PAI-1的蛋白及mRNA表达水平均明显降低〔TF蛋白（TF/GAPDH）：0.45±0.02比0.55±0.03，TF mRNA（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）：0.39±0.08比1.48±0.11，PAI-1蛋白（PAI-1/GAPDH）：0.37±0.02比0.64±0.04，PAI-1 mRNA（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）：1.14±0.29比4.18±0.44，均$P<0.01$〕，TFPI蛋白及mRNA表达水平明显升高〔TFPI蛋白（TFPI/GAPDH）：0.53±0.02比0.45±0.02，TFPI mRNA（$2^{-\Delta\Delta Ct}$）：0.94±0.08比0.40±0.05，均$P<0.01$〕；同时细胞上清液中APC、ATⅢ含量明显升高〔APC（μg/L）：1 358.5±26.0比994.2±23.1，ATⅢ（μg/L）：118.0±7.4比84.4±2.7，均$P<0.01$〕，而PⅢP和TAT含量则均明显降低〔PⅢP（μg/L）：11.2±0.4比18.6±0.9，TAT（ng/L）：222.1±2.8比287.6±7.0，均$P<0.01$〕。**结论** 黄连素可以剂量依赖性抑制LPS刺激下大鼠AECⅡ细胞促凝及纤溶抑制相关因子表达和分泌，促进抗凝因子表达和分泌，有望成为有效防治急性呼吸窘迫综合征（ARDS）肺泡过度促凝和纤溶抑制的新靶点。

【关键词】 黄连素； 大鼠； 肺泡上皮细胞，Ⅱ型； RLE-6TN细胞； 急性呼吸窘迫综合征； 凝血/纤溶
基金项目：贵州省科技计划项目（2019-1261）
DOI：10.3760/cma.j.cn121430-20200917-00636

Berberine dose-dependently inhibits the expression of procoagulant and fibrinolytic inhibitory factors in lipopolysaccharide-induced rat type Ⅱ alveolar epithelial cells

Li Xiang, Yang Guixia, Shen Feng, Zheng Xinghao, He Tianhui, Li Shuwen, Cheng Yumei, Li Qing, Li Wei, Qin Jincheng
Department of Critical Care Medicine, Guizhou Medical University Affiliated Hospital, Guiyang 550004, Guizhou, China
Corresponding author: Shen Feng, Email: doctorshenfeng@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of berberine on procoagulant and fibrinolytic inhibitory factors produced by rat type Ⅱ alveolar epithelial cell (AECⅡ) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** AECⅡ cells (RLE-6TN cells) were cultured *in vitro*, and the cells in logarithmic growth phase were collected. The cytotoxicity text of berberine was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) to determine the drug concentration range according to inhibition concentration of half cells (IC_{50}). The RLE-6TN cells were divided into five groups, the cells in blank control group were cultured in DMEM; the cells in LPS group were stimulated with 5 mg/L LPS; and the cells in berberine pretreatment groups were pretreated with 20, 50 and 80 μmol/L berberine for 1 hour, and then were co-cultured with 5 mg/L LPS. The cells were collected after LPS induced for 24 hours. The protein and mRNA expression levels of tissue factor (TF), tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in the cells were detected by Western blotting and real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). The levels of activated protein C (APC), precollagen Ⅲ peptide (PⅢP), thrombin-antithrombin complex (TAT) and antithrombin Ⅲ (ATⅢ) in the cell supernatant were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** According

to the inhibition rate curve, the IC_{50} of berberine on RLE-6TN cells was 81.16 μmol/L. Therefore, 20, 50 and 80 μmol/L were selected as the intervention concentration of berberine. Compared with the blank control group, the expression and secretion of procoagulant and fibrinolytic inhibitory factors were abnormal in RLE-6TN cells after LPS induced for 24 hours. The protein and mRNA expression levels of TF and PAI-1 in the LPS group were significantly increased, but the protein and mRNA expression levels of TFPI were significantly decreased. Meanwhile, the levels of APC and AT Ⅲ in the cell supernatant were significantly decreased, while the levels of P Ⅲ P and TAT were significantly increased. After pretreatment with berberine, the abnormal expression and secretion of procoagulant and fibrinolytic inhibitory factors induced by LPS were corrected in a dose-dependent manner, especially in 80 μmol/L. Compared with the LPS group, the protein and mRNA expression levels of TF and PAI-1 in the berberine 80 μmol/L group were significantly decreased [TF protein (TF/GAPDH): 0.45±0.02 vs. 0.55±0.03, TF mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.39±0.08 vs. 1.48±0.11, PAI-1 protein (PAI-1/GAPDH): 0.37±0.02 vs. 0.64±0.04, PAI-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.14±0.29 vs. 4.18±0.44, all $P < 0.01$] and those of TFPI were significantly increased [TFPI protein (TFPI/GAPDH): 0.53±0.02 vs. 0.45±0.02, TFPI mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.94±0.08 vs. 0.40±0.05, both $P < 0.01$]. Meanwhile, the levels of APC and AT Ⅲ in the cell supernatant were significantly increased [APC (μg/L): 1 358.5±26.0 vs. 994.2±23.1, AT Ⅲ (μg/L): 118.0±7.4 vs. 84.4±2.7, both $P < 0.01$], while those of P Ⅲ P and TAT were significantly decreased [P Ⅲ P (μg/L): 11.2±0.4 vs. 18.6±0.9, TAT (ng/L): 222.1±2.8 vs. 287.6±7.0, both $P < 0.01$]. **Conclusions** Berberine could inhibit the LPS-induced expressions of procoagulant and fibrinolytic inhibitory factors in rat AEC Ⅱ cells and promote the expressions of anticoagulant factors in a dose-dependent manner. Berberine may be a new therapeutic target for alveolar hypercoagulability and fibrinolysis inhibition in acute respiratory distress syndrome (ARDS).

【Key words】 Berberine; Rat; Type Ⅱ alveolar epithelial cell; RLE-6TN cell; Acute respiratory distress syndrome; Coagulation/fibrinolysis

Fund program: Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project of China (2019-1261)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200917-00636

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)发病过程中存在全身凝血和纤溶系统异常改变,即促凝活性增加,纤溶活性降低[1-2],这种异常改变在肺泡更加明显[3]。Ⅱ型肺泡上皮细胞(type Ⅱ alveolar epithelial cell,AEC Ⅱ)具有肺泡上皮干细胞的功能[4],能够合成和分泌表面活性物质,通过离子转运维持肺泡内外液体平衡[5]。近年来,AEC Ⅱ细胞与 ARDS 肺泡促凝和纤溶抑制的关系受到越来越多的关注。本课题组前期研究表明,内毒素脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)刺激下 AEC Ⅱ细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制相关因子显著增加,而分泌抗凝因子显著减少[6-8]。提示 AEC Ⅱ细胞对 ARDS 肺泡促凝亢进和纤溶过度抑制有重要调节作用。因此,以 AEC Ⅱ细胞作为靶点深入研究,对有效防治 ARDS 肺泡促凝及纤溶抑制具有重要意义。

黄连素是从黄连等植物中提取的异喹啉类生物碱,具有多种生物化学和药理活性,包括降脂[9-10]和抗炎[11-12]作用。研究表明,黄连素预处理能显著抑制 LPS 刺激下人单核/巨噬细胞株 THP-1 中组织因子(tissue factor,TF)表达,并抑制 TF 的促凝活性[13],同时可显著抑制 LPS 刺激下的细胞死亡[14-15];黄连素还可减轻 LPS 诱导小鼠 ARDS 及脓毒症的严重程度[16]。本课题组在预实验中发现,通过预先腹腔注射黄连素可显著抑制 LPS 诱导 ARDS 小鼠肺组织促凝和纤溶抑制相关因子的表达,减少支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中促凝和纤维成分相关因子含量,增加 BALF 中抗凝相关因子水平,提示黄连素可有效纠正 ARDS 肺泡促凝和纤溶抑制的异常状态,但其作用靶点是否与 AEC Ⅱ细胞有关尚不清楚。因此,本研究以大鼠 AEC Ⅱ细胞为研究对象,观察不同浓度黄连素对 LPS 刺激下 AEC Ⅱ细胞促凝及纤溶抑制相关因子表达和分泌的影响,为 ARDS 肺泡过度促凝和纤溶过度抑制的有效药物防治研究及其临床应用转化提供理论基础。

1　材料和方法

1.1　细胞来源:大鼠 AEC Ⅱ细胞株 RLE-6TN 购自中南大学湘雅医学院细胞中心。本实验属于贵州省科技计划项目(2019-1261)子项目内容,实验过程中细胞处理措施符合伦理学要求,获得了贵州医科大学实验动物伦理委员会批准(审批号:01900560)。

1.2　细胞培养:将 RLE-6TN 细胞加入含 10% 胎牛血清和 1% 青-链双抗(青霉素 1×10^5 U/L、链霉素 100 mg/L)的 DMEM 培养基,置于恒温细胞培养箱(37 ℃、5% CO_2)中培养;隔天更换细胞完全培养基 1 次。待细胞覆盖率达 80%~90% 后用 0.25% 胰酶消化传代。取对数生长期细胞用于后续实验。

1.3　细胞增殖与毒性检测试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8)检测细胞毒性:取对数生长期细胞,胰酶消化制备细胞悬液,进行细胞计数,分为5组,每组6个复孔,每孔接种 8×10^3 个细胞于 96 孔板中,另设一组只加 DMEM 培养基作为调零组。待细胞贴壁后,分别以 0、12.5、25、50、100、200 μmol/L 黄连素溶液

处理细胞。24 h 后弃培养液，以换液方式每孔加入含 20 μL CCK-8 溶液的 220 μL 无血清培养基，37 ℃避光孵育 2 h，于酶标仪 450 nm 处测定每孔吸光度（absorbance，*A*）值，计算细胞存活率〔细胞存活率＝（对照组 *A* 值－实验组 *A* 值）/（对照组 *A* 值－调零组 *A* 值）×100%〕，然后再计算细胞抑制率（细胞抑制率＝100% －细胞存活率）。

1.4 实验分组：将对数生长期细胞分为 5 组。空白对照组用 DMEM 培养基常规培养；LPS 组加入 5 mg/L LPS 刺激细胞；黄连素预处理组先分别加入 20、50、80 μmol/L 黄连素预处理 1 h 后，再加入 5 mg/L 的 LPS 共培养。

1.5 蛋白质免疫印迹试验（Western blotting）检测 TF、组织因子途径抑制物（tissue factor pathway inhibitor，TFPI）以及纤溶酶原激活物抑制剂-1（plasminogen activator inhibitor-1，PAI-1）的蛋白表达：取对数生长期细胞，分组处理 24 h 后，离心收集细胞，提取细胞质蛋白并定量，100 ℃加热蛋白 10 min 变性，取 60 μg 等量蛋白上样行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE），转膜，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，加入 TF、TFPI、PAI-1 抗体（均为 1∶1 000），4 ℃孵育过夜；使用洗膜缓冲液充分洗膜 3 次，每次 5 min，加入山羊抗兔二抗（1∶5 000），室温轻摇孵育 1.5 h；洗膜缓冲液洗膜 3 次，每次 5 min，除去未结合的二抗，采用电化学发光法曝光、显影，凝胶成像分析系统检测条带，应用 Image J 软件分析条带灰度值，以 3-磷酸甘油醛脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH；1∶3 000）作为内参，以目的蛋白与内参的灰度值比值作为目的蛋白的表达量。每组实验重复 3 次，计算统计量。

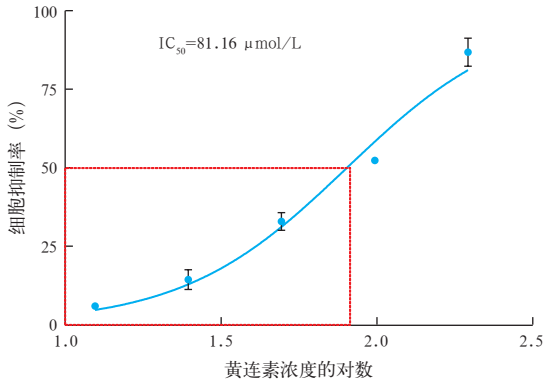
1.6 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应（quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction，RT-qPCR）检测 TF、TFPI、PAI-1 的 mRNA 表达：用 TRIzol 方法提取细胞总 RNA，紫外分光光度仪测定其在 260 nm 和 280 nm 处 *A* 值，并计算 RNA 浓度。用 20 μL 反转录体系进行 RT-qPCR 扩增。TF、TFPI、PAI-1、GAPDH 引物均由上海生工生物工程有限公司合成。qPCR 反应程序：95 ℃预变性 10 min，95 ℃变性 15 s，60 ℃退火和延伸 1 min，共 40 个循环。所有待测样本均做 3 个平行复孔以减少操作误差。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算待测目的基因表达量。

1.7 酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）检测活化蛋白 C（activated protein C，APC）、Ⅲ型前胶原肽（procollagen-Ⅲ-peptide，PⅢP）、凝血酶-抗凝血酶复合物（thrombin-antithrombin complex，TAT）及抗凝血酶Ⅲ（antithrombin Ⅲ，AT Ⅲ）含量：取各组细胞培养上清液，离心后按照 ELISA 试剂盒操作说明书进行检测。每组样本做 3 个复孔。

1.8 统计学方法：用 GraphPad Prism 8.3 软件分析数据。计量资料符合正态分布，以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用独立样本 *t* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 黄连素对 RLE-6TN 细胞的毒性作用（图 1）：绘制黄连素对 RLE-6TN 细胞的抑制率曲线，并计算出黄连素对 RLE-6TN 细胞的半数抑制浓度（IC_{50}）为 81.16 μmol/L。因此，本研究中选择 20、50、80 μmol/L 作为黄连素的干预浓度。

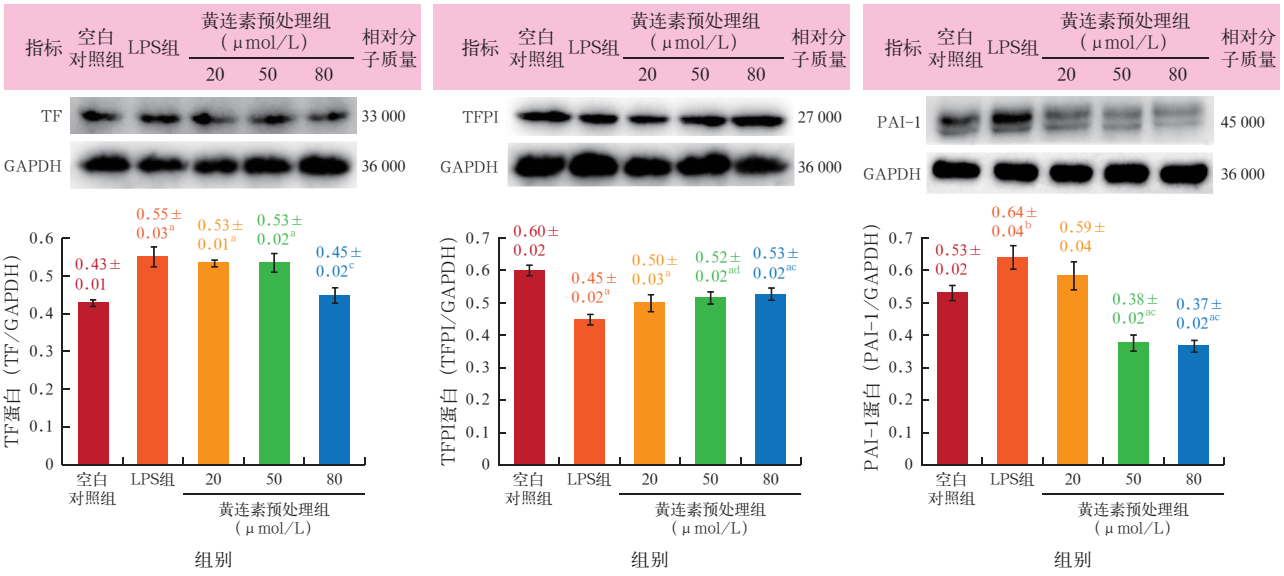


注：RLE-6TN 细胞为大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞，IC_{50} 为半数抑制浓度

图 1 不同浓度黄连素对 RLE-6TN 细胞的抑制率

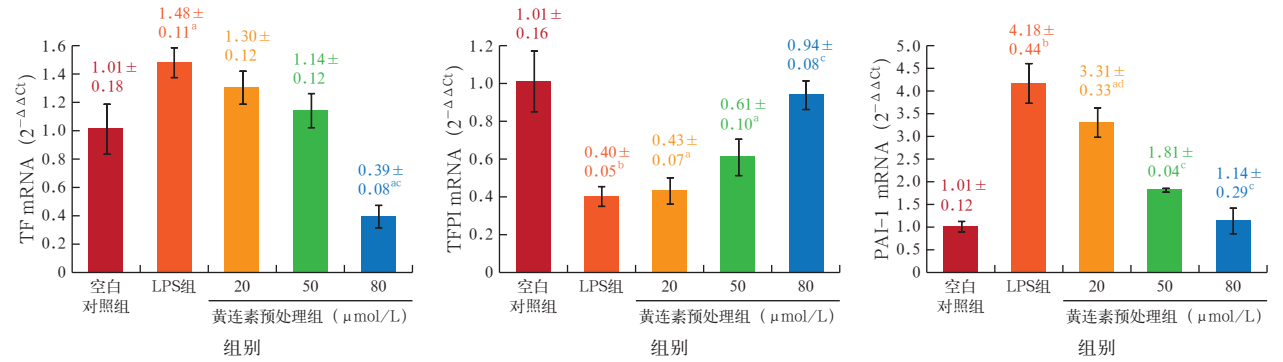
2.2 黄连素预处理对 LPS 诱导下 RLE-6TN 细胞中 TF、TFPI、PAI-1 蛋白表达的影响（图 2）：与空白对照组比较，LPS 组细胞中 TF 和 PAI-1 蛋白表达水平明显升高，而 TFPI 蛋白表达明显降低（均 $P<0.05$）；与 LPS 组相比，黄连素预处理组 TF 和 PAI-1 蛋白表达水平均降低，TFPI 蛋白表达水平升高，并呈一定剂量依赖性（均 $P<0.05$）。

2.3 黄连素预处理对 LPS 诱导下 RLE-6TN 细胞中 TF、TFPI、PAI-1 mRNA 表达的影响（图 3）：与空白对照组比较，LPS 组细胞中 TF 和 PAI-1 的 mRNA 表达水平明显升高，而 TFPI 的 mRNA 表达水平明显降低（均 $P<0.05$）；与 LPS 组相比，黄连素预处理组 TF 和 PAI-1 的 mRNA 表达水平降低，TFPI 的 mRNA 表达水平升高，并呈一定剂量依赖性（均 $P<0.05$）。



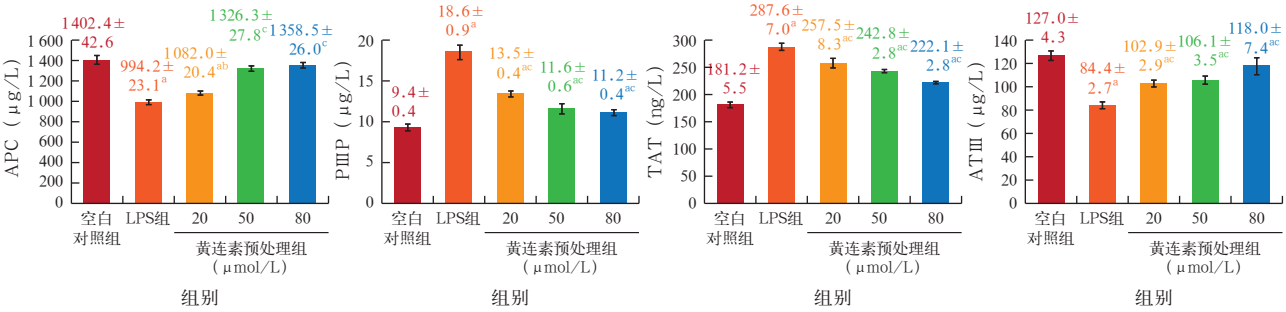
RLE-6TN 细胞为大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞，TF 为组织因子，TFPI 为组织因子途径抑制物，PAI-1 为纤溶酶原激活物抑制剂-1，GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶；与空白对照组比较，$^{a}P<0.01$，$^{b}P<0.05$；与脂多糖（LPS）组比较，$^{c}P<0.01$，$^{d}P<0.05$

图 2　蛋白质免疫印迹试验（Western blotting）检测各组 RLE-6TN 细胞中 TF、TFPI、PAI-1 的蛋白表达



注：RLE-6TN 细胞为大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞，TF 为组织因子，TFPI 为组织因子途径抑制物，PAI-1 为纤溶酶原激活物抑制剂-1；与空白对照组比较，$^{a}P<0.05$，$^{b}P<0.01$；与脂多糖（LPS）组比较，$^{c}P<0.01$，$^{d}P<0.05$

图 3　各组 RLE-6TN 细胞中 TF、TFPI、PAI-1 的 mRNA 表达比较



注：RLE-6TN 细胞为大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞，APC 为活化蛋白 C，PⅢP 为Ⅲ型前胶原肽，TAT 为凝血酶-抗凝血酶复合物，ATⅢ为抗凝血酶Ⅲ；与空白对照组比较，$^{a}P<0.01$；与脂多糖（LPS）组比较，$^{b}P<0.05$，$^{c}P<0.01$

图 4　各组 RLE-6TN 细胞上清液中 APC、PⅢP、TAT 和 ATⅢ含量比较

2.4　黄连素预处理对 LPS 诱导下 RLE-6TN 细胞上清液中 APC、PⅢP、TAT 及 ATⅢ含量的影响（图 4）：与空白对照组比较，LPS 组细胞上清液中 APC 和 ATⅢ含量明显降低，而 PⅢP 和 TAT 含量明显升高（均 $P<0.01$）；与 LPS 组相比，黄连素预处理组细胞上清液中 APC 和 ATⅢ含量升高，而 PⅢP 和 TAT 含量则出现完全相反的变化，并呈一定剂量依赖性（均 $P<0.05$）。

3 讨 论

大鼠 AEC Ⅱ 细胞株 RLE-6TN 在体外培养中具有稳定的性能和良好的重复性[17]，而 LPS 常用于复制 ARDS 的动物模型[18-19]。鉴于 AEC Ⅱ 细胞对 ARDS 肺泡促凝和纤溶具有重要的调节作用，故本实验中采用 LPS 对 RLE-6TN 细胞进行损伤刺激。在本课题组前期研究中，以 5 mg/L 的 LPS 刺激时，RLE-6TN 细胞活性最大，且能满足刺激损伤效果[7]，故本研究仍选择此浓度作为 LPS 的刺激浓度。

本实验中选择了 TF、TFPI、PAI-1、APC、P Ⅲ P、TAT、AT Ⅲ等作为观察指标。TF 作为凝血级联反应的始动者[20]，是外源性凝血级联反应的促凝剂[21]，主要通过外源性凝血途径启动机体凝血系统。本研究结果显示，LPS 刺激 24 h 后 RLE-6TN 细胞中 TF 的蛋白及 mRNA 表达水平均较空白对照细胞明显升高，提示其基因转录及翻译均明显上调。TFPI 是 TF 的生理抑制剂，可与 F Ⅹa 结合并抑制其活性[22-23]、抑制凝血蛋白酶复合物 TF-F Ⅶa[24-25]，对凝血级联反应的始动环节进行负反馈调节[26]。生理状态下，TF 与 TFPI 保持动态平衡，共同维持机体凝血系统处于稳定状态。PAI-1 是纤溶系统中的主要负调节因子，其主要作用是抑制纤溶酶系统中组织型纤溶酶原激活剂和尿激酶型纤溶酶原激活剂，从而降低内源性纤溶活性[27-29]。在生理状态下，PAI-1 与纤溶酶原激活物相互作用，共同维持机体纤溶状态。APC 为蛋白 C 在凝血酶作用下活化形成的，具有抗凝、促纤溶的作用[30-31]。P Ⅲ P 是Ⅲ型前胶原转变成Ⅲ型胶原时释放的多肽，P Ⅲ P 增加提示组织的炎症或纤维化开始，对肺纤维化具有较高的诊断价值[32-33]。TAT 是凝血活化程度的重要标志之一，代表凝血酶生成量，可评估机体凝血激活状态[34-35]。AT Ⅲ是由肝脏产生的具有抗凝作用的物质之一，在总抗凝血酶中活性较高[36-37]。本研究结果表明，在 LPS 刺激下，细胞内或上清液中 TF、PAI-1、P Ⅲ P、TAT 水平明显升高，TFPI、APC、AT Ⅲ水平则明显降低，提示 LPS 刺激下 AEC Ⅱ 细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制因子明显增加，而抗凝因子受到抑制，与本课题组前期研究结果吻合[7-8]。

黄连素是从黄连等植物中提取的异喹啉类生物碱，具有多种生物化学和药理活性，包括降脂[9-10]和抗炎[11-12]作用，但其对促凝和纤溶抑制因子的作用机制尚不清楚。Gao 等[13]研究表明，黄连素预处理能通过下调 THP-1 细胞中核转录因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）、蛋白激酶 B（Akt）及丝裂素活化蛋白激酶/c-Jun 氨基末端激酶/p38 丝裂素活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶〔mitogen-activated protein kinase（MAPK）/c-Jun N-terminal kinase/p38MAPK/extracellular regulated kinase，MAPK/JNK/p38MAPK/ERK〕通路，显著抑制 LPS 诱导 THP-1 细胞中 TF 的活性表达，并对 TF 的促凝活性起到抑制作用；Huang 等[38]研究结果表明，黄连素可剂量依赖性减轻 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤。本研究结果显示，预先使用黄连素可明显降低 LPS 刺激下 TF、PAI-1、P Ⅲ P、TAT 等水平，促进 TFPI 表达和 APC、AT Ⅲ的分泌，提示黄连素对 AEC Ⅱ 细胞介导的促凝活性增强和纤溶抑制具有纠正作用。结合本研究结果认为，黄连素预处理能纠正 ARDS 肺泡促凝和纤溶抑制，而 AEC Ⅱ 细胞可能是黄连素作用的靶点之一，但黄连素对 LPS 刺激下大鼠 AEC Ⅱ 细胞表达及分泌促凝和纤溶抑制因子的机制尚不清楚。

本研究还表明，随着黄连素浓度的增加，其作用效果逐渐增强，提示可能存在一定的剂量依赖效应，但其最佳作用浓度仍有待进一步研究。

本实验存在的主要不足：① 体外实验离开了体内各系统的调控，且影响因素较为单一，所得结果不能完全反映药物在体内的情况；② 本研究中观察时间点较为单一，未进行动态观察；③ 对黄连素浓度的选择有待进一步优化。

综上，黄连素能改善 LPS 刺激下大鼠 AEC Ⅱ 细胞促凝及纤溶抑制相关因子的表达和分泌，促进抗凝因子的分泌，且表现出一定的剂量依赖效应。黄连素有望成为纠正 ARDS 肺泡促凝和纤溶异常状态的有效靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Wu Y, Wang Y, Liu B, et al. SN50 attenuates alveolar hypercoagulation and fibrinolysis inhibition in acute respiratory distress syndrome mice through inhibiting NF-κB p65 translocation [J]. Respir Res, 2020, 21 (1): 130. DOI: 10.1186/s12931-020-01372-6.

[2] Gouda MM, Shaikh SB, Bhandary YP. Inflammatory and fibrinolytic system in acute respiratory distress syndrome [J]. Lung, 2018, 196 (5): 609-616. DOI: 10.1007/s00408-018-0150-6.

[3] Idell S, James KK, Levin EG, et al. Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome [J]. J Clin Invest, 1989, 84 (2): 695-705. DOI: 10.1172/JCI114217.

[4] Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, et al. Acute respiratory distress syndrome [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5 (1): 18. DOI: 10.1038/s41572-019-0069-0.

[5] Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis [J]. J Cell Physiol, 2012, 227 (2): 493-507. DOI: 10.1002/jcp.22783.

[6] 刘雨晴，刘博，姚玲，等. 不同液体培养对脂多糖刺激后人Ⅱ型肺泡上皮细胞 A549 产生凝血及纤溶因子的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2016, 23 (3): 294-298. DOI: 10.3969/j.issn.

1008-9691.2016.03.018.
Liu YQ, Liu B, Yao L, et al. Effects of culturing with different kinds of liquids on production of coagulation and fibrinolysis associated factors of human type Ⅱ alveolar epithelial cell A549 induced by lipopolysaccharide [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (3): 294-298. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.03.018.
[7] Liu B, Wu Y, Wang Y, et al. NF-κB p65 knock-down inhibits TF, PAI-1 and promotes activated protein C production in lipopolysaccharide-stimulated alveolar epithelial cells type Ⅱ [J]. Exp Lung Res, 2018, 44 (4-5): 241-251. DOI: 10.1080/01902148.2018.1505975.
[8] Liu B, Wang Y, Wu Y, et al. IKKβ regulates the expression of coagulation and fibrinolysis factors through the NF-κB canonical pathway in LPS-stimulated alveolar epithelial cells type Ⅱ [J]. Exp Ther Med, 2019, 18 (4): 2859-2866. DOI: 10.3892/etm.2019.7928.
[9] Wang K, Feng X, Chai L, et al. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects [J]. Drug Metab Rev, 2017, 49 (2): 139-157. DOI: 10.1080/03602532.2017.1306544.
[10] Hu Y, Ehli EA, Kittelsrud J, et al. Lipid-lowering effect of berberine in human subjects and rats [J]. Phytomedicine, 2012, 19 (10): 861-867. DOI: 10.1016/j.phymed.2012.05.009.
[11] Li CL, Tan LH, Wang YF, et al. Comparison of anti-inflammatory effects of berberine, and its natural oxidative and reduced derivatives from Rhizoma Coptidis *in vitro* and *in vivo* [J]. Phytomedicine, 2019, 52: 272-283. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.09.228.
[12] Lee CH, Chen JC, Hsiang CY, et al. Berberine suppresses inflammatory agents-induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha productions via the inhibition of IkappaB degradation in human lung cells [J]. Pharmacol Res, 2007, 56 (3): 193-201. DOI: 10.1016/j.phrs.2007.06.003.
[13] Gao MY, Chen L, Yang L, et al. Berberine inhibits LPS-induced TF procoagulant activity and expression through NF-κB/p65, Akt and MAPK pathway in THP-1 cells [J]. Pharmacol Rep, 2014, 66 (3): 480-484. DOI: 10.1016/j.pharep.2013.12.004.
[14] Jiang W, Kou J, Yuan S, et al. A simplified and high-throughput chromogenic assay for testing tissue factor-dependent procoagulant activity [J]. J Biomol Screen, 2011, 16 (3): 295-302. DOI: 10.1177/1087057110396370.
[15] Ge HX, Zhang J, Chen L, et al. Chemical and microbial semi-synthesis of tetrahydroprotoberberines as inhibitors on tissue factor procoagulant activity [J]. Bioorg Med Chem, 2013, 21 (1): 62-69. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.11.002.
[16] Zhang HQ, Wang HD, Lu DX, et al. Berberine inhibits cytosolic phospholipase A2 and protects against LPS-induced lung injury and lethality independent of the alpha2-adrenergic receptor in mice [J]. Shock, 2008, 29 (5): 617-622. DOI: 10.1097/SHK.0b013e318157ea14.
[17] 陈尚雅, 崔冠群, 薄存香, 等. 大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞系 RLE-6TN 诱导脂肪间充质干细胞体外分化 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21 (33): 5280-5286. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2017.33.006.
Chen SY, Cui GQ, Bo CX, et al. *In vitro* differentiation of rat adipose-derived mesenchymal stem cells induced by rat lung epithelial-T-antigen negative cell line [J]. Clin J Tis Eng Res, 2017, 21 (33): 5280-5286. DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2017.33.006.
[18] Mei H, Tao Y, Zhang T, et al. Emodin alleviates LPS-induced inflammatory response in lung injury rat by affecting the function of granulocytes [J]. J Inflamm (Lond), 2020, 17: 26. DOI: 10.1186/s12950-020-00252-6.
[19] Mei SH, McCarter SD, Deng Y, et al. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1 [J]. PLoS Med, 2007, 4 (9): e269. DOI: 10.1371/journal.pmed.0040269.
[20] Bastarache JA, Wang L, Geiser T, et al. The alveolar epithelium can initiate the extrinsic coagulation cascade through expression of tissue factor [J]. Thorax, 2007, 62 (7): 608-616. DOI: 10.1136/thx.2006.063305.
[21] Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24 (6): 1015-1022. DOI: 10.1161/01.ATV.0000130465.23430.74.
[22] Wesselschmidt R, Likert K, Girard T, et al. Tissue factor pathway inhibitor: the carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Ⅹa [J]. Blood, 1992, 79 (8): 2004-2010.
[23] 余波, 罗师平, 宋丽萍, 等. 氨基酸序列突变对 TFPI 生物半衰期和生物活性的影响 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2007, 34 (4): 382-388. DOI: 10.3321/j.issn:1000-3282.2007.04.008.
Yu B, Luo SP, Song LP, et al. Decreasing the clearance rate of tissue factor pathway inhibitor from plasma by selectively mutating the amino acid residues in its C-terminal region [J]. Prog Biochem Bioph, 2007, 34 (4): 382-388. DOI: 10.3321/j.issn:1000-3282.2007.04.008.
[24] Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, et al. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor [J]. Thromb Haemost, 2001, 86 (4): 959-972.
[25] Broze GJ Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation [J]. Annu Rev Med, 1995, 46: 103-112. DOI: 10.1146/annurev.med.46.1.103.
[26] Wood JP, Ellery PE, Maroney SA, et al. Biology of tissue factor pathway inhibitor [J]. Blood, 2014, 123 (19): 2934-2943. DOI: 10.1182/blood-2013-11-512764.
[27] Wu Q, Zhao Z. Inhibition of PAI-1: a new anti-thrombotic approach [J]. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, 2002, 2 (1): 27-42. DOI: 10.2174/1568006023337727.
[28] Ha H, Oh EY, Lee HB. The role of plasminogen activator inhibitor 1 in renal and cardiovascular diseases [J]. Nat Rev Nephrol, 2009, 5 (4): 203-211. DOI: 10.1038/nrneph.2009.15.
[29] Whitsett JA, Wert SE, Weaver TE. Alveolar surfactant homeostasis and the pathogenesis of pulmonary disease [J]. Annu Rev Med, 2010, 61: 105-119. DOI: 10.1146/annurev.med.60.041807.123500.
[30] Esmon CT. Protein C anticoagulant system: anti-inflammatory effects [J]. Semin Immunopathol, 2012, 34 (1): 127-132. DOI: 10.1007/s00281-011-0284-6.
[31] Xie W, Liu Z, Chen B. Protein C deficiency resulting from two mutations in PROC presenting with recurrent venous thromboembolism [J]. J Vasc Surg Cases Innov Tech, 2017, 3 (4): 254-256. DOI: 10.1016/j.jvscit.2017.11.002.
[32] 王雪, 沈锋. 不同潮气量机械通气对急性呼吸窘迫综合征家兔凝血/纤溶的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (7): 585-590. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.009.
Wang X, Shen F. Effects of mechanical ventilation with different tidal volumes on coagulation/fibrinolysis in rabbits with acute respiratory distress syndrome [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (7): 585-590. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.009.
[33] 周小煊, 郑雪冰, 刘畅, 等. 转化生长因子-β1 和Ⅲ型前胶原肽在百草枯中毒引发肺纤维化中的作用及机制研究 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14 (4): 569-571. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2010.04.032.
Zhou XX, Zheng XB, Liu C, et al. Study on the effect of transforming growth factor-β1 and type Ⅲ procollagen peptide in the pathogenesis of pulmonary fibrosis induced by paraquat poisoning [J]. Chin J Lab Diagn, 2010, 14 (4): 569-571. DOI: 10.3969/j.issn.1007-4287.2010.04.032.
[34] 陈文欣, 李强, 薛赢俊, 等. 恶性肿瘤患者凝血-纤溶系统标志物检测及其临床意义 [J]. 检验医学, 2018, 33 (8): 722-726. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2018.08.012.
Chen WX, Li Q, Xue YJ, et al. Determination of coagulation-fibrinolytic system markers in patients with malignant tumor and its role [J]. Lab Med, 2018, 33 (8): 722-726. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2018.08.012.
[35] Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock [J]. Semin Thromb Hemost, 1998, 24 (1): 33-44. DOI: 10.1055/s-2007-995821.
[36] 李博, 赵宏谋. 四肢创伤患者血清 PAI-1、TF、AT Ⅲ水平变化及临床意义 [J]. 检验医学与临床, 2020, 17 (2): 192-194, 198. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2020.02.014.
Li B, Zhao HM. Clinical significance of serum PAI-1, TF and AT Ⅲ levels in patients with limb trauma [J]. Lab Med Clin, 2020, 17 (2): 192-194, 198. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2020.02.014.
[37] 陈宁, 沈锋. 急性呼吸窘迫综合征家兔输注不同类型液体对凝血/纤溶功能的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (5): 486-491. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.05.009.
Chen N, Shen F. Effects of infusion with different kinds of liquid on blood coagulation and fibrinolysis in rabbits with acute respiratory distress syndrome [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (5): 486-491. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.05.009.
[38] Huang L, Zhang X, Ma X, et al. Berberine alleviates endothelial glycocalyx degradation and promotes glycocalyx restoration in LPS-induced ARDS [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 65: 96-107. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.10.001.

（收稿日期：2020-09-17）