

养阴益气活血冲剂对培养人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶等功能的影响

万海同¹, 白海波², 杨洁红¹, 余道军¹, 别晓东², 蔡宇², 严伟民²
(1 浙江中医学院, 浙江 杭州 310053; 2 浙江大学, 浙江 杭州 310027)

摘要: 目的: 研究养阴与益气活血方药对培养人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶等功能的影响。方法: 采用血清药理学方法观察养阴益气活血方药对培养人脐静脉内皮细胞抗凝、纤溶及抗自由基损伤的作用。结果: 养阴益气活血方药具有显著增高前列环素($\text{G-ket-PGF1}\alpha$)含量; 提高组织型纤溶酶原激活物(t-PA)的活性, 抑制组织型纤溶酶原激活抑制物(PAI)活性的作用; 提高超氧化物歧化酶(SOD)活力, 降低丙二醛(MDA)含量的作用; 降低ET含量, 提高NO含量等作用。结论: 养阴与益气、活血方药相伍在抗栓、溶栓、抗自由基损伤等方面具有协同作用, 认为养阴生津方药是治疗血瘀证的重要法则。

关键词: 内皮细胞; 前列环素; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 养阴益气活血冲剂

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)05-0024-03

The influence of Yin-nourishing Qi-tonifying and Blood-moving Granules on the Anticoagulation and Fibrinolysis by Cultivating endotheliocyte of human umbilical vein

WAN Hai-tong¹, BAI Hai-bo², YANG Jie-hong¹, YU Dao-jun¹, BIE Xiao-dong², CAI Yu², YAN Wei-min²,

(1. Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: To studying the influence of Yin-nourishing Qi-tonifying and blood-moving Granules on the anticoagulation and fibrinolysis by cultivating endotheliocyte of human umbilical vein, observation of Yin-nourishing Qi-tonifying and blood-moving recip to the anticoagulation, and fibrinolysis and anti-injury of free radical of cultivating endotheliocyte of human umbilical vein by using the method of serology pharmacology. Yin-nourishing Qi-tonifying and blood-moving recip could obviously increase the content of ($\text{G-ket-PGF1}\alpha$); It could promote the activity of t-PA and inhibit the activity of PAI; It could promote the activity of SOD and decrees the content of MDA; Yin-nourishing recipe could decrease the content of ET and increase the content of NO. The function of the anticoagulation, fibrinolysis and anti-injury of free radical by Yin-nourishing Qi-tonifying and blood-moving recip was much superior than Qi-tonifying and blood-moving recip, with blood-moving recip.

Key words: endotheliocyte; prostacyclin; superoxide dismutase; Nitrogen monoxide; Yin-nourishing Qi-tonifying and blood-moving Granules

血管内皮细胞(EC)作为一种抗血栓形成细胞,其分泌的生物活性物质在抗凝、纤溶和抗血小板活化等方面具有重要的意义。我们近年来临床研究结果表明以养阴生津方药为主配以益气活血方药治疗心脑血管疾病血瘀证具有明显疗效^[1];实验研究结果表明养阴生津方药对多种原因引起的血瘀病理状态

具有明显的改善作用^[2];认为养阴生津法是治疗血瘀证的重要法则^[3]。本实验采用血清药理学方法观察了养阴益气活血冲剂及其相关方药对培养人脐静脉内皮细胞抗凝与纤溶功能等的影响,取得了一定进展。这对较为深入的研究养阴益气活血方药治疗血瘀证的作用机理,探讨血瘀证病理本质,寻求治疗血瘀证的新途径均具有重要意义。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 纯种雄性新西兰家兔,体重 2.2 ±

收稿日期: 2002-02-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070941); 浙江省自然科学基金青年科技人才培养专项资助项目(RC00050, 301498)。

0.2kg, 由浙江中医学院动物中心提供。

1.2 材料及试剂 新生儿脐带由浙江医科大学妇产科医院提供; 培养液: RPMI 1640 培养液, 并配成含青霉素(100U/ml)、链霉素(100μg/ml)、20% 小牛血清, 用 Tris 调整 pH 值至 7.2~7.4; 胶原酶: 美国 Sigma 公司出品 I 型; 新生牛血清, 由杭州四季青生物材料工程研究所提供; 兔抗人 VIII 因子抗体(I 抗), FITC-羊抗兔 IgG 抗体(II 抗) 由华美生物工程公司提供。CO₂ 恒温培养箱(BB5060 型, Heraeus 上海产) 光学倒置显微镜(COIC), 相差倒置显微镜(IX70, Olympus, 日本产), 荧光显微镜(BX50 型, Olympus, 日本产), 酶标仪(505 型, bio 型), γ-计数仪(SN-682 型, 上海日环核仪厂), 96 孔细胞培养板(NUNC)。

1.3 方药制备 养阴益气活血冲剂由生地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)、生黄芪(*Astragalus membranaceus* Bge)、川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort) 等组成, 由浙江省中药新产品制剂研究重点实验室采用水煎醇沉工艺制备而成; 益气活血方由黄芪、川芎等组成; 川芎方: 即活血方, 由川芎组成。上述药物经鉴定后分别按法制成药液, 置 4℃ 冰箱内保存备用。

1.4 含药血清的制备 选用家兔, 分别每日分二次给予益气活血方含生药总量 10g/kg, 川芎方含生药总量 5g/kg, 养阴益气活血冲剂 25g(生药)/kg; 另设一对照组每日给予 15ml 温开水, 灌胃 7d 后, 于心脏采用前 12h、6h、3h、1h 再各灌胃一次(最后一日剂量增加一倍), 并于心脏采血前 24h 禁食不禁水, 心脏采血后, 无菌分离血清, 经 56℃, 30min 灭活处理后, 用 0.45μm 的微孔滤膜过滤除菌, 置 -20℃ 冰箱内保存备用。

1.5 人脐静脉原代内皮细胞的制备 参照 Jaffe^[4] 等方法并加以改进。以 PBS(pH 为 7.2~7.4) 冲洗脐静脉管腔至洗出液无色透明, 再以 0.1% 的胶原酶(pH 为 7.4) 作用 15min 后停止消化, 收集 EC, 计数, 调整细胞浓度至 5 × 10⁴/ml, 接种于 96 孔培养板, 每孔 200μl, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中静置培养, 24h 后进行第 1 换液, 加入 37℃ 预热的新鲜培养液, 以后每隔 48h 换液一次, 接种 3~4d 后 EC 单层融合, 经相差倒置显微镜形态观察, 荧光显微镜下进行人的 VIII 因子免疫荧光抗体检查及生长曲线均证明具有典型的内皮细胞特征后, 供研究用。

1.6 分组及各组实验培养液配制 上述培养的细胞吸去培液, 再加入含有各组成分的培养液。共分 4 组, 每组 8 孔, 各组配制方法为: (1) 对照组: 将

15ml 正常兔血清, 5ml 新生牛血清, 加入 80% RPMI 1640 液至 100ml; (2) 川芎方组、益气活血方组、养阴益气活血冲剂组三组; 将 15ml 含各组分药的兔血清, 5ml 新生牛血清, 加入 80ml RPMI 1640 液至 100ml; 加入上述含有各组成分的培养液后, 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24h 后吸出培液, 置 -20℃ 冰箱待测。

1.7 检测指标及方法 取上述各组培养液, 分别检测以下指标: 采用放免法测前列环素(6-keto-PGF1α); 采用比色法测超氧化物歧化酶(SOD) 活力、丙二醛(MDA) 含量(均购自南京建成生物工程研究所); 采用发色底物法测组织型纤溶酶原激活物(t-PA) 及其抑制物(PAI) 活性(试剂盒购自福建太阳生物技术公司)。采用非平衡放射免疫法测定 ET 含量(放免试剂盒购自解放军总医院东亚免疫技术研究所); 采用酶法测 NO 含量(购自南京建成生物工程研究所)。具体检测方法主要参照试剂盒说明进行。

1.8 所得数据采用统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 养阴益气活血冲剂对培养脐静脉内皮细胞 6-keto-PGF1α 含量的影响 从表 1 可知, 各用药组与对照组相比均具有显著差异, 养阴益气活血冲剂显著优于川芎和益气活血方组。结果提示养阴与益气活血方药配合在提高培养脐静脉内皮细胞 6-keto-PGF1α 含量方面具有协同作用。

表 1 养阴益气活血冲剂对培养脐静脉内皮细胞 6-keto-PGF1α 含量的影响($\bar{x} \pm s$; n = 8)

组别	6-keto-PGF1α (pg/ml)
对照组	101.92 ± 11.93
川芎组	289.16 ± 40.23* △△
益气活血组	472.81 ± 60.21** △△
养阴益气活血冲剂	606.54 ± 139.47**

注: 与对照比: * : P < 0.05, ** P < 0.01; 与养阴益气活血冲剂比较, △ P < 0.05, △△ P < 0.01。

2.2 养阴益气活血冲剂对培养脐静脉内皮细胞 PAI 和 t-PA 活性的影响 表 2 显示, 养阴益气活血冲剂具有显著降低培养人脐静脉内皮细胞 PAI 活性和提高 t-PA 活性的作用。养阴药与益气活血药在降低 PAI 活性和提高 t-PA 活性方面具有协同作用。

2.3 养阴益气活血冲剂对培养脐静脉内皮细胞 SOD 活性和 MDA 含量的影响 表 3 显示, 养阴益气活血冲剂与对照组相比可显著提高培养脐静脉内皮细胞 SOD 活力。各用药组与对照组相比均可降低 MDA 含量。结果表明养阴药与益气活血药配合可

增强培养脐静脉内皮细胞 SOD 活性和降低 MDA 含量。

表 2 养阴益气活血冲剂对培养脐静脉内皮细胞 PAI t-PA 活性的影响($\bar{x} \pm s; n=8$)

组别	PAI 活性(AU/ml)	t-PA 活性(IU/ml)	PAI/t-PA
对照组	0.910 ± 0.087	0.513 ± 0.085	1.774
川芎组	0.882 ± 0.074 [△]	0.558 ± 0.094 ^{△△}	1.581
益气活血组	0.814 ± 0.062	0.681 ± 0.087 [*] △	1.195
养阴益气活血冲剂	0.691 ± 0.082 ^{**}	0.865 ± 0.082 ^{**}	0.799

表 3 养阴益气活血冲剂对培养脐静脉内皮细胞 SOD 活力,MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s; n=8$)

组别	SOD(NU/ml)	MDA(nM/ml)
对照组	56.09 ± 8.93	27.72 ± 5.13
川芎组	77.98 ± 10.33	16.29 ± 5.35 [*]
益气活血组	99.43 ± 15.30	14.30 ± 4.41 [*]
养阴益气活血冲剂	129.47 ± 26.62 ^{**}	11.46 ± 2.85 ^{**}

2.4 养阴益气活血冲剂对培养脐静脉内皮细胞 ET NO 含量的影响 如表 4 所示,养阴益气活血冲剂可显著降低培养脐静脉内皮细胞 ET 含量和提高培养脐静脉内皮细胞 NO 含量。养阴药与益气活血药配合具有协同作用。

表 4 养阴益气活血冲剂对培养脐静脉内皮细胞 ET NO 含量的影响($\bar{x} \pm s; n=8$)

组别	ET(pg/ml)	NO(μmol/ml)
对照组	86.53 ± 7.21	10.57 ± 1.58
川芎组	66.48 ± 5.43 ^{* △△}	11.45 ± 2.35 ^{△△}
益气活血组	55.21 ± 6.87 [*]	15.63 ± 2.89 [△]
养阴益气活血冲剂	44.50 ± 6.25 ^{**}	23.89 ± 4.23 ^{**}

3 讨论

血管 EC 是人体最活跃的旁分泌器官,它最基本功能就是抗血栓形成。已证明 EC 的抗凝、纤溶功能在保证血液流体性、维持血管通畅中具有重要作用^[5],前列腺素是迄今所知最强烈抑制血小板聚集的生物活性物质。测定 PGI₂ 体内稳定代谢产物 6-keto-PGF_{1α} 含量不仅可以反映抑制血小板聚集性情况,更可反映血管 EC 的损伤程度。结果表明养阴益气活血冲剂具有提高培养脐静脉内皮细胞 6-keto-PGF_{1α} 含量的作用。

纤溶系统在防止血栓形成及溶栓中都有肯定作用。EC 产生的 t-PA, PAI 是调节纤溶活性的一对重要物质, t-PA 是纤溶的主要生理性激活剂,启动生理性纤溶,清除血管床上的纤维蛋白沉积。PAI 是 t-PA 快速抑制剂,血浆中 PAI 也主要来源于血管内皮细胞。处于活性状态 PAI 与血浆中游离的 t-PA 形成 1:1 的复合物而抑制其纤溶活性作用, PAI 在循环中对 t-PA 活性进行调节^[5]。结果提示,养阴益气活血

方具有明显降低 PAI 活性和提高 t-PA 活性的作用。

近年研究表明,血浆脂质过氧化物(LPO)产生增加,可致动脉 EC 损伤剥落,并有血栓形成。丙二醛(MDA)是指质过氧化物中的主要一种^[6]。超氧化物歧化酶(SOD)对自由基的清除起重要作用。结果提示养阴益气活血方药具有提高细胞抗氧化作用和抑制其脂质过氧化作用。

内皮素(ET)和一氧化氮(NO)是最近几年才发现的器官局部血液调节因子。目前认为,NO 和 ET 之间的平衡是体循环调节和局部血流灌注的主要决定因素^[7]。ET 是目前所知作用最强的长效血管收缩剂;NO 具有抑制血小板凝集等作用。ET 和 NO 这两种效应相反的血管作用物质处于动态平衡状态,维持着血管的舒缩功能。结果表明养阴益气活血冲剂可显著降低培养脐静脉内皮细胞 ET 含量和提高培养脐静脉内皮细胞 NO 含量,具有防止组织细胞损伤的作用。

根据我们以往的实验与临床研究以及有关研究报告,结合本项研究结果,我们认为养阴生津方药抗栓溶栓的作用机制不完全同与活血化瘀类药主要通过改善血液流变学,促进血流动力学,改善微循环等作用机制达到活血化瘀作用;而养阴方药主要是通过提高细胞抗氧化作用和抑制脂质过氧化作用以保护其免受损伤;促进 EC 对抗凝,纤溶物质的分泌;提高纤溶活性,调节抗凝,纤溶物质及活性的比例,进而提高机体的抗凝、纤溶水平,达到抗栓、消栓的作用。养阴方药与益气、活血方药在抗栓溶栓等方面有机配合具有协同作用,可达到较佳的抗自由基损伤、抗栓、提高纤溶等作用。

参考文献:

- [1] 万海同,王灿晖,杨进,等.养阴通瘀方对心脑血管疾病血瘀证及其血液流变学指标的影响[J].中国中医药信息杂志,2000,7(9):39.
- [2] 万海同,杨进.养阴生津法对家兔热瘀模型血液流变学及凝血指标的影响[J].中医基础医学杂志,1997,3(3):46.
- [3] 万海同,杨进.论养阴生津法是治疗血瘀证的重要法则[J].中医杂志,1996,37(1):8.
- [4] Jaffe EA. Synthesis antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells[J]. clin invest, 1973, 52: 2757.
- [5] 赵基. t-PA PAI 的基础与临床[J]. 国外医学:生理病理科学与临床分册, 1988, 8(3): 115-118.
- [6] 周玖. 脂质过氧化作用及对细胞成分的损伤[J]. 解放军医学杂志, 1984, (2): 145.
- [7] Lemman A, Burnett JC. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion[J]. Circulation, 1992, 86(6): III 12-19.