

# 心脑血管保护血管内皮细胞损伤的实验研究

梁中琴<sup>1</sup>, 朱 益<sup>1</sup>, 顾振纶<sup>1</sup>, 范盘生<sup>1</sup>, 周文轩<sup>2</sup>, 郭次仪<sup>2\*</sup>

(1. 苏州大学医学院 药理教研室, 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 香港保健协会, 香港)

**摘要:**目的 研究心脑血管对血管内皮细胞的保护作用。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞 (HUV EC), 缺氧造成内皮细胞损伤, 通过放免法和比色法测定培养上清液中 ET、NO 水平。结果 HUV EC 缺氧 48 h 后, NO 含量明显下降, 而 ET 含量增加, 不同浓度心脑血管 (0.25~2.0 g/L) 与 HUV EC 预孵 48 h 后, 对缺氧造成的上述变化具明显影响, 用药后 NO 含量增加, ET 含量下降。结论 心脑血管对血管内皮细胞具有明显的保护作用。

**关键词:** 心脑血管; 内皮细胞; 内皮素; 一氧化氮

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)11-1006-03

## Experimental study on protective effect of XINNAOTONG on vascular endothelial cell damage

LIANG Zhong-qin<sup>1</sup>, ZHU Yi<sup>1</sup>, GU Zhen-lun<sup>1</sup>, FAN Pan-sheng<sup>1</sup>, ZHOU Wen-xuan<sup>2</sup>, GUO Ci-yi<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacology, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China;

2. Hong Kong Healthcare Association, Hong Kong, China)

**Abstract** **Object** To study the protective effect of XINNAOTONG on vascular endothelial cell.

**Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUV EC) were cultured *in vitro* and their damages were induced by hypoxia. Radioimmunoassay and colorimetric methods were used respectively to determine the effect of ET and NO levels. **Results** HUV EC hypoxia in 48 h, NO content decreased significantly while ET content increased, 48 h pretreatment of XINNAOTONG at different concentrations (0.25~2.0 g/L) in HUV EC affected the above-mentioned changes, NO content increased while ET decreased. **Conclusion** XINNAOTONG has the protective effect on vascular endothelial cell damage.

**Key words** XINNAOTONG; endothelial cell; endothelin; NO

心脑血管系中药丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge., 山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 和银杏叶 *Ginkgo biloba* L. 经科学提取后, 按一定比例混合组成的纯中药制剂, 主要用于缺血性心脑血管疾病。实验研究证实, 心脑血管对实验性脑缺血具有显著的保护作用, 其机制与抗自由基和激活纤溶系统有关<sup>[1]</sup>; 并可抑制血小板聚集、抑制内皮细胞和血小板表达粘附分子<sup>[2]</sup>。但对内皮素 (endothelin-1, ET-1) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 的影响未见报道。ET-1 和 NO 是一对效应相反的血管活性介质<sup>[3,4]</sup>, ET 是由血管内皮细胞 (VEC) 产生的一种作用强烈而持久的血管收缩肽, 是迄今所知体内最强的血管收缩因子。NO 是细胞-细胞间信息传递的主要调节因子, 作为第二信使和神经递质在循环系统中的作用主要是调节血管张力, 使血管平滑肌松弛, 引起血管扩张, 血压下降, 并可抑制 ET 生成和释放, 被认为是

机体内源性 ET 拮抗剂<sup>[5,6]</sup>。二者对血管舒缩效应在血栓栓塞性疾病的发病中具有重要作用。从中药中寻找保护血管内皮、抑制 ET 缩血管效应的药物, 是研究抗血栓药物的方向。本文观察了心脑血管对培养的脐静脉内皮细胞 ET 和 NO 水平的影响, 旨在探讨心脑血管对血管内皮细胞的保护作用。

### 1 材料

1.1 药物和试剂: 心脑血管系香港百草堂有限公司产品, 淡褐粉末, 0.1 g 溶于 10 mL RPMI1640 培养液中, 经无菌过滤后置冰箱保存; <sup>125</sup>I-ET-1 放免测定试剂盒、NO 代谢产物硝酸盐测定试剂盒由北京东亚免疫技术所提供。

1.2 仪器: 721 型分光光度计, 上海第三分析仪器厂产品; SN-628B 型放免  $\gamma$  计数器, 上海核福光电仪器有限公司产品。

### 2 方法

\* 收稿日期: 2002-04-07

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (39870945)

作者简介: 梁中琴 (1954-), 女, 山东福山人, 教授, 硕士, 毕业于原苏州医学院, 现任苏州大学医学院药理教研室主任, 硕士生导师, 主要从事中药抗肿瘤及免疫调节作用的研究。Tel: (0512) 65125191

2.1 内皮细胞培养:人脐静脉内皮细胞 (HUVEC)按 Jaffa 方法处理<sup>[7]</sup>。细胞用含 10% 小牛血清的 RPM I1640 培养至融合单层后供实验用。

2.2 内皮细胞缺氧模型的制备及实验分组:融合单层 HUVEC,置密闭容器内充纯 N<sub>2</sub>, 20 min/d,造成缺氧。缺氧密闭容器置 37℃ 生化培养箱。实验分为正常对照组,单纯缺氧组,心脑血管缺氧组,心脑血管 (0.25~20 g/L) 于缺氧前加入到培养液中,在缺氧条件下,37℃ 孵育 48 h。

2.3 ET-1 和 NO 的测定:细胞培养液经离心取上清液,上清液用 PBS 1:10 稀释后,按试剂盒说明书在 γ 计数测定仪上测定 ET-1 的含量,同时取上清液按 NO 测定试剂盒要求操作测 NO 含量。

### 3 结果

3.1 心脑血管对缺氧内皮细胞培养上清液中 ET-1 含量的影响:如表 1 所示,单纯缺氧条件下, HUVEC 培养上清液中 ET-1 含量与正常对照组相比含量明显增高 ( $P < 0.01$ ),提示缺氧可刺激 HUVEC 分泌 ET。心脑血管 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 g/L 可不同程度地抑制 HUVEC 产生 ET,其中 0.50, 1.0 g/L 组抑制作用最明显,与单纯缺氧组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。当剂量增大为 2.0 g/L 时,其抑制作用虽有所减弱,但仍低于单纯缺氧组。

表 1 心脑血管对 HUVEC 培养上清液中 ET-1 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

| 组别   | 剂量 (g/L) | ET-1 (pg/ml)               |
|------|----------|----------------------------|
| 正常对照 | -        | 31.26 ± 78.14              |
| 单纯缺氧 | -        | 85.70 ± 11.10 <sup>△</sup> |
| 心脑血管 | 0.25     | 75.00 ± 22.76              |
|      | 0.50     | 60.22 ± 8.08               |
|      | 1.00     | 66.42 ± 9.17               |
|      | 2.00     | 71.35 ± 21.31              |

与单纯缺氧组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与正常对照组比较: <sup>△</sup>  $P < 0.05$

3.2 心脑血管对缺氧 HUVEC 培养上清液中 NO 含量的影响:见表 2。缺氧 48 h 后 HUVEC 上清液中 NO 含量降低,但预先加入心脑血管 0.25, 0.50, 1.0, 2.0 g/L 共孵,可以剂量依赖性地增加 HUVEC 培养上清中 NO 含量,其中 1.0, 2.0 g/L 组与单纯缺氧组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。提示心脑血管可促进缺氧内皮细胞分泌 NO。

### 4 讨论

内皮细胞 (EC) 是血管壁与血液之间的分界细胞,它不仅在维持血液流动状态方面发挥作用,而且还是机体重要的代谢和内分泌器官之一。EC 可释放缩血管物质 ET 和舒血管物质 NO,二者共同调节血管的张力。在病理条件下,内皮功能紊乱介导血

表 2 心脑血管对 HUVEC 培养上清液中 NO 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ )

| 组别   | 剂量 (g/L) | NO (nmol/L)  |
|------|----------|--------------|
| 正常对照 | -        | 18.60 ± 4.90 |
| 单纯缺氧 | -        | 13.90 ± 3.22 |
| 心脑血管 | 0.25     | 15.57 ± 4.61 |
|      | 0.50     | 19.60 ± 4.34 |
|      | 1.00     | 35.42 ± 6.62 |
|      | 2.00     | 39.22 ± 7.08 |

与单纯缺氧组比较: \*  $P < 0.05$

管收缩,血小板、单核细胞粘附和平滑肌细胞 (SMC) 增殖,最终引起动脉粥样硬化 (AS) 性血管疾病<sup>[8]</sup>。研究显示,内皮功能紊乱或丧失,可削弱 NO 的释放,而 AS 发生中最早出现的异常之一是血管 NO 活性降低,内皮依赖血管松弛减弱<sup>[9]</sup>,高胆固醇或心脏缺血再灌注引起 NO 释放减少,且与 PMN 粘附增多有关,而给予 NO 供体,则可有效地预防 PMN 粘附,明显改善血管功能<sup>[10]</sup>。缺氧对血管有许多不同的作用,有报道指出,缺氧可引起 HUVEC 减少生成 NO,降低活性 NO 释放<sup>[11]</sup>,还可刺激 ET-1 的基因表达<sup>[12]</sup>,大鼠冠脉结扎后血浆 ET-1 浓度增加,心肌缺血再灌注在灌注期 ET-1 释放也有明显增加<sup>[11]</sup>。其血 ET-1 浓度的升高不仅使循环血液粘滞度升高,而且还可能激活血小板及某些凝血因子从而有利于血栓形成。

本实验中,采用体外培养 HUVEC,观察心脑血管对正常培养和缺氧状态下培养的 HUVEC 表达 ET-1 和 NO 的影响,结果显示,在缺氧状态下,可显著增加 HUVEC 表达 ET-1,同时降低 NO 的表达。加入不同浓度的心脑血管,与 HUVEC 共孵,在 0.25~2.0 g/L 范围内可使培养上清液中 ET-1 含量下降,而 NO 含量增加,提示其对内皮细胞具有明显的保护作用,可能是心脑血管抗血栓形成的又一个作用机制,表明心脑血管有益于心脑血管性疾病及硬皮病的防治。

参考文献:

- [1] 王平,顾振纶,周文轩,等. 心脑血管对实验性脑缺血的保护作用 [J]. 中成药, 2000, 22(9): 636-639.
- [2] 梁中琴,陆群,朱益,等. 心脑血管抑制内皮细胞和血小板表达粘附分子 [J]. 中成药, 2001, 12: 894-896.
- [3] Furchgott RF. The discovery of endothelium dependent relaxation [J]. Circulation, 1993, 87(suppl v): v3.
- [4] Moncada S, Palmer RM J, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology [J]. Pharmacol Rev, 1991, 43: 109-142.
- [5] Panza JA, Casina P K, Kilcoyne C M. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension [J]. Circulation, 1993, 87: 1468-1474.
- [6] Hinson JP, Kapas S, Cameron L A. Differential effects of en-

- ogenous and exogenous nitric oxide on release of endothelium-I from the intact perfused rat adrenal gland in situ [J]. FEBS-Lett, 1996, 379(1): 7-10.
- [7] Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, *et al.* Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria [J]. J Clin Invest, 1973, 52: 2745-2756.
- [8] Luscher T F, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease, role of the endothelium as a target and mediator [J]. Atherosclerosis, 1995, 118(suppl): s81.
- [9] Freiman P C, Mitchell G G, Heistad D D, *et al.* Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates [J]. Circ Res, 1986, 58-78.
- [10] Ma S L, Weyrich A S, Lefer D J, *et al.* Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium [J]. Circ Res, 1993, 72: 403-412.
- [11] Phelan M W, Faller D V. Hypoxia decrease constitutive nitric oxide synthase transcript and protein in culture endothelial cells [J]. J Cell Physiol, 1996, 167: 469-476.
- [12] Kourembranes S, Mcquillan L P, Leung G K, *et al.* Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia [J]. J Clin Invest, 1993, 92: 99-104.
- [13] Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, *et al.* Endothelin in myocardial in myocardial infarction [J]. Nature, 1990, 344: 114.

## 血竭总黄酮对血小板聚集 血栓形成及心肌缺血的影响

马建建<sup>1</sup>, 宋艳<sup>1</sup>, 贾敏<sup>2</sup>, 李长龄<sup>1\*</sup>

(1. 北京大学药学院 分子与细胞药理学系, 北京 100083; 2. 山西省大同市药品检验所, 山西 大同 037006)

**摘要:** 目的 观察血竭总黄酮对大鼠及兔血小板聚集、血栓形成及心肌缺血的影响。方法 采用体外血小板聚集、大鼠体内深静脉血栓形成及结扎冠状动脉所致急性心肌缺血实验模型。结果 血竭总黄酮对体外 ADP 诱导的大鼠血小板聚集及 PAF 诱导的兔血小板聚集有一定的抑制作用; 可明显抑制大鼠实验性深静脉血栓形成及结扎冠状动脉所致急性心肌缺血面积。结论 血竭总黄酮具有一定的活血化瘀和抗血小板、抗血栓形成作用。

**关键词:** 血竭总黄酮; 血小板聚集; 血栓形成; 心肌缺血; 活血化瘀

中图分类号: R286.2 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)11-1008-03

### Effect of total flavone in *Sanguis Draconis* on platelet aggregation, thrombus formation and myocardial ischemia

MA Jian-jian<sup>1</sup>, SONG Yan<sup>1</sup>, JIA Min<sup>2</sup>, LI Chang-ling<sup>1</sup>

(1. Department of Molecular and Cellular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Institute for Drug Control, Datong 037006, China)

**Abstract** **Object** To investigate the effect of total flavone in *Sanguis Draconis* (tFSD) on platelet aggregation, thrombus formation and myocardial ischemia in rat and rabbit. **Methods** Adopting the experimental models including *in vitro* platelet aggregation in rat and rabbit, *in vivo* thrombus formation in rat internal vein, and acute myocardial ischemia by ligating the coronary artery. **Results** *In vitro*, tFSD could, to a certain degree, inhibit the platelet aggregation induced by ADP and PAF. Moreover, tFSD could markedly restrain artificial thrombus formation in rat internal vein and the area of acute myocardial ischemia after ligating the coronary artery. **Conclusion** tFSD has the function of promoting blood circulation and removing blood stasis, anti-thrombosis, together with platelet aggregation inhibition.

**Key words** total flavone in *Sanguis Draconis* (tFSD); platelet aggregation; thrombus formation; myocardial ischemia; promoting blood circulation and removing blood stasis

血竭为剑叶龙血树 *Daemonorops cochinchinensis* (Lour.) S. C. Chen 的含树脂木材的 95% 乙醇提取物, 是国家 1991 年批准的一类新药材。具有活

血散瘀、止血、止痛、敛疮、生肌等功效。内服主治瘀血肿痛、闭经、痛经; 外用主治外伤出血、溃疡不敛、痔漏肿痛等。为了进一步探讨和提高血竭的药用价

\* 收稿日期: 2002-05-10

作者简介: 李长龄 (1946-), 男, 教授, 医学硕士, 1982 年毕业于中国协和医科大学 (中国医学科学院药物所), 目前主要从事心血管药物药理研究

\* 通讯作者 Tel (010) 62091703