

## · 药理与临床 ·

## 大黄酸鬼臼毒素酯对人骨肉瘤细胞作用机制的研究

万宗明, 陈虹, 曹波, 王莹, 牟洪军\*

(武警医学院 生药教研室, 天津 300162)

**摘要:**目的 研究大黄酸衍生物大黄酸鬼臼毒素酯(RH-01)对人骨肉瘤(HOS)细胞的作用及其机制。方法体外培养HOS细胞,应用MTT法测定RH-01作用72h的 $IC_{50}$ 值,羟基磷灰石吸附实验测定RH-01在体外的骨亲和性,荧光染色观察RH-01对HOS细胞形态的影响,流式细胞仪检测细胞周期分布情况,RT-PCR检测HOS细胞周期蛋白Cyclin D1, CDK4基因表达的变化。结果 RH-01能明显抑制HOS细胞的生长,作用72h的 $IC_{50}$ 值为 $0.18 \mu\text{mol/L}$ ;羟基磷灰石对四环素和RH-01吸附值分别为 $(8.1 \pm 0.15)$ 、 $(14.8 \pm 0.11) \mu\text{mol/g}$ , RH-01的骨亲和性高于四环素;荧光染色后,可见到经RH-01处理的HOS细胞膜皱褶、卷曲、破裂,核碎裂固缩,聚集成细小的凝聚块;流式细胞仪检测到细胞周期 $G_2+M$ 期阻滞明显;RT-PCR的半定量检测结果表明Cyclin D1和CDK4 mRNA表达降低。结论 RH-01通过调控细胞周期驱动机制使细胞发生周期阻滞,导致HOS细胞的生长抑制,并且RH-01在体外具有良好的骨亲和性。

**关键词:** 大黄酸鬼臼毒素酯; 人骨肉瘤细胞(HOS细胞); Cyclin D1; CDK4

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)01-0067-05

### Mechanism of Podophyllotoxin rheinate (RH-01) on human osteosarcoma cells growth

WAN Zong-ming, CHEN Hong, CAO Bo, WANG Ying, MOU Hong-jun

(Department of Pharmacognosy, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of Podophyllotoxin rheinate (RH-01) on human osteosarcoma (HOS) cells. **Methods** HOS Cells were cultured in MEM alone or exposed to different concentrations of RH-01. The growth inhibition was analyzed by MTT assay. The bone-targeted effect of RH-01 was evaluated by values of hydroxyapatite ceramic adsorption. The flow cytometry (FCM), fluorescence microscopy, and RT-PCR assay were employed to detect the action mechanism of RH-01. **Results**

RH-01 remarkably inhibited HOS cells growth, its  $IC_{50}$  value was  $0.18 \mu\text{mol/L}$  at 72 h. Values of hydroxyapatite ceramic adsorption towards ADM and RH-01 were  $(8.1 \pm 0.15)$  and  $(14.8 \pm 0.11) \mu\text{mol/g}$ , respectively, which demonstrated that RH-01 had much stronger bone-targeted function than ADM. After the HOS cells with RH-01 diluted by Hoechst 33342 solution, it showed typically morphologic change compared with the control group under fluorescence microscope. Results indicated that RH-01 dramatically induced an accumulation in  $G_2/M$  phase of cell cycle at 24 h by FCM analysis. RT-PCR Assay showed that the expression of cyclin D1, CDK4 mRNA obviously decreased in a concentration dependent manner. **Conclusion** The compound RH-01 could obviously inhibit the growth of HOS cell line and have a very strong bone-affinity feature *in vitro*.

**Key words:** Podophyllotoxin rheinate (RH-01); human osteosarcoma (HOS); Cyclin D1; CDK4

骨肉瘤, 又称成骨肉瘤, 是一种恶性程度很高的骨肿瘤, 主要的治疗方法是手术和手术后化疗, 使5年生存率达到50%<sup>[1]</sup>。现阶段常用的临床治疗药物有甲氨蝶呤、阿霉素、顺铂、异环磷酰胺和长春新碱等, 有效率仅为30%左右。还有一些尚待进一步

研究的治疗骨肉瘤的药物, 如新的双磷酸盐抗癌药唑仑磷酸、铂类新药洛铂、Cryptophycin52、PUN-19548和吡唑啉吡啶(PZA)等<sup>[2]</sup>。但以上化疗药物均有骨髓抑制、胃肠反应、心脏毒性、肝脏毒性、肾脏及膀胱毒性等不良反应。因此努力寻找及合成新型

\* 收稿日期: 2007-06-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371682)

作者简介: 万宗明(1972—), 男, 安徽省肥西县人, 药理学硕士, 实验师, 主要从事抗肿瘤药理学研究。

Tel: (022) 60578256 E-mail: wanzm@you.com

治疗骨肿瘤的药物显得尤为重要。本实验研究的大黄酸衍生物大黄酸鬼臼毒素酯 (RH-01) 为大黄酸和传统抗肿瘤药鬼臼毒素经偶联而得到的一类新型化合物。本研究对 RH-01 在体外影响人源骨肉瘤 HOS 细胞的生长进行了初步的探讨。

## 1 材料

大黄酸衍生物 RH-01 的相对分子质量为 694, 黄色粉末, 难溶于水, 遇酸或碱易分解, 质量分数 > 99%, 结构见图 1, 由武警医学院生药教研室陈虹博士提供。鬼臼毒素和四环素由陈虹博士提供。MEM 培养基为 Gibco 公司产品。MTT (噻唑蓝) 为 Sigma 公司产品。PCR 试剂购于北京鼎国生物技术有限责任公司。其他常规试剂均购于天津联星生物技术公司。

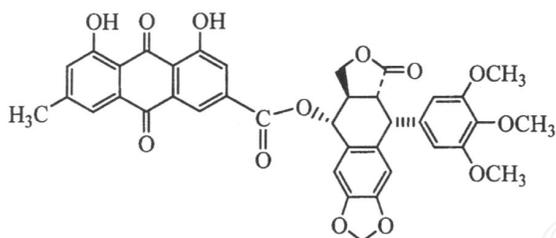


图 1 RH-01 化学结构

Fig 1 Chemical structure of RH-01

## 2 方法

2.1 药品配制: RH-01 不溶于水, 体外实验用二甲基亚砜 (DM SO) 配制, 4℃ 保存, 实验前用无血清培养基稀释, DM SO 终体积分数 < 0.1%。

2.2 细胞培养: 人源骨肉瘤 HOS 细胞由中国协和医科大学细胞中心提供, 体外培养于 MEM 培养基中, 内含 10% 胎牛血清, 100 U/L 青霉素, 100 μg/L 链霉素, 置 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 孵育箱中培养。

2.3 MTT 法检测: 取 HOS 细胞接种于 96 孔培养板内, 培养 24 h 后加药 RH-01 (终浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μmol/L), 另设对照组 (加入 200 μL 细胞悬液, 不加药) 和空白组 (只加 200 μL 培养基), 每组设 3 个复孔, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h 后, 加 MTT 50 μL (1 mg/mL), 培养箱中孵育 4 h 后, 吸出上清液, 加 150 μL DM SO, 摇匀, 用全自动酶标仪 (波长 490 nm), 测定各孔吸光度 (A) 值, 计算 IC<sub>50</sub> 值<sup>[3]</sup>。

2.4 RH-01 的体外羟基磷灰石吸附作用: 用无水乙醇分别溶解四环素和 RH-01, 稀释至 0.125 mmol/L, 各取样品 3 份, 分别向其中加入 25 mg 羟基磷灰石, 各样品在超声波振荡器振荡 1 min 后, 室

温平衡 16 h, 滤过, 测定羟基磷灰石对四环素和 RH-01 的吸附值, 并比较二者的吸附作用大小。

2.5 RH-01 对 HOS 细胞生长曲线的影响: 取 HOS 细胞培养于 96 孔培养板内 (共 4 块板), 培养 24 h, 给药 RH-01 (0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μmol/L), 每组设 3 个复孔, 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 分别在 0、24、48、72 h 按 MTT 法测定 A 值, 以时间为横坐标, A 值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

2.6 荧光染色: 取 HOS 细胞, 加药 RH-01 (0.062 5、0.125、0.25 μmol/L), 设空白对照组; 作用 24 h 后, 收集细胞, 离心后去上清液, 4% 多聚甲醛固定细胞, 加入 Hoechst 33342 (终质量浓度为 10 μg/mL), 37℃ 染色 5~10 min; Olympus XSZ-D2 型荧光显微镜下观察并照相。

2.7 流式细胞仪检测: 将 RH-01 (0.062 5、0.125、0.25 μmol/L) 作用于 HOS 细胞, 设空白对照组加入 0.1% DM SO; 分别在 12、24、36 h 收集细胞, 用 70% 乙醇固定, 4℃ 过夜。作用 24 h 后 PI 染色, 用流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

2.8 HOS 细胞的 RNA 提取和 PCR 分析: 应用 Primer 软件优化设计出上下游引物, 由上海生工公司合成, 引物序列分别为细胞周期素 (CyclinD1) 正向引物: 5'-CTGTCGCTGGA GCCCGTGAAA-AAAG-3'、反向引物: 5'-GAA GTT GTT GGGGCTC-CTCAGGTT-3'; 细胞周期依赖性蛋白激酶 (CDK4) 正向引物: 5'-CATGTA GACCA GGACC-TAAGG-3'、反向引物: 5'-AACTGGCGCATCA-GATCCTAG-3'; βactin 正向引物: 5'-CATCTC-TTGCTCGAAGTCCA-3'、反向引物: 5'-ATCAT-GTTTGA GACCTTCAACA-3'。

取 HOS 细胞, 加药 RH-01 (0.062 5、0.125、0.25 μmol/L), 作用 24 h 后按 trizol 试剂盒说明书进行总 RNA 的抽提, 定量。RT-PCR 采用二步法: 首先按 PCR 试剂盒说明书添加试剂, 42℃ 逆转录 30 min, 95℃、5 min 使酶失活并与 RNA 分离, 终止反应, 得到 cDNA 产物; 在所得的 cDNA 产物中分别加入 CyclinD1 和 CDK4 的上下游引物, 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 进行 35 循环, 最后一个循环 72℃ 延伸 10 min, 其中 CDK4 为 56℃ 退火 45 s。最后取 βactin CyclinD1 和 CDK4 基因 PCR 产物 5 μL 进行 75 V 恒压 1.5 h 琼脂糖凝胶电泳; 经 Total-lab v1.10 软件对凝胶照相结果分析, 得到待测的 RNA 扩增产物的电泳带总灰度与内参照 βactin

RNA 扩增产物的电泳带总灰度, 将二者的比值作为半定量结果 (相对值), 并以此作为目的 RNA 的相对表达量。

2.9 统计学处理: 实验资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 11.5 软件分析。

### 3 结果

3.1 RH-01 对 HOS 细胞毒性作用: HOS 细胞经 RH-01 处理 72 h 后, 经 MTT 法检测, 活细胞数目明显减少, 在 RH-01 0.8  $\mu\text{mol/L}$  组中已无成形细胞可见, 与对照组比较, RH-01 组的 A 值差异显著, 见表 1。RH-01 作用 72 h 的  $\text{IC}_{50}$  值为 0.18  $\mu\text{mol/L}$ 。

表 1 RH-01 对 HOS 细胞的细胞毒性作用 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	C/( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	A 值
空白	-	0.086 $\pm$ 0.006
对照	-	0.520 $\pm$ 0.027
RH-01	0.05	0.439 $\pm$ 0.023*
	0.1	0.287 $\pm$ 0.016*
	0.2	0.208 $\pm$ 0.017*
	0.4	0.165 $\pm$ 0.022*

与对照组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

3.2 RH-01 在体外对羟基磷灰石的吸附作用: 羟基磷灰石对四环素和 RH-01 的吸附值分别为 (8.1  $\pm$  0.15)、(14.8  $\pm$  0.11)  $\mu\text{mol/g}$ , 二者比较差异显著, 表明 RH-01 在体外具有骨亲和性, 其吸附作用高于四环素。

3.3 RH-01 作用后 HOS 细胞的生长曲线: 见图 2, 给药组细胞生长受到抑制, 呈时间、剂量依赖性关系, 在 RH-01 0.8  $\mu\text{mol/L}$  组中已无成形细胞可见。

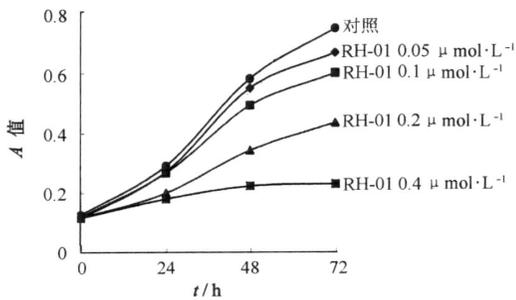
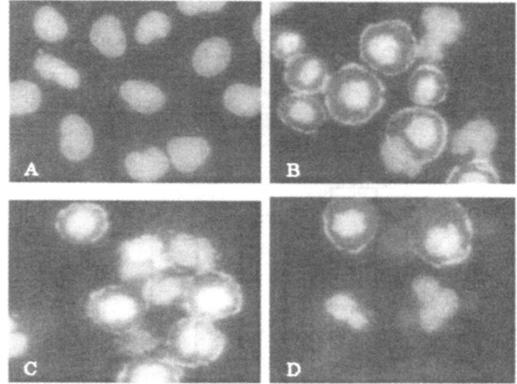


图 2 RH-01 对 HOS 细胞的生长抑制作用

Fig 2 Inhibition of RH-01 on growth of HOS cells

3.4 荧光显微镜检测 RH-01 对 HOS 细胞形态的影响: Hoechst 33342 染色后的 HOS 细胞, 在紫外光激发下, 发出蓝色荧光。给药组细胞形态变化明显, 胞膜皱褶、卷曲和破裂, 核碎裂固缩, 聚集成细小的凝聚块。随着药物浓度的加大, 镜下成形细胞数渐少, 见图 3。



A-对照 B~D-RH-01 0.0625, 0.125, 0.25  $\mu\text{mol/L}$

A-control B~D-RH-01 0.0625, 0.125, 0.25  $\mu\text{mol/L}$

图 3 不同浓度 RH-01 作用后 HOS 细胞形态学变化

Fig 3 Morphological changes of HOS cells treated by RH-01 at different concentrations

3.5 流式细胞仪检测: HOS 细胞经 RH-01 作用 24 h 时,  $G_2+M$  期细胞比例明显增加, 且呈明显剂量依赖性, 表明 RH-01 对 S 期细胞向  $G_2+M$  期移行的阻滞作用明显。RH-01 作用 HOS 细胞 36 h 后, 流式细胞仪已检测不到完整的细胞, 见表 2。

表 2 RH-01 作用 12、24 h 后 HOS 细胞周期分布 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Cell cycle distribution of HOS cell treated by RH-01 for 12, and 24 h ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

RH-01 C/( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	作用 12 h 后细胞周期分布/%			作用 24 h 后细胞周期分布/%		
	$G_1$	S	$G_2+M$	$G_1$	S	$G_2+M$
0(对照)	43.2 $\pm$ 1.8	36.4 $\pm$ 1.5	18.4 $\pm$ 1.1	45.9 $\pm$ 1.4	40.7 $\pm$ 1.8	19.4 $\pm$ 1.9
0.0625	44.4 $\pm$ 1.5	34.9 $\pm$ 1.4	17.7 $\pm$ 1.3	40.3 $\pm$ 1.6	38.5 $\pm$ 1.9	25.1 $\pm$ 1.2
0.125	43.0 $\pm$ 1.6	36.0 $\pm$ 1.6	16.8 $\pm$ 1.7	31.8 $\pm$ 1.8	30.7 $\pm$ 1.2	35.2 $\pm$ 1.3*
0.25	39.0 $\pm$ 1.1	38.3 $\pm$ 1.7	22.7 $\pm$ 1.8	19.1 $\pm$ 1.8	17.5 $\pm$ 1.6	49.7 $\pm$ 1.4*

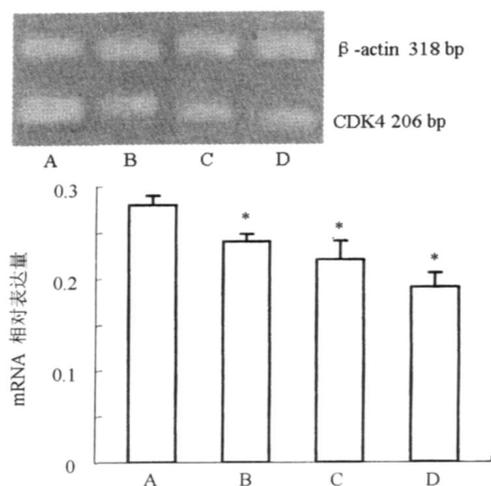
与对照组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

3.6 RH-01 对调节细胞周期相关基因表达的影响: 经 RT-PCR 检测结果显示, 与对照组相比, 不同浓度的 RH-01 作用于 HOS 细胞 24 h 后, CyclinD1、CDK4 mRNA 表达量随作用剂量增加而明显减少, 差异显著, 见图 4 和 5。

### 4 讨论

大黄的蒽醌类化合物大黄酸的结构与四环素相似, 具有碱金属离子络合的能力, 并经羟基磷灰石体外吸附实验证实有类似于四环素的骨亲和性。鬼臼毒素有很强的抗癌活性, 但由于其有严重的骨髓抑制和胃肠道反应等副作用, 所以在临床上不能直接用来作为抗肿瘤应用<sup>[4]</sup>。大黄酸衍生物 RH-01 是大黄酸和鬼臼毒素进行化学结构改造而得到的新的化

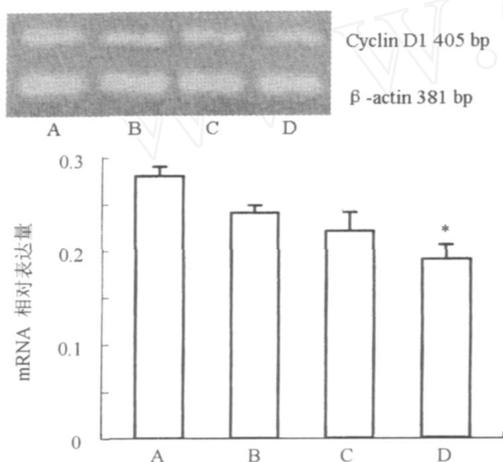


A-对照组 B~D-RH-01 0.0625, 0.125, 0.25  $\mu\text{mol/L}$  组  
与对照组比较: \* $P < 0.05$

A-control group B-D-RH-01 0.0625, 0.125, and  
0.25  $\mu\text{mol/L}$  group \* $P < 0.05$  vs control group

图 4 RH-01 对 HOS 细胞 CDK4 mRNA 表达的  
影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 4 Effect of RH-01 on CDK4 mRNA expression  
in HOS cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



A-对照组 B~D-RH-01 0.0625, 0.125, 0.25  $\mu\text{mol/L}$  组  
与对照组比较: \* $P < 0.05$

A-control group B-D-RH-01 0.0625, 0.125, and  
0.25  $\mu\text{mol/L}$  group \* $P < 0.05$  vs control group

图 5 RH-01 对 HOS 细胞 Cyclin D1 mRNA 表达的  
影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig 5 Effect of RH-01 on Cyclin D1 mRNA expression  
in HOS cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

合物。本实验在研究 RH-01 抑制 HOS 细胞生长和体外羟基磷灰石吸附作用的基础上,进一步对 RH-01 的作用机制进行了初步探讨。

经体外药效学研究证实, RH-01 对体外培养的人源骨肉瘤 HOS 细胞有很强的杀伤力, 对 HOS 细

胞的  $\text{IC}_{50}$  为  $0.18 \mu\text{mol/L}$ 。通过对 HOS 细胞的生长曲线观察, 发现 RH-01 对 HOS 细胞的生长抑制作用呈浓度及时间依赖性。由此表明 RH-01 在体外能抑制 HOS 细胞的生长; 经体外羟基磷灰石吸附实验证实 RH-01 与钙离子结合能力强, 具有骨亲和性。

肿瘤的发生主要是细胞周期调控的异常, 包括细胞周期启动、运行和终止的异常, 使细胞获得以增殖过多、凋亡过少的失控性生长特征。细胞周期受控于精密的细胞周期调控机制。细胞周期调控机制涉及一组蛋白激酶, 称为细胞周期依赖性蛋白激酶 (CDK), 它们在细胞周期内特定的时间激活, 通过对相应的底物磷酸化, 驱使着细胞完成细胞周期, 人类细胞主要的 CDK 有 CDK1 (CDC2)、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7; CDK 的细胞周期特异性又依赖于呈细胞周期特异性表达、累积与分解的蛋白质, 称为细胞周期素 (Cyclin)。人类细胞主要的 Cyclin 有 CyclinB1、CyclinA、CyclinE、CyclinD1、D2 和 D3。与肿瘤关系最为密切的 Cyclin, 首推 CyclinD, 大量的研究表明, 在大多数的肿瘤中, 由于基因的扩增或移位导致 CyclinD1 的过度表达。目前, 越来越多的研究证明, 在不同的肿瘤细胞中, 存在着不同的 Cyclin 和 CDK 的过度表达和基因重排, 从而影响细胞的周期调控机制, 致使细胞进入了失控性生长——癌变。Ma 等<sup>[5]</sup>在研究唾液腺囊性癌时发现 CyclinD1 和 CDK4 与细胞周期  $G_2 + M$  期有关, 抗癌药物作用后, 使细胞周期阻滞在  $G_2 + M$  期, 抑制了肿瘤细胞的过度增殖, 而细胞周期调控机制的 CyclinD1 和 CDK4 的蛋白表达量也降低。本实验通过流式细胞仪对 HOS 细胞的细胞周期的检测结果显示: RH-01 作用于 HOS 细胞后,  $G_1$  期细胞数明显减少,  $G_2 + M$  期细胞数显著增多, 而 RT-PCR 结果显示: RH-01 作用于 HOS 细胞后, 细胞周期调控机制的相关蛋白 CyclinD1 和 CDK4 基因 mRNA 表达明显降低, 由此推测, RH-01 对 HOS 细胞  $G_2 + M$  的阻滞作用与细胞周期调控机制 CyclinD1 和 CDK4 基因表达降低相关。

综上所述, 本实验发现大黄酸衍生物 RH-01 可能是一种具有骨亲和性的化合物, 并且通过调控细胞周期蛋白 CyclinD1 和 CDK4 的表达, 使 HOS 细胞周期发生阻滞, 最终抑制了 HOS 细胞的生长。本研究提示大黄酸衍生物 RH-01 可能是一种具有特异性抗骨肉瘤作用的药物, 本课题组将进行动物体内实验研究, 拟对其做进一步的验证。

## 参考文献:

- [1] Schwameis E, Dominkus M, Krepler P, *et al*. Reconstruction of the pelvis after tumor resection in children and adolescents [J]. *Clin Orthop*, 2002, 402: 220-235.
- [2] Nakamura H, Oishi S, Yagyu H, *et al*. Comparative study of bone resorption markers for the diagnosis of bone metastasis in lung cancer [J]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, 2002, 40(5): 355-359.
- [3] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997.
- [4] 郑培楠, 李朝峰, 赵长琦. 鬼臼毒素及其衍生物 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(1): 80-82.
- [5] 马杰, 王洁, 钟鸣, 等. Genistein 对腺样囊性癌细胞 SAAC-83 中细胞周期蛋白表达的影响 [J]. 上海口腔医学, 2006, 15(1): 69-72.

## 川芎嗪对缺氧人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶功能的影响

张国平<sup>1</sup>, 孙梅<sup>1</sup>, 杨洁红<sup>2</sup>, 万海同<sup>2\*</sup>

(1. 浙江大学医学院附属第二医院 中医科, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053)

**摘要:**目的 应用人脐静脉内皮细胞 (HUV ECs) 缺氧模型, 观察川芎嗪对其抗凝和纤溶功能的影响。方法 制备正常人脐静脉原代 EC, 待 EC 培养达融合状态后, 将其放入含 95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气体的缺氧环境, 制备人脐静脉原代 EC 缺氧损伤模型。并设正常组, 模型组, 川芎嗪组, 观察各组细胞培养上清液中漂浮细胞数、抗凝、纤溶指标等变化。结果 与对照组相比, 模型组培养液中的漂浮细胞数显著增高, 前列环素 (6-keto-PGF<sub>1α</sub>) 水平显著下降, 组织型纤溶酶原激活物抑制物 (PAI) 活性显著增高, 组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 活性显著降低, 内皮素 (ET) 水平显著增高, NO 水平显著降低; 川芎嗪具有显著提高 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 水平, 调节 PAI、t-PA 活性和 ET、NO 水平的作用。结论 本实验制备的人脐静脉原代 EC 缺氧损伤模型存在着 EC 受损, 分泌功能下降, 血管舒缩功能失调; 川芎嗪具有保护在缺氧环境下 EC 受损, 调节 EC 分泌功能和血管舒缩功能。

**关键词:** 川芎嗪; 内皮细胞; 缺氧; 前列环素; 组织型纤溶酶原激活物; 内皮素

中图分类号: R 286.32 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2008)01-0071-03

## Effect of tetramethylpyrazine on hypoxic model in human umbilical vein endothelium cells and its functions of anticoagulation and fibrinolysis

ZHANG Guo-ping, SUN Mei, YANG Jie-hong, WAN Hai-tong

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; 2. Institute of Cardio-cerebral Diseases, Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

**Abstract Objective** To set the hypoxic model in human umbilical vein endothelium cells (HUV ECs) and observe the effect of tetramethylpyrazine in its functions of anticoagulation and fibrinolysis. **Methods** Preparing the normal primary HUV ECs, when the cultured endothelial cells (ECs) were inoculated they were put into the anoxic condition with 95% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> to make hypoxic model in primary HUV ECs. Normal, model, and tetramethylpyrazine groups were divided and used to observe the difference of floating cells, anticoagulation and fibrinolysis indexes in supernatant of each group. **Results** Compared with the control group, the number of floating cells in supernatant was increased obviously, the level of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> was declined significantly, the activity of plasminogen activator inhibitor (PAI) and the level of endothelin (ET) were enhanced obviously, the activity of tissue plasminogen activator (t-PA) and the level of NO were declined significantly in model group; the level of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> was raised significantly, the activity of PAI and t-PA, and the levels of ET and NO could be regulated in the tetramethylpyrazine group. **Conclusion** In the hypoxic model of primary HUV ECs made in this experiment, ECs are injured, secreting function is declined, vasomotion is out of control. Tetramethylpyrazine could protect hypoxic ECs from being injured, regulate the secreting function of ECs and the vasomotion. The model could provide a method for basic study and medicine selection of anticoagulation and fibrinolysis.

**Key words:** tetramethylpyrazine; endothelial cells (ECs); hypoxia; prostacyclin; tissue plasminogen activator (t-PA); endothelin (ET)

收稿日期: 2007-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371789); 浙江省自然科学基金资助项目 (Z204424)

作者简介: 张国平 (1967—), 男, 浙江嵊州市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事心脑血管病的中西医结合临床研究。

E-mail: zhangguoping@zj.com

\* 通讯作者 万海同 E-mail: wanhaitong@zjcm.net