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SACC-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[1], 孙 梅[1], 杨洁红[2], 万海同[2*]

(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 (HUVECs) 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_2、5% CO_2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-$PGF_{1\alpha}$) 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-$PGF_{1\alpha}$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: R286.32 **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 (HUVECs) and observe the effect of tetramethylpyrazine in its functions of anticoagulation and fibrinolysis. **Methods** Preparing the normal primary HUVECs, when the cultured endothelial cells (ECs) were inosculated they were put into the anoxic condition with 95% N_2 and 5% CO_2 to make hypoxic model in primary HUVECs. 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-$PGF_{1\alpha}$ 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-$PGF_{1\alpha}$ 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 HUVECs 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@zjtcm.net

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起着重要作用，EC的损伤是心脑血管等许多疾病的病理基础。本实验在建立人脐静脉内皮细胞缺氧损伤模型的基础上，观察了川芎嗪对其抗凝和纤溶等功能的影响。

1 材料

1.1 材料及试剂：新生儿脐带由浙江大学妇产科医院提供。川芎嗪对照品购自中国药品生物制品检定所。RPMI-1640培养液（含青霉素100 U/mL、链霉素100 μg/mL、20%小牛血清），用Tris调整pH值至7.2～7.4；Ⅰ型胶原酶，美国Sigma公司产品；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。CO_2恒温培养箱（BB5060型，Heraeus上海）；光学倒置显微镜（COIC）、倒置相差荧光显微镜，Nikon公司；BX70型荧光显微镜（Olympus，日本），bio型酶标仪，SN—682型γ-计数仪（上海日环核仪厂）。

1.2 药品制备：川芎经乙醇回流热提，滤出提取液，浓缩，酸碱处理，精制，川芎嗪得率为0.53%，质量分数为95%，川芎嗪溶于不含小牛血清的培养液中，川芎嗪的终浓度为0.50 mmol/L（该剂量是根据临床使用剂量换算并结合早期EC培养的预试验结果而定）。

2 方法

2.1 正常人脐静脉原代EC制备：参照Jaffe方法[1]，并加以改进。以PBS（pH值为7.2～7.4）冲洗脐静脉管腔至洗出液无色透明，再以0.1%胶原酶（pH 7.4）作用15 min后停止消化，收集EC，计数，调整细胞浓度至5×10^4/mL，接种于96孔培养板，每孔200 μL，在37 ℃、5% CO_2培养箱中静置培养，24 h后进行第1次换液，加入37 ℃预热的新鲜培养液，以后每隔48 h换液1次，接种3～4 d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EC特征。

2.2 人脐静脉原代EC缺氧损伤模型制备：人脐静脉原代EC培养达融合状态后，更换无小牛血清的培养液（每孔2 mL），放入含95% N_2、5% CO_2混合气体的培养缸内（缺氧环境）培养24 h。全量收集该EC上清液，离心（1 000 r/10 min）除去培养液中的细胞碎片，置-20 ℃冰箱备用。血气分析表明常氧和缺氧培养液上清液中氧分压分别为：16.7 kPa（125 mmHg）和2.8 kPa（21 mmHg）。正常组：人脐静脉原代EC培养达融合状态后，更换无小牛血清的培养液（2 mL），继续在常氧环境中培养24 h，按上述方法，收集培养液。

2.3 分组：EC分为模型组、对照组、川芎嗪治疗组。川芎嗪治疗组在EC培养达融合状态后，在放入含95% N_2、5% CO_2混合气体的培养缸内（缺氧环境）的0时，更换含川芎嗪培养液，其余操作同模型组，每孔2 mL，培养24 h，设8个复孔。对照组正常培养，无缺氧，其余同模型组。

2.4 检测指标及方法：观察细胞形态及培养上清液中的漂浮细胞情况。取各组培养液，采用放免法测定前列环素（6-keto-$PGF_{1\alpha}$）；采用发色底物法测定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内皮素（ET）水平（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水平（试剂盒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。

3 结果

3.1 各组细胞培养上清液中漂浮细胞和6-keto-$PGF_{1\alpha}$水平的变化：表1显示，模型组在缺氧24 h后，漂浮细胞数显著高于对照组，表明缺氧后EC受损。与模型组相比，川芎嗪组可显著降低漂浮细胞数，表明其对细胞在缺氧环境下的生长具有保护作用，保护EC在缺氧状况下的分泌功能。模型组在缺氧24 h时，6-keto-$PGF_{1\alpha}$的量显著低于正常组，表明模型组缺氧后EC受损，分泌功能下降。与模型组相比，川芎嗪组可显著提高6-keto-$PGF_{1\alpha}$的量，对细胞在缺氧环境下的生长具有保护作用。

表1 各组细胞上清液中漂浮细胞数及6-keto-$PGF_{1\alpha}$水平（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Table 1 Number of floating cells and level of 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ in supernatant of HUVECs in each group（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	漂浮细胞（细胞总个数$\times10^5\cdot mL^{-1}$）	6-keto-$PGF_{1\alpha}$/($pg\cdot mL^{-1}$)
对照	0.062±0.021	423.6±65.33
模型	0.432±0.072**	217.6±43.3**
川芎嗪	0.142±0.031△△	363.9±55.2△

与对照组比较：**$P<0.01$

与模型组比较：△$P<0.05$ △△$P<0.01$

**$P<0.01$ *vs* control group

△$P<0.05$ △△$P<0.01$ *vs* model group

3.2 川芎嗪对培养人脐静脉EC PAI和t-PA活性及ET和NO水平的影响：表2显示，模型组在缺

氧 24 h 时, PAI 活性显著高于对照组, 而 t-PA 活性显著低于对照组。与对照组相比, 模型组 PAI/t-PA 的值增高, 川芎嗪组 PAI/t-PA 的值下降。提示模型组缺氧后 EC 受损, 分泌功能失调, 纤溶功能减弱。与模型组相比, 川芎嗪组可调节 PAI 与 t-PA 活性, 对细胞在缺氧环境下的生长具有保护作用, 调节 EC 分泌功能。模型组在缺氧 24 h 时, ET 水平显著高于对照组, 而 NO 的量显著低于对照组。提示模型组缺氧后 EC 受损, 血管舒缩功能失调。川芎嗪组可抑制缺氧后 EC 受损, 调节血管舒缩功能。

表2 各组培养人脐静脉 EC 上清液中 PAI、t-PA 活性和 ET、NO 水平($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 2 Activity of PAI and t-PA, levels of ET and NO in supernatant of HUVECs in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	PAI 活性/(U·mL^{-1})	t-PA 活性/(U·mL^{-1})	PAI/t-PA	ET/(pg·mL^{-1})	NO/(μmol·mL^{-1})
对照	0.653±0.056	0.956±0.081	0.683	56.71±6.20	35.23±4.85
模型	0.939±0.077**	0.614±0.059**	1.529	93.31±10.23**	20.17±3.78**
川芎嗪	0.857±0.082	0.876±0.049△	0.978	70.44±10.98△△	22.36±3.95

与对照组比较: $^{**}P<0.01$

与模型组比较: $^{\triangle}P<0.05$ $^{\triangle\triangle}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ *vs* control group

$^{\triangle}P<0.05$ $^{\triangle\triangle}P<0.01$ *vs* model group

4 讨论

机体缺氧可使血管 EC 直接受损伤。如高原缺氧病理检查时可见毛细血管平滑肌肥大; 毛细血管 EC 成阶段性肿胀, 胞核突向管腔内, 有空泡形成(缺氧细胞损伤的标志)和退变萎缩, 管腔受压而变窄, 因此高原居民的血管 EC 易衰老和脱落[2]。在缺氧条件下, EC 内 NO 和 Ca^{2+} 超载是其损伤的分子机制之一。近年研究发现, 血管 EC 的缺氧性凋亡中有 NO 的参与[3]。缺氧是许多血管性疾病中常见的病理现象, 缺氧可在以下几个主要方面造成对血管 EC 的损伤: 缺氧可使血管 EC 形态学发生改变, 主要表现为线粒体肿胀、空化、嵴结构不清; 另一方面缺氧可促使血管 EC 产生自由基, 通过对生物膜中多价不饱和脂肪酸的氧化作用而引起细胞损伤; 缺氧还对血管 EC 合成、释放 ET 和 NO 的功能也有损伤作用; 血管 EC 在缺氧后可增加与血小板、血细胞的黏附性, 增高血液凝固性[4]。对于心脑血管等疾病, 保护血管 EC 免受缺氧性损伤具有十分重要的意义。

ET 和 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[5]。

EC 不仅具有屏障及物质转运功能, 而且还可产生释放 t-PA、PAI、前列腺素 I_2(PGI$_2$)等生物活性物质, 参与调控机体的凝血及纤溶平衡。PGI$_2$是 EC 产生的前列腺素家族中的主要一员, 是迄今所知最强烈抑制血小板聚集的生物活性物质, 主要基于其激活腺苷酸环化酶, 升高细胞 cAMP, 而抑制血小板聚集, 从而达到抗血栓作用。测定 PGI$_2$体内稳定代谢产物 6-keto-PGF$_{1\alpha}$的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。

体外培养血管 EC 有贴壁生长的特性, 而一旦 EC 受到缺氧等损害, 就会影响它的部分功能, 最终使其坏死漂浮[6]。本实验研究结果表明: 人脐静脉原代 EC 缺氧损伤模型与对照组相比, 模型组培养液中的漂浮细胞数显著增高, 6-keto-PGF$_{1\alpha}$的量显著下降; PAI 活性显著增高, t-PA 活性显著降低; ET 的量显著增高; NO 的量显著降低; 这表明本实验制备的人脐静脉原代 EC 缺氧损伤模型存在着内皮细胞受损, 分泌功能下降, 血管舒缩功能失调。本模型可做为 EC 受损, 为进行抗凝和纤溶的基础研究和药物筛选评价提供方法。

川芎嗪具有抑制缺血区血管 EC 黏附分子的表达, 抗血栓形成、改善微循环的作用[7]; 通过增加 NO 释放保护内皮细胞损伤。川芎嗪可显著改善脑缺血-再灌注损伤大鼠 ET、MDA 及脑超微结构的异常变化。本实验研究也表明: 川芎嗪可显著降低漂浮细胞数, 显著提高 6-keto-PGF$_{1\alpha}$的量, 调节 PAI 与 t-PA 活性, 调节 ET、NO 的量。提示川芎嗪对 EC 在缺氧环境下的生长具有保护作用, 调节 EC 分泌功能失调, 调节血管舒缩功能。

参考文献:

[1] Jaffe E A. Synthesis antihemophuie factor antigen by cultured human endothelial cells [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2757-2760.

[2] 刘 郁, 张海鹏. 缺血缺氧性脑损伤病理机制 [J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(7): 496-497.

[3] Endoh M, Maiese K, Wanger J. Expression of the in-ducible from of nitricoxide synthase by reactive astrocytes after transient globail ischemia [J]. *Brain Res*, 1994, 65(1): 2-100.

[4] 陈小容, 邹霞英, 辛达临. 缺氧性肺动脉高压大鼠肺血管内皮细胞的变化 [J]. 中国病理生理杂志, 1996, 12(6): 608-610.

[5] Leman A, Burnett J C. Intent and altered endothelium in regulation of vasomotion [J]. *Circulation*, 1992, 86(6): III-12-19.

[6] 胡大林, 廖建坤, 吴校连, 等. 自由基与 DNA 的氧化损伤 [J]. 国外医学: 卫生学分册, 2002, 29(5): 261.

[7] 刘 勇, 许彦钢, 林 奇. 川芎嗪对脑血管内皮细胞 ICAM-1 表达的影响 [J]. 西安医科大学学报, 1998, 19(2): 14.