

表达来上调 Glut4 的表达,完全不同于罗格列酮在胰岛素的参与下上调 CAP 的表达从而促进 Glut4 表达的作用机制。另外,还发现小檗碱能增加 IR 3T3-L1 脂肪细胞的葡萄糖消耗量,但对 Glut4 蛋白的表达无影响,提示其改善 IR 的机制不同于梓醇及罗格列酮通过上调 Glut4 蛋白的表达从而增加细胞的葡萄糖消耗量。

本研究虽初步揭示了小檗碱、梓醇及其配伍改善 IR 的部分机制,但值得提出的是,小檗碱不通过上调 Glut4 的表达改善 IR,梓醇通过何种途径上调 Glut4^[9],尤其是在没有胰岛素的情况下依然能上调 Glut4 蛋白的表达该如何解释,均有待于做进一步探讨。

参考文献:

- [1] 刘芳芳,杨明炜,王晓强,等.梓醇与小檗碱及其配伍对胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞的影响[J].中草药,2007,38(10):1523-1526.
- [2] Anil Kumar K L, Marita A R. Troglitazone prevents and reverses dexamethasone induced insulin resistance on glycogen synthesis in 3T3 adipocyte [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 130: 351-358.
- [3] Baumann C A, Ribon V, Kanzaki M, et al. CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport [J]. *Nature*, 2000, 407: 202-207.
- [4] Lienhard G E, Slot J W, James D E, et al. How cells absorb glucose? [J]. *Sci Am*, 1992, 266: 86-91.
- [5] Rea S, James D E. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles [J]. *Diabetes*, 1997, 46: 1667-1677.
- [6] Chiang S H, Baumann C A, Kanzaki M, et al. Insulin stimulated GLUT4 translocation requires the CAP dependent activation of TC10 [J]. *Nature*, 2001, 410: 944-948.
- [7] Pessin J E, Saltiel A R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance [J]. *Clin Invest*, 2000, 106: 165-169.
- [8] Baumann C A, Ribon V, Kanzaki M, et al. CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport [J]. *Nature*, 2000, 407: 202-207.
- [9] Ke Y F, Zheng R T. Antihyperglycemic action of catalpol [A]. *Dissertation of Master Degree of Chengong University* [D]. Taiwan: Chengong University, 2003.

补阳还五汤有效组分对血管内皮细胞抗血栓功能及蛋白激酶 C 的影响

欧明娥,唐利文,邓常清*

(湖南中医药大学 中西医结合学院,湖南 长沙 410007)

摘要:目的 探讨补阳还五汤及其有效组分生物碱、苷对凝血酶诱导的血管内皮细胞抗血栓功能改变及蛋白激酶 C (PKC) 活化的影响。方法 以凝血酶 (10 U/mL) 作用于培养的人脐静脉内皮细胞 (ECV304),同时加入药物,24 h 后测定上清液中组织型纤溶酶原激活物 (tPA) 和纤溶酶原激活物抑制物-1 (PAI-1) 水平、细胞组织因子 (TF)、组织因子途径抑制物 (TFPI)、凝血酶调节蛋白 (TM) mRNA 表达及 PKC_α 蛋白表达。结果 凝血酶作用内皮细胞后,tPA 释放增加 ($P<0.01$),TF、TFPI mRNA 表达增强 ($P<0.05$),而 PAI-1 释放及 TM mRNA 表达无显著性变化 ($P>0.05$);PKC_α 表达增强 ($P<0.05$)。补阳还五汤可抑制凝血酶诱导的 tPA 释放增加 ($P<0.01$),生物碱对 tPA 释放增加无显著影响 ($P>0.05$);苷 (1.25 mg/mL) 可使凝血酶诱导的 tPA 分泌增加 ($P<0.05$);原方、生物碱 (2 mg/mL) 和苷 (5 mg/mL) 均可抑制内皮细胞分泌 PAI-1 ($P<0.01$)。原方、生物碱 (1, 2 mg/mL) 和苷均可抑制凝血酶诱导的 TF mRNA 表达增强;生物碱 (0.5 和 1 mg/mL) 可抑制 TFPI mRNA 表达 ($P<0.05$);各药对 TM mRNA 表达无显著影响;原方、生物碱和苷均可抑制凝血酶诱导的内皮细胞 PKC_α 表达的增强 ($P<0.01$)。PKC 激活剂佛波酯 (PMA) 刺激内皮细胞后,PKC_α 被激活 ($P<0.01$);PKC 抑制剂 H₇ 作用于 PMA 刺激的内皮细胞后,PKC_α 表达增强不明显,PAR-1 受体抑制剂 CATG 作用于凝血酶刺激的 ECV304 细胞后,PKC_α 表达显著抑制 ($P<0.05$)。结论 凝血酶可诱导内皮细胞抗血栓性发生变化。补阳还五汤原方、生物碱和苷对凝血酶诱导的血管内皮细胞抗凝、纤溶功能的改变具有调节作用,使血管内皮细胞的抗凝、纤溶作用趋于正常,其作用可能主要是通过抑制凝血酶诱导的 PKC_α 的激活而介导的。生物碱和苷类有效组分可能为该方抗血栓作用的药效物质基础。

关键词:补阳还五汤;血管内皮细胞;组织型纤溶酶原激活物;纤溶酶原激活物抑制物-1;蛋白激酶 C

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)10-1514-07

收稿日期:2007-12-10

基金项目:国家自然科学基金项目 (30572301);教育部科学研究重点项目 (204100);湖南省教育厅重点资助项目 (03A033)

作者简介:欧明娥(1982—),女,湖南常德人,助教,医学硕士,主要从事心脑血管病临床基础研究,现在广东肇庆医学高等专科学校工作。Tel: 13527071045 E-mail: ome202@126.com

* 通讯作者 邓常清 E-mail: dchangq@sohu.com

Effect of Buyang Huanwu Decoction and its active fraction on antithrombosis in cultured vascular endothelial cells and protein kinase C

OU Ming-e, TANG Li-wen, DENG Chang-qing

(College of Integrative Chinese and Western Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: Objective To investigate the antithrombosis effects of Buyang Huanwu Decoction (BHD) and its active fractions on cultured vascular endothelial cells (VEC) following the stimulation of thrombin and their mechanism. **Methods** The human umbilicus vein endothelial cells (ECV 304) were cultured in media containing 10 U/mL thrombin and different doses of drugs. The levels of tPA and PAI-1 were detected by ELISA, the expression of TF, TFPI, and TM mRNA was measured by RT-PCR, and the expression of PKC α was examined by immunohistochemical staining 24 h later. **Results** Compared to the control without any treatment, the release of tPA was increased evidently ($P < 0.01$), and the expression of E-selectin, CD31 and TF, TFPI mRNA was upregulated ($P < 0.05$); While no significant change had been found in the release of PAI-1 and the expression of TM mRNA ($P > 0.05$). Compared to the data after the mere stimulus of thrombin, each dose of BHD increased the release of tPA ($P < 0.01$); None of the doses of alkaloid had significant effect on the release of tPA ($P > 0.05$); And glycoside (1.25 mg/mL) increased the release of tPA ($P < 0.05$). Alkaloid (2 mg/mL), glycoside (5 mg/mL), and each dose of BHD reduced the release of PAI-1 of VEC ($P < 0.01$). The data of RT-PCR detection indicated that the expression of TF mRNA was reduced by the treatment of alkaloid (1 and 2 mg/mL), all doses of BHD, and glycoside; Alkaloid (0.5, and 1 mg/mL) downregulated the expression of TFPI mRNA ($P < 0.05$); While no significant change had been found in the expression of TM mRNA after the treatment of all doses of drugs. The expression of PKC in each drug treatment group was greatly decreased when compared to that in the mere stimulus of thrombin ($P < 0.01$). PKC activator (PMA) significantly enhanced the PKC α expression ($P < 0.01$), H₇ (PKC inhibitor) could inhibit PKC α activation stimulated by PMA. The expression of PKC α stimulated by thrombin was inhibited obviously after adding CATG (PAR-1 inhibitor) ($P < 0.05$). **Conclusion** Thrombin could induce thrombotic changes in cultured VEC, including anticoagulation and fibrinolytic functions. Those changes can be adjusted to the control level by the treatment of BHD, alkaloid, and glycoside. BHD may ameliorate the thrombotic changes caused by thrombin through inhibiting the activation of PKC. The similar effects of alkaloid and glycoside against thrombosis indicate that these two constituents are two effective pharmacological components through which BHD plays its role of antithrombosis.

Key words: Buyang Huanwu Decoction (BHD); vascular endothelial cell (VEC); tissue plasminogen activator (tPA); plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1); protein kinase C (PKC)

血管内皮细胞 (VEC) 是位于血液与血管壁内皮下组织之间的单层细胞, 目前认为, VEC 形态和功能异常为动脉血栓形成的始动原因。研究显示凝血酶除了参与凝血过程外, 还对血管壁的生物学功能产生许多影响, 包括调节血管紧张度、血管平滑肌细胞增殖、迁移和血管生长等^[1]。已有研究表明, 补阳还五汤能提高正常或自由基损伤的 VEC 增殖能力, 减少脂质过氧化物的产生, 使细胞分泌前列环素、内皮素1功能趋于正常^[2]。近期研究表明该方及主要有效组分生物碱和苷可抑制 FeCl₃ 诱导的动脉血栓形成, 其作用与抗血小板活化、提高血中抗凝蛋白活性、促进纤溶活性有关^[3], 因而提示生物碱和苷可能为其抗动脉血栓的有效物质基础之一。本研究

进一步以凝血酶-血管内皮细胞反应模型为对象, 研究补阳还五汤有效组分生物碱、苷对凝血酶诱导的 ECV304 细胞抗血栓功能及蛋白激酶 C (PKC) 信号途径的影响。

1 材料

1.1 人脐静脉内皮细胞 (ECV304): 由武汉大学典型物种保存中心提供。

1.2 试验药物

1.2.1 补阳还五汤的药物组成: 补阳还五汤原方由黄芪 60 g、赤芍 9 g、川芎 6 g、当归 9 g、地龙 9 g、红花 9 g、桃仁 9 g 组成。黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根, 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis*

(Oliv.) Diels 的干燥根,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (Linn.) Batsch 的干燥成熟种子,红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,地龙为环节动物门钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (Perrier) 的干燥体。以上药材均由湖南中医药大学药学院贺福元教授鉴定并提取。

1.2.2 补阳还五汤的提取:按原方比例取药材,加水浸泡,回流加热提取两次,提取时间分别为 60 和 40 min,滤过,合并滤液浓缩至 1 g/mL (按生药计),加 95% 乙醇使醇量分别达 80% 和 85%,搅拌,摇匀,滤过,回收乙醇,加蒸馏水稀释,得原方水提取液,相当于生药 1 g/mL。全方含黄芪甲苷 (0.378 ± 0.0078) mg/g、芍药苷 (1.1623 ± 0.0898) mg/g、苦杏仁苷 (0.8973 ± 0.0124) mg/g、川芎嗪 (0.0106 ± 0.0006) mg/g。

1.2.3 各有效组分的提取分离:原方提取液采用酸碱沉淀、离子交换树脂色谱等方法提取生物碱及苷部分,两类有效部位分离完全,相互之间无混杂。经 HPLC 测定苷类组分含黄芪甲苷 (2.3943 ± 0.1587) mg/g、芍药苷 (19.1132 ± 0.2512) mg/g、苦杏仁苷 (17.9213 ± 0.5638) mg/g;生物碱类组分含川芎嗪 (9.7601 ± 0.0321) mg/g。上述药物使用时以无血清 RPMI-1640 培养基配制。

1.3 主要试剂:PKC 激动剂佛波脂 (PMA)、PKC 抑制剂 H_7 、蛋白酶活化受体-1 (PAR-1) 抑制剂组织蛋白酶 G (CATG)、凝血酶购自 Sigma 公司;RPMI-1640 培养基购自美国 Hyclone 公司;小牛血清 (FCS) 购自杭州四季青公司;胰蛋白酶购自 Amresco 公司。乳酸脱氢酶 (LDH) 活性试剂盒购自南京建成生物工程研究所,组织型纤溶酶原激活物 (tPA)、纤溶酶原激活物抑制物 (PAI-1) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自上海太阳生物技术有限公司,Trizol 核酸提取液购自 Gibco BRL 公司;逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 试剂盒为 TakaRa RNA PCR Kit (Amv) Ver3.0,购自大连宝生物有限公司。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。多聚赖氨酸、即用型 SABC 免疫细胞化学试剂盒、DAB 显色剂、兔抗人 PKC α 多克隆抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养:将 ECV304 细胞株以 0.125% 胰

蛋白酶-0.02% EDTA 消化,用 RPMI-1640 培养液 (含 10% FCS、 1×10^5 U/L 青霉素、 1×10^5 U/L 链霉素, pH 7.2) 制成 1×10^5 /mL 细胞悬液,置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养,待细胞生长融合后,用于以下实验。

2.2 不同浓度凝血酶对 ECV304 的刺激作用:以不同浓度 (1.25~20 U/mL) 凝血酶与 ECV304 细胞共同孵育,以无血清 RPMI-1640 调总反应体积为 200 μ L,18 h 后,调零孔加 Hank's 液,其余各孔加 20 μ L MTT (5 g/L),37 °C、5% CO_2 中培养 4 h,弃孵育液,每孔加二甲亚砜 150 μ L,室温振摇 10 min 后测定 492 nm 处的吸光度 (A) 值,以 A 值反映细胞的活力。同时取培养上清液按试剂盒说明测定 LDH 活性。

2.3 药物的细胞毒作用:根据 MTT 法细胞毒实验,以细胞毒活性值 (抑制率) 大于 20% 作为有显著意义的细胞毒作用。补阳还五汤原方、生物碱和苷均设立不同质量浓度,药物与 ECV304 在 37 °C、5% CO_2 培养箱中共同孵育 24 h 后,按上述 MTT 法测定。每个药物质量浓度做 5 次实验,取平均值,按抑制率 = $(1 - \text{试验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。根据细胞毒实验确定后边实验所用药物的质量浓度。

2.4 对 ECV304 细胞分泌 tPA、PAI-1 的影响:培养的 ECV304 融合后,随机分为对照组、凝血酶组、生物碱 (0.5、1、2 mg/mL) 组、苷 (1.25、2.5、5 mg/mL) 组和补阳还五汤原方 (生药 25、50、100 mg/mL) 组。除对照组外,各组加入不同质量浓度药物和凝血酶 (10 U/mL),置 37 °C、5% CO_2 中培养 24 h。对照组加入等量培养基。取培养上清液,3 000 r/min 4 °C 离心 10 min 后,以 ELISA 法测定 tPA、PAI-1 的量。

2.5 组织因子 (TF)、组织因子途径抑制物 (TFPI)、凝血酶调节蛋白 (TM) mRNA 表达的测定

2.5.1 总 RNA 提取:细胞处理同 2.4 项方法,在 6 孔培养板中加入 0.8 mL Trizol 核酸裂解液,按一步法提取细胞总 RNA。用紫外分光法测 A 值进行定量,并计算 A_{260}/A_{280} 值,提取的总 RNA 比值在 1.7~2.0,表明所得总 RNA 完整。

2.5.2 RT-PCR:按 RT-PCR 试剂盒说明书进行。

①逆转录 (RT):分别加入总 RNA、AMV 逆转录酶和逆转录反应体系进行 RT 反应。②聚合酶链式反应 (PCR):加入 PCR 反应体系、上下游引物、超净水进行 PCR 反应。TF 上游引物为 5'-AACACTTTCCTAAGCCTCC-3',下游引物为 5'-

ACTCATTTCGCTTCCAT-3', 扩增片段长度为 471 bp; TFPI 上游引物为 5'-CAGGAGCCAAC-AGGAAAT-3', 下游引物为 5'-CCACAGCCAGTATAGGTGA-3', 扩增片段长度为 500 bp; TM 上游引物为 5'-CATGTGCGAGACCGGCTAC-CGGCTGGCGG-3', 下游引物为 5'-AGGGGCTGGGCTGGTACTCGCAGTTGGC-3', 扩增片段长度为 218 bp; β -actin 上游引物为 5'-GTGGACATCCGCAAGAC-3', 下游引物为 5'-AAAGGGTGTAACGCAACTAA-3', 扩增片段长度为 302 bp。TF 反应条件: 94 °C、5 min, 94 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、45 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。TFPI、 β -actin 反应条件: 94 °C、5 min, 94 °C、30 s, 51 °C、30 s, 72 °C、45 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。TM 反应条件: 94 °C、5 min, 94 °C、40 s, 61 °C、45 s, 72 °C、40 s, 30 个循环, 72 °C 延伸 5 min。③电泳及分析: PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用 DU640 光密度扫描仪 (美国 Beckman Coulter 产)、Lab Works3.0 凝胶图像分析软件 (美国 UVP 公司产) 检测出阳性表达产物和 β -actin 的表达强度, 按如下公式计算相对强度: 相对强度 = 标志物表达强度/ β -actin 表达强度, 相对强度越大, 表达强度越高。

2.6 对 ECV304 细胞 PKC α 表达的影响: 分组同 2.4 项, 细胞接种时, 于 24 孔培养板中加入 1 cm $\times$ 1 cm 经多聚赖氨酸处理的玻片, 待细胞亚融合后, 加入各组药物和凝血酶, 37 °C、5% CO $_2$ 中培养 24 h, 弃上清液, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 (pH 7.4) 固定, 晾干后以免疫细胞化学法测定 PKC α 表达, 并进行图像分析, 结果以灰度值表示, 灰度值越低, 表示细胞 PKC α 表达越强。

此外, 为分析补阳还五汤有效组分对 PKC α 表达作用的特点, 比较了有效组分与不同抑制物对 PKC α 表达的影响。细胞分为对照组、凝血酶 (10 U/mL) 组、PMA (100 nmol/L) 组、凝血酶+H $_7$ (100 μ mol/L) 组、PMA+H $_7$ 组、凝血酶+CATG (40 mU/mL) 组、凝血酶+原方 (50 mg/mL) 组、凝血酶+生物碱 (2 mg/mL) 组、凝血酶+苷 (5 mg/mL) 组。培养 24 h 后同前测定 PKC α 表达强度。

2.7 统计分析: 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 软件进行分析。多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐时用 LSD 检验, 方差不齐时用秩和检验。

3 结果

3.1 不同浓度凝血酶对 ECV304 的影响: 正常

ECV304 细胞呈菱形或多边形, 直径约为 30~60 μ m, 单层铺路石样排列; 凝血酶浓度为 10 U/mL 时, 细胞收缩变圆, 细胞间隙增大; 凝血酶浓度为 20 U/mL 时, 除细胞收缩变圆和间隙增大外, 可见部分细胞核固缩、死亡。凝血酶为 1.25~15 U/mL 时, 可使 MTT 的 A 值降低, LDH 活性升高; 在凝血酶为 10~15 U/mL 时, MTT 的 A 值降低, LDH 活性升高明显 (图1)。故本实验选定凝血酶终浓度为 10 U/mL。

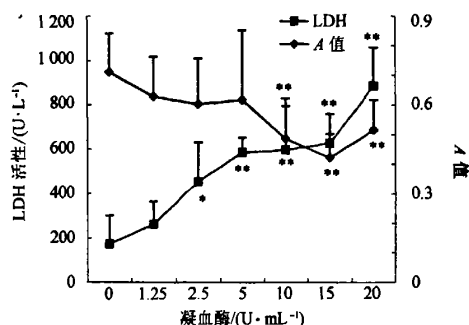


图1 凝血酶对 ECV304 细胞活力和 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 1 Effect of thrombin on vitality and LDH activity of ECV304 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

3.2 药物的细胞毒作用: 生物碱 2.0 mg/mL 时细胞毒活性小于 20%, 故实验时生物碱终质量浓度最大为 2 mg/mL; 苷 5.0 mg/mL 时细胞毒活性值小于 20%, 拟定实验时苷终质量浓度最大为 5 mg/mL; 原方基本上无细胞毒性, 拟定原方终质量浓度最大为 100 mg/mL。

3.3 对凝血酶诱导的 ECV304 细胞分泌 tPA 和 PAI-1 的影响: 凝血酶刺激细胞 24 h 后, 培养液中 tPA 水平升高 ($P<0.01$), 而 PAI-1 水平无显著性变化 ($P>0.05$)。生物碱 3 个剂量对凝血酶诱导的 tPA 分泌增加无明显影响 ($P>0.05$); 苷 5、2.5 mg/mL 剂量对 tPA 分泌增加也无显著影响 ($P>0.05$), 苷 1.25 mg/mL 组其 tPA 水平显著高于对照组 ($P<0.01$), 与凝血酶组比较差异显著 ($P<0.05$)。原方 3 个剂量对 tPA 分泌增加呈显著抑制作用 ($P<0.01$)。生物碱 3 个剂量组 PAI-1 水平显著低于对照组 ($P<0.05, 0.01$); 生物碱 2 mg/mL 组 PAI-1 水平也显著低于凝血酶组 ($P<0.01$); 苷 2.5、5 mg/mL 组 PAI-1 水平均低于对照组 ($P<0.05, 0.01$), 苷 5 mg/mL 组 PAI-1 水平也低于凝血酶组 ($P<0.01$); 原方 3 个剂量组 PAI-1 水平均降低, 显著低于对照组 ($P<0.01$) 和凝血酶组

($P<0.01$)。结果见表1。

3.4 对凝血酶诱导的 ECV304 细胞 TF、TFPI、TM mRNA 表达的影响:各目的基因电泳图谱见图2。凝血酶刺激 ECV304 细胞 24 h 后,细胞 TF、TFPI 表达均增强 ($P<0.05$),TM 表达无显著性变化 ($P>0.05$)。生物碱终质量浓度 1、2 mg/mL 时可抑制凝血酶诱导的 TF mRNA 表达 ($P<0.05$);苷 3 个剂量组和原方 3 个剂量组均可抑制 TF mRNA 表达,生物碱 1、2 mg/mL 可抑制凝血酶诱导的 TFPI mRNA 表达 ($P<0.05$);而苷和原方对 TFPI mRNA 表达无显著影响 ($P>0.05$)。各药对 TM mRNA 表达均无显著性影响。半定量结果见表2。

3.5 对凝血酶诱导的 ECV304 细胞 PKC α 表达的影响:凝血酶刺激细胞 24 h 后,PKC α 灰度值显著低于对照组 ($P<0.01$),而其他各药物组与对照组比

表1 补阳还五汤及其有效部位对凝血酶刺激 ECV304 细胞 tPA 和 PAI-1 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effects of BHD and its active fraction on levels of tPA and PAI-1 in ECV304

cells stimulated by thrombin ($\bar{x}\pm s, n=6$)

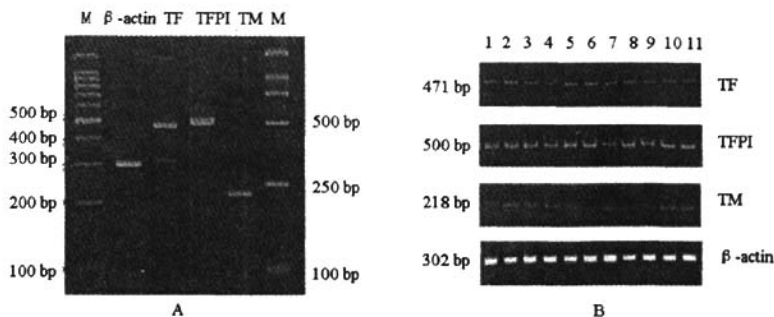
组别	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	tPA/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	PAI-1/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
对照	—	0.97 ± 0.33	37.80 ± 1.79
凝血酶	—	$2.47\pm0.95^{**}$	36.23 ± 1.51
生物碱	0.5	$3.47\pm2.35^{**}$	$34.84\pm1.07^{*}$
	1	$3.00\pm1.20^{**}$	$34.35\pm1.40^{*}$
	2	$2.46\pm1.91^{*}$	$30.81\pm2.61^{**}\Delta\Delta$
苷	1.25	$6.84\pm3.06^{**}\Delta$	37.64 ± 1.94
	2.5	$4.96\pm3.46^{**}$	$35.03\pm3.03^{*}$
	5	$2.52\pm1.12^{*}$	$31.08\pm2.80^{**}\Delta\Delta$
原方	25	$0.88\pm0.61\Delta\Delta$	$24.28\pm1.91^{**}\Delta\Delta$
	50	$0.64\pm0.32^{*}\Delta\Delta$	$22.41\pm1.91^{**}\Delta\Delta$
	100	$0.76\pm0.65^{*}\Delta\Delta$	$18.98\pm2.44^{**}\Delta\Delta$

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与凝血酶组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

$\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs thrombin group



A-各自的基因表达图谱 B-各组各自的基因表达图谱 M-Marker 1-对照组 2-凝血酶组 3~5-生物碱组 ($2, 1, 0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 6~8-苷组 ($5, 2.5, 1.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 9~11-原方组 ($100, 50, 25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

A-Gram of every targeted gene B-Gram of targeted gene in every group M-Marker 1-control group 2-thrombin group 3-5-alkaloids group ($2, 1, \text{ and } 0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 6-8-glycosides group ($5, 2.5, \text{ and } 1.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 9-11-BHD group ($100, 50, \text{ and } 25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

图2 各目的基因 RT-PCR 电泳图谱

Fig. 2 RT-PCR Electrophoregram of every gene targeted in groups

表2 补阳还五汤及其有效部位对凝血酶刺激 ECV304 细胞 TF、TFPI、TM mRNA 表达及 PKC α 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effects of BHD and its active fraction on expression of TF, TFPI, TM mRNA, and PKC α in ECV304 cells stimulated by thrombin ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	药物剂量 $\rho/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	TF/ β -actin	TFPI/ β -actin	TM/ β -actin	PKC α 灰度值
对照	—	0.69 ± 0.10	0.88 ± 0.15	0.43 ± 0.12	128.40 ± 13.77
凝血酶	—	$0.89\pm0.06^{*}$	$1.06\pm0.18^{*}$	0.48 ± 0.17	$91.68\pm13.77^{**}$
生物碱	0.5	0.71 ± 0.05	$0.93\pm0.08\Delta$	0.43 ± 0.12	107.72 ± 29.04
	1	$0.58\pm0.12^{*}\Delta$	$0.93\pm0.10\Delta$	0.36 ± 0.13	107.96 ± 15.98
	2	$0.64\pm0.11\Delta$	1.00 ± 0.27	0.42 ± 0.16	$115.22\pm10.66\Delta$
苷	1.25	$0.67\pm0.24\Delta$	$1.11\pm0.24^{*}$	0.37 ± 0.12	$116.18\pm27.55\Delta$
	2.5	$0.69\pm0.12\Delta$	0.99 ± 0.18	0.35 ± 0.11	$121.20\pm15.91\Delta$
	5	$0.69\pm0.07\Delta\Delta$	0.98 ± 0.07	0.30 ± 0.07	$129.84\pm13.77\Delta\Delta$
原方	25	$0.52\pm0.12^{**}\Delta\Delta$	1.01 ± 0.24	0.41 ± 0.18	111.72 ± 13.72
	50	$0.59\pm0.17\Delta\Delta$	$1.12\pm0.15^{*}$	0.46 ± 0.18	$119.28\pm17.27\Delta$
	100	$0.52\pm0.13^{*}\Delta\Delta$	1.11 ± 0.30	0.34 ± 0.10	$117.38\pm21.43\Delta$

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与凝血酶组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs thrombin group

较差异无显著性意义 ($P>0.05$); 生物碱 2 mg/mL 组, 苷 3 个剂量组, 原方 50、100 mg/mL 组 PKC_α 灰度值均显著高于凝血酶组 ($P<0.05, 0.01$)。结果见表 2。

凝血酶刺激细胞 24 h 后, PKC_α 灰度值显著低于对照组 ($P<0.01$); PKC 激活剂 PMA 刺激 ECV304 后, PKC_α 灰度值显著低于对照组 ($P<0.01$); PKC 抑制剂 H₇ 作用于 PMA 刺激的 ECV304 后, PKC_α 灰度值显著高于 PMA 组和凝血酶组 ($P<0.05$)。H₇ 作用于凝血酶刺激的 ECV304 细胞后, PKC_α 灰度值仍显著低于对照组 ($P<0.05$); CATG 作用于凝血酶刺激的 ECV304 细胞后, PKC_α 灰度值显著高于凝血酶组 ($P<0.05$); 原方、生物碱和苷组与凝血酶组比较, PKC_α 灰度值均显著升高 ($P<0.01$), 而与对照组比较差异无显著性意义 ($P>0.05$)。见表 3。

表 3 补阳还五汤及其有效组分与各工具药比较对 ECV304 细胞 PKC_α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effect of BHD and its active fraction on expression of PKC_α of ECV304 cells compared with every tool medicine ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组 别	剂 量	PKC _α 灰度值
对照	—	146.51 ± 28.06
凝血酶	10 U · mL ⁻¹	111.82 ± 23.48**
PMA	100 nmol · mL ⁻¹	119.35 ± 23.44**
凝血酶 + H ₇	10 U · mL ⁻¹ + 100 μmol · L ⁻¹	127.21 ± 32.65*
PMA + H ₇	100 nmol · L ⁻¹ + 100 μmol · L ⁻¹	133.32 ± 29.08△
凝血酶 + CATG	10 U · mL ⁻¹ + 40 mU · mL ⁻¹	132.44 ± 22.04△
凝血酶 + 原方	10 U · mL ⁻¹ + 50 mg · mL ⁻¹	138.71 ± 29.09△△
凝血酶 + 生物碱	10 U · mL ⁻¹ + 2 mg · mL ⁻¹	142.58 ± 16.67△△
凝血酶 + 苷	10 U · mL ⁻¹ + 5 mg · mL ⁻¹	152.17 ± 18.46△△

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

与凝血酶组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

△ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs thrombin group

4 讨论

在动脉栓塞性疾病中, 血栓形成大多是在 VEC 受损的基础上发生的。VEC 在阻止非适应性凝血发生、维持血管壁的完整性、调节内皮下血管平滑肌细胞的收缩及控制大分子和炎症细胞透过血管壁等方面起重要作用^[4,5]。VEC 可合成分泌前列环素 (PGI₂)、tPA、TM 等抗凝抗栓物质, 对抗血栓形成; 又可合成分泌 von Willebrand 因子 (vWF)、表达 TF 等, 参与凝血和血栓形成^[6]。生理状态下, VEC 以抗栓功能为主, 当血管受损或 VEC 损伤时, VEC 转变为以促栓功能为主。因而, 保护 VEC 功能、促进其抗栓功能为血栓性疾病防治的重要措施。

凝血酶为凝血级联反应过程中的关键酶, 研究表明, 凝血酶除可使纤维蛋白原转变为纤维蛋白外, 还具有多种生物学功能, 可促进内皮细胞活化和分泌促血栓物质^[7]。有研究表明, 凝血酶能增强 VEC 的通透性, 且这种反应与内皮细胞收缩反应一致^[8]。tPA 主要由 VEC 合成释放, 它通过与结合于血栓中的纤溶酶原结合, 起纤维激活作用, 从而使血栓局部的纤维蛋白溶解, 而不引起全身的纤溶酶原激活。PAI-1 是 tPA 的快速抑制剂, 可由 VEC 合成和分泌。两者能够在血液中以 1:1 的比例形成稳定的复合物, 从而维持纤溶平衡^[9]。本实验结果表明凝血酶可使 ECV304 释放 tPA 增加, 对 PAI-1 的释放无影响。已知凝血酶作用于 VEC 后, VEC 产生反应性变化, 分泌释放 tPA 增加。补阳还五汤原方可抑制凝血酶诱导的 tPA 释放, 提示原方对凝血酶诱导的 tPA 释放有抑制作用。而生物碱和苷对 tPA 的释放无显著影响, 并且苷 (1.25 mg/mL) 可促进 tPA 释放, 表明苷和生物碱对 tPA 的释放无抑制作用, 这可能有利于在局部促进血栓溶解。生物碱、苷和原方均可抑制 VEC 的 PAI-1 释放, 提示该方及有效组分生物碱和苷可降低 VEC 的纤溶抑制活性, 从而使其纤溶活性提高, 对促进局部血栓溶解有重要意义。

TF 在凝血过程中的作用是作为因子 VII (VIIa) 的辅因子而启动外源性凝血过程。TFPI 通过依赖于因子 Xa 的方式抑制 TF-FVIIa 复合物活性, 阻止 Xa 和 VIIa 因子的产生而发挥抗凝作用, 它是一种 Kunitz 丝氨酸蛋白水解酶抑制剂, 通过结合并灭活 Xa 因子, 及与 TF-FVIIa 复合物结合 Xa 因子形成 TF-FVIIa-FXa-TFPI 复合物来抑制凝血酶和纤维蛋白的产生^[10]。本实验结果表明, 凝血酶刺激后, TF、TFPI mRNA 表达均增强, 提示凝血酶刺激 VEC 后, 可使 VEC 产生反应性变化, 表达 TF 和 TFPI 增强。生物碱 (1.2 mg/mL)、苷 3 个剂量、原方 3 个剂量 TF 表达均低于凝血酶组, 表明补阳还五汤及生物碱、苷对凝血酶诱导的 TF 表达具有抑制作用, 可在转录水平抑制 TF 表达, 从而抑制凝血酶导致的 VEC 促凝活性增强。而各药物中仅生物碱 (0.5、1 mg/mL) 可部分抑制凝血酶诱导的 TFPI mRNA 表达。表明补阳还五汤及生物碱、苷对凝血酶诱导的 TFPI mRNA 表达无明显抑制作用, 这对于对抗 VEC 的促凝作用, 抑制血栓形成具有重要的意义。TM 作为内皮细胞表面一种具有很强抗凝活性的糖蛋白, 其能结合凝血酶, 使之不能水解

纤维蛋白原,同时 TM 结合凝血酶后可进一步活化蛋白 C 系统发挥抗凝作用^[11]。本实验结果表明,补阳还五汤原方、生物碱、苷对 TM mRNA 表达无显著影响,表明该方及有效组分的抗血栓作用不是通过 TM 介导的。

凝血酶不仅在凝血过程中起主导作用,还可以通过细胞表面的凝血酶受体-蛋白酶活化受体(PAR)介导分子和细胞间相互作用,引起广泛的生物学效应,凝血酶受体启动细胞内信号经典的途径是通过偶联 Gq 蛋白激活磷脂酶 C-8 (PLC-8),裂解磷脂酰肌醇生成三磷酸肌醇(IP₃)和二酰甘油(DAG),前者引发 Ca²⁺动员,后者激活 PKC 和其他 Ca²⁺敏感蛋白。PKC 为凝血酶诱导 VEC 活化的重要途径。有研究发现,PKC 的激活可促进 VEC 的 TF 和 TFPI 释放,它可能通过 258 位点的丝氨酸磷酸化参与信号传递途径^[12]。本研究结果表明,凝血酶刺激 ECV304 后,PKC_α表达增强,表明 VEC 在受到凝血酶刺激时 PKC_α被激活;生物碱 2 mg/mL 组、苷 3 个剂量组、原方 50、100 mg/mL 组 PKC_α表达减弱,提示补阳还五汤及其有效组分生物碱、苷对凝血酶诱导的 ECV304 细胞 PKC_α激活具有抑制作用,该方及有效组分生物碱和苷可能通过抑制 PKC_α活化而达到对抗凝血酶诱导的 VEC 抗血栓特性异常的作用。进一步研究表明,PKC 激活剂 PMA 刺激 ECV304 细胞后,PKC_α也被激活;PMA 抑制剂 H₇作用于 PMA 刺激的 ECV304 细胞后,PKC_α表达增强不明显,说明 H₇对于 PMA 刺激的 PKC_α表达增强有明显抑制作用。但实验同时表明 H₇对于凝血酶刺激的 PKC_α表达增强并无明显抑制作用,这提示凝血酶诱导的 PKC_α激活可能与 PMA 不同,可能有其他信号传导途径参与。PAR-1 抑制剂 CATG 作用于凝血酶刺激的 ECV304 细胞后,PKC_α表达显著抑制,表明 CATG 对于凝血酶刺激的 PKC_α表达增强有明显抑制作用,CATG 通过在受体环节阻断了凝血酶与 PAR-1 结合,从而阻断了其下游信号的传递。原方、生物碱和苷均可抑制

凝血酶诱导的 ECV304 细胞 PKC_α表达的增强,进一步证实了原方可通过抑制 PKC_α途径的激活而发挥抗血栓作用,生物碱和苷可能是其发挥作用的有物质基础,对 PKC 信号途径的抑制作用可能是该方及其有效组分作用的主要环节。而补阳还五汤及其有效组分究竟是通过何种机制抑制凝血酶诱导的 PKC 激活的,还有待于今后进一步阐明。

参考文献:

- [1] Minami T, Sugiyama A, Wu SO, *et al.* Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(1): 41-53.
- [2] 吴健宇,李仪奎,符胜光,等. 补阳还五汤药物血清对自由基损伤的血管内皮细胞的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 1999, 15(2): 3-6.
- [3] 梁燕,张淑萍,杨静,等. 补阳还五汤及其有效部位生物碱和苷对大鼠动脉血栓形成纤溶相关指标的影响 [J]. *湖南中医学院学报*, 2006, 26(2): 1-3.
- [4] Michiels C. Endothelial cell functions [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 196(3): 430-443.
- [5] Badimon L, Martinez-Gonzalez J. Endothelium and vascular protection: an update [J]. *Rev Esp Cardiol*, 2002, 55(Supl. 1): 17-26.
- [6] 文志斌,尚改萍,刘发益,等. 补阳还五汤对凝血酶诱导血管内皮细胞释放 NO、vWF、TFPI 及表达组织因子的影响 [J]. *湖南医科大学学报*, 2002, 27(4): 313-318.
- [7] Terry CM, Callahan K S. Protein kinase C regulates cytokine-induced tissue factor transcription and procoagulant activity in human endothelial cells [J]. *J Lab Clin Med*, 1996, 127(1): 81-93.
- [8] Nobe K, Sone T, Paul R J, *et al.* Thrombin-induced force development in vascular endothelial cells; contribution to alteration of permeability mediated by calcium-dependent and -independent pathways [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 99(3): 252-263.
- [9] Skrabal C A, Thompson L O, Southard R E, *et al.* Interaction between isolated human myocardial mast cells and cultured fibroblasts [J]. *J Surg Res*, 2004, 118(1): 66-70.
- [10] Mirshahi F, Vasse M, Tedgui A, *et al.* Oncostatin M induces procoagulant activity in human vascular smooth muscle cells by modulating the balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2002, 13(5): 449-455.
- [11] Sperling C, Salchert K, Streller U, *et al.* Covalently immobilized thrombomodulin inhibits coagulation and complement activation of artificial surfaces in vitro [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(21): 5101-5113.
- [12] Ahamed J, Ruf W. Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(22): 23038-23044.

保 护 环 境 保 护 植 被