

## 养阴益气活血方对培养人脐静脉内皮细胞 抗凝和纤溶功能的作用

杨洁红, 张宇燕, 王华锋

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

**【摘要】** 目的 研究养阴益气活血方药对培养人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶功能的作用。方法 养阴益气活血方由生地黄、黄芪、川芎各等份组成;活血方由川芎一味组成。采用血清药理学方法观察养阴益气活血方和活血方对培养人脐静脉内皮细胞抗凝、纤溶功能的作用。结果 与对照组比较,养阴益气活血方和活血方均有显著增高培养人脐静脉内皮细胞中 6-酮-前列腺素  $F_{1\alpha}$  (6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ) 含量 [(412.5±42.7)ng/L 和 (231.7±30.1)ng/L 比 (137.6±13.5)ng/L]、提高组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 的活性 [(0.920±0.072)kU/L 和 (0.679±0.062)kU/L 比 (0.516±0.052)kU/L]、抑制组织型纤溶酶原激活物抑制物 (PAI) 活性 [(0.622±0.071)kAU/L 和 (0.851±0.085)kAU/L 比 (0.934±0.076)kAU/L]、降低内皮素 (ET) 含量 [(35.7±4.9)ng/L 和 (46.8±5.1)ng/L 比 (58.6±6.2)ng/L]、提高一氧化氮 (NO) 含量 [(21.68±2.26)mmol/L 和 (15.15±1.73)mmol/L 比 (8.67±1.24)mmol/L] 的作用, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且养阴益气活血方的作用显著优于活血方 ( $P < 0.05$ )。结论 养阴、益气、活血方药的相互配伍在抗栓、溶栓方面具有协同作用;养阴生津是治疗血瘀证的重要法则。

**【关键词】** 内皮细胞; 前列腺素; 组织型纤溶酶原激活物; 内皮素; 一氧化氮; 养阴益气活血方

中图分类号: R285.5; Q25 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)01-0003-03

**Influence of Yin-nourishing Qi-tonifying and blood-activating recipe (养阴益气活血方) on anticoagulation and fibrinolysis of cultured human umbilical vein endothelial cells** YANG Jie-hong, ZHANG Yu-yan, WANG Hua-feng. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, Zhejiang, China  
Corresponding author: ZHANG Yu-yan (Email: baobao7376@sina.com)

**【Abstract】** **Objective** To study the influence of Yin-nourishing Qi-tonifying and blood-activating recipe (养阴益气活血方) on anticoagulation and fibrinolysis of cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** Yin-nourishing Qi-tonifying blood-activating recipe was composed of three equal proportions of Radix Rehmanniae (生地黄), Radix Astragali (黄芪) and Rhizoma Chuanxiong (川芎); blood-activating recipe (活血方) contains Rhizoma Chuanxiong only. Serology pharmacology method was used to observe the effects of Yin-nourishing Qi-tonifying and blood-activating recipe on anticoagulation and fibrinolysis of cultured endotheliocytes of human umbilical vein. **Results** Compared with control group, both Yin-nourishing Qi-tonifying blood-activating and blood-activating recipes could obviously increase the content of 6-keto-prostacyclin  $1\alpha$  (6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ) in HUVEC [(412.5±42.7)ng/L and (231.7±30.1)ng/L vs. (137.6±13.5)ng/L], promote the activity of tissue plasminogen activator (t-PA) [(0.920±0.072)kU/L and (0.679±0.062)kU/L vs. (0.516±0.052)kU/L], and inhibit the activity of tissue plasminogen activator inhibitor (PAI) [(0.622±0.071)kAU/L and (0.851±0.085)kAU/L vs. (0.934±0.076)kAU/L], decrease the content of endothelin (ET) [(35.7±4.9)ng/L and (46.8±5.1)ng/L vs. (58.6±6.2)ng/L], and increase the content of nitrogen monoxide (NO) [(21.68±2.26)mmol/L and (15.15±1.73)mmol/L vs. (8.67±1.24)mmol/L] of cultured HUVEC ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); the effects of Yin-nourishing Qi-tonifying blood-activating recipe were significantly better than those of blood-activating recipe (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The Yin-nourishing medicine is synergetic to Qi-tonifying and blood-activating medicine in anti-embolism and embolism-dissolution. Yin-nourishing and fluid-producing (生津) is an important rule in treating blood-stasis syndrome (血瘀证).

**【Key words】** endothelial cells; prostacyclin; tissue plasminogen activator; endothelin; nitrogen monoxide; Yin-nourishing Qi-tonifying and blood-activating recipe

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30672652); 浙江省自然科学基金资助项目 (Z204424)

通讯作者: 张宇燕, 博士生, Email: baobao7376@sina.com

作者简介: 杨洁红 (1969-), 女 (汉族), 广东省人, 医学博士, 副教授, 主要从事方剂配伍研究, Email: yannoo7376@sina.com.

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,以养阴益气活血方药配伍治疗心脑血管疾病血瘀证具有明显疗效;研究结果表明,养阴益气活血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<sup>[1]</sup>;认为养阴生津法是治疗血瘀证的重要法则<sup>[2]</sup>。本实验中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(HUVEC)抗凝与纤溶功能等的影响,取得了一定进展。这对较为深入研究养阴益气活血方药治疗血瘀证的作用机制,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 材料与方药

**1.1 实验动物:** 纯种雄性新西兰家兔,体重(2.2±0.2)kg,由浙江中医药大学动物中心提供。

**1.2 实验材料及试剂:** 新生儿脐带由浙江医科大学妇产科医院提供。RPMI1640 培养液,配制含青霉素(100 kU/L)、链霉素(100 mg/L)、体积分数为 20% 的小牛血清,用 Tris 调整 pH 值至 7.2~7.4。

1 型胶原酶(美国 Sigma 公司),新生牛血清(杭州四季青生物材料工程研究所);兔抗人Ⅷ因子抗体(一抗)、FITC-羊抗兔-IgG 抗体(二抗)由华美生物工程公司提供。6-酮-前列环素 F<sub>1α</sub>(6-keto-PGF<sub>1α</sub>,南京建成生物工程研究所),组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及其抑制物(PAI,试剂盒购自福建太阳生物技术公司),内皮素(ET,放射免疫试剂盒购自解放军总医院东亚免疫技术研究所),一氧化氮(NO,购自南京建成生物工程研究所)。CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(BB5060 型, Heraeus, 上海),光学倒置显微镜(COIC),相差倒置显微镜(K 70, Olympus, 日本),荧光显微镜(BX50 型, Olympus, 日本),BIO-RAD 680 型伯乐全自动酶标仪(美国伯乐生命科学产品有限公司),γ-计数仪(SN-682 型, 上海),96 孔细胞培养板(NUNC)。

**1.3 方药制备:** 养阴益气活血方由生地黄、黄芪、川芎各等份组成,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。活血方由川芎一味药组成。上述药物经鉴定后分别制成药液,置于 4℃ 冰箱内保存备用。

**1.4 含药血清的制备:** 两个给药组分别每日分两次给予活血方(含生药总量 5 g/kg)或养阴益气活血方(含生药总量 15 g/kg);另设对照组,每日给予等

量温开水。各组灌胃 7 d 后,于心脏采血前 12、6、3 和 1 h 再各灌胃 1 次(最后 1 d 剂量增加 1 倍),并于心脏采血前 24 h 禁食、不禁水。心脏采血后,无菌分离血清,经 56℃、30 min 灭活处理后,用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤除菌,置 -20℃ 冰箱内保存备用。

**1.5 原代 HUVEC 的制备:** 参照 Jaffe 等<sup>[3]</sup>介绍的方法加以改进制备。以磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值为 7.2~7.4)冲洗脐静脉管腔至洗出液无色透明,以质量分数为 0.1% 的胶原酶(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<sup>7</sup>/L,接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl;在 37℃、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 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 特征后,供研究用。

**1.6 分组及各组实验培养液的配制:** 将上述培养的细胞吸去培养液,再加入含有各组成分的培养液。共分 3 组,每组 8 个复孔。各组配制方法:对照组:15 ml 正常兔血清、5 ml 新生小牛血清,加入 80 ml RPMI 1640 液至 100 ml;活血方组、养阴益气活血方组:15 ml 含各组方药的兔血清和 5 ml 新生牛血清,各加入 80 ml RPMI 1640 液至 100 ml。加入含各组成分的培养液后,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 24 h,吸出培养液,置 -20℃ 冰箱待测。

**1.7 检测指标及方法:** 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 测定采用放射免疫法,t-PA 和 PAI 活性测定采用发色底物法,ET 测定采用非平衡放射免疫法,NO 测定采用酶法。具体检测方法主要参照试剂盒说明书进行。

**1.8 统计学处理:** 检测数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,行方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HUVEC 中 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量的变化(表 1):** 两个给药组培养 HUVEC 中的 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量均较对照组明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),且养阴益气活血方组显著高于活血方组( $P < 0.05$ )。提示养阴益气活血方药配伍在提高培养 HUVEC 中的 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量方面具有协同作用。

**2.2 HUVEC 中 t-PA 和 PAI 活性的变化(表 1):** 两个给药组具有显著降低 HUVEC 中 PAI 活性和提高 t-PA 活性的作用,与对照组比较差异有统计

表 1 各组 HUVEC 中 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量及 t-PA、PAI 活性比较

组别	标本数	6-keto-PGF <sub>1α</sub> ( $\bar{x} \pm s$ , ng/L)	t-PA 活性( $\bar{x} \pm s$ , kU/L)	PAI 活性( $\bar{x} \pm s$ , kAU/L)	PAI/t-PA 比值
对照组	8	137.6 ± 13.5	0.516 ± 0.052	0.934 ± 0.076	1.81
活血方组	8	231.7 ± 30.1 <sup>a</sup>	0.679 ± 0.062 <sup>a</sup>	0.851 ± 0.085	1.53
养阴益气活血方组	8	412.5 ± 42.7 <sup>bc</sup>	0.920 ± 0.072 <sup>bc</sup>	0.622 ± 0.071 <sup>ac</sup>	0.68

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与活血方组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),且养阴益气活血方的作用优于活血方组( $P$  均  $< 0.05$ )。表明养阴益气与活血方药在降低 PAI 活性和提高 t-PA 活性方面具有协同作用。

2.3 HUVEC 中 ET 和 NO 含量的变化(表 2):两个给药组均可显著降低 HUVEC 中 ET 含量、提高 NO 含量( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),养阴益气活血方作用优于活血方组( $P < 0.05$ )。表明养阴益气与活血方药配伍有协同作用。

表 2 各组 HUVEC 中 ET 和 NO 含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	标本数	ET(ng/L)	NO(mmol/L)
对照组	8	58.6 ± 6.2	8.67 ± 1.24
活血方组	8	46.8 ± 5.1	15.15 ± 1.73 <sup>a</sup>
养阴益气活血方组	8	35.7 ± 4.9 <sup>a</sup>	21.68 ± 2.26 <sup>bc</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,与活血方组比较:

<sup>c</sup>  $P < 0.05$

### 3 讨论

血管 EC 是人体最活跃的旁分泌器官,它的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动性、维持血管通畅中具有重要作用。前列环素是迄今所知最强烈抑制血小板聚集的生物活性物质,测定前列环素(PGI<sub>2</sub>)体内稳定代谢产物 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 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<sup>[4]</sup>。本结果表明,养阴益气活血方具有提高培养 HUVEC 中 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 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<sup>[5]</sup>。EC 产生的 t-PA 和 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 的快速抑制剂,血浆中的 PAI 也主要来源于血管 EC。处于活性状态的 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。本结果提示,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。

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<sup>[6]</sup>。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。本结果表明,养阴益气活血方可显著降低培养 HUVEC 中的 ET 含量和提高培养 HUVEC 中的 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道,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与活血化瘀类药不完全相同。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化瘀作用;而养阴生津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。从本研究结果看,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,可达到较佳的抗栓、提高纤溶等效果。

### 参考文献

- 万海同,白海波,杨洁红,等.养阴益气活血冲剂对脑缺血/再灌注损伤保护作用的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2001,8(2):85-87.
- 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.
- Jaffe E A, Hoyer L W, Nachman R L. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells [J]. J Clin Invest, 1973, 52(11): 2757-2764.
- 王旭东,李海燕,李普庆.急性心肌梗死患者溶栓治疗过程中血浆前列环素和血栓素 A<sub>2</sub> 的变化及其意义[J].中国危重病急救医学,1999,11(3):166-168.
- 陈懿,葛金文,邓冰湘.脑秦方提取物对局灶性脑梗死大鼠血浆纤溶活性的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2006,13(2):70-72.
- Lerman A, Burnett J C Jr. Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion [J]. Circulation, 1992, 86(6 Suppl): 12-19.

(收稿日期:2007-08-01 修回日期:2007-09-18)

(本文编辑:李银平)

### • 广告目次 •

- ①天津红日药业:心血净注射液 ..... (封底)