

• 论著 •

# 全蝎纯化液对凝血酶诱导血管内皮细胞释放血管性血友病因子和 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub> 的影响

易小民, 谭 茜, 彭延古, 徐爱良, 黄 莺, 靳铁飞

(湖南中医药大学血管生物学实验室, 湖南 长沙 410007)

**【摘要】** 目的 观察全蝎纯化液对凝血酶诱导血管内皮细胞(VEC)释放血管性血友病因子(vWF)和 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>(6-keto-PGF<sub>1α</sub>)的影响,探讨全蝎抗凝作用的机制。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC),选择生长良好的细胞分为空白对照组、凝血酶组及全蝎纯化液高、中、低剂量组,每组 10 个复孔。全蝎纯化液高、中、低剂量组加入凝血酶 10 kU/L 后,分别加入全蝎纯化液 24、12、6 mg/L;凝血酶组加入凝血酶 10 kU/L;空白对照组加入等量 RPMI1640 培养液。各组均培养 12 h 后收集上清液,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测上清液中 vWF、6-keto-PGF<sub>1α</sub> 的含量。结果 与空白对照组比较,凝血酶组细胞培养上清液中 vWF 含量显著升高[(17.01±0.54)%比(6.05±0.49)%],6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量显著降低[(20.40±1.18) ng/L 比(35.20±1.37) ng/L,均 P<0.01];与凝血酶组比较,全蝎纯化液高、中、低剂量组 vWF 均显著降低[(7.18±0.44)%、(8.91±0.47)%、(9.81±0.48)%],6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量均显著升高[(30.10±1.50)、(25.50±1.43)、(23.30±1.47) ng/L],差异有统计学意义(均 P<0.01)。结论 全蝎纯化液能抑制凝血酶诱导 HUVEC 释放 vWF,并对抗凝血酶抑制 HUVEC 释放 6-keto-PGF<sub>1α</sub>,提示全蝎纯化液对凝血酶诱导的 VEC 损伤具有保护作用。

**【关键词】** 全蝎; 凝血酶; 血管内皮细胞; 血管性血友病因子; 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>。

中图分类号:R285.5;Q343.6 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2010.06.004

Effects of scorpion purified liquid on the release of von willebrand factor and 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub> induced by thrombin in cultured vascular endothelia cells YI Xiao-min, TAN Qian, PENG Yan-gu, XU Ai-liang, HUANG Ying, JIN Tie-fei. Vascular Biology Laboratory, Human University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China

Corresponding author: PENG Yan-gu, Email: pyg888@163.com

**【Abstract】** Objective To observe the effect of scorpion purified liquid on the release of von willebrand factor (vWF) and 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub> (6-keto-PGF<sub>1α</sub>) from cultured vascular endothelia cells (VEC) induced by thrombin, and to investigate the mechanism of anticoagulation. Methods The human umbilical vein VEC was cultured in vitro. The well grown VECs were divided into the blank control, thrombin and high, medium, low concentration scorpion purified liquid groups, 10 holes in each group. The thrombin group was given 10 kU/L of thrombin, and different concentrations of scorpion purified liquid (24, 12 and 6 mg/L) were given after administration of thrombin (10 kU/L) in high, medium, low concentration scorpion purified liquid groups. The blank control group was given RPMI1640 culture medium. The VECs were cultured for 12 hours and the supernatant was collected in each group. The concentrations of vWF and 6-keto-PGF<sub>1α</sub> in the supernatant were measured with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Results Compared with the blank control group, the concentration of vWF was significantly increased [(17.01±0.54)% vs. (6.05±0.49)%] and the concentration of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> was markedly decreased in thrombin group [(20.40±1.18) ng/L vs. (35.20±1.37) ng/L, both P<0.01]. Compared with thrombin group, the concentration of vWF was obviously decreased [(7.18±0.44)%、(8.91±0.47)%、(9.81±0.48)%], the concentration of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> was remarkably increased [(30.10±1.50) ng/L, (25.50±1.43) ng/L, (23.30±1.47) ng/L] in high, medium, low concentration scorpion purified liquid groups (all P<0.01). Conclusion Scorpion purified liquid can inhibit the release of vWF from HUVEC induced by thrombin and counter the thrombin inhibition on the HUVEC release of 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, suggesting that scorpion protect the injured VEC induced by thrombin.

**【Key words】** Scorpion; Thrombin; Vascular endothelia cell; von Willebrand factor; 6-keto-prostaglandin F<sub>1α</sub>。

我国心血管疾病从 1990 年起持续成为居民死亡首位原因,因此,控制心血管疾病蔓延成为我国

21 世纪提高人类健康水平的重中之重。研究表明,血管内皮细胞(VEC)能够合成、分泌多种生物活性物质来维持血管壁的凝血/抗凝、纤溶/抗纤溶之间的平衡,VEC 受损,其合成分泌功能失调,导致血液呈高凝状态,因此 VEC 与心脑血管疾病中血栓事件的发生密切相关<sup>[1]</sup>。全蝎作为传统中药在我国已

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772715);湖南省教育厅重点资助项目(07A053);湖南省重点学科实验室资助项目

通信作者:彭延古,Email:pyg888@163.com

作者简介:易小民(1985-),女(汉族),湖南省人,硕士研究生。

有上千年的历史,并在临床中被广泛应用于抗凝、抗血栓。体外实验表明,全蝎具有良好的抗凝、抗血栓作用<sup>[2]</sup>;动物实验表明,全蝎纯化液可通过降低大鼠内、外源性凝血系统因子活性,增加纤溶系统活性,进而抑制凝血酶<sup>[3]</sup>;但其机制尚不明确,特别是与血管性血友病因子(vWF)、6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>(6-keto-PGF<sub>1α</sub>)的关系未见报道。本研究中通过比较不同浓度全蝎纯化液对 VEC 释放和表达 vWF、6-keto-PGF<sub>1α</sub>的影响,探讨全蝎抗凝作用的机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 主要实验材料:**人脐静脉内皮细胞(HUVEC)株由武汉大学典型物种保存中心提供。RPMI1640 培养基、新生小牛血清、胰蛋白酶为美国 Gibco 公司产品,磷酸盐缓冲液(PBS)干粉为武汉博士德公司产品。96 孔培养板为美国 Costar 公司产品,CO<sub>2</sub> 培养箱为美国谢尔登制造公司产品,酶标仪为芬兰 Labsystems 集团产品,倒置显微镜为日本 Olympus 产品,超净工作台为苏州净化设备公司提供。人 6-keto-PGF<sub>1α</sub>定量检测试剂盒购自美国 R&D 公司,vWF 含量测定试剂盒为上海太阳生物技术有限公司产品。

**1.2 HUVEC 培养与鉴定:**将内皮细胞加入含 10%小牛血清、100 kU/L 青霉素、100 kU/L 链霉素的 RPMI1640 培养基中,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。倒置显微镜下观察 HUVEC 呈多角形、铺石样镶嵌排列,待细胞长满培养瓶底后用 0.25%胰蛋白酶消化传代,经 VII 因子(FVII)免疫荧光鉴定并选择生长良好的内皮细胞用于实验。

**1.3 全蝎纯化液的制备:**全蝎购自湖南省医药公司,经水煮沸沉、凝胶过滤、离子交换层析等分离纯化过程将其真空冷冻干燥成粉末,-20 ℃保存备用。使用前用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液配成所需浓度工作液,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

**1.4 实验分组及药物处理:**选取生长良好的 2~3 代细胞。将融合生长的 HUVEC 用 0.25%胰蛋白酶消化吹打制成单细胞悬液,根据预实验结果调节细胞密度为 7.5×10<sup>4</sup> 个/ml,接种于 96 孔培养板中,每孔 200 μl。置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,待细胞融合成单层细胞时开始实验。将已融合的细胞分成空白对照组、凝血酶组及全蝎纯化液高、中、低剂量组。全蝎纯化液高、中、低剂量组加入凝血酶 10 kU/L 后分别加入 24、12、6 mg/L 全蝎纯化液;凝血酶组只加凝血酶 10 kU/L;空白对照组加入等量 RPMI1640 培养液,每组设 10 个复孔,分别置

37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 12 h 后收集细胞培养上清液,置-20 ℃冰箱中保存备用。

**1.5 细胞培养上清液中 vWF、6-keto-PGF<sub>1α</sub> 的含量测定:**vWF、6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量测定采用酶联免疫吸附法(ELISA),严格按试剂盒说明书操作步骤进行。

**1.6 统计学处理:**采用 SPSS 15.0 统计软件,实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间两两比较采用单因素方差分析,方差齐时用 *q* 检验,方差不齐时用秩和检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 不同剂量全蝎纯化液对凝血酶诱导 HUVEC 释放 vWF 的影响(表 1):**与空白对照组比较,凝血酶组 vWF 显著增加(*P*<0.01);全蝎纯化液各剂量组 vWF 均较凝血酶组明显降低(均 *P*<0.01)。说明全蝎纯化液能明显抑制凝血酶诱导 HUVEC 释放 vWF 的作用。

表 1 不同剂量全蝎纯化液对凝血酶诱导 HUVEC 释放 vWF 和 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	vWF(%)	6-keto-PGF <sub>1α</sub> (ng/L)
空白对照组	10	6.05±0.49	35.20±1.37
凝血酶组	10	17.01±0.54 <sup>a</sup>	20.40±1.18 <sup>a</sup>
全蝎高剂量组	10	7.18±0.44 <sup>ab</sup>	30.10±1.50 <sup>ab</sup>
全蝎中剂量组	10	8.91±0.47 <sup>ab</sup>	25.50±1.43 <sup>ab</sup>
全蝎低剂量组	10	9.81±0.48 <sup>ab</sup>	23.30±1.47 <sup>ab</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01;与凝血酶组比较,<sup>b</sup>*P*<0.01

**2.2 不同剂量全蝎纯化液对凝血酶诱导 HUVEC 释放 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 的影响(表 1):**与空白对照组比较,凝血酶能明显抑制 HUVEC 释放 6-keto-PGF<sub>1α</sub> (*P*<0.01);全蝎纯化液各剂量组 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 均较凝血酶组明显升高(均 *P*<0.01)。说明全蝎纯化液能对抗凝血酶抑制 HUVEC 释放 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 的作用。

## 3 讨 论

VEC 是铺被于血管内腔表面的机械屏障膜,是人体最活跃的旁分泌器官,不但具有选择性透过的屏障作用,并已证明其抗凝、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<sup>[4]</sup>。正常 VEC 具有防止血管内凝血系统激活和血栓形成等重要生理功能<sup>[5]</sup>。VEC 主要通过合成分泌各种活性物质,从而发挥调节血管张力、参与血小板功能调节、激活血小板促凝因子、清除活化的凝血因子及参与纤溶过程等作用<sup>[6]</sup>。若 VEC 受损,其抗血栓形成的功能减弱甚至消失,相反凝血过程得以充分表达,导致病理血栓的形成,因此 VEC 在体内促凝/抗凝平衡中起着举足轻重的作用,其抗血栓形成在血栓栓塞性

疾病中的作用也得到公认和证实<sup>[7]</sup>。

vWF 是一种大分子糖蛋白,由 VEC 合成。vWF 主要有两种生物学功能:①在血管损伤处介导血小板黏附、聚集和血栓的形成;②作为 FⅧ的载体,可使血浆中 FⅧ保持稳定,加速血小板黏附、聚集,促进血栓形成。当 VEC 受损时,可使储存的 vWF 释放入血,同时皮下层暴露,vWF 与血小板膜糖蛋白形成结合物,黏附在血管内皮下,从而介导血栓形成。因此 vWF 对判断血栓形成危险及病情轻重程度有重要参考价值<sup>[8-9]</sup>。本实验发现,全蝎纯化液能抑制 HUVEC 释放 vWF,表明全蝎对 VEC 损伤具有一定的保护作用,其机制可能通过抑制受损 VEC 释放 vWF 发挥抗凝、抗血栓形成的作用。

前列环素(PGI<sub>2</sub>)主要由 VEC 生成,具有扩张血管、阻止血小板聚集、稳定细胞膜的作用,是血管的“保护性激素”<sup>[10]</sup>;亦是 VEC 受损的标志物之一<sup>[7]</sup>。但因 PGI<sub>2</sub> 不稳定,能迅速转变成稳定而无活性的 6-keto-PGF<sub>1α</sub>,测定 PGI<sub>2</sub> 在体内的稳定代谢产物 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量,不仅可以反映抑制血小板聚集情况,更可反映 VEC 的损伤程度<sup>[11]</sup>。故本研究中通过测定 HUVEC 培养上清液中 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量反映 PGI<sub>2</sub> 的水平,结果显示,凝血酶可以显著降低 UHVEC 培养上清液 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 含量,全蝎纯化液能抑制凝血酶的这种作用,表明全蝎纯化液可能通过促进 VEC 合成分泌 PGI<sub>2</sub>,起到保护 VEC、抑

制血小板聚集的作用。

### 参考文献

[1] 张敬霞,孙根义,陈永利,等.组织型纤溶酶原激活物在急性肺血栓栓塞肺动脉组织中的表达.中国危重病急救医学,2004,16(8):481-483.

[2] 郝晓云,彭延古,肖长江.全蝎提取液对血液凝固的影响.血栓与止血学,2001,7(4):158-159.

[3] 彭延古,黄莺,易小民,等.全蝎纯化液对凝血酶所致血液凝固的影响.中国中西医结合急救杂志,2010,17(3):138-140.

[4] 杨洁红,张宇燕,王华锋.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.中国中西医结合急救杂志,2008,15(1):3-5.

[5] 刘亚军,卢辉和,张莉,等.藤丹通脉片对兔动脉成形术后血管内膜增生及内皮细胞血管性假血友病因子表达的影响.中国危重病急救医学,2007,19(11):695-696.

[6] 李家增,贺石林,王鸿利,等.血栓病学.北京:科学出版社,1998:81-91.

[7] 于海鹰,王宗仁,马静,等.芪丹通脉片对内皮细胞抗血栓形成作用的影响.第四军医大学学报,2005,26(10):948-950.

[8] Hlubocká Z, Umnerová V, Heller S, et al. Is mild essential hypertension without obvious organ complications and risk factors associated with increased levels of circulating markers of endothelial dysfunction? Effect of ACE inhibitor therapy. Vnitř Lek,2002,48(8):718-723.

[9] Conway DS, Pearce LA, Chin BS, et al. Prognostic value of plasma von willebrand factor and soluble P-selection as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation. Circulation,2003,107(25):3141-3145.

[10] 郭昌星,杨兴易,林兆奋,等.生脉注射液对全身炎症反应综合征患者血浆血管活性介质影响的临床观察.中国中西医结合急救杂志,2004,11(4):239-241.

[11] 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.中国危重病急救医学,1999,11(3):166-168. (收稿日期:2010-08-14)

(本文编辑:李银平)

### • 经验交流 •

## 围手术期的麻醉意外及影响因素

李红峰

(宁夏回族自治区人民医院,宁夏 银川 750021)

【关键词】 围手术期; 麻醉意外; 影响因素

中图分类号:R614 文献标识码:B DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2010.06.005

在临床手术麻醉的围手术期中,由于麻醉及手术操作对患者机体生理功能会产生影响,同时由于患者的病情复杂及危重,或存在疑难合并症,这样就使得麻醉风险增加。麻醉意外的发生主要取决于麻醉实施、监测和管理的质量。

麻醉意外的出现与否受多种因素的影响,主要有:①麻醉医师:医师本人的临床经验、操作技巧、理论知识、工作作风和态度(责任意识)、精神与情绪(心理因素)、应变能力等都能明显影响对患者病情的观察和判断水平,以及处理措施

的准确程度及时效性。②患者:患者病情的严重程度、病变性质、主要器官功能状况、潜在疾病,以及患者对治疗、操作和各种处理措施的反应性等均可影响麻醉的安全性。③周围环境:各岗位人员密切配合将使手术在更为安全的条件下进行,这种协调性主要取决于工作人员的整体素质以及技术操作的规范程度。手术过程中有大量的物品参与,其性能的优劣或是否使用得当,也将明显影响手术的安全进行;手术进行场所的监测设备、救治和应急条件也常成为麻醉意

外的隐患。此外,医疗护理规章制度、人员配备、医护质量管理措施和控制模式等也发挥着重要的作用。麻醉意外的发生通常为多种因素综合作用所致,对围手术期的麻醉与手术成败以及患者安危构成一种“多米诺效应”,任何一个方面或因素的不良作用均可能导致麻醉意外的发生。同时,护理人员耐心仔细的护理及专业技术的操作配合,都能使麻醉满意率上升,缩短麻醉操作时间,减轻患者痛苦。

(收稿日期:2010-09-10)

(本文编辑:李银平)