文章编号:1000-5404(2010)11-1149-03

论著

黄芪、当归对血管内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1 的影响

杨长春[1],马增春[2] (100039 北京,武警总医院南楼一科[1];100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所[2])

[摘要] 目的 观察中药黄芪、当归对血管内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1,PAI-1)表达及活性的影响,探讨黄芪、当归抗血栓作用的分子机制。**方法** 使用成品的黄芪和当归注射液,各设两个浓度(6 mg/ml 和 3 mg/ml),分别加入细胞培养板,实验组各孔均加入 0.5 ng/ml TGF-β1 作为诱导剂以增加 PAI-1Ag 表达。同时设立 TGF-β1 组(细胞液中只加入 0.5 ng/ml TGF-β1)以及空白对照组(细胞液中不加入任何成分),各组在 37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养 24 h。应用 RT-PCR 方法检测黄芪、当归对血管内皮细胞 PAI-1 mRNA 表达的影响,ELISA 法检测黄芪、当归对 PAI-1 表达的影响,发色底物显色法检测黄芪、当归对 PAI-1 活性的影响。**结果** 黄芪、当归可不同程度地降低血管内皮细胞 PAI-1 mRNA 表达、抗原水平与活性,以黄芪、当归联合应用作用更为明显。黄芪、当归单独及联合应用对 PAI-1 mRNA 表达的抑制率分别为 17%、24.6% 和 36.6%。**结论** 黄芪、当归可能通过抑制血管内皮细胞 PAI-1 表达和活性而发挥其抗血栓形成的作用。

[关键词] 黄芪;当归;血管内皮细胞;纤溶酶原激活物抑制剂-1
[中图法分类号] R282.71; R364.15; R392.2 **[文献标志码]** A

Effect of *Astragalus Membranaceus* and *Angelica Sinensis* on plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells

Yang Changchun[1], Ma Zengchun[2] ([1]First Department of Nanlou, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing, 100039; [2] Beijing Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of *Astragalus Membranaceus* (Ast) and *Angelica Sinensis* (Ang) on antithrombosis and explore the molecular mechanism. **Methods** Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression and activity were selected to observe the antithrombosis effect of Ast and Ang (3 and 6 mg/ml) on 0.5 ng/ml TGF-β_1 treated endothelial cells. PAI-1mRNA expression was detected by RT-PCR, PAI-1 antigen assay was detected by specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), and PAI-1 activity was measured by amidolytical assay. **Results** Ast and Ang significantly inhibited PAI-1 mRNA expreesion, antigen and activity in endothelial cells. The more powerful effects could be observed when treated by Ast and Ang together. **Conclusion** The PAI-1 mRNA expression, antigen and activity is inhibited effectively by Ast and Ang, which may be the mechanism of their treatment for antithrombosis.

[Key words] Astragalus Membranaceus (Ast), Angelica Sinensis (Ang), Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)

Supported by the Grant from the Armed Police Sciences Foundation (WZ200508). Corresponding author: Yang Changchun, Tel: 86-10-88276872, E-mail: yangchangchun99@sina.com

纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)是体内纤溶酶原激活物的生理抑制剂,主要产生于血管内皮细胞和肝细胞。内源性纤溶活性减低导致微血栓形成和血栓沉积,而内源性纤溶活性主要由 PAI-1 调节。PAI-1 表达及活性升高已被证实是血栓性疾病的一个重要独立的危险因素[1,2],与动脉粥样硬化、冠心病、脑血栓形成等疾病密切相关,对血栓性疾病的诊断、预后判断也具有重要意义[3]。抑制 PAI-1 表达与活性,为心、脑血管疾病特别是血栓性疾病的治疗提供了一条新的思路。

[基金项目] 武警总部Ⅰ类科研课题(WZ200508)
[通信作者] 杨长春,电话:(010)88276872,E-mail:yangchangchun99@sina.com

中医学认为,血栓形成是"血脉不通,血行失度,血凝而不流,血气不至"所导致的"血瘀症",黄芪、当归是活血化淤的常用药物,但其是否可以通过抑制血管内皮细胞 PAI-1 表达、水平,从而发挥抗血栓形成的作用,我们在此进行了初步观察与探讨。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

黄芪注射液由成都地奥九泓制药厂生产,批号 0301043,生药含量 2 g/ml;当归注射液由江西青峰制药厂生产,批号 051010,生药含量 0.05 g/ml;DMEM 培养基,低糖型,Gibco 公司产品;Trizol,Gibco 公司产品;RT-PCR 一步法试剂盒 Promega 公司产品;DNA 标准 DL2000,北京鼎国生物技术公司产品;

PAI-1Ag测定试剂盒,奥地利Technoclone公司产品,PAI-1活性测定试剂盒,美国ADI公司上海SUN分公司;血管内皮细胞,由军事医学科学院惠赠。

1.2 仪器

酶联仪,ANEG-G公司,DU640核酸蛋白紫外分析仪,Backman公司;PCR仪,Genius Fgen02TD,Techne公司;Imagine 4.0分析软件,Bio-discovery,Inc; CO_2培养箱,Forma;倒置显微镜,重庆光学仪器厂。

1.3 细胞培养

血管内皮细胞以DMEM培养液(含10%小牛血清,100 U/ml青霉素,100 μg/ml链霉素)在37 ℃,5% CO_2孵箱中培养。分别以每孔密度为1.5×10^5、2×10^4个细胞接种(6孔、48孔细胞培养板),待细胞80%融合后,换为无血清培养液,继续孵育24 h。

1.4 实验分组

换5%低血清培养液,将黄芪(6 mg/ml)、当归(3 mg/ml)、黄芪(6 mg/ml)与当归(3 mg/ml)加入到相应位置(其中6孔细胞培养板同一药物浓度各设3孔,48孔细胞培养板同一药物浓度各设8孔)。为模拟血栓形成时PAI-1Ag的高水平,实验组各孔均加入TGF-β_1(0.5 ng/ml)作为诱导剂以增加PAI-1Ag表达。同时设立TGF-β_1组(细胞液中只加入0.5 ng/ml TGF-β_1)以及空白对照组(细胞液中不加入任何成分),各组培养24 h后,48孔细胞培养板收集细胞上清液,收集细胞上清,置-70 ℃冰箱保存,用于PAI-1Ag及活性测定。6孔细胞培养板细胞用于提取RNA,进行PAI-1 mRNA表达。

1.5 黄芪、当归对PAI-1 mRNA表达的影响

PAI-1mRNA表达检测应用RT-PCR一步法。用Trizol试剂从各组细胞中提取总RNA,核酸蛋白分析仪测定$D(260)/D(280)$比值,根据$D(260)$测定RNA浓度。取RNA 2 μg,按试剂说明书进行RT-PCR反应。

取PCR产物10 ml,2%琼脂糖凝胶电泳分离,以DL 2000标准为参照,凝胶图像分析仪扫描,以Imagine 4.0图像分析软件分析各条带的光密度值(IDV),以GAPDH基因片段的IDV为内参照;观察血管内皮细胞PAI-1 mRNA表达的变化。数据以相对于对照组的抑制率表示。

1.6 黄芪、当归对PAI-1Ag的影响

PAI-1Ag检测应用ELISA法。取各组细胞上清液25 ml,按照试剂盒所述方法进行,在波长为450 nm的酶联仪上测定各孔光密度值[$D(450)$],根据试剂盒所提供标准品制备标准曲线,依此计算所测标本PAI-1Ag数值。

1.7 黄芪、当归对PAI-1活性的影响

PAI-1活性检测应用发色底物显色法。取各组细胞上清液25 ml,按照试剂盒所述方法进行,在波长为405 nm的酶联仪上测定各孔光密度值[$D(405)$],根据试剂盒所提供标准品制备标准曲线,依此计算所测标本PAI-1活性数值。

1.8 统计学处理

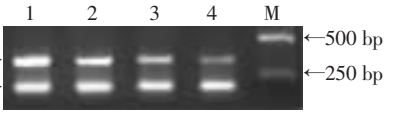
实验数据以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 11.0统计软件行t检验。

2 结果

2.1 黄芪、当归对血管内皮细胞PAI-1mRNA表达的影响

RNA经提取后,测定所有样品$D(260)/D(280)$值均在1.8~2.0。RT-PCR结果显示:与Marker比较,PCR产物片段长度与预期实验结果相一致,各组每一样品RT-PCR产物电泳均可在401 bp处有1条清晰扩增条带(图1)。

结果显示,黄芪、当归对血管内皮细胞PAI-1 mRNA表达有明显的抑制作用,以黄芪、当归单独及联合应用作用明显。对实验结果进行图像分析的结果显示,黄芪、当归单独及联合应用对PAI-1 mRNA表达的抑制率分别为17%、24.6%和36.6%。



1:对照组;2:黄芪组;3:当归组;4:黄芪+当归组;M:DNA标准(DL2000)

图1 黄芪、当归对血管内皮细胞PAI-1mRNA表达的影响

2.2 黄芪、当归对血管内皮细胞PAI-1 Ag与活性的影响

结果显示,黄芪、当归对血管内皮细胞PAI-1Ag水平及活性均有一定的抑制作用,以黄芪、当归联合应用组的抑制作用明显,具有统计学差异($P<0.05$)。见表1。

表1 黄芪、当归对PAI-1 Ag、活性的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	PAI-1Ag(ng/ml)	PAI-1活性($\times10^{-2}$AU/ml)
对照组	48.26±3.28	2.21±0.020
黄芪组	32.34±2.37[a]	1.90±0.005[a]
当归组	28.56±2.63[a]	1.67±0.014[a]
黄芪+当归组	18.25±1.08[a]	1.42±0.012[a]

a:$P<0.05$ 与对照组比较

3 讨论

PAI-1是血栓性疾病的重要危险因素和分子标志物,可通过特异性抑制组织型纤溶酶原激活物(plasminogen activator, tPA),调节纤溶系统活性、维持纤溶-凝血系统的平衡,促进血管平滑肌细胞增殖,影响血管损伤后血管重塑等机制在血栓性疾病的发生、发展过程中发挥重要作用,因此,有效抑制PAI-1水平与活性为心血管疾病特别是血栓性疾病的治疗提供了新的靶标[4,5]。

中医理论认为,血栓性疾病属于"血瘀症"范畴,治疗上当以益气、活血、化瘀为主。黄芪、当归为益气、活血、化淤的经典药物。现代药理学研究显示,黄芪具有强心、抗氧化、抗心律失常、利尿、调节免疫等作用[6];当归具有扩张血管、保护心肌、抑制血小板凝集、促进造血、抗氧化、抗炎等作用[7],两者联合应用,在活血化瘀的同时,辅以益气补血,扶正固本,标本同治,可加强治疗效果。

黄芪、当归在心血管系统作用的基础研究显示,其可促进血管内皮细胞增殖、血管再生[8-10],逆转bFGF诱导的血管平滑肌细胞表型转化[11],抑制血管平滑肌细胞信号转导分子黏着斑激酶表达[12]。本实验结果证实,中药黄芪、当归单独及联合应用对血管内皮细胞PAI-1 mRNA表达、PAI-1 Ag与活性均有一定抑制作

用,以黄芪、当归联合应用明显,且其抑制作用在mRNA表达、蛋白及酶活性水平的作用趋势相一致。该结果是对黄芪和当归中药药理作用的重要补充。

本研究结果提示,黄芪、当归两味中药可能通过益气活血化淤,减轻血淤的病理表现,通过下调血栓相关基因PAI-1表达与活性,调整t-PA/PAI的动态平衡,促进纤溶,防止血栓形成,维持血管内皮功能稳定,从而起到抗血栓形成、防治血栓性疾病的作用。本研究以PAI-1作为抗血栓治疗的靶点,从细胞和分子水平揭示了黄芪、当归防治血栓性疾病新的分子机制,为应用中药防治血栓性疾病提供了理论和实验依据。

参考文献:

[1] Naya M, Tsukamoto T, Inubushi M, *et al*. Elevated plasma plasminogen activator inhibitor type-1 is a independent predictor of coronary microvascular dysfunction in hypertension[J]. Circ J, 2007, 71(3): 348-533.
[2] Dupont D M, Madsen J B, Kristensen T, *et al*. Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1[J]. Front Biosci, 2009, 14: 1337-1361.
[3] 张冬梅,陈明. 纤溶酶原激活物抑制剂-1与心血管疾病[J]. 心血管病学进展,2009, 30(4): 696-699.
[4] Diamantopoulos E J, Andreadis E A, Vassilopoulos C V, *et al*. Increased plasma plasminogen activator inhibitor-1 levels: a possible marker of hypertensive target organ damage[J]. Clin Exp Hypertens, 2003, 25(1): 1-9.
[5] 王大宇,金红,李玉光. 纤溶酶原激活物抑制剂-1的调节与心血管疾病的关系[J]. 心血管康复医学杂志,2009,18(1): 76-78.
[6] 黄玫,曲晶,李晓天,等. 黄芪化学成分及对心血管系统作用的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2009, 29(11): 1451-1453.
[7] 宋锦叶,孟立强,李晓玫. 黄芪与当归的现代药理学研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2008,9(9):833-835.
[8] 雷燕,高倩,李悦山,等. 黄芪、当归及其组方促血管内皮细胞增殖作用的研究[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(10):753-756.
[9] 廖苇萍,石元刚. 黄芪多糖和大豆异黄酮对糖尿病大鼠糖代谢的影响[J]. 第三军医大学学报,2007,29(5):416-418.
[10] 严士海,朱萱萱,陈晓虎,等. 黄芪注射液载入修饰胶原促进血管再生的研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(4):464-467.
[11] 李琦,温进坤,韩梅. 黄芪、当归对血管内皮剥脱后内膜增生的影响及作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2003, 23(11):758-760.
[12] 杨长春,温进坤,韩梅. 黄芪、当归对血管平滑肌细胞粘着斑激酶表达和细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2003, 23(3): 201-203.

(**收稿**:2010-03-04;**修回**:2010-03-31)
(编辑 王小寒)

文章编号:1000-5404(2010)11-1151-01

个案与短篇

纤维结肠镜检查术前肠道清洁方法的比较

安贺娟 (100700 北京,北京军区总医院胃肠内科)

[关键词] 纤维结肠镜检查;大肠水疗法;硫酸镁;肠道清洁
[中图法分类号] R619 **[文献标志码]** B

纤维结肠镜检查前的肠道准备传统方法采用大肠水疗法,或口服导泻药物[1]。目前国内多家医院采用自行配制的口服清肠液[2]。年龄大、胃不适的患者30 min内很难将3 000 ml口服导泻药喝到胃中,有些患者由于短时间内喝进大量液体引起呕吐造成准备工作失败,达不到清洁肠道的目的,部分患者还影响到结肠镜检查,使患者产生畏惧心理。我科于2007年开始使用大肠水疗机结合口服硫酸镁,用于清洁肠道准备,效果满意,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组

选择2007年1月至2009年7月本科拟行纤维结肠镜检查的患者500例,男性201例;女性299例;年龄16~79岁,平均48岁。将500例患者随机数字法分为3组:A组:单纯大肠水疗法162例;B组:单纯口服硫酸镁、果导片163例;C组:大肠水疗法加口服硫酸镁、果导片175例。

[通信作者] 安贺娟,电话:(010)64069831,E-mail:hejuan8998@126.com

1.2 试药与仪器

硫酸镁溶液(规格:100 ml,50 g;本院制剂室配制)果导片(酚酞片,规格:0.1 g/片,北京太洋药业有限公司生产);R-C型肠道水疗机(北京华康美医疗科技有限公司生产)

1.3 清洁方法及效果评定

A组患者于术前单独使用大肠水疗方法,通过仪器控制一定的压力、温度,将经过过滤的温水注入肠道,并通过患者憋水排水及护师的按摩,帮助患者清除大肠内粪便残渣,达到结肠清洁。患者平躺在治疗床上,将一次性肛管涂擦凡士林润滑油后慢慢地插入肛门,深度为2~3 cm,水温38~42 ℃,开进水阀向肠道注水,嘱患者有便意时尽量多憋一会再排便,同时配合腹部按摩结肠(依顺序乙状结肠、降结肠、横结肠、升结肠、回盲部)。根据患者行大肠水疗过程中肠道内容物排出情况,水疗时间控制在30~60 min,平均45 min。通过肛门如此重复地注入水至结肠深处,将累积在结肠壁上的宿便软化、稀释,并刺激肠蠕动,而使粪便排出,冲洗完毕,拔出肛管。B组患者在检查前3.5 h内饮入3 000 ml硫酸镁溶液(50 g/100 ml加水到3 000 ml),对长期便秘者,术前1晚口服果导片2片;C组患者除按上述方法进行大肠水疗法外,于大肠水疗前1 h加服硫酸镁口服液1 000 ml。

根据镜检肠面清洁程度进行评估[1]。优:镜检时有少量

(下转1161页)