

人脐静脉内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂1对醒脑静干预的反应

欧阳海春¹, 吴沃栋², 钟冬梅³, 吴焱贤¹, 李文杰², 陈晞明² (广东省佛山市顺德区第一人民医院心血管内科, 广东省佛山市 528300; 广州医科大学附属第三医院, ²心血管内科, ³中医科, 广东省广州市 510150)

文章亮点:

1 众多学者就醒脑静应用于冠心病治疗方面做了许多研究, 但这些研究多从临床应用上着手, 较少在基因分子生物学层面研究其作用机制。

2 实验从调节血管内皮细胞纤溶系统活性的基因分子生物学角度来探讨醒脑静治疗冠心病的作用机制。结果证实, 醒脑静能有效降低重组人肿瘤坏死因子 α 所致的人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂1分泌和mRNA表达, 并升高组织型纤溶酶原激活物分泌和mRNA表达, 从而逆转重组人肿瘤坏死因子 α 所致的人脐静脉内皮细胞纤溶活性降低。

关键词:

组织构建; 血管内皮细胞; 醒脑静; 安宫牛黄丸; 肿瘤坏死因子; 内皮细胞; 组织型纤溶酶原激活物; 纤溶酶原激活物抑制剂1

主题词:

中药; 肿瘤坏死因子 α ; 组织型纤溶酶原激活物

基金资助:

广州市中医药局中西医结合科研课题(2004A014); 广东省中医药局建设中医药强省科研课题(2060063)

摘要

背景: 前期研究发现醒脑静能有效抑制兔心肌缺血再灌注模型的炎症递质及促纤溶作用, 但是影响纤溶系统活性的作用机制未完全明确。

目的: 观察醒脑静对重组人肿瘤坏死因子 α 介导人脐静脉内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1及其基因表达的影响。

方法: 取3-5代人脐静脉内皮细胞, 在培养基中添加10 $\mu\text{g/L}$ 重组人肿瘤坏死因子 α 介导人脐静脉内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1及其基因表达, 醒脑静组加入不同浓度(5, 10, 20 mL/L)的醒脑静干预, 阳性对照组添加氟伐他汀(1 $\mu\text{mol/L}$), 并设立单纯人脐静脉内皮细胞培养的空白对照组。培育24 h后采用酶联免疫吸附双抗体夹心法(ELISA)检测细胞上清液组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1水平; 采用反转录聚合酶链反应检测人脐静脉内皮细胞的组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1的mRNA表达。

结果与结论: 重组人肿瘤坏死因子 α 组纤溶酶原激活物抑制剂1分泌和mRNA表达较空白对照组显著升高($P < 0.05$), 组织型纤溶酶原激活物分泌和mRNA表达较空白对照组显著降低($P < 0.05$)。不同浓度醒脑静组纤溶酶原激活物抑制剂1分泌和mRNA表达均较重组人肿瘤坏死因子 α 组显著降低($P < 0.05$), 而组织型纤溶酶原激活物分泌和mRNA表达均较重组人肿瘤坏死因子 α 组显著升高($P < 0.05$), 且呈剂量依赖关系。结果证实, 醒脑静作用可逆转重组人肿瘤坏死因子 α 所致的人脐静脉内皮细胞的纤溶活性。

欧阳海春, 吴沃栋, 钟冬梅, 吴焱贤, 李文杰, 陈晞明. 人脐静脉内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂1对醒脑静干预的反应[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(11):1717-1721.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.11.015

Effects of *Xingnaojing* on recombinant human tumor necrosis factor-mediated tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 expression in human umbilical cord vein endothelial cells

Ouyang Hai-chun¹, Wu Wo-dong², Zhong Dong-mei³, Wu Yan-xian¹, Li Wen-jie², Chen Xi-ming² (¹Department of Cardiology, the First People's Hospital of Shunde District, Foshan 528300, Guangdong Province, China; ²Department of Cardiology, ³Department of Chinese Traditional Medicine, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: We have found that *Xingnaojing* can effectively inhibit mediators of inflammatory mediators and promote fibrinolytic activity in a rabbit model of myocardial ischemia and reperfusion. However, it is not completely clear what is the action of mechanism of fibrinolytic system activity in human umbilical vein endothelial cells.

欧阳海春, 男, 1980年生, 汉族, 2008年广州医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事冠心病的中西医结合治疗。

通讯作者: 吴沃栋, 主任医师, 硕士生导师, 广州医科大学附属第三医院心血管内科, 广东省广州市 510150

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)11-01717-05

稿件接受: 2015-02-06

<http://WWW.crter.org>

Ouyang Chun-hai, Master, Attending physician, Department of Cardiology, the First People's Hospital of Shunde District, Foshan 528300, Guangdong Province, China

Corresponding author: Wu Wo-dong, Chief physician, Master's supervisor, Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-02-06

OBJECTIVE: To investigate the effects of *Xingnaojing* on recombinant human tumor necrosis factor α -mediated tissue-type plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in human umbilical cord vein endothelial cells.

METHODS: The passages 3-5 of human umbilical cord vein endothelial cells were obtained, and were induced by adding 10 $\mu\text{g/L}$ recombinant human tumor necrosis factor α in the culture medium. *Xingnaojing* in different concentrations (5, 10, 20 mL/L) were injected in the *Xingnaojing* group, and fluvastatin (1 $\mu\text{mol/L}$) was added as positive control group. A blank control group of simple human umbilical cord vein endothelial cells culture was set up. After 24 hours of cultivation, the production of t-PA and PAI-1 in the cultured medium was determined by ELISA. The mRNA expression of t-PA and PAI-1 was measured by reverse transcript-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the blank control group, the secretion and mRNA expression of PAI-1 in the group treated with recombinant human tumor necrosis factor α (10 $\mu\text{g/L}$) were significantly increased ($P < 0.05$); however, the secretion and mRNA expression of t-PA in the group treated with recombinant human tumor necrosis factor α (10 $\mu\text{g/L}$) were significantly decreased ($P < 0.05$). The secretion and mRNA expression of t-PA were significantly higher in the *Xingnaojing* group at different concentrations than in the recombinant human tumor necrosis factor α group ($P < 0.05$); however, the secretion and mRNA expression of PAI-1 were significantly lower in the former group than the latter group ($P < 0.05$), which was in a dose-dependent manner. *Xingnaojing* can effectively improve the fibrinolytic function of human umbilical cord vein endothelial cells mediated by recombinant human tumor necrosis factor α .

Subject headings: Drugs, Chinese Herbal; Tumor Necrosis Factor- α ; Tissue Plasminogen Activator

Funding: the Integrated Chinese and Western Medicine Research of Traditional Chinese Medicine Bureau of Guangdong Province, No. 2004A014; the Construction Research for Traditional Chinese Medicine in the Traditional Chinese Medicine Bureau of Guangdong Province, No. 2060063

Ouyang HC, Wu WD, Zhong DM, Wu YX, Li WJ, Chen XM. Effects of *Xingnaojing* on recombinant human tumor necrosis factor-mediated tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 expression in human umbilical cord vein endothelial cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(11):1717-1721.

0 引言 Introduction

冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)的主要病理基础是动脉粥样硬化,而动脉粥样硬化是对血管损伤的过度慢性炎症反应^[1]。动脉粥样过程中释放大量的炎症因子,特别是肿瘤坏死因子 α 是动脉粥样硬化炎症反应中的关键启动因子^[2]。内皮细胞表面有肿瘤坏死因子 α 受体,为肿瘤坏死因子 α 主要靶细胞之一^[3]。肿瘤坏死因子 α 影响动脉粥样硬化斑块的形成和发展的机制很多,其中降低血管内皮细胞纤溶活性是其中最重要的途径之一^[4]。

他汀类药物是预防与治疗冠心病的基础药物,能有效延缓、稳定或逆转动脉粥样硬化斑块的进展,减少急性冠脉综合征、缺血性脑卒中及猝死等心脑血管事件的发生率^[5],其作用机制可能是与他汀类药物可以抑制血管内皮细胞炎症反应和增加血管内皮细胞纤溶活性有关^[6-7]。

醒脑静注射液是由祖国医学传统名方“安宫牛黄丸”经科学提取精制而成的新型水溶性静脉注射液,具有清热解毒、凉血活血、开窍醒脑之功能,其主要成分为麝香、栀子、郁金、冰片,其有效成分具有兴奋中枢、解热、镇痛、抗炎等药效^[8],临床上已广泛用于治疗缺血性脑梗死,并取得良好的临床疗效^[9]。

基于脑梗死与心肌梗死有着相似的病理基础动脉粥样硬化,作者已经进行了部分研究,探讨了醒脑静注射液治疗冠心病的部分作用机制,前期动物研究发现:醒脑静注射液能有效抑制兔心肌缺血再灌注模型的炎症递质及促纤溶作用^[10],并且将醒脑静注射液应用临床心肌梗死患者,结果表明醒脑静注射液治疗心肌梗死有良好的临床疗效,可有效改善患者心功能,有效抑制患者血浆中炎症递质水平及促进纤

溶活性^[11],但其具体作用机制尚未完全明确。本实验旨在从内皮细胞纤溶系统活性分子生物及基因表达水平来探讨醒脑静注射液影响内皮细胞纤溶系统活性的药理作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 多因素水平设计、细胞分子及基因水平对照实验。

时间及地点: 于2007年5月2008年1月在广州医科大学第三附属医院妇产科研究室完成。

材料:

人脐静脉内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1对醒脑静干预的变化试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
醒脑静注射液	江苏无锡山禾药业股份有限公司
氟伐他汀(Fluvastatin, Flu)	美国ADI&ALEXIS公司
M199培养基干粉、胎牛血清胰蛋白酶, 胶原酶II	美国Gibco公司
重组人肿瘤坏死因子 α (rhTNF- α)	美国PEPROTECH EC公司
RNAprep培养细胞总RNA提取试剂盒	德国TIANGEN公司
SYBR [®] PrimeScript [™] RT-PCR Kit、PCR引物及内参(GAPDH)引物合成	宝生物工程(大连)有限公司(大连Takara公司)
组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1含量酶联免疫吸附测定(ELISA)	上海太阳生物技术公司

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)由广州医科大学第三附属医院妇产科研究室提供,均征得产妇知情同意,并签署相关知情同意书,试验获得医院伦理委员会批准。

实验方法:

人脐静脉内皮细胞培养: 参照Jaffe等^[12]建立的方法,

0.2% II型胶原酶消化、分离脐静脉内皮细胞并用内皮细胞培养液培养, 在倒置相差显微镜下进行内皮细胞的形态观察和鉴定。第3-5代细胞用于实验。

分组处理: 取3-5代人脐静脉内皮细胞用含体积分数20%胎牛血清的M199培养液配成单个细胞悬液, 按 1×10^4 /孔接种于96孔培养板中, 37℃、体积分数5%CO₂孵箱中培养24 h, 换含体积分数5%胎牛血清的M199培养基培养, 每组设立6个平行孔。干预24 h后收集各组上清液, 1 500 r/min离心, -20℃保存, 待测。

分组干预方法:

组别	处理
重组人肿瘤坏死因子α组	培养基中添加10 μg/L 重组人肿瘤坏死因子α
5 mL/L醒脑静组	培养基中添加5 mL/L醒脑静注射液+10 μg/L 重组人肿瘤坏死因子α
10 mL/L醒脑静组	培养基中添加10 mL/L醒脑静注射液+10 μg/L 重组人肿瘤坏死因子α
20 mL/L醒脑静组	培养基中添加20 mL/L醒脑静注射液+10 μg/L 重组人肿瘤坏死因子α
阳性对照组	培养基中添加氟伐他汀1 μmol/L+10 μg/L 重组人肿瘤坏死因子α
空白对照组	单纯含体积分数5%胎牛血清的M199培养基培养

酶联免疫吸附双抗体夹心法(ELISA)检测组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1: 采用ELISA法测定培养上清液中组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1抗原浓度, 包被抗体与待测标本中的抗原结合, 加入酶标抗体后形成复合物, 后者与底物作用呈显色反应。分别将组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1标准品准确复溶及倍比稀释, 组织型纤溶酶原激活物标准品浓度分别为30, 15, 7.5, 3.75, 1.875, 0.937 5 μg/L; 纤溶酶原激活物抑制剂1标准品质量浓度分别为120, 60, 30, 15, 7.5, 3.75, 1.875 μg/L。具体步骤严格按组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1测定试剂盒说明书操作。以A₄₉₀对抗原标准品浓度分别在普通坐标系(组织型纤溶酶原激活物)和双对数坐标系(纤溶酶原激活物抑制剂1)上作标准曲线, 待测组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1含量由标准曲线上得出。

组织型纤溶酶原激活物、纤溶酶原激活物抑制剂1和GAPDH引物设计: 组织型纤溶酶原激活物、纤溶酶原激活物抑制剂1、GAPDH引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

引物序列及扩增产物的预期长度:

目的基因	引物序列(5'-3')	产物长度
纤溶酶原激活物抑制剂1	正义 TCA TCA TCAATG ACT GGG TGAAGA C	25 bp
	反义 TTC CAC TGG CCG TTG AAG TAG AG	23 bp
组织型纤溶酶原激活物	正义 ACG GTG ATC TTG GGC AGAACA TA	23 bp
	反义 CGG GAC GAA TCC GAT TTC AG	20 bp
GAPDH	正义 GCA CCG TCAAGG CTG AGA AC	20 bp
	反义 TGG TGAAGA CGC CAG TGG A	19 bp

RT-PCR检测组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1mRNA的表达:

RNA提取/质量鉴定及含量的计算: 各组细胞孵育成功后, 彻底吸除细胞培养基上清, 加入1 mL Trizol试剂提取细胞总RNA, RNA提取按说明书进行。RNA质量鉴定及含量的计算采用改良的1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性, 10倍稀释RNA样品, 紫外分光光度计测定A₂₆₀和A₂₈₀, 以检测RNA的纯度。

实时荧光定量PCR反应具体步骤: 参考TaKaRa: SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit说明书进行。本实验采用的是基因表达的相对定量方法。管家基因GAPDH作为内标基因来校准目的基因在组织中表达的相对拷贝数。取各组PCR纯化后产物各取2 μL混合, 作为标准曲线中浓度最高的模板(10⁰), 然后将其逐次10倍稀释成10¹, 10², 10³, 10⁴倍, 自定义相对应的其对应总RNA量的对数Log值为5, 4, 3, 2, 1, 用于标准曲线的制作。每次循环收集一次荧光, ABI PRISM7500自带软件7000 System SDS Software产生最佳荧光基线和标准曲线, 利用CurveExert 1.3通过绘制每个标准的CT值(yaxis)与其对应总RNA量的对数Log值(xaxis)的点阵图来构建基于5个点的线性相对定量标准曲线(y=ax+b)。基因的拷贝数分别根据产生的Ct值从各自的标准曲线获得。针对每个目的基因和内标基因每次反应中每个样本至少重复3次, 最后取平均值。每个样本的相对表达量的值等于目的基因的表达量均值除以内标基因的表达量均值。

主要观察指标: 重组人肿瘤坏死因子α、氟伐他汀、醒脑静注射液的干预对人脐静脉内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1含量及其mRNA的影响。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计学软件分析。计量资料数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用多个样本均数间的多重比较的SNK-q检验。

2 结果 Results

2.1 醒脑静干预下人脐静脉内皮细胞形态变化 人脐静脉内皮细胞培养两三天后, 倒置相差显微镜下可见细胞呈椭圆形、多角形、梭形或多边形, 边界清楚, 胞浆丰富, 为单层鹅卵石镶嵌样排列, 细胞融合时呈“铺路石”样紧密镶嵌排列, 见图1。

2.2 醒脑静干预下各实验组人脐静脉内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1的变化 从表1可以看出, 与空白对照组相比, 10 mg/L重组人肿瘤坏死因子α可以显著减少人脐静脉内皮细胞组织型纤溶酶原激活物的分泌(P < 0.05)和显著促进人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂1的分泌(P < 0.05); 而各组的醒脑静、1 μmol/L氟伐他汀均可显著增加10 mg/L重组人肿瘤坏死因子α所引起的组织型纤溶酶原激活物的分泌减少(P < 0.05), 均可显著抑制10 mg/L重组人肿瘤坏死因子α所引起的纤溶酶原激活

表1 各组的人脐静脉内皮细胞组织型纤溶酶原激活物与纤溶酶原激活物抑制剂1的比较 ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/L}$)

Table 1 Comparison of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 secretion in human umbilical cord vein endothelial cells

组别	组织型纤溶酶原激活物	纤溶酶原激活物抑制剂1
空白对照组	1.051±0.125	38.660±1.658
重组人肿瘤坏死因子 α 组	0.716±0.207 ^a	67.165±2.756 ^a
阳性对照组(氟伐他汀)	1.210±0.265 ^{ab}	40.568±4.356 ^{ab}
5 mL/L醒脑静组	0.814±0.263 ^{abc}	60.054±3.081 ^{abc}
10 mL/L醒脑静组	1.076±0.188 ^{bc}	52.863±3.867 ^{abc}
20 mL/L醒脑静组	1.175±0.162 ^{ab}	40.121±2.483 ^{ab}

表注: 醒脑静各组、阳性对照组均可显著增加 10 mg/L 重组人肿瘤坏死因子 α 所引起的组织型纤溶酶原激活物的分泌减少, 显著抑制了纤溶酶原激活物抑制剂1的分泌增加。与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与重组人肿瘤坏死因子 α 组比较, ^b $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, ^c $P < 0.05$ 。

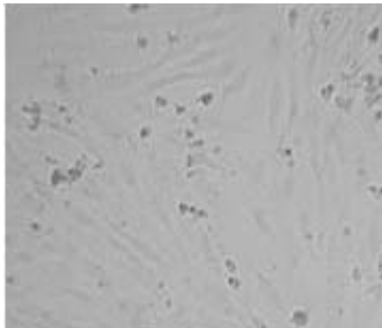


图1 倒置相差显微镜下人脐静脉内皮细胞形态($\times 200$)

Figure 1 Morphology of human umbilical cord vein endothelial cells under inverted phase contrast microscope ($\times 200$)

图注: 细胞呈椭圆形、多角形、梭形或多边形, 边界清楚, 胞浆丰富。

物抑制剂1的分泌增加($P < 0.05$); 氟伐他汀对重组人肿瘤坏死因子 α 介导人脐静脉内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1的影响比醒脑静作用更强, 与5 mL/L及10 mL/L醒脑静比差异有显著性意义($P < 0.05$), 而与20 mL/L醒脑静比差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.3 各实验组纤溶酶原激活物抑制剂1、组织型纤溶酶原激活物实时荧光定量PCR结果 从表2可以看出, 与空白对照组相比, 10 mg/L重组人肿瘤坏死因子 α 可以显著减少人脐静脉内皮细胞组织型纤溶酶原激活物的mRNA表达($P < 0.05$)和显著促进人脐静脉内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂1的mRNA表达($P < 0.05$); 而各组的醒脑静、1 $\mu\text{mol/L}$ 氟伐他汀均可显著增加10 mg/L重组人肿瘤坏死因子 α 所引起的组织型纤溶酶原激活物的mRNA表达减少($P < 0.05$), 均可显著抑制10 mg/L重组人肿瘤坏死因子 α 所引起的纤溶酶原激活物抑制剂1的mRNA表达增加($P < 0.05$); 氟伐他汀对重组人肿瘤坏死因子 α 介导人脐静脉内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制剂1的mRNA表达影响比各浓度的醒脑静作用更强, 与5 mL/L醒脑静及10 mL/L醒脑静比较差异有显著性意义($P < 0.05$), 而与20 mL/L醒脑静比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表2 各组的纤溶酶原激活物抑制剂1、组织型纤溶酶原激活物mRNA表达的相对拷贝数 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Relative copy number of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 mRNA expression in each group

组别	组织型纤溶酶原激活物的相对拷贝数	纤溶酶原激活物抑制剂1的相对拷贝数
空白对照组	1.236±0.144	0.557±0.023
重组人肿瘤坏死因子 α 组	0.648±0.014 ^a	0.989±0.014 ^a
阳性对照组(氟伐他汀)	0.941±0.088 ^{ab}	0.667±0.019 ^{ab}
5 mL/L醒脑静组	0.739±0.043 ^{abc}	0.870±0.026 ^{abc}
10 mL/L醒脑静组	0.835±0.058 ^{abc}	0.776±0.017 ^{abc}
20 mL/L醒脑静组	0.937±0.025 ^{ab}	0.695±0.019 ^{ab}

表注: 醒脑静各组、阳性对照组均可显著增加 10 mg/L 重组人肿瘤坏死因子 α 所引起的组织型纤溶酶原激活物的mRNA表达减少, 均可显著抑制纤溶酶原激活物抑制剂1的mRNA表达增加。与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与重组人肿瘤坏死因子 α 组比较, ^b $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, ^c $P < 0.05$ 。

3 讨论 Discussion

纤溶系统的主要生理功能是防止血管内血栓形成, 主要的调节因子为组织型纤溶酶原激活物与纤溶酶原激活物抑制剂1, 主要由血管内皮细胞合成和分泌。组织型纤溶酶原激活物是组织型纤溶酶原激活剂, 激活纤溶酶原形成纤溶酶, 从而促进纤维蛋白降解及溶解血栓, 还可以抑制血小板聚集, 纤溶酶原激活物抑制剂1是组织型纤溶酶原激活物的快速抑制物^[13]。组织型纤溶酶原激活物与纤溶酶原激活物抑制剂1之间处理动态平衡是纤溶系统保持稳定的前提条件, 组织型纤溶酶原激活物/纤溶酶原激活物抑制剂1比值下降可以导致血浆中的纤溶活性下降, 导致血栓形成, 甚至导致急性冠脉综合征、缺血性脑卒中等心脑血管事件发生^[5, 14]。

肿瘤坏死因子 α 是导致血管内皮细胞的损伤或功能紊乱一种重要的细胞因子, 可以抑制内皮细胞(人脐静脉内皮细胞)的组织型纤溶酶原激活物分泌、mRNA表达和促进纤溶酶原激活物抑制剂1分泌、mRNA表达^[4, 6], 本实验结果也符合上述结论。这种纤溶系统平衡的改变可引起局部纤溶减弱, 诱发急性血栓形成, 诱发急性冠脉综合征、缺血性脑卒中等^[15]。因此, 抑制肿瘤坏死因子 α 引起的纤溶系统平衡的改变是治疗急性冠脉综合征、缺血性脑卒中的一个重要方法。氟伐他汀作为一种具有内皮保护及抗炎作用的物质^[16], 能有效提升肿瘤坏死因子 α 所致的内皮细胞组织型纤溶酶原激活物分泌、mRNA表达的减少和抑制肿瘤坏死因子 α 所致的内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂1分泌、mRNA表达的增加^[17], 从而逆转肿瘤坏死因子 α 介导的内皮细胞纤溶活性降低, 本实验结果与既往研究结果基本相符, 其作用机制与Rho家族蛋白、肌动蛋白聚合及p38 MAP激酶有关^[18-19]。

醒脑静注射液系古方安宫牛黄丸减味而成的水溶性静脉注射液, 具有通络行气、活血、化痰逐瘀之功效, 具活血通络、活血、化痰逐瘀之功效^[8], 临床上已广泛用于治

疗缺血性脑梗死,并取得良好的临床疗效^[9]。现代医学所指的血栓性脑梗死与心肌梗死均属于“血瘀症”范围,在现代医学病理机制中与血管内皮功能损伤、凝血与纤溶系统平衡失调有关。

作者前期动物研究表明:醒脑静预处理对兔心缺血再灌注损伤由明显的保护作用,其机制与醒脑静可以有效抑制炎症递质及促进纤溶作用有关^[10]。作者还开展了醒脑静临床试验,结果表明:醒脑静注射液应用临床心肌梗死患者,结果表明醒脑静注射液治疗心肌梗死有良好的临床疗效,可有效抑制患者血浆中炎症递质水平及促进纤溶活性^[11],但其具体机制未完全明确。本实验旨在从内皮细胞纤溶系统活性分子生物及基因表达水平来探讨醒脑静注射液治疗冠心病的药理作用机制。从实验结果可以看出:与氟伐他汀一样,各种浓度醒脑静均能有效提升肿瘤坏死因子 α 所致的内皮细胞组织型纤溶酶原激活物分泌、mRNA表达的减少和抑制肿瘤坏死因子 α 所致的内皮细胞纤溶酶原激活物抑制剂1分泌、mRNA表达的增加,从而逆转肿瘤坏死因子 α 介导的内皮细胞纤溶活性降低,且随作用浓度增加而增强。

作者的分子基因水平、动物实验及临床应用等研究为醒脑静应用于预防及治疗急性冠脉综合征、缺血性脑卒中提供理论基础,也为合并缺血性脑卒中的冠心病尤其是急性冠脉综合征患者提供新型预防及治疗方法,其作用机制可能是:醒脑静注射液促进内皮细胞的组织型纤溶酶原激活物分泌、mRNA表达和抑制纤溶酶原激活物抑制剂1分泌、mRNA表达基因表达有关,也可能与降低肿瘤坏死因子 α 等炎症因子水平有关,是否有其他作用途径,尚需进一步研究探讨。

作者贡献: 实验设计与评估均为吴沃栋,实验实施、资料收集为欧阳海春,钟东梅负责中医理论,欧阳海春成文,吴沃栋审校,吴沃栋和欧阳海春对文章负责。采用盲法评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 均征得产如知情同意,并签署相关知情同意书,试验获得医院伦理委员会批准。

学术术语: 纤溶系统-参与纤维蛋白溶解过程的一系列化学物质组成的系统称为纤溶系统,纤溶系统包括:纤维蛋白溶解酶、纤溶酶的激活物与纤溶酶的抑制物3个组成部分。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Marini MG, Sonnino C, Previtero M, et al. Targeting inflammation: impact on atherothrombosis. *J Cardiovasc Transl Res.* 2014;7(1):9-18.
- [2] Cho HC, Yu G, Lee MY, et al. TNF- α polymorphisms and coronary artery disease: Association study in the Korean population. *Cytokine.* 2013;62(1):104-109.
- [3] Biswas S, Ghoshal PK, Mandal SC, et al. Relation of anti-to pro-inflammatory cytokine ratios with acute myocardial infarction. *Korean J Intern Med.* 2010; 25(1):44-50.
- [4] Ku SK, Kim TH, Lee S, et al. Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. *Food Chem Toxicol.* 2013;53:197-204.
- [5] Tian J, Gu X, Sun Y, et al. Effect of statin therapy on the progression of coronary atherosclerosis. *BMC Cardiovasc Disord.* 2012;12:70.
- [6] Bergh N, Larsson P, Ulfhammer E, et al. Effect of shear stress, statins and TNF- α on hemostatic genes in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 420(1):166-171.
- [7] Liu L, Zhao SP, Zhou HN, et al. Effect of fluvastatin and valsartan, alone and in combination, on postprandial vascular inflammation and fibrinolytic activity in patients with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;50(1):50-55.
- [8] 欧阳海春, 吴沃栋, 钟冬梅, 等. 醒脑静抑制重组人肿瘤坏死因子介导的人脐静脉内皮细胞增殖[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(2):239-242.
- [9] 李昶, 茹雪莹, 吴泰相, 等. 醒脑静注射液治疗急性脑梗死随机对照试验的系统评价[J]. *临床荟萃*. 2013, 28(9):1006-1013.
- [10] 欧阳海春, 吴沃栋, 钟冬梅, 等. 安宫牛黄丸及类方预处理对兔心肌缺血及再灌注损伤保护的作用研究[J]. *现代医院*, 2008, 7(8):25-28.
- [11] 李文杰, 陈晔明, 吴沃栋, 等. 醒脑静注射液治疗急性心肌梗死的临床疗效研究[J]. *中国急救医学*, 2007, 27(8):682-684.
- [12] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cell derived from umbilical veins. identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973; 52(11):2745-2756.
- [13] Bai H, Nangia S, Parmer RJ. The plasminogen activation system and the regulation of catecholaminergic function. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:721657.
- [14] Walter T, Szabo S, Suselbeck T, et al. Effect of atorvastatin on haemostasis, fibrinolysis and inflammation in normocholesterolaemic patients with coronary artery disease: a post hoc analysis of data from a prospective, randomized, double-blind study. *Clin Drug Investig.* 2010;30(7):453-60.
- [15] Shantsila E, Montoro-Garcia S, Tapp LD, et al. Fibrinolytic status in acute coronary syndromes: evidence of differences in relation to clinical features and pathophysiological pathways. *Thromb Haemost.* 2012;108(1):32-40.
- [16] Robinson R, Ho CE, Tan QS, et al. Fluvastatin downregulates VEGF-A expression in TNF- α -induced retinal vessel tortuosity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(10):7423-7431.
- [17] Wiesbauer F, Kaun C, Zorn G, et al. HMG CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins. *Br J Pharmacol.* 2002;135(1):284-292.
- [18] Kunieda Y, Nakagawa K, Nishimura H, et al. HMG CoA reductase inhibitor suppresses the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 induced by angiotensin II in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Res.* 2003; 110(4):227-234.
- [19] Dunoyer-Geindre S, Fish RJ, Kruihof EK. Regulation of the endothelial plasminogen activator system by fluvastatin. Role of Rho family proteins, actin polymerisation and p38 MAP kinase. *Thromb Haemost.* 2011;105(3):461-472.