

• 基础研究 •

通络救脑注射液对大鼠脑微血管内皮细胞活性
及其条件培养液影响的初步研究^{*}青雪梅 李澎涛^{**} 胡京红 侯金才 华 茜 王 冰 杜 欢

(北京中医药大学基础医学院 北京 100029)

摘要 目的: 观察通络救脑注射液对正常及拟缺血大鼠脑微血管内皮细胞的活性影响, 并初步探讨细胞条件培养液内蛋白分泌的时效特征、奠定可溶性蛋白深入分析的技术基础。方法: 通络救脑注射液作用于正常及拟缺血脑微血管内皮细胞之后, 用 MTS/PMS 比色分析法测定细胞的活性, Bradford 法测定细胞培养液总蛋白含量, 比色分析法测定细胞培养液乳酸脱氢酶(LDH) 漏出值, 同步观察了 5 个时间点的细胞活性及条件培养液总蛋白量及 LDH 释放量。结果: 通络救脑注射液能够提高拟缺血细胞的活性, 且抑制 LDH 释放量; 正常组分泌总蛋白量 3h 达到高峰, 此时细胞活性最佳, LDH 释放量亦少。拟缺血组分泌总蛋白量是 6h 达到高峰, 此时 LDH 释放量最少, 但细胞活性与 3h 比较有所下降。结论: 通络救脑注射液对拟缺血细胞损伤具有保护作用; 以 3h 至 6h 的细胞条件培养液做为收集目标是研究条件培养液的最佳时间段。

关键词: 通络救脑注射液; 脑微血管内皮细胞; 条件培养液; 总蛋白

Observing effects of TLJN injection on the rat cerebral microvascular endothelial cells and primary study of the feature of cellular conditioned medium

QING Xue - mei, LI Peng - tao, HU Jing - hong, et al

(School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT Objective: Through observing the active influence of tongluojiunao (TLJN) injection on the normal and ischemic rat cerebral microvascular endothelial cells (CMECs) and primary discussion on total protein secretive time-effect feature in cellular conditioned medium, to establish a technical basis for further study of solubility protein. **Methods:** After TLJN injection having reacted upon normal and ischemic cerebral microvascular endothelial cells (CMECs), MTS/PMS colorimetric method, Bradford assay and colorimetric analysis antigenic were used respectively and isochronously to test cellular activity, total protein quantity of conditioned medium, and LDH releasing value of conditioned medium, observing them and analyzing the time-effect feature of cellular conditioned medium. **Results:** TLJN injection can not only promote the activity of ischemic cells, but also reduce LDH releasing value. In the normal group, the peak time of total protein quantity is at 3rdh, at this time, cell activity is highest and LDH releasing value is least. In the ischemia group, the peak time of total protein quantity is at 6thh, simultaneously, LDH releasing value is least, but cell activity is a little lower than that of 3rdh. **Conclusion:** TLJN injection has protective action on ischemic cells. In this study, it is suggested that regarding conditioned medium from 3rdh to 6thh as collecting aim is the best period to study biological effects of solubility protein.

Key words: Tongluojiunao (TLJN) injection (TLJN injection); Cerebral microvascular endothelial cells (CMECs); Conditioned medium; Total protein

大量临床与实验工作证实, 具有活血通络作用的中药在改善脑微血管功能及血流状态的同时, 对脑缺血损伤也起了保护作用^[1], 这种脑保护功能是否与启动了脑微血管内皮细胞的调控机制有关尚无研究报道。尽管近年来加深了络病学说的研究, 其病络的物质基础仍不清楚。阐明通络方药的“解毒通络”作用机制, 对于深化“毒损脑络^[2]”病机的理论内涵具

有重要意义。目前尚少有研究报道以内皮细胞的条件培养液入手, 去探索脑微血管内皮细胞与神经细胞间的功能关系。本实验观察了通络救脑注射液对拟缺血脑微血管内皮细胞的效应, 并初步探讨了不同时间点的细胞条件培养液的总蛋白分泌状况与细胞活性的关系, 为进一步揭示内皮细胞调控的脑损伤保护机制研究做前期基础工作。

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划(“973 计划”)项目:

通络方药对脑缺血损伤的脑组织保护作用的微血管机制研究(No. 2005CB523311)

国家自然科学基金资助项目: 从络脉论治脑神病的生物学基础研究(30572284)

作者简介: 青雪梅, (1969-), 博士研究生, 副主任医师

** 通讯作者: 李澎涛, 博士生导师, 北京中医药大学基础医学院(100029) Email: LPTao@263.net

(收稿日期: 2006-04-11 接受日期: 2006-04-28)

1 材料与方法

1.1 动物

雄性SD大鼠,体重60–80g,级别SPF/VAF,动物合格证号:SCXK京2002–0003。购自北京维通利华实验动物中心。

1.2 主要试剂

内蒙古康源药业有限公司:通络救脑注射液(药品批号为04061011);PROMEGA公司:四氮唑MTS[3–(4,5–dimethylthiazol–2–yl)–5–(3–carboxymethoxyphenyl)–2–(4–sulphophenyl)–2H–tetrazolium, inner salt, MW487.8]和酚嗪硫酸甲酯(PMS);北京普利莱基因技术有限公司:PI510蛋白定量试剂盒;PROMEGA公司:LDH试剂盒;GIBCO公司:高糖DMEM基础培养基;SIGMA公司:胰蛋白酶,胶原酶,EDTA,TYPE–A明胶和ECGS;黑龙江五江制药厂:胎牛血清。

1.3 主要仪器

美国BECKMAN公司:340S酶标仪;法国JOUAN公司:CO₂培养箱。

1.4 方法

1.4.1 主要试剂的配制:

完全培养液:高糖DMEM基础培养基,加胎牛血清20%;ECGS 75mg•L⁻¹、肝素钠4×10⁴U•L⁻¹、青霉素1×10⁵U•L⁻¹、链霉素1×10⁵U•L⁻¹、胰岛素200U•L⁻¹、L–谷氨酰胺2mmol•L⁻¹。调pH为7.2,0.22μm滤器过滤除菌,4℃保存期限两周,正常细胞培养使用。

Kreb's液:NaCl 119mmol•L⁻¹;KCl 4.7mmol•L⁻¹;KH₂PO₄ 1.2mmol•L⁻¹;NaHCO₃ 25mmol•L⁻¹;CaCl₂ 2.5mmol•L⁻¹;MgCl₂ 1mmol•L⁻¹。超纯水溶解,调pH为7.2,0.22μm滤器过滤除菌,临用前配制,做为拟缺血组细胞的培养液。

1.4.2 脑微血管内皮细胞的培养

雄性SD大鼠,体重60–80g,无菌条件下取出双侧大脑半球,置预冷的冲洗液(DMEM培养液、10%新生牛血清、青霉素/链霉素1×10⁵U•L⁻¹)中,剔除软脑膜、表面血管及白质,收集皮质。剪碎成1mm3的小块,置手动玻璃匀浆器,冰上操作上下匀浆约25次。依次通过80目和200目尼龙网过滤,收集200目滤网上微血管段。用0.1%胶原酶,37℃消化30分钟。冲洗液冲洗两遍,1000r/min离心5min,将微血管段重悬于完全培养基中,接种于2%明胶预先包被的培养瓶中,37℃、5%CO₂培养箱静置培养48小时后,第一次换液。约6–7d细胞基本融合成片,进行消化传代,消化液为0.125%的胰蛋白酶–0.02%EDTA(1:1)。

第二代细胞经过VIII因子免疫荧光鉴定,其纯度>98%。本实验用第三代细胞,将实验细胞分为正常(N)和拟缺血(Is)两组,台盼蓝计活细胞数调整传代密度为1×10⁵个•cm²,传至96孔培养板,37℃、5%CO₂培养箱培养36h后,进行药物干预。药物作用终浓度为2μL•mL⁻¹,即每毫升培养液中含注射液2μL,该通络救脑注射液有效成份为7.7mg/mL,我们采用了体积含量为计算单位。

1.4.3 正常组药物干预及时效关系研究

对于正常组细胞,又分给药组与无药对照组两系列。稀释药物的溶剂是DMEM液。干预细胞的终浓度是2μL•mL⁻¹,首先系列稀释成10×终浓度(20μL•mL⁻¹)。给药组每孔细胞加完全培养液90μL和10μL含药的DMEM液;对照组加100μL的完全培养液。置37℃、5%CO₂培养箱培养6h后,弃去完全培养液,D–Hank's冲洗2遍,换上无血清DMEM培养液(即条件培养液)。

首先分别测量给药组及无药对照组各8个复孔的细胞活性。方法参照PROMEGA公司的MTS/PMS检测说明书,每孔加20μLMTS/PMS混合液,继续培养3h显色,于340S酶标仪检测492nm光密度值(OD)。其余未检测孔亦继续培养,并做药物组与无药组5个时间点的时效关系研究,分别按时收集1h、3h、6h、12h、34h条件培养液分两部分,20μL检测总蛋白含量,50μL检测LDH释放量;同时同步做细胞活性检测(方法同上),各时间点均做复孔8个。总蛋白含量检测用Bradford法,参照普利莱说明书(略),终止反应后于酶标仪上测定570nm光密度值(OD),然后根据标准曲线计算出总蛋白量。LDH释放活性检测参照PROMEGA公司试剂盒说明书(略),终止反应后于酶标仪上测定492nm吸光值(A)。

1.4.4 拟缺血组药物干预及时效关系研究

对于拟缺血组细胞,亦分给药组与无药对照组两系列,采用氧糖剥夺(OGD)法模拟在体缺血^[3]。稀释药物的溶剂换成Kreb's溶液,配置浓度同正常组。造模时弃去完全培养液,以D–Hank's冲洗细胞2遍,给药组每孔细胞加完全培养液90μL和10μL含药的Kreb's溶液;对照组加100μL的Kreb's液。置37℃、93%N₂+7%CO₂自制的密闭缺氧罐中培养6小时。

首先分别收集给药组及无药对照组各8个复孔的细胞缺氧液,测量其总蛋白含量和LDH释放量,同时给细胞换上DMEM液加MTS/PMS混合液,继续培养3h后测其活性,三种指标检测方法同上。其余未检测各孔亦换上无血清DMEM培养液(即条件培养液)置37℃、5%CO₂培养箱继续培养,做5个时间点的时效关系研究,时间点设置、分组及检测方法均同正常组。

1.5 统计学处理

结果以($\bar{X} \pm S$)表示,单因素方差分析。

2 结果

从以下四个方面进行结果分析。

2.1 药物对N组及Is组细胞活性的影响

首先从细胞增殖活性角度分析通络救脑注射液对N组及Is组细胞的影响,结果如表1所示。通络救脑注射液作用于拟缺血组细胞,与无药物对照组比较对细胞活性的改善具有显著统计学意义(P<0.05);药物对正常组细胞的影响无显著差异。此外,拟缺血细胞的无药物对照组与正常细胞的无药物对照组比较,拟缺血细胞活性明显低于正常细胞活性(P<0.01),提示了体外缺血模型成功。

表1 MTS/PMS法检测TNJN对N组及Is组细胞的活性($\bar{X} \pm S$)

(Table 1 cellular activity treated with TNJN injection by MTS/PMS assay, $\bar{X} \pm S$)

	numbers	对照组	给药组
		(control, OD)	(drug treat, OD)
N(Normal cells)	8	0.89±0.13	0.99±0.17
Is(Ischemic cells)	8	0.50±0.06 ^{☆☆}	0.68±0.06 [*]

注:与拟缺血对照组比较^{*}P<0.05;与正常对照组比较^{☆☆}P<0.01
(note: compare with control of ischemic cells^{*}P<0.05; compare with control of normal cells^{☆☆}P<0.01)

2.2 药物对Is组细胞活性、总蛋白含量、LDH释放量的影响

针对Is组细胞,从细胞活性、上清总蛋白分泌量及LDH释放量三方面研究通络救脑注射液的影响,结果如表2所示。通络救脑注射液能够提高拟缺血组细胞活性,且降低LDH漏出值均有显著性差异(P<0.05)。

表2 TNJN 对 1s 组细胞活性及上清总蛋白含量、LDH 释放量的影响($\bar{X} \pm s$)

(Table 2 cellular activity, extracellular total protein quantity and LDH release value of ischemic cells group caused by TNJN injection)

	n(numbers)	细胞活性(OD)	总蛋白量($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LDH 活性(A)
		(cellular activity, od)	(total protein quantity, $\mu\text{g}/\text{mL}$)	(LDH release value, A)
control	8	0.50 $\pm$ 0.06	52.89 $\pm$ 13.29	0.34 $\pm$ 0.02
drug treat	8	0.68 $\pm$ 0.06*	50.17 $\pm$ 10.95	0.27 $\pm$ 0.01*

注: 与各纵列对照组比较 *P< 0.05

(note: compare with control of each lengthways list *P< 0.05)

2.3 N 组细胞活性及条件培养液蛋白含量的时效特征

通络救脑注射液作用于正常组细胞后, 从时效关系角度初步分析了 5 个时间点的培养液总蛋白分泌量及 LDH 释放量, 并同步测定其细胞活性, 汇总结果如表 3. 所示。给药组与对照组同时时间点比较, 总蛋白含量在 1h 与 24h 两时间点均表现出显著性差异(P< 0.01), 细胞活性及 LDH 释放量未见统计学意义。

分析细胞活性的时效关系, 给药组与对照组总趋势基本一致, 随着时间增加细胞活性呈下降趋势。表现为 1h 后明显

降低(P< 0.01), 1h 至 6h 处于平台期, 6h 到 12h 阶段再次明显下降(P< 0.01), 12h 至 24h 再呈缓慢下降趋势。培养液总蛋白含量分析显示, 给药组与对照组均为早期 1 h 内蛋白分泌量最少, 3h 后快速上升达高峰(P< 0.01), 3h 至 12h 缓慢下降, 对照组 12h 到 24h 持平, 而给药组 24h 明显减少(P< 0.01)。培养液 LDH 释放活性的时效关系表明, 随着时间延长 LDH 释放量由缓慢至快速增加, 对照组与给药组总趋势基本一致。1h 至 6h 基本处于平台期, 6h 到 12h 缓慢增加(P< 0.05), 12h 至 24h 快速增加(P< 0.01)。

表3 N 组细胞活性及条件培养液的总蛋白、LDH 时效关系($\bar{X} \pm s$)

(Table 3 in normal cells group, time- effects relationship of cellular activity, extracellular total protein quantity and LDH release value respectively, $\bar{X} \pm s$)

		细胞活性		总蛋白		LDH 活性	
		(cellular activity, od)		(total protein, μg/mL)		(LDH release value, A)	
n		对照组	给药组	对照组	给药组	对照组	给药组
		(control)	(drug treat)	(control)	(dng treat)	(control)	(drug treat)
0 h	8	0.89±0.13 ^{☆☆}	0.99±0.17 ^{☆☆}	---	---	---	---
1 h	8	0.58±0.13 ^{★★}	0.47±0.17 ^{★★}	77.65±19.37 ^{☆☆}	96.03±16.04 ^{☆☆▲}	0.27±0.03	0.29±0.02
3 h	8	0.61±0.14	0.57±0.09	221.47±25.93 ^{★★☆}	196.03±26.77 ^{★★}	0.27±0.02	0.27±0.03
6 h	8	0.52±0.09 ^{☆☆}	0.58±0.07 ^{☆☆}	203.82±23.17 [☆]	188.53±23.39	0.26±0.03 [☆]	0.30±0.11 [☆]
12h	8	0.32±0.09 ^{★★}	0.37±0.12 ^{★★}	183.97±25.19 [★]	178.38±21.65 [☆]	0.34±0.05 ^{★★☆☆}	0.33±0.02 ^{★★☆☆}
24h	8	0.33±0.08	0.33±0.06	183.09±20.18	144.85±24.6 ^{★▲}	0.53±0.13 ^{★★}	0.50±0.17 ^{★★}

注: 与同组相邻前一时间点比较 *P< 0.05, **P< 0.01; 与同组相邻后一时间点比较 *P< 0.05, **P< 0.01; 与对照组同时时间点比较 *P< 0.01

(note: compare with the nearest pre- time point of each lengthways list *P< 0.05, **P< 0.01; compare with the nearest post- time point of each lengthways list *P< 0.05, **P< 0.01; compare with control of each assay in same time point respectively ▲P< 0.01)

2.4 Is 组细胞活性及条件培养液蛋白含量的时效性分析

通络救脑注射液作用于缺血组细胞后, 其条件培养液的时效关系如表 4. 所示。细胞活性表现为给药组与对照组总趋势基本一致, 表现为 1h 后明显抑制(P< 0.01), 1h 至 3h 处于平台期, 3h 到 12h 阶段再次明显下降(P< 0.01, P< 0.05), 12h 至 24h 有所回升, 以给药组回升更显著(P< 0.01)。拟缺血条

件培养液总蛋白含量各时间点明显低于正常组, 表现为给药组与对照组均为早期 1 h 内蛋白分泌量很少, 到 6h 含量有所上升(P< 0.05), 12h 后又有所下降(P< 0.05), 24h 又反弹回升(P< 0.05)。培养液 LDH 释放活性的时效关系表明, 对照组与给药组总趋势亦基本一致, 1h 至 3h 基本处于平台期, 6h 反而有所下降(P< 0.05), 6h 至 24h 逐渐升高(P< 0.05, P< 0.01)。

表4 Is 组细胞活性及条件培养液的总蛋白、LDH 时效关系($\bar{X} \pm s$)

(Table 3 in ischemic cells group, time- effects relationship of cellular activity, extracellular total protein quantity and LDH release value respectively, $\bar{X} \pm s$)

		细胞活性		总蛋白		LDH 活性	
		(cellular activity, od)		(total protein, μg/mL)		(LDH release value, A)	
n		对照组	给药组	对照组	给药组	对照组	给药组
		(control)	(drug treat)	(control)	(dng treat)	(control)	(drug treat)
0 h	8	0.50±0.06 ^{☆☆}	0.68±0.06 ^{☆☆▲}	52.89±13.3	50.17±10.95	0.34±0.02	0.27±0.01 [▲]
1 h	8	0.28±0.08 ^{★★}	0.32±0.06 ^{★★☆}	15.83±6.81	16.48±9.3	0.31±0.03	0.31±0.02
3 h	8	0.26±0.06 [☆]	0.28±0.05 ^{★☆}	16.70±6.98	27.57±10.16	0.30±0.04	0.33±0.04 [☆]
6 h	8	0.18±0.03 ^{★☆}	0.18±0.06 [★]	36.80±7.31 [☆]	54.41±13.76 [☆]	0.28±0.02 [☆]	0.25±0.02 ^{★☆☆}
12h	8	0.10±0.02 ^{★☆}	0.12±0.03 [☆]	8.54±2.70 ^{★☆☆}	9.74±3.04 [★]	0.35±0.02 [★]	0.37±0.02 ^{★☆☆}
24h	8	35.50±8.99 [★]	28.54±7.13	0.15±0.04 [★]	0.19±0.03 [★]	0.39±0.04	0.44±0.05 [★]

注: 与同组相邻前一时间点比较 *P< 0.05, **P< 0.01; 与同组相邻后一时间点比较 *P< 0.05, **P< 0.01; 与对照组同时时间点比较 *P< 0.01

(note: compare with the nearest pre- time point of each lengthways list *P< 0.05, **P< 0.01; compare with the nearest post- time point of each lengthways list *P< 0.05, **P< 0.01; compare with control of each assay in same time point respectively ▲P< 0.01)

3 讨论

本实验再次验证了通络救脑注射液对拟缺血脑微血管内皮细胞的保护效应^[3],从细胞活性增高及LDH漏出减少两方面进一步肯定了通络救脑注射液对拟缺血细胞具有保护作用;并探讨不同时间点的细胞条件培养液的总蛋白含量与细胞活性的关系,选择相对高分泌量时间点的条件培养液收集可作为下一步研究目标。由于瞬时总蛋白含量的多少并不能反映出瞬时的蛋白活性,辅佐瞬时的细胞活性检测,有助于我们初步推测内皮细胞分泌的可溶性因子的可能生物学效应。细胞增殖活性采用了MTS/PMS法,MTS是MTT的一种新型类似物,它与MTT的应用原理基本相同,反映了活细胞线粒体功能。其在PMS存在的情况下可被活细胞的酶还原,形成水溶性的产物,可用酶标仪在波长490nm~570nm范围检测。作者以前用过MTT法,此次改用MTS法,基于MTS法有更多的优点^[4,5]。尤其不需有机溶剂溶解后再显色,反应后直接上机检测,若培养板其余孔还有未检测细胞,保持无菌后仍可以继续培养,方便了实际操作。LDH释放量测定的是在细胞坏死时释放于上清的一种稳定的胞质酶(LDH),若LDH释放量增多,提示细胞受损严重,同时亦增加了上清的总蛋白量。故仅仅单纯总蛋白量的多少,绝不是我们要研究探索的最终目标,更要考虑到这些可溶性细胞因子是否为内皮细胞损伤后产生的负效应因子,还是药物干预后内皮分泌的进一步的调节性细胞因子。

内皮细胞可以产生多种活性物质作用于细胞本身和其它细胞,细胞因子应是主要的活性物质之一,和相应的细胞受体结合,而对细胞的活动施加影响。实验检测了不同时间点可溶性总蛋白含量的变化特征,结合细胞活性与LDH释放量的变化,为可溶性蛋白进一步的深入研究提供了有意义的信息。正常组分泌总蛋白量3h达到高峰,此时细胞活性尚佳,LDH释放量亦少,随后总蛋白量缓慢下降,活性有所降低,LDH释放量在6h前处于平台期随后增加。拟缺血组分泌总蛋白量是6h达到高峰而后快速下降到24h时又有所回升,这时细胞的活性明显下降,LDH释放量亦显著增加,提示回升的原因更可能是进一步坏死时细胞自溶而产生的蛋白过度释放。拟缺血组在6h处LDH释放量最少,但细胞活性与3h比较有所下降,体现出3h至6h细胞处于活跃阶段。综合评价本实验的结果,以3h至6h的细胞条件培养液做为收集目标是研究条件液的最佳时间段。这与其它细胞条件培养液的研究者收集多为24h或48h有所不同^[6,7],作者理解为内皮细胞是相对比较脆弱的细胞,对血清的依赖性相对较强,在无血清培养液维持过程中,时间过长易导致不同程度的损伤,负面效应会增加。故研究早期的内皮细胞条件培养液,其生物学效应可能会更佳。

本实验拟缺血组细胞各个时间点的上清总蛋白量都明显低于正常组,考虑细胞氧糖剥夺导致拟缺血损伤,细胞活性远不如正常组细胞,其代谢及蛋白表达情况自然会有质与量的差异。纵观三个指标药物干预组与无干预对照组的条件培养液比较无统计学意义,无论是正常还是拟缺血组,其总的规律如平台期或是高峰期基本一致。一般来说,细胞合成和分泌活性因子是细胞受刺激后出现的短暂过程,一旦刺激停止,合成和分泌即终止^[8]。但又由于细胞因子间存在着负反馈或正反馈的连锁反应,即使持续刺激存在,某些瞬时表达的因子可

能不再分泌,或是停止了刺激仍然持续分泌。本实验观察的细胞条件培养液,可以说是不同状态的细胞的后续效应。因为受到培养液里含有血清及其他因子的干扰,限制了即时效应的研究,除非采用严格控制条件的无血清培养,增加了现阶段实验的可行性难度。而正常细胞与拟缺血细胞的“条件培养液”研究本身又具双重身份的效应,既是正常组或拟缺血组的条件培养液,但对于正常组来说,由于条件培养液不能含血清的干扰,所以撤离血清及促进细胞增殖的EGCs等,亦等于轻度的拟缺血效应^[9];对于拟缺血组来讲,由氧糖剥夺的Krebs溶液换上DMEM培养液,又相当于拟缺血组的再灌,增加了实验分析的复杂性,但对进一步研究工作的完善提供了积极启示。本实验的条件培养液反映的是不同状态的细胞的后续效应,在此阶段药物的后续效应并不明显。

研究报道内皮细胞具有强大的分泌功能^[10],探索已知的、未知的、好的、坏的脑微血管内皮细胞的功能机制具有重要意义。脑缺血损伤是众多脑系疾病的共同病理过程,阐明疾病的分子和细胞机制及药物作用的靶标,发展寻找新药的新理论、新技术、新方法,相信会为治疗脑系疾病的中药现代化研究提供新的思路。就中医而言,以毒邪和络病作为深入研究的切入点,是进一步提高脑血管疾病疗效的突破口所在^[11]。目前,国内外许多学者已注意到微循环局部与整体全过程的联系,提出血管内皮细胞是某些致病因素的靶点^[12]。我们以脑微血管内皮细胞为切入点,逐步诠释通络救脑注射液“解毒通络”的作用机制,探索药物的有效“靶标”分子,对于深化“毒损络”病机理论内涵具有重要意义。

参考文献

- [1] 史以菊,聂恒环,邢国庆,等.三七皂甙对大脑中动脉栓塞性缺血的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2000,5(2):150-153
- [2] 李澎涛,王永炎,黄启福.“毒损络”病机假说的形成及其理论与实践意义[J].北京中医药大学学报,2001,24(1):1-6+16
- [3] 青雪梅,李卫红,侯金才,等.通络救脑注射液对脑微血管内皮细胞活性影响的特征[J].现代生物医学进展,2006,6(2):15-18
- [4] 王一飞,刘新建,张美英,等.MTS/PMS法检测细胞药物敏感性[J].中国卫生检验杂志,2003,13(2):146-147
- [5] 叶萍,李燕,谷淑燕.MTS和MTT法检测小鼠NK及特异性细胞毒性T细胞活性的比较[J].中华实验和临床病毒学杂志,1998,12(1):85-86
- [6] 宋岳涛,唐一鹏,洪庆涛.星形胶质细胞正常条件培养液对体外脑缺氧/复氧损伤神经元的影响[J].中国病理生理杂志,2004,20(5):870-873
- [7] 那晓东,王绮如.小鼠骨髓内皮细胞条件培养液复合FL及TPO对HPP2CFC及CFU2GM增殖的影响[J].生理学报,2001,53(4):316-320
- [8] 孙卫民,王惠琴.细胞因子研究方法学[M].人民卫生出版社,1999:5-6
- [9] 严华,张永祥,黄璐琦,等.清开灵及有效成分对培养大鼠缺血损伤神经胶质细胞分泌NGF的影响[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(2):31-33
- [10] 郭南山.内皮功能研究进展[J].广东医学,2001,22(11):990-992
- [11] 王永炎.关于提高脑血管疾病疗效难点的思考[J].中国中西医结合杂志,1997,17(4):195-196
- [12] 雷燕,王永炎,黄启福.络病理论探微[J].北京中医药大学学报,1998,21(2):18-23+72