

- 153-155.
- [3] 谢梅林,顾振纶,陈可冀,等.力平脂对兔粥样硬化血管壁组织内皮素-1和一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响[J].中国药理学报,2000,21(5): 473-476.
- [4] 王成彬,田亚平,沈文梅,等.大鼠脑组织中一氧化氮合酶测定[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(6): 548-550.
- [5] Cadman E, Bostwick J R, Eichberg J. Determination of protein by a modified Lowry procedure in the presence of some commonly used detergents [J]. Anal Biochem, 1979, 96 21-23.
- [6] 汤健,唐朝枢.心肺内分泌学[M].北京:北京科学技术出版社,1991.
- [7] Lerman A, Edwards B S, Hallett W, *et al.* Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis [J]. N Engl J Med, 1991, 325 997-1001.
- [8] Saijonmaa O, Ristimäki A, Fyhrquist F. Atrial natriuretic peptide, nitroglycerine, and nitroprusside reduce basal and stimulated endothelin production from cultured endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 173 514-520.
- [9] 谢梅林,顾振纶,钟蓓,等.消痰片治疗颈动脉粥样硬化的疗效观察[J].中成药,1999,21(10): 515-518.

活血化瘀注射液对急性重型胰腺炎 大鼠肺内皮细胞粘附分子表达的影响

张艳军¹,赵连根¹,吴咸中²

(1. 天津中医学院 中药系,天津 300193; 2. 天津市中西医结合急腹症研究所,天津 300100)

摘要:目的 研究急性重型胰腺炎(SAP)大鼠胰腺、肺内皮细胞粘附分子 ICAM-1 P选择素、E选择素的动态变化,并观察活血化瘀注射液(HHI-I)的作用。方法 应用胆胰管内逆行注射牛磺酸钠的方法引起大鼠 SAP,将实验动物随机分为假手术对照组、SAP模型组、SAP+ HHI-I组、SAP+ 复方丹参注射液组,利用免疫组织化学方法观察了 SAP大鼠 1,3,6,12,24 h胰腺、肺内皮细胞粘附分子 ICAM-1 P选择素、E选择素的表达情况。结果 SAP后肺 ICAM-1 P选择素、E选择素表达明显增多,HHI-I能够有效抑制粘附分子的过度表达。结论 粘附分子在 SAP发展过程中起重要作用,HHI-I通过抑制粘附分子的过度表达,从而影响白细胞内皮细胞的相互作用,减少白细胞在组织募集,发挥其对胰外脏器的保护作用。

关键词:急性重型胰腺炎(SAP);粘附分子;活血化瘀注射液(HHI-I)

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)11-1010-03

Affect of HUOXUE HUAYU INJECTION in expression of adhesive molecular of intrapulmonic endothelial cell of rats suffered from SAP

ZHANG Yan-jun¹, ZHAO Lian-gen², WU Xian-zhong²

(Department of Chinese Materia Medica, Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China)

Key words SAP; adhesive molecular; HUOXUE HUAYU INJECTION (HHI-I)

以往的研究表明,活血化瘀注射液(HHI-I)可改善犬肠、胰腺血液的动力学^[1,2],并证实与抑酶注射液(YHI)合用能延长急性重型胰腺炎(SAP)家兔存活时间,提高存活率^[3]。我们推测可能对SAP病理生理过程中白细胞内皮细胞相互作用有影响。HHI-I可抑制SAP大鼠白细胞在肠系膜毛细血管后静脉的滚动、粘附^[4]。已知白细胞与内皮细胞粘附以及经内皮迁移需要粘附分子的表达,因此,我们研究了实验性SAP大鼠病理生理过程中胰腺、肺内皮细胞表面粘附分子表达状况以及HHI-I对细胞表面粘附分子的表达作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:健康 Wistar大鼠(购于军事医学科学院四所)160只,体重220~300g,雌雄各半。适应环境1周后开始实验。将实验动物随机分为假手术对照组($n=10$),SAP模型组($n=50$),SAP+ HHI-I组($n=50$),SAP+ 复方丹参注射液组($n=50$),后3组又分为1,3,6,12,24 h亚组,每亚组10只。

1.2 试剂和药物: P选择素、E选择素、ICAM-1山羊抗鼠多克隆抗体(一抗, Santa Cruz公司);生物素化兔抗山羊 IgG (二抗, Vector公司),辣根酶标记

收稿日期: 2001-03-04

基金项目: 天津市卫生局科研基金资助课题(98KY-9)

作者简介: 张艳军(1967-),男,2000年6月天津医科大学中西医结合专业博士研究生毕业,主要从事活血化瘀中药作用机制研究,发表论文10余篇,获天津市科技进步三等奖2项。Tel: 27486658 转 1086

链亲合素(三抗, Vector公司); OCT包埋剂 DAB 封闭用兔血清工作液(北京中山公司); Tris 30% 过氧化氢(中国医科院血研所科技公司;牛磺胆酸钠 (Sigma公司)。HHI-I由南开医院药厂制备。复方丹参注射液由上海第一生化制药公司生产,批号 971002

1.3 检测指标:免疫组织化学方法检测各组动物胰腺、肺组织 P选择素 E选择素 ICAM-1 的表达肺组织 P选择素 E选择素 ICAM-1 的表达按下列分级方法进行半定量分析:+++ ,整个视野大量内皮细胞广泛强阳性表达;+ + ,阳性内皮细胞比较多,介于+++ 与+ 之间;+ ,散在阳性内皮细胞;- ,没有表达 40× 10 视野下每一切片随机观察 5 个视野,记录每组动物各级视野数目。

1.4 实验方案:实验前禁食 1 夜。将大鼠以 20% 乌拉坦 0.5 mL/kg 体重麻醉。无菌条件下进行手术,右颈静脉插管 (PE50 医用塑料管,内径 0.5 mm,外径 0.8 mm,日本夏目制作所制),以备输液用。继之开腹,其中 SAP 组 SAP+ HHI-I 组 SAP+ 丹参组结扎大鼠总胆管,经十二指肠乳头将 PE50 医用塑料管插入胆胰管 0.5 cm,逆行注入 5% 牛磺胆酸钠溶液,0.1 mL/100 g·min,复制 SAP 模型,注射完毕后松开结扎胆总管的丝线。随即用微量蠕动泵分别经颈静脉插管输入生理盐水 HHI-I 和复方丹参注射液,2 mL/h,给药剂量按 60 kg 成人每 kg 体重剂量的 15 倍换算 各亚组分别

于 1, 3, 6, 12, 24 h 颈椎脱臼处死。假手术组不复制 SAP 模型,仅经颈静脉输入生理盐水,12 h 后颈椎脱臼处死,取胰腺、肺, OCT 包埋,液氮冷冻 30 s, - 25℃ 保存,以备免疫组织化学检测

1.5 免疫组织化学检测:将 OCT 包埋的组织做 8 μm 的冰冻切片,4℃ 冷丙酮固定后, - 25℃ 保存,以备免疫组织化学染色。过程如下:切片恢复室温后, TAB (0.05 mol/L pH7.4) 洗 2 次 (2× 5 min),以含 0.3% 过氧化氢的 TAB 室温孵育 20~ 30 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;蒸馏水冲洗, TAB 洗 2 次 (2× 5 min); 5% 正常兔血清 (TBS 稀释) 封闭,室温湿盒内孵育 30 min;倾去血清,分别滴加适当比例稀释 (1: 50~ 200, TAB 稀释) 的一抗,4℃ 湿盒内过夜; TAB 洗 3 次 (3× 5 min),滴加适当比例稀释 (1: 100, TAB 稀释) 的二抗,室温湿盒内孵育 1 h; TAB 洗 3 次 (3× 5 min),滴加适当比例稀释 (1: 100, TAB 稀释) 的三抗,室温湿盒内孵育 1 h; TAB 洗 3 次 (3× 5 min), DAB 显色;自来水充分冲洗,复染,封片。

1.6 统计学处理: Ridit 分析。

2 结果

2.1 各组肺组织粘附分子表达情况:见表 1~ 3

假手术组 ICAM-1 P选择素、E选择素仅少量表达于肺微血管内皮细胞、肺泡壁上细胞,表达呈弱阳性。

SAP 组 1 h 肺组织 ICAM-1 表达即明显增强,

表 1 各组动物肺组织 ICAM-1 表达情况 (视野数)

组别	1 h				3 h				6 h				12 h				24 h			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-
假手术													0	0	21	9				
SAP	0	25	5	0	9	21	0	0	20	10	0	0	23	7	0	0	20	10	0	0
SAP+ 复方丹参	0	16	14	0	6	23	1	0	18	12	0	0	19	11	0	0	17	13	0	0
SAP+ HHI-I	0	0	14	16	0	0	13	17	0	0	25	5	0	2	28	0	0	0	18	12

表 2 各组动物肺组织 E-选择素表达情况 (视野数)

组别	1 h				3 h				6 h				12 h				24 h			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-
假手术													0	0	11	19				
SAP	1	13	15	1	15	13	2	0	26	4	0	0	8	20	2	0	1	18	11	0
SAP+ 复方丹参	1	14	13	2	13	13	4	0	23	4	3	0	14	9	7	0	1	12	17	0
SAP+ HHI-I	0	0	6	24	0	0	10	20	0	0	22	8	0	0	25	5	0	0	22	8

表 3 各组动物肺组织 P-选择素表达情况 (视野数)

组别	1 h				3 h				6 h				12 h				24 h			
	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-	+++	++	+	-
假手术													0	0	16	14				
SAP	2	16	8	4	13	15	2	0	26	3	1	0	19	7	4	0	12	10	6	2
SAP+ 复方丹参	1	13	9	7	12	14	4	0	24	4	2	0	17	6	7	0	12	9	4	5
SAP+ HHI-I	0	0	4	26	0	0	9	21	0	0	25	5	0	0	24	6	0	0	19	11

与假手术组相比,有显著性差异 ($P < 0.01$),以后表达逐渐增强,6~12 h达高峰,1~3,3~6 h时间段之间相比,有显著或非常显著性差异 ($P < 0.05$ 或 0.01),24 h仍维持较高水平,与12 h相比没有显著性差异 ($P > 0.05$)。广泛表达于肺微血管内皮细胞、肺泡壁上皮细胞,表达呈强阳性。SAP⁺ 复方丹参组表达趋势与SAP组没有显著性差异;SAP⁺ HHI-I组 ICAM-1表达与SAP组、SAP⁺ 复方丹参组相比显著减少,接近假手术组,甚至有比假手术组低的趋势。

SAP组 1 h肺组织 P选择素表达即明显增强,与假手术组相比有显著性差异 ($P < 0.01$),以后表达逐渐增强,6~12 h达高峰,1~3,3~6 h时间段之间相比,有显著或非常显著性差异 ($P < 0.05$ 或 0.01),广泛表达于肺微血管内皮细胞、肺泡壁上皮细胞,表达呈强阳性。12~24 h逐渐降低 ($P < 0.05$),但24 h时仍有较高水平表达。SAP⁺ 复方丹参组表达趋势与SAP组没有显著性差异;SAP⁺ HHI-I组 P选择素表达与SAP组、SAP⁺ 复方丹参组相比显著减少,接近假手术组。

SAP组 1 h肺组织 E选择素表达即明显增强,与假手术组相比有显著性差异 ($P < 0.01$),以后表达逐渐增强,6 h达高峰,1~3,3~6 h时间段之间相比,有显著或非常显著性差异 ($P < 0.05$ 或 0.01),广泛表达于肺微血管内皮细胞、肺泡壁上皮细胞和小肠粘膜下微血管内皮细胞,表达呈强阳性。6~24 h逐渐降低,24 h时已接近基础水平,相邻2个时间段相比,有显著或非常显著性差异 ($P < 0.05$ 或 0.01)。SAP⁺ 复方丹参组表达趋势与SAP组没有显著性差异;SAP⁺ HHI-I组 E选择素表达与SAP组、SAP⁺ 复方丹参组相比显著减少,接近假手术组。

2.2 胰腺组织未检测出,原因待查

3 讨论

白细胞内皮细胞粘附是白细胞向炎症部位募集并造成组织损伤的关键步骤,白细胞和内皮细胞表面表达的粘附分子是白细胞粘附到血管内皮细胞以及白细胞跨内皮移行到炎症部位的分子基础。这一过程是一多步级联过程^[5],最初表现为不牢固的粘附 (weak adhesion),然后引起白细胞沿着血管内皮滚动 (rolling),随即这些粘附力量进一步强化,白细胞牢固粘附在内皮细胞表面 (firm adhesion),最后白细胞通过相邻的内皮细胞间隔游出到间质组织。这一过程被白细胞、内皮细胞表面表达的不同家

族的粘附分子的连续活化所调节,主要包括选择素家族、整合素家族和免疫球蛋白超家族。

SAP所至胰外脏器损害的共同特征是受损脏器中有大量的中性粒细胞浸润,粘附分子在SAP病理生理过程中的作用日益得到重视,抗粘附分子治疗将为SAP及其并发症的治疗和预防提供新的有力手段。粘附分子单克隆抗体的保护作用已在一些炎症反应、免疫反应和缺血再灌注损伤中被观察到。然而粘附分子单克隆抗体可能完全阻断宿主防御机制,使宿主易于感染,导致临床上出现与白细胞粘附缺陷病人相类似的情况,已有很多文献报道了这种危险因素。另外,由于许多粘附分子以不同方式参与了白细胞与内皮细胞的粘附过程,因此很难用阻断一种粘附分子的方法去阻断炎症反应。应用单克隆抗体抗粘附分子至今还不能作为药物用于治疗 and 预防SIRS及MOF病人。由于白细胞内皮细胞过度粘附可导致明显的微循环障碍,基于现代医学对中医血瘀和血瘀证的大量研究,血瘀证的主要病理基础是微循环障碍,血瘀与现代医学的微循环障碍症,以及活血化瘀疗效与现代医学微循环障碍的改善关系密切。所以,抗白细胞内皮细胞过度粘附可能为活血化瘀中药的作用机制之一,活血化瘀中药可能对白细胞内皮细胞过度粘附有调节作用。HHI-I是我们临床治疗SAP有效方剂中的活血化瘀药,通过正交设计,筛选出最有效药物组分,制成的静脉注射剂,主要由桃仁、赤芍等提取物组成,以往研究表明,HHI-I可抑制急性重型胰腺炎大鼠白细胞在肠系膜毛细血管后静脉的滚动、粘附。本研究结果表明,HHI-I能够抑制SAP病理生理过程中粘附分子P-选择素、E选择素和ICAM-1的过度表达,提示HHI-I通过抑制粘附分子的过度表达从而抑制白细胞内皮细胞的过度粘附,显示出良好的应用前景。

本实验没能检测出胰腺组织粘附分子的表达,可能由于胰酶含量过高的缘故,有待今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵连根,张虹,孟青竹,等. 活血化瘀注射液对犬小肠血液动力学的影响[J]. 中西医结合杂志,1989,9(12): 731-733.
- [2] 赵连根,高淑娟,陈玉玲,等. 活血化瘀注射液对犬胰腺血液动力学的影响[J]. 中草药,1993,(3): 140-142.
- [3] 赵连根,伍孝先,韩恩垠,Y.HI及HHI-I对家兔实验性急性胰腺炎的保护作用[J]. 中国中西医结合外科杂志,1997,3(5): 301-305.
- [4] 赵连根,张艳军,陈玉玲,等. 活血化瘀注射液对急性胰腺炎大鼠肠系膜活体微循环的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志,2001,7(1): 18-20.
- [5] Panes J, Granger D N. Leukocyte-endothelial cell interaction: molecular mechanisms and implication in gastrointestinal disease[J]. Gastroenterol, 1998, 114(5): 1066-1090.