

当归补血汤对组胺引起的血管内皮细胞单层通透性增高的作用

上海中医药大学中药研究所(200032) 胡之璧* 樊懿 韩之芬** 吴大正 宋纯清

摘要 从新生牛主动脉分离获得单个内皮细胞,培养于微孔滤膜上直至形成致密单层。通过灌流 hanks 液或含 5 g/L 白蛋白的 hanks 液后,测定经 10^{-4} mol/L 组胺溶液处理或经 10^{-4} mol/L 组胺溶液加 10^{-4} g/mL 当归补血汤处理的液体滤过系数 (K_f)、液体滤过流量 (J_v) 和蛋白质渗透压反射系数 (σ)。结果表明内皮单层经组胺处理后, K_f 和 J_v 降低, σ 升高;而当归补血汤能够抑制因组胺造成的 K_f 和 J_v 降低,以及 σ 升高。说明组胺能够引起血管内皮单层通透性的增加,而当归补血汤能够减轻组胺造成的内皮单层通透性的增加;其作用机制需进一步研究。

关键词 当归补血汤 组胺 内皮单层 通透性

Influence of Blood Replenishing Angelica Decoction on Enhanced Endothelial Permeability Induced by Histamine

Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM (Shanghai 200032) Hu Zhibi, Fan Yi, Han Zhifen, Wu Dazheng and Song Chunqing

Abstract Blood Replenishing Angelica Decoction [Danggui Buxue Tang (DGBXT)] is a well known TCM prescription composed of *Radix Angelicae Sinensis* and *Radix Astragali* with the actions of invigorating "Qi" and enriching blood. Its action to curtail endothelial permeability induced by histamine was studied. Endothelial cells isolated from the aorta of neonatal calf were cultured on polycarbonate microporous filter membrane to develop a confluent endothelial monolayer. After perfused with either plain Hank's balanced salt solution or that containing 5 g/L albumin, the monolayer was treated with 10^{-4} mol/L histamine for 30 min either with or without preincubation for 60 min with 10^{-4} g/mL of DGBXT. Fluid filtration coefficient (K_f), filtration volume (J_v) and osmotic reflective coefficient (σ) of protein were then measured. The findings showed that DGBXT could curtail the lowering of K_f and J_v and elevation of σ induced by histamine, indicating that DGBXT could inhibit the action of histamine on endothelial permeability, but its mechanism of action needs further study.

Key words Danggui Buxue Tang (DGBXT) (Blood Replenishing Angelica Decoction) histamine endothelial monolayer permeability

当归补血汤是经典的补气生血代表方,由黄芪和当归两味中药组成。目前我国对该方的两味中药进行了较为深入的化学成分和药理、药效的研究,认为当归补血汤“补气生血”药效环节主要在于促进机体免疫功能,改善血象(血虚)、刺激骨髓造血机能等^[1-3]。上述机制还不能完全阐明当归补血汤“补气生血”的内涵。长期血虚能引起机体免疫功能的低下,使体内许多非感染性炎症介质如组胺、白三烯、缓激肽、5-羟色胺等释放,导致血管通透性和细胞通透性的增加,进一步加重血虚的程度。当归补血汤潜在的功能有可能通过抑制血虚时血管内皮炎症介质的释放,改善血管内皮的通透性,维持机体的内环境稳定。为此,本实验应用血管内皮细胞单层通透性测

量方法,观察当归补血汤对组胺造成的血管内皮细胞单层通透性增高的作用。

1 材料与方法:

1.1 材料和仪器:

新生小牛主动脉(上海动物园); M199 培养基(Gibco); 胰蛋白酶(Serva); EDTA(Amresco); 胎牛血清(华美生物工程公司); 青霉素(苏州第二制药厂); 链霉素(上海四药公司); 白蛋白(Sigma); 考马氏亮蓝 G-250(Amresco); 混合纤维素微孔滤膜(上海医药工业研究院); 针式滤器(Ann Arbor Mich); Uvikon 810 分光光度计(日本、岛津), 实验中所用的当归补血汤由我所中药化学研究室提供,按原方剂量的 250 倍浓缩提取,每毫升相当于生药 30 mg

* Address: Hu Zhibi, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of TCM, Shanghai

胡之璧,女,64岁,研究员,博士生导师,中国工程院院士,德国理学博士,中药研究所所长,国家有突出贡献的细胞生物学家,学术专长为生药学、植物化学和生物工程学。已发表论文 30 多篇,论著多部,8 次获国家级、部级和市级科研成果奖。

** 本校基础医学院机能综合实验室

1.2 细胞的培养与接种

1.2.1 内皮细胞 (endothelial cells, EC) 分离与传代^[4]: 新生小牛经放血、处死后, 取长约 10 cm 的降主动脉, 快速置于 4℃ 无钙、镁的 hanks 液 (D-HBS 液) 中。3 h 内用 D-HBS 液洗净血液, 剥离血管外结缔组织, 结扎动脉下端及翻出动脉内面, 移入含 0.25% 胰蛋白酶、0.025% EDTA 的 D-HBS 液中。在 37℃ 下消化 10~15 min, 用 M199 液 (含 20% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素) 终止消化, 通过离心机以 100 g 离心力离心 10~15 min, 弃上清液, 获得 EC 换上新鲜的 M199 液中进行接种, 接种密度为 5×10^4 /mL, 接种后置于 5% CO₂ 培养箱中培养。在接种后 6~8 h 内吸去悬浮的 EC, 加入新鲜的 M199 培养液, 每 2 天换液一次。培养 1 周后, 用 D-HBS 液将细胞洗涤 2 次并在含 0.25% 胰蛋白酶、0.025% EDTA 的 D-HBS 液中进行消化, 以 1:2 传代率进行传代, 选用第 2~3 代细胞进行实验。

1.2.2 微孔滤膜的处理和接种^[5]: 将微孔滤膜 (混合醋酸纤维滤膜, 直径 25 mm 孔径 0.45 μm) 浸入 50℃、0.5% 醋酸 20 min, 用 25℃ 蒸馏水冲洗 2 遍, 加入 0.5 g/L 明胶, 在 50℃ 下孵育 60 min, 取出烘干, 经高压蒸汽消毒后备用。处理后的滤膜置于直径 30 mm 的培养皿中, 用 2% 明胶粘贴于内底面, 置于超净台上, 室温下干燥 3~4 h 致密生长在 50 mL 培养瓶内的 EC 经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 接种在 2 张滤膜上。接种密度约为 2×10^5 /cm², 8~10 d 后在滤膜上形成致密 EC 单层可用于实验。

1.3 实验分组: 实验前, 先将空白滤膜 (不含内皮) 漂洗后均匀涂敷小牛血清, 置入滤器中, 测定其背景的通透性。

对照组: 将接种在滤膜上的 EC 单层置于正常的 HBS 液中孵育 30 min, 置入滤器测定其正常通透性。

组胺组: 将接种在滤膜上的 EC 单层置于含 10⁻⁴ g/mL 组胺的 HBS 液中孵育 30 min, 置入滤器测定通透性的变化。

当归补血汤组: 将接种在滤膜上的 EC 单层置于含 10⁻⁴ g/mL 当归补血汤的 HBS 液中孵育 30 min 后, 加入 10⁻⁴ g/mL 组胺刺激 30 min, 置入滤器测定通透性的变化。

1.4 EC 单层膜通透性测量^[6]: 将处理过的含 EC 单层的滤膜装入针式滤器, 上腔加 HBS 液和 或含白蛋白 (5 g/L) 的 HBS 液灌注, 维持液体的高度

(H) 为 25 cm 灌注时先平衡 5 min, 而后收集 5~10 min 液体, 计量体积 (重量法, 设 ρ=1) 和蛋白浓度 (考马氏亮蓝法)。

渗透压反射系数 σ 按以下公式计算:

$$\sigma = 1 - C_F / C_P$$

σ 根据蛋白浓度算出, C_F 与 C_P 分别是上下腔收集液中白蛋白的浓度。

滤过系数 K_f 按以下公式计算:

$$K_f = J_v / (\Delta P - \sigma \Delta \pi)$$

K_f (μL/min · cm² · kPa) 根据灌注液体积算出, J_v 为通过内皮单层流量 (μL/min · cm²), ΔP 为灌注压 (设 ΔP=2.45 kPa), σ 为渗透压反射系数, Δπ 为胶体渗透压差。胶体渗透压差根据 Von Hoff 定律进行计算: π (kPa) = C (mosm/L) · 2.6 (kPa · L/mosm), 其中 C 为蛋白毫渗量浓度。

2 结果

2.1 EC 单层经 HBS 液灌注所测的对照 K_f 值为 (10.40 ± 0.91) μL/min · cm² · kPa, J_v 值为 (25.48 ± 2.24) μL/min · cm² (n=5) (表 1)。EC 单层经 100 μg/mL 组胺刺激 30 min 后, 灌注 HBS 液所测的 K_f 和 J_v 值明显升高, 说明组胺能够明显增加 EC 单层对液体和小分子物质的通透性。当 EC 单层在含当归补血汤的 HBS 液中孵育 30 min 后, 加入 100 μg/mL 组胺刺激 30 min, 与单纯应用组胺的比较, K_f 和 J_v 值明显降低, 差异明显 (P < 0.01), 说明当归补血汤对组胺造成的 EC 单层对液体和小分子物质的通透性的增加具有较强的抑制作用。

表 1 当归补血汤对含组胺的 Hanks 灌注液引起的 EC 单层通透性增加的作用 (x̄ ± s)

组别	n	K _f (μL/min · cm ² · kPa)	J _v (μL/min · cm ²)
对照组	5	10.40 ± 0.91	25.48 ± 2.24
组胺组	7	14.87 ± 1.76	36.44 ± 4.32
当归补血汤组	4	12.23 ± 1.48 [△]	29.53 ± 2.06 [△]

与对照组比较: * P < 0.01; 与组胺组比较: △ P < 0.05

2.2 EC 单层经 5 g/L 白蛋白 Hanks 灌注液灌注所测的对照 K_f 值为 (4.62 ± 0.53 μL/min · cm² · kPa), J_v 值为 (11.16 ± 1.11) μL/min · cm², σ 值为 0.52 ± 0.02 (n=5) (表 2)。EC 单层经 100 μg/mL 组胺刺激 30 min 后, 灌注 5 g/L 白蛋白 Hanks 灌注液所测的 K_f 和 J_v 值明显升高, σ 值明显降低。说明组胺能够明显增加 EC 单层对蛋白质和大分子物质的通透性。当 EC 单层置于含当归补血汤的 5 g/L 白蛋白 Hanks 灌注液中孵育 30 min 后, 加入

组胺刺激 30 min,与单纯应用组胺的比较, K_f 和 J_v 值明显降低和 σ 值的明显升高,差异明显 ($P < 0.01$),说明当归补血汤对组胺造成的 EC 单层对蛋

白质和大分子物质的通透性的增加具有较强的抑制作用。

3 讨论

表 2 当归补血汤对含组胺的 5 g/L 白蛋白 Hanks 灌流液引起的 EC 单层通透性增加的作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	K_f	J_v	σ
		($\mu\text{L}/\text{min} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{kPa}$)	($\mu\text{L}/\text{min} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{kPa}$)	
对照组	5	4.62 \pm 0.53	11.16 \pm 1.11	0.52 \pm 0.02
组胺组	7	6.27 \pm 0.82	14.89 \pm 2.18	0.26 \pm 0.04*
当归补血汤组	4	4.53 \pm 0.78 $\Delta\Delta$	11.38 \pm 1.81 Δ	0.38 \pm 0.03 Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与组胺组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

在内皮细胞膜上介导的炎症介质受体有组胺、缓激肽、血小板激活因子 (PAF) 和细胞因子等。当这些受体被激活后,引起内皮细胞的收缩,导致细胞旁路的开放或跨细胞穿透的膜孔径增宽,随之使血管内皮通透性增加^[7]。其通透性增加机制涉及到细胞外 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的内流和细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的释放;信号转导系统的激活,包括 G 蛋白和磷脂酶 C (PLC) 信号、蛋白激酶 (PKC) 和酪氨酸激酶 (TK) 的激活,以及肌球蛋白轻链 (MLC) 的磷酸化和去磷酸化等^[8,9]。近年来,MLC 的磷酸化和去磷酸化的研究倍受重视。细胞外 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的内流和细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的释放以及 MLC 的去磷酸化能够诱导肌动-肌球蛋白间相互作用,中心张力增加,引起细胞骨架的变化和细胞间裂隙形成^[10]。应用 $[\text{Ca}^{2+}]$ 内流阻断剂和外源性 cAMP 能够抑制炎症介质所致的内皮通透性增加^[9]。

本实验采用内皮单层加压灌注装置,精确地定量 Starling 方程中的各个参数 K_f J_v 和 α 。在此, K_f 和 J_v 值反映的是内皮单层对液体和小分子物质的通透性, σ 值反映的是内皮单层对大分子物质的通透性。内皮细胞单层经含组胺的 hanks 液和含组胺的 5 g/L 白蛋白 hanks 液灌流后,对液体和小

分子物质的通透性以及蛋白质和大分子物质的通透性均明显增高。内皮单层经组胺刺激后,应用当归补血汤能够逆转因组胺引起的内皮单层的通透性增加,说明当归补血汤对组胺造成的 EC 单层通透性增加具有改善作用。根据本实验的结果,还不能确定当归补血汤改善内皮单层的通透性的作用机制,进一步的工作将着重研究当归补血汤在抗炎症作用中的细胞和分子机制,特别是对信号转导系统的影响。

参考文献

- 1 周件贵. 时珍国药研究, 1996, 7(4): 250
- 2 康永, 杜晓峰, 许强. 中成药, 1997, 19(12): 38
- 3 张勇, 曹英. 实用中西医结合杂志, 1995, 8(9): 542
- 4 Schwartz S M. In Vitro, 1978, 14: 966
- 5 Postlethwaite A E, Szyderman R, Kang A H. J Exp Med, 1976, 144: 1188
- 6 Cooper J A, Peter J D V, Fred L M, et al. J Appl Physiol, 1987, 62: 1076
- 7 Walter T, Zydi Z, Leszek G, et al. Pflugers Arch, 1995, 430: 145
- 8 Ikeda K, Utoguchi N, Makimoto H, et al. Inflammation, 1999, 23: 87
- 9 Van Nieuw Amerongen G P, Draijer R, Vermeer M A, et al. Circ Res, 1998, 83: 1115
- 10 Rabiet M J, Plantier J L, Rival Y, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996, 16: 488

(2000-01-31收稿)

Studies on the Calcium Antagonist Action of Arctigenin

Liaoning College of TCM (Shenyang 110032) Gao Yang*, Kang Tingguo and Zhang Xiaoyu

Abstract The calcium antagonist action of arctigenin (ACT) was studied in order to verify the effect of *Fructus Arctii* for the relieve of exterior syndrome. Muscular contraction of isolated rat trachea, colon, pulmonary artery and thoracic aorta induced by KCl, that of guinea pig trachea induced by CaCl_2 , before and after the addition of ACT were assessed and their contraction-response curves drawn and PD₂ calculated according to Scott. The inhibition rate of two-phase contraction of guinea pig trachea induced by acetylcholine chloride (Ach) in comparison with verapamil (VER) was calculated. Results of the study showed that ACT could non-competitively antagonize the muscular contraction of the test specimens with

* 高阳女, 1975年出生, 1998年毕业于辽宁中医学院中药系, 现为该系 98级药理硕士研究生。