

活跃<sup>[7]</sup>,许多发达国家已将多种低聚糖类产品定为特定保健药品,用于防治便秘、肥胖、高血脂、动脉硬化及冠心病等常见病症。魔芋低聚糖有一定的甜度,能替代蔗糖和葡萄糖,但又不使血糖升高。它不被人体内消化酶所消化,热量值很低,可通过促进肠道双歧杆菌增殖,减少有毒发酵产物及有害细菌酶的产生,增强机体的免疫力和抗氧化能力。本实验结果表明,小鼠喂饲高浓度葡萄糖,其血糖含量及 LPO 水平明显增高, SOD 活性降低;而喂饲同样浓度魔芋低聚糖的小鼠,其血糖含量和 LPO 水平明显低于葡萄糖组,而 SOD 活性显著升高。提示魔芋低聚糖具有不升高血糖,又增强机体抗氧化能力的作用,不仅适用于健康人群亦适用于糖尿病人长期服用,可作

为防治糖尿病的保健食品和药品加以开发利用。

参考文献:

[1] 马百平. 魔芋的药用研究概况[J]. 中草药, 1993, 24(1): 49-53.  
 [2] 王照利, 吴万兴, 李科友. 魔芋精粉中甘露聚糖含量测定研究[J]. 食品科学, 1998, 19(3): 56-58.  
 [3] 杨艳燕, 高尚, 王慧平, 等. 魔芋低聚糖对小鼠实验性高脂血症防治作用的研究[J]. 湖北大学学报, 1999, 21(4): 386-388.  
 [4] 王素敏, 刘福荣, 徐增年, 等. 大豆低聚糖对小鼠血脂和抗氧化作用的影响[J]. 营养学报, 1997, 19(4): 468-469.  
 [5] 北师大生化教研室. 基础生物化学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1994.  
 [6] Wursch P. Dietary fibre and unabsorbed carbohydrates In: Sugars in Nutrition (Cracey M. Kretschmer N. Rossi E. Eds). New York: Rove, 1991, 25: 153.  
 [7] 郑建仙, 耿立萍. 功能性低聚糖析论[J]. 食品与发酵工业, 1997, 23(1): 39-46.

## 平行平板流动装置用于药物对内皮细胞功能影响的实验研究

李 薇<sup>1</sup>, 蔡绍哲<sup>2</sup>, 李胜富<sup>3</sup>, Eva Finkeldei<sup>2\*</sup>, 蔡绍晖<sup>3</sup>, 杨华蓉<sup>3\*</sup>

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405; 2. 重庆大学 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044; 3. 华西医科大学 附属第一医院移植免疫实验室, 四川 成都 610041)

**摘要:**目的 将平行平板流动装置用于体外药物试验研究, 为心血管药物的筛选和测试提供新的实验方法和手段。方法 用放射免疫法测定内皮素(ET-1)和 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>(6-keto-PGF<sub>1α</sub>)的分泌速率和累积分泌量, 观察复方丹参注射液、丹皮酚和阿司匹林等心血管药物在剪切流场中对内皮细胞分泌 ET-1 和前列腺素(PG<sub>I<sub>2</sub></sub>)功能的干预作用。结果 复方丹参注射液和丹皮酚对 ET-1、PG<sub>I<sub>2</sub></sub>的分泌功能均有促进作用, 而阿司匹林则无影响。结论 平行平板流动装置条件易控制, 观察和测定方便, 不失为一种研究心血管药物对内皮细胞功能影响的较好方法。实验结果有利于对丹参和丹皮酚的血管作用有新的认识。

**关键词:** 内皮细胞; 平行平板流动装置; 内皮素; 前列腺素; 心血管药物

中图分类号: R965·1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670-(2001)02-0144-04

## Application of parallel-plate flow chamber system in experimental studies on drug effect on endothelial cell function

LI Wei<sup>1</sup>, CAI Shao-xi<sup>2</sup>, LI Sheng-fu<sup>3</sup>, EVA Finkeldei<sup>2</sup>, CAI Shao-hui<sup>3</sup>, YANG Hua-rong<sup>3</sup>

(1. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou Guangdong, 510405, China; 2. Key Laboratory for Biomechanics and Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing Sichuan 400044, China; 3. First Affiliated Hospital of West China University, Chengdu Sichuan, 610041, China)

**Key words:** endothelial cell; parallel-plate flow chamber; endothelin; prostaglandin; cardiovascular drug

内皮细胞(endothelial cell, EC)功能的变化与多种疾病的发生和发展有着密切的关系<sup>[1]</sup>。内皮细

胞特殊的位置又使得人们特别关注它所处的力学环境以及这种力学环境下各种力综合作用对它功能的

\* 收稿日期: 2000-06-11

基金项目: 重庆市应用基础研究资助项目和高等学校重点实验室访问学者基金资助

作者简介: 李 薇, 女, 博士, 现任广州中医药大学中药学院副教授。目前主要从事中药品质鉴定的方法学研究。在国内外已发表学术论文 20 余篇, 编写出版专著和教材数部。

\* 德国留学生

影响。80 年代以来不少学者运用平行平板流动装置 (parallel-plate-flow chamber) 来研究流动剪切应力对血管内皮细胞形态及功能的影响, 取得了诸多的进展, 流动装置也逐步得以改进<sup>[2-4]</sup>。由于它能保证细胞受到不同水平的恒流剪切作用, 又能使细胞在高剪切力作用下发生形态改变的同时仍然保持粘附, 还能适时观察记录剪切力对内皮细胞的作用。平行平板流动腔目前已成为人们研究体外培养的血管内皮细胞在剪切应力作用下的生物学特性的重要手段之一<sup>[5]</sup>。正是由于内皮细胞功能在心血管系统的特殊地位以及平行板流动腔研究剪切流场内皮细胞功能的优越性, 我们研究了部分心血管药物在剪切流场中对内皮细胞功能的干预作用, 考察此方法用于体外药物试验的可行性和可靠性。

## 1 材料与方法

### 1.1 平行平板流动装置的安装及流动参数的估算:

本流动装置是按文献<sup>[6]</sup>进行安装的。其中壁剪切应力( $\tau_w$ )、雷诺数(Re)和平面 Poiseuille 流动的入口长度(l)三个流动参数的计算方法与文献<sup>[6]</sup>相同。在本实验中, 循环液粘度  $\mu = 0.0122 \text{ (dyn} \cdot \text{s/cm}^2\text{)}$  (用 low-shear 30 型粘度计测定), 流动腔宽度  $w = 2.3 \text{ cm}$ , 流动腔高度  $h = 0.03 \text{ cm}$  以及实测出大小不同的流量 Q。将这些数值代入公式  $\tau_w = 6\mu Q / wh^2$  即得在层流条件下平板流动腔的剪应力。据报道<sup>[9]</sup>一般人体内动静脉内皮细胞接受稳定的切应力为  $0 \sim 5 \text{ Pa}$  ( $1 \text{ Pa} = 10 \text{ dyn/cm}^2$ ), 本实验分别选择了数种大小的剪切力进行了预试, 最后, 采用了较为适中的剪切应力:  $\tau_w = 16 \text{ dyn/cm}^2$ 。此外, 鉴于本试验中最大雷诺数(Re)仅为 6.94, 而腔高(h)为 0.03 cm, 入口长度(l)仅为  $83 \mu\text{m}$ , 表明通过腔中的流动为层流, 而且入口长度造成的流动变化也可忽略不计。

### 1.2 人胚肾小球血管内皮细胞(HGVEC)的培养和鉴定:

取新鲜人胎肾用含青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 U/mL 的无菌 Hank's 液(按常规方法配制)冲洗肾表面数次至干净, 小心剥离肾被膜, 剪取肾皮质成小块置于 100 目不锈钢筛网中研磨, 同时用 Hank's 液将其冲滤至 200 目滤网上。冲洗并收集 200 目网上的组织团, 将混悬液用 100 r/min 离心 5 min, 弃去上清液后加入 0.19% IV 型胶原酶(美国 Sigma 公司)的 M199 液置 37 °C 水浴中孵育消化组织团 30 min, 再经 1200 r/min 离心 6 min, 其沉淀即为 HGVEC。经 0.5% 台盼蓝拒染试验计算活细胞百分率, 并调整细胞数以  $1.5 \times 10^5$  个细胞/mL 密度接种于 50 mL 培养瓶加入 M199 培养液(美国 GIB-

COBRL 公司, 含 15% 小牛血清、胰岛素 0.006 U/mL、青霉素 200 U/mL、链霉素 100 U/mL) 在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下培养, 每两天换液一次。采用常规免疫组化的方法, 检测细胞的 因子相关抗原<sup>[7]</sup>。HGVEC 的传代培养是选择生长旺盛期的 HGVEC, 加入 0.25% Trypsin 消化液消化 2~3 min, 待细胞开始变圆, 加入含 15% 小牛血清的 M199 终止消化, 轻轻吹打瓶底细胞使其脱落, 离心洗涤细胞两次, 调整浓度为  $1.5 \times 10^5 \text{ cfu/mL}$ , 接种于 50 mL 培养瓶或流动装置的细胞载片上, 每两天换液一次。同一实验选择同代的细胞, 一般选择 2~3 代的细胞进行实验。

### 1.3 内皮细胞内皮素(ET-1)分泌量的测定:

选无菌的细胞载片 5~6 张, 将第二代 HGVECs 接种于载片上。HGVECs 经过 2~3 d 生长增殖, 汇合形成细胞单层。从中选取 4 张进行实验, 其中 1 张载片进行静态培养作为对照。将另外具单层细胞载片分别放入独立的流动腔中, 分别加入含药物的 M199 培养液 20 mL 于收集瓶。调整流量, 使其达到所需剪切力, 启动蠕动泵并计时。循环开始后每 2 h 分别收集循环液各 1 mL 以及静态对照皿内的培养液 1 mL, 迅速冻存(-75 °C), 同时补充新鲜循环液各 1 mL。剪切作用时间为 24 h。样品中的内皮素分泌量用放射免疫法测定, 按北京邦定生物技术公司试剂盒说明书操作(单位: pg/mL)。

### 1.4 内皮细胞前列环素(PGI<sub>2</sub>)分泌量的测定:

操作同 1.3。测定样品中的 PGI<sub>2</sub> 代谢产物 6-酮-前列腺素 F<sub>1α</sub>(6-keto-PGF<sub>1α</sub>) 的含量。其测定方法按北京东亚免疫技术研究所试剂盒说明书操作(单位: pg/mL)。

### 1.5 生物半衰期的测定:

取细胞载片, 按  $10^4 \sim 10^6 \text{ cfu/cm}^2$  密度接种 HGVECs, 在含有 15% 小牛血清的 M199 培养液中孵育。待细胞铺成单层后备用。另取一平皿, 将上述细胞载片放在平皿内, 定量加入 20 mL M199 培养液孵育 8 h 后, 取出细胞载片。每隔一定时间在平皿中取样 1 mL 迅速冻存(-75 °C), 用放射免疫法测定 ET-1 含量。本实验测得 ET-1 的浓度变化与时间呈指数函数关系:  $Y = 86.729e^{-0.2238x}$ ; 相关系数  $R^2 = 0.9624$ 。因 PGI<sub>2</sub> 的生物半衰期只有几分钟<sup>[8]</sup>, 故无法测定。

### 1.6 数据处理:

采用与 McIntire 实验室类似的处理方法<sup>[9]</sup>。将实测的 ET-1 和 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> 含量转换为单位面积的含量(pg/cm<sup>2</sup>), 根据流动装置中的物质平衡, 考虑到生物半衰期、抽样和补加循环液因

素, 换算出样品的累加含量。并根据采样的时间间距, 计算出平均分泌速率。各组间平均数差异比较采用  $t$  检验法。

## 2 结果与分析

2.1 药物对内皮素(ET-1)分泌速率和累积分泌量的影响: 在模拟人体生理环境的剪切应力范围内

表 1 药物对内皮细胞在剪切流场(16 dyn/cm<sup>2</sup>)中持续作用 12 h 后 ET-1 分泌量的影响

组别	数量	剂量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ET-1 累积分泌量( $\text{pg}/\text{cm}^2$ )		ET-1 分泌速率 ( $\text{pg}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ )
			6 h 后	12 h 后	
对照	5	—	40.952 1 $\pm$ 4.780 7	102.686 1 $\pm$ 12.693 1	10.330 1 $\pm$ 1.279 0
丹参	5	1 500	74.423 7 $\pm$ 6.314 0 <sup>**</sup>	193.654 1 $\pm$ 26.503 3 <sup>**</sup>	19.988 6 $\pm$ 2.103 6 <sup>**</sup>
丹皮酚	5	200	76.931 9 $\pm$ 5.379 1 <sup>**</sup>	160.357 1 $\pm$ 11.411 2 <sup>**</sup>	13.906 5 $\pm$ 2.427 9 <sup>**</sup>
阿司匹林	5	200	41.022 1 $\pm$ 3.214 1	102.696 3 $\pm$ 13.055 4	10.298 9 $\pm$ 1.562 1

与对照组比较:<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

量的影响: 为了同步了解药物对剪切流场作用下的内皮细胞 PGI<sub>2</sub> 的分泌速率和累积分泌量的影响, 本

表 2 药物对内皮细胞在剪切流场(16 dyn/cm<sup>2</sup>)中持续作用 12 h 后 PGI<sub>2</sub> 分泌量的影响

组别	数量	剂量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	PGI <sub>2</sub> 累积分泌量( $\text{pg}/\text{cm}^2$ )		PGI <sub>2</sub> 分泌速率 ( $\text{pg}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ )
			6 h 后	12 h 后	
对照	6	—	10.045 3 $\pm$ 1.321 5	17.464 3 $\pm$ 2.433 7	1.200 4 $\pm$ 0.871 3
丹参	6	1 500	18.125 5 $\pm$ 3.673 3 <sup>**</sup>	24.488 6 $\pm$ 2.673 9 <sup>**</sup>	1.654 7 $\pm$ 0.721 1
丹皮酚	6	200	14.301 8 $\pm$ 2.650 9 <sup>**</sup>	23.521 5 $\pm$ 3.554 3 <sup>**</sup>	1.511 8 $\pm$ 0.663 2
阿司匹林	6	200	12.044 2 $\pm$ 1.965 1	15.756 3 $\pm$ 1.996 3	0.695 1 $\pm$ 0.430 1

与对照组比较:<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

2.2 药物对内皮细胞在剪切流场中作用持续 12 h 后 ET-1 和 PGI<sub>2</sub> 水平的影响: 为了更直观的比较药物对内皮细胞分泌 ET-1 和 PGI<sub>2</sub> 的影响, 本实验分

表 3 药物对 ET-1 和 6-Keto-PGI<sub>1 $\alpha$</sub>  水平的影响作用比较

组别	数量	剂量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	ET-1( $\text{pg}/\text{mL}$ )	6-Keto-PGI <sub>1<math>\alpha</math></sub>
对照	5	—	49.667 0 $\pm$ 11.817 2	13.303 8 $\pm$ 3.960 5
丹参	5	1 500	86.117 8 $\pm$ 9.208 5 <sup>**</sup>	20.047 0 $\pm$ 0.302 6 <sup>**</sup>
丹皮酚	5	200	79.208 7 $\pm$ 10.796 0 <sup>**</sup>	18.190 5 $\pm$ 2.725 9 <sup>*</sup>
阿司匹林	5	200	54.378 4 $\pm$ 10.133 3	13.167 5 $\pm$ 3.123 6

与对照组比较:<sup>\*</sup>  $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

## 3 讨论

3.1 血液流动引起的剪应力及其作用时间在内的血流动力学因素是影响血管内皮细胞合成的分泌功能的重要因素之一<sup>[6]</sup>。为此, 本实验利用平行平板流动腔装置检测药物对内皮细胞功能影响。实验中发现, 流动装置不仅安装简单易行, 而且剪切的大小可通过流速随意调控。流动装置中循环液流动平稳不易产生气泡, 总循环液需要量仅为 15 ~ 25 mL, 特别适于微量细胞代谢产物的测定。在实验过程中还可随时观察和记录细胞的生长状态, 以保证实验的正常进行。实验表明, 运用此方法研究药物对内皮细胞功能的影响是可行的, 其实验条件比在静态环境下的研究更符合实际生理状态。

(0 ~ 20 dyn/cm<sup>2</sup>) 其内皮素是随着剪切应力加大而分泌增多<sup>[10]</sup>, 而且作用时间在 10 h 左右分泌量达到峰值<sup>[6]</sup>。因此, 本文着重比较了剪切作用 6 h 后和 12 h 后的累积分泌量, 并分别比较了药物 ET-1 分泌速率的影响。结果见表 1。

2.2 药物对前列环素(PGI<sub>2</sub>)分泌速率和累积分泌

实验仍采用和 ET-1 同样的时间点和作用时间进行比较。结果见表 2。

别选择了内皮细胞在剪切流场(16 dyn/cm<sup>2</sup>)中持续作用 12 h 后 ET-1 和 6-Keto-PGI<sub>1 $\alpha$</sub>  的浓度值, 并对其进行了比较。结果见表 3。

3.2 在实验中选取了近年来研究较集中的主要作用于心血管系统的药物和中药单体, 如复方丹参注射液、丹皮酚以及阿司匹林作为实验对象。复方丹参注射液中所含丹参素是改善微循环和扩张冠状动脉的有效成分<sup>[11]</sup>, 丹皮酚具有舒张血管, 抑制内毒素、组织胺及 5-羟色胺等致炎物质所引起的血管壁通透性增强<sup>[12]</sup>, 均具有一定的代表性。而阿司匹林除了对血管内皮细胞合成的前列腺素几乎没有或仅有部分(高浓度时)抑制<sup>[13]</sup>外, 尚未发现有关血管作用的报道。因此, 选用阿司匹林作为参照物, 其血管作用可在本实验系统中得到进一步证实。

3.3 本实验结果表明: 复方丹参注射液和丹皮酚对内皮细胞分泌内皮素和前列环素均有促进作用, 而

阿司匹林则无影响。此结果从内皮细胞对药物的应答反应来看是与以往的这些药物血管活性相关的报道结果<sup>[11~13]</sup>一致。但出乎意料的是:复方丹参注射液和丹皮酚对这二种物质均有促进分泌作用,而不是仅促进前列环素一种物质的分泌。此结果说明丹参注射液和丹皮酚的血管作用涉及到与内皮细胞功能相关的其它因子或与其相关的其它作用途径和机制方面的问题,值得进一步探讨。

致谢: 华西医大同位素室张敏老师担任本文放射免疫测定工作; 药理教研室刘于宾老师协助本文部分实验工作, 在此一并致谢。

参考文献:

[1] 盛民立. 内皮细胞和疾病[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1993.  
 [2] Frangos J A, McIntire L V, Eskin S G. Shear stress induced stimulation of mammalian cell metabolism [J]. Biotechnol Bioeng, 1988, (32): 1053-1060.  
 [3] Eskin S G, Ives C L, McIntire L V. Response of cultured en-

dothelial cells to steady flow [J]. Microvac Res, 1984, (28): 87-94.  
 [4] Nollert M U, Diamond S L, McIntire L V. Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism [J]. Biotech Bioeng, 1991, (38): 588-602.  
 [5] Helming G, Geiger R V, Schreck S, et al. Effect of Pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology [J]. Biomech Eng, 1991, (113): 123-131.  
 [6] 王贵学, 罗向东, 欧阳克清, 等. 剪切应力对毛细血管内皮细胞代谢的影响[J]. 生物物理学报, 1999, 15(1): 178-185.  
 [7] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995.  
 [8] 王振纲. 临床药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.  
 [9] McIntire L V. 1992 ALZA distinguished lecture: Bioengineering and vascular biology[J]. Biomech Eng, 1994, (22): 2-13.  
 [10] 王建民, 施永德, 梁子钧. 剪切应力下内皮细胞内皮素及其 mRNA 的表达[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(3): 298-302.  
 [11] 李仪奎, 姜名瑛. 中药药理学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1992.  
 [12] 董华进, 王建荣, 汪巨峰, 等. 丹皮酚的心血管药理作用[J]. 基层中药杂志, 1994, 8(2): 40-41.  
 [13] 曹树平, 王庆璋, 刘贞浏. 阿司匹林在缺血性血管病防治中的应用[J]. 中国医院药学杂志, 1993, 13(1): 25-27.

## 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基 酮对缺血再灌脑内氨基酸、乙酰胆碱酯酶活性的影响

何泉华<sup>1</sup>, 邓芹英<sup>2\*</sup>

(1. 广州医学院蛇毒所, 广东 广州 510182; 2. 中山大学化学与化工学院, 广东 广州 510275)

摘要: 目的 观察 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基 酮(XT)对反复脑缺血再灌后脑内氨基酸及乙酰胆碱酯酶活力的影响。方法 手术前给小鼠 iv XT 50 和 10 mg/kg, 对反复脑缺血再灌注后 45 min, 用氨基酸自动分析仪测定小鼠脑内谷氨酸(Glu), 天冬氨酸(Asp)和  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的含量; 并测定造模后 45 min 以及第 5 天脑内乙酰胆碱酯酶(AchE)活力。结果 反复脑缺血再灌注后 45 min, Glu 和 Asp 均升高, GABA 也随之升高。二个剂量均可抑制 Glu、Asp 的升高, 50 mg/kg XT 还使升高的 GABA 恢复至接近正常。造模后 45 min 以及第 5 天, 模型组小鼠 AchE 活力降低, XT 可升高 AchE 活力。结论 XT 可抑制反复脑缺血再灌后脑内 Glu, Asp 和 GABA 含量的升高, 提高 AchE 活力。

关键词: 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基 酮; 脑缺血再灌; 谷氨酸; 乙酰胆碱酯酶

中图分类号: R 285 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)02-0147-03

### Effects of xanthone on intracerebral amino acid and AchE activity of ischemia reperfusion mouse

HE Quan-hua<sup>1</sup>, DENG Qin-ying<sup>2</sup>

(1. Institute of Snake Venom, Guangzhou Medical College, Guangzhou Guangdong 510182, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou Guangdong 510275, China)

Key words: xanthone; cerebral ischemia-reperfusion; Glu; AchE

我们与中山大学化学与化工学院合作, 从穿心 M azz. 中提取分离出系列黄酮类化合物。前期工作草 *Canscora lucidissima* (Levl. et Vant) Hand. - 发现 1, 8-二羟基-3, 5-二甲氧基 酮(1, 8-dihydrox-

\* 收稿日期: 2000-09-18

作者简介: 何泉华, 男, 34 岁, 博士, 广州蛇毒研究所副所长。主要从事心、脑血管药理研究。通讯地址: 广州医学院广州蛇毒研究所, 邮编: 510182, 于 2000 年 12 月中旬前往美国 Yale University 从事博士后工作。