

1997, 17: 1583-1590.

[3] Miura S, Watanabe J, Tomita T, *et al.* The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu<sup>2+</sup> mediated oxidative modification of low density lipoprotein [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(12): 1567-1572.

[4] Pryor W A, Castal L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides [J]. *Methods Enzymol*, 1984, 105(34): 293-299.

[5] Jaffe E A. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2745.

[6] Li J, Liu Q H, Jiang L *et al.* Apolipoprotein CIII antagonize the damage on endothelium induced by low-lipid lipoprotein [J]. *Chin J Arterioscle* (中国动脉硬化杂志), 1997, 5(1): 32-36.

[7] Fogelman A M. Modification of the recall method for the isolation of human monocytes [J]. *J Lipid Res*, 1988, 29: 243-246.

[8] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362: 801-809.

[9] Justin W. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 1997, 27(1): 1.

## 芪丹通脉片对肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导的心肌细胞的 细胞间黏附分子-1 表达的影响

王宗仁<sup>1</sup>, 肖铁舟<sup>1</sup>, 李晶华<sup>1</sup>, 马静<sup>1</sup>, 邵中军<sup>2</sup>, 郑瑾<sup>1</sup>, 马爱玲<sup>1\*</sup>

(1. 第四军医大学附属西京医院 中医科, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学 流行病学教研室, 陕西 西安 710032)

近年来, 冠心病发生发展中的细胞黏附机制日益受到重视, 其中内皮细胞 (EC), 白细胞和血小板之间以及与血管内皮基质间相互黏附、相互作用而导致炎症反应和促凝异常、血栓形成, 从而促进冠心病的形成和发展, 而黏附分子和黏附蛋白是介导细胞黏附的分子基础。研究发现, 细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 参与中性粒细胞黏附心肌细胞, 释放细胞毒过程, 在心肌细胞坏死过程中起关键作用。一些细胞因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ), 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1), 白细胞介素-1 (IL-1), 白细胞介素-6 (IL-6), 脂多糖 (LPS) 和佛波酯 (PMA) 等可促进上皮细胞和血管平滑肌等细胞 ICAM-1 的表达, 其中 TNF- $\alpha$  的作用尤其引人注目<sup>[1]</sup>。本研究观察芪丹通脉片 (QDTMP) 对 TNF- $\alpha$  诱导的培养乳鼠心肌细胞 ICAM-1 表达的影响, 探讨中药复方制剂对冠心病发生发展中的细胞黏附过程的作用机制。

### 1 材料与方法

1.1 材料: SD 大鼠 30 只, 雄性, 体重 (220 $\pm$ 18) g, 第四军医大学实验动物中心提供。DMEM 胰蛋白酶、胎牛血清 (FBS)、TNF- $\alpha$  抗 ICAM-1 多抗及 DAB 染色剂购于武汉博士德公司。生物素标记羊抗兔抗体 (二抗), ABC 复合物, 第四军医大学神经生物教研室提供。芪丹通脉片提取浸膏干粉 (1 g 干粉相当于生药 2.862 g), 由第四军医大学附属西京医院提供。

1.2 含药血清制备: SD 大鼠按体重随机分成: 对照组、芪丹通脉片低、高剂量组。对照组 ig 生理盐水 10 mL/kg, 芪丹通脉片低、高剂量组分别 ig 1, 2 g 生药/kg; 连续 7 d 第 8 天断头取血, 离心, 取血清, 分装保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3 心肌细胞原代培养: 新生 1~3 d SD 大鼠 (第四军医大学实验动物中心提供), 雌雄兼用, 活杀取心室, 除去心包膜, 放入不含钙、镁的 Hanks 液中漂洗 2 次, 洗去多余水分, 剪成 1~2 mm<sup>3</sup> 组织碎块, 置于 0.2% 胰蛋白酶溶液中, 37 $^{\circ}$ C 水浴振荡消化 15~20 min, 200 目不锈钢筛滤过, 将上层细胞悬液吸入含 10% FBS DMEM 培养基的消毒离心管中混匀, 800~1000 r/min 离心 10 min, 离心后弃上清液, 加入不含钙、镁 Hanks 液混匀, 800~1000 r/min 离心 10 min, 离心后弃上清液, 加 4 mL 培养液混匀, 接种在消毒的载玻片上, 37 $^{\circ}$ C 孵箱中静置 3 h, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^5$  /L, 吸入含 10% FBS 的 DMEM 培养基转入培养皿 37 $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 并观察细胞生长状况。48 h 后换液备用。

1.4 分组: 加用 TNF- $\alpha$  和芪丹通脉片, 换液时将培养的心肌细胞随机分为 3 类, 一类在含 10% FBS 的 DMEM 中分别加入 TNF- $\alpha$  (100 U/mL), 另一类在 10% 高剂量含药血清的 DMEM 中加入 TNF- $\alpha$  (100 U/mL), 第三类在含 10% 低剂量含药血清的 DMEM 中加入 TNF- $\alpha$  (100 U/mL), 均刺激 6, 12, 24 h

\* 收稿日期: 2003-03-14  
基金项目: 陕西省重点课题 (2001K12-G7)  
作者简介: 王宗仁 (1951-), 男, 博士生导师, 第四军医大学附属西京医院中医科主任  
Tel: (029) 3375347 E-mail: zongren@fmmu.edu.cn

1.5 免疫组织化学:将载玻片用 PBS 冲洗干净,放入冷丙酮中固定 15 min, PBS 冲洗干净。而后进行免疫组化鉴定。3% 过氧化氢作用 15~ 20 min,水冲洗, PBS 洗 3 min,共 3 次。加抗 ICAM-1 (一抗 1:100), 4℃ 冰箱过夜, 37℃ 水浴箱 60 min, PBS 冲洗 3 min,共 3 次。加生物素标记羊抗兔抗体 (二抗 1:300), 37℃ 水浴箱 30 min, PBS 冲洗 3 min,共 3 次。加过氧化物酶链霉菌抗生物素蛋白 (三抗 1:300), 37℃ 水浴箱 30 min, PBS 冲洗 3 min,共 3 次。加 DAB 液显色 2~ 10 min,水冲洗,苏木精复染, 1% 盐酸酒精脱色,脱水透明,中性树脂封片。

1.6 ICAM-1 的检测:用 Leica Q 500 Mc 图像分析仪对阳性结果的密度进行测定 ( $\bar{x} \pm s$ )。

1.7 数据统计:用 SPSS 软件对资料进行整理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验对资料进行分析。

2 结果

免疫组化结果:见表 1 TNF $\alpha$  (100 U/mL) 能明显刺激培养心肌细胞 ICAM-1 的表达 ( $P < 0.01$ ), 6 h 时表达水平较高,而用含芪丹通脉片血清作用后心肌细胞 ICAM-1 的表达下降,芪丹通脉片能够下调各个时间点培养心肌细胞 ICAM-1 表达,与单纯 TNF $\alpha$  刺激的心肌细胞比较有明显差异。芪丹通脉片作用 12 h,高剂量组作用较低剂量组明显,二者相比有差异,证明高剂量对 ICAM-1 的影响作用较明显。

表 1 芪丹通脉片与单纯 TNF $\alpha$  刺激的心肌细胞 ICAM-1 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of ICAM-1 expression in myocardium stimulated by QDTMP and TNF $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g $\cdot$ kg $^{-1}$ )	ICAM-1 表达		
		6 h	12 h	24 h
对照	-	11.32 $\pm$ 1.20	10.83 $\pm$ 1.54	11.54 $\pm$ 2.01
TNF $\alpha$	-	25.6 $\pm$ 4.11	58.14 $\pm$ 6.30*	39.68 $\pm$ 5.44*
芪丹通脉片	1	20.09 $\pm$ 4.23 $\Delta$	38.57 $\pm$ 4.12 $\Delta$	26.35 $\pm$ 4.55 $\Delta$
	2	20.27 $\pm$ 3.35 $\Delta$	41.95 $\pm$ 5.21 $\Delta$ $\blacktriangle$	30.62 $\pm$ 6.02 $\Delta$

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 TNF $\alpha$  组比较:  $\Delta P < 0.01$

与芪丹通脉片低剂量组比较:  $\blacktriangle P < 0.05$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.01$  vs TNF $\alpha$  group;

$\blacktriangle P < 0.05$  vs QDTMP low dose group

3 讨论

黏附分子和黏附蛋白通过介导内皮细胞,血小板和白细胞之间及其与其他细胞和细胞基质间的相互黏附、相互作用,因而在冠心病发生、发展中有重要作用。ICAM-1 为一种细胞黏附分子,属免疫球蛋白超家族成员,分为还原型与非还原型,和成纤维母细胞等细胞表达,通过白细胞上的配体 CD11/CD18 复合物与任何白细胞相互作用,是炎症反应的可信

标志物。近几年来随着研究逐步深入,已证实其在缺血再灌注损伤、急性心梗、动脉粥样硬化 (AS) 形成中起着重要的作用 [2~ 5]。

心肌细胞在正常情况下仅表达极少量 ICAM-1,多种因素可以影响 ICAM-1 的表达。在某些病理因素刺激下如:心脏遭受致命性损伤、心脏移植排斥反应、心肌缺血再灌注,心肌细胞膜表面 ICAM-1 量可成倍增加。一些细胞因子尤其是 TNF $\alpha$  可促进上皮细胞和血管平滑肌细胞等细胞 ICAM-1 的表达 [1]。研究表明, TNF $\alpha$  可以刺激 ICAM 在培养心肌细胞上的表达,并呈浓度依赖性。心力衰竭时心肌组织 TNF $\alpha$  升高,可溶性 TNF $\alpha$  及 TNF $\alpha$  受体升高。提示 TNF $\alpha$  在心力衰竭的进程中可能起重要作用,尽管机制有许多方面,但 TNF $\alpha$  刺激心肌细胞 ICAM-1 表达可能是其中重要的一环。

芪丹通脉片根据中医异病同治及气血相关论研制而成,组方中君药黄芪补益心气,气旺则运血有力;臣药丹参为“达脏腑祛瘀滞之佳品”入血分而活血行血,与黄芪相配加强益气活血之效;佐药当归为“血中之气药”,故而补血行血,红花活血,祛瘀止痛;佐使药桂枝“宣道百药,通血脉”,与黄芪合用能振奋心阳,以达温通经脉之效。诸药合用以达益气活血、温通经脉、活血化瘀之效。

近年来,有关中医中药对冠心病发生发展过程中黏附机制作用影响的研究还很少,中医认为缺血性心、脑血管疾病基本病机为气虚血瘀,治疗宜益气、活血化瘀为主。本实验的结果表明,芪丹通脉片可以下调 TNF $\alpha$  诱导的心肌细胞 ICAM-1 表达,对损伤心肌细胞具有保护作用,以高剂量作用明显,其作用机制尚有待进一步证明,可能为活血化瘀中药复方制剂对缺血性心血管疾病的治疗找到新的理论依据。

References

- [1] Filippo C, Luigi M B, Antonion B, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of unstable coronary artery disease [J]. *Am J Cardiol*, 1997, 80(5): 10-16.
- [2] Ishibashi T, Kijima M, Yokoyama K, et al. Expression of cytokine and adhesion molecule mRNA in atherectomy specimens from patients with coronary artery disease [J]. *Jpn Circ J*, 1999, 63(4): 249-254.
- [3] Briaud S A, Ding Z M, Michael L H, et al. Leukocyte trafficking and myocardial reperfusion injury in ICAM-1/P-selectin-knockout mice. [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(1): 60-67.
- [4] Li Y H, Teng J K, Tsai W C, et al. Elevation of soluble adhesion molecules is associated with the severity of myocardial damage in acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiol*, 1997, 80(9): 1218-1221.
- [5] Ridker P M. Inflammation, atherosclerosis, and cardiovascular risk: an epidemiological view [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1999, 10(1): 9-12.