

活血化瘀注射液- 号对细胞因子体外诱发大鼠肺微血管内皮细胞 E-选择素、P-选择素及细胞间黏附分子-1 表达的影响

张艳军¹, 赵连根², 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)

近年研究证明血管内皮细胞表达的黏附分子在炎症性疾病的发病过程中对白细胞与血管壁内皮细胞黏附、经内皮迁移及向组织浸润起了关键作用。内皮细胞黏附分子过度表达在多发损伤、脓毒血症及多脏器功能不全的发生发展中起重要作用。肺损害在急性重症胰腺炎(SAP)时极为常见,在多器官衰竭综合征(MODS)中,肺损害发生最早,多表现为成人呼吸窘迫综合征(ARDS),约20% SAP病人并发ARDS,发病后一周内死亡的SAP病人约60%与ARDS有关。本实验研究了细胞因子对肺微血管内皮细胞黏附分子表达的影响,并观察了活血化瘀注射液- 号(HHF)的作用。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂: TE300 倒置显微镜(Nikon), CO₂培养箱(美国),全自动酶标仪(SLT Spectra Tecan)。DMEM/F₁₂培养基(Gibco);特优级胎牛血清(Hyclon);胰蛋白酶(Sigma);白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF),北京邦定生物医学公司;P-选择素、E-选择素、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、山羊抗鼠多克隆抗体(Santa Cruz公司);辣根酶标记兔抗山羊 IgG(Vector公司);封闭用兔血清工作液(北京中山公司);30%过氧化氢(中国医学科学院血液病研究所科技公司);邻苯二胺、聚山梨酯 20(Sigma)。其他常用试剂均为国产分析纯。HHF 由天津市南开医院药厂制备,主要由桃仁、红花等组成,含生药 1 g/mL。复方丹参注射液由上海第一生化制药公司生产,批号 971002。

1.2 大鼠肺微血管内皮细胞的分离和培养:参照文献^[1]方法,稍加改进。取体重约 150 g 的健康 Wistar 大鼠(军事医学科学院第四研究所),雌雄不限。以 10% 乌拉坦 ip 麻醉(10 mL/kg),同时 ip 肝素钠 3 000 U。仰卧位固定,无菌条件下颈动脉放血处死。打开胸腔,从右心灌注 D-Hanks 液至双肺发白,取出肺脏置 D-Hanks 液中(以下工作在超净工作台内进行)。充分冲洗肺脏,剥去脏层胸膜,切取

周边不含大中血管的肺组织,切割至约 1 mm³大小的组织块,D-Hanks 液洗涤 3~5 次,100 目滤过。用吸管将肺组织块均匀种于 25 cm²塑料培养瓶,每瓶 15~20 块。瓶底朝上,置 37 ℃、湿度 95%~100%、5% CO₂培养箱内孵育 1.5~2 h,小心加入含 20% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM/F₁₂培养基,重置培养箱内静置培养,60 h 后,弃组织块,继续培养。2~3 d 换液 1 次。第 2~3 周绝大部分细胞单层汇合时,用 0.08% 胰蛋白酶消化后按 1:2 传代。第 3 代细胞进行实验。

1.3 大鼠外周血白细胞悬液的制备:健康 Wistar 大鼠,无菌心脏取血至离心管中,肝素抗凝,按体积比 1:1 加入无菌 6% 右旋糖苷(Dextran500,相对分子质量为 5.0 × 10⁵)生理盐水溶液,反复翻覆 40 次,使其混匀;将离心管静置于 37 ℃ 温箱内使其沉降;10 min 后可见清晰分层,小心吸取上层富含白细胞的上清液,其余部分继续沉降,出现清晰分层后吸取上清液,如此沉降 1.5 h,将富含白细胞的上清液收集于离心管中,1 500 r/min 离心 10 min,弃上清液;加 8 mL 冷三蒸水,轻轻混匀,低渗破坏红细胞,1 min 后加入 2 mL 4.5% 氯化钠溶液,轻轻摇匀;以生理盐水洗 2 次,1 500 r/min 离心 10 min,用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F₁₂培养基制成 1 × 10⁶/mL 白细胞悬液,经常规台盼蓝染色检查活细胞 > 95% 者备用。

1.4 含药血清制备:健康 Wistar 大鼠 6 只,体重 250~300 g,雌雄不限。其中 3 只经颈静脉输入 3% HHF,3 mL/h,连续 3 h^[2]。另外 3 只经颈静脉输入复方丹参注射液,3 mL/h,连续 3 h。停药 0.5 h,心脏采血,制备血清,56 ℃ 灭活 0.5 h,低温冰箱保存备用。

1.5 白细胞与内皮细胞黏附实验

1.5.1 分组:TNF- 组,培养基中加入 TNF- (1 000 U/mL);TNF- + HHF 组:培养基中加入

TNF- 及 HHF 含药血清 (体积分数 10%) ; TNF- + 丹参组:培养基中加入 TNF- (1 000 U/mL) 及复方丹参注射液含药血清 (体积分数 10%) ;IL-1 组:培养基中加入 IL-1 (100 U/mL) ; IL-1 + HHF 组:培养基中加入 IL-1 (100 U/mL) 及 HHF 含药血清 (体积分数 10%) ;IL-1 + 丹参组:培养基中加入 IL-1 (100 U/mL) 及复方丹参注射液含药血清 (体积分数 10%)。以上各组培养基中均含有 10% 胎牛血清, TNF- 组、IL-1 组以不含药大鼠血清调整血清体积分数 20%。空白对照组:培养基中加入 10% 不含药血清, 10% 胎牛血清。

1.5.2 黏附实验^[1]:培养的肺微血管内皮细胞按 1×10^5 /mL 接种于 96 孔板 (100 μ L/孔), 37[°]、湿度为 95%~100%、5% CO₂ 培养箱内培养至生长融合, 倾去培养基, 分别按 1.5.1 项分组处理, 每组 6 个复孔, 12 h 后倾去培养基, 用 37[°] 预热的 D-Hanks 液小心冲洗 2 次, 以每孔 100 μ L 加入白细胞悬液, 置 37[°]、湿度 95%~100%、5% CO₂ 培养箱孵育 1 h, 小心吸出未结合的白细胞悬液, 光镜下计数, 计算细胞黏附率, 每个样本计数 3 次, 取平均值。

细胞黏附率 = (加入白细胞计数值 - 未黏附白细胞计数值) / 加入白细胞计数值 \times 100%

1.6 肺微血管内皮细胞黏附分子表达测定^[3]

1.6.1 分组:分组同 1.5.1 项, 每组又分 1、3、6、12、24 h 亚组。

1.6.2 测定:肺微血管内皮细胞按 1×10^5 /mL 接种于 96 孔板 (100 μ L/孔), 37[°]、湿度 95%~100%、5% CO₂ 培养箱内培养至生长融合, 倾去培养基, 分别按 1.6.1 项分组处理, 每亚组 18 个复孔。在相应时间段结束后, 用 pH 7.2 PBS 洗板 2 次, 用 4[°] 冷丙酮固定 15 min, 用含 0.05% 聚山梨酯 20 的 PBS 洗板 3 次, 3% 兔血清封闭 30 min, 每孔 200 μ L, 洗板后分别加入抗 P-选择素、抗 E-选择素、抗 ICAM-1 抗体工作液 (1:200 PBS 稀释), 每孔 100 μ L, 37[°] 孵育 1 h, 洗板 3 次后加入辣根酶标记兔抗山羊 IgG (1:500), 每孔 100 μ L, 37[°] 孵育 1 h, PBS 洗板 3 次, 每孔加入 100 μ L 底物溶液 (含邻苯二胺 400 μ g/mL、30% H₂O₂ 5 μ L)。37[°] 作用 30 min, 每孔加入 1 mol/L H₂SO₄ 100 μ L 终止反应, 96 孔板在全自动酶标仪 492 nm 波长测吸光度 (A) 值。

1.7 统计:数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差分析, *q* 检验。

2 结果

2.1 肺微血管内皮细胞的培养:60 h 弃组织块时, 接种的肺组织块周围可见大量内皮细胞生长, 2~3 周单层汇合。细胞主要呈多角形、短梭形, 铺路石状排列, 分裂相细胞呈类圆形, 单层贴壁生长, 表现出接触抑制现象, 即细胞完全单层汇合后停止分裂。内皮细胞特异性抗原 (PECAM-1) 染色, 细胞胞浆阳性着色。

2.2 白细胞与内皮细胞黏附实验:肺微血管内皮细胞与含 TNF-、IL-1 的培养基共同孵育后, 可显著增加白细胞与内皮细胞的相互黏附作用, 与正常对照组相比差异显著 ($P < 0.01$); 在培养基中加入 HHF 含药血清后, 黏附率明显降低 ($P < 0.01$); 加入复方丹参注射液含药血清, 黏附率亦降低 ($P < 0.01$), 但其作用不如 HHF 明显 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 白细胞与内皮细胞黏附率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Comparison of adhesion rate between leukocyte and endothelial cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	黏附率/%	组别	黏附率/%
正常	12.72 \pm 1.91	IL-1	31.89 \pm 4.25 **
TNF	32.53 \pm 3.22 **	IL-1 + HHF	18.22 \pm 2.66 **
TNF + HHF	17.23 \pm 2.48 *	IL-1 + 丹参	24.40 \pm 2.63 **
TNF + 丹参	24.81 \pm 2.02 **		

与正常对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与相应模型组比较: $P < 0.01$; 与 HHF 组比较: $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal control group; $P < 0.01$ vs corresponding model group; $P < 0.01$ vs HHF group

2.3 肺微血管内皮细胞黏附分子表达: TNF-、IL-1 刺激肺微血管内皮细胞 3 h 后, ICAM-1 便明显增加, 与正常对照组相比差异显著 ($P < 0.01$), 此后逐渐增强, 12 h 达高峰, 虽然 24 h 有所下降, 但仍维持较高水平。HHF 含药血清对 ICAM-1 表达增强有显著抑制作用, 与相应模型组相比差异显著 ($P < 0.01$), 复方丹参注射液含药血清对 ICAM-1 的增强表达也有一定抑制作用, 但不如 HHF 明显。见表 2。

TNF-、IL-1 刺激肺微血管内皮细胞 1 h 后, E-选择素便明显增加, 与正常对照组相比差异显著 ($P < 0.01$), 此后逐渐增强, 3 h 达高峰, 6 h 明显下降, 12 h 已接近基线水平。HHF-I 含药血清对 E-选择素表达增强有显著抑制作用, 与模型组相比差异显著 ($P < 0.01$), 复方丹参注射液含药血清对 E-选择素的增强表达也有一定的抑制作用, 但其作用远不如 HHF-I 明显。见表 3。

TNF-、IL-1 刺激肺微血管内皮细胞 1 h 后,

P-选择素便明显增加,与正常对照组相比差异显著 ($P < 0.05$),此后逐渐增强,6~12 h 达高峰,24 h 明显下降。HHF-I 含药血清对 P-选择素表达增强有显著抑制作用,与模型组相比差异显著 ($P <$

0.01),复方丹参注射液含药血清对 P-选择素的增强表达也有一定的抑制作用,但其作用远不如 HHF-I 明显。见表 4。

表 2 HHF-I 对 TNF- α 和 IL-1 刺激肺微血管内皮细胞表达 ICAM-1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Table 2 Effect of HHF-I on expression of ICAM-1 in lung microvascular endothelial cells in rats stimulated by TNF- α and IL-1 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

组别	ICAM-1 (A)				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
正常	0.210 \pm 0.029	0.212 \pm 0.018	0.207 \pm 0.029	0.205 \pm 0.012	0.217 \pm 0.034
TNF- α	0.263 \pm 0.037 **	0.369 \pm 0.030 **	0.490 \pm 0.027 **	0.624 \pm 0.019 **	0.510 \pm 0.022
TNF- α + HHF-I	0.217 \pm 0.019	0.269 \pm 0.024	0.327 \pm 0.018	0.413 \pm 0.038	0.334 \pm 0.030
TNF- α + 丹参	0.215 \pm 0.021	0.322 \pm 0.013 #	0.404 \pm 0.019 #	0.517 \pm 0.050 #	0.433 \pm 0.021 #
IL-1	0.258 \pm 0.022 **	0.371 \pm 0.027 **	0.502 \pm 0.014 **	0.631 \pm 0.024 **	0.492 \pm 0.026
IL-1 + HHF-I	0.220 \pm 0.016	0.265 \pm 0.018	0.323 \pm 0.009	0.401 \pm 0.011	0.310 \pm 0.026
IL-1 + 丹参	0.220 \pm 0.016	0.324 \pm 0.012 #	0.400 \pm 0.013 #	0.507 \pm 0.010 #	0.409 \pm 0.018 #

与正常组比较: $P < 0.01$; 与相邻时间段比较: ** $P < 0.01$; 与相应模型组比较: $P < 0.01$; 与 HHF-I 组比较: # $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs normal group; ** $P < 0.01$ vs closed-time period; $P < 0.01$ vs corresponding model group; # $P < 0.01$ vs HHF-I group

表 3 HHF-I 对 TNF- α 和 IL-1 刺激肺微血管内皮细胞表达 E-选择素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Table 3 Effect of HHF-I on expression of E-selectin in lung microvascular endothelial cells in rats stimulated by TNF- α and IL-1 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

组别	E-选择素 (A)				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
正常	0.057 \pm 0.028	0.068 \pm 0.018	0.052 \pm 0.029	0.083 \pm 0.012	0.065 \pm 0.034
TNF- α	0.337 \pm 0.032 **	0.601 \pm 0.014 **	0.303 \pm 0.022	0.217 \pm 0.050	0.215 \pm 0.035
TNF- α + HHF-I	0.120 \pm 0.018	0.237 \pm 0.019	0.192 \pm 0.021	0.142 \pm 0.038	0.139 \pm 0.029
TNF- α + 丹参	0.221 \pm 0.022 #	0.397 \pm 0.022 #	0.253 \pm 0.027 #	0.214 \pm 0.017 #	0.209 \pm 0.030 #
IL-1	0.334 \pm 0.023 **	0.613 \pm 0.021 **	0.308 \pm 0.024	0.212 \pm 0.028 **	0.205 \pm 0.044
IL-1 + HHF-I	0.115 \pm 0.015	0.218 \pm 0.018	0.182 \pm 0.038	0.133 \pm 0.034	0.120 \pm 0.039
IL-1 + 丹参	0.212 \pm 0.026 #	0.414 \pm 0.014 #	0.274 \pm 0.024 #	0.210 \pm 0.027 #	0.206 \pm 0.024 #

表注同表 2

Notes are same to Table 2

表 4 HHF-I 对 TNF- α 和 IL-1 刺激肺微血管内皮细胞表达 P-选择素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Table 4 Effect of HHF-I on expression of P-selectin in lung microvascular endothelial cells in rats stimulated by TNF- α and IL-1 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

组别	P-选择素 (A)				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
正常	0.148 \pm 0.030	0.139 \pm 0.018	0.142 \pm 0.025	0.135 \pm 0.019	0.139 \pm 0.036
TNF- α	0.231 \pm 0.021 **	0.378 \pm 0.014 **	0.504 \pm 0.028	0.600 \pm 0.022 **	0.445 \pm 0.023
TNF- α + HHF-I	0.153 \pm 0.018	0.186 \pm 0.019	0.249 \pm 0.026	0.331 \pm 0.039	0.241 \pm 0.022
TNF- α + 丹参	0.184 \pm 0.024 #	0.287 \pm 0.018 #	0.392 \pm 0.020 #	0.449 \pm 0.019 #	0.337 \pm 0.033 #
IL-1	0.232 \pm 0.020 **	0.392 \pm 0.020 **	0.511 \pm 0.025 **	0.620 \pm 0.023 **	0.448 \pm 0.018
IL-1 + HHF-I	0.124 \pm 0.010	0.208 \pm 0.013	0.242 \pm 0.028	0.326 \pm 0.026	0.242 \pm 0.023
IL-1 + 丹参	0.157 \pm 0.016 #	0.285 \pm 0.019 #	0.404 \pm 0.017 #	0.419 \pm 0.016 #	0.346 \pm 0.023 #

表注同表 2

Notes are same to Table 2

3 讨论

目前有关细胞因子对内皮细胞表达的黏附分子的调控研究,绝大部分是在脐静脉等大血管内皮细胞上进行^[4],但由于白细胞-内皮细胞黏附主要发生在微血管,而大血管内皮细胞与微血管内皮细胞在

生物学上及对各种物质的反应性均不同^[5],培养人脐静脉内皮细胞用于研究炎症介质及细胞因子对黏附分子的调节,能否反映微血管内皮细胞对炎症介质及细胞因子的反应特征,目前仍有争论^[6~9]。而且不同部位微血管内皮细胞的生物学形状也不尽相

同,这就要求不同的研究目的,要选用比较合适的细胞模型。

肺微血管内皮细胞的体外培养在技术上一直比较困难。1995 年 Chen^[1]等建立了肺周边组织块法,用于培养肺微血管内皮细胞,不但大大地简化了肺微血管内皮细胞的培养,而且避免了在细胞分离过程中的机械或化学损伤,提高了培养成功率。本实验对该方法稍加改进,大鼠处死后经右心用 D-Hanks 液进行肺循环灌注,清除了肺循环中滞留的血液,避免了培养过程中血细胞对内皮细胞的影响,很大程度上提高了培养成功率;另外,增加了组织块接种数,使获得的细胞数明显增加。

TNF- α 、IL-1 是 SAP 病理生理过程中的炎性细胞因子,在 SAP 由局部损害向全身并发症进展过程中起重要作用^[10]。TNF- α 、IL-1 作用机制之一就是上调黏附分子的表达,从而促使白细胞-内皮细胞黏附,跨内皮迁移,引起毛细血管通透性增加及组织损害^[11]。

本实验动态观察了 TNF- α 、IL-1 对体外培养大鼠肺微血管内皮细胞表达黏附分子的影响。结果表明,TNF- α 、IL-1 处理内皮细胞,显著增加白细胞-内皮细胞的黏附率,可以引起大鼠肺微血管内皮细胞黏附分子表达的明显上调,该结果与 Shen^[12]等在体外培养人内皮细胞上发现的结果相一致。但 Guttorm 等^[13]以 TNF- α 、IL-1 刺激体外培养的人肠微血管内皮细胞,发现 E-选择素可持续高表达很长时间,特别是 IL-1 刺激后 72 h 仍可检测到 E-选择素的高水平表达,这可能是由于内皮细胞类型不同的缘故。

HHF-I 是从治疗 SAP 有效方剂中的活血化瘀中药中筛选出的疗效最好的重要制剂,研究已证明 HHF-I 能抑制 SAP 大鼠在肠系膜毛细血管后静脉白细胞内皮细胞的过度黏附,减少白细胞在胰腺、肺和小肠组织的募集,降低肺和小肠组织黏附分子的上调^[1-3]。本实验结果表明,HHF-I 能显著降低

TNF- α 、IL-1 引起的白细胞内皮细胞的过度黏附率,抑制 TNF- α 、IL-1 引起的肺微血管内皮细胞表达的黏附分子的上调,从细胞水平进一步证明了 HHF-I 在调控白细胞内皮细胞黏附中的作用。

References:

- [1] Chen S F, Xia P, Li S H. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries [J]. *Microvas Res*, 1995, 50(1): 119-128.
- [2] Zhang Y J, Zhao L G, Wu X Z. Inhibitory effect of Huoxue huayu Injection (HHF-I) on leukocyte aggregation of acute and severe type pancreatitis in pancreas and lung of rat [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(6): 537-540.
- [3] Jane A, Wendy J, Handelsman D J, et al. Androgen exposure increases human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial cell expression of vascular cell adhesion molecule-1 [J]. *Circulation*, 1999, 99: 2317-2322.
- [4] Bevilacqua M P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules [J]. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11: 767.
- [5] Gumkowski F, Kminka G, Kaminski M, et al. Heterogeneity of mouse vascular endothelium [J]. *Blood Vessels*, 1987, 24: 11.
- [6] Abbot S E, Kaul A, Stevens C R, et al. Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium [J]. *Arthritis Rheum*, 1993, 36: 593.
- [7] Gerritsen M E, Niedbata M J, Szczepanski A, et al. Cytokine activation of human macro- and microvessel-derived endothelial cells [J]. *Blood Cells*, 1993, 19: 325.
- [8] Swerlick R A, Lee K H, Lawley T J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 on human dermal microvascular endothelial cells [J]. *J Immunol*, 1992, 149: 698.
- [9] Petzelbauer P, Bender J R, Wilson J, et al. Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture [J]. *J Immunol*, 1993, 151: 5062.
- [10] Norman J G. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis [J]. *Am J Surg*, 1998, 175: 76-83.
- [11] Kusske A M, Rongione A J, Reber H A, et al. Cytokines and acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 1996, 110: 639-642.
- [12] Shen J K, Richard G, Soverin K. Expression of adhesion molecules in cultured human pulmonary microvascular endothelial cells [J]. *Microvas Res*, 1995, 50: 360-372.
- [13] Guttorm H. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human intestinal microvascular endothelial cells [J]. *J Immunol*, 1996, 156: 2558-2565.

生骨灵颗粒促进骨折愈合的实验研究

叶日乔¹, 李 茂², 韦宝伟^{2*}

(1. 广西中医学院瑞康医院, 广西南宁 530011; 2. 广西中医药研究所, 广西南宁 530011)

生骨灵颗粒具有活血祛瘀、消肿止痛、强筋健骨

的功效,临床辅助治疗骨折疗效显著。为进一步研