

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 D2 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。

TNF2A、IL21B 是 SAP 病理生理过程中的炎症细胞因子,在 SAP 由局部损害向全身并发症进展过程中起重要作用^[10]。TNF2A、IL21B 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 TNF2A、IL21B 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, TNF2A、IL21B 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 TNF2A、IL21B 刺激体外培养的人肠微血管内皮细胞,发现 E2 选择素可持续高表达很长时间,特别是 IL21B 刺激后 72 h 仍可检测到 E2 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。

HH21 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 HH21 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,HH21 能显著降低

TNF2A、IL21B 引起的白细胞内皮细胞的过度黏附率,抑制 TNF2A、IL21B 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 HH21 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 I A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries [J] *Micovas Res*, 1995, 50(1): 112-128
- [2] Zhang Y J, Zhao L G, Wu X Z I Inhibitory effect of Huoxue huayu Injection (HH21) 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): 532-540
- [3] Jane A, Wendy J, Handelsman D J, et al Androgen exposure increases human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial cell expression of vasculare cell adhesion molecule 1 [J] *Circulation*, 1999, 99: 2317-2322
- [4] Bevilacqua M P I 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: 111
- [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 macrophage and microvesicle derived endothelial cells [J] *Blood Cells*, 1993, 19: 325
- [8] Swerlick R A, Lee K H, Lawley T J I 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 I The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis [J] *Am J Surg*, 1998, 175: 762-831
- [11] Kusske A M, Rongione A J, Reber H A, et al. Cytokines and acute pancreatitis [J] *Gastroenterology*, 1996, 110: 632-642
- [12] Shen J K, Richard G, Soverin K I Expression of adhesion molecules in cultured human pulmonary microvascular endothelial cells [J] *Micovas Res*, 1995, 50: 362-372
- [13] Guttorm H. Cytokine regulated expression of E2selectin, intercellular adhesion molecule 21 (ICAM21), and vascular cell adhesion molecule 21 (VCAM21) in human intestinal microvascular endothelial cells [J] *J Immunol*, 1996, 156: 2552-2561

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^{2X}

(11 广西中医学院瑞康医院, 广西 南宁 530011; 21 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

究其药理作用及机制, 本实验观察生骨灵颗粒对大鼠及小鼠骨折模型的影响, 为其临床应用提供依据。

1 材料

111 动物: SD 大鼠 (180~ 210 g) 和 NIH 小鼠 (20~ 24 g), 由广西中医药研究所动物室提供。实验室温度 (26 ± 2) °C, 相对湿度 (70 ± 3)%。

112 药物: 生骨灵颗粒使用其提取的浓缩液, 含原药材 1179 g/mL, 由广西中医药研究所制药厂提供, 批号 990208 (临床拟用剂量为口服颗粒 10 g/d, 相当于原药材 01279 g/kg。临用时浓缩液加水稀释, 使各剂量组给药体积相等)。伤科接骨片, 大连中药厂出品, 批号 9808246, 规格: 013 g/片。

113 试剂与仪器: 二甲苯, 广州化学制药厂生产, 批号 951020; 醋酸, 广西南宁化学试剂厂生产, 批号 951004; 扭力天平, 上海第二天平仪器厂; 恒温水浴箱, 北京医疗设备厂。

2 方法与结果

211 小鼠骨折试验^[1]: 取雄性小鼠 60 只, 体重 22~ 25 g, 用手将小鼠右腿下肢向内侧对折 90°, 同时听到骨折断的声音和感觉到骨折断, 造成小鼠骨折模型, 均不包扎固定, 随机分为 4 组, 每组 15 只。生骨灵颗粒各组分别 ig 生骨灵颗粒 1013、511 g/kg (分别为临床拟用量 3619、1813 倍), 阳性对照组 ig 伤科接骨片 115 g/kg (为临床用量 25 倍), 模型组 ig 蒸馏水 20 mL/kg, 均每天 1 次。分别于给药后 10、20、30 d 每组分批各处死 5 只小鼠, 取小鼠右腿下肢股骨, 10% 甲醛溶液固定, 去掉软组织, 10% 硝酸脱钙, 石蜡切片, 苏木素2伊红染色, 观察骨痂组织学的变化。疗效判断标准: 断端软骨细胞骨化小于 50% (+), 断端软骨细胞骨化 50% (++) , 断端软骨细胞骨化大于 50% (+++)。各组结果与模型组比较, 作等级序值法统计分析, 见表 1。结果显示生骨灵颗粒能促进小鼠骨断端软骨细胞的骨化, 有利于骨折的愈合。

表 1 生骨灵颗粒对小鼠骨组织的影响

Table 1 Effect of Shengguling Granule on mice bone tissue

组别	剂量 (g/kg ⁻¹)	10 d			20 d			30 d		
		+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
生骨灵颗粒	1013	0	3	2**	0	1	4**	0	0	5**
	511	1	4	0*	0	2	3**	0	1	4**
阳性对照	115	2	2	1	1	1	3*	0	1	4**
模型	-	5	0	0	5	0	0	5	0	0

与模型组比较: * P < 0105 ** P < 0101

* P < 0105 ** P < 0101 vs model group

212 大鼠骨折试验: 取 SD 雄性成年大鼠 60 只, 戊巴比妥钠麻醉, 碘酒及酒精消毒大鼠右腿, 横向锯割手术造成下肢胫腓骨中段 3 mm 完全缺损, 术毕缝合切口, 不予覆盖包扎, ip 青霉素抗感染, 连续 3 d, 造成大鼠骨折模型。将模型大鼠随机分为 4 组, 分组及给药同 211 项, 每天 1 次, 连续 30 d。分别于药后 15、30 d, 每组随机取 10 只大鼠麻醉后, 采用 47 kV、100 mA、016 s、90 cm 条件下拍摄 X 光片, 采用上海市骨伤科研究所 X 光片评价标准评级^[2]。结果显示, 骨折后第 15 天生骨灵颗粒两个剂量组的 X 光片有较明显改变, 大鼠骨折端模糊, 有骨痂形成, 有轻度骨膜反应, 以大剂量组作用明显, 阳性对照组也有同样作用; 而模型组仅表现为骨折端模糊, 有轻度骨膜反应, 个别骨痂可见; 但统计学检验差异无显著性。骨折后 30 d, 生骨灵颗粒组缺损处有较多骨痂形成, 大剂量组有 4 只而模型组仅有 1 只 (取样 10 只) 大鼠骨折缺损处已愈合, 生骨灵颗粒组与模型组比较, 用等级序值法统计分析差异显著

(P < 0105), 见表 2。

表 2 X 光片检查生骨灵颗粒对大鼠骨折愈合的影响

Table 2 Effect of Shengguling Granule on healing of rat fracture by X-ray

组别	剂量 (g/kg ⁻¹)	15 d				30 d			
		+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
生骨灵颗粒	1013	4	3	3	0	0	3	1	6*
	511	6	2	2	0	0	6	3	1
阳性对照	115	4	6	0	0	0	5	5	0
模型	-	6	3	1	0	0	7	2	1

与模型组比较: * P < 0105

* P < 0105 vs model group

213 抗折力试验: 212 项中各组大鼠给药 30 d 后, 停药观察 5 d 后处死, 取各组大鼠右后腿剥离肌肉, 用 10% 甲醛溶液固定, 分离出胫腓骨, 按文献方法^[3]测定各鼠骨折处抗折力 (折断力, kg)。最后将骨折断端做病理切片, 观察骨折处骨痂骨组织愈合程度 (评级标准同 211 项), 结果见表 3。生骨灵颗粒两个剂量组的抗折力明显高于模型组, 差异显著

($P < 0.01$), 表明生骨灵颗粒能促进大鼠骨折端软骨细胞骨化。

表 3 生骨灵颗粒对大鼠抗折力及骨组织的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Shengguling Granule on antibraked force and bone tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg ⁻¹)	动物数 /只	抗折力 /kg	断端软骨细胞		
				全部骨化	50% 骨化	小于 50% 骨化
生骨灵颗粒	101.3	11	81.43 ± 11.66**	8**	3**	0**
	51.1	11	71.21 ± 21.74**	8**	3**	0**
阳性对照	11.5	9	81.83 ± 21.79**	9**	0**	0**
模型	-	10	21.40 ± 01.76	0	8	2

与模型组比较: ** $P < 0.01$ (t 检验)

** $P < 0.01$ vs model group (t test)

21.4 小鼠腿部软组织撞击损伤试验: 选取 NIH 小鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 23~25 g。每鼠右后足腿部剪毛, 用 200 g 砝码, 在 20 cm 高度的圆筒内自由落下, 经砧木锤伤右后腿软组织, 锤击后肉眼可见锤击部位皮下有出血块, 数分钟后看见明显肿胀。次日将软组织损伤的小鼠随机分组并给药, 方法同 21.1 项, 每天 1 次, 连续 6 d, 末次给药后 24 h 处死小鼠, 取下右后腿, 剥离皮肤, 按动物软组织损伤的实验方法观察评分^[4]。结果生骨灵颗粒两个剂量组和阳性对照组的评分均比模型组低, 经等级序值法统计分析, 差异显著 ($P < 0.05$), 见表 4。

表 4 生骨灵颗粒对小鼠软组织撞击损伤的影响

Table 4 Effect of Shengguling Granule on stroke injury of mice soft tissue

组别	剂量 (g/kg ⁻¹)	评分			
		0	1	2	3
生骨灵颗粒	101.3	2	8	0	0*
	51.1	0	8	2	0*
阳性对照	11.5	1	9	0	0*
模型	-	5	5	5	0

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

3 讨论

骨折愈合过程是一个复杂的组织学、生物学、神经内分泌学及骨生物力学的动态过程。临床上, 各种原因所致的骨折延迟愈合和骨折不愈合是常见病。本实验研究表明, 生骨灵颗粒能促进小鼠骨折断端软骨细胞骨化, 促进骨折的愈合; 明显促进大鼠骨折断端骨膜反应及骨痂生成, 提高骨痂质量, 明显增强抗折力; 明显减轻小鼠右腿部软组织撞击损伤所致水肿, 加速瘀血的吸收, 促进损伤的修复。由此可见, 生骨灵颗粒具有明确的促进骨折愈合效果, 为临床应用提供了可靠的理论依据。

References:

- [1] Qiu T1 The influence of Conjoint fracture Pellet on the callus of femur fracture in mice [J] J Gansu Coll Tradit Chin Med (甘肃中医学院学报), 1989, 6(1): 501
- [2] Liu Y S. The experimental research about the influence of Conjoint fracture Pellet on fracture in rabbit [J] Fujian J Tradit Chin Med (福建中医药), 1994, 25(3): 192-221
- [3] Liu R T1 The research on traditional Chinese medicine Conjoint fracture Pellet promoting fracture healing [J] 1 Tianjin J Tradit Chin Med (天津中医药), 1962, 4(8): 4571
- [4] Zhou G L1 An experimental method about animal soft tissue injury [J] 1 Acta Pharmacol Sin (中国药理学通报), 1991, 7(5): 3961

丹参素对缺糖2缺氧损伤神经细胞的保护作用

张文生¹, 朱陵群², 牛福玲^{2,X}

(11 北京师范大学资源学院, 北京 100875; 21 北京中医药大学东直门医院 中医内科学教育部重点实验室, 北京 100700)

研究表明脑组织缺血性损伤过程中存在着神经细胞凋亡^[1], 且神经细胞凋亡在缺血性脑损伤中起十分重要的作用。药物可通过干预神经细胞凋亡过程阻止缺血性损伤的进一步发展, 而发挥对神经细胞损伤的保护作用。细胞内 Ca^{2+} 超载是缺血性脑

损伤的发病机制之一, 在缺血后神经元凋亡发生中也起关键作用, 而钙离子抑制剂或药物可抑制细胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 升高, 可阻止凋亡的发生^[2,3]。丹参素是丹参的有效活性成分, 具有抗缺血缺氧、抗自由基、抑制细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高等作

X 收稿日期: 200321224

作者简介: 张文生(1966), 男, 河北衡水市人, 副教授, 医学博士, 现任北京师范大学资源学院资源药物与中药资源研究所副所长, 研究方向为中药神经药理及中药资源研究。Tel: (010) 62205268 E2mail: zws@bnu.edu.cn