

· 实验研究 ·

# 活血化瘀注射液对大鼠肺微血管内皮细胞与白细胞粘附率的影响

\* 张艳军

(天津中医学院 300193)

赵连根 吴咸中

(天津市中西医结合急腹症研究所 300100)

**摘要** 观察活血化瘀注射液(HH-I)对细胞因子诱发的体外培养大鼠肺微血管内皮细胞与白细胞粘附率的影响。结果表明肺微血管内皮细胞与含肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 培养基共同孵育后,可显著增加白细胞与内皮细胞的相互粘附作用,与正常对照组相比,有显著性差异( $P < 0.01$ );在培养基中加入HH-I或HH-I含药血清后,则粘附率明显降低( $P < 0.01$ )。提示抑制白细胞内皮细胞的过度粘附,是活血化瘀重要的作用机理之一。

**关键词** 活血化瘀注射液 肺微血管内皮细胞 白细胞 粘附率 细胞因子

中图分类号:R 289.5 文献标识码:A 文章编号:1005-1180(2001)02-0020-03

白细胞尤其是中性粒细胞被认为与急性重型胰腺炎(SAP)时胰腺局部炎症的恶化和胰外器官损害的发生有密切关系。白细胞内皮细胞粘附是白细胞经内皮迁移游出,在组织间隙募集(recruitment)的关键步骤,是白细胞导致组织破坏发挥病理效应的先决条件。活血化瘀注射液(HH-I)可改善大肠、胰腺血液的动力学<sup>[1][2]</sup>,并证实与抑酶注射液(YHI)合用能延长重型急性胰腺炎家兔存活时间,提高存活率<sup>[3]</sup>。我们已证实HH-I能够明显减少SAP发生时肠系膜毛细血管后静脉白细胞滚动、粘附的增加,并使血流速度和壁切率恢复正常<sup>[4]</sup>。在此基础上,我们进一步观察了活血化瘀注射液对细胞因子诱发的体外培养大鼠肺微血管内皮细胞与白细胞粘附率的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

倒置显微镜(TE300, Nikon), CO<sub>2</sub> 培养箱(美国)。NMEM/F12 培养基(Gibco), 特优级胎牛血清(Hiclone), 胰蛋白酶(Sigma), rIL-1, rTNF- $\alpha$ (北京帮定生物医学公司), 高分子右旋糖苷(Dextran500, Sigma)其他常用试剂均为国产分析纯。

HH-I由本所药厂制备,3%溶液浓度相当中药

成分100%。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Chen<sup>[5]</sup>的方法进行,并稍加改进。

取全重约150g的健康Wistar大鼠(军事医学科学院四所),雌雄不限。大鼠以10%乌拉坦腹腔注射麻醉,10ml/kg体重,同时腹腔注射肝素钠3000U。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1mm<sup>3</sup>左右大小的组织块,D-Hanks液3~5次,100目尼龙网过滤。用吸管将肺组织块均匀种于25cm<sup>2</sup>的塑料培养瓶(Nunc)中,15~20块/瓶。瓶底超上,置37℃、湿度为95%~100%、5%CO<sub>2</sub>培养箱内孵育1.5~2小时,小心加入含20%胎牛血清、100U/ml青霉素、100 $\mu$ g/ml链霉素的DMEM/F12培养基,重置培养箱内静置培养,60小时后,弃组织块,继续培养。2~3天换液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。第三代细胞进行实验。

\* 天津市卫生局科研基金资助课题(98KY-9)

### 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, 肝素抗凝, 按体积比 1:1 加入无菌的 6% 分子量为 50 万的右旋糖苷 (Dextran500) 生理盐水溶液, 反复翻覆 40 次, 使其混匀; 竖直静置于 37℃ 温箱内使其沉降, 10 分钟后可见清晰分层, 以吸管小心吸取上层富含白细胞的血清, 其余部分继续沉降, 出现清晰分层后即可吸取上清, 如此沉降 1.5 小时, 将富含白细胞的上清收集于离心管, 1500 转/分, 离心 10 分钟, 弃上清。加入 8 ml 冷三蒸水, 轻轻混匀, 使红细胞被低渗破坏, 1 分钟后加入 2 ml 4.5% 氯化钠溶液, 轻轻摇匀。以生理盐水洗 2 次, 1500 转/分, 离心 10 分钟; 用含 20% 胎牛的血清的 DMEM/F12 制成  $1 \times 10^6$  个白细胞/ml 细胞悬液, 经常规台盼蓝检查活细胞 > 95% 者备用。

### 1.4 HHI- I 含药血清制备

健康 Wistar 大鼠 5 只, 体重 250-300 g, 雌雄不限。经颈静脉输入 3% HHI- I 3 ml/小时, 连续 3 小时。0.5 小时后, 心脏采血, 制备血清, 56℃ 灭活 0.5 小时, 低温冰箱保存备用。

### 1.5 白细胞与内皮细胞粘附实验

1.5.1 实验分组 TNF- $\alpha$  组: 培养基中加入 TNF- $\alpha$ , 终浓度 1000 U/L; TNF- $\alpha$ +HHI- I 组: 培养基中加入 HHI- I, 终浓度 60  $\mu$ L/ml; TNF- $\alpha$ +HHI- I2) 组: 培养基中加入 HHI- I 含药血清, 终浓度 10%; TNF- $\alpha$ +丹参组: 培养基中加入复方丹参注射液, 终浓度 60  $\mu$ L/ml; L-1 组: 培养基中加入 L-1, 终浓度 100 U/ml; L-1+HHI- I 组: 培养基中加入 HHI- I, 终浓度 60  $\mu$ L/ml; L-1+HHI- I2) 组: 培养基中加入 HHI- I 含药血清, 终浓度 10%; L-1+丹参组: 培养基中加入复方丹参注射液, 终浓度 60  $\mu$ L/ml; 以上各组培养基中均含有 10% 胎牛血清, 并以不含药大鼠血清调整血清终浓度为 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 粘附实验<sup>[5]</sup> 培养的肺微血管内皮细胞按  $1 \times 10^5$ /ml 浓度接种于 96 孔板 (100  $\mu$ l/孔), 37℃, 湿度为 95% - 100%, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养至生长融合后, 倾去培养基, 分别按上述分组处理, 每组 6 复孔, 12 小时后倾去培养基, 用 37℃ 预热的 D-Hanks 液小心冲洗 2 次, 然后以 100  $\mu$ l/孔的量将白细胞悬液加入 96 孔培养板中, 置 37℃, 湿度为 95% - 100%, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 小时, 小心吸出未结合的白细胞悬液, 光镜下计数, 以加入和吸出白细胞的量之差计算白细胞粘附的值, 每个样本计数 3 次, 取平均值。粘附率按以下

公式计算:

细胞粘附率 = (加入的白细胞计数值 - 未粘附白细胞计数值) / 加入的白细胞计数值  $\times$  100%

### 1.6 统计方法

方差分析, F 检验, 两两比较, u 检验。

## 2 结果

### 2.1 肺微血管内皮细胞的培养

60 小时弃组织块时, 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。细胞主要呈现多角形、短梭形, 铺路石状排列, 分裂相细胞呈现类圆形, 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, 细胞浆阳性着色。

### 2.2 白细胞与内皮细胞粘附率

肺微血管内皮细胞与含 TNF- $\alpha$  L-1 $\beta$  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粘附作用, 与正常对照组相比, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 在培养基中加入 HHI- I 或 HHI- I 含药血清后, 则粘附率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 在培养基中加入复方丹参注射液, 虽然也可以降低粘附率 ( $P < 0.01$ ), 但其作用不如 HHI- I 明显 ( $P < 0.01$ )。表 1

表 1 各组白细胞与内皮细胞粘附率比较

组别	n	粘附率 (%)
正常对照组	6	12.72 $\pm$ 1.91
TNF- $\alpha$ 组	6	32.53 $\pm$ 3.22 * *
TNF- $\alpha$ +HHI- I(1) 组	6	16.27 $\pm$ 1.80 *
TNF- $\alpha$ +HHI- I(2) 组	6	17.23 $\pm$ 2.48 *
TNF- $\alpha$ +丹参组	6	24.81 $\pm$ 2.02 * *
L-1 组	6	31.89 $\pm$ 4.35 * *
L-1+HHI- I(1) 组	6	17.27 $\pm$ 2.05 *
L-1+HHI- I(2) 组	6	18.22 $\pm$ 2.66 * *
L-1+丹参组	6	24.4 $\pm$ 2.63

\* 与正常对照组相比  $P < 0.05$

\* \* 与正常对照组相比  $P < 0.01$

与相应模型组相比  $P < 0.01$

与 HHI- I 组相比  $P < 0.01$

## 3 讨论

目前在有关细胞因子对内皮细胞表达的粘附分子的调控研究, 绝大部分是在人脐静脉等大血管内皮细胞上进行<sup>[5]</sup>, 但由于白细胞内皮细胞粘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

学及对各种物质的反应性均不同<sup>[6]</sup>,培养人脐静脉内皮细胞用于研究炎症介质及细胞因子对粘附分子的调节,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。而且不同部位微血管内皮细胞的生物学形状也不尽相同,这就要求我们要根据自己的研究目的,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。95年Chen<sup>[5]</sup>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。该方法主要根据细胞从组织游出的时间差来分离内皮细胞,组织块培养过程中,最早游出的是血细胞,以后为内皮细胞,60-70小时以后主要是成纤维细胞,只要掌握好组织块去除时间(60-70小时),就能够获得纯度较高的内皮细胞。我们对该方法稍微进行了改进,首先,将大鼠处死后,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,由报道的每45cm<sup>2</sup>接种10块增加到每25cm<sup>2</sup>接种10-20块,使获得的细胞数明显增加。

TNF- $\alpha$  L-1 $\beta$ 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<sup>[7]</sup>。有研究表明,复制AP模型后30分钟,胰腺就有明显的组织学改变,其中腺泡细胞TNF- $\alpha$  L-1 $\beta$ 表达明显升高<sup>[8]</sup>,且细胞因子释放到血循环后,在肺、脾、肝中迅速升高,并发全身性炎症反应综合征(SIRS),最终导致多脏器功能衰竭(MOF)<sup>[9]</sup>。TNF- $\alpha$  L-1 $\beta$ 作用机制之一就是上调粘附分子的表达,从而促使白细胞内皮细胞粘附、跨内皮迁移,引起毛细血管通透性增加及组织损害<sup>[10]</sup>。

鉴于TNF- $\alpha$  L-1 $\beta$ 在SAP中的重要作用及成人呼吸窘迫综合征(ARDS)在SAP并发症中的地位,我们观察了HHI-1对TNF- $\alpha$  L-1 $\beta$ 诱发体外培养

大鼠肺微血管内皮细胞与白细胞粘附率的影响。结果表明,TNF- $\alpha$  L-1 $\beta$ 处理内皮细胞,显著增加白细胞内皮细胞的粘附率,HHI-1能显著降低TNF- $\alpha$  L-1 $\beta$ 引起的白细胞内皮细胞的粘附率。HHI-1是我们从治疗胰腺炎有效方剂中的活血化瘀中药中筛选出的疗效最好的中药制剂,我们已证明HHI-1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粘附,结合本实验结果,进一步说明抑制白细胞内皮细胞的过度粘附是活血化瘀中药的作用机理之一。

### 参考文献

- 1 赵连根,张虹,孟青竹,等.活血化瘀注射液对大小肠血液动力学的影响.中西医结合杂志,1989;9(12):731
- 2 赵连根,高淑娟,陈玉玲,等.活血化瘀注射液对大小肠血液动力学的影响.中草药,1993;(3):140
- 3 赵连根,伍孝先,韩恩琨.YHI及HHI-1对家兔实验性急性胰腺炎的保护作用.中国中西医结合外科杂志,1997;3(5):301-5
- 4 赵连根,陈玉玲.活血化瘀注射液对急性胰腺炎大鼠肠系膜活体微循环的影响.中国中西医结合外科杂志,2001;(1):18-20
- 5 Chen SF, Xia p, Li SH. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. Microvas Pes 1995;50(1):119-128
- 6 Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. Annu Rev Immunol 1993;11:767.
- 7 Noman JG. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. Am J Surg 1998;175:76-83
- 8 Noman JG, Fink GW, Franz MG. Acute pancreatitis intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. Arch Surg 1995 Sep;130(9):966-70
- 9 Noman JG, Fink GW, Denham W, et al. Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction. Dig Dis Sci 1997 Aug;42(8):1783-8
- 10 Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA, et al. Cytokines and acute pancreatitis. Gastroenterology 1996;110:639-642

(收稿日期:2000-12-05)

# 讲究卫生

# 减少疾病

· 公益广告 ·