

黄连解毒汤含药血清对 LPS/TNF- α 诱导的人中性粒细胞 与血管内皮细胞间粘附的影响

方素萍, 邱全琰, 郝 钰
(北京中医药大学, 北京 100029)

摘要: 以体外培养的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为模型, 应用蛋白染料染色法, 观察 HLJDT 含药血清及其与 LPS/INF- α 共同处理 HUVEC 4h、12h、24h 后, 对中性粒细胞与血管内皮细胞粘附的影响。结果显示, HLJDT 含药血清不仅能抑制非致炎状态下中性粒细胞与血管内皮细胞的粘附, 而且能抑制致炎因子所诱导的中性粒细胞与血管内皮细胞粘附作用增强, 这可能是黄连解毒汤抗炎作用的机制之一。

关键词: 黄连解毒汤; 含药血清; 中性粒细胞; 人脐静脉内皮细胞; 细胞粘附

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)02-0031-03

Influence of Herbage Containing Serum of HuangLianJieDu Tang on LPS or TNF- α Induced Neutrophil-Endothelium Cells Adhesion

FANG Su-ping, QIU Quan-ying, HAO Yu
(Beijing University of TCM, Beijing 100029)

Abstract: Objects: To investigate the influence of herbage containing serum of HuangLianJieDu Tang (HLJDT) on LPS or TNF- α induced neutrophil-endothelium adhesion and its anti-inflammation mechanism. Methods: Based on the model of Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Rose Bengal Stain was used to study the influence of herbage containing serum of HLJDT on LPS or TNF- α induced neutrophil-endothelium adhesion by pretreated HUVEC 4h, 12h, 24h. Results: The results showed the serum of 1.5h group can decrease cells adhesion by pretreated HUVEC with serum only, but all serum can decrease LPS/INF- α induced cells adhesion by pretreated HUVEC with serum and LPS or TNF- α . Conclusion: The herbage containing serum of HLJDT can decrease the neutrophil-endothelium cells adhesion, inhabiting neutrophil transude from vessel, which may be one of its anti-inflammation mechanisms.

Key words: HuangLianJieDu Tang; herbage containing serum; neutrophil; Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC); cell adhesion

急性炎症早期, 炎症部位多种前炎症因子激活中性粒细胞及血管内皮细胞, 介导中性粒细胞在血管内皮细胞上滚动、粘附, 继而穿越血管内皮细胞向炎症部位移行和聚集^[1]。近年来, 中性粒细胞与血管内皮细胞的粘附在炎症反应中的重要作用已成为抗炎研究的新重点。黄连解毒汤经医家多年临床验证, 具有良好的清热解毒消炎疗效。初步试验研究证实连续给药三天所取大鼠黄连解毒汤(HLJDT)含

药血清, 可抑制非致炎状态下中性粒细胞与血管内皮细胞间的粘附。因此本实验进一步动态观察了给药 3d 后不同时段所取的 HLJDT 含药血清对 LPS 和 TNF- α 诱导的中性粒细胞与血管内皮细胞粘附的影响。

1 材料

1.1 试剂 I 型胶原酶、虎红(Rose Bengal) LPS(美国 SIGMA), M199 培养基、胎牛血清(美国 GIBCO), 内皮细胞生长因子(EGCG 德国 B.M), 胰酶(美国 DIFCO), 抗 VIII 因子相关抗原单克隆抗体及免疫组化染色 SP 试剂盒(美国 ZYMED), 重组人 TNF- α (北京邦定试剂公司)

收稿日期: 2000-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 No: 39970949 和高等学校博士学科点专项基金资助项目 No: 9858

1.2 实验用药 黄连解毒汤的制备 黄连 6g、黄芩 6g、黄柏 6g、栀子 9g, 以水浸泡 2h, 旺火煮沸后文火煎煮 40min, 取一煎液, 再加水煎煮 15min 后取二煎液, 二液合并浓缩成含生药 0.63g/ml。HLJDT 含药血清的制备 Wistar 大鼠 30 只, 雄性, 体重 225 ± 6.8 g, 给药前禁食不禁水 4h, 每天间隔 12h 按 6.3g 生药/kg 体重各灌胃给药 1 次, 连续给药 3d, 末次给药后分别于 0.5、1、1.5、2、2.5h 无菌取血制备含药血清。对照血清组代以生理盐水灌服。各组血清均经 56°C 30min 灭活, -20°C 冰箱保存备用。使用时用不完全 M199 培养液稀释成所需浓度。

2 实验方法

2.1 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的原代培养与传代及鉴定 参照文献^[5]进行。实验用第 2~4 代。用第 VIII 因子相关抗原(SP 免疫细胞化学染色法)检测、鉴定内皮细胞。

2.2 人外周血中性粒细胞(PMN)的制备 抽取健康成人志愿者静脉血, 肝素抗凝, 按文献^[4]用细胞分层液分离后, 取粒细胞层, 经 PBS 洗两次后用完全 M199 重悬备用, 使细胞纯度和活力均达 95% 以上。

2.3 中性粒细胞与血管内皮细胞粘附实验 96 孔板内的 HUVEC 融合成单层时, 每孔加入各取血时间 10% 浓度的含药血清(对照孔加对照血清、空白孔不加血清, 每组 4 复孔)、含药血清+TNF- α (1000u/ml)(对照孔加对照血清+TNF- α 、空白孔加 TNF- α 而不

加血清)、含药血清+LPS(1ug/ml)(对照孔对照血清+LPS、空白孔加 LPS 而不加血清)继续培养 4h、12h、24h, 弃去上清, PBS 洗 2 次, 加入上述中性粒细胞, $3 \sim 5 \times 10^5$ 细胞/孔, 37°C 5% CO_2 孵箱内孵育 1h 后, PBS 洗去未粘附细胞, 加入 0.25% 虎红 100 μl /孔, 室温作用 10min, 洗去游离虎红, 加入 PBS-乙醇(1:1) 200 μl /孔, 1h 后, 酶标仪 570nm 测 A 值。

2.4 统计方法 t 检验。数据统计用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用图表表示细胞粘附抑制百分率%: 细胞粘附抑制百分率% = $(1 - \text{实验孔 A 值} / \text{对照孔 A 值}) \times 100\%$

3 结果

3.1 HUVEC 的鉴定 倒置相差显微镜观察细胞形态呈铺路石样排列; 第 VIII 因子相关抗原检测阳性; 透射电镜观察细胞浆内有 Weibel Palade 小体。

3.2 黄连解毒汤对中性粒细胞与血管内皮细胞间粘附的影响 单用 HLJDT 含药血清处理 HUVEC 不同时间后, 对中性粒细胞与血管内皮细胞粘附均有一定的抑制作用, 而与对照组相比, 其中仅 1.5h 左右所取血清能显著抑制细胞粘附。

与对照血清组相比, 各时间点所取含药血清+LPS 共处理 HUVEC 不同时间后均可显著抑制由 LPS 诱导的细胞粘附增强, 且其细胞粘附抑制百分率随着作用时间的延长而逐渐升高, 其中尤以 0.5h 组各点最高。

表 1 单用 HLJDT 含药血清作用 HUVEC4h、12h、24h 后对 PMN-HUVEC 粘附的影响($\bar{x} \pm s$ /抑制率)

作用时间	含药血清取血时间点					
	对照血清	0.5h	1.0h	1.5h	2.0h	2.5h
4h	0.2307 ± 0.0396	0.2338 ± 0.0056	$0.2243 \pm 0.0112^*$	0.2305 ± 0.0073	0.2398 ± 0.0077	0.2530 ± 0.0171
	8.8%	8%	11.4%	8.9%	5.2%	
12h	0.2243 ± 0.0373	0.2208 ± 0.0077	$0.2190 \pm 0.0077^*$	$0.2220 \pm 0.0091^*$	0.2310 ± 0.0070	0.2455 ± 0.0170
	8.6%	7.1%	10.8%	9.6%	6%	
24h	0.2420 ± 0.0134	$0.2363 \pm 0.0120^*$	$0.2343 \pm 0.0069^{**}$	$0.2383 \pm 0.0094^*$	0.2550 ± 0.0043	0.2683 ± 0.0024
	9.8%	12%	12.7%	11.2%	5%	

注: 与对照血清组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (下同)。

与对照血清组相比, 各时间点所取含药血清+TNF- α 共处理 HUVEC 不同时间后, 均可显著抑制由 LPS 诱导的细胞粘附增强, 且其细胞粘附抑制百分率随着作用时间的延长而逐渐升高, 其中尤以 2.0h 组各点最高。

4 讨论

现代研究表明, 在急性炎症早期, 细菌内毒素、

补体激活产物等既可激活巨噬细胞释放前炎症因子(如 TNF- α 、IL-1、PAF 等), 又能协同这些因子进一步激活中性粒细胞与血管内皮细胞等效应细胞, 促使效应细胞在不同阶段表达不同的粘附分子, 从而介导中性粒细胞在血管壁上滚动、粘附, 直至穿越到达局部而产生炎症^[3]。LPS、TNF- α 等主要前炎症因子在作用 HUVEC 30min 后, 可使中性粒细胞与血管内皮细胞的粘附迅速增高, 至 12h 达高峰, 可维持 24~

48h^[4]。

表 2 HLJDT 含药血清+ LPS(1ug/ml)作用 HUVEC4h、12h、24h 后对 PMN- HUVEC 粘附的影响($\bar{x} \pm s$ /抑制率)

作用 时间	含药血清取血时间点					
	对照血清	0. 5h	1. 0h	1. 5h	2. 0h	2. 5h
4h	0. 2213 $\pm$ 0. 0356* 14. 9%	0. 2498 $\pm$ 0. 0084 11%	0. 2433 $\pm$ 0. 0072 13%	0. 2503 $\pm$ 0. 0079 10. 9%	0. 2625 $\pm$ 0. 0059 6. 6%	0. 2810 $\pm$ 0. 0144
12h	0. 2548 $\pm$ 0. 0053* * 14. 4%	0. 2657 $\pm$ 0. 0060* 10. 7%	0. 2577 $\pm$ 0. 0104* 12. 8%	0. 2670 $\pm$ 0. 0060* 11. 1%	0. 2748 $\pm$ 0. 0134 8. 6%	0. 2975 $\pm$ 0. 0147
24h	0. 2877 $\pm$ 0. 0107* * 16. 4%	0. 3003 $\pm$ 0. 0057* * 12. 7%	0. 2955 $\pm$ 0. 0034* * 14. 1%	0. 3038 $\pm$ 0. 0083* 11. 7%	0. 3133 $\pm$ 0. 0128* 8. 9%	0. 3493 $\pm$ 0. 0145

表 3 HLJDT 含药血清+ TNF- α (1000u/ml)作用 HUVEC4h、12h、24h 后对 PMN- HUVEC 粘附的影响($\bar{x} \pm s$ /抑制率)

作用 时间	含药血清取血时间点					
	0. 5h	1. 0h	1. 5h	2. 0h	2. 5h	对照血清
4h	0. 3783 $\pm$ 0. 0095* * 12. 7%	0. 3663 $\pm$ 0. 0026* * 15. 5%	0. 3680 $\pm$ 0. 0073* * 15%	0. 3620 $\pm$ 0. 0135* * 16. 5%	0. 4150 $\pm$ 0. 0071* 4. 3%	0. 4335 $\pm$ 0. 0097
12h	0. 3633 $\pm$ 0. 0230* 13. 9%	0. 3550 $\pm$ 0. 0139* * 15. 8%	0. 3528 $\pm$ 0. 0109* * 16. 4%	0. 3473 $\pm$ 0. 0235* 17. 7%	0. 3983 $\pm$ 0. 0059 5. 6%	0. 4218 $\pm$ 0. 0127
24h	0. 3685 $\pm$ 0. 0092* * 17. 7%	0. 3565 $\pm$ 0. 0013* * 20. 3%	0. 3578 $\pm$ 0. 0089* * 20%	0. 3460 $\pm$ 0. 0193* * 22. 7%	0. 4050 $\pm$ 0. 0076* 9. 5%	0. 4470 $\pm$ 0. 0189

我们以往的研究发现小檗碱与 TNF- α 共处理 HUVEC 20h 后,可明显抑制 TNF- α 诱导的中性粒细胞与血管内皮细胞间粘附作用的增强^[5],进一步研究发现大鼠黄连解毒汤含药血清可抑制中性粒细胞与血管内皮细胞间的粘附。基于此,本实验采用 LPS/TNF- α 诱导 HUVEC 模拟体内炎症状态,观察黄连解毒汤含药血清抑制细胞粘附的作用。结果发现,单独给予血清组 1. 5h 左右可明显抑制细胞粘附,而各时间所取血清与 LPS/TNF- α 共处理 HUVEC 不同时间后均可明显抑制细胞粘附,且其细胞粘附抑制率都随着作用时间的延长而呈升高趋势。其中血清+ LPS 组以 0. 5h 最高;而血清+ TNF- α 组以 2. 0h 最高。说明黄连解毒汤含药血清对不同炎症因子的刺激有不同的时效关系,这可能与中药复方多种有效成分不同代谢峰值有关。至于黄连解毒汤含药血清在抑制细胞粘附过程中对粘附分子的影响机

制,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Elliott MJ. Interaction between neutrophils and endothelium [J]. Ann Thorac Surg, 1993, (12) : 38.
[2] 杨贵贞. 医学免疫学[M]. 长春: 吉林人民出版社, 1980, 363~ 364.
[3] Dunzendorfer S, Naunyn Schmiedeberg. Effects of thalidomide on neutrophil respiratory burst, chemotaxis, and transmigration of cytokine and endotoxin activated endothelium [J]. Arch Pharmacol, 1997, (11) : 56.
[4] 周向东, 陈意生, 史景泉. 主要前炎症因子对中性粒细胞-血管内皮细胞粘附影响的单细胞定量研究[J]. 解放军医学杂志, 1996, 21(3) : 187—188.
[5] 郝钰, 邱全瑛, 吴君, 等. 小檗碱对 IL-1 或 TNF 诱导的多形核白细胞与内皮细胞粘附的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(7) : 585—587.