

黄连解毒汤含药血清对血管内皮细胞增殖及粘附中性粒细胞能力的影响

方素萍,邱全璞,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 MTT 和蛋白染料染色法,观察给药一次及连续给药 3d 后 0.5、1、1.5、2、2.5h 所取黄连解毒汤(HLJDT)含药血清对 HUVEC 增殖及粘附中性粒细胞(PMN)能力的影响,以探讨 HLJDT 含药血清制备的最佳取血时间点及其抗炎作用机制。结果:①与对照血清相比,40%及 20%浓度的含药血清对 HUVEC 均有不同程度的抑制增殖作用,而 10%浓度时无明显抑制作用;②各点的 HLJDT 含药血清均有一定的抑制 HUVEC-PMN 粘附的作用,且与取血时间点存在一定的时效关系。其抑制细胞粘附的最佳时间点为连续给药 3d 组的 1.5h 左右。结论:HLJDT 含药血清能抑制 HUVEC-PMN 粘附,可能是 HLJDT 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)03-0031-04

收稿日期:2000-09-22

基金项目:国家自然科学基金资助项目 NO:239970949 和高等学校博士学科点专项基金资助项目 NO:29858

Influence of Huang Lian Jie Du Decoction-Containing Serum on Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion

FANG Su-ping, QIU Quan-ying, HAO Yu

(Beijing University of TCM, Beijing, 100029)

Abstract: In order to observe Huang Lian Jie Du Decoction (HLJDD)'s anti-inflammation mechanism and the best time to collect its herbage-containing serum from rats, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cultured in vitro and protein staining was used to study the effect of serum on neutrophil-endothelial cell adhesion by treated with HUVEC for 4h, 12h, 24h, the serum was collected on 0.5h 1.0h 1.5h 2.0h 2.5h after treating with HLJDD (one dose once a day while another dose twice a day for three days). The results showed that the herbage-containing serum could decrease the cell adhesion in some degree with time-effect relationship. Compared to the control group, the best time to collect its serum was 1.5h around by dosed twice a day for three days. The HLJDD herbage-containing serum could decrease the neutrophil-endothelial cell adhesion, and inhibit neutrophil transuding from vessel, which might be one of HLJDD's anti-inflammation mechanisms.

Key words: Huanglianjiadu Decoction, Herbage-containing serum, Neutrophil, Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Cell adhesion

中性粒细胞(PMN)与血管内皮细胞(VEC)的粘附,在炎症的发生发展过程中起着重要作用。在急性炎症早期,多种前炎症因子激活 PMN 及 VEC,介导 PMN 在 VEC 上滚动、粘附,直至渗出到炎症局部而发挥作用^[1]。黄连解毒汤作为清热解毒的代表方,为历代医家所推崇。我们以往通过对黄连、黄柏的主要成分小檗碱的研究,证实其具有明显的抑制 PMN 和 HUVEC 粘附及细胞粘附分子表达的作用^[1]。而黄连、黄柏是黄连解毒汤的主要药物,因此本实验选取给药一次及连续给药 3d 后 0.5、1、1.5、2、2.5h 所取的黄连解毒汤含药血清,在其有效浓度范围内,动态观察其对 VEC 粘附 PMN 的影响,以探讨其抗炎作用机理。

1 材料

1.1 试剂与器材 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),虎红、I 型胶原酶、MTT(美国 SIGMA),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);透射电镜,CO₂ 恒温培养箱(美国 Forma),倒置相差显微镜及显微照相系统(日本 Olympus),低温冷冻离心机(日本 HITACHI),精密电子天平(德国 1/1000, A200S),酶标仪(美国 Bio-Rad 2550)。

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(购于国医堂,经北京中医药大学中药鉴定室鉴定),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。

黄连解毒汤含药血清的制备 给药 3d 组: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。给药一次组:同等条件下于给药前禁食不禁水 12h,给药一次后分别于 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后制备。各组血清均经 56℃30min 灭活, -20℃ 冰箱保存备用,使用时用完全 M199 培养液稀释成所需浓度。

2 方法

2.1 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的原代培养与传代及鉴定 收集健康产妇分娩脐带,以 1% I 型胶原酶脐静脉灌注法^[3]分离内皮细胞,用完全 M199 培养基(含 20% FBS, 20μg/ml ECGF)接种于细胞培养瓶(预先用 1% 明胶包被),置于 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养。当原代细胞长成单层时,以 0.125% 胰酶 - 0.02% EDTA 消化传代。从第 3 代起按 100μl、 4×10^4 细胞/孔接种入 96 孔平底细胞培养板(预先用 1% 明胶包被)。实验用第 2~5 代。

2.2 人外周血中性粒细胞(PMN)的制备 取健康成人志愿者静脉血,肝素抗凝,按文献方法^[2]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 含药血清对 HUVEC 增殖的影响 96 孔板内的 HUVEC 融合成单层时,加入 40%、20%、10% 浓度的

黄连解毒汤含药血清与 HUVEC 共处理 24h, 应用 MTT 法观察含药血清对 HUVEC 增殖的影响(以 $\bar{x} \pm s$ 表示)

2.4 含药血清对中性粒细胞与血管内皮细胞粘附的影响 96 孔板内的 HUVEC 融合成单层时, 加入各时间点含药血清 100 μ l(终浓度均为 10%, 其中对照孔加对照正常血清、空白孔不加血清, 每组 4 复孔), 继续培养 4h、12h、24h, 弃去上清, PBS 先 2 次, 加入上述中性粒细胞 100 μ l、 $3 \sim 5 \times 10^5$ 细胞/孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内孵育 1h 后, PBS 洗去未粘附细胞, 加入 0.25% 虎红 100 μ l/孔, 室温作用 10min, 洗去游离虎红, 加入 PBS—乙醇(1:1)200 μ l/孔, 1h 后, 酶标仪 570nm 测 A 值。

2.5 统计学处理 t 检验。数据统计用 $\bar{x} \pm s$ 表

示。

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(SP 免疫细胞化学染色法)阳性; 透射电镜观察细胞胞浆内有 Weibel Palade 小体。

3.2 黄连解毒汤含药血清对 HUVEC 增殖的影响 结果表明, 与对照组相比, 40% 及 20% 浓度的黄连解毒汤含药血清在作用 HUVEC24h 后, 对 HUVEC 的增殖均有一定的抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 10% 浓度的含药血清除药 3d 组 1.5h 点外, 均无明显的抑制细胞增殖的作用。因此, 在进行细胞粘附实验时, 均选用 10% 浓度的含药血清(见表 1、2)。

表 1 给药一次组黄连解毒汤含药血清对 HUVEC 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

作用 浓度	各取血时间点 A 值					对照血清
	0.5h	1.0h	1.5h	2.0h	2.5h	
40%	0.413 $\pm$ 0.011	0.359 $\pm$ 0.011 **	0.377 $\pm$ 0.010 *	0.365 $\pm$ 0.036 **	0.383 $\pm$ 0.011	0.409 $\pm$ 0.008
20%	0.446 $\pm$ 0.059	0.445 $\pm$ 0.028	0.411 $\pm$ 0.012 **	0.408 $\pm$ 0.003 **	0.400 $\pm$ 0.018 **	0.473 $\pm$ 0.017
10%	0.469 $\pm$ 0.032	0.454 $\pm$ 0.033	0.440 $\pm$ 0.033	0.453 $\pm$ 0.005	0.477 $\pm$ 0.020	0.499 $\pm$ 0.013

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

表 2 给药三天组黄连解毒汤含药血清对 HUVEC 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

作用 浓度	各取血时间点 A 值					对照血清
	0.5h	1.0h	1.5h	2.0h	2.5h	
40%	0.501 $\pm$ 0.046 **	0.507 $\pm$ 0.012 *	0.484 $\pm$ 0.024 **	0.488 $\pm$ 0.024 *	0.498 $\pm$ 0.003 **	0.445 $\pm$ 0.013
20%	0.574 $\pm$ 0.028	0.600 $\pm$ 0.015 *	0.611 $\pm$ 0.040 **	0.587 $\pm$ 0.010	0.585 $\pm$ 0.015 **	0.551 $\pm$ 0.018
10%	0.640 $\pm$ 0.015	0.674 $\pm$ 0.015	0.715 $\pm$ 0.020 **	0.649 $\pm$ 0.005	0.662 $\pm$ 0.017	0.650 $\pm$ 0.009

注: 与对照血清组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3.3 黄连解毒汤含药血清对血管内皮细胞粘附中性粒细胞能力的影响 结果表明, 给药一次及连续给药 3d 组黄连解毒汤含药血清对中性粒细胞与血管内皮细胞粘附均有一定的抑制作用, 且随着取血

时间的延长而作用减弱。但与正常对照血清相比, 给药一次组均无显著差异; 而给药 3d 组中 1.5h 所取的含药血清具有明显的抑制粘附作用($P < 0.05$), 且随作用时间的延长而加强, 至作用 24h 时 1.0h、1.5h、2.0h 均有显著意义($P < 0.05$)。

表 3 给药一次组黄连解毒汤含药血清作用 HUVEC4h、12h、24h 后对 HUVEC-PMN 粘附的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

作用 时间	各取血时间点 A 值					对照血清	空白对照
	0.5h	1.0h	1.5h	2.0h	2.5h		
4h	0.232 $\pm$ 0.017	0.238 $\pm$ 0.009	0.231 $\pm$ 0.004	0.234 $\pm$ 0.009	0.247 $\pm$ 0.016	0.253 $\pm$ 0.017	0.219 $\pm$ 0.015
12h	0.222 $\pm$ 0.019	0.228 $\pm$ 0.010	0.219 $\pm$ 0.007	0.226 $\pm$ 0.009	0.238 $\pm$ 0.015	0.246 $\pm$ 0.017	0.210 $\pm$ 0.006
24h	0.246 $\pm$ 0.024	0.247 $\pm$ 0.014	0.244 $\pm$ 0.004 *	0.25 $\pm$ 0.010	0.256 $\pm$ 0.011	0.268 $\pm$ 0.005	0.253 $\pm$ 0.006

表4 连续给药三天组黄连解毒汤含药血清作用 HUVEC4h、12h、24h 后对 HUVEC-PMN 粘附的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

作用 时间	各取血时间点 A 值						空白对照
	0.5h	1.0h	1.5h	2.0h	2.5h	对照血清	
4h	0.231 ± 0.039	0.234 ± 0.006	0.224 ± 0.011 *	0.231 ± 0.007	0.239 ± 0.008	0.253 ± 0.017	0.219 ± 0.015
12h	0.224 ± 0.037	0.228 ± 0.008	0.219 ± 0.008 *	0.222 ± 0.009 *	0.231 ± 0.007	0.246 ± 0.017	0.210 ± 0.006
24h	0.242 ± 0.013	0.236 ± 0.012 *	0.234 ± 0.01 **	0.238 ± 0.009 *	0.255 ± 0.004	0.268 ± 0.005	0.253 ± 0.006

4 讨论

中性粒细胞是机体非特异性免疫的主要效应细胞。在急性炎症反应中,循环中的中性粒细胞粘附、穿越血管内皮细胞,渗出到血管外炎症局部,一方面发挥其杀菌吞噬功能,另一方面又释放多种炎症介质,从而导致局部组织细胞的炎性损伤。研究表明,中性粒细胞的这种炎性损伤呈粘附依赖性,即依赖于中性粒细胞与血管内皮细胞粘附的强度^[3]。因此,研制或寻找既能阻止中性粒细胞的粘附或抑制中性粒细胞的激活水平,同时又可以提高中性粒细胞的吞噬能力和/或也具有杀菌、抑菌能力的药物,对于急性炎症的治疗是很有意义的。

近20年来,国内外对黄连解毒汤的临床应用与药理研究日渐深入。现代研究已经证实,黄连解毒汤不仅可明显降低致炎物质如二甲苯、缓激肽等所诱发的血管通透性的升高^[4],还可以明显抑制 IL-8、IL-6、TNF 的产生^[5,6]。然而中药及其复方由于成分复杂以及有效成分的不完全清楚,其体外药理研究受到很大限制。自1988年日本学者田代真一提出了“中药血清药理学”这一新概念后,国内外许多学者开始应用中药血清药理学来进行中药复方的药理学研究^[7]。本实验选取了黄连解毒汤含药血清进行体外实验,一方面从粘附分子角度,探讨其对中性粒细胞与血管内皮细胞粘附的影响;另一方面观察了给药一次与给药多次各取血时间点的含药血清之间作用的差异。实验结果表明:①、40%及20%浓度的

黄连解毒汤含药血清具有一定的抑制血管内皮细胞增殖的作用;②、10%浓度的黄连解毒汤含药血清具有抑制中性粒细胞与血管内皮细胞粘附的作用,且给药三天组均较给药一次组的效果好。推测给药一次组其血液中有有效成分的含量较低,而给药三天组其血液中有有效成分的含量较高,其抑制细胞粘附的有效取血时间点在1.5h左右。至于其在抑制细胞粘附过程中的分子作用机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 邱全瑛,郝钰,王娟娟,等.小檗碱对中性粒细胞与血管内皮细胞粘附的影响及机制探讨[J].中国病理生理杂志,1999,15(8):763.
- [2] 杨贵贞.医学免疫学[M].长春:吉林人民出版社,1980.363.
- [3] Jones-DA, Smith-CW, Picker-LJ, et al. Neutrophil adhesion to 24h IL-1 stimulated endothelial cells under flow conditions [J]. J-Immunol, 1996, 15(2):858.
- [4] 秦秀兰,吴锦梅,郑有顺.黄连解毒汤镇痛抗炎作用的实验研究[J].中药药理与临床,1994,(6):9-10.
- [5] 艾民摘译.黄连解毒汤对 IL-8 产生系统的影响[J].国外医学.中医中药分册,1999,21(5):49.
- [6] 邝枣国,刘倩娴.黄连解毒汤对细胞因子的影响[J].辽宁中医杂志,1999,26(8):374-375.
- [7] 阴赓宏,谭余庆,霍海茹,等.中药血清药理学研究方法及其应用[J].中国实验方剂学杂志,1997,3(6):41.