

四妙勇安汤抑制中性粒细胞-内皮细胞黏附的实验研究

李光辉¹, 张军平^{2*}, 丁义¹, 曹阳¹, 董玮¹, 彭立¹

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第一附属医院心血管内科, 天津 300193)

[摘要] **目的:**探讨四妙勇安汤对于凝血酶处理的内皮细胞与中性粒细胞黏附及内皮细胞 P-选择素表达的影响。**方法:**MTT 法检测四妙勇安汤以生药 $22.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig 7 d 制备含药血清对于内皮细胞活力的影响, EA.hy926 细胞加入 $0.2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 凝血酶、中性粒细胞作为模型组, 2.5%、5%、10%、20% 四妙勇安汤含药血清预处理内皮细胞 24 h 后造模为干预组。虎红法检测细胞黏附率, 流式细胞术、ELISA 检测内皮细胞 P-选择素的表达。**结果:**空白组与空白对照组在各项检测中均无显著性差异; 10%、20% 含药血清组对黏附率有抑制作用, 10% 组效果较好; ELISA 结果显示 10% 含药血清预处理组能抑制 P-选择素的表达, 其他 3 个干预组则无差异; 流式细胞术检测 10%、20% 含药血清组对于细胞表面 P-选择素有抑制作用, 10% 含药血清组效果最好。**结论:**四妙勇安汤能抑制中性粒细胞、内皮细胞的黏附, 这一作用可能是通过抑制内皮细胞 P-选择素的表达来实现的。

[关键词] 四妙勇安汤; 黏附; 内皮细胞; 中性粒细胞; P-选择素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0193-04

[doi] 10.11653/syfy2013240193

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131012.0918.003.html>

[网络出版时间] 2013-10-12 9:18

Simiao Yongan Tang Inhibits Neutrophil-endothelial Cell Adhesion

LI Guang-hui¹, ZHANG Jun-ping^{2*}, DING Yi¹, CAO Yang¹, DONG Wei¹, PENG Li¹

(1. Tianjin University of Chinese Medicine, Tianjin, 300193 China; 2. Tianjin University of Chinese Medicine First Affiliated Hospital Cardiovascular Internal Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the impact of Simiao Yongan Tang on the expression of thrombin-treated endothelial cells and neutrophil adhesion and endothelial cell P-selectin expression. **Method:** MTT was used to detect endothelial cell viability of serum containing Simiao Yongan Tang. $0.2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ thrombin was added to EA.hy926 cells, neutrophils was as a model group, 2.5%, 5%, 10%, 20% of the serum containing drugs pretreated endothelial cells 24 h after modeling. Bengal method was used to detect the cell adhesion rate, the flow cytometry and ELISA were used to detect endothelial cell P-selectin expression. **Result:** 10%, 20% serum containing drugs inhibited adhesion rate, 10% serum of which was better; the ELISA results showed that 10% serum containing drugs pretreatment could inhibited P-selectin expression; the flow cytometry showed that 10%, 20% serum containing drugs inhibited cell surface P-selectin, 10% serum containing drugs was better. **Conclusion:** Simiao Yongan Tang can inhibit neutrophil adhesion of endothelial cells, this effect may be achieved by inhibiting P-selectin expression in endothelial cells.

[Key words] Simiao Yongan Tang; adhesion; endothelial cells; neutrophils; P-selectin

[收稿日期] 20130403(023)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(901904);天津市自然科学基金重点项目(09JCZDJC20700)

[第一作者] 李光辉, 硕士, 从事中医药治疗心血管疾病研究, Tel:13820217289, E-mail:liguanghui860306@163.com

[通讯作者] * 张军平, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 从事心血管疾病的科研与临床研究, Tel:022-27432016, E-mail:tjzhtcm@163.com

白细胞与内皮细胞的黏附是动脉粥样硬化的起始阶段, P-选择素在其中起着重要的作用^[1]。前期研究表明, 具有滋阴、解毒、活血功效的四妙勇安汤具有抑制动脉粥样硬化 *NF- κ b* 表达的作用^[2], 全方及单体具有促进内皮细胞增殖的作用^[3-4], 本实验拟观察四妙勇安汤对于内皮细胞、中性粒细胞黏附及内皮细胞 P-选择素表达的影响, 以探讨其是否通过抑制 P-选择素的来影响内皮细胞、中性粒细胞的黏附。

1 材料

1.1 细胞株与动物 EA.hy926 细胞株购自上海细胞所。雄性日本大耳白兔 3 只, 普通级, 体重(2.2 ± 0.2) kg, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证号 SCXK(京)2007-0001, 防疫合格证号 20060038。

1.2 药物与试剂 四妙勇安汤饮片(由金银花、玄参、当归和甘草 4 味药组成) 购自天津中医药大学第一附属医院, 金银花、玄参(安徽协和成药业饮片有限公司, 20070102), 当归(河北美威中药材有限公司, 070701), 甘草(安国市光明饮片加工厂, 070402), 以上药材均由天津中医药大学药教研室张丽娟老师对其形状与质地进行初步判定, 认为是道地药材。绿原酸(110753 200212)、阿魏酸(0773-910), 单体均由中国药品生物制品检定所提供。DMEM 干粉(Gibco 公司, 12400024), 胎牛血清(FBS, 中美合资兰州民海生物工程有限公司, A911001.104), 凝血酶(Sigma 公司, T4648), Anti-Human CD62P (P-Selectin) FITC (eBioscience 公司, 11-0628), P-选择素 ELISA 试剂盒(上海凯博公司, KB1175)。

1.3 仪器 MK3 型酶标仪(芬兰雷勃公司), 2323-2 型 CO₂ 培养箱(美国 Shellab 公司), FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD Biosciences)。

2 方法

2.1 四妙勇安汤含药兔血清的制备 按处方比例称取金银花 30 g, 玄参 30 g, 当归 20 g, 甘草 10 g, 浸泡 30 min。分别加 10, 8, 8 倍量水煎煮 3 次, 滤过, 合并滤液, 离心, 取上清液, 采用分子截留值 5 万的超滤膜进行超滤, 超滤过程中控制压力为 0.1 mPa, 温度为(30 ± 1) °C, 水煎液按 15:1 进行旋蒸浓缩, 定容至 100 mL, 即得 1 mL 相当于原药材 0.84 g 的水提液。

以公式(给药剂量 = 临床常用量 × 动物等效面积系数)^[5] 计算给药剂量, 以生药 11.25 g·kg⁻¹ 给健

康日本大耳白兔每 12 h ig 1 次, 22.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 连续服用 7 d, 于最末次给药后 2 h 后乙醚吸入麻醉腹主动脉抽血, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 分离血清, 于 55 °C 温育 30 min 灭活, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 再经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 置 -20 °C 冰箱保存备用。同时采集家兔未服药时的血液制作对照组用血清(RNS)。

2.2 测定细胞活力 细胞接种于 96 孔板中, 约 2 × 10⁴ 个/mL。培养 24 h 后同步化培养 24 h, 分别加入含 10% FBS 全培养基、含 10% 兔正常血清(RNS)全培养基、含 2.5%, 5%, 10%, 20% 含药血清全培养基培养细胞, 每组 6 个复孔, 作用 24 h, MTT 法测定 570 nm 波长时吸光度(A 值)。

2.3 分组 空白组: 含 10% FBS 全培养基培养细胞; 空白对照组: 含 10% 兔正常血清全培养基培养细胞; 模型组^[6-8]: 10% FBS 全培养基培养的细胞同时加入 0.2 U·mL⁻¹ 凝血酶与中性粒细胞 2 × 10⁵ 个/样本; 模型对照组: 10% FBS 全培养基培养的细胞加入中性粒细胞 2 × 10⁵ 个/样本; 干预组: 含 2.5%, 5%, 10%, 20% 含药血清预处理内皮细胞 24 h 后造模(加入凝血酶与中性粒细胞)。每组设 5 个重复样本。

2.4 对中性粒细胞-内皮细胞黏附的影响 中性粒细胞的制备: 取健康志愿者抗凝血 5 mL, 离心弃掉上层血浆, 加入与血浆等体积的生理盐水及 1/6 体积的 6% 右旋糖酐混匀。37 °C 静置 30 min, 将上层白细胞吸出轻浮于 3 mL 淋巴细胞分离液中, 2 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取出底部中性粒细胞, 加入 1 mL 双蒸水红细胞破膜 30 s, 加入 2 × PBS 1 mL, 离心 10 min, 中性粒细胞用 1 × PBS 洗 3 次, 最后悬浮于 Hanks 液中并调数 2 × 10⁶ 个/mL, 并用胎盼蓝排斥试验证实其成活率 > 95%。

血管内皮细胞按 2 × 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板中培养 24 h。待细胞长成单层贴壁后, 按上述分组处理。凝血酶、中性粒细胞 37 °C, 5% CO₂ 作用内皮细胞 30 min 后, 以 1 × PBS 冲洗 3 遍去除未黏附的中性粒细胞。加入 0.125% 虎红 100 μm/孔, 室温作用 10 min, 洗去游离虎红, 加入 PBS-乙醇(1:1) 200 μm 孔, 1 h 后, 酶标仪 570 nm 测 A。

相对黏附率 = (实验组 A - 空白组 A) / 空白组 A

2.5 P-选择素蛋白含量的检测 将细胞悬液分别接种于 96 孔培养板上, 3 × 10⁴ 个/孔, 待细胞长成单层贴壁后, 按上述分组, 取细胞培养液上清离心(2 500 r·min⁻¹, 10 min), 然后按 P-选择素 ELISA 试剂盒说明操作, 用酶标仪在 450 nm 处测定 A 值。

2.6 内皮细胞表面 P-选择素的表达检测 内皮细胞接种于 6 孔板内, 5×10^6 个/孔, 细胞长成单层贴壁后, 按分组处理, 胰酶消化离心得细胞沉淀, 用 $1 \times \text{PBS } 0.5 \text{ mL}$ 悬起细胞, 加入 P-选择素抗体 ($5 \mu\text{L}/\text{样本}$), 避光反应 30 min, 复洗 1 遍, 流式细胞仪检测细胞阳性率及荧光强度。

2.7 统计方法 采用 SPSS 11.5 统计软件, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P = 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对内皮细胞活力的影响 10% RNS 与 10% FBS 不存在统计学差异, 可以排除兔正常血清对细胞活力影响的种属差异, 2.5% 含药血清组与空白组比较无差异, 5%, 10%, 20% 含药血清组与空白组比较存在统计差异 ($P < 0.05$), 其中 10% 含药血清组效果最优。见表 1。

表 1 四妙勇安汤对内皮细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	血清容积/%	细胞活力/A
胎牛血清	10	1.101 ± 0.301
兔正常血清	10	1.084 ± 0.279
四妙勇安汤血清	2.5	1.151 ± 0.368
	5	$1.209 \pm 0.187^{1)}$
	10	$1.334 \pm 0.335^{1,2)}$
	20	$1.305 \pm 0.266^{1,2)}$

注: 与 10% 胎牛血清比较¹⁾ $P < 0.05$; ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对凝血酶诱导的中性粒细胞与血管内皮细胞黏附的影响 兔正常血清组与胎牛血清组 A 值没有统计学差异, 模型组 A 值高于空白组 ($P < 0.05$), 其与模型对照组比较存在差异 ($P < 0.05$), 说明未经凝血酶处理的中性粒细胞、内皮细胞其黏附率较低。2.5%, 5% 含药血清与模型组比较 A 值及黏附率无统计学差异, 10%, 20% 含药血清组与模型组比较具有差异性 ($P < 0.05$) 见表 2。

3.3 对凝血酶诱导的中性粒细胞与血管内皮细胞可溶性 P-选择素的影响 兔正常血清组与胎牛血清组 A 值没有统计学差异, 其他各组与空白组均存在统计学差异, 模型组 A 值高于兔正常血清组 ($P < 0.05$), 其与模型对照组比较存在统计学差异 ($P < 0.05$)。2.5%, 5%, 20% 含药血清组与模型组比较无统计学差异, 10% 含药血清组与模型组比较具有差异性 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对凝血酶诱导的中性粒细胞与血管内皮细胞 P-选择素的影响 空白组及空白对照组 P-选择素的

表 2 四妙勇安汤对凝血酶诱导的中性粒细胞与血管内皮细胞黏附的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	血清容积/%	A	相对黏附率/%
胎牛血清	10	0.2613 ± 0.0323	-
兔正常血清	10	0.2027 ± 0.0692	-
模型	-	$0.4597 \pm 0.0265^{1)}$	$77.4^{1)}$
模型对照	-	$0.3738 \pm 0.0430^{1,3)}$	$44.3^{1,3)}$
四妙勇安汤血清	2.5	$0.4377 \pm 0.0259^{1)}$	$68.9^{1)}$
	5	$0.4406 \pm 0.0165^{1)}$	$70.1^{1)}$
	10	$0.4050 \pm 0.0171^{1,3)}$	$56.3^{1,3)}$
	20	$0.4083 \pm 0.0188^{1,3)}$	$57.8^{1,3)}$

注: 与 10% 胎牛血清比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3~4 同)。

表 3 四妙勇安汤对凝血酶诱导的中性粒细胞与血管内皮细胞可溶性 P-选择素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	血清容积/%	A
胎牛血清	10	0.191 ± 0.06
兔正常血清	10	0.187 ± 0.13
模型	-	$0.509 \pm 0.10^{1)}$
模型对照	-	$0.261 \pm 0.03^{1,3)}$
四妙勇安汤血清	2.5	$0.470 - 0.03^{1)}$
	5	$0.477 - 0.17^{1)}$
	10	$0.468 \pm 0.21^{1,3)}$
	20	$0.470 \pm 0.42^{1)}$

表达接近阴性, 模型组与模型对照组比较, P-选择素的表达明显升高, 以上两点说明 P-选择素主要表达于凝血酶刺激的内皮细胞表面, 2.5%, 5% 含药血清组与模型组无差异, 10%, 20% 两组含药血清阳性率及荧光强度均低于模型组, 10% 组效果最好。见表 4。

表 4 四妙勇安汤对凝血酶诱导的中性粒细胞与血管内皮细胞 P-选择素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	血清容积/%	细胞阳性率/%	荧光强度
胎牛血清	10	0.135 ± 7.40	0.059 ± 6.70
兔正常血清	10	0.254 ± 9.78	0.094 ± 8.40
模型	-	$79.12 \pm 9.40^{1)}$	$0.816 \pm 0.29^{1)}$
模型对照	-	$15.402 \pm 8.81^{1,3)}$	$0.108 \pm 0.37^{1,3)}$
四妙勇安汤血清	2.5	$78.42 \pm 7.26^{1)}$	$0.773 \pm 0.25^{1)}$
	5	$77.12 \pm 9.40^{1)}$	$0.779 \pm 0.28^{1)}$
	10	$71.402 \pm 8.81^{1,3)}$	$0.638 \pm 0.67^{1,3)}$
	20	$73.942 \pm 8.64^{1,3)}$	$0.658 \pm 0.37^{1,3)}$

4 讨论

血管内皮的损伤及白细胞与内皮细胞的黏附是动脉粥样硬化的起始阶段, 缺氧、凝血酶、氧自由基

等因素刺激血管内皮细胞后,其 P-选择素表达增高,P-选择素在白细胞与内皮细胞的黏附及白细胞向内皮细胞滚动中起着重要的作用,前期体外实验证实^[9-10],四妙勇安汤能有效稳定动脉粥样硬化斑块,降低斑块周围促炎因子的表达,为研究四妙勇安汤对凝血酶刺激的内皮细胞、中性粒细胞黏附的影响,本实验以凝血酶同时刺激内皮细胞、中性粒细胞为模型,不同浓度四妙勇安汤含药血清预处理内皮细胞为干预组。同时设空白对照组及模型对照组,以排除免正常血清及中性粒细胞的影响。

结果显示:四妙勇安汤 $22.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig } 7 \text{ d}$ 的 10%,20% 含药血清对黏附率有抑制作用,10% 组效果较好,但两组组间无差异;进一步检测可溶性 P-选择素的表达,10% 含药血清预处理组能抑制 P-选择素的表达,其他 3 个干预组则无差异;10%,20% 含药血清组能抑制细胞表面 P-选择素的表达,10% 组效果较好。值得注意的是,ELISA 与流式细胞术对于 20% 含药血清预处理细胞的 P-选择素表达结果是不同的,ELISA 法主要检测细胞分泌的 P-选择素,可能是因为凝血酶刺激 15 min 后,内皮细胞所分泌的 P-选择素较少,而流式细胞术所检测的结果与黏附率的结果一致,说明 20% 含药血清对于细胞 P-选择素的表达有抑制作用,但其效果低于 10% 组。空白组与空白对照组在各项检测中均无差异可以排除免血清对于实验的影响,模型组与模型对照组比较,各检测指标模型组均明显增高,说明凝血酶刺激的 P-选择素的表达主要来自内皮细胞,而缺少凝血酶刺激的中性粒细胞、内皮细胞,其黏附也相应的降低,进一步证明凝血酶在两者黏附时发挥着重要的作用。本实验证实:四妙勇安汤能抑制中性粒细胞、内皮细胞的黏附(10% 含药血清组最显著),这一作用可能是通过抑制内皮细胞 P-选择素的表达来实现的。

[参考文献]

- [1] 赵亚鹏,金佩佩,周同,等. P-选择素及其细胞黏附与血栓形成[J]. 细胞生物学杂志,2007,29(1):22.
- [2] 张军平,李明,李良军,等. 四妙勇安汤调控核因子- κB 活性及抑制相关炎症因子的实验研究[J]. 中华中医药杂志,2010,25(3):372.
- [3] 王筠,袁卓,张军平. 四妙勇安汤对人脐静脉血管内皮细胞 ECV304 的增殖作用[J]. 中华中医药学刊,2007,25(9):1818.
- [4] 袁卓,张军平,张仁岗. 四妙勇安汤的有效成分对血管内皮细胞增殖的影响[J]. 上海中医药大学学报,2008,22(4):69.
- [5] 赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息,2010,(5):52.
- [6] George B Lenon, Charlie CL Xue, David F Story, et al. Inhibition of release of inflammatory mediators in primary and cultured cells by a Chinese herbal medicine formula for allergic rhinitis [J]. Chinese Medicine, 2007,2(1):2.
- [7] Bae J S, Rezaie A R. Thrombin upregulates the angiotensin-Tie2 Axis; endothelial protein C receptor occupancy prevents the thrombin mobilization of angiotensin 2 and P-selectin from Weibel-Palade bodies [J]. J Thromb Haemost,2010,8(5):1107.
- [8] Sugama Y, Tirupathi C, offakidevi K, et al. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion [J]. J Cell Biol, 1992, 119(4):935.
- [9] 张军平,许颖智,李明,等. 四妙勇安汤对动脉粥样硬化模型兔氧化应激及炎症反应的影响[J]. 中医杂志,2010,51(1):72.
- [10] 许颖智,张军平,李明,等. 四妙勇安汤对动脉粥样硬化易损斑块内细胞外基质的影响[J]. 中华中医药杂志,2011,26(4):822.

[责任编辑 聂淑琴]