

• 论著 •

血必净注射液预先给药对内毒素诱导肺泡Ⅱ型
上皮细胞分泌细胞因子的影响

马新华, 徐道妙, 艾宇航, 赵双平

(中南大学湘雅医院 ICU, 湖南 长沙 410008)

【摘要】 目的 探讨血必净注射液对内毒素诱导大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞(ATⅡ)分泌细胞因子的影响。方法 原代培养 ATⅡ, 将细胞分为空白对照组(C组)、脂多糖(LPS)组、血必净 5 mg/ml+LPS 组(X1+LPS 组)、血必净 15 mg/ml+LPS 组(X2+LPS 组)、血必净 45 mg/ml+LPS 组(X3+LPS 组)、血必净 5 mg/ml 组(X1组)、血必净 15 mg/ml 组(X2组)、血必净 45 mg/ml 组(X3组)8 组进行实验, 每组平行 6 孔。预先给予相应浓度血必净注射液, 10 min 后加入 LPS, 培养 24 h 后检测细胞培养液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的浓度。结果 与 C 组比较, LPS 组、X1+LPS 组、X2+LPS 组 TNF- α 、IL-8 和 MCP-1 浓度增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$); X3+LPS 组、X1 组、X2 组和 X3 组差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。与 LPS 组比较, X1+LPS 组、X2+LPS 组、X3+LPS 组 TNF- α 、IL-8 和 MCP-1 浓度随血必净剂量增加而进一步下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 血必净注射液预先给予可使内毒素诱导 ATⅡ分泌细胞因子 TNF- α 、IL-8 和 MCP-1 明显下降, 且呈剂量依赖性; 而单纯使用血必净注射液无此作用。

【关键词】 血必净注射液; 肺泡; 上皮细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 单核细胞趋化蛋白-1; 白细胞介素-8

中图分类号: R285.5; Q343.6 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.01.018

Effects of Xuebijing injection (血必净注射液) pretreatment on secretion of cytokines from rat alveolar type II epithelial cells induced by lipopolysaccharide MA Xin-hua, XU Dao-miao, AI Yu-hang, ZHAO Shuang-ping. Department of Intensive Care Unit, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China

Corresponding author: XU Dao-miao, Email: xudaomiao@medmail.com.cn

【Abstract】 **Objective** To study the effects of Xuebijing injection (血必净注射液) pretreatment on secretion of cytokines from rat alveolar type II epithelial cells (ATⅡ) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** ATⅡ of primary generation were isolated from adult Sprague-Dawley (SD) rats, purified and incubated. The cells were randomly divided into eight groups: control group (C group), LPS group, Xuebijing 5, 15, 45 mg/ml+LPS groups (X1+LPS, X2+LPS, X3+LPS groups) and Xuebijing 5, 15, 45 mg/ml groups (X1, X2, X3 groups); there were six parallel holes in each group. Xuebijing injection in corresponding dosages were added to the cells 10 minutes before the addition of LPS in X1+LPS, X2+LPS, X3+LPS groups, respectively. The cells were cultured for another 24 hours after LPS was added. Then the concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1) in the culture medium were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The concentrations of TNF- α , IL-8 and MCP-1 from rat ATⅡ were significantly increased in LPS group, X1+LPS group and X2+LPS group compared with those in C group ($P<0.05$ or $P<0.01$); however, there were no significant differences in above concentrations between C group and each of the following groups, X3+LPS, X1, X2, X3 groups (all $P>0.05$). Compared with LPS group, the levels of TNF- α , IL-8 and MCP-1 from rat ATⅡ in X1+LPS group, X2+LPS group and X3+LPS group were further decreased along with the increase of the dosages of Xuebijing, showing significant dose-dependence ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Xuebijing injection pretreatment can markedly inhibit LPS-induced up-regulation of cytokines from rat ATⅡ in a dose-dependent manner; Xuebijing injection does not affect the secretion of cytokines from rat ATⅡ under normal condition.

【Key words】 Xuebijing injection; Pulmonary alveoli; Epithelial cell; Tumor necrosis factor- α ; Monocyte chemo-attractant protein-1; Interleukin-8

肺泡Ⅱ型上皮细胞(ATⅡ)作为肺泡上皮细胞的干细胞,参与急性肺损伤(ALI)的发生发展和转归^[1]。ATⅡ分泌的细胞因子,如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、白细胞介素-8(IL-8)是调控白细胞

向肺周边移行细胞因子的重要来源^[2]。MCP-1、IL-8属趋化因子超家族成员,对中性粒细胞具有很强的趋化作用和激活作用。研究表明,中性粒细胞在肺内集聚、激活对 ALI 的发生发展起着极其重要的作用^[3];而血必净注射液是否可以通过影响 MCP-1、IL-8 的分泌减少中性粒细胞浸润尚待讨论。本研究拟探讨血必净注射液对内毒素诱导大鼠 ATⅡ分泌细胞因子的影响,进一步探讨血必净注射液用于

基金项目:天津市科技创新专项基金项目(06F22DSH00403),

天津市现代中药大品种群系统开发基金资助项目(2006)

通信作者:徐道妙,Email: xudaomiao@medmail.com.cn

作者简介:马新华(1978-),男(汉族),江苏省人,主治医师。

临床治疗 ALI 或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物:雄性 SD 大鼠,体重 180~220 g,由中南大学湘雅医学院实验动物研究中心提供。腹腔注射戊巴比妥麻醉大鼠,肝素 400 U/kg 抗凝,气管切开插管后,放血处死大鼠。

1.2 ATⅠ分离:参照文献方法^[4]分离大鼠 ATⅠ。经肺动脉用溶液 I [140 mmol NaCl、5 mmol KCl、2.5 mmol NaHPO₃、10 mmol 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、6 mmol 葡萄糖、0.2 mmol 乙二醇四乙酸(EGTA),pH 值 7.4]冲洗肺内血管,气管通气 8 次直至肺苍白色,取出心肺。再用 5 ml 溶液 I、I (140 mmol NaCl、5 mmol KCl、2.5 mmol NaHPO₃、10 mmol HEPES、0.2 mmol EGTA、6 mmol 葡萄糖、2.0 mmol CaCl₂、1.3 mmol MgSO₂, pH 值 7.4),分别经气管插管灌洗肺 4 次。在含有脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 的小烧杯中将肺脏切成小块,用胎牛血清灭活胰酶终止消化,补足溶液 I 20 ml 后倒入烧瓶,37℃水浴并晃动 15 min。经过滤后收集滤液,离心弃上清液,Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)细胞重悬并计数待提纯。

1.3 ATⅠ纯化、培养和鉴定:用免疫黏附选择法纯化大鼠 ATⅠ,用含胎牛血清的 DMEM 培养基悬浮细胞,计数细胞并调节细胞浓度后转移至培养瓶中继续培养 18~20 h,贴壁细胞绝大部分即为 ATⅠ,锥虫蓝染色检测细胞存活率大于 95%。用碱性磷酸酶(AKP)染色法鉴定 ATⅠ。

将经过分离、纯化、鉴定的 ATⅠ分别接种至培养瓶中培养 4 h 后,换无血清 DMEM 培养基按下述实验分组进行干预。

1.4 实验分组:共分为空白对照组(C 组)、脂多糖(LPS)组、血必净 5 mg/ml+LPS 组(X1+LPS 组)、血必净 15 mg/ml+LPS 组(X2+LPS 组)、血必净 45 mg/ml+LPS 组(X3+LPS 组)、血必净 5 mg/ml 组(X1 组)、血必净 15 mg/ml 组(X2 组)、血必净 45 mg/ml 组(X3 组)8 组,每组平行 6 孔。各孔中按以上浓度加入血必净注射液,10 min 后加入 LPS(终浓度为 10 μg/ml),再加入磷酸盐缓冲液(PBS)至每孔总容积 1 ml。继续培养 24 h 后进行各项分析测试。

1.5 细胞因子测定:采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定细胞培养液中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-8 和 MCP-1 的浓度,按照试剂盒(武汉博士德生物公

司产品)说明书操作。

1.6 统计学处理:使用 SPSS 12.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示,与 C 组比较,LPS 组、X1+LPS 组、X2+LPS 组 TNF-α、IL-8 和 MCP-1 水平均显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其余各组差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与 LPS 组比较,X1+LPS 组、X2+LPS 组、X3+LPS 组 TNF-α、IL-8 和 MCP-1 水平均明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈剂量依赖性。

表 1 各组 ATⅠ分泌细胞因子的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TNF-α(ng/L)	IL-8(ng/L)	MCP-1(ng/L)
C 组	58.67±8.64	4 958.33±180.04	2 448.00±9.90
LPS 组	3 802.83±8.32 ^b	35 141.67±111.43 ^b	9 229.00±11.03 ^b
X1+LPS 组	1 952.33±4.32 ^{bc}	20 303.33±209.92 ^{bc}	7 032.17±18.82 ^{bc}
X2+LPS 组	608.00±7.38 ^{cd}	18 194.17±199.61 ^{bc}	6 226.33±10.09 ^{cd}
X3+LPS 组	205.04±11.33 ^d	9 192.33±148.50 ^d	3 233.83±15.43 ^d
X1 组	61.00±7.16	4 898.67±86.95	2 447.00±8.53
X2 组	56.67±6.95	4 509.67±113.27	2 429.16±7.76
X3 组	62.33±7.92	4 435.00±130.85	2 484.33±7.03

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

3 讨论

ATⅠ细胞在体外基本不传代,分离及体外原代培养已成为获得 ATⅠ细胞的主要手段。肺组织成分复杂,ATⅠ细胞仅占 14%~16%,因此需要纯化。本研究中采用免疫黏附选择法,其细胞纯度高达 90%以上^[5]。有研究显示,将 ATⅠ暴露在 LPS 浓度为 10 μg/ml 的条件下培养 24 h, TNF-α、IL-8 和 MCP-1 的分泌量到达高峰^[6]。

ATⅠ是肺泡内皮干细胞,其凋亡致肺泡上皮屏障受损和肺泡表面活性物质减少,在 ALI 的发生发展中至关重要,本课题组前期的研究也证实了这一点^[7];不仅如此,ATⅠ分泌的趋化因子是调控白细胞向肺周边移行细胞因子的重要来源。趋化因子使中性粒细胞激活,在肺组织聚集,致肺泡上皮屏障受损,引发 ALI/ARDS^[8]。ARDS 患者的肺组织及支气管肺泡灌洗液(BALF)中存在大量中性粒细胞,而且在 BALF 中的增多程度与 ARDS 的预后相关^[9]。因此,通过对 ATⅠ分泌趋化因子的研究,对中性粒细胞聚集以及阐明 ALI 的机制,进而有效治疗 ALI 具有重要意义。

本实验结果表明:LPS 可使 ATⅠ分泌 TNF-α、IL-8 和 MCP-1 明显增加;而预先使用血必净注射

液干预可使 LPS 诱导的 ATⅠ分泌 TNF- α 、IL-8 和 MCP-1 明显下降,并呈剂量依赖性;而单纯给予血必净注射液不影响 ATⅠ分泌细胞因子。有研究显示,LPS 作用于 Toll 样受体 4(TLR4)使 TNF- α 合成和分泌增加^[6],进而提高核转录因子- κ B(NF- κ B)活性,形成正反馈机制^[10]。NF- κ B 是一个多效的转录因子,与多种基因的转录有关,NF- κ B 活化后促进炎症因子基因转录进而增加炎症相关蛋白的表达^[11]。LPS 作用于 ATⅠ表面表达的 TLR4^[12],使 TNF- α 合成和分泌增加,进而提高 NF- κ B 活性,使 TNF- α 、IL-8 和 MCP-1 的转录和分泌增加。

血必净注射液主要成分为红花、赤芍、川芎、丹参、当归等,具有拮抗内毒素、抗炎、改善免疫功能、保护组织及细胞内皮的作用^[13]。进一步研究表明,血必净注射液能够减少内毒素诱导 ALI 时 TNF- α 表达^[14]。因此,用血必净注射液拮抗内毒素,可减少 TNF- α 表达,阻断了正反馈机制,TNF- α 表达进一步减少,NF- κ B 活性降低,TNF- α 、IL-8 和 MCP-1 分泌明显下降。

综上所述,血必净注射液 5、15、45 mg/ml 体外干预可使内毒素诱导的 ATⅠ分泌 TNF- α 、IL-8 和 MCP-1 明显下降,且呈剂量依赖性。

参考文献

- [1] Perl M, Lomas-Neira J, Chung CS, et al. Epithelial cell apoptosis and neutrophil recruitment in acute lung injury: a unifying hypothesis? What we have learned from small interfering RNAs. *Mol Med*, 2008, 14(7-8): 465-475.
- [2] Witherden IR, Vanden Bon EJ, Goldstraw P, et al. Primary human alveolar type I epithelial cell chemokine release: effects of cigarette smoke and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30(4): 500-509.

- [3] 王烁,袁秀红,郭德玉,等.急性肺损伤家兔早期中性粒细胞相关功能的变化研究. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(7): 403-408.
- [4] 徐道妙,明广峰,吴晓英,等.利多卡因对 LPS 致大鼠肺泡Ⅰ型上皮细胞损伤的保护作用. *中南大学学报(医学版)*, 2006, 31(2): 241-244.
- [5] Hastings RH, Hua XY. Expression of calcitonin gene-related peptide by cultured rat alveolar type I cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, 13(5): 563-569.
- [6] Thorley AJ, Ford PA, Gienbycz MA, et al. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type I epithelial cells and macrophages. *J Immunol*, 2007, 178(1): 463-473.
- [7] 徐道妙,马新华,艾宇航,等.血必净注射液对内毒素诱导肺泡Ⅰ型上皮细胞表面活性物质相关蛋白 A 表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(11): 690-691.
- [8] Perkins GD, Gao F, Thickett DR. In vivo and in vitro effects of salbutamol on alveolar epithelial repair in acute lung injury. *Thorax*, 2008, 63(3): 215-220.
- [9] Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, et al. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1994, 150(1): 113-122.
- [10] Covert MW, Leung TH, Gaston JE, et al. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappa B activation. *Science*, 2005, 309(5742): 1854-1857.
- [11] Xu R, Xu G, Shi J, et al. A correlative study of NF-kappa B activity and cytokines expression in human chronic nasal sinusitis. *J Laryngol Otol*, 2007, 121(7): 644-649.
- [12] Armstrong L, Medford AR, Uppington KM, et al. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(2): 241-245.
- [13] 曹书华,王今达.血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(8): 489-491.
- [14] 李银平,乔佑杰,武子霞,等.血必净注射液对脓毒症大鼠组织肿瘤坏死因子- α 及凝血功能的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(2): 104-107.

· (收稿日期: 2009-09-29)

(本文编辑: 李银平)

· 消息 ·

中国科技信息研究所万方数据 2009 年版《中国期刊引证报告》(扩刊版) ——基础医学类期刊影响因子和总被引频次及中国医学类期刊影响因子前 20 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	总被引频次	排位	期刊名称	影响因子	排位
中国疫苗和免疫	2.143	1	中华医院管理杂志	4 256	1	中西医结合学报	1.286	1
中国危重病急救医学	1.780	2	中国危重病急救医学	3 942	2	中国中西医结合杂志	1.266	2
中华医院管理杂志	1.720	3	中华麻醉学杂志	3 723	3	中国中药杂志	1.072	3
中国医院管理	1.438	4	中国医院管理	3 261	4	针刺研究	0.958	4
中华高血压杂志	1.351	5	中国病理生理杂志	2 942	5	世界科学技术-中医药现代化	0.950	5
免疫学杂志	1.197	6	中国健康心理学杂志	2 207	6	中国中西医结合急救杂志	0.907	6
中国健康心理学杂志	0.878	7	中华血液学杂志	2 163	7	中医杂志	0.835	7
中国病理生理杂志	0.792	8	解放军医学杂志	2 114	8	中国中医药科技	0.824	8
中国寄生虫学与寄生虫病杂志	0.777	9	中华高血压杂志	2 032	9	中国针灸	0.823	9
中华病理学杂志	0.760	10	医疗卫生装备	1 941	10	中国中药杂志	0.781	10
中华男科学杂志	0.759	11	中国疫苗和免疫	1 922	11	中草药	0.772	11
中华麻醉学杂志	0.758	12	解放军医院管理杂志	1 908	12	上海针灸杂志	0.770	12
中国实验血液学杂志	0.736	13	中华病理学杂志	1 873	13	中药药理与临床	0.746	13
解放军医院管理杂志	0.726	14	中国人兽共患病学报	1 721	14	中药材	0.721	14
细胞与分子免疫学杂志	0.715	并列 15	免疫学杂志	1 672	15	吉林中医药	0.719	15
医疗卫生装备	0.715	并列 15	中华微生物学和免疫学杂志	1 472	16	上海中医药杂志	0.715	16
中华医学遗传学杂志	0.687	17	中华男科学杂志	1 423	17	中国骨伤	0.674	17
解剖科学进展	0.682	18	生物医学工程杂志	1 239	18	中成药	0.667	18
生理科学进展	0.663	19	中国免疫学杂志	1 238	19	中国现代中药	0.663	19
解放军医学杂志	0.632	20	中国微生物学杂志	1 219	20	中国实验方剂学杂志	0.629	20