

· 博士之窗 ·

常规制备家兔血清对人脐静脉 内皮细胞-304 的影响^{*}

秦 英^{1△} 杨 君² 姜良铎¹ 王硕仁¹ 朱陵群¹ 牛福玲¹ 周春华²

内容提要 目的 探讨中药血清药理学研究中常规制备的正常家兔血清浓度变化对培养体系中细胞的影响。方法 常规制备无污染、无溶血正常家兔血清,通过细胞形态学、台盼蓝染色活细胞计数、细胞毒四唑盐(MTT)比色试验、乳酸脱氢酶(LDH)及血管紧张素转换酶(ACE)等指标,观察5%、10%、20%、40%、60%和80%家兔血清对人脐静脉内皮细胞(VEC)-304的影响。结果 5%和10%两浓度组各指标均无变化,对VEC-304没有损伤作用。40%、60%和80%3个浓度组家兔血清浓度对细胞均有不同程度的损伤,而且随着浓度的增加,呈现出损伤加重的趋势,而20%的浓度从细胞形态、台盼蓝染色活细胞计数、MTT及ACE方面没有表现出明显的损伤作用,只有LDH含量差异有显著性($P < 0.01$)。结论 常规制备的家兔血清在无污染和无溶血的情况下,其对细胞的作用浓度是有一定限制的,当达到40%或更高浓度时有较为明显的损伤。所以,在中药血清药理学研究中,应进行常规制备正常血清及含药血清的细胞毒实验,以尽量减少血清本身带给实验的影响。

关键词 常规制备家兔血清 细胞毒性 人脐静脉内皮细胞-304 乳酸脱氢酶 血管紧张素转换酶

Effect of Conventionally Prepared Rabbit Serum on Human Umbilical Vein Endothelial Cell -304 QIN Ying, YANG Jun, JIANG Liang-duo, et al Dongzhimen Hospital, Beijing University of TCM, Beijing (100700)

Objective: To study the effect of conventionally prepared rabbit serum, usually used in the field of serum pharmacology of TCM, in various concentration on cultured system of human umbilical vein endothelial cell (VEC)-304 cell line. **Methods:** Prepared conventionally from healthy rabbit, the effect of uncontaminated and nonhemolytic serum of six concentrations (5%, 10%, 20%, 40%, 60% and 80%) on VEC-304 cells was observed using parameters such as cell morphologic examination, trypan blue exclusion test, methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) test, lactate dehydrogenase (LDH) and angiotensin-converting release test. **Results:** Serum of 5% and 10% concentration showed no effect in all the above-mentioned tests. Serum of 20% concentration also showed no effect in the tests except for LDH releasing ($P < 0.01$). But when the concentration of serum reached up to 40% or above, distinct cytotoxicity and serious injury appeared in a dose-dependent manner. **Conclusion:** High concentration of conventionally prepared rabbit serum could injure the incubated cell. Therefore, in order to lower the background effect of serum as far as possible in TCM serum pharmacological study, the cytotoxicity of rabbit serum should be tested first of all.

Key words conventionally prepared rabbit serum, cytotoxicity, human umbilical vein endothelial 304 cell line, lactate dehydrogenase, angiotensin-converting

中药血清药理学的运用,使中药复方通过含药血清进行体外研究比药物直接接触培养体系更具有体内药物作用的拟似性,因此,通过给培养体系加用含药的血清进行研究日益受到重视。但是,由于在实验中常规制备的血清本身也会对培养体系具有作用,而且培

养体系中的血清量越大,这种背景作用也越明显,甚至当血清浓度超过一定限度时会产生对培养体系的毒损作用。为此,我们通过对人脐静脉内皮细胞(VEC)-304细胞系的基础性指标,即台盼蓝染色活细胞计数、细胞毒四唑盐(MTT)和乳酸脱氢酶(LDH)测定,细胞形态学观察及内皮细胞释放血管紧张素转换酶(ACE)的研究,现将结果报告如下。

^{*} 云南盘龙云海药业有限公司资助

1. 北京中医药大学东直门医院(北京 100700) 2. 海军总医院

[△] 在读博士后

材料与方法

1 试剂及仪器 VEC-304 (ATCC CRI-1998 128 代) 细胞株, 武汉大学典型培养物保藏中心提供; RPMI-1640 培养基、L-谷氨酰胺、HEPES 及胰蛋白酶购自 GIBCO 公司、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自 Hyclone 公司; MTT、乳酸钠、吩嗪二甲酯硫酸盐 (PMS)、硝基氯化四氮唑蓝 (NBD)、氧化型辅酶 I (NAD^+)、台盼蓝及二甲基亚砷 (DMSO) 均购自 Sigma 公司。

2 动物及血清制备 纯种日本大耳白兔 4 只, 体重 2.2~2.5kg, 购于北京医科大学动物中心。动物予正常饮食, 预适应 1 周后, 从兔耳缘动脉无菌取血 (注意防止溶血), 37°C 促凝, $2\,500\text{r}/\text{min}$ 离心分离血清, 血清呈透明、清亮、淡黄色, 无沉淀, 未溶血, 56°C 30min 混合灭活后分装, 置 -20°C 冰箱保存, 1 个月内使用。

3 细胞培养及分组 VEC-304 按常规细胞培养方法培养, 1:4 传代。10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基 (内含青、链霉素各 100u/ml 及 HEPES 25mmol/L)、无血清 RPMI-1640 培养基、含家兔血清 RPMI-1640 培养基 (无血清 RPMI-1640 培养基按体积比配制家兔血清)。取同代 (第 134 代) 对数生长期细胞, D-Hank's 液洗涤 2 次, 0.25% 胰蛋白酶消化, 离心, 吸弃上清液, 用含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液配成 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 单个细胞悬液, 96 孔培养板每孔加入细胞悬液 $100\mu\text{l}$, 继续培养 36h 后, 去培养液, 按组别分别加入各种条件培养液: 正常组 (10% 胎牛血清 RPMI-1640)、空白组及不同浓度的家兔血清组 (5%、10%、20%、40%、60%、80%)。各组均设 8 个重复孔, 于 37°C , 5% CO_2 培养箱继续培养 24h 后检测。

4 MTT 测定 按文献^[1]方法, 将各组细胞每孔加入 MTT 溶液 (5mg/ml) $20\mu\text{l}$, 37°C 继续孵育 4h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 $150\mu\text{l}$ DMSO, 振荡 10min, 使结晶物充分溶解, 选择 490nm 波长, 在酶标仪上测定各孔 OD 值。细胞抑制率 (%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 $\times 100\%$, 细胞增殖率 (%) = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。

5 LDH 测定 按文献^[2]方法, 同上述方法 96 孔板培养各组细胞, 分别将上清 $100\mu\text{l}$ 移入另一 96 孔板, 同时去上清液的各组各孔细胞分别加 2% Triton-100 $100\mu\text{l}$ 30min (破膜)。将上清液及破膜后的细胞悬液加入 $100\mu\text{l}$ LDH 底物液 (NBD 4.0mg、 NAD^+ 10mg

与 PMS 1.0mg 加水至 2.0ml 混合, 取混合液 1.6ml 加 1.0mol/L 乳酸钠 0.4ml, 加入 0.1mol/L PBS (pH 7.4) 至 10ml, 于加入后的 30~150s 间 (室温 $32\sim37^\circ\text{C}$) 在酶标仪上 490nm 波长处每隔 30s 连续读取 OD 值, 求每孔平均每分钟 OD 变化值。细胞毒 LDH 活性释放率 (%) = 上清 OD 值 / (上清 OD 值 + 细胞 OD 值) $\times 100\%$ 。

6 ACE 测定 取培养上清液, 按 ACE 测定试剂盒 (海军总医院提供) 说明操作测定。

7 台盼蓝染色活细胞计数 随机取培养各组细胞 (每组 4 孔) 制备单细胞悬液 1×10^6 细胞/ml, 进行台盼蓝染色, 于 3min 内用血球计数板分别计数死活细胞数, 活细胞率 (%) = 活细胞总数 / (活细胞总数 + 死细胞总数) $\times 100\%$ 。

8 形态学观察 各组细胞用倒置相差显微镜观察, 每组每孔随机选择 10 个视野。

9 统计学方法 多组间比较用单因素方差分析, 组间比较采用 q 检验。

结 果

1 家兔血清引起 VEC-304 的形态变化 倒置相差显微镜下观察: 正常组细胞呈典型的内皮细胞生长特征, 细胞为多角形, 呈单层铺路石状紧密排列; 空白组与 5% 组、10% 组及 20% 组细胞生长状态良好, 细胞形态正常; 40% 组细胞形态发生变化, 细胞变圆或拉长, 散在有损伤脱落区, 但细胞边界尚清楚; 60% 组与 80% 组均有较多的细胞脱落, 形成较大的脱落区, 细胞变圆的数量明显增多, 细胞边界模糊。

2 不同浓度家兔血清对 MTT 及台盼蓝染色计数 VEC-304 活细胞的影响 MTT 法: 空白组细胞培养 24h 后与正常组比较, 细胞增殖抑制率达 30.9% ($P < 0.01$), 而家兔血清则对无血清细胞具有促增殖作用, 5%、10%、20% 与 40% 4 组随着血清的量增大, 细胞促增殖作用呈剂量依赖性增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中 40% 组达 52.88%, 但当血清浓度增至 60% 时, 开始出现细胞毒性; 80% 组细胞抑制率达 29.57%, 与正常组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。台盼蓝染色计数: 家兔血清活细胞率随血清浓度的增加逐渐降低, 至 60% 和 80% 时, 活细胞率仅为 73.70% 和 67.52%, 与正常组比较活细胞数明显减少 ($P < 0.05$)。

3 不同浓度常规制备家兔血清对 VEC-304 细胞释放 ACE 及 LDH 的影响 由 VEC-304 释放 ACE 的量来看, 正常及低于 20% 家兔血清对 VEC-304 几乎无

表 1 不同浓度家兔血清对 MTT 及台盼蓝染色计数
VEC-304 活细胞的影响

组别	MTT (OD 值 $\bar{x} \pm s$)	台盼蓝计数活细胞 ($\times 10^4/\text{ml}$ $\bar{x} \pm s$)	活细胞率 (%)
正常	602 $\pm$ 41 $^{\Delta\Delta}$ (8)	51.33 $\pm$ 11.57(4)	100.00
空白	416 $\pm$ 112 ** (8)	51.16 $\pm$ 10.96(4)	99.12
5% 血清	481 $\pm$ 48 ** (8)	49.54 $\pm$ 14.35(4)	99.00
10% 血清	538 $\pm$ 23 $^{\Delta\Delta}$ (8)	51.46 $\pm$ 12.44(4)	98.53
20% 血清	549 $\pm$ 62 $^{\Delta}$ (8)	49.59 $\pm$ 17.21(4)	96.47
40% 血清	636 $\pm$ 41 $^{\Delta\Delta}$ (8)	40.22 $\pm$ 15.94(4)	86.64
60% 血清	577 $\pm$ 78 $^{\Delta}$ (8)	31.47 $\pm$ 13.00 * (4)	73.70
80% 血清	494 $\pm$ 91 * (8)	34.19 $\pm$ 14.18 * (4)	67.52

注:与正常组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与空白组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ ()内为样本数

表 2 不同浓度家兔血清对 VEC-304
释放 ACE 及 LDH 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ACE (u)	LDH 活性释放率 (%)
正常	8	15.34 $\pm$ 1.17	2.01 $\pm$ 1.09
空白	8	16.42 $\pm$ 1.94	3.12 $\pm$ 1.13
5% 血清	8	15.87 $\pm$ 1.07	3.10 $\pm$ 1.21
10% 血清	8	15.64 $\pm$ 1.74	2.12 $\pm$ 0.45
20% 血清	8	17.05 $\pm$ 1.91	8.20 $\pm$ 3.47 *
40% 血清	8	20.41 $\pm$ 1.97 *	29.85 $\pm$ 3.10 *
60% 血清	8	26.45 $\pm$ 3.20 *	38.97 $\pm$ 10.03 *
80% 血清	8	29.19 $\pm$ 1.33 *	46.16 $\pm$ 11.24 *

注:与正常组比较, $^{*}P<0.01$
影响,而当家兔血清浓度增至 40% 以上,其对 VEC-304 ACE 的释放则明显增加($P<0.01$);VEC-304 LDH 细胞毒性实验表明,20% 组 LDH 释放明显增加($P<0.01$),且随着家兔血清浓度的升高,这种变化呈明显的剂量依赖性。

讨 论

血清作为体外组织及细胞培养中重要的天然培养基,含有丰富的营养物质,包括大分子的蛋白质和核酸等,对促进细胞生长繁殖、粘附及中和某些毒性物质的毒性起着一定的作用,因此,高质量的血清往往成为体外培养体系能否建立的关键因素,这不仅要求血清无菌无污染,而且还要有一定的低内毒素含量及低球蛋白含量等,这样才能较少产生对细胞培养过程中自身血清的影响。但在进行体外含药血清的制备时,由于技术等方面的原因,只能采用常规的实验条件和方法,这样所制备的血清势必对细胞具有一定的基础影响作用。为此,我们采用常规制备的家兔血清,观察了不同浓度的家兔血清对细胞的影响。

从本实验结果来看,常规方法制备的家兔血清在作用于培养体系中对细胞具有一定的细胞毒性作用,特别是当血清浓度达到及超过 40% 时尤为明显。形

态学上,当细胞浓度超过 40% 时,可见明显的细胞损伤,并且呈现随着浓度的增加而损伤加重的表现。MTT 试验表明,当用无血清诱导细胞 24h 后,细胞增殖受到抑制(OD 值降低),而加用各种浓度的家兔血清后,则表现出明显的血清促生长及促增殖作用,但这种促增殖作用一旦超过了一定的浓度(40%)后,由于在促增殖作用和细胞毒作用的共同影响下,MTT 反应的就是这二者的共同作用结果,既有高浓度血清对细胞的促增殖作用,也有对细胞的毒损作用,所以 MTT 细胞毒试验不呈现剂量依赖关系。为了单独说明细胞的毒损作用,我们又进行了台盼蓝染色的活细胞计数,结果表明,常规制备的家兔血清浓度达到 20% 时,基本上不具有对细胞的毒损作用,其活细胞率达 96.47%。但当血清浓度超过 40% 时,就开始有明显的细胞死亡,而且随着浓度的增加,呈现出死亡率的上升,这和我们形态学的观察结果一致。

另外,从对血管内皮细胞损伤的定量分析角度,我们测定了人脐静脉内皮细胞内 ACE 和 LDH 的释放量。VEC-304 是美国 ATCC 公司认证的 VEC 的一种永生化细胞系,由于其培养时不需要特异的生长因子,并且保持有接触抑制等正常内皮细胞的生长特征⁽³⁾,这样既可以在对细胞造成损伤的前提下进行无血清培养,将其作为对照,也可以起到降低实验背景和实验误差的作用。LDH 是糖酵解酶,其广泛存在于人体组织细胞内,当细胞受损时可释放出来,损伤越重,释放量越多,所以常常通过测定培养液中 LDH 释放量占培养液中细胞总 LDH 的比例来反映细胞膜损伤的程度。ACE 主要来源于血管内皮细胞,血管内皮细胞受损后,ACE 便从血管内皮细胞表面脱落,使 ACE 水平增加。有研究证明,ACE 水平变化是血管内皮细胞损伤的可靠指标⁽⁴⁾。本实验结果表明,常规制备的家兔血清浓度在 20% 时,ACE 没有明显变化,而 LDH 则发生变化,这似乎表明,20% 血清给药浓度对细胞的损伤仍待进一步研究。但可以肯定的是血清药物浓度达到或超过 40% 时,其 ACE 和 LDH 的释放则呈现出明显的毒损作用。

总之,从本实验结果来看,常规制备的家兔血清在无污染和无溶血的情况下,其对细胞的作用浓度是有一定限制的,当达到 40% 或更高时有较为明显的损伤特征和表现。所以,在中药血清药理学研究中,应进行常规制备正常血清及含药血清的细胞毒实验,以确定最大的给药血清浓度,尽量减少血清本身带给实验的影响。

参 考 文 献

1. 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版西安公司, 1996: 186—187.
2. 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000: 199—200.

3. Kikiko Takahashi. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *Cell Dev Biol* 1990; 25: 265—274.

4. 马丽萍, 张国元, 吴宗贵, 等. 17β -雌二醇对低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的影响. *基础医学与临床* 2000; 20(2): 82.

(收稿 2000-11-10 修回 2001-07-08)

苦参液加思密达灌肠治疗老年溃疡性结肠炎 36 例

王玉玲 郭翠英

1998 年 5 月~2001 年 2 月, 我们用苦参液加思密达保留灌肠治疗老年溃疡性结肠炎 36 例, 并与单用思密达液灌肠的 22 例作对比观察, 现报道如下。

临床资料 参照全国慢性非感染性肠道疾病学术研究会制定的溃疡性结肠炎的诊断及疗效标准[中华消化杂志 1993; 13(6): 354—355]。将 58 例患者按就诊顺序随机分为两组, 治疗组 36 例, 男 24 例, 女 12 例, 年龄 60~70 岁, 平均 67 岁, 病程 3 个月~4.5 年, 平均 3 年, 腹泻 36 例, 腹痛 20 例, 里急后重 14 例, 脓血便 10 例; 每日大便次数为 1~8 次, 平均 4 次; 大便镜检(1 个视野)红细胞 + ~ +++ 者 24 例, 脓细胞 + ~ +++ 者 36 例, 纤维结肠镜检: 单发性溃疡 19 例, 多发性溃疡 17 例; 病变位于直肠、乙状结肠 18 例, 左半结肠 12 例, 全结肠 6 例。对照组 22 例, 男 12 例, 女 10 例, 年龄 60~78 岁, 平均 68 岁, 病程 3 个月~5 年, 平均 3.5 年, 腹泻 22 例, 腹痛 16 例, 里急后重 7 例, 脓血便 5 例; 每日大便次数为 1~8 次, 平均 3 次; 大便镜检: 红细胞 + ~ +++ 者 10 例, 脓细胞 + ~ +++ 者 22 例, 纤维结肠镜检: 单发性溃疡 12 例, 多发性溃疡 10 例; 病变位于直肠、乙状结肠 10 例, 左半结肠 6 例, 全结肠 6 例。两组患者资料比较, 差异无显著性, 具有可比性。

方 法

1. 灌肠液的配制 苦参和思密达混悬液: 取苦参 30g 加水文火煎至 100ml 与思密达(法国巴黎益普生制药公司生产, 3g/袋)6g 制成混悬液。思密达液: 用思密达 6g 加入生理盐水 100ml 中混匀即可。

2. 治疗方法 治疗组用苦参、思密达混悬液灌肠, 对照组用思密达液灌肠。将灌肠液 100ml 加入灌肠筒中, 加温至 37℃ 左右, 患者左侧卧位, 屈膝, 润滑肛周并插入肛管。病变在直肠或(及)乙状结肠部位者, 插入 10~15cm, 病变在乙状结肠以上者, 插入 20cm 左右, 缓慢注入药液。嘱患者第 2 天晨起排便,

少数不能坚持到第 2 天可提前排便。每晚 1 次保留灌肠, 两周为 1 个疗程, 连续治疗 2 个疗程, 并监测血压、心率、血糖、心电图变化, 每周查大便常规 1 次, 4 周后复查纤维结肠镜。有高血压、糖尿病者, 酌情予以口服依那普利、二甲双胍及对症治疗。统计学方法采用 χ^2 检验。

结 果

1. 疗效标准 显效: 症状及体征基本消失, 每天大便次数为 2 次以下, 大便常规正常, 肠镜下肠粘膜糜烂及溃疡消退。有效: 症状及体征减轻, 每天大便 < 2~4 次, 大便常规镜下红细胞 < 10 个, 肠镜检查肠粘膜充血水肿消失, 糜烂及溃疡面积缩小。无效: 未达到有效标准者。

2. 疗效 治疗组 36 例, 显效 23 例(63.9%), 有效 7 例(19.4%), 无效 6 例(16.7%), 总有效率 83.3%。对照组 22 例, 显效 4 例(18.2%), 有效 9 例(40.9%), 无效 9 例(40.9%), 总有效率 59.1%, 两组显效率比较差异有显著性($P < 0.05$)。两组患者的血压及血糖无明显变化, 治疗过程中未发现明显的副作用。出院后随访 2 个月, 治疗组 30 例, 复发 2 例(6.7%); 对照组 13 例, 复发 4 例(30.8%), 两组比较差异有显著性($P < 0.05$)。

讨 论 苦参含有多种生物碱, 其中氧化苦参碱是一种低毒有效的免疫抑制剂, 同时还具有广谱的抗微生物作用, 思密达为双八面体蒙脱石微粒, 1g 思密达表面积可达 100~110m², 其颗粒与颗粒之间具有粘塑性, 能连续覆盖在消化道表面, 增强消化道粘液屏障作用。另外, 思密达还可促进消化道上皮再生, 加速病变粘膜的修复, 吸附消化道内气体, 降低结肠内气体和刺激性, 减轻腹胀, 激活凝血因子, 有局部止血作用。因此两种药物合用, 既可以调节机体免疫力, 又可以消炎、止血、保护肠粘膜、促进病变粘膜的修复, 避免了全身用药的不良反应, 对血压、血糖无影响, 尤其适用于老年溃疡性结肠炎患者。

(收稿 2001-04-20 修回 2001-08-16)

解放军 251 医院(河北省张家口 075000)