

# 黄芪多糖促进中性粒细胞与血管内皮细胞黏附及相关黏附分子表达

郝 钰<sup>1</sup> 邱全璞<sup>1</sup> 吴 珺<sup>1</sup> 王伊光<sup>2</sup>

**摘要** 目的 观察黄芪多糖对中性粒细胞与血管内皮细胞黏附作用及相关黏附分子表达的影响,以探讨黄芪托毒生肌作用与其对伤口愈合中炎症反应作用的关系。方法 以黄芪多糖或黄芪多糖加白细胞介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)处理人中性粒细胞(PMN)或人脐静脉内皮细胞(HUVEC)后,用蛋白染料染色法研究黄芪多糖对 PMN 与 HUVEC 黏附的作用,用 Cell-ELISA、APAAP 法研究黄芪多糖对细胞表面黏附分子表达的影响。结果 黄芪多糖作用于 HUVEC 能明显促进其与 PMN 的黏附,而作用于 PMN 未见其作用增强。黄芪多糖与 IL-1 共同处理 HUVEC,能促进 IL-1 诱导的 PMN 与 HUVEC 的黏附增强,且能增加由 IL-1、TNF 诱导的 HUVEC 表达黏附分子 ICAM-1 的表达;黄芪多糖处理 PMN 后对黏附分子 CD18 的表达无作用。结论 黄芪多糖可通过促进内皮细胞表面 ICAM-1 的表达而促进中性粒细胞与内皮细胞的黏附,促进伤口愈合中的炎症反应,这可能是黄芪托毒生肌作用的生物学基础之一。

**关键词** 黄芪多糖;中性粒细胞;血管内皮细胞;黏附分子;托毒生肌

**Effect of Astragalus Polysaccharides in Promoting Neutrophil-Vascular Endothelial Cell Adhesion and Expression of Related Adhesive Molecules** HAO Yu, QIU Quan-ying, WU Jun, et al *Department of Immunology, Beijing University of CM, Beijing (100029)*

**Objective** To explore the detoxication and tissue generation effect of Astragalus (As) in wound healing and its relation with inflammatory reaction, through observing the effect of Astragalus polysaccharides (AP) on neutrophil-endothelial cell adhesion and expression of related adhesive molecules. **Methods** Human polymorphonuclear leucocyte (PMN) or human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) was treated separately with AP, AP plus interleukin 1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) to study the effect of AP on PMN adhesion with HUVEC by rose bengal staining, and that on expression of superficial adhesive factor by means of Cell-ELISA and APAAP method. **Results** When AP acted on HUVEC, it could significantly promote the adhesion of HUVEC with PMN, while when AP acted on PMN, the adhesion would not increase. When HUVEC was treated by AP plus IL-1, the IL-1 induced PMN adhesion with HUVEC could be strengthened, and the expression of HUVEC superficial adhesive factor ICAM-1 induced by IL-1 and TNF was strengthened also, but when PMN treated with AP, it showed no effect on the expression of adhesive factor CD18. **Conclusion** AP promotes the adhesion between neutrophil and endothelial cell by way of promoting the expression of superficial ICAM-1 on surface of endothelial cells, so as to improve the inflammatory reaction in the wound healing course, it possibly is one of the biological bases of the detoxication and tissue generation effects of AP.

**Key words** Astragalus polysaccharides; neutrophil; vascular endothelial cell, adhesive molecule; detoxication and tissue generation

黄芪味甘、性温,有补益脾肺、益气升阳、托毒生肌

基金项目:国家自然科学基金(No. 39870949)及高校博士点专项基金资助(No. 9858)

作者单位:1. 北京中医药大学基础医学院微生物与免疫学教研室(北京 100029);2. 北京中医药大学东方医院外科

通讯作者:邱全璞, Tel: 010-64286973, E-mail: quanyingq@yahoo.com.cn

的作用,临床治疗气血不足所致疮疡内陷、脓成不溃、溃久不敛,是中医外科经典方剂透脓散的主药,也有报道单用黄芪促进伤口愈合<sup>[1,2]</sup>。伤口愈合是一个复杂的过程,炎症反应是伤口愈合的起始反应,而白细胞与血管内皮细胞黏附在炎症信号的启动和急性炎症反应的发生发展过程中具有重要的意义。本研究观察黄芪的主要有效成分黄芪多糖(Astragalus Polysaccharides,

APS)对中性粒细胞与血管内皮细胞粘附及相关黏附分子表达的影响,以探讨黄芪托毒生肌作用与其对伤口愈合中炎症反应作用的关系。

### 材料与方法

1 药品与试剂 APS(中国药品生物制品检定所提供),内皮细胞生长因子(endothelial cell growth factor, ECGF,德国 BM 产品),I 型胶原酶(美国 Sigma 产品),鼠抗人细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)单克隆抗体(美国 ZYMED),鼠抗人 CD18 单克隆抗体、重组白细胞介素 1(interleukin-1, IL-1)、重组肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、APAAP 试剂盒(邦定生物医学公司)。

### 2 实验方法

2.1 人脐静脉内皮细胞(human umbilical cord vein endothelial cell, HUVEC)的培养与鉴定 参照文献<sup>[3]</sup>方法,以 0.1%胶原酶消化法分离内皮细胞,用完全 M199(含 20% FCS, 20μg/ml ECGF)接种细胞于培养瓶(预先用 1%明胶包被),置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养,当细胞融合成单层时,以 0.125%胰酶-0.02% EDTA 消化传代,实验用第 3~5 代。用第Ⅷ因子相关抗原检测(SP 免疫细胞化学染色法)鉴定内皮细胞。

2.2 制备人外周血中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN) 参考文献<sup>[4]</sup>,细胞活力为 98%,纯度大于 97%。

2.3 PMN 与 HUVEC 黏附实验 方法同参考文献<sup>[5]</sup>。观察黄芪多糖对 PMN 与 HUVEC 黏附的影响,实验分为 4 组:对照组,黄芪多糖 1mg/ml、200μg/ml、40μg/ml 组,每组 3 复孔。对照组细胞无任何处理,其余 3 组用不同浓度黄芪多糖处理呈单层的 HUVEC 20h 或 PMN 30min 后进行细胞黏附实验。

黄芪多糖对 IL-1 诱导的 PMN 与 HUVEC 黏附的影响,实验分为 5 组:对照组、IL-1 组、黄芪多糖(1mg/ml、200μg/ml、40μg/ml)加 IL-1 组,每组 3 复孔。对照组细胞无任何处理,其余 4 组分别用 IL-1 或不同浓度黄芪多糖加 IL-1 处理呈单层的 HUVEC 20h 或 PMN 30min 后进行细胞黏附实验。

黄芪多糖对 TNF 诱导的 PMN 与 HUVEC 黏附的影响,实验分为 5 组:对照组、TNF 组、黄芪多糖(1mg/ml、200μg/ml、40μg/ml)加 TNF 组,每组 3 复孔。处理细胞方法同上。

2.4 HUVEC 表达 ICAM-1 表达的检测 采用细胞 ELISA 法。实验分为 6 组:对照组、黄芪多糖

(1mg/ml)组、TNF(1 000U/ml)组、TNF(1 000U/ml)加黄芪多糖(1mg/ml)组、IL-1(1 000U/ml)组、IL-1(1 000U/ml)加黄芪多糖(1mg/ml)组,用黄芪多糖或黄芪多糖加 IL-1、TNF 处理 96 孔板中呈单层的 HUVEC 20h 后,PBS 洗两遍,进行 Cell-ELISA 实验,方法同参考文献<sup>[5]</sup>。

2.5 PMN 表面 CD18 表达的检测 用 APAAP 桥联酶标法。实验分组同 2.4,用不同药物处理 PMN 30min 后,用离心涂片机制备细胞涂片(每组 3 张片),按试剂盒说明操作。显微镜下计数 200 个 PMN,计算阳性细胞百分率,并观察阳性细胞的染色密度。

3 统计学处理 采用 *t* 检验,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

### 结 果

1 黄芪多糖对 PMN 与 HUVEC 黏附的影响 见表 1。黄芪多糖处理 HUVEC 能明显促进其与 PMN 的黏附( $P < 0.01, P < 0.05$ ),黄芪多糖处理的 PMN 未见其黏附增加( $P > 0.05$ )。

表 1 黄芪多糖对 PMN 与 HUVEC 黏附的影响 ( $A570, \bar{x} \pm s$ )

| 组别           | <i>n</i> | HUVEC-PMN 黏附<br>(药物处理 HUVEC) | PMN-HUVEC 黏附<br>(药物处理 PMN) |
|--------------|----------|------------------------------|----------------------------|
| 对照           | 3        | 0.0440 ± 0.0072              | 0.0407 ± 0.0055            |
| 黄芪多糖 40μg/ml | 3        | 0.0630 ± 0.0050 *            | 0.0380 ± 0.0061            |
| 200μg/ml     | 3        | 0.0727 ± 0.0103 *            | 0.0413 ± 0.0091            |
| 1mg/ml       | 3        | 0.0873 ± 0.0098 **           | 0.0467 ± 0.0061            |

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

2 黄芪多糖对 IL-1 诱导的 PMN 与 HUVEC 黏附的影响 见表 2。IL-1 处理 HUVEC 能明显促进其与 PMN 的黏附( $P < 0.05$ ),黄芪多糖 1mg/ml 与 IL-1 共同处理 HUVEC 可增强 IL-1 的作用( $P < 0.05$ )。IL-1 处理的 PMN 未见与 HUVEC 黏附增加( $P > 0.05$ ),黄芪多糖与 IL-1 共同处理 PMN 亦无明显差异( $P > 0.05$ )。

表 2 黄芪多糖对 IL-1 诱导的 PMN 与 HUVEC 黏附的影响 ( $A570, \bar{x} \pm s$ )

| 组别                 | <i>n</i> | HUVEC-PMN 黏附<br>(药物处理 HUVEC) | PMN-HUVEC 黏附<br>(药物处理 PMN) |
|--------------------|----------|------------------------------|----------------------------|
| 对照                 | 3        | 0.0430 ± 0.0076              | 0.0427 ± 0.0058            |
| IL-1(1 000U/ml)    | 3        | 0.0813 ± 0.0080 △            | 0.0437 ± 0.0072            |
| IL-1 加黄芪多糖 40μg/ml | 3        | 0.0810 ± 0.0107              | 0.0413 ± 0.0042            |
| 200μg/ml           | 3        | 0.0897 ± 0.0078              | 0.0423 ± 0.0059            |
| 1mg/ml             | 3        | 0.0988 ± 0.0065 *            | 0.0447 ± 0.0065            |

注:与 IL-1 组比较,\* $P < 0.05$ ;与对照组比较,△ $P < 0.05$

3 黄芪多糖对 TNF 诱导的 PMN 与 HUVEC 黏附的影响 见表 3。TNF 处理 HUVEC 能明显促进其与 PMN 的黏附( $P < 0.01$ ),TNF 处理 PMN 亦能使其

与 HUVEC 间的黏附增强 ( $P<0.05$ ), 而黄芪多糖对 TNF 的这种作用无影响。

表 3 黄芪多糖对 TNF 诱导的 PMN 与 HUVEC 黏附的影响 ( $\Delta 570, \bar{x} \pm s$ )

| 组别                      | n | HUVEC-PMN 黏附<br>(药物处理 HUVEC) | PMN-HUVEC 黏附<br>(药物处理 PMN) |
|-------------------------|---|------------------------------|----------------------------|
| 对照                      | 3 | 0.0430 $\pm$ 0.0048          | 0.0290 $\pm$ 0.0046        |
| TNF(1 000U/ml)          | 3 | 0.0927 $\pm$ 0.0071 **       | 0.0413 $\pm$ 0.0050 *      |
| TNF 加黄芪多糖 40 $\mu$ g/ml | 3 | 0.0906 $\pm$ 0.0078          | 0.0390 $\pm$ 0.0036        |
| 200 $\mu$ g/ml          | 3 | 0.0863 $\pm$ 0.0113          | 0.0397 $\pm$ 0.0065        |
| 1mg/ml                  | 3 | 0.0973 $\pm$ 0.0121          | 0.0420 $\pm$ 0.0072        |

注:与对照组比较,\*  $P<0.05$ ,\*\*  $P<0.01$

4 黄芪多糖对 HUVEC 表面 ICAM-1 表达的影响 见表 4。黄芪多糖、IL-1、TNF 均能诱导 HUVEC 表面 ICAM-1 表达增加 ( $P<0.01$ ), 而黄芪多糖能促进 IL-1 和 TNF 的作用 ( $P<0.01, P<0.05$ )。

表 4 黄芪多糖对 HUVEC 表面 ICAM-1 表达的影响 ( $\Delta 490, \bar{x} \pm s$ )

| 组别                 | n | ICAM-1                     |
|--------------------|---|----------------------------|
| 对照                 | 3 | 0.084 $\pm$ 0.006          |
| 黄芪多糖 1mg/ml        | 3 | 0.190 $\pm$ 0.003 *        |
| TNF 1 000U/ml      | 3 | 0.209 $\pm$ 0.006 **       |
| TNF 加黄芪多糖(1mg/ml)  | 3 | 0.223 $\pm$ 0.003 $\Delta$ |
| IL-1 1 000U/ml     | 3 | 0.171 $\pm$ 0.004 *        |
| IL-1 加黄芪多糖(1mg/ml) | 3 | 0.198 $\pm$ 0.005 $\Delta$ |

注:与对照组比较,\*  $P<0.01$ ;与 TNF 组比较, $\Delta P<0.05$ ;与 IL-1 组比较, $\Delta P<0.01$

5 黄芪多糖对 PMN 表面 CD18 表达的影响 静止的 PMN CD18 阳性率即达 97%, 经 IL-1、TNF 作用后, CD18 阳性率无明显改变, 但静止的 PMN CD18 密度较低, 阳性染色较浅; 经 TNF 作用后, CD18 密度增高, 阳性染色变深, 说明 TNF 促进 PMN CD18 的表达。黄芪多糖与 TNF 共同处理 PMN 后, CD18 染色较 TNF 组差异无显著性。

讨 论

中医学认为创面的愈合与“脾主肌肉”、“脾生气血”密切相关, 明·汪机《外科理例》中说:“肌肉, 脾之所主也, 溃后收敛迟缓者, 乃气血虚衰使然, ……生肌之法, 当先理脾胃, 助气血为主, 则肌自生。”故气血不足之伤口的愈合多用黄芪以鼓舞正气、托毒生肌。炎症是伤口愈合的起始阶段, 一切抑制损伤后炎症的措施, 如应用皮质激素等都会导致伤口愈合不良或延迟。对许多具有生肌作用的中药进行实验研究发现, 在愈合早期中药组伤口面积非但未减小, 反而比对照组大, 创面分泌物明显增多, 有大量中性粒细胞和单核巨噬细胞渗出<sup>[6]</sup>; 而由放射线照射造成的伤口愈合延迟模型, 早期创面分泌物减少, 创口的分泌细胞总数也减少<sup>[7]</sup>,

说明伤口愈合早期的炎症反应是非常重要的。急性炎症反应主要由中性粒细胞介导, 中性粒细胞在多种介质作用下经过附壁、黏着、游走和渗出, 进入伤口区域。白细胞可通过吞噬作用、氧自由基抗菌效应和补体激活等作用清除坏死组织和异物, 保护正常组织、防止感染发生。同时它也分泌释放多种化学介质、细胞因子和酶, 有助于单核细胞、成纤维细胞、内皮细胞的趋化迁移和基质结构的降解, 促进伤口愈合<sup>[8]</sup>。研究表明糖尿病溃疡、放射性溃疡、激素治疗和化疗后溃疡愈合的迟缓均与中性粒细胞功能的异常有关。

中性粒细胞与血管内皮细胞黏附是急性炎症反应早期的必经过程, 也是影响炎症发生发展的关键因素<sup>[9]</sup>。研究表明, 中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附是通过存在于其表面的多种黏附分子及其配体分子相互作用的结果。在急性炎症早期细菌内毒素、补体激活产物等既能激活巨噬细胞释放前炎症因子如 IL-1、TNF- $\alpha$  等, 又能协同这些前炎症因子进一步激活中性粒细胞和血管内皮细胞, 从而促使其在不同的阶段表达不同的黏附分子, 介导循环中的中性粒细胞在血管壁上滚动、黏附, 直至渗出到炎症局部, 其中 ICAM-1/CD18 介导了中性粒细胞与血管内皮细胞强有力而稳定的黏附<sup>[10]</sup>。

本研究表明, 黄芪多糖能上调内皮细胞表面黏附分子 ICAM-1 的表达, 增强中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附, 从而促进中性粒细胞穿越血管内皮渗出在伤口局部聚集, 吞噬消化细菌、清除坏死组织, 最终通过化学介质、细胞因子及各种细胞的相互作用而使伤口愈合。这体现了中医学“去腐生肌”、“假脓长肉”理论的现代生物学基础。

参 考 文 献

1 邱克, 杨继洲, 李玉平, 等. 黄芪注射液促进痔瘘创面修复的临床研究. 湖北中医学院学报 2000;2(4):24—27.  
Qiu K, Yang JZ, Li YP, et al. Clinical research of Astragalus injection on wound healing of hemorrhoidal fistula. J Hubei Coll TCM 2000;2(4):24—27.  
2 王和平. 口服生黄芪粉促进伤口愈合 57 例报告. 新疆中医药 1997;15(3):10—11.  
Wang HP. Report of 57 cases on oral administration of crude Astragalus powder in promoting wound healing. Xingjiang TCM 1997;15(3):10—11.  
3 Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest 1973; 52:2745—2754.

- 4 杨景山. 中性粒细胞的分离. 见: 杨景山主编. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990: 17—18.  
Yang JS, editor. Separation of neutrophils. Technique of medical cellular chemistry and cellular biology. Beijing: United Publishing House of Beijing Medical University and Beijing Union Medical College, 1990: 17—18.
- 5 郝钰, 邱全瑛, 吴珺, 等. 小檗碱对淋巴细胞与血管内皮细胞黏附及黏附分子的影响. 中国免疫学杂志 1999; 15(11): 523—525.  
Hao Y, Qiu QY, Wu J, et al. Effect of berberine on lymphocyte and endothelium adhesion, and adhesion molecules expression. Chin J Immunol 1999; 15(11): 523—525.
- 6 李萍, 黄启福, 盛巡, 等. 珠香散对阿霉素攻击大鼠伤口愈合影响的实验研究. 北京中医 1998; 3(4): 33—35.  
Li P, Huang QF, Sheng X, et al. Experimental study of Zhuxiang San on healing of rat wound caused by adriamycin. Beijing TCM 1998; 3(4): 33—35.
- 7 崔玉芳, 夏国伟, 杨红, 等. 放射延迟伤口愈合机制的初步研究. 中国危重病急救医学 2001; 13(7): 430—433.  
Cui YF, Xia GW, Yang H, et al. Preliminary analysis of delayed wound healing induced by radiation. Chin Crit Care Med 2001; 13(7): 430—433.
- 8 付小兵, 王德文. 创伤修复基础. 北京: 人民军医出版社, 1997: 216—229.  
Fu XB, Wang DW. Basic of Wound Healing. Beijing: People's Military Doctor Publishing Company, 1997: 216—229.
- 9 Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. FASEB 1994; 8: 504—512.
- 10 Smith CM, Rothlein R, Hughes BJ, et al. Recognition of an endothelial determinant for CD18-dependent human neutrophil adhesion and transendothelial migration. J Clin Invest 1998; 82: 1746—1756.

(收稿: 2003-07-22 修回: 2003-10-12)

## · 征订启事 ·

《中国老年保健医学》杂志(ISSN 1672-2671, CN 11-4981/R)是卫生部主管, 中国老年保健医学研究会主办的综合性医学学术刊物, 季刊, 国内外公开发行。杂志内容主要是针对老年群体所涉及的预防保健、治疗、康复等医疗保健问题开展经验交流和学术探讨。如介绍具有国内外先进水平的老年病学科研成果; 介绍老年病临床诊疗经验, 以及与其密切相关的新技术、新药品和新器械的应用; 介绍老年病健康康复的实践与探索等内容, 栏目设置融信息、理论、应用于一体, 使读者可及时了解国家政策法规和医学动态, 把握学术前沿和研究方向, 沟通医药企业信息。适合从事老年医疗、保健的各级科研人员、临床工作者、药品、保健品及康复器械生产企业等相关人员和单位订阅。《中国老年保健医学》杂志为季刊, 国际大 16 开本, 64 页, 定价 9.80 元, 全年定价 39.20 元。本刊为自办发行, 欢迎单位和个人直接汇款至本刊发行部。通讯地址: 北京朝阳区芍药居北里 304 号楼 406 室杂志社发行部, 邮编: 100029; 查询电话: 010-84640739 84649522, 传真: 010-84640279。

## · 征文通知 ·

由中华中医药学会内科分会主办, 山西省中医药学会内科分会、太原市中医药学会承办的“中华中医药学会第五届内科疑难病证辨治规律研讨会”, 将于 2004 年 8 月在山西省太原市

举行, 现开始征文。欢迎有志于中医内科疑难病研究的中西医结合工作者踊跃投稿。

1 会议主题 中医内科疑难病证辨治规律研讨。

2 征文内容 (1) 中医内科疑难病证辨治规律探讨; (2) 中医内科疑难病证的临床经验总结; (3) 中医内科疑难病证的独特诊治方法、方药、心得体会; (4) 诊治中医内科疑难病证的新思路、新方法; (5) 中医内科疑难病证的诊断标准和疗效评价研究; (6) 中医内科疑难病证新的科研成果; (7) 尤其欢迎病毒性疾病和脏器纤维化疾病的有关论文。

3 征文要求 (1) 来稿要求资料真实, 具有科学性和先进性, 名词术语准确, 采用法定计量单位, 参考文献规范。(2) 一般稿件全文不超过 2 500 字, 附关键词及 150 字中文摘要。(3) 来稿一式两份, 用 A4 纸打印, 宋体字, 标题 3 号字, 内容 5 号字。(4) 来稿请寄 30 元论文审查费。(5) 论文题目下注明作者姓名、职称、工作单位、通讯地址及邮政编码。

4 征文截止日期 2004 年 7 月 15 日。

5 来稿请寄 山西省太原市并州西街山西省中医药研究院刘光珍、张克敏、刘智, 邮编: 030012; 或中国中医研究院广安门医院 高荣林, 邮编 100053。