论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0972-03

炎症因素在泡沫细胞形成中的作用及三七皂苷对其影响

贾 乙,李晓辉 (第三军医大学基础医学部药理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨炎症因素在小鼠腹腔巨噬细胞来源泡沫细胞形成中的作用及三七皂苷对其影响。**方法** 在传统泡沫细胞形成模型基础上添加炎症刺激因素及三七皂苷,培养后,油红O染色观察泡沫细胞的形成,检测细胞内总胆固醇的含量,取细胞培养液测定TNF-α和IL-1的含量。**结果** 酵母多糖能够明显增加细胞内脂质的沉积,同时伴有细胞产生TNF-α和IL-1的增加,三七皂苷可以明显减少由炎症因素引起的脂质沉积的增加,并同时减少炎症细胞因子的产生。**结论** 炎症因素可以明显促进泡沫细胞的生成,三七皂苷可通过其抗炎活性干预这一过程。

关键词:泡沫细胞;酵母多糖;炎症;三七皂苷
中图法分类号:R282.71; R364.5; R541.402 **文献标识码**:A

Role of inflammation in and effects of saponin of Panax Notoginseng on formation of foam cells

JIA Yi, LI Xiao-hui (Department of Pharmacology, College of Medicine, Third Military Medical Univrersity, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the role of zymosan in and the effects of total saponin of Panax notoginseng (PNS) on the formation of foam cells originating from peritoneal macrophages. **Methods** The peritoneal macrophages of mice were cultured with zymosan, PNS and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) for 48 h. The shape of the foam cells was shown with the staining of red oil O dye. The content of total cholesterol (TC) in the foam cells was determined. The concentration of TNFα and IL-1 in the supernatant of the cell culture was measured. **Results** The TC content and the concentration of TNF-α and IL-1 were significantly higher in the zymosan group than in the PNS group. **Conclusion** Inflammation can accelerate the formation of foam cells through the pathway of inflammatory cytokines but PNS can reduce the formation with the inhibition of inflammation.

Key words: foam cell; zymosan; inflammation; Panax notoginseng

既往认为高血脂是动脉粥样硬化发生的主要危险因素,但临床流行病学研究表明约50%以上的心血管疾病患者血脂水平正常,并且在努力控制血脂水平的情况下心血管疾病的发病率仍在持续上升[1],这提示有其它重要致病因素存在。临床流行病学研究表明,慢性支气管炎、前列腺炎、牙龈炎等患者动脉粥样硬化发病率高,其缺血性脑中风的发生率(48%)也显著高于非感染/炎症患者(24%)[2],提示炎症免疫因素(inflammatory and immunological factors, IIF)在动脉粥样硬化形成中可能具有重要作用。泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化发病的核心环节,酵母多糖作为典型的炎症刺激剂在体内注射可诱导多器官衰竭,体外应用可激活炎症细胞,为此本研究首先观察了酵母多糖对体外泡沫细胞形成的影响。

三七皂苷(total saponins of Panax notoginseng, PNS)是三七的主要有效成分,对多种心血管疾病有良好的防治作用,通常认为其机制与降血脂、抗血栓形成等效应有关。本研究组既往观察到PNS还具有显著的抗炎作用[3],因此本研究一并探讨了PNS对酵母多糖影响泡沫细胞形成的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康昆明小鼠,雄性,体质量18~20 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

酵母多糖(Zymosan A)、无酚红RPMI1640培养基购自Sigma公司;低密度脂蛋白(LDL,1.5 mg/ml)购自北京协和医科大学;

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470465,30371768)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470465, 30371768)
作者简介:贾 乙(1979-),男,辽宁省沈阳市人,硕士研究生,助教,主要从事动脉粥样硬化发病机制及药物干预方面的研究。电话:(023)68753397-83
通讯作者:李晓辉,电话:(023)68753397-81
收稿日期:2005-03-11;修回日期:2005-04-30

三七皂苷(粉剂，纯度 99%)，由中国科学院昆明植物研究所提供)；胆固醇 CHOD-PAP 法测定试剂盒购自上海荣盛生物制品公司；小鼠 TNF-α、IL-1 ELISA 法测定试剂盒购自晶美生物公司。

1.3　氧化性低密度脂蛋白的制备

将 LDL 置含 10 μmol/L Cu^{2+} 的 PBS 中，37 ℃透析 12 h，然后置含 0.01% EDTA 的 PBS 中，4 ℃透析 24 h 中止氧化，过滤除菌后保存待用。

1.4　巨噬细胞的分离

每只小鼠腹腔内注射无血清无酚红 RPMI1640 培养液 2 ml，20 min 后颈椎脱臼处死，75% 乙醇浸泡 10 min，剖腹收集腹腔内液，750 r/min 离心 5 min 后收集细胞，用含 10% 胎牛血清的无酚红 RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 5×10^6/ml。取 6 孔培养板 10 张，每孔加细胞悬液 1 ml，置 5% CO_2、37 ℃孵箱培养 2 h 后去上清液，用 PBS 洗去未贴壁细胞。

1.5　分组

分为单纯 ox-LDL 对照组、炎症刺激组、三七皂苷干预(低、中、高剂量)组，每组两张培养板。每孔加入含 10% 胎牛血清无酚红 RPMI1640 培养液 1 ml 及 ox-LDL 100 μg/ml。炎症刺激组加入酵母多糖 100 μg/ml，三七皂苷组加入酵母多糖 100 μg/ml 后分别加入三七皂苷 30、100、300 μg/ml，置 5% CO_2、37 ℃孵箱培养 48 h。

1.6　油红 O 染色观察泡沫细胞

弃去培养液，漂洗固定后，依次用 0.3% 油红 O 和苏木精染色，倒置显微镜下观察。

1.7　培养液 TNF-α 和 IL-1 的测定

吸出培养上清液，加入 96 孔板中，按试剂盒说明进行，用 BIO-RAD 550 型酶标仪测量，根据标准曲线计算 TNF-α 和 IL-1 的浓度。

1.8　细胞内胆固醇的测定

吸去培养液，用 Folch 法[4] 抽提泡沫细胞中脂质，按试剂盒说明进行。

1.9　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间用 SPSS 8.0 统计软件行方差分析，对脂质含量和 TNF-α、IL-1 水平行 pearson 相关性分析。

2　结果

2.1　泡沫细胞形态观察

加入 ox-LDL 培养 48 h 后，可见胞浆内含有大量红染的脂质，表明泡沫细胞已经形成。与对照组相比，炎症刺激组细胞体积明显增大，胞浆内红染脂质明显增多。三七皂苷各组细胞体积较炎症刺激组明显减小，胞浆内脂质明显减少。

2.2　细胞内胆固醇的含量

炎症刺激组细胞内胆固醇含量比对照组升高 65.53% ($P<0.01$)，与炎症刺激组相比，三七皂苷各组细胞内胆固醇含量均明显降低(表 1)。

表 1　PNS 对泡沫细胞内胆固醇含量的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of PNS on the content of cholesterol in foam cells ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Dose(μg/ml)	Cholesterol [μg/(5×10^6 cells)]
ox-LDL	100	33.57 ± 4.13
ox-LDL + zymosan	100 + 100	55.57 ± 6.82**
ox-LDL + zymosan + PNS	100 + 100 + 30	40.35 ± 7.31##
ox-LDL + zymosan + PNS	100 + 100 + 100	32.18 ± 5.19##
ox-LDL + zymosan + PNS	100 + 100 + 300	31.93 ± 4.66##

**: $P<0.01$, *vs* ox-LDL group; ##: $P<0.01$, *vs* ox-LDL + zymosan group

表 2　PNS 对泡沫细胞培养液中 TNF-α 和 IL-1 含量的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of PNS on the concentration of TNF-α and IL-1 in culture medium of foam cells($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Dose(μg/ml)	TNF-α (pg/ml)	IL-1 (pg/ml)
ox-LDL	100	122 ± 25	81 ± 18
ox-LDL + zymosan	100 + 100	354 ± 32**	232 ± 38**
ox-LDL + zymosan + PNS	100 + 100 + 30	242 ± 30##	216 ± 30
ox-LDL + zymosan + PNS	100 + 100 + 100	141 ± 37##	154 ± 21##
ox-LDL + zymosan + PNS	100 + 100 + 300	135 ± 28##	133 ± 26##

**: $P<0.01$, *vs* ox-LDL group; ##: $P<0.01$, *vs* ox-LDL + zymosan group

2.3　培养液中 TNF-α 和 IL-1 含量

如表 2 所示，炎症刺激组培养液中 TNF-α 和 IL-1 浓度均明显高于对照组($P<0.01$)，三七皂苷 100、300 μg/ml 组细胞产生的 TNF-α 和 IL-1 较炎症刺激组有明显降低($P<0.01$)，30 μg/ml 组可明显减少 TNF-α 的产生，对 IL-1 则影响不大。

2.4　相关性分析结果

相关分析表明，脂质含量与 TNF-α 水平呈显著正相关($r=0.795$, $P<0.01$)，与 IL-1 水平呈显著正相关($r=0.580$, $P<0.01$)。

3　讨论

含大量脂质的泡沫细胞的形成是动脉粥样硬化初期的特征性病理变化，也是动脉粥样硬化发病的核心环节，泡沫细胞生成的多少对病变斑块的面积、血管的狭窄程度等具有直接的影响。影响泡沫细胞形成的因素包括血脂水平、细胞表面受体表达情况、胞内酰基辅酶 A 胆固醇酰基转运酶(acyl-coenzymeA-cholesterol acyltransferase, ACAT)活性等[5]。文献[6]报道，TNF-α 可上调巨噬细胞 ox-LDL 受体的表达，如凝集素样氧化低密度脂蛋白受体(LOX-1)，提示炎症因子可能促进泡沫细胞的形成，但尚少见实验研究报道。本实验采用酵母多糖作为炎症刺激剂，叠加传统的 ox-LDL 刺激小鼠腹腔巨噬细胞源性泡沫细胞的形成，结果观察到与单纯 ox-LDL 刺激组(传统泡沫细胞模型)比较，酵母多糖刺激组细胞分泌的 TNF-α 和 IL-1 显著增多，而且泡沫细胞内脂质沉积量也明显升高。相关分析显示，脂质含量与 TNF-α 水平呈显著正相关($r=0.795$, $P<0.01$)，与 IL-1 水平呈显著正相关($r=0.580$, $P<0.01$)，提示炎症刺激可以促进泡沫细胞的形成，其机制可能与活化的巨噬细胞产生炎症因子、进而导致 ox-

LDL摄入的增加有关。结合临床流行病学"患有慢性炎症疾病的患者动脉粥样硬化发病率较非患病组有明显的升高"的报道,以及本研究组发现,炎症刺激叠加高脂饮食致兔主动脉粥样硬化形成的面积及程度较单纯高脂饮食组显著升高,充分说明炎症是导致动脉粥样硬化形成的另一重要机制。

三七为五加科人参属植物,味甘、微苦、性温,具有活血化淤、止血定痛的功效,其主要有效成分为三七皂苷。研究表明,三七皂苷对动脉粥样硬化等多种心血管疾病具有良好的防治作用,但通常认为其机制与降血脂、抗血栓形成有关。本研究组既往发现三七皂苷可使由花生四烯酸合成的前列腺素等炎症介质明显减少,对急、慢性炎症具有显著治疗作用[3],还能显著降低严重烫伤大鼠血清炎症介质TNF-α的含量、明显改善动物早期心功能,说明三七除具有调节血脂等作用外,还具有很强的炎症调节作用。本研究观察到,三七皂苷可以剂量依赖性地抑制巨噬细胞受到炎症刺激后TNF-α和IL-1的释放,并能减少泡沫细胞内脂质沉积的增加。该结果提示,抑制炎症介质的生成可能是三七皂苷抗泡沫细胞形成的又一重要机制,这同时也说明炎症调节效应有望成为抗动脉粥样硬化的一个崭新策略,值得更深入的研究。

参考文献:

[1] Taubes G. Cardiovascular disease. Does inflammation cut to the heart of the matter[J]? Science, 2002, 296(5566): 242-245.
[2] Paganini-Hill A, Lozano E, Fischberg G, *et al*. Infection and risk of ischemic stroke: differences among stroke subtypes[J]. Stroke, 2003, 34(2): 452-457.
[3] Li S H, Chu Y. Anti-inflammatory effects of total saponins of Panax notoginseng[J]. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1999, 20(6): 551-554.
[4] Folch J, Less M, Ssloane Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. J Biol Chem, 1957, 226(1): 497-509.
[5] Li A C, Glass C K. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention[J]. Nat Med, 2002, 8 (11): 1235-1242.
[6] Kume N, Moriwaki H, Kataoka H, *et al*. Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 902: 323-327.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2005)10-0974-01

穿通性心脏伤25例救治体会

Emergency treatment for 25 patients suffered penetrating cardiac trauma

汤 文,陈 力 (重庆市第二人民医院胸心外科,重庆 402160)

我院1994年1月至2004年12月共收治30例穿通性心脏伤病人,其中25例进行了急诊手术。现将救治体会报告如下。

1 临床资料

30例病人中,男26例,女4例,年龄18~52岁,平均22.5岁。其中锐器伤28例,钝器伤2例。25例接受手术的病人共发现52处损伤,其中4例右心房损伤,2例左心房损伤,5例右心室损伤,14例左心室损伤。单纯心脏穿透伤15例,合并其它脏器伤10例。合并损伤共38处,其中大血管2例,肺20例,食管5例,肝脏4例,脾脏7例。30例病人中,5例病人入院时心跳已经停止,紧急抢救无效死亡,因此未行手术治疗。25例施行急诊手术的病人中,20例表现为失血性休克,5例表现为心脏压塞。对于病情危重的病人直接开胸手术,同时行气管插管,其余病人先行紧急气管插管,然后开胸手术。手术切口的位置根据胸壁伤口的位置而定,其中采取左前外侧切口者7例,右前外侧切口者3例,正中切口者15例。24例直接缝合心脏伤口,1例在体外循环下进行手术。入胸后,迅速找到伤口,以手指压迫止血,使用Prolene缝线缝合伤口。伤口较多时,迅速处理其中较大的一个,然后分别处理其它伤口。心脏表面伤口处理结束后,观察心脏跳动情况。主动脉损伤较大估计直接修复困难者,迅速建立体外循环。对合并的其它部位的损伤一并处理。

结果:30例病人中5人死亡,其中因病情延误3例,大出血2例。其余病人均康复。手术治疗的病人术后并发症主要包括:气胸1例,胸腔感染1例,经合理处置均得到改善。对5例右心室损伤病人、14例左心室损伤病人随访6个月至3年,手术效果满意,无明显后遗症,无明显并发症。

2 讨论

穿通性心脏伤是较常见的外伤类型,发生率高,但入院患者较少[1]。这主要是由于其病情危重,大部分于入院前死亡的缘故。在运送到医院的患者中,也有很大一部分因途中拖延时间过长而丧失手术时机。可见,尽量缩短入院前的时间是抢救成功的基础。

开放性心脏外伤的临床表现可分为两类:一类是休克的表现,主要是由于失血过多引起,临床上可出现心悸、气促、血压

(下转977页)

作者简介:汤 文(1968-),男,重庆市荣昌县人,主治医师,主要从事心胸外伤和胸部肿瘤诊治方面的研究。电话:(023)85381655

收稿日期:2005-03-28;修回日期:2005-04-25