DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.011

粉防已碱对大鼠腹腔巨噬细胞释放部分炎症介质的影响

宋述强 胡友梅 (第三军医大学基础部药理学教研室) 630038

提 要 血小板活化因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF)及白介素-1(IL-1)是几个很强的炎症介质,对多种细胞、组织及器官都有重要的作用。利用洗涤的兔血小板聚集的方法和酶联免疫法、小鼠胸腺细胞增殖法分别测定了粉防已碱(Tet)对脂多糖(LPS)刺激大鼠腹腔巨噬细胞(PMΦ)释放PAF、TNF及IL-1的影响,结果表明Tet对TNF、IL-1及PAF的释放都有显著地抑制作用,并在0.1~100 μmol/L有剂量依赖关系,这提示Tet的抗炎、免疫抑制作用的机理之一是由于Tet抑制了PAF、IL-1、TNF等炎症介质的释放。

关键词 粉防已碱;脂多糖类;巨噬细胞;血小板活化因子;肿瘤坏死因子;白介素-1;大鼠
中图法分类号 R392.12

粉防已碱(Tetrandrine,Tet)是从中药粉防已科植物粉防已根中提取的有效成分,它具有抗炎、解热镇痛和抗过敏作用[1,2],在我国的传统医学中用于治疗风湿痹痛。本实验以体外脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)刺激的大鼠腹腔巨噬细胞(Peritoneal macrophages,PMΦ)为模型,研究了Tet对血小板活化因子(PAF)、肿瘤坏死因子(TNF)及白介素-1(IL-1)的影响,以进一步探讨Tet的抗炎机制。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar大鼠:♀♂不拘,体重160±15 g;新西兰家兔:♀♂不拘,体重2.8±0.3 kg;Balb/c小鼠:♀♂不拘,16±2.0 g;本校实验动物中心提供。

1.2 药品

Tet:浙江金华制药厂;盐酸阿的平:上海寄生虫病研究所;消炎痛:石家庄市制药厂;PAF标准品、LPS、刀豆素A(ConA)均为Sigma公司产品;TNF检测试剂盒:军事医学科学院产品;[^{3}H]-TDR:中科院上海原子能研究所产品,比活度481 GBq/mmol;MEM培养基:GIBICO公司。

1.3 仪器

CO_2孵箱:德国Heracus公司;血小板聚集仪:北京生化厂;酶联检测仪:BIORAD公司(美国);液闪计数仪:瑞典LKD-121型。

1.4 大鼠腹腔巨噬细胞培养上清的制备

将收集到的大鼠腹腔细胞洗涤,离心后用含10%小牛血清的MEM-BSA液(BSA占0.2%,W/V)制成细胞悬液(2×10^6细胞/ml)加入24孔培养板中,每孔1 ml,置37℃,5%CO_2孵箱中培养2 h,使之贴壁,然后倾去上清液并洗涤两次,再加入MEM-BSA培养液1 ml,同时加入不同浓度的药物,孵育15 min后,加入刺激剂LPS,继续培养到所需的时间后收集上清液。

1.5 培养上清中PAF的提取

按Stenton等报道的方法[3]向收集的上清液中分别加入1 ml预冷的丙酮,充分振摇30 s,4℃冰箱放置10 min后,4℃、1560× g 离心5 min,取其上清液,再加入2 ml预冷的氯仿,充分混匀,4℃、1560× g 离心5 min,取下层有机层,真空负压抽干,-20℃保存待测。

1.6 洗涤兔血小板的制备[4]

新西兰家兔清醒状态下心脏取血,用枸橼酸抗凝剂(acid-citric dextrose,ACD)抗凝(全血:抗凝剂6∶1,V/V),室温下以190× g 离心15 min后,取富含血小板的血浆(platelet-rich plasm,PRP),以2500× g 离心15 min后,沉淀的血小板用含0.1 mmol/L EGTA无钙明胶台氏液(0.25%明胶)洗两次,离心后去上清液,第二次洗涤时加入消炎痛(终浓度5 μmol/L),并在37℃放置30 min后再离心,然后用台氏液(含0.25%BSA)调整血小板数为3×10^8/ml。

1.7 PAF的生物定量测定[4]

血小板的聚集在恒温37℃和搅拌下测定,测定前30 s加入CP/CPK(CP 300 μg/ml CPK 150 μg/ml),并用PAF标准品作出标准曲线,根据样品使血小板聚集的程度可计算样品中PAF的含量。实验结果用$\bar{x}\pm s$表示,显著性用t检验判定。

1.8 TNF的测定(双重抗体夹心法)

在包被,封闭好的酶联板中加入标准TNF或待测样品,室温反应1 h,洗涤三次,再加入酶标抗体,室温反应50 min,洗涤三次后加入OPD显色,测定OD值,与标准曲线比较,计算样品中的TNF含量。

1.9 IL-1的测定[5]

Balb/c小鼠脱臼致死,在无菌的条件下取出胸腺,制成4×10^6/ml细胞悬液,于96孔培养板中每孔加入100 μl,同时加入ConA,待测样品,使每孔的终体积为200 μl,ConA浓度3 μg/ml,细胞浓度2×10^6/ml,样品稀释度1∶4,一式三份,置37℃,5%CO_2的孵箱中培养72 h,培养结束前6 h加入[^{3}H]-TDR(每孔18.5 KBq),培养结束后收集每孔的细胞,分别测定其dpm值。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 Tet 对 PAF 释放的影响

2.1.1 LPS 刺激巨噬细胞释放 PAF 的量效和时效关系：LPS 刺激巨噬细胞释放 PAF，且释放 PAF 的量随其剂量增大和刺激时间的增长而增加，实验结果表明，LPS 剂量增至5 μg/ml 以上后 PAF 的增加不明显，LPS 刺激 PMΦ 在1 h 时 PAF 释放的量达到最大值(表1)。

表1 LPS 在不同浓度和时间时刺激大鼠腹腔巨噬细胞 PAF 的释放

Tab 1 The release of PAF from PMΦ stimulated LPS in various concentration and time (n=3)

Time (LPS 5 μg·ml^{-1})	PAF (ng·ml^{-1})	LPS (60 min)	PAF (ng·ml^{-1})
0	0	0	0
20 min	0.21±0.03	0.5 μg/ml	0.60±0.06
30 min	1.20±0.34	1.0 μg/ml	3.43±0.24
40 min	3.25±0.27	5.0 μg/ml	11.60±1.33
50 min	7.98±1.16	10.0 μg/ml	12.36±1.67
60 min	11.37±1.61		
70 min	8.4 ±0.97		

2.1.2 Tet 对 LPS 刺激的大鼠 PMΦ 释放 PAF 的影响：在 LPS 5 μg/ml 孵育时间为60 min 的条件下 Tet 能显著地抑制 LPS 刺激的大鼠 PMΦ 释放 PAF，而且在0.1～100 μmol/L 范围内有剂量依赖性关系(表2)，在同样的条件下，阳性对照药阿的平在100 μmol/L 时也显著抑制 PAF 的产生。

表2 Tet 对 LPS 刺激的 PMΦ 释放 PAF 的影响

Tab 2 Effect of Tet on the release of PAF from PMΦ in the presence of LPS (LPS 5 μg/ml, n=6)

Group	PAF (μg·L^{-1})
None	0
LPS	11.83±1.17
LPS+Tet 0.1 μmol·L^{-1}	9.79±1.2*
LPS+Tet 1.0 μmol·L^{-1}	6.51±1.59**
LPS+Tet 10 μmol·L^{-1}	4.72±0.84**
LPS+Tet 100 μmol·L^{-1}	3.36±0.44**
LPS+Mep 100 μmol·L^{-1}	4.40±0.83**

*：P<0.05，**：P<0.01，*vs* LPS group；Mep：mepacrine

2.2 Tet 对 LPS 刺激大鼠 PMΦ 释放 TNF 及 IL-1 的影响

2.2.1 LPS 刺激大鼠 PMΦ 释放 TNF 的时效关系：LPS(20 μg/ml)刺激大鼠 PMΦ 后2、4、6、12、24 h 分别取培养上清液检测 TNF，结果表明12 h 时 TNF 释放量最大，24 h 稍有降低(表3)，为与 IL-1检测时间一致，药物实验时都采取24 h 后的上清液。

表3 LPS 刺激 PMΦ 释放 TNF 的时效关系

Tab 3 Time kinetic of TNF released by LPS-stimulated rat PMΦ (LPS 20 μg/ml, n=4)

Time (h)	TNF (ng·ml^{-1})
2	0.22±0.012
4	0.53±0.016
6	1.48±0.33
12	3.97±0.67
24	3.62±0.43

2.2.2 Tet 对 LPS 刺激大鼠 PM 释放 TNF 及 IL-1的影响

Tet 不仅抑制 LPS 刺激大鼠 PMΦ 释放 TNF，而且对 IL-1的释放也有显著的抑制，在0.1～100 μmol/L 范围内也呈剂量依赖性，在同样的条件下，阳性对照药地塞米松也显著抑制 TNF 及 IL-1的释放(表4)。

表4 Tet 对 LPS 刺激的 PMΦ 释放 TNF、IL-1的影响

Tab 4 Effect of Tet on IL-1 and TNF release by LPS-stimulated rat PMΦ (LPS 20 μg/ml, n=6)

Group	TNF (ng/ml)	IL-1 (dpm)
None	0.27±0.55	216.54±18
LPS	3.66±0.47	4433.25±374.5
LPS+Tet 0.01 μmol/L	2.45±0.38*	3188.6±426.3*
LPS+Tet 0.1 μmol/L	1.89±0.62**	2513.0±389.5**
LPS+Tet 1.0 μmol/L	1.71±0.43**	1722.2±317.2**
LPS+Tet 10 μmol/L	0.96±0.18**	1219.3±359.6**
LPS+Dex 1.0 μmol/L	1.07±0.12**	1151.25±184.6**

*：P<0.05，**：P<0.01，*vs* LPS group；Dex：dexamethasone

3 讨论

Tet 是一种二苯异喹啉碱(Bisbenzylisoqinoline alkaloid)，近来的药理学实验证明 Tet 具有广泛的抗炎和免疫抑制特性，已有实验证明 Tet 能抑制中性粒细胞的粘连、游走、趋化及氧自由基的产生[6,7]，抑制分裂素(mitogen)诱导的淋巴细胞转化、免疫蛋白的合成

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

及NK细胞活性[8]，抑制肥大细胞组胺的释放[9]。本实验的结果表明Tet对TNF、IL－1及PAF的释放都有显著地抑制作用，这可能是Tet抗炎和免疫抑制作用的又一重要机理。

PAF、TNF及IL－1是近来发现的几个很强的炎症介质，在炎症的发生、发展过程中起着重要的作用。机体受到致炎因素的作用后，首先是炎性粒细胞的游走、趋化及氧自由基的产生或炎症介质白介素、干扰素、TNF、PAF、花生四烯酸等的释放，继而产生一系列的生物效应，而钙离子在PAF的合成与释放过程中起重要作用，IL－1和TNF的mRNA表达也受钙/钙调蛋白的调节[10]。Tet具有钙拮抗作用，能抑制钙调蛋白的活性[11]，降低中性粒细胞钙离子的升高[12]。因此我们认为Tet对TNF、IL－1及PAF的释放的抑制作用可能与其钙拮抗作用有关。

参考文献

1 吕富华，张覃沐，方达超.汉防己甲素及汉防己乙素之消炎与抗过敏休克之研究.药学学报，1957；2：113

2 张覃沐，方达超，吕富华.苯海拉明对汉防己及其他一些镇痛药的加强作用.生理学报，1957；2：133

3 Steton SC, Court EM, Lomgstpm WP et al. Platelet－activating factor in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects. J Eur Respir, 1990；3：408～413

4 Wyle RL, O'Flaherty JT, Thomas MJ. Platelet－activating factor. Methods in Enzymology, 1988；163：45～54

5 Song JP, QIan DH. Effects of azimexon on interleukin 1 and interleukin 2 production *in vitro*. Acta Pharmacology Sincia, 1988；9：468～471

6 Seow WK, Li Siying, Thong YH. Inbibitory effect of tetrandrine on human neutrophil and monocyte adherence. Immunol Lett, 1986；13：83～88

7 Seow WK, Ferante A, Li Siying et al. Antiphagocytic and antioxidant properties in the plant alkaloid tetrandrine. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1988；85：404～409

8 Seow WK, Ferrante A, Goh DBH et al. In vitro immunosuppressive properities of the plant alkaloid tetrandrine. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1988；85：410～415

9 Teh BS, Seow WK, Cahalmer AH. Inhibition of histamine release from rat mast cell by the plant alkaloid tetrandrine. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1988；86：220～224

10 Kovds EJ, Radzioch D, Yong HA et al. Differential inhibition of IL－1 and TNF mRNA expression by agents which block second messengeer pathways in muring macrophages. J Immunol, 1988；141：3101～3106

11 钱月明，黄钺华.粉防己碱对血小板聚集、TXA_2合成及钙调素活性的影响.中国药理学报，1989；10(1)：61～65

12 张　敏，黎　鳌，杨宗诚等.烟雾吸入伤家兔血中性粒细胞游离走的变化及粉防己碱的作用.第三军医大学学报，1992；14(1)：1～4

(收稿：1994-07-15；修回：1995-03-16)

Study of tetrandrine effects on several inflammation mediators released by peritoneal macrophages of rats

Song Shuqiang, Hu Youmei (Department of Pharmacology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Platelet－activating factor (PAF), tumor necrosis factor (TNF) and interleukin 1 (IL－1) are potent molecular mediators of imflammation and exert significant effects on various types of cells, tissues and organs. The effects of tetrandrine (Tet) on the PAF, TNF and IL－1 released by the peritoneal macrophages of rats were observed with the methods of washed rabbit platelets, mouse thymocyte proliferation and enzyme－linked immunosorbant assay respectively. It was found that the release of PAF, TNF and IL－1 were significantly inhibited by Tet in a dosage－dependent manner of the range 0.1～100 μmol/L, which indicates that one of the mechanisms of the anti－inflammatory effect of Tet is its inhibition to the release of PAF, TNF and IL－1 by the peritoneal macrophages.

Key words tetrandrine; lipopolysaccharides; macrophages; platelet activating factor; tumor necrosis factor; interleukin－1; rat

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net