DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.03.001

粉防己碱对实验性胸膜炎的防治作用的研究*

何华美 李新芳** 张 敏 (第三军医大学基础部药理教研室) 630038

提 要 角叉菜胶(Carrageenin,Car)致大鼠胸膜炎后8 h,胸膜腔渗出液中中性白细胞游离钙浓度(Neu-[Ca^{2+}]i)升高,中性白细胞钙调素活性(Neu-CaMA)增强;粉防己碱(Tetrandrine,Tet)(10～80 mg·kg^{-1})于致炎前30 min和致炎后4 h给大鼠灌胃可明显减少炎症胸膜腔渗出液量、蛋白渗出量和白细胞游出数,同时能降低Neu-[Ca^{2+}]i和Neu-CaMA;在体外,Ca^{2+}(32 μmol·L^{-1})能不同程度的对抗Tet(20～160 μmol·L^{-1})抑制Neu-CaMA的作用。提示:Tet具有良好的抗炎作用,其机理与抑制Ca^{2+}-CaM系统有关,Tet抑制Neu-CaMA可能与其降低Neu-[Ca^{2+}]i有关。

关键词 胸膜炎/药物疗法;角叉菜;炎症;嗜中性白细胞;钙;钙调素;粉防己碱*

中图法分类号 R561.1

粉防己碱(Tetrandrine,Tet)对巴豆油性肉芽肿、佐剂性关节炎等实验性炎症有明显的抑制作用[1],但对其它炎症效果如何,以及它的抗炎作用机理还不清楚。钙离子(Ca^{2+})是重要的细胞信使,在体内主要通过钙调素(CaM)发挥生物效应。Ca^{2+}-CaM系统在炎症发生发展中的作用已引起人们重视。本实验用角叉菜胶(Carrageenin,Car)致大鼠胸膜炎模型,观察胸膜炎形成后8 h,胸膜腔渗出液量、蛋白渗出量、白细胞游出数、中性白细胞胞浆内游离钙浓度(Neu-[Ca^{2+}]i)和中性白细胞钙调素活性(Neu-CaMA)的变化,以及Tet对它们的影响;同时,采用体外实验研究Ca^{2+}、CaM对Tet影响Neu-CaMA的作用,为探讨Tet的抗炎作用机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 体内实验

1.1.1 动物分组和模型制备:成年雄性Wistar大鼠60只,体重186±27 g,随机分为生理盐水(NS)对照组、Car致炎对照组和Tet 10、20、40、80 mg·kg^{-1}处理组(每组10只)。Car致炎组和Tet各组大鼠分别于乙醚轻度麻醉后,向右胸膜腔内注入0.5% Car 2 ml·kg^{-1},NS对照组注入等容量NS。给药方法:于致炎前30 min和致炎后4 h,分别两次灌胃给各处理组大鼠以相应剂量的Tet(用5%葡萄糖盐水配制,给药容量为10 ml·kg^{-1},含相应剂量的Tet);NS对照组和Car致炎对照组同样分别两次灌胃给予等容量5%葡萄糖盐水。

1.1.2 测定指标及其方法:各组大鼠分别于胸膜腔内注射NS或Car后8 h,脱颈臼处死,测定以下指标:①渗出液量:常规方法收集。②渗出液中白细胞计数和分类计数:常规方法。③渗出液中蛋白质定量:Folin-酚试剂法。④渗出液中嗜中性白细胞(Neu)的分离及Neu-[Ca^{2+}]i的测定:先用离心洗涤的方法分离制备5×10^{9}·L^{-1} Neu悬液(Neu比例>95%,活细胞>90%),再按Cobbold等[2]的方法测定Neu-[Ca^{2+}]i。⑤Neu-CaMA测定:同上法制备Neu悬液,按PDE法[3]测定其活性。

1.2 体外实验

同上法制备5×10^{9}·L^{-1} Neu悬液,并按沸水变性法[3]提取、鉴定CaM,用Folin-酚试剂测定其蛋白含量。实验组设:Neu悬液+Tet(0、20、40、80、160 μmol·L^{-1})+$CaCl_2$(0、8、16、32 μmol·L^{-1})或+CaM(0、4、8、16 mg protein·L^{-1}),各组取Neu悬液1 ml加入相应药物和试剂,以Ca^{2+}载体A_{23187}为刺激剂,37℃水浴温孵30 min后,按前法测定CaMA。

1.3 统计学处理

实验数据用微机进行单因素方差分析,结果用$\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

2.1 致炎后8 h胸膜腔渗出液量、蛋白渗出量、白细胞游出数及Tet对它们的影响

Car致胸膜炎后8 h,胸膜腔内渗出液量,蛋白渗出量、白细胞游出数均较NS对照组明显增多,Tet(10～80 mg·kg^{-1})明显减少各项指标的数量,对体液和蛋白质渗出的抑制作用,未显示理想的量效关系,而对白细胞游出的抑制作用则呈现出剂量依赖关系,见表1。

* 国家自然科学基金资助项目,No.38970906

** 白求恩国际和平医院药械科,石家庄 050082

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

表1 Car 致炎后8 h 胸膜腔渗出液量、蛋白渗出量和白细胞游出数及 Tet 对它们的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The amount, protein content, neutrophil count of the pleural exudate at 8 h after induction of pleurtis by Car and the effects of Tet on these parameters

Group	Dose ($mg \cdot kg^{-1}$)	Amount of exudate ($ml \cdot rat^{-1}$)	Protein content ($mg \cdot rat^{-1}$)	Protein content ($g \cdot L^{-1}$)	Neurtrophil count ($10^7 \cdot rat^{-1}$)	Neurtrophil count ($10^9 \cdot L^{-1}$)
NS		0.21±0.09	8.1±2.8	1.6±0.4	1.43±0.36	0.29±0.07
Car		2.7±0.8^{++}	236±56^{++}	89±19^{++}	11.5±1.9^{++}	61±8^{++}
Car+Tet	10	2.4±0.8	213±56	86±16	10.8±1.6	45±8*
	20	2.0±0.7$^{**\#\#}$	173±49$^{**\#\#}$	85±14	6.8±1.4$^{**\#}$	36±7$^{**\#}$
	40	1.9±0.8**	157±66**	81±11*	5.4±1.6$^{**\#}$	30±8$^{**\#\#}$
	80	1.9±0.7**	154±46**	83±14*	4.8±1.3$^{**\#\#}$	25±4$^{**\#\#}$

$n=10$. $++P<0.01$ *vs* NS control; $*P<0.05$, $**P<0.01$ *vs* Car control; $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$ *vs* less and nearest dose-Tet group.

2.2 致炎后8 h 胸膜腔渗出液中 Neu-$[Ca^{2+}]i$ 及 Tet 的作用

Car 致炎后8 h,渗出液中 Neu-$[Ca^{2+}]i$ 较 NS 对照组升高约2.5倍,Tet 10、20、40、80 $mg \cdot kg^{-1}$分别使 Neu-$[Ca^{2+}]i$ 较 Car 致炎对照组降低2.6%,23.9%,25.8%,36.6%,但 Tet 80 $mg \cdot kg^{-1}$仍不能使 Neu-$[Ca^{2+}]i$ 降至 NS 对照组水平,见表2。

2.3 致炎后8 h 胸膜腔渗出液中 Neu-CaMA 及 Tet 的作用

Car 致炎后8 h,Neu-CaMA 较 NS 对照组升高约2倍;Tet 能剂量依赖性抑制 Neu-CaMA(见表2)。

表2 Car 致炎后8 h 渗出液中 Neu-$[Ca^{2+}]i$ 和-CaMA 及 Tet 的作用($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Neu-$[Ca^{2+}]i$ and -CaMA in the pleural exudate at 8 h after induction of pleuritis by Car and the effects of Tet on these parameters

Group	Dose ($mg \cdot kg^{-1}$)	Neu-$[Ca^{2-}]i$ ($nmol \cdot L^{-1}$)	Neu-CaMA (hydrolysis of cGMP%)
NS	—	229± 48	39± 8
Car	—	565±163^{--}	78± 7^{--}
Car+Tet	10	550±141	82±11
	20	430±114$^{*\#}$	67± 8$^{*\#\#}$
	40	419±136*	50± 7$^{**\#\#}$
	80	358±162**	42± 6$^{**\#}$

$n=10$. $++P<0.01$ *vs* NS control; $*P<0.05$, $**P<0.01$ *vs* Car control; $\#P<0.05$, $\#\#P<0.01$ *vs* less and nearest dose-Tet group.

2.4 细胞外 Ca^{2-} 对 Tet 抑制 Neu-CaMA 的影响

在 A_{23187}的作用下,Neu 悬液中加入 Ca^{2-},Neu-CaMA 随细胞外液 Ca^{2-}浓度增加而增强。Tet 与 Neu 悬液孵育30 min,对 Neu-CaMA 有明显抑制作用,在20～80 $\mu mol \cdot L^{-1}$范围内,呈剂量依赖关系。再增大 Tet 的浓度其作用无明显增强。Tet 的这种作用受细胞外 Ca^{2-}的影响,随细胞外 Ca^{2-}浓度增加,Tet 的抑制作用减弱,当细胞外 Ca^{2-}为32 $\mu mol \cdot L^{-1}$时,Tet 40、80 $\mu mol \cdot L^{-1}$的抑制作用被取消,Tet 160 $\mu mol \cdot L^{-1}$对 Neu-CaMA 的抑制作用减弱,见图1。

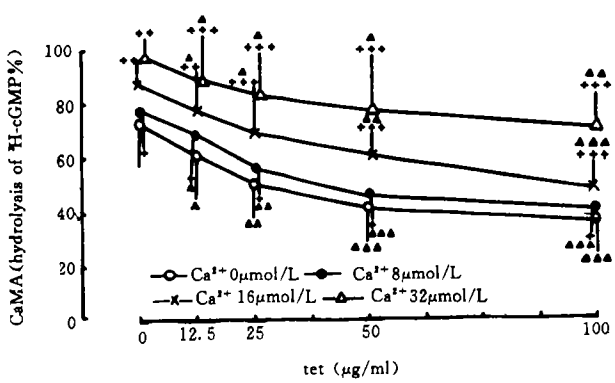


图1 细胞外 Ca^{2-}对 Tet 抑制 Neu-CaMA 的影响($n=5$)

Fig 1 Effects of extracellular Ca^{2-} on inhibition action of Tet on Neu-CaMA.

$n=5$. $+P<0.05$, $++P<0.01$ *vs* Ca^{2-} 0 $\mu mol \cdot L^{-1}$; $*P<0.05$, $**P<0.01$ *vs* Tet 0 $\mu g \cdot L^{-1}$; $\#P<0.05$ *vs* the less and nearest dose-Tet group.

2.5 细胞外 CaM 对 Tet 抑制 Neu-CaMA 的影响

不同量的 CaM 与 Neu 悬液作用,对 Neu-CaMA 无明显影响,Tet 20～80 $\mu mol \cdot L^{-1}$与 Neu 悬液孵育30 min,呈剂量依赖地抑制 Neu-CaMA,加入不同量 CaM 对 Tet 抑制 Neu-CaMA 无明显影响,见图2。

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

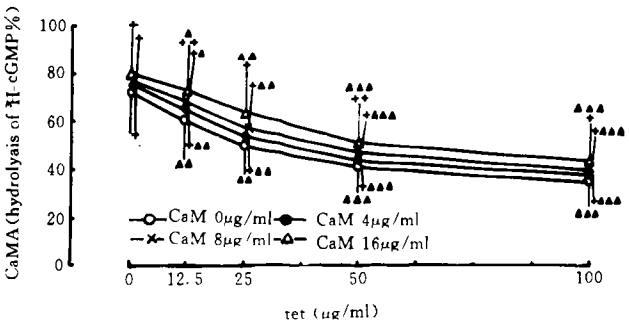


图2　细胞外CaM对Tet抑制Neu-CaMA的影响($n=5$)

Fig 2　Effects of extracellular CaM on inhibition action of Tet on Neu-CaMA.

$n=5$. $+P<0.05$ *vs* CaM 0 mg protein·L^{-1}; $*P<0.05$, $**P<0.01$ *vs* Tet 0 μmol·L^{-1}; $\#P<0.05$ *vs* the less and nearest dose-Tet group.

3　讨论

3.1　炎症时白细胞 Ca^{2+}-CaM 系统的变化

本实验证实，炎症时，白细胞 Ca^{2+}-CaM 系统出现明显的变化：Neu-[Ca^{2+}]i 显著升高，Neu-CaMA 明显增强。Neu-[Ca^{2+}]i 的升高可能主要是由于致炎因子的作用引起细胞外 Ca^{2+} 通过细胞膜上的 Ca^{2+} 通道进入细胞内、细胞内钙库释放 Ca^{2+} 和钙泵转运功能低下所致[4]。Neu-CaM 的增强则可能主要与 Neu-[Ca^{2+}]i 升高有关。缺 Ca^{2+} 时，CaM 没有活性，当刺激引起[Ca^{2+}]i 增加($10^{-7}\rightarrow10^{-6}$ mol·L^{-1})时，CaM 与 Ca^{2+} 结合，形成有活性的 Ca^{2+}-CaM 复合物，后者与细胞内酶发生可逆反应，形成有活性的全酶，从而促进细胞的生化反应和生理效应[5]。

3.2　Tet 的抗炎作用及其与影响 Ca^{2+}-CaM 系统的关系

Tet 体内用药明显地减少角叉菜胶所致胸膜炎时的炎性渗出液量、蛋白渗出量和白细胞游出时，显示了良好的抗炎作用。由于炎症时，体液和蛋白质的渗出主要受血管通透性改变的影响，而血管通透性的改变和白细胞的游走与 Ca^{2+}-CaM 系统关系密切，因此，我们观察了 Tet 对 Ca^{2+}-CaM 系统的作用。证实：Tet 能明显降低胸膜炎时 Neu-[Ca^{2+}]i，明显抑制 Neu-CaMA。Tet 降低 Neu-[Ca^{2+}]i 除与其阻断 Neu 电压控制性钙通道[6]和抑制磷酸肌醇代谢，减少肌醇三磷酸的生成[7]外，还可能与其激活 Neu 腺苷酸环化酶，使 cAMP 的生成增多[8]有关。由于 Tet 与 Neu 悬液孵育时可明显抑制 Neu-CaMA，加入 Ca^{2+} 可对抗 Tet 抑制 Neu-CaMA 的作用，但加入不同量 CaM 对 Tet 抑制 Neu-CaMA 的作用无明显影响。故认为，Tet 降低 Neu-CaMA 并非其直接作用于 CaM 所致，而与其影响 Neu-[Ca^{2+}]i 有关。

Tet 降低 Neu-[Ca^{2+}]i 和抑制 Neu-CaMA 的结果，使许多依赖于 Ca^{2+} 的生理反应，如白细胞的游走、粘附及吞噬活动，溶酶体酶的释放及血管内皮细胞的收缩等受到抑制；依赖于 Ca^{2+}-CaM 的酶，如磷脂酶 A_2、5-脂氧酶、乙酰转移酶等活性降低，前列腺素、白三烯、血小板活化因子等多种炎症介质的产生减少从而使血管通透性降低，白细胞趋化运动减弱，进一步引起炎症渗出液量、蛋白渗出量、白细胞游离数减少。

本实验结果表明，炎症时，Neu-[Ca^{2+}]i 升高，Neu-CaMA 增强，Tet 可降低 Neu-[Ca^{2+}]i 并抑制 Neu-CaMA，这可能是 Tet 抗炎作用的重要机理之一。

（本文承蒙胡友梅教授和唐汝愚教授审阅，谨致谢忱！）

参考文献

1 张乐之，李新芳，吕金胜. 粉防己碱的抗炎作用. 中药药理与临床，1992，8(增)：33

2 Cobbold H, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescene measurement of cytoplasmic free calcium. Biochem J, 1987, 243 (2): 313

3 Liu JS, Liu Y, Chin YC. Preparation and assay of calmodulin. Acta Acad Med Sin, 1985, 7(6): 453

4 Jia HP, Wen YY. Phosphoryl inositol and intercellular calcium homoeostasis. Physiol Sci, 1988, 8(suppl): 451

5 Martin AW, Linda MDW, Cheung WY. Calmodulin and calcium channel blockers. Acta Acad Med XUZHOU, 1988, 8(1): 1

6 He FC, Tang RY, Yan DF. The relationship between inhibitory effect of tetrandrine on neutrophil lysomal enzyme release and calcium ion. Chin Pharm Bull, 1989, 5(4): 221

7 Ioannoi B, Chalmers AH, Seow WK, et al. Tetrandrine and transmembrane signal transduction. Int Arch Aller Appl Immunol, 1989, 89(4): 349

8 He FC, Tang RY, Yan DF. Effects of tetrandrine on vascular permeability and neurtrophil function in acute inflammation. Acta Pharmacol Sin, 1989, 10(3): 249

（收稿：1993-11-11；修回：1994-02-18）

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

Studies of prophylactic and therapeutic effects of tetrandrine on experimental pleuritis in rats※

He Huamei, Li Xinfang, Zhang Min (Department of Pharmacology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract There was an increase of cytosolic free calcium concentration [Neu-Ca^{2-}]i and calmodulin activity (Neu-CaMA) of the neutrophils in the pleural exudate at 8 h after carrageenin-induced pleuritis in rats. When tetrandrine(Tet) was intragastrically administered in the dosages of 10, 20, 40 and 80 $mg \cdot kg^{-1}$ to rats at 30 min prior to and 4 h after the infliction of pleuritis, the amount, protein content and neutrophil count of the pleural exudate could significantly reduced, [Neu-Ca^{2+}]i was decreased and Neu-CaMA inhibited. In addition, it was found that calcium was able to reverse the inhibition of tetrandrine on Neu-CaMA *in vitro*. On the basis of these findings, it is believed that the excellent anti-inflammatory effect of Tet may be related to its antagonism to calcium-calmondulin system and the inhibition of Tet on Neu-CaMA is dependent upon the decrease of [Neu-Ca^{2+}]i level.

Key words pleurisy/DT; tetrandrine; carrageenan; inflammation; neutrophils; calcium; calmodulin; tetrandrine*

※ The Project Supported by the National Natural Science Foundation of China

食管异物致主动脉食道瘘根治术麻醉成功的体会

杨玉萍 刘桥义 (第三军医大学新桥医院麻醉科) 630037

食管异物并发主动脉食管瘘罕见，麻醉期间随时面临大出血死亡的危险。我们处理一例获得成功，现予报道。

患者男，34岁。入院时发烧、胸痛、呕血，诊断为食管异物并发主动脉食管瘘。于1992年7月在气管内插管，静脉复合，全身低温及控制性低血压麻醉下行主动脉搭桥及病变主动脉根治和食道瘘口修补术。

麻醉处理：以芬太尼、硫喷妥钠、潘可罗宁进行麻醉诱导，保持病人绝对安静。术中监测包括心电示波、中心静脉压，平均动脉压、呼气末二氧化碳，气道压，血氧饱和度和尿量等。静脉注入冬眠Ⅰ号后进行全身体表降温，整个手术过程中肛温维持32℃～30℃。开胸后游离主动脉时开始静滴硝普钠0.5～1 μg/kg/min，血压控制在9.3～10.7/5.3～6.7 kPa，尿量30～50 ml/h。血管吻合完毕后停用硝普钠，自然复温。手术历时12小时30分钟。

讨论

食管异物约有2%并发主动脉食管瘘[1]。国外报道100余例，非手术治疗全部死亡[2]。手术治疗死亡率亦高，国内报道3例，仅1例存活[3]。情绪激动，血压升高，气管内插管引起呛咳，改变体位可导致主动脉破口处凝血块脱落或假性动脉瘤破裂大出血死亡[4,5]。为避免上述危险因素，术前给予足量的镇静药，麻醉诱导时选用非去极化肌松剂－潘可罗宁和麻醉作用较强的硫喷妥钠，芬太尼氟呱啶，防止了肌肉抽搐和呛咳。

麻醉中低温和降压，有效降低了主动脉压力，防止动脉瘤破裂和手术野出血，有利于手术顺利进行，同时低温。低压也降低机体耗氧量和能量代谢[6]。保护脑、脊髓和心肾等重要器官功能。术后恢复良好，无并发症。

关键词 食管异物；主动脉疾病；食管瘘；麻醉

中图法分类号 R614.25

参考文献

1 张生茂，李加惠. 食管异物并发主动脉瘘. 中华医学杂志，1982，62：30

2 Eukungo I. Aortaesophageal fistula by swallowed foreign body－A case report and review of the literature. Jpn J Iegal Med，1989，43：377

3 聂志忠. 食管异物刺破主动脉大出血抢救成功一例. 中华心胸外科杂志，1991，7：138

4 路作新，刘欲团. 外伤性胸主动脉破裂抢救成功一例. 中华创伤杂志，1993，9(2)：104

5 杨 强，李济豪. 食管异物并发主动脉食管瘘(附6例报告). 中华耳鼻喉科杂志，1979，14：450

6 张守春. 低温麻醉. 见刘俊杰，赵俊主编. 现代麻醉学. 北京：人民卫生出版社，1987，Ⅰ：621

(收稿：1994-03-29；修回：1994-05-15)

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