DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.04.007



# 粉防己碱对兔多形核白细胞花生四烯酸代谢的影响

杜泽英 黄钺华（药理教研室）

欧阳瑜 （重庆医科大学 化学教研室）

**提 要** 我们以反相高效液相色谱法（RP-HPLC）和放射免疫测定法（RIA）研究了粉防己碱（Tet）对体外用钙离子载体$A_{23187}$诱导兔多形核白细胞（PMN）合成白三烯$B_4$（$LTB_4$）和血栓素$A_2$（$TXA_2$）的影响，并以地塞米松（Dex）和氟奋乃静（FPZ）作对照。结果表明，Tet与PMN温育15min即可抑制PMN合成$LTB_4$和$TXA_2$，其效应呈剂量依赖性。加入外源性花生四烯酸（AA）时，Tet的上述抑制作用消失。FPZ与Tet有相似的作用，Dex则与Tet不同，它需与PMN温育60min才出现抑制作用。

**关键词** 粉防己碱；花生四烯酸类；白细胞三烯B类；血栓素$B_2$；嗜中性白细胞；A-23187

粉防己碱（tetrandrine，Tet）具有镇痛、抗炎、抗风湿、抗过敏、降血压及抗心律失常等作用[1]，临床已用于治疗高血压和冠心病。我教研室发现[2]，Tet对胶原诱导的血小板聚集和$TXA_2$合成有明显的抑制作用，但它不抑制血小板利用外源性AA合成$TXA_2$，提示Tet可能是抑制胶原诱导的内源性AA的释放。我们还发现Tet对血小板钙调素（CaM）的活性有明显抑制作用，其作用特点和CaM抑制剂三氟啦嗪（TFP）很相似。Walenga等根据TFP对血小板的作用，认为CaM通过影响磷脂酶$A_2$（$PLA_2$）的活性而控制内源性AA的释放[3]。因此，我们推测，Tet可能是通过抑制血小板的CaM活性而对抗胶原对$PLA_2$的激活，从而抑制内源性AA的释放，由此抑制血小板的$TXA_2$合成和聚集。如果这种推测是对的，那么Tet对AA经环氧酶和脂氧酶两条途径代谢的产物为$TXA_2$和$LTB_4$等的合成均应具有抑制作用。由于AA的上述代谢产物都是炎症的重要介质，抑制这些产物的合成将有明显的抗炎作用。随后我室研究了Tet的抗炎作用[4]，发现Tet在显著减轻炎症反应的同时，抑制了中性粒细胞向炎症区的浸润、减少了超氧阴离子和溶酶体酶的释放。由于各种细胞的CaM没有明显的特异性差别，所以本研究又以PMN为靶细胞，观察Tet对钙离子载体$A_{23187}$诱导兔血PMN合成$LTB_4$和$TXA_2$的影响，并以Dex和FPZ作对照，进一步分析其可能的机理。

## 1 材料和方法

健康日本大耳白兔，雌、雄均用，体重1.8～2.6kg。花生四烯酸钠盐、钙离子载体$A_{23187}$、前列腺素$B_2$（$PGB_2$）和$LTB_4$标准品均为Sigma产品。Tet（浙江金华制药厂），FPZ（上海黄河制药厂），Dex（卫生部药品检定所药典对照品），$TXB_2$放免测定药盒（解放军总医院基础所生化室），右旋糖酐（Mr 10万，上海试剂分装厂），聚蔗糖（Mr 40万，上海试剂二厂）。泛影葡胺（上海信谊药厂）。甲醇经间苯二酚回流及重蒸馏，乙酸乙酯经无水碳酸钾处理后重蒸馏。

兔PMN的制备：兔颈动脉放血，肝素抗凝（20IU/ml），每5 ml血加1 ml 6％右旋糖酐沉降45～60 min，吸取上层富白细胞液，经聚蔗糖-泛影葡胺分层液（比重1.086±0.001）分层，离心450×g，25min。低渗溶解红细胞（0.22% NaCl，1 min），以等量高渗盐水（1.58% NaCl）恢复渗透压。生理盐水洗涤2次，得到PMN，以$10^7$/ml浓度混悬于Hank's平衡盐液（HBSS，pH 7.40）。PMN纯度大于95%，台芬蓝排斥试验示细胞活力为95%以上。

孵育条件：PMN悬液$1\times10^7$/ml，0.5ml于37℃水浴预温育15min，分别加入0.5ml不同浓度药液（HBSS配制）或0.5ml HBSS，于37℃°振荡水浴15min或60min（视药物不同而异）。加$A_{23187}$（终浓度10μmol/L），继续温育5 min，12000×g离心30s终止反应。上清待测$LTB_4$和$TXB_2$。

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

$LTB_4$提取与测定：反应液加$PGB_2$ 15ng（50 μl甲醇），以1 mol/L HCl调pH至3～4。$C_{18}$ Bond-Elut小柱（Analytichem International）预先以的pH 3.0的PBS平衡，样品上柱，以双蒸水、苯．乙酸乙酯各3 ml依次淋洗，收集乙酸乙酯组分，用$N_2$气流挥干，以30%甲醇110 μl复溶，取100 μl作高效液相色谱（HPLC）检测。HPLC仪为Waters系列（高压泵Model 510，检测器Lambda-Max Model 480），色谱柱Nucleacil，ODS，7μm，4×250mm（大连色谱技术总公司）。流动相：甲醇/水/乙酸（67/33/0.08，V/V/V），用$NH_4OH$调pH至6.20，流速为1.5ml/min。检测波长280nm。记录仪(Hitachi 056)记录色谱图，色谱数据处理机（CDMC-2A，上海计算技术研究所）记录色谱图并打印峰保留时间和峰面积。$PGB_2$为内标，对样品$LTB_4$定性。根据$LTB_4$标准曲线定量，计算药物抑制率。

$TXB_2$测定：$TXB_2$是$TXA_2$ 37℃时的稳定代谢产物，测定$TXB_2$量可以反映$TXA_2$量。反应液未经提取经适当释稀后，按药盒说明书测定并计算药物抑制率。

统计处理：实验结果以$\bar{X}\pm SD$表示，显著性检验用t检验测定。

## 2 结果

兔血PMN在$A_{23187}$诱导下产生$LTB_4$，其色谱图峰与标准品$LTB_4$峰的保留时间一致，与内标$PGE_2$峰的保留时间比值恒定。无$A_{23187}$时，不产生可测量的$LTB_4$峰。$LTB_4$的产量平均为21.2±5.6ng/$5\times10^6$ PMN（n=6）。

表1 3种药物对$A_{23187}$刺激兔血PMN产生LTB和$TXB_2$的影响 （$\bar{X}\pm SD$，N=6）

| 药物 (μmol/L) | 温育时间 (min) | 外源性AA | 抑制率（%） $LTB_4$ | 抑制率（%） $TXB_2$ |
|---|---|---|---|---|
| FPZ (100) | 15 | －（对照） | 98.3±3.0 | 100±0.0 |
| FPZ (100) | 15 | + | 68.7±5.6*** | 64.1±7.2** |
| Dex (10) | 15 | －（对照） | 7.6±2.6 | 4.8±1.1 |
| Dex (10) | 60 | － | 45.5±6.2*** | 47.9±7.8*** |
| Tet (20) | 15 | －（对照） | 91.8±10.2 | 89.5±8.5 |
| Tet (20) | 15 | + | 4.8±1.9*** | 5.7±1.2*** |

**$P<0.05$，***$P<0.01$，

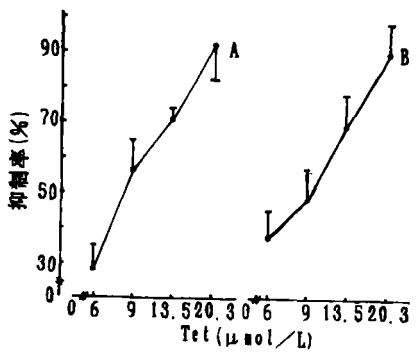



图 Tet对$A_{23187}$在体外刺激兔PMN产生$LTB_4$（A）和$TXB_2$（B）的影响（n=6）

在无外源性AA的反应体系中，Tet在体外明显抑制$A_{23187}$诱导PMN合成$LTB_4$和$TXB_2$，其效应呈剂量依赖性，$IC_{50}$分别为8.3和9.6μmol/L（图）。而在有外源性AA（50μmol/L）的反应体系中，Tet在同样剂量范围内对体外$A_{23187}$诱导PMN合成$LTB_4$和$TXB_2$均无明显影响（表）。

Dex与PMN温育（终浓度10μmol/L）15min，对$LTB_4$和$TXB_2$合成未见明显抑制，而用同样浓度的Dex与PMN温育60min则对$LTB_4$和$TXB_2$的合成有明显抑制作用（表）。温育时间不同，Dex对$LTB_4$和$TXB_2$合成的抑制作用有非常显著的差别（$P<0.01$）。

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

在无外源性AA的情况下，FPZ（100μmol/L）对PMN合成$LTB_4$和$TXB_2$有非常显著的抑制，而在有外源性AA的条件下，其抑制作用明显减弱（表）。

## 3 讨　论

花生四烯酸经环氧酶和脂氧酶两条途径的代谢产物前列腺素、血栓素及白三烯等具有高度生物活性，在炎症、血栓形成及过敏反应等多种病理过程的发生和/或发展中起着重要作用。$LTB_4$可致白细胞趋化、聚集、脱颗粒和产生超氧阴离子，是重要的炎症介质[5]。$TXA_2$可致白细胞聚集[3]，可能也是炎症介质之一。$A_{23187}$激活细胞膜磷脂酶$A_2$（$PLA_2$），使膜磷脂水解生成AA，进而生成$LTB_4$和$TXA_2$。$PLA_2$是钙-钙调素（Ca-CaM）依赖性酶[4]。本实验结果表明，Tet可抑制兔血PMN合成$LTB_4$和$TXB_2$，对二者的$IC_{50}$相近，提示其作用机理可能有共同之处。本实验再次证明外源性AA使Tet的作用消失，故表明Tet不是影响AA的利用，因此不是直接抑制5-脂氧酶和环氧酶，而是抑制内源性AA的释放。又因本实验证明，CaM抑制剂FPZ对兔血PMN合成$LTB_4$和$TXA_2$也有明显的抑制作用，而且外源性AA也使其作用大减，这就再一次证明CaM拮抗剂在这方面与Tet的作用特点相似，也和文献报导FPZ对血小板的作用[3]相似。我们实验室曾报道，Tet可抑制血小板CaM的活性[2]，本实验的结果支持我们以前的推论，即Tet和已知的CaM抑制剂一样，可通过抑制CaM而抑制$Ca^{++}$CaM依赖性$PLA_2$，从而抑制内源性AA的释放，由此可抑制$LTB_4$和$TXA_2$的合成。

Dex需经一定时间以合成脂皮素（Lipocortin）后，才能发挥抑制$PLA_2$的作用[7]。Tet的作用方式与Dex完全不同，Tet是通过抑制CaM而抑制$PLA_2$，因此不要经历诱生脂皮素所需的时间延搁。这可能是Tet影响AA代谢而发挥药理作用的机理之一，

## 参 考 文 献


1. 张鸿烁。粉防己碱的药理与临床。中国医院药学杂志　1988;8:25
2. 钱月明、黄铖华。粉防己碱对兔血小板聚集、血栓素$A_2$合成及钙调素活性的影响。中国药理学报1989;10:61
3. Walenga RW, et al. Differential effects of calmodulin antagonists on phospholipase $A_2$ and C in thrombinstimulated platelets. J Biolchem　1980;256:12523
4. 何凤慈，等。粉防己碱对急性炎症血管通透性和中性粒细胞功能的影响。中国药理学报　1989;10:249
5. MaMillan RM, Foster SJ. Leukotriene $B_4$ and inflammatory disease. Agents Actions　1988;24:114
6. Boot JR, et al. The chemotactic activity of thromboxane $B_2$: A possible role in inflammation. J Physiol　1976;257:47P
7. Hirata F, et al. Isolation and characterization of lipocortin(lipomodulin). Agents Actions　1985;17:263


（收稿：1989.09.18；修回：1989.12.18）

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

# Effects of Tetrandrine on the Metabolism of Arachidonic acid in Rabbit Polymorphonuclear Leukocytes

Du Z eying et al. (Department of Pharmacology, Third Military Medical College)

The effects of tetrandrine (Tet) on the production of leukotrine $B_4$($LTB_4$) and thromboxane$B_2$($TXB_2$)of calcium ionophore $A_{23187}$-stimulated rabbit polymorphonuclear leukocytes (PMN)are measured with the reversed phase high performance liquid chromatography and radioimmunoassay respcctively. Dexamethasone (Dex) and fluphenazine (EPZ)are used as the control. The production of $LTB_4$ and $TXB_2$ by PMN is significantly depressed by Tet in a dose-dependent mannet when incubated for 15 min. The IC50 for inhibition of $LTB_4$ and $TXB_2$ production is 8.3 and 9.6 μmol/L respectively. The characteristics of the effect of Tet are the same as those of FPZ. The effect of Dex occurs when incubated with PMN for 60 min.

**Key words**: tetrandrine; arachidonic acid/ME; leukotrine B; thromboxane$B_2$; neutrophils; A-$_{23187}$

---

(上接287页)

到较好效果。对于皮肤损害程度深，累及骨组织者，及早清除创面，切除坏死软组织和腐骨，作皮瓣移植术，可收到良好效果。

## 参 考 文 献

1. 王其源，等。放射线烧伤。人民军医 1959;9:744
2. 程天民。防原医学。上海科技出版社 1986:374
3. 林增禄，等。皮肤严重放射性溃疡的手术治疗。中华放射医学与防护杂志 1989;1:30
4. 李美疑。四例骨科医务人员慢性放射性皮肤损伤及恶变。中华放射医学与防护杂志 1989;2:122
5. 高慎永，等。严重X射线皮肤损伤两例报告。中华放射医学与防护杂志 1989;4:275

(收稿：1990.04.15;修回：1990.05.03)

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