

## 粉防己碱对急性炎症血管通透性和嗜中性白细胞功能的影响

何凤慈、唐汝愚、姚丹帆 (第三军医大学药理学教研室, 重庆 630038, 中国)

**Effects of tetrandrine on vascular permeability and neutrophil function in acute inflammation**

HE Feng-Chi, TANG Ru-Yu, YAO Dan-Fan

(Department of Pharmacology, The Third Military Medical College, Chongqing 630038, China)

**Abstract** The effects of tetrandrine (Tet) on vascular permeability and neutrophil (Neu) functions in carrageenin induced subcutaneous air pouch inflammation in rats were studied. It was found that the vascular permeability, Neu emigration,  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -G) release and superoxide anion ( $O_2^-$ ) generation were increased in the carrageenin induced inflammation. The vascular permeability, Neu emigration,  $\beta$ -G release and  $O_2^-$  generation were suppressed by Tet ip (20, 40, 100 mg/kg), but the intracellular superoxide dismutase (SOD) activity and the cAMP level in Neu were increased by the same dose of Tet. The results indicate that Tet inhibits prostaglandin synthesis and scavenges free radicals. The mechanism of the inhibitory effects of Tet on Neu functions may be related to the increases in SOD activity and cAMP levels in Neu.

**Key words** tetrandrine; anti-inflammatory agents; carrageenan; inflammation; neutrophils; adenosine cyclic monophosphate; capillary permeability; superoxide dismutase

**提要** 粉防己碱 (Tet) 20, 40, 100 mg/kg ip 可使大鼠背部气囊角叉菜胶炎症血管通透性降低、嗜中性白细胞 (Neu) 游出和  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶释放显著减少。Tet 亦可升高 Neu 内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 减少  $O_2^-$  生成, 还能升高 Neu 内 cAMP 水平。提示 Tet 具有抑制 PGs 合成和捕获自由基的作用, 其机理可能与提高 Neu 内 SOD 活性和升高 cAMP 水平有关。

**关键词** 粉防己碱; 抗炎剂; 角叉菜; 炎症; 嗜中性白细胞; 腺苷环一磷酸; 毛细血管渗透性; 超氧化物歧化酶

炎症反应过程中, 嗜中性白细胞 (neutrophil, Neu) 花生四烯酸合成前列腺素产生的自由基可使细胞膜脂质过氧化, 促进 Neu 趋化, 破坏溶酶体膜, 增加血管通透性<sup>(1,2)</sup>。本研究粉防己碱 (tetrandrine, Tet) 对急性炎症血管通透性和 Neu 功能的影响, 并以吲哚美辛 (indomethacin, Ind) 为阳性对照, 分析其抗炎作用机理。

**Materials**

Wistar  $\sigma$  大鼠由本校实验动物所提供。角叉菜胶 (carrageenin) 辽宁省药物研究所产品。Tet 浙江金华制药厂产品。 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶 ( $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -G) 基质本校野战外科研究所提供。Ind 卫生部药品检定所提供药典对照品。cAMP 放免测定盒上海第二医科大学同位素室产品。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD, 54 000 U/mg) 中国科学院上海生化研究所试剂厂产品。细胞色素 C (cytochrome C 马心 III 型) BDH 产品。酵母多糖上海生物制品研究所产品。黄嘌呤氧化酶 Sigma 产品。黄嘌呤上海试剂厂产品。氨基苯二甲酰肼 Aldrich 产品。Evans 蓝英国进口。

**Methods and results**炎症模型的制备 140 只 Wistar 大鼠,  $\sigma$ ,

体重  $173 \pm SD$  34 g, 乙醚轻度麻醉, 背部正中 sc 空气 20 ml, d 3 补充注射空气 10 ml, d 6 气囊内注射角叉菜胶 25 mg/kg 致炎。Ind 10 mg/kg 和 Tet 20, 40, 100 mg/kg 分别于致炎前 30 min ip, 6 h ip 戊巴比妥钠 25 mg/kg 麻醉, 气囊内注射无钙镁 Hank's 平衡盐液 (HBSS) 10 ml 灌洗, 收集灌洗液置于已硅化的试管中, 作白细胞计数, 涂片染色分类。Neu 占 98%, 经 Trypan 蓝染色活细胞占 95% 以上<sup>(4)</sup>。角叉菜胶致炎组灌洗液中 Neu 数量、 $\beta$ -G 释放及超氧阴离子 (superoxide anion,  $O_2^-$ ) 生成均明显增加, 血管通透性亦显著升高 (Tab 1)。

**对血管通透性的影响** 角叉菜胶致炎前 5-10 min iv Evans 蓝 20 mg/kg, 致炎 6 h 后, 用 5 ml HBSS 灌洗气囊, 灌洗液经  $1800 \times g$  离心 10 min 后, 用分光光度法<sup>(4)</sup> (721 型分光光

Tab 1. Changes of air-pouch inflammation induced by carrageenin (25 mg/kg) in rats.  $n=10$ ,  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P>0.05$ , \*\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.01$  vs normal saline (NS), Neu = neutrophil,  $\beta$ -G =  $\beta$ -glucuronidase,  $O_2^-$  = superoxide anion, SOD = intracellular superoxide dismutase.

Parameter	NS	Carrageenin
Evans blue (ng/ml)	62 $\pm$ 17	109 $\pm$ 21***
Neu ( $10^6$ /ml)	5.2 $\pm$ 2.6	10.9 $\pm$ 2.5***
$\beta$ -G (U)	590 $\pm$ 317	1396 $\pm$ 280***
$O_2^-$ (nmol/ $10^6$ cell $\cdot$ 15 min)	6.9 $\pm$ 2.9	10.6 $\pm$ 4.4**
SOD (U/mg protein)	14.8 $\pm$ 1.7	14.1 $\pm$ 1.8*
cAMP (pmol/ $10^6$ cell)	0.6 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.2*

Tab 2. Effects of ip tetrandrine and indomethacin on vascular permeability, neu emigration,  $\beta$ -G release,  $O_2^-$  generation, intracellular SOD activity and cAMP level in Neu in carrageenin-induced inflammatory air pouch in rats.  $n=10$ ,  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P>0.05$ , \*\* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.01$  vs NS.

Parameter	NS	Indomethacin 10 mg/kg	Tetrandrine (mg/kg)		
			20	40	100
Evans blue (ng/ml)	119 $\pm$ 31	46 $\pm$ 9***	110 $\pm$ 23*	67 $\pm$ 10***	53 $\pm$ 10***
Neu ( $10^6$ /ml)	7.3 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.6***	3.3 $\pm$ 2.0***	3.7 $\pm$ 1.3***	3.8 $\pm$ 1.2***
$\beta$ -G (U)	1292 $\pm$ 157	639 $\pm$ 62***	516 $\pm$ 220***	571 $\pm$ 199***	614 $\pm$ 178***
$O_2^-$ (nmol/ $10^6$ cell $\cdot$ 15 min)	11.1 $\pm$ 2.7	6.3 $\pm$ 1.4**	9.0 $\pm$ 3.1**	6.3 $\pm$ 2.1**	4.6 $\pm$ 1.7**
SOD (U/mg protein)	12.5 $\pm$ 3.2	15.0 $\pm$ 1.6**	15.5 $\pm$ 1.5**	15.2 $\pm$ 2.0**	16.2 $\pm$ 0.3**
cAMP (pmol/ $10^6$ cell)	0.6 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.3**	0.7 $\pm$ 0.2*	0.9 $\pm$ 0.2**	0.9 $\pm$ 0.3**

度计, 590 nm) 测定 Evans 蓝含量。Tet 和 Ind 均可使角叉菜胶致炎后血管通透性明显抑制, 灌洗液中 Evans 蓝含量显著降低 ( $P<0.01$ ), Tet 抑制毛细血管通透性的程度与其剂量呈依赖关系 (Tab 2)。

**对 Neu 游出和  $\beta$ -G 释放的影响** 取灌洗液按常规作白细胞计数, 并经离心后 ( $1800 \times g$ ,  $4^\circ C$ , 10 min), 取上清液按酚肽葡萄糖醛酸比色法<sup>(5)</sup> 测定  $\beta$ -G 活性。Tet 和 Ind 均能抑制 Neu 游出和  $\beta$ -G 释放 ( $P<0.01$ ) (Tab 2)。

**升高 Neu 内 SOD 活性, 清除/抑制  $O_2^-$  生成** Neu ( $5 \times 10^8$  细胞/ml) 经超声细菌粉碎器 (UR-200) 60 W 30 s 粉碎后,  $1800 \times g$  离心 15 min, 取上清液 0.1 ml 按福林酚试剂法<sup>(6)</sup> 测定蛋白含量, 并按化学发光法<sup>(7)</sup> 用液体闪烁计数器 (FJ 2101 型) 计数 10 s, 计算发光抑制率和 SOD 比活性 (U/mg 蛋白)。按细胞色素 C 还原法<sup>(8)</sup> 测定  $O_2^-$ , 结果以 nmol 细胞色素 C 还原/ ( $10^6$  细胞  $\cdot$  15 min) 表示。Tet 和 Ind 也均使 Neu 内 SOD 活性升高, 清除/抑制  $O_2^-$  生成 ( $P<0.05$ ) (Tab 2)。

**对细胞内 cAMP 水平的影响** 用 10% 三氯醋酸将 Neu 悬液调整至  $5 \times 10^8$  细胞/ml, 混匀置  $-25^\circ C$  6-8 h 融冻后用饱和水乙醚提取 3 次,  $1800 \times g$  离心 10 min 后, 按  $10^6$  细胞/管分样, 真空干燥后按 RIA<sup>(9)</sup> 测定 cAMP 含量。Tet 和 Ind 均可使 Neu 内 cAMP 水平显著升高 ( $P<0.05$ ) (Tab 2)。

## Discussion

Tet 具有抗大鼠甲醛性关节炎<sup>(10)</sup>，解热镇痛<sup>(11)</sup>和抑制过敏介质 SRS-A 释放<sup>(12)</sup>的作用。本实验结果表明 Tet 和 Ind 均可抑制 Neu 游出、 $\beta$ -G 释放和  $O_2^-$  生成，提示 Tet 和 Ind 具有抑制 PGs 合成和捕获自由基的作用，两者的抗炎特性在许多方面非常相似。Tet 和 Ind 还可使 Neu 内 SOD 活性及 cAMP 水平升高，SOD 是一种内源性的抗炎因子<sup>(13)</sup>，其水平的升高可清除  $O_2^-$  及来源于活性氧的自由基。Ind 升高 cAMP 水平的机理在于抑制了 cAMP-磷酸二酯酶的活性。Neu 内 cAMP 水平的升高又可稳定溶酶体膜，减少溶酶体酶的释放，减轻组织损伤<sup>(14)</sup>。因此，Tet 发挥抗炎作用的机理可能与 Neu 内 SOD 活性和 cAMP 水平的升高有关。

## References

- 1 Oyanagui Y. Participation of superoxide anions at the prostaglandin phase of carrageenan foot-oedema. *Biochem Pharmacol* 1976; 25 : 1465
- 2 龜山 勉. 非ステロイド系治療の薬理作用. 薬局 1983; 34 : 183
- 3 Edwards JCW, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: An *in vivo* tissue culture system. *J Pathol* 1981; 134 : 147
- 4 於传斌. 解热、抗炎药物实验法. 见: 徐叔云、卞如濂、陈修, 主编. 药理实验方法学. 第1版, 北京: 人民卫生出版社, 1981 : 528-47

- 5 Fishman WH. Preparation and assay of substrates for  $\beta$ -glucuronidase. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*; vol 3. NY : Academic Press, 1957 : 55-7
- 6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 7 李益新、方允中. 超氧化物歧化酶活力测定的新方法——化学发光法. 生物化学与生物物理进展 1983; 2 : 59
- 8 Zimmerman GA, Renzetti AD, Hill HR. Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1983; 127 : 290
- 9 张象贤、吴春芳、陶清、龚兰生、夏宗勤、胡雅儿. 血小板环一磷酸鸟苷的放射免疫分析法. 中华核医学杂志 1983; 3 : 94
- 10 Lue FH, Chang TM, Fong TC. The antiphlogistic and anti-anaphylactic shock actions of tetrandrine and demethyl-tetrandrine. *Acta Pharm Sin* 1957; 5 : 113
- 11 Chang TM, Fong TC, Lue FH. The potentiating effect of diphenhydramine upon the analgesic action of Han-Fang-Chi and some other analgesics. *Acta Physiol Sin* 1957; 21 : 133
- 12 Zhang HQ, Bian RL. Anti-SRS-A effect of tetrandrine. *Acta Pharm Sin* 1984; 19 : 616
- 13 Lewis DA. Endogenous anti-inflammatory factors. *Biochem Pharmacol* 1984; 33 : 1705
- 14 Mikulíková D, Trnavský K. The effect of indomethacin and its ester on lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes and intracellular levels of cAMP and cGMP after phagocytosis of urate crystals. *Ibid* 1982; 31 : 460