

山莨菪碱抑制卡西霉素引起的小鼠腹腔巨噬细胞及牛主动脉内皮细胞释放前列腺素及白三烯¹

李 坚²、姜远英、岳天立 (第二军医大学药理学系药理教研室, 上海 200433, 中国)

Inhibition of release of prostaglandins and leukotrienes from calcimycin-induced mouse peritoneal macrophages and bovine aorta endothelial cells by anisodamine¹

LI Jian², JIANG Yuan-Ying, YUE Tian-Li³ (*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China*)

Abstract [³H]Arachidonic acid (AA)-pre-labeled mouse peritoneal macrophages were stimulated by calcium ionophore A-23187 to release [³H]AA metabolites. The major labeled products which were co-chromatographed with the authentic PG and LT

standards by TLC and determined by liquid scintillation were 6-keto-PGF_{1α}, PGE₂, LTC₄, and LTB₄. Anisodamine (Ani) significantly inhibited the A-23187-induced release of PG and LT from mouse macrophages in a dose-dependent manner. In the presence of Ani at 0.5 mmol/L, the A-23187-induced release of 6-keto-PGF_{1α}, PGE₂, LTC₄ and LTB₄ was reduced by 57%, 20%, 53% and 49%, respectively.

1988年6月9日收稿 1988年10月25日接受

¹国家自然科学基金资助课题 86生字 85-445

²现在: 第四军医大学西京医院, 西安 710015, 中国

A-23187-induced release of 6-keto-PGF_{1α} measured by RIA from bovine aorta endothelial cells was also significantly inhibited by Ani in a dose-dependent manner. These results indicate that the calcium-antagonistic effects of Ani may not only play a significant role in its inhibiting release of PG and LT, but also contribute to its salutary effects in the treatment of septic shock.

Key words anisodamine; arachidonic acids; prostaglandins; leukotrienes B; SRS-A; macrophages; endothelium cells; A-23187 (calcimycin)

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, № Bio 85-445

² Present Address: The Fourth Military Medical University, Xi-an 710015, China

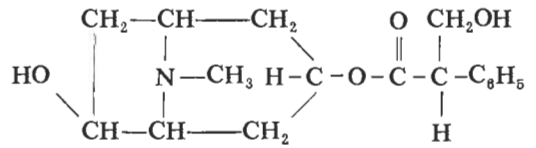
³ Correspondence: Prof YUE Tian-Li

提要 卡西霉素(A-23187)刺激 [³H]AA 预标的小鼠巨噬细胞释放 6-keto-PGF_{1α}、PGE₂、LTC₄ 及 LTB₄。山莨菪碱(Ani)呈剂量依赖性地抑制 A-23187 的刺激释放作用。当 Ani 为 500 μmol/L 时, A-23187 引起的上述 AA 代谢物的释放量分别减少(%) : 57, 20, 53 及 49。Ani 同样抑制 A-23187 引起的牛内皮细胞释放 6-keto-PGF_{1α}, 且与剂量呈依赖关系。Ani 的钙拮抗作用可能是其抑制 PG 与 LT 释放的重要机理。

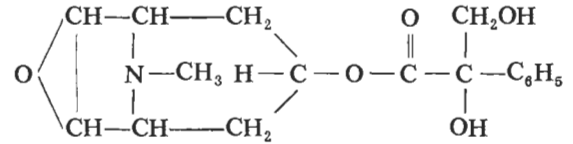
关键词 山莨菪碱; 花生四烯酸类; 前列腺素类; 白三烯 B 类; 慢反应物质 A; 巨噬细胞; 内皮细胞; 卡西霉素(A-23187)

作者在多种实验标本上证实了山莨菪碱(anisodamine, Ani)。抑制前列腺素(PG)和白三烯(LT)的释放⁽¹⁻³⁾。然对这种抑制作用的机理尚不清楚。文献报道花生四烯酸(AA)从胞膜的游离与钙离子密切相关⁽⁴⁾。钙离子载体卡西霉素(calcimycin, A-23187)能选择性增加胞膜外 Ca²⁺ 的转入和胞内钙贮的释放, 提高胞浆 Ca²⁺ 浓度, 从而提高磷脂酶及脂氧酶的活性, 增加 PG 和 LT 的释放⁽⁵⁾。为进一步探讨 Ani 抑制 AA 代谢物释放是否与拮抗 Ca²⁺

有关, 我们采用培养小鼠巨噬细胞和牛主动脉内皮细胞, 观察了 Ani 对 A-23187 刺激上述细胞释放 PG 和 LT 作用的影响, 并与典型的钙拮抗剂维拉帕米(verapamil, Ver)比较⁽⁶⁾。



Anisodamine



Anisidine

Materials and methods

昆明种小鼠, ♀ ♂ 不拘, 体重 20 ± SD 2 g, 牛主动脉取自上海食品公司屠宰场。

[5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H]AA (8029 GBq/mmol) 购自 Amersham。PG 及 LT 标准品分别承 JE Pike (Upjohn, USA) 和 J Rokach (Merck, Canada) 博士赠送。A-23187 购自 Calbiochem-Behring 公司, RPMI-1640 培养基和 199 培养基分别为 Gibco 及日本制药株式会社产品。6-酮前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) 放射免疫测定(RIA)药盒由中国医学科学院基础所药理学室供给。Ani 及 Ver 分别购自成都制药一厂和上海天丰药厂。

巨噬细胞培养和 [³H]AA 参入 以 D-Hanks 液(pH 7.4)灌洗小鼠腹腔, 灌洗液经离心(400 × g, 15 min)后得细胞沉淀, 加入含 10% 小牛血清的 1640 液制成细胞悬液(1 × 10⁷ cells/ml), 加入直径 35 mm 培养皿中(1 ml/皿), 置 CO₂ 孵箱内贴壁 2 h, 再以 D-Hanks 液和 1640 液各洗一次, 去除非贴壁细胞, 每皿加入含 [³H]AA 26 kBq 之 1640 液 1 ml, 孵育 4 h, 倾去上清液(测定参入率), 用 1640 液洗培皿二次, 洗尽未参入之 [³H]AA。尔后加入含被试药液之 1640 液(1 ml/皿), 孵育 20 min, 再加

入 A-23187 (除注明外终浓度均为 $1 \mu\text{mol/L}$), 继续孵育。于 5 min, 0.5 及 2 h 取适量培养液, 测定放射性强度, 待孵育结束倾出全部培养液, 离心 ($800 \times g$, 15 min) 后以 10% 甲酸酸化, 用乙酸乙酯 ($2 \times 2 \text{ ml}$) 提取 $[^3\text{H}]AA$ 及其代谢物, 提取液于氮气流下吹干, 行薄层层析 (TLC)。

内皮细胞培养⁽⁷⁾ 由牛主动脉取得内皮细胞, 用含有 20% 小牛血清的 199 培养液培养, 实验用第 4 代细胞, 每皿含 3×10^5 细胞。将内皮细胞与含或不含药物的 D-Hanks 液于 37°C 下孵育 20 min, 尔后加入 A-23187 (终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$), 继续孵育 5 min, 细胞孵育液用盐酸 1 mol/L 酸化后加 3 倍体积之重蒸乙酸乙酯提取 2 次, 合并提取液, 吹干后于 -30°C 下备 RIA 用。

巨噬细胞 $[^3\text{H}]AA$ 代谢物的分离定量 向上述提取物中加入含 PGE_2 , 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, LTC $_4$ 及 LTB $_4$ 各 $5 \mu\text{g}$ 的乙醇液 $20 \mu\text{l}$, 残渣溶解后行 TLC。层析条件: 硅胶 G 板 ($20 \times 5 \text{ cm}$) 展开剂为乙酸乙酯/异辛烷/乙酸/水 ($110/50/20/110$), 展开距离 16 cm 。用 10% 磷钼酸显色, 各 AA 代谢物呈浅蓝色, 在上述条件下均能满足分开⁽⁸⁾。将各显色斑收集后测定放射性强度。

6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的 RIA 将上述内皮细胞提取物用磷酸缓冲液复溶后, 取适量按 RIA 药盒规定测定。

实验结果以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 表示, 显著性用 t 检验测定。

Results

$[^3\text{H}]AA$ 对小鼠巨噬细胞膜的参入 巨噬细胞能迅速地摄取 $[^3\text{H}]AA$, 加入 5 min 后, 总参入量的 53% 已进入胞膜 (Fig 1)。2 h 参入已趋平衡, 4 h 时胞膜 $[^3\text{H}]AA$ 参入量为加入量的 (%): 62 ± 9 ($n = 7$), 延长孵育时间未见参入量进一步增加。

不同量 A-23187 对小鼠巨噬细胞释放 $[^3\text{H}]AA$ 代谢物的影响 随着 A-23187 加入量的增加巨噬细胞释放 $[^3\text{H}]AA$ 代谢物的总量显

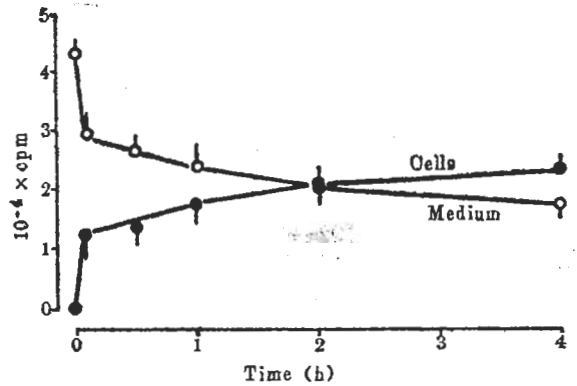


Fig 1. Incorporation of $[^3\text{H}]$ arachidonic acid into mouse peritoneal macrophages. Macrophages ($1 \times 10^7/\text{ml}$) were labeled with $[^3\text{H}]AA$ ($26 \text{ kBq}/\text{ml}$). $n = 3-4$ expts, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

著增加, 当 A-23187 终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 时刺激释放作用最强, 释放量为参入量的 (%): 3.1 ± 1.1 (5 min), 4.1 ± 1.2 (30 min) 及 6.0 ± 1.9 (2 h) ($n = 14$), 分别为相应时间对照释放量的 (%): 194, 228 及 240 (P 均 < 0.01)。当进一步增加 A-23187 量, $[^3\text{H}]AA$ 释放量反而降低, 故本实验刺激巨噬细胞采用的 A-23187 终浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 。

Ani 抑制 A-23187 引起的巨噬细胞释放 $[^3\text{H}]AA$ 代谢物 从 Fig 2 可见 Ani 的这种抑制作用与剂量呈依赖关系。当 Ani 浓度为 $500 \mu\text{mol/L}$ 时, $[^3\text{H}]AA$ 代谢物总释放量较单用 A-23187 组分别降低 (%): 41 (5 min), 35 (30 min) 及 33 (2 h) (P 均 < 0.01 , $n = 9$)。同样条件下 Ver $50 \mu\text{mol/L}$ 抑制 A-23187 刺激释放 $[^3\text{H}]AA$ 的作用与 Ani 相仿, 抑制释放 (%): 41 (5 min), 38 (30 min) 和 32 (2 h) ($P < 0.01$, $n = 4$)。樟柳碱 (anisodine) 的抑制作用较弱, 当浓度为 $500 \mu\text{mol/L}$ 时, 抑制 A-23187 释放 $[^3\text{H}]AA$ 代谢物的 % 为 33 (5 min), 24 (30 min) 和 24 (2 h)。

小鼠巨噬细胞在 A-23187 刺激下形成主要 AA 代谢产物为 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, PGE_2 , LTC $_4$ 及 LTB $_4$ (Tab 1)。此外, 尚有一主要代谢物可能为单羟基甘肟四烯酸 (HETE), 因无标准品故未确定。Tab 1 为 Ani $500 \mu\text{mol/L}$ 对 A-

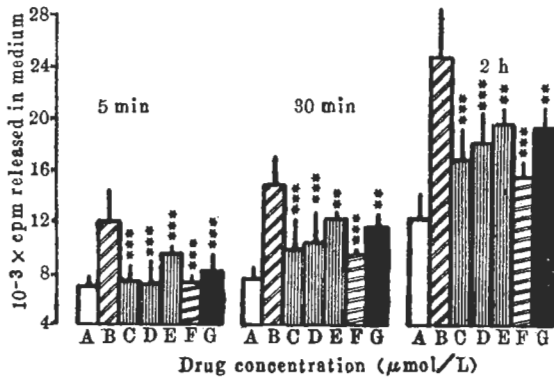


Fig 2. Effects of anisodamine, verapamil and anisidine on calcimycin-induced release of total $[^3\text{H}]$ arachidonic acid metabolites from $[^3\text{H}]$ AA-prelabeled mouse macrophages. The test drug was preincubated with $[^3\text{H}]$ AA-labeled cells for 20 min and calcimycin was then added. Blank control (A). Calcimycin $1 \mu\text{mol/L}$ (B), plus anisodamine $500 \mu\text{mol/L}$ (C), $100 \mu\text{mol/L}$ (D), $50 \mu\text{mol/L}$ (E), verapamil $50 \mu\text{mol/L}$ (F), or anisidine $500 \mu\text{mol/L}$ (G). $n = 6-14$ expts, $\bar{x} \pm \text{SD}$. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs calcimycin alone.

Tab 1. Effects of anisodamine on release of $[^3\text{H}]$ arachidonic acid metabolites from $[^3\text{H}]$ AA-prelabeled mouse macrophages challenged with calcimycin (A-23187). $[^3\text{H}]$ AA-labeled mouse macrophages were incubated with or without anisodamine ($500 \mu\text{mol/L}$) for 20 min and subsequently exposed to calcimycin ($1 \mu\text{mol/L}$) for 2 h. The $[^3\text{H}]$ AA metabolites released in media were extracted, separated by TLC and counted as described in methods. $n = 4-6$ expts, $\bar{x} \pm \text{SD}(\text{pg})$. ** $P < 0.05$ vs control, †† $P < 0.05$ vs calcimycin.

	Calcimycin -	Calcimycin +	Calcimycin +
	Anisodamine -	Anisodamine -	Anisodamine +
6-keto-PGF $_{1\alpha}$	0.31 ± 0.08	$0.58 \pm 0.20^{**}$	$0.25 \pm 0.07^{\dagger\dagger}$
PGE $_2$	0.25 ± 0.05	$0.40 \pm 0.05^{**}$	$0.32 \pm 0.05^{\dagger\dagger}$
LTB $_4$	0.22 ± 0.04	$0.33 \pm 0.06^{**}$	$0.17 \pm 0.07^{\dagger\dagger}$
LTC $_4$	0.66 ± 0.10	$0.89 \pm 0.13^{**}$	$0.54 \pm 0.09^{\dagger\dagger}$

23187 刺激小鼠巨噬细胞 2 h 释放的各 $[^3\text{H}]$ AA 代谢物的影响。根据 TLC 分离的各 $[^3\text{H}]$ AA 代谢物的放射性强度换算成相应的 pg 值, 从 Tab 1 可见 Ani 可显著减少 A-23187 刺激小鼠巨噬细胞释放各 $[^3\text{H}]$ AA 代谢物, 环氧酶产物 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 及 PGE $_2$ 分别减少 (%): 57 及 20, 5-脂

氧酶产物 LTC $_4$ 及 LTB $_4$ 分别减少 (%): 53 及 48, 与不加 A-23187 组无显著差异 ($P > 0.05$).

Ani 对 A-23187 刺激牛主动脉内皮细胞释放 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 的影响 结果见 Tab 2. 从 Tab 2 可见 Ani 对 A-23187 引起的内皮细胞释放 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 有抑制作用, 且与剂量呈依赖关系. 在所试的 Ani 浓度下抑制 A-23187 刺激释放的 % 为 30-51. 但尚不能完全拮抗 A-23187 的刺激释放作用, 给药组与不给 A-23187 的对照组间仍有显著差异 ($P < 0.05$).

Tab 2. Effects of anisodamine on release of 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ from cultured bovine aorta endothelial cells challenged with calcimycin. The cultured cells were incubated with anisodamine for 20 min and subsequently exposed to calcimycin ($10 \mu\text{mol/L}$) for 5 min. 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ released in media was measured by RIA. $n = 5-14$ expts, $\bar{x} \pm \text{SD}$. *** $P < 0.01$ vs control; ††† $P < 0.01$ vs calcimycin.

Calcimycin (10 $\mu\text{mol/L}$)	Anisodamine ($\mu\text{mol/L}$)	n	6-keto-PGF $_{1\alpha}$ (pg)
-	-	5	356 ± 91
+	-	14	$1961 \pm 395^{***}$
+	500	5	$992 \pm 106^{\dagger\dagger\dagger}$
+	100	5	$970 \pm 166^{\dagger\dagger\dagger}$
+	50	5	$1369 \pm 255^{\dagger\dagger\dagger}$

Discussion

文献中采用的 A-23187 的浓度很不一致, 故我们观察了不同浓度 A-23187 对小鼠巨噬细胞释放 $[^3\text{H}]$ AA 代谢物的影响, 发现以 $1 \mu\text{mol/L}$ 作用最强, 这与在大鼠中性白细胞上观察到的结果⁽⁹⁾ 相似. 巨噬细胞释放的 $[^3\text{H}]$ AA 代谢物主要为 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, PGE $_2$, LTC $_4$ 及 LTB $_4$, 与文献 (10, 11) 报道的结果一致.

Ani 对 A-23187 引起的巨噬细胞释放 PG 及 LT 以及牛内皮细胞释放 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 均呈抑制作用, 且作用与剂量呈依赖关系. 在上述两标本上 Ani 产生有效拮抗作用的浓度与文献中报道的 Ani 在高钾去极化豚鼠肠条上抗钙作

用所需的有效浓度 $328 \mu\text{mol/L}$ ⁽¹²⁾ 相近。在小鼠巨噬细胞标本上 Ver 也产生显著的拮抗 A-23187 的作用。上述结果提示了 Ani 通过拮抗 Ca^{2+} 作用而抑制 AA 代谢物的释放, 与在离体肠条抗 Ca^{2+} 实验上看到的类似情况是, Ani 浓度的进一步增高, 并不使其拮抗 A-23187 的作用进一步增强, 反而有所减弱(结果未列出)。当 Ani 浓度低于 $50 \mu\text{mol/L}$ 时, 抑制作用不明显。

目前认为, 在休克过程中缺血、毒素等原因引起的组织细胞不可逆损伤及死亡的过程中 Ca^{2+} 在细胞内的积聚是十分重要的环节, 本实验所观察到的 Ani 的有效抗钙浓度与整体动物上 Ani 常用剂量(10mg/kg , iv) 时产生的血药浓度⁽¹²⁾ 相似, Ani 的抗钙作用不仅可减少在休克发病学上起重要作用的 PG 与 LT 的释放⁽¹³⁾, 且因减少细胞内 Ca^{2+} 的积聚, 可能是其产生细胞保护作用的重要机理。Ani 是否因拮抗 Ca^{2+} 作用而降低磷脂酶 A_2 及 C 的作用, 从而减少 AA 的游离, 正在进一步研究。

References

- 1 Yue TL, Mai K. Effects of anisodamine on acetylcholine- and norepinephrine-induced prostaglandin released by rabbit iris. *Acta Pharm Sin* 1987; 22 : 807
- 2 Yue TL, Tong L. Effects of anisodamine on the metabolism of arachidonic acid by rat pleural neutrophils. *Acta Pharm Sin* 1988; 23 : 727
- 3 Mai K, Yue TL. 山莨菪碱抑制内毒素引起的小鼠巨噬细胞释放前列腺素和白三烯. *Kexue Tongbao* 1989; 34 : 386
- 4 Bottoms GD, Johnson M, Ward D, Fessler J, Lamar C, Turek J. Release of eicosanoids

- from white blood cells platelets, smooth muscle cells, and endothelial cells in response to endotoxin and A 23187. *Circ Shock* 1986; 20 : 25
- 5 Gerrard JM. *Prostaglandins and leukotrienes (blood and vascular cell functions)*. 1st ed. NY: Marcel Dekker, 1985 : 153-9
- 6 Levine L. Inhibition of the A-23187-stimulated leukotriene and prostaglandin biosynthesis of rat basophil leukemia (RBL-1) cells by nonsteroidal anti-inflammatory drugs, anti-oxidants, and calcium channel blockers. *Biochem Pharmacol* 1983; 32 : 3023
- 7 Hong SL. Effect of bradykinin and thrombin on prostacyclin synthesis in endothelial cells from calf and pig aorta and human umbilical cord vein. *Thromb Res* 1980; 18 : 787
- 8 Yue TL, Dong L, Chen XS, Mai K. 薄层层析法分离前列腺素和白三烯. *Acad J Second Military Med College* 1988; 9 : 365
- 9 Dobson P, Aharony D, Krell RD. Development of a sensitive method for measurement of leukotriene production by isolated cells. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1983; 42 : 3
- 10 Humes JL, Sadowski S, Galarage M, et al. Pharmacological effects of non-steroidal anti-inflammatory agents on prostaglandin and leukotriene synthesis in mouse peritoneal macrophages. *Biochem Pharmacol* 1983; 32 : 2319
- 11 Du JT, Foegh M, Maddox Y, Ramwell PW. Human peritoneal macrophages synthesize leukotrienes B_4 and C_4 . *Biochim Biophys Acta* 1983; 753 : 159
- 12 Tang CS, Yang XH, Wang X, Zhao Q, Su JY. Calcium-antagonist effect of anisodamine (654-2). *J Beijing Med College* 1985; 17 : 165
- 13 Feuerstein G, Hallenbeck JM. Prostaglandins, leukotrienes, and platelet-activating factor in shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1987; 27 : 301