

# 蝙蝠葛碱对大鼠胸水中性白细胞花生四烯酸代谢的影响<sup>1</sup>

岳天立、佟 丽<sup>2</sup> (第二军医大学药学院药理教研室, 上海 200433, 中国)

## Effects of dauricine on the metabolism of arachidonic acid in rat pleural neutrophils

YUE Tian-Li, TONG Li (Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** The effects of dauricine (Dau), an isoquinoline alkaloid and anti-arrhythmic agent used in China recently, on the biosynthesis of metabolites of arachidonic acid in rat pleural neutrophils, comparing with dazoxiben, indomethacin and BW-755 c, were studied. The major products of metabolism by 5-lipoxygenase (5-LPO), measured by HPLC, were  $LTB_4$  and 5-HETE, whereas the major cyclooxygenase products measured by HPLC and RIA, were HHT and  $TXB_2$ . The formation of all products by neutrophils was significantly depressed by Dau in a dose-dependent manner. The concentration of Dau required to obtain 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) of formation of HHT,  $TXB_2$ ,  $LTB_4$  and 5-HETE was 25.3, 59.3, 31.8 and 59.5  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. These results indicate that the two major metabolic pathways of arachidonic acid in rat pleural neutrophils are inhibited by Dau.

**Key words** arachidonic acids; leukotrienes B; dauricine; neutrophils; hydroxyeicosatetraenoic acids; thromboxane B<sub>2</sub>; 12-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid

**摘要** 本文研究蝙蝠葛碱(Dau)对大鼠胸水中性白细胞AA代谢的影响,采用HPLC及RIA测定白细胞5-脂氧酶代谢物 $LTB_4$ 、5-HETE及环氧酶代谢物HHT和 $TXB_2$ 。Dau同时抑制上述两条代谢途径产物的形成,且作用呈剂量依赖关系。与BW-755 c作用相似。而吲哚美辛在抑制HHT及 $TXB_2$ 形成同时,使 $LTB_4$ 及5-HETE明显增高。

**关键词** 花生四烯酸类; 白三烯B; 蝙蝠葛碱; 嗜中性白细胞; 羟花生四烯酸类; 血栓素 $B_2$ ; 12-羟-5,8,10-十七碳三烯酸

蝙蝠葛碱(dauricine, Dau)是从防己科植物蝙蝠葛根茎中分离得的一种双苄基异喹啉类生物碱,作为抗心律失常药已用于临床<sup>(1)</sup>。作者发现Dau抑制血小板合成血栓素 $A_2$ (thromboxane  $A_2$ ,  $TXA_2$ )和12-羟廿碳四烯酸(12-hydroxyeicosatetraenoic acid, 12-HETE),提示Dau可能抑制环氧酶(cyclooxygenase)和脂氧酶(lipoxygenase, LPO)活性<sup>(2)</sup>。为进一步探讨Dau对花生四烯酸(AA)代谢的影响,我们采用大鼠胸水中性白细胞为观察标本,因为该细胞同时具有5-LPO及环氧酶活性,可以同时观察Dau对AA两条代谢途径的影响<sup>(3)</sup>,并与典型的血栓素合成酶抑制剂dazoxiben,环氧酶抑制剂吲哚美辛(indomethacin)及兼具抑制环氧酶和LPO作用的BW-755 c进行了比较。

### Materials and methods

Sprague-Dawley大鼠,♂。体重 $258 \pm SD$  23 g, Dau由同济医科大学植化教研室提取分

1988年5月7日收稿 1988年11月1日接受

<sup>1</sup>国家自然科学基金资助项目 No 生字 85-445

<sup>2</sup>现在:第一军医大学中西医结合研究室,广州 510132, 中国

离, 胡崇家教授提供, 临用前加适量 HCl (1 mol/L) 溶解, 再以 pH 7.4 磷酸缓冲液稀释至所需浓度。血栓素 B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) 及白三烯 B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 标准品分别由 J Rokach (Merck, Frost, Canada) 及 JE Pike (Upjohn, USA) 博士惠赠, BW-755 c 由 Wellcome 药厂赠送。吲哚美辛、角叉菜胶购自 Sigma 公司, calcimycin (A-23187) 系 Calbiochem-Behring 产品, TXB<sub>2</sub> RIA 药盒由中国医学科学院基础医学研究所药理室提供, dazoxiben 由我系药化室合成。

**胸水中性白细胞制备** 向乙醚轻度麻醉下的大鼠右侧胸腔内注入 1% 角叉菜胶 0.2 ml。4 h 后断头, 开胸, 吸出胸腔积液, 于 4°C 下离心。沉淀的白细胞悬浮于 Tris-HCl 缓冲液 (17 mmol/L, pH 7.4, 含 0.75% 氯化铵) 以溶解样品中含有的红细胞<sup>(4)</sup>, 将白细胞沉淀后再用磷酸缓冲液 (pH 7.4) 洗涤一次, 然后将白细胞悬浮于同一缓冲液中, 使每 ml 含  $2 \times 10^7$  细胞 (测 TXB<sub>2</sub>) 或  $3 \times 10^7$  细胞 (测其它 AA 代谢物)。按上述方法制得的白细胞标本中中性白细胞占 94%, 锥虫蓝排斥试验表明 98% 以上的白细胞具有活力, 与文献 (5) 报道近似。

**孵育及 AA 代谢物的提取及定量** 向白细胞悬液中加入被试药物后, 于 37°C 下振荡孵育 20 min, 再加入 calcimycin (终浓度为 2 μmol/L), 继续孵育 5 min, 加入两倍量无水乙醇终止反应, 再加入内标物前列腺素 B<sub>2</sub> (PGB<sub>2</sub>) 0.5 μg 及适量水, 使乙醇浓度为 15%, 于 400 × g 离心 10 min (4°C)。上清液加 HCl (1 mol/L) 使 pH 3, 将该溶液通过 SEP-PAK C<sub>18</sub> 小柱 (Waters 产品), 顺次以 10% 乙醇、水、石油醚各 20 ml 冲洗小柱, 最后用 10 ml 甲酸甲酯将 AA 代谢物从小柱上洗脱。洗脱液于氮气流下吹干, 加入 30 μl 甲醇溶解后备 HPLC 测定用。当用 RIA 测定样品中的 TXB<sub>2</sub> 时, 温孵结束后加入 10% 甲酸使 pH 3, 离心后上清液用重蒸乙酸乙酯各 2 ml 提取两次, 合并提取液后取适量于氮气流下吹干备 RIA 用。HPLC 采用 Beckman 334 型双泵 HPLC 仪,

Beckman ODS 柱 (5 μm, 250 × 4.6 mm), 流动相为含 0.05% 乙酸的甲醇/水。开始 30 min 进行线性梯度洗脱, 使甲醇浓度从 60% 增至 70%, 接着进行等梯度洗脱 30 min, 然后再于 30 min 内使甲醇浓度增至 82%。采用可调波长紫外检测器, 检测波长为 280 nm (LTB<sub>4</sub> 及 PGB<sub>2</sub>) 和 235 nm (12-羟-5,8,10-十七碳三烯酸, HHT) 及 5-羟廿碳四烯酸 (5-HETE) (Fig 1), 定量依据吸收峰面积与内标物 PGB<sub>2</sub> 峰面积之比计算<sup>(6)</sup>。TXB<sub>2</sub> 采用 RIA 定量, 将上述提取物用磷酸缓冲液 (0.01 mol/L) 复溶后, 按 RIA 药盒规定测定。

显著性测定用 *t* 检验法。

## Results

**大鼠胸水中性白细胞对 AA 的代谢** Fig 1 为大鼠中性白细胞 AA 代谢物的 HPLC 色谱图。从图可见主要产物为 LTB<sub>4</sub>, 5-HETE 及 HHT, 与文献 (5) 报道一致。当每个样品含白细胞数  $3 \times 10^7$  个时, 各代谢物的生成量 (nmol) 分别为: LTB<sub>4</sub>  $1.08 \pm 0.18$ ; 5-HETE  $0.86 \pm 0.11$ ; HHT  $0.34 \pm 0.05$  (n = 8)。由于 TXB<sub>2</sub> 在上述波长下无吸收峰, 故采用 RIA 定量, 其形成量为  $0.12 \pm 0.03$  nmol/ $2 \times 10^7$  个细胞。

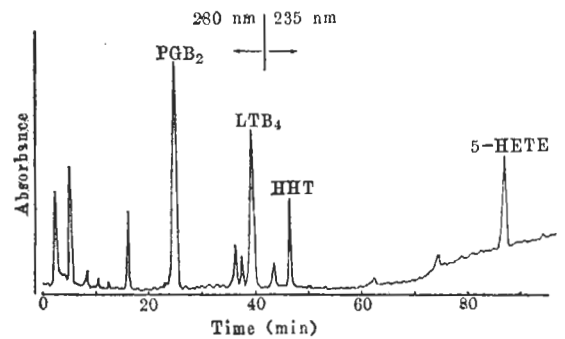


Fig 1. High-pressure liquid chromatogram of arachidonic acid metabolites formed by rat pleural neutrophils. The uv absorbance was monitored initially at 280 nm and then at 235 nm after 43 min.

**Dau 对大鼠胸水中性白细胞 AA 环氧酶代谢产物形成的影响** Fig 2 所示为 Dau 对白细

胞形成  $TXB_2$  的抑制作用。该作用与其剂量呈依赖关系,  $IC_{50} = 59.3 \mu\text{mol/L}$ , 同样条件下 **dazoxiben** 和 **吲哚美辛** 抑制  $TXB_2$  形成的  $IC_{50}$  分别为:  $0.84$  和  $0.18 \mu\text{mol/L}$ 。Dau 对 HHT 的形成同样呈剂量依赖性抑制(Fig 3), 其  $IC_{50}$  为  $25.3 \mu\text{mol/L}$ 。同样条件下, 当 **BW 755 c** 及 **吲哚美辛** 浓度分别为  $10$  及  $1 \mu\text{mol/L}$  时, HHT 形成分别减少  $57.1$  及  $67.6\%$ 。**Dazoxiben** 对 HHT 形成无影响。

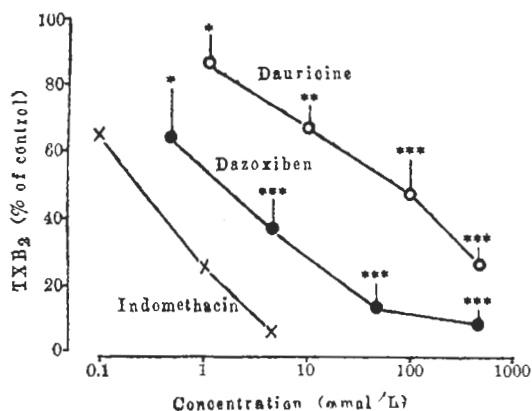


Fig 2. Effects of dauricine, dazoxiben and indomethacin on the formation of  $TXB_2$  in rat pleural neutrophils.  $n = 5-6$  determinations, except for indomethacin  $n = 2$  determinations done in duplicate.  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs control values.

Dau 对大鼠胸水中性白细胞 AA 5-脂氧酶代谢产物形成的影响 结果见 Fig 3。从图可见 Dau 对  $LTB_4$  及 5-HETE 的形成同样呈剂量依赖性抑制, 其抑制  $LTB_4$  及 5-HETE 的  $IC_{50}$  分别为  $31.8$  及  $59.5 \mu\text{mol/L}$ 。同样条件下, 当 **BW 755 c** 浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  时, 上述两代谢物的形成量分别减少  $31.2$  和  $29.4\%$ 。而 **吲哚美辛** ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) 则使  $LTB_4$  及 5-HETE 形成量分别增加  $37.6$  和  $57.7\%$ 。

## Discussion

血栓素合成酶抑制剂 **dazoxiben** 仅抑制白细胞  $TXB_2$  的形成, 其  $IC_{50}$  与文献(7)报道相似, **BW-755 c** 既抑制 5-LPO 又抑制环氧酶代

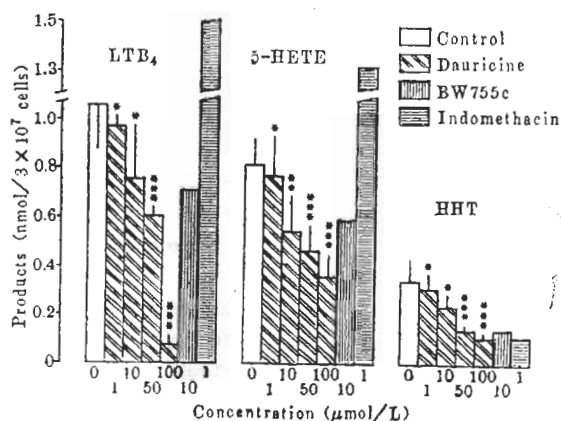


Fig 3. Effects of dauricine, BW-755 c and indomethacin on the biosynthesis of  $LTB_4$ , 5-HETE and HHT in rat pleural neutrophils.  $n = 5-6$  determinations for dauricine and the control, but  $n = 2$  experiments done in duplicate for BW 755 c and indomethacin.  $\bar{x} \pm SD$ . \* $P > 0.05$ , \*\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs control.

谢物的形成, 与其在血小板上观察到的结果<sup>(8)</sup>相似, 证明它兼具抑制 LPO 及环氧酶的作用。反之, **吲哚美辛** 抑制环氧酶代谢物的同时, 增加 5-LPO 代谢物的形成, 表明由于环氧酶途径受阻, 使更多的 AA 进入未受影响的 5-LPO 途径代谢。上述结果证实了用本模型观察 AA 两条代谢途径的可靠性。Dau 在抑制  $LTB_4$  及 5-HETE 形成的同时, 抑制 HHT 及  $TXB_2$  的合成, 且这种抑制作用与其剂量呈依赖关系、表明本品对 5-LPO 及环氧酶两条代谢途径均有抑制作用。

迄今发现的具有抑制白三烯形成的药物极少<sup>(9)</sup>。Dau 兼具抑制 5-LPO 及环氧酶代谢物的形成, 是值得引起人们注意的。有报道 Dau 具有抗炎镇痛及抑制白细胞游走的作用<sup>(10)</sup>, 很可能与其抑制 AA 代谢, 尤其是抑制  $LTB_4$  形成有关。最近发现 Dau 等苜基异喹啉生物碱具有抗钙作用<sup>(11)</sup>, 是否由此而影响 AA 的释放及代谢有待研究。

## References

- 1 Li GR, Hu CJ, Lü FH. 蝙蝠葛碱抗实验性心律失常的作用. *Chin Med J* 1984; 4: 2

- 2 Dong L, Yue TL. 蝙蝠葛碱对血小板聚集性及花生四烯酸代谢的影响. *Acta Pharm Sin* 1989; 24 : 5
- 3 Yue TL, Mai K. Observation on effects of drugs on two major metabolic pathways of arachidonic acid by using rat pleural neutrophils. *Kexue Tongbao* 1988; 33 : 866
- 4 Boyle W. An extension of the  $^{51}\text{Cr}$ -release assay for the estimation of mouse cytotoxins. *Transplantation* 1968; 6 : 761
- 5 Yue TL, Varma DR, Powell WS. Effects of protein deficiency on the metabolism of arachidonic acid by rat pleural polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* 1983; 751 : 332
- 6 Powell WS. Reversed-phase high-pressure liquid chromatography of arachidonic acid metabolites formed by cyclooxygenase and lipoxygenases. *Anal Biochem* 1985; 148 : 59
- 7 Gerald W, Dorn II, Perry VH. Thromboxane synthetase inhibitors, thromboxane receptor antagonists, and aspirin in cardiovascular disease. *Rational Drug Therapy* 1985; 19 : 1
- 8 Higgs GA, Flower RJ, Vane JR. A new approach to anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 1979; 28 : 1959
- 9 岳天立. 白三烯: 一类具有高度生物活性的花生四烯酸衍生物. 国外医学(药学分册) 1984; 11 : 170
- 10 Du ZH, Liu HG, Chai CY, Luo LY, Hu CJ. Anti-inflammatory effect of dauricine. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7 : 419
- 11 Hu ZY, Chen SL, Hao ZQ, Huang WL, Peng SX. Studies in interaction of benzylisoquinoline derivatives with calmodulin and phosphodiesterase. *J Chin Pharm Univ* 1988; 19 : 78