

levels of toxic deethylated lidocaine metabolites is to be expected in such circumstances^(6,7).

Summing up, the present study points out a possibility of a leakage of basic drugs into the gastric juice after iv injection. However, in the case of a single bolus iv injection of lidocaine this phenomenon seems not to have a major clinical sequel.

ACKNOWLEDGMENTS I thank Prof Kornel GIBINSKI, MD (*Department of Gastroenterology, Silesian School of Medicine, Katowice, Poland*) for the inspiration to perform this work and his expert advice while preparing the manuscript. I acknowledge also the invaluable technical help of Ms. A BECKER and Ms. I MANCZYK, M Sc, in performing chromatographic determination of lidocaine.

REFERENCES

1 Newton DW, Kluza RB. pK_A values of medical

compounds in pharmacy practice. *Drug Intell Clin Pharm* 1978; 12 : 546
2 Kanto J, Sellman R, Laurikainen E. Saliva concentrations of lignocaine in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 13 : 736
3 Laurikainen E, Kanto J. Saliva concentrations of lignocaine in patients with acute myocardial ischemia. *Ibid* 1983; 16 : 199
4 Barchowsky A, Stargel WW, Shand DG. Routledge PA. Saliva concentrations of lidocaine and its metabolites in man. *Ther Drug Monit* 1982; 4 : 335
5 Mather LE, Tucker GT. Meperidine and other basic drugs: general method for their determination in plasma. *J Pharm Sci* 1974; 63 : 306
6 Bennett PN, Aarons LJ, Bending MR, Steiner JA, Rowland M. Pharmacokinetics of lidocaine and its deethylated metabolite: dose and time dependency studies in man. *J Pharmacokinetic Biopharm* 1982; 10 : 265
7 Collinsworth KA, Kalman SM, Harrison DC. The clinical pharmacology of lidocaine as an antiarrhythmic drug. *Circulation* 1974; 50 : 1217

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Sep; 11 (5) : 466-470

阿魏酸钠和 18β-甘草次酸对氧自由基的清除作用¹

句海松²、李小洁、赵保路、侯京武、韩哲武²、忻文娟
(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080, 中国)

Scavenging effects of sodium ferulate and 18β-glycyrrhetic acid on oxygen free radicals¹

JU Hai-Song², LI Xiao-Jie, ZHAO Bao-Lu, HOU Jing-Wu, HAN Zhe-Wu², XIN Wen-Juan
(*Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

ABSTRACT The scavenging effects of sodium ferulate (SF) and glycyrrhetic acid (GA) on oxygen free radicals were studied by using spin trapping

technique and chemiluminescence (CL) methods. SF 0.3 mmol/L and GA 0.3 mmol/L effectively scavenged oxygen free radicals produced by phorbol myristate acetate (PMA)-stimulated polymorphonuclear leukocytes (PMN), but had no effect on the oxygen consumption by PMN, measured with spin probe oxymetry. In 3 cell-free oxygen free radical generating systems, both SF and GA showed a remarkably scavenging effects on O₂⁻ and OH[·]. SF 30 μmol/L and GA 30 μmol/L prominently inhibited the CL response of PMA-stimulated PMN. The results demonstrated that SF and GA are oxygen free radical scavengers.

KEY WORDS sodium ferulate; 18β-glycyrrhetic acid; electron spin resonance; luminescence; neutrophils; antioxidants; free radicals

Received 1989 Apr 21 Accepted 1990 May 27

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 3870789

² Department of Pharmacology, Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010059, China

摘要 用自旋捕集技术和化学发光法研究了阿魏酸钠(SF)和 18 β -甘草次酸(GA)对氧自由基的清除作用. SF 和 GA 0.3 mmol/L 对人多形核白细胞(MPN)释放的氧自由基有明显的清除作用. 它们对 PMN 的氧消耗无影响. SF 和 GA 对水溶液体系产生的 O₂⁻ 和 OH[·] 有明显的清除作用. 两药 30 mol/L 对 PMN 产生的化学发光有显著抑制作用. 结果证实 SF 和 GA 有直接捕获氧自由基作用.

关键词 阿魏酸钠; 18 β -甘草次酸; 电子自旋共振; 发光; 嗜中性白细胞; 抗氧化剂; 自由基

阿魏酸钠(sodium ferulate, SF)能抑制血小板脂质过氧化产物丙二醛的生成⁽¹⁾. 抑制丙二醛和羟自由基(OH[·])诱发的溶血及过氧化氢(H₂O₂)和超氧阴离子自由基(O₂⁻)引起的脂质过氧化反应⁽²⁾. 甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)能抑制多种化学物质诱发的鼠肝微粒体脂质过氧化反应, 对四氯化碳诱导的鼠肝微粒体产生的自由基有抑制作用. 抑制酵母多糖刺激的小鼠腹腔巨噬细胞生成 O₂⁻ 和 H₂O₂. 以上作用被认为是 GA 有保肝作用的机理之一⁽³⁾. 然而以上实验结果都是用间接方法得到的. 为进一步了解 SF 和 GA 的抗氧化作用. 本文用电子自旋共振(electron spin resonance, ESR)自旋捕集技术研究 SF 和 GA 对 O₂⁻ 和 OH[·] 的直接作用, 并用化学发光法检测它们对人多形核白细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMN)氧化代谢的影响.

MATERIALS AND METHODS

Phorbol myristate acetate (PMA), 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide (DMPO), 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-1-yloxy (CTPO), 黄嘌呤(Xan)和鲁米诺(luminol)是 Sigma 产品. PMA 用丙酮溶解, -20℃ 保存, 用前以磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.4)稀释到所需浓度. DMPO 经活性炭处理, ESR 检测未见到杂质信号. CTPO 用少量乙醇溶解. 用前以磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.4)稀释到所需浓度. 鲁

米诺用二甲基亚砷配成 1 mmol/L 的储备液, 用前以 Hank's 液稀释. 黄嘌呤氧化酶是中国科学院上海生物化学所产品(批号 8705114)其余试剂均为国产 AR 级, SF 是白色结晶. 由中国科学院药物研究所提供. 18 β -甘草次酸为白色粉末, 由呼和浩特制药厂提供.

PMN 的分离提纯⁽⁴⁾ 正常人新鲜抗凝血购自北京市红十字血液中心, 将全血与 6% 的葡聚糖按 2:1(vol/vol)混匀, 静置 1h, 取上层富含白细胞的悬液, 经冰水低渗法溶解残留的红细胞, 离心后(160 \times g, 4 min)回收白细胞, 用 Ficoll 经梯度离心得 PMN. 将 PMN 重悬于 Hank's 液中并调细胞数至 5 \times 10⁷/ml. 台盼蓝染色表明活细胞占 95% 以上.

PMN 释放氧自由基的测定⁽⁵⁾ 将含有 PMN 1.7 \times 10⁷/ml, 二乙三胺五乙酸(dietylenetriaminepentacetic acid, DETA-PAC) 0.1 mmol/L, 药物(对照样品用等量溶媒代替)和 DMPO 90 mmol/L 的混合物置 37℃ 水浴 2 min 后, 立刻加入 PMA 100 ng/ml, 将混合液吸入石英毛细管中, 置入 ESR 谐振腔内测定.

O₂⁻ 和 OH[·] 的测定 按本组已建立的自旋捕集方法测定 O₂⁻ 和 OH[·]⁽⁵⁾. 用黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统和光照核黄素体系产生 O₂⁻, 用 Fenton's 反应产生 OH[·]. 在上述 3 个水溶液体系中加入药物及对照, 在一定时间内描记 ESR 波谱.

波谱仪为美国 Varian E-109 ESR. 测定条件: 微波功率 15 mW, X 波段, 调制频率 100 kHz, 调制幅度 0.1 mT, 中心磁场 324 mT, 扫宽 20 mT, 扫速 5mT/min, 时间常数为 0.128, 温度为 25℃.

PMN 呼吸爆发时氧消耗的测定 用自旋探针氧测定法(spin probe oxymetry) 测定 PMA 刺激 PMN 产生呼吸爆发时的氧消耗⁽⁶⁾. 将含有 PMN 1.7 \times 10⁷ 细胞/ml, CTPO 0.3 mmol/L, 药物和 PMA 100 ng/ml 的混

合物密封于石英毛细管中、置 37°C 水浴 1 min, 分别于加入 PMA 后 2, 7, 12 和 17 min 时描记 ESR 波谱, 测试条件为:微波功率 1 mW, 调制幅度 5 μ T, 扫宽 1 mT, 扫速 37 μ T/min, 其余条件同前。

PMN 产生化学发光的测定⁽⁷⁾ 把已预温 (37°C, 45 min) 的 PMN (1×10^6 / ml) 0.5 ml 加入容量为 5 ml 的聚丙烯小管内, 加药物 50 μ l (对照用等量 Hank's 液代替), 再加鲁米诺 (0.1 mmol / L) 0.9 ml 和 PMA (1.25 μ g / ml) 50 μ l, 立刻计时, 用 LKB-1250 型发光仪测定 4, 8, 12, 16 和 20 min 时化学发光峰值, 相对发光强度用 V 表示。

RESULTS

SF 和 GA 对 PMN 释放的活性氧自由基的影响 PMN 受 PMA 刺激后产生呼吸爆

发, 释放出 O_2^- 和 OH^{\cdot} ⁽⁸⁾。Fig 1 A a, b, c 分别为不含或含 SF 或 GA 所得到的 ESR 波谱。加药后自旋加合物 DMPO-OOH 和 DMPO-OH 信号明显减弱, 说明两药均能清除 / 抑制 O_2^- 和 OH^{\cdot} 。

SF 和 GA 对 PMN 氧消耗的影响 自旋探针 CTPO 是一种顺磁性物质, 在特定条件下其 ESR 波谱如 Fig 2 B, 如果介质中有较高浓度的氧, 则顺磁性的氧与 CTPO 间产生自旋-自旋相互作用, 使 CTPO 的 ESR 谱线加宽, 超超精细分裂消失。故观察 CTPO 的 ESR 波谱变化可以了解氧浓度的高低, 用参数 K 表示波谱变化速率⁽⁶⁾, K 值按公式 $K = (b+c) / 2a$ 计算, 其中 a, b, c 的测量如 Fig 1 B。K 值大, PMN 氧消耗越多, 反之亦然。结果表明 SF 和 GA 对 PMN 呼吸爆发时的氧消耗无明显影响 (Fig 2 SF 未列出)。

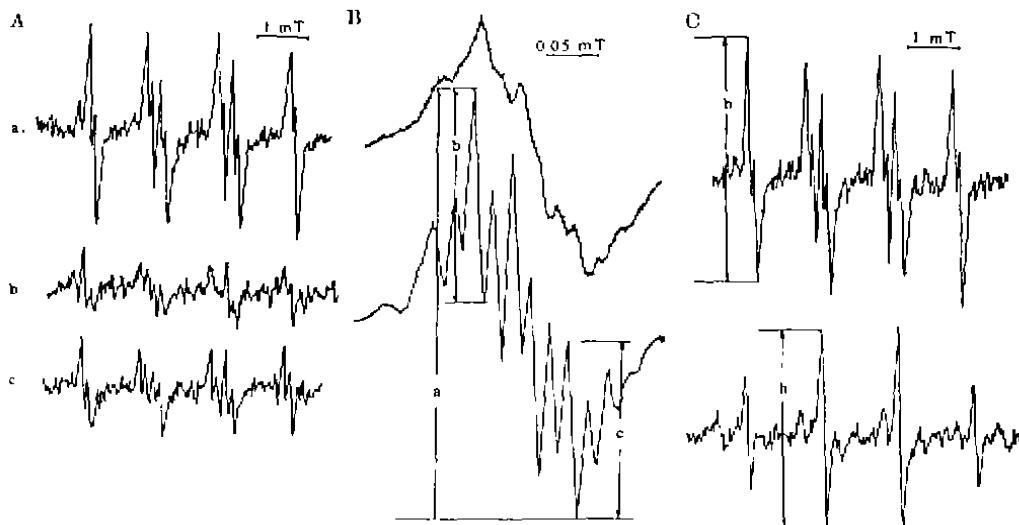


Fig 1. Electron spin resonance (ESR) spectrum of free radicals. A) ESR spectrum of DMPO adduct of oxygen free radicals produced by phorbol myristate acetate (PMA) - stimulated neutrophils. (a) Control, (b) Sodium ferulate 0.3 mmol / L, (c) glycyrrhetic acid (GA) 0.3 mmol / L. B) ESR spectrum of spin probe CTPO at the beginning (upper) or the end (lower) of the respiratory burst of PMA-stimulated neutrophils. C) Upper: the superoxide spin adduct spectra of DMPO produced by xanthine 0.32 mmol / L, DETAPAC 0.16 mmol / L, DMPO 80 mmol / L and xanthine oxidase 0, 1 IU / ml in 50 mmol / L phosphate buffer, pH 7.4. Lower: The hydroxyl spin adduct spectra of DMPO produced by 1% H_2O_2 , ferrousammonium sulfate 100 μ mol / L and DMPO 0.1 mol / L in 50 mmol / L phosphate buffer, pH 7.4. DMPO = 5,5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide. CTPO = 3-carbamoyl-2,3,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-1-yloxy. DETAPAC = diethylenetriaminepentacetic acid.

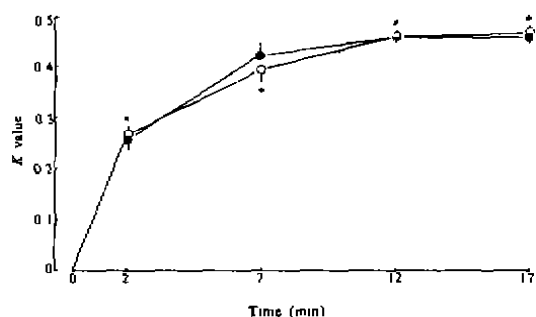


Fig 2. Effect of GA on the O₂ consumption by neutrophils during the respiratory burst. (O) GA 0.3 mmol/L, (●) Control, *P>0.05.

SF 和 GA 对 O₂⁻ 和 OH[·] 的直接作用
Fig 1 C 上下曲线分别是 O₂⁻ 或 OH[·] 与自旋捕集剂 DMPO 形成的自旋加合物 DMPO-OOH 或 DMPO-OH 的 ESR 波谱。

用 DMPO-OOH 信号的第一峰的峰高和 DMPO-OH 第二峰的峰高表示 ESR 信号的相对强度⁽⁵⁾。用抑制率 E 表示药物作用强弱，按公式： $E = (h_0 - h_1) / h_0 \times 100\%$ 。计算，其中 h₀ 为对照样品 ESR 波峰高度，h₁ 为加药后相应的 ESR 波峰高度。结果表明 SF 和 GA 均有直接清除 O₂⁻ 和 OH[·] 的作用 (Tab 1)。

SF 和 GA 对 PMN 产生化学发光的影响

PMN 呼吸爆发释放的氧自由基能使鲁米诺氧化成激发态的氨基酸盐离子。当它从激发态返回基态时对化学发光起增强作用。故测定

Tab 1. The scavenging percentages of sodium ferulate(SF) and glycyrrhetic acid (GA) on O₂⁻ and OH[·] in 3 cell-free systems. n=3, $\bar{x} \pm SD$. ***P<0.01, Xan = Xanthine, XO = Xanthine oxidase, O₂⁻ = superoxide anion, OH[·] = hydroxyl radical.

	Control	SF	GA
	0	0.6 mmol/L	0.6 mmol/L
Xan/XO	0	22.2 ± 2.3***	20.8 ± 1.0***
Irradiation	0	27.5 ± 1.9***	21.8 ± 4.0***
riboflavin	0	19.2 ± 0.7***	35.4 ± 0.2**
Fenton's	0		
reaction	0		

化学发光是检测上述氧化代谢产物的一种灵敏而准确的方法⁽⁷⁾。PMN 受 PMA 刺激后，随着呼吸爆发的进行，发光逐渐增强并于 12 min 时达高峰，此后又逐渐减弱。SF 和 GA 对于 PMN 产生的化学发光有显著的抑制作用 (Fig 3)。

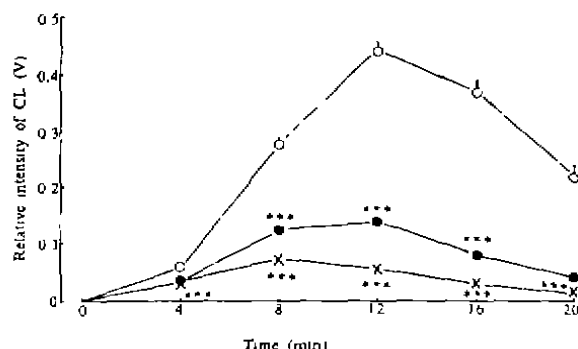


Fig 3. The chemiluminescence (CL) response of PMA-stimulated neutrophils. (O) Control, (●) sodium ferulate 30 μmol/L, and (×) GA 30 μmol/L. n=3, ***P<0.01 vs control.

DISCUSSION

氧自由基与炎症、自身免疫性疾病、心脑血管缺血性疾病及肿瘤的发生、发展关系密切⁽⁸⁾。自由基生成过多和/或机体抗氧化能力下降时，需要用外源性抗氧化剂进行纠正或治疗，故研究抗氧化剂有重要的理论及实际意义。PMN 是体内生成氧自由基的重要细胞。本文首先观察到 SF 和 GA 使 PMA 激活的 PMN 释放的 O₂⁻ 和 OH[·] 明显减少。产生这一结果有两种可能：一是药物抑制了 PMN 产生呼吸爆发而使 O₂⁻ 和 OH[·]；另一种可能是药物并不影响 PMN 呼吸爆发的进行，而是对此过程释放出的 O₂⁻ 和 OH[·] 有清除作用。本文结果表明：两药对 PMN 呼吸爆发过程中的氧消耗无明显影响，这有力地证明了药物使 O₂⁻ 和 OH[·] 减少不是抑制呼吸爆发所致而是其直接清除自由基的结果。

由于本文测到的 PMN 释放的氧自由基的 ESR 波谱是由自旋加合物 DMPO-OOH 和 DMPO-OH 叠加而成.因此,对药物的作用只能给出定性结果⁽³⁾.为了定量研究药物对 O₂⁻ 和 OH[·] 的作用,本实验采用了两个产生 O₂⁻ 和一个产生 OH[·] 的非细胞体系对两药做了定量观察.结果表明两药对 O₂⁻ 和 OH[·] 均有明显的清除作用.

PMN 呼吸爆发时除了释放 O₂⁻ 和 OH[·] 外,还有 H₂O₂ 等活性氧化代谢物生成.O₂ 的清除剂超氧化物歧化酶,OH[·] 的清除剂苯甲酸钠及 H₂O₂ 的清除剂过氧化氢酶均抑制 PMN 产生化学发光⁽⁷⁾.文献报道 SF 和 GA 有清除 H₂O₂ 的作用⁽²⁻³⁾,故认为 SF 和 GA 抑制化学发光是它们清除 O₂⁻、OH[·] 和 H₂O₂ 的综合结果.

ACKNOWLEDGMENTS 本所 ESR 技术组提供技术支持,中国医学科学院药物研究所徐理纳研究员提供阿魏酸钠.

REFERENCES

1 Yin ZZ, Wang JP, Xu LN. Effect of sodium ferulate on malondialdehyde production from platelets of rats. *Acta Pharmacol Sin* 1986;

7 : 336
2 Pan HZ, Zhao CY, Xu LN. The effect of sodium ferulate on lipid peroxidation of erythrocyte membrane. *Chin J Integr Tradit West Med* 1985; 5 : 678
3 Kiso Y, Tohkin M, Hikino H, Hattori M, Sakamoto T, Namba T. Mechanism of antihepatotoxic activity of glycyrrhizin, I: Effect on free radical generation and lipid peroxidation. *Planta Med* 1984; 51 : 298
4 Markert M, Andrews PC, Babior BM. Measurement of O₂⁻ production by human neutrophils. *Methods Enzymol* 1984; 105 : 358
5 Zhao BL, Li XJ, He RG, Cheng SJ, Xin WJ. Scavenging effect of extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophys* 1989; 14 : 175
6 Lai CS, Hopwood LB, Hyde JS, Lukiewicz S. ESR studies of O₂ uptake by Chinese hamster ovary cells during the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79 : 1166
7 Shult PA, Graziano FM, Wallow IH, Busse WW. Comparison of superoxide generation and luminol-dependent chemiluminescence with eosinophils and neutrophils from normal individuals. *J Lab Clin Med* 1985; 106 : 638
8 Britigan BE, Rosen GM, Chai Y, Cohen MS. Do human neutrophils make hydroxyl radicals? *J Biol Chem* 1986; 261 : 4426
9 Marx JL. Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science* 1987; 235 : 529

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Sep; 11 (5) : 470-473

博来霉素 A₃ 与钙调素抑制剂合用对体外 S-180 细胞增殖的影响¹

张鸿青、何农高、薛绍白(北京师范大学生物系细胞生物研究室,北京 100875, 中国)

Effect of bleomycin A₃ with calmodulin inhibitor on the proliferation of S-180 cells *in vitro*¹

Shao-Bai (Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

ZHANG Hong-Qing, HE Nong-Gao, XUE

ABSTRACT The effect of bleomycin A₃ (BLM) alone and along with calmodulin inhibitor N-(4-aminobutyl)-5-chloro-2-naphthalene sulfonamide (W-13) on the proliferation of S-180 cells *in vitro* were studied. IC₅₀ of BLM alone to the cells was about 2.63 μg/ml, which was decreased

Received 1989 May 20 Accepted 1990 May 15
¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China. No. 9388002