

3 Shan CW. Effects of polydatin on platelet aggregation of rabbits. *Acta Pharm Sin* 1988; 23 : 394

4 Shan CW, Liang QZ. Effects of procainamide on

blood platelet aggregation in rabbits. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9 : 338

5 Granstrom E, Kindahl H, Samuelsson B. Radioimmunoassay for thromboxane B₂. *Anal Lett* 1976; 9 : 611

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Nov; 11 (6) : 530-533

山萘萆碱和蝙蝠葛碱对牛脑动脉平滑肌细胞产生前列腺素的作用¹

曾国钱、芮耀诚 (第二军医大学药学院药理教研室, 上海 200433, 中国)

Inhibitory effects of dauricine and anisodamine on production of prostaglandins on bovine cerebral arterial smooth muscle cells¹

ZENG Guo-Qian, RUI Yao-Cheng
(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT The effects of dauricine (Dau), anisodamine (Ani), platelet activating factor (PAF), leukotriene C₄ (LTC₄) and leukotriene D₄ (LTD₄) on the production of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} (the stable metabolites of TXA₂ and PGI₂, respectively) in bovine anterior cerebral arterial smooth muscle cells were studied.

The normal quantities of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} produced by bovine anterior cerebral arterial smooth muscle cells were 16 ± 5 and 464 ± 24 pg / 10⁵ cells, respectively, when measured by radioimmunoassay (RIA). The levels of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} in bovine anterior cerebral arterial smooth muscle cells decreased significantly when the cells were treated with Dau or Ani over 20 min. Both drugs inhibited the production of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} in dose (1-100 μmol / L) dependent manner. The bovine anterior cerebral arterial smooth muscle cells were stimulated markedly by LTC₄ and LTD₄ to produce TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} on the same condition even at 0.01 μmol / L. When the cells were treated with PAF

over 20 min, TXB₂ increased significantly, but 6-keto-PGF_{1α} remained unchanged. If the cells were preincubated with Dau or Ani 20 min before PAF, LTC₄ or LTD₄ stimulation, the production of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} especially TXB₂ were inhibited significantly compared with that of PAF, LTC₄ or LTD₄ group, respectively.

The results indicated that PAF, LTC₄ and LTD₄ can enhance TXA₂ and PGI₂, especially TXA₂, biosynthesis in bovine anterior cerebral arterial smooth muscle cells, and that Dau and Ani normalized the balance of TXA₂ / PGI₂ in the cells changed by PAF, LTC₄ or LTD₄, and that both drugs may have significance in the prevention and treatment of cerebral vascular diseases.

KEY WORDS vascular smooth muscle; dauricine; anisodamine; platelet activating factor; leukotrienes; thromboxane B₂; 6-ketoprostaglandin F₁ alpha

提要 用放射免疫分析法测定了培养的牛脑动脉平滑肌细胞中 TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1α} 含量分别为 16 ± 5 及 464 ± 24 pg / 10⁵ 细胞。LTC₄ 及 LTD₄ 依剂量性刺激该细胞产生 TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1α}，但对 TXB₂ 刺激产生作用强。PAF 只刺激 TXB₂ 产生。山萘萆碱和蝙蝠葛碱均能显著抑制该细胞及 PAF, LTC₄, LTD₄ 刺激的该细胞产生 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α}，且对 TXB₂ 的抑制作用更明显。

关键词 血管平滑肌; 蝙蝠葛碱; 山萘萆碱; 血小板活化因子; 白三烯; 血栓素 B₂; 6-酮前列腺素 F_{1α}

Received 1990 Apr 11 Accepted 1990 May 31
¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China No. 3880742

血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 和白三烯 C₄ (leukotriene C₄, LTC₄)、白三烯 D₄ (leukotriene D₄, LTD₄) 是

二类具有广泛生物活性的自体活性物质, 参与体内许多病理过程^(1,2), 但其作用机理尚未完全明了。有报道, LTC_4 和 LTD_4 能促进人内皮细胞及牛主动脉内皮细胞 PGI_2 的产生^(3,4), 还能刺激小鼠平滑肌细胞产生 TXB_2 ^(4,5)。PAF 也能刺激培养的主动脉平滑肌细胞及肾脏表皮细胞合成前列腺素⁽⁶⁾。为了进一步研究 PAF 及 LT_4 对脑血管的作用, 作者用放射免疫分析法(RIA)测定了 PAF, LTC_4 及 LTD_4 对培养的小牛大脑前动脉平滑肌细胞(bovine anterior cerebral arterial smooth muscle cells)产生 TXB_2 及 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 的影响, 并研究了山莨菪碱及蝙蝠葛碱的作用。

MATERIALS AND METHODS

PAF 标准品由瑞士 Hoffmann-La Roche 公司的 Dr P Hadvery 惠赠, 用无水乙醇配成 $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 原液, -20°C 保存。用前再用 D-Hanks 液稀释。LTs 标准品由加拿大 Merck Frosst 公司提供, 用 pH 8.0 的磷酸缓冲液溶解, 并于 -80°C 保存, 临用前用 D-Hanks 液稀释。山莨菪碱(anisodamine, Ani) 购自成都制药一厂, 用 D-Hanks 液配制。蝙蝠葛碱(dauricine, Dau)由中国药科大学药化教研室提供, 临用前用适量 HCl(1 mol/L)溶解, 再用 pH 7.4 的 D-Hanks 液稀释至所需浓度。 TXB_2 及 $6\text{-keto-}[^3\text{H}]\text{-PGF}_{1\alpha}$ 放射免疫药盒购自北京解放军总医院。

小牛大脑前动脉平滑肌细胞的体外培养参照文献⁽⁷⁾的方法, 在无菌条件下取出新处死的小牛大脑前动脉, 放入 0.5% 的水解乳蛋白液中, 洗涤数次, 剥去外部的脂肪组织, 纵行剖开血管, 轻轻刮去内膜, 用手术刀片将血管切成 $1\text{--}2 \text{ mm}^3$ 的组织小块, 用镊子将组织块的内面贴在培养瓶壁上, 每 cm^2 种 2-5 块, 2-4 h 以后, 加入含 20% 小牛血清的 MEM 培养液, 在 CO_2 孵箱内于 37°C 培养 5-10 d 后, 可见细胞从组织块周围萌出生

长, 此时每周更换培养液 2 次, 15-20 d 后即可传代, 本实验所用细胞均为第 13 代细胞。传代时, 先用 D-Hanks 液洗细胞 2 次, 然后加入 0.25% 的胰蛋白酶, 消化约 3 min, 倒置显微镜下见大部分细胞收缩, 细胞间隙变大, 界线分明时, 倾去酶液, 加入含 10% 小牛血清的 MEM 培养液, 吹打分散成细胞悬液, 显微镜下计数, 以 $1 \times 10^4 - 2 \times 10^4$ 细胞/ cm^2 接种于新瓶中, 每周换液一次, 7-10 d 可再次传代。

小牛大脑前动脉平滑肌细胞中 TXB_2 及 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 的产生、提取与测定 取铺满瓶底的平滑肌细胞, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化后, 加 MEM 制成细胞悬液, 调整细胞数为 1×10^5 细胞/ml。将细胞接种于 24 孔培养板中, 每孔 1×10^5 细胞, 3 d 以后, 倒掉旧培养液, 换入新的不含小牛血清的培养液, 同时加入被试药物, 37°C 经 20 min 后, 每孔加入 $30 \mu\text{l}$ HCl (1 mol/L) 调 pH 至 3.5, 用重蒸乙酸乙酯提取, 每次 2 ml, 提 2 次, 取乙酸乙酯层 0.5 ml 用 RIA 法分别测定其中的 TXB_2 和 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 量。

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

RESULTS

山莨菪碱、蝙蝠葛碱及 PAF, LT_4 对小牛大脑前动脉平滑肌细胞产生 TXB_2 及 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 的影响 培养的小牛大脑前动脉平滑肌细胞可以合成并释放 TXB_2 及 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$, 其含量分别为 16 ± 5 及 $464 \pm 24 \text{ pg}/10^5$ 细胞。在同样的条件下, Dau 和 Ani 在 $1\text{--}100 \mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内均能显著抑制小牛大脑前动脉平滑肌细胞产生 TXB_2 及 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$, 并具有浓度依赖性, 其中 TXB_2 量下降到测不出水平。相反, LTC_4 和 LTD_4 在 $0.01\text{--}1 \mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内均能明显刺激该细胞产生 TXB_2 及 6-keto-

PGF_{1α}, 并且随着剂量的增加, 刺激作用也增强. PAF 在 0.01-1 μmol/L 浓度范围内, 呈剂量依赖性地刺激小牛大脑前动脉平滑肌细胞合成 TXB₂, 而对其合成 6-keto-PGF_{1α} 无影响. PAF, LTC₄ 和 LTD₄ 对 TXB₂ 的刺激产生作用明显强于对 6-keto-PGF_{1α} 的刺激产生作用, 因而显著改变了小牛大脑前动脉平滑肌细胞中的 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ 平衡, 使其向 TXB₂ 占优势的方向转化. 结果见 Tab 1.

Tab 1. Effects of dauricine (Dau), amisodamine (Ani), PAF, LTC₄ and LTD₄ on the production of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} in bovine anterior cerebral arterial smooth muscle cells. n=3, except n=6 in control group. $\bar{x} \pm SD$. *P>0.05, **P<0.05, ***P<0.01 vs control.

Drug (μmol/L)	TXB ₂ (pg/10 ⁵ cells)	6-keto-PGF _{1α} (pg/10 ⁵ cells)	6-keto-PGF _{1α} /TXB ₂
Control	16±5	464±24	28±4
Dau			
0	0	319±35***	
10	0	234±34***	
100	0	206±61***	
Ani			
0	0	429±47*	
10	0	408±25*	
100	0	302±63***	
PAF			
0.01	38±25**	391±144*	7.5±0.6**
0.1	65±21***	449±158*	7.0±0.6**
1	91±12***	408±50*	4.5±0.04**
LTC ₄			
0.01	45±1***	483±98*	6.7±3.6**
0.1	150±19***	576±74***	3.6±0.2**
1	213±74***	749±88***	3.7±0.9**
LTD ₄			
0.01	88±49**	705±68***	13.2±1.3***
0.1	77±6**	837±26***	10.5±0.5***
1	114±24***	1072±102***	8.6±1.3***

山萸萸碱、蝙蝠葛碱对 PAF, LTs 刺激的小牛大脑前动脉平滑肌细胞合成 TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1α} 的影响. Dau 和 Ani 不仅能抑制培养的小牛大脑前动脉平滑肌细胞在正常情况下产生 TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1α}, 而且能明显抑制 PAF, LTC₄ 和

LTD₄ 刺激的小牛大脑前动脉平滑肌细胞产生 TXB₂ 以及抑制 LTC₄ 和 LTD₄ 刺激的这种细胞产生 6-keto-PGF_{1α}. 结果见 Tab 2. 在 10 和 100 μmol/L 时, Dau 和 Ani 均能显著降低 PAF, LTC₄ 及 LTD₄ 刺激的小牛大脑前动脉平滑肌细胞产生 TXB₂, 且浓度高, 抑制作用也强. 虽然 Dau 和 Ani 在此浓度时也能抑制 LTC₄ 及 LTD₄ 刺激的小牛大脑前动脉平滑肌细胞产生 6-keto-PGF_{1α} 但两药对 TXB₂ 的抑制作用强, 因而产生有益作用.

Tab 2. Effects of dauricine (Dau), amisodamine (Ani), on production of TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} in bovine anterior cerebral arterial smooth muscle cells stimulated with 1 μmol/L of PAF, LTC₄ and LTD₄. n=3, $\bar{x} \pm SD$. *P>0.05, **P<0.05, ***P<0.01 vs PAF, LTC₄ and LTD₄, respectively

Drug (μmol/L)	TXB ₂ (pg/10 ⁵ cells)	6-keto-PGF _{1α} (pg/10 ⁵ cells)	6-keto-PGF _{1α} /TXB ₂
PAF	91±12	408±51	4.5±0.04
PAF+Dau			
10	21±6***	544±85*	26.8±4.8***
100	7±4***	526±42**	81.1±31.6**
PAF+Ani			
10	64±12**	589±60**	25.7±32.9*
100	17±9***	555±69**	36.0±14.5**
LTC ₄	213±74	749±88	3.7±0.9
LTC ₄ +Dau			
10	38±8***	563±158*	14.4±0.2***
100	26±11***	405±133**	20.6±2.5***
LTC ₄ +Ani			
10	61±5***	662±49*	11.3±0.8***
100	46±13***	574±37**	14.3±1.8***
LTD ₄	114±24	1073±102	8.7±1.3
LTD ₄ +Dau			
10	85±44*	716±151**	9.9±4.4*
100	20±12***	639±161**	85.8±15.0***
LTC ₄ +Ani			
10	61±25***	760±116**	11.1±0.2**
100	29±13***	669±41***	50.7±5.6***

DISCUSSION

本文结果表明培养的小牛大脑前动脉平滑肌细胞可以合成并分泌 TXB₂ 及

6-keto-PGF_{1α}, 且 6-keto-PGF_{1α} 的产量高于 TXB₂, 说明在正常情况下, 小牛大脑前动脉平滑肌细胞中保持着 PGI₂ 占优势的 PGI₂/TXA₂ 动态平衡. PAF, LTC₄ 及 LTD₄ 促进许多细胞和组织中前列腺素的合成已有文献报道⁽⁵⁻⁸⁾. 本实验则进一步证明 LTC₄ 及 LTD₄ 能刺激培养的小牛大脑前动脉平滑肌细胞产生 TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1α}. 但两者增加的 TXB₂ 相对量远大于 6-keto-PGF_{1α}, 使该细胞中原有的 PGI₂/TXA₂ 动态平衡向 TXA₂ 占优势的方向转化. PAF 只刺激小牛大脑前动脉平滑肌细胞中 TXB₂ 的产生, 表明 PAF 和 LTC₄, LTD₄ 可能作用于细胞中的不同环节. 因此, PAF, LTC₄ 和 LTD₄ 不仅通过促进血小板聚集、收缩脑血管等直接作用, 而且还通过增加 TXA₂ 相对量参与了脑血管病变.

Ani 和 Dau 在许多生物标本上抑制花生四烯酸(arachidonic acid)的代谢^(9,10), Dau 还能抑制小鼠腹腔巨噬细胞释放 PAF⁽¹¹⁾. 本实验证明 Dau 和 Ani 能抑制 PAF, LTC₄ 及 LTD₄ 刺激的小牛大脑前动脉平滑肌细胞产生 TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1α}, 特别是抑制 TXB₂ 的产生, 使该细胞因受这些因子刺激而造成的 PGI₂/TXA₂ 平衡失调逆转而恢复正常, 提示二药可能对防治脑血管病有意义.

REFERENCES

- 1 Bessin P, Bonnet J, Apffel P, Soulard C, Desgroux L, Pelas I, et al. Acute circulatory collapse caused by platelet-activating factor (PAF-acether) in dogs. *Eur J Pharmacol* 1983; 86 : 403
- 2 Morris HR, Taylor GW, Piper PJ, Samhoun MH, Tippins JR. Slow reacting substances (SRS): the structure identification of SRS from rat basophilic leukemia (RBL-1) cells. *Prostaglandins* 1980; 19 : 185
- 3 Cramer EB, Pologe L, Pawlowski NA, Cohn ZA, Scott WA. Leukotriene C promotes prostacyclin synthesis by human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80 : 4109
- 4 Clark MA, Littlejohn D, Conway TM, Mong S, Steiner S, Crooke ST. Leukotriene D₄ treatment of bovine aortic endothelial cells and murine smooth muscle cells in culture results in an increase in phospholipase A₂ activity. *J Biol Chem* 1986; 261 : 10713
- 5 Clark MA, Cook M, Mong S, Crooke ST. The binding of leukotriene C₄ and leukotriene D₄ to membranes of a smooth muscle cell line (BC3H₁) and evidence that leukotriene induced contraction in these cells is mediated by thromboxane and RNA synthesis. *Eur J Pharmacol* 1985; 116 : 207
- 6 Kawaguchi H, Yasuda H. Platelet-activating factor stimulates prostaglandin synthesis in cultured cells. *Hypertension* 1986; 8 : 192
- 7 Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1977; 59 : 1
- 8 Piper PJ, Samhoun MN. The mechanism of actions of leukotriene C₄ and D₄ in guinea-pig isolated lung and parenchymal strips of guinea-pig, rabbit and rat. *Prostaglandins* 1981; 21 : 793
- 9 Clark MA, Littlejohn D, Mong S, Crooke ST. Effect of leukotrienes, bradykinin and calcium ionophore (A23187) on bovine endothelial cells: release of prostacyclin. *Ibid* 1986; 31 : 157
- 10 Yue TL, Zeng GQ, Li J. Inhibition of release of prostaglandins and leukotrienes from zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages by anisodamine. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1989; 3 : 91
- 11 Yue TL, Tong L. Effects of dauricine on the metabolism of arachidonic acid in rat pleural neutrophils. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 279
- 12 Zeng GQ, Rui YC. Inhibitory effect of dauricine on platelet-activating factor released from calcimycin-induced mouse peritoneal macrophages. *Ibid* 1990; 11 : 346