

## 益康唑和克霉唑对卡西霉素刺激的中性白细胞和 AA 诱导的血小板生成 TXB<sub>2</sub> 及 PGE<sub>2</sub> 的影响

姜远英、张 滨、陈新生、龙 焜 (第二军医大学药学院药理教研室, 上海 200433, 中国)

**Effects of econazole and clotrimazole on TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> production in calcimycin-stimulated neutrophils and arachidonic acid-stimulated platelets.**

JIANG Yuan-Ying, ZHANG Bin, CHEN Xin-Sheng, LONG Kun  
(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT** The effects of econazole and clotrimazole which are used as antifungal agents, on TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> production in calcimycin (A-23187)-stimulated rat pleural neutrophils and arachidonic acid (AA)-stimulated washing rabbit platelets were examined by radioimmunoassay. Econazole and clotrimazole 0.05-100 μmol · L<sup>-1</sup> inhibited TXB<sub>2</sub> production both in rat pleural neutrophils and in rabbit platelets with a dose-dependent manner. The most potent inhibition was found in rabbit platelets. At the concentration of 50 μmol · L<sup>-1</sup>, econazole and clotrimazole were sufficient to inhibit TXB<sub>2</sub> production in rabbit platelets by up to 99% and 98% respectively. Econazole and clotrimazole 0.05-5 μmol · L<sup>-1</sup> also increased PGE<sub>2</sub> biosynthesis in rabbit platelets. But econazole and clotrimazole 50 μmol · L<sup>-1</sup> reduced the PGE<sub>2</sub> production in rabbit platelets to 11% and 37% of the amounts of 5 μmol · L<sup>-1</sup> econazole and clotrimazole respectively. The results suggest that econazole and clotrimazole at lower concentration may have a selective inhibitory effect on thromboxane synthetase, at higher concentration they also inhibit cyclooxygenase.

**KEY WORDS** econazole; clotrimazole; aspirin; blood platelets; neutrophils; thromboxane B<sub>2</sub>; dinoprostone; radioimmunoassay; calcimycin (A-23187); A-23187 (calcimycin)

**提要** 放射免疫测定 TXB<sub>2</sub> 及 PGE<sub>2</sub>, 证明益康唑 (Eco) 和克霉唑 (Clo) 对卡西霉素刺激的大鼠中性白细胞及 AA 诱导的兔血小板 (RP) 产生 TXB<sub>2</sub> 都有剂量依赖性抑制作用, Eco 和 Clo 50 μmol · L<sup>-1</sup> 使 RP 的 TXB<sub>2</sub> 生成量分别为对照组的 0.9% 及 2%。两药 0.05-5 μmol · L<sup>-1</sup>, 还能增加 RP 的 PGE<sub>2</sub> 生成量, 但 Eco 和 Clo 50 μmol · L<sup>-1</sup> 可使 RP 的 PGE<sub>2</sub> 生成量分别降为 5 μmol · L<sup>-1</sup> 组的 11% 及 37%, 减少非常显著。

**关键词** 益康唑; 克霉唑; 阿司匹林; 血小板; 嗜中性白细胞; 血栓素 B<sub>2</sub>; 前列腺素 E<sub>2</sub>; 放射免疫测定; 卡西霉素 (A-23187); A-23187 (卡西霉素)

克霉唑和咪康唑对花生四烯酸 (AA) 代谢的影响虽有报道<sup>(1,4)</sup>, 但结论不完全一致, 而益康唑对血小板聚集和 AA 代谢的影响, 迄今未见报道。我们在证明了益康唑和克霉唑对 AA 诱导的血小板聚有较强抑制作用的基础上, 进一步发现两者对大鼠洗涤血小板 TXB<sub>2</sub> 的基础释放量有比已知 TXA<sub>2</sub> 合成酶抑制剂达唑氧苯更强的抑制作用, 并且在低浓度时能增加 PGE<sub>2</sub> 的生成量, 而高浓度时则反而降低 PGE<sub>2</sub> 的产生量<sup>(5)</sup>。为更详尽地了解益康唑和克霉唑对 AA 环氧酶代谢途径的影响, 我们又观察了两者对 A-23187 刺激的大鼠胸水中性白细胞及 AA 诱导的兔洗涤血小板生成 TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的影响。

### MATERIALS AND METHODS

Sprague-Dawley 大鼠, ♂, 体重 265 ± SD 30 g. New Zealand 大白兔, ♂, 体重 2.5 ± 0.3 kg. 卡西霉素 (A-23187) 购自 Calbiochem-Behring 公司, 角叉菜胶和 AA 钠盐 (纯度 99%) 系 Sigma 产品, 益康唑 (econazole) 和克霉唑 (clotrimazole) 纯品由本

Received 1990 Jun 2

Accepted 1990 Sep 1

院有机化学教研室提供, 溶于 *N*-二甲基甲酰胺(DMF)作为贮存液, 临用时稀释成含有 16.7% DMF, 16.7% 聚乙二醇, 66.7% 生理盐水及相应药物浓度的应用液. DMF 和聚乙二醇的终浓度不超过 0.167% (vol · vol<sup>-1</sup>). TXB<sub>2</sub> 及 PGE<sub>2</sub> 的放射免疫测定药盒购自北京解放军总医院.

**大鼠胸水中性白细胞的制备** 向轻度乙醚麻醉下的大鼠右倾胸腔内注入 1% 角叉菜胶悬液 0.3 ml, 4 h 后将大鼠断头, 并用含有 5 IU · ml<sup>-1</sup> 所素的磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)冲洗出胸腔积液, 然后于 4℃ 下离心 10 min (200 × *g*), 弃上清液, 将沉淀的细胞悬浮于含 0.75% 氯化铵的 17 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)中, 以破坏其中的红细胞. 将获得的白细胞离心(200 × *g*, 5 min)沉淀后, 再用磷酸缓冲液(pH 7.4)洗涤一次, 最后悬浮于该磷酸缓冲液中, 过 4 号针头使成单细胞均匀状态, 调整细胞浓度, 使每 ml 含 5 × 10<sup>6</sup> 个细胞. 按上述方法制得的白细胞标本, 中性白细胞占 95% 以上, 锥虫蓝排斥试验表明 98% 以上的细胞具有活力<sup>(6)</sup>.

**中性白细胞温育** 取此中性白细胞液 1 ml, 加入被试药液或相应的对照液 10 μl, 于 37℃ 振荡温育 20 min, 再加入 A-23187 溶液, 使其终浓度为 2 μmol · L<sup>-1</sup>, 于 37℃ 继续温育 5 min 后取出, 立即置冰浴中并加 10% 甲酸使 pH 3.5, 中止反应.

**兔血小板洗涤及温育** 健康家兔清醒状态下心脏内采血, 全血用 ACD 溶液(citric acid 65 mmol · L<sup>-1</sup>, trisodium citrate 85 mmol · L<sup>-1</sup>, dextrose 110 mmol · L<sup>-1</sup>)按照 6 : 1 (vol · vol<sup>-1</sup>)的比例混匀抗凝, 室温下 200 × *g* 离心 10 min, 取上层富血小板血浆(PRP), 再 1500 × *g* 离心 PRP 15 min, 沉淀的血小板用含 EGTA 0.2 mmol · L<sup>-1</sup> 的无钙台氏明胶(2.5%, wt/vol)溶液洗涤两次, 最后用含 CaCl<sub>2</sub> 1.3 mmol · L<sup>-1</sup> 和 0.25% (wt/vol)牛

血清白蛋白(BSA)的台氏液制成血小板悬液, 调整血小板数使每 ml 含 1.6 × 10<sup>8</sup> 个血小板. 取此血小板悬液 1 ml, 加入被试药液或相应的对照液, 温育过程同中性白细胞, 不同的是血小板用 10, 30 或 100 μmol · L<sup>-1</sup> 的 AA 刺激 5 min 后中止反应.

**TXB<sub>2</sub> 及 PGE<sub>2</sub> 的提取与测定** 将温育过的中性白细胞悬液或血小板悬液, 室温下用 2-3 倍容量的重蒸乙酸乙酯提取两次, 合并两次提取的有机相, 用 N<sub>2</sub> 气吹干, -35℃ 保存, 测定前样品中加入 pH 7.4 的磷酸缓冲液复溶后, 用放射免疫法<sup>(7,8)</sup>测定其中 TXB<sub>2</sub> 及 PGE<sub>2</sub> 的含量.

实验结果用  $\bar{x} \pm SD$  表示, 显著性测定用 *t* 检验.

## RESULTS

**A-23187 对大鼠中性白细胞 TXB<sub>2</sub> 及 PGE<sub>2</sub> 生成的影响** 在不加诱导剂刺激的情况下, 大鼠中性白细胞 TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的基础释放量分别为 2.8 ± 1.3 及 3.4 ± 1.7 ng / 10<sup>7</sup> cells (*n* = 4). 温育时加终浓度为 2 μmol · L<sup>-1</sup> 的 A-23187 刺 5 min, 能使 TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的生成量分别增加到 7.9 ± 0.8 (*n* = 3) 及 29.8 ± 2.9 ng / 10<sup>7</sup> cells (*n* = 5), 与 TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的基础释放量相比都相差非常显著(*P* < 0.01), 结果表明 A-23187 能刺激大鼠胸水中性白细胞 TXB<sub>2</sub> 与 PGE<sub>2</sub> 的生成.

**药物对 A-23187 刺激的大鼠中性白细胞 TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 生成的影响** 益康唑和克霉唑在 0.1-100 μmol · L<sup>-1</sup> 的浓度范围内, 都能显著抑制 A-23187 刺激的大鼠中性白细胞 TXB<sub>2</sub> 的生成, 并有良好的剂量效应相关(Fig 1). 其最大抑制率分别为 82.9% 及 84.5%. 益康唑和克霉唑在 0.1 和 1 μmol · L<sup>-1</sup> 的浓度下, 对大鼠中性白细胞产生 PGE<sub>2</sub> 没有显著的影响, 虽然从数据上看稍有增加趋势, 但统计学上相差不显著(*P* > 0.05). 相反两药在 10 和 100

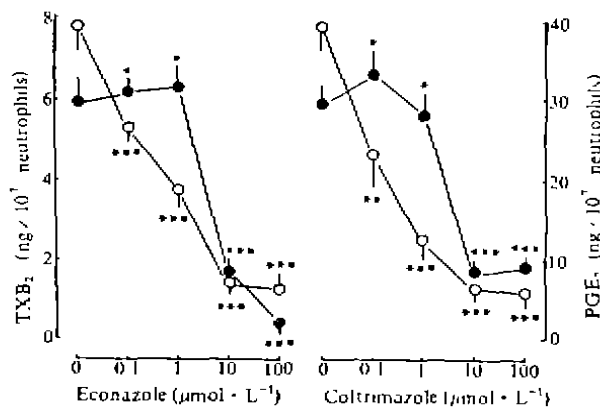


Fig 1. Effects of econazole and clotrimazole on the production of TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> in rat pleural neutrophils stimulated by 2 μmol · L<sup>-1</sup> ionophore A-23187 for 5 min *in vitro*. n=4,  $\bar{x} \pm SD$ , \*P>0.05, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.01 vs control. (○) TXB<sub>2</sub>; (●) PGE<sub>2</sub>.

μmol · L<sup>-1</sup> 的浓度下, 则能显著抑制 PGE<sub>2</sub> 的生成(P<0.01), 这与文献<sup>(2)</sup>报道的作用结果相类似. 在 100 μmol · L<sup>-1</sup> 的浓度下, 益康唑的抑制作用比克霉唑要更强些.

AA 对洗涤兔血小板 TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 生成的影响 洗涤兔血小板 TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的基础释放量很低, 分别只有 1.3 ± 1.3 (n=5) 及 0.26 ± 0.06 ng / 10<sup>8</sup> 血小板(n=5). 外源性 AA 作为血小板环氧酶的底物, 与洗涤兔血小板一起温育 5 min, 能显著增加 TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的

Tab 1. Effects of exogenous arachidonic acid on TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> production in washing rabbit platelets *in vitro*. n=3-5 experiments,  $\bar{x} \pm SD$ , \*\*\*P<0.01 vs control.

Arachidonic acid (μmol · L <sup>-1</sup> )	TXB <sub>2</sub> (ng / 10 <sup>8</sup> platelets)	PGE <sub>2</sub> (ng / 10 <sup>8</sup> platelets)
0	1.3 ± 1.3	0.26 ± 0.06
10	23 ± 6**	2.9 ± 0.6***
30	378 ± 84***	25 ± 3***
100	463 ± 52***	40 ± 6***

生成量, 而且随着 AA 加入量的增加, TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的生成量也随之增加(Tab 1). 当外加 AA 终浓度超过 30 μmol · L<sup>-1</sup> 时, TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 生成量增加的程度趋于平缓, 我们参照文献并结合本实验的结果, 采用 AA 终浓度为 30 μmol · L<sup>-1</sup> 以观察药物的作用.

药物对 AA 诱导的洗涤兔血小板 TXB<sub>2</sub> 生成的影响 阿司匹林是已知的环氧酶抑制剂, 当浓度为 0.05 μmol · L<sup>-1</sup> 时, 能使 TXB<sub>2</sub> 的生成量有减低趋势, 但统计学上没有显著差异(P>0.05). 当浓度为 0.5-50 μmol · L<sup>-1</sup> 时, 则能显著抑制 AA 诱导的洗涤兔血小板生成 TXB<sub>2</sub>, 其抑制强度呈剂量依赖性. 而益康唑和克霉唑在 0.05-50 μmol · L<sup>-1</sup> 的浓度范围内, 都能显著抑制兔血小板生成 TXB<sub>2</sub>, 并呈良好的剂量效应相关. 在 0.05-5 μmol · L<sup>-1</sup> 的浓度下益康唑和克霉唑对 TXB<sub>2</sub> 生成的抑制作用比阿司匹林强(Fig 2). 各浓度点都有显著差异(P<0.01).

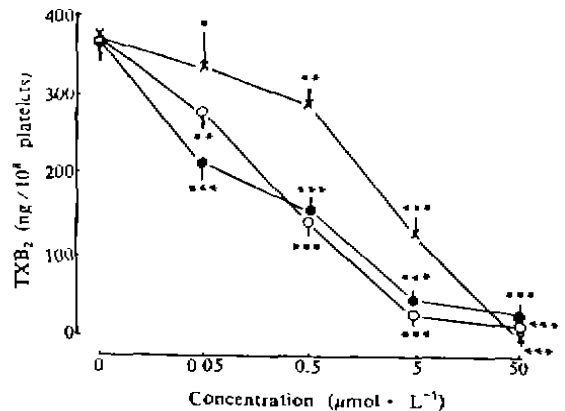


Fig 2. Inhibitory effects of econazole, clotrimazole and aspirin on TXB<sub>2</sub> biosynthesis from exogenous arachidonic acid in washing rabbit platelets *in vitro*. n=3-5,  $\bar{x} \pm SD$ , \*P>0.05, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.01 vs control. (○) Econazole; (●) Clotrimazole; (×) Aspirin.

药物对 AA 诱导的洗涤兔血小板 PGE<sub>2</sub> 生成的影响 阿司匹林对 AA 诱导的洗涤兔血

小板 PGE<sub>2</sub> 生成的抑制作用与对 TXB<sub>2</sub> 生成的抑制作用非常相似, 也是在 0.5–50 μmol · L<sup>-1</sup> 的浓度下, 才能显著抑制 PGE<sub>2</sub> 的生成, 而且剂量效应相关. 与阿司匹林不同, 益康唑和克霉唑在浓度为 0.05–5 μmol · L<sup>-1</sup> 时, 反而能增加 PGE<sub>2</sub> 的生成量, 并且其增加的程度与药物的剂量呈正相关. 但当浓度增加为 50 μmol · L<sup>-1</sup> 时, 益康唑和克霉唑则可使兔血小板 PGE<sub>2</sub> 的生成量分别降为 5 μmol · L<sup>-1</sup> 组的 11% 及 37%, 减少非常显著.

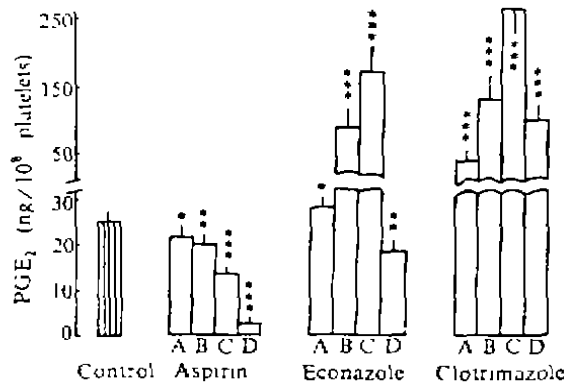


Fig 3. Effects of econazole, clotrimazole and aspirin on PGE<sub>2</sub> biosynthesis from exogenous arachidonic acid in washing rabbit platelets *in vitro*. The drugs were used at the concentration of (A) 0.05 μmol · L<sup>-1</sup>, (B) 0.5 μmol · L<sup>-1</sup>, (C) 5 μmol · L<sup>-1</sup>, (D) 50 μmol · L<sup>-1</sup>. n=4–5,  $\bar{x} \pm SD$ , \*P>0.05, \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.01 vs control.

DISCUSSION

我们在以往工作的基础上, 又再一步观察了益康唑和克霉唑对大鼠中性白细胞经环氧酶代谢内源性 AA 的影响. 实验中采用 A-23187 刺激细胞膜磷脂释放 AA, 结果表明两药在 0.1–100 μmol · L<sup>-1</sup> 的浓度下都能以剂量依赖性抑制 TXB<sub>2</sub> 生成, 而对 PGE<sub>2</sub> 生成的影响则是在 0.1–1 μmol · L<sup>-1</sup> 的低浓度下有增高趋势, 在 10–100 μmol · L<sup>-1</sup> 的高浓度有显著的抑制作用, 表明两者在高浓度时对环氧酶

或磷脂酶确有抑制作用.

选择性抑制 TXA<sub>2</sub> 合成酶, 可使前列腺素内过氧化物堆积并转向合成 PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> 等, 因而使两者的生成量增加. 而抑制环氧酶则不仅能使 TXB<sub>2</sub> 的生成量降低, 而且能使 PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> 等的生成量也降低. 为了搞清益康唑和克霉唑对环氧酶有无抑制作用, 我们又观察了两药对洗涤兔血小板代谢外源性 AA 生成 TXB<sub>2</sub> 和 PGE<sub>2</sub> 的影响. 结果益康唑和克霉唑在 0.05–5 μmol · L<sup>-1</sup> 时能抑制 TXB<sub>2</sub> 的生成, 增加 PGE<sub>2</sub> 的生成量, 表明两药在此低浓度下能选择性抑制 TXA<sub>2</sub> 合成酶. 而在 50 μmol · L<sup>-1</sup> 时益康唑和克霉唑分别能使 PGE<sub>2</sub> 的生成量降为 5 μmol · L<sup>-1</sup> 组的 11% 及 37%, 是两药抑制 TXA<sub>2</sub> 合成酶增加 PGE<sub>2</sub> 的生成量和抑制环氧酶降低 PGE<sub>2</sub> 生成量两方面作用综合的结果. 上述事实证明益康唑和克霉唑在低浓度时能选择性抑制 TXA<sub>2</sub> 合成酶, 而高浓度时在抑制 TXA<sub>2</sub> 合成酶的同时, 还能抑制环氧酶的活性.

REFERENCES

- 1 Tolman EL, Fuller BL. Inhibition of thromboxane synthesis in guinea pig lung and human platelets by clotrimazole and other imidazole antifungals. *Biochem Pharmacol* 1983; 32 : 3488
- 2 Gordon D, Nouri AME, Thomas RU. Selective inhibition of thromboxane biosynthesis in human blood mononuclear cells and the effects on mitogen-stimulated lymphocyte proliferation. *Br J Pharmacol* 1981; 74 : 469
- 3 Beetsens JR, Loots W, Smoers Y, Coene MC, De Clerck F. Ketoconazole inhibits the biosynthesis of leukotrienes *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 1986; 35 : 883
- 4 Shinsuke I, Shigeo M, Osamu W. Miconazole inhibition of platelet aggregation by inhibiting cyclooxygenase. *Biochem Pharmacol* 1986; 35 : 1787
- 5 Jiang YY, Long K, Chen XS. Effects of econazole and clotrimazole on platelet aggregation

and TXB<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> production in platelets. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1990; 4 : 278

6 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

7 Wang Z, Zhu GQ, Huang RS, An Y, Cheng

JX, Liu JS. Radioimmunoassay for thromboxane B<sub>2</sub>. *Acta Acad Med Sin* 1986; 8 : 139

8 Cheng JX, Duan JH, Han FY, Ge L, Wang ZG, Shi YQ. Radioimmunoassay for prostaglandin E<sub>2</sub>. *Acta Acad Med Sin* 1987; 9 : 229

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 Mar; 12 (2) : 280-284

## 18β-甘草次酸钠对大鼠嗜中性白细胞活性氧生成及细胞内游离 Ca<sup>2+</sup>浓度的影响

吴勇杰、李新芳 (兰州医学院药理学教研室, 兰州 730000, 中国)

Effects of sodium 18β-glycyrrhetic acid on the production of active oxygen species and the concentration of intracellular free Ca<sup>2+</sup> in rat neutrophils

WU Yong-Jie, LI Xin-Fang  
(Department of Pharmacology, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000, China)

**ABSTRACT** The effects of sodium 18β-glycyrrhetic acid (SGA) on the production of active oxygen species (AOS) and the concentration of intracellular free Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in the rat neutrophils were studied by the methods of luminoldependent chemiluminescence and calcium indicator Fura-2 loading. The results showed that SGA 0.8-12.7 μmol · L<sup>-1</sup> selectively inhibited calcium inophore A-23187-stimulated AOS production with IC<sub>50</sub> 1.4 μmol · L<sup>-1</sup>; while SGA 25.4-203 μmol · L<sup>-1</sup> stimulated neutrophils to generate AOS and potentiated the action of chemotactic peptide f-MLP on inducing AOS production. SGA 25.4-203 or 6.3-50.7 μmol · L<sup>-1</sup> depressed the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise in neutrophils stimulated by A-23187 or f-MLP; in the contrast, verapamil or diltiazem has higher effective concentration more than 100 or 200 μmol · L<sup>-1</sup> to f-MLP and left [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise induced by A-23187 unaffected. SGA 101.5-203 μmol · L<sup>-1</sup> also caused [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise in

neutrophils. The result analysis indicate that the effect of SGA on AOS production has no relationship with its regulation to [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in neutrophils.

**KEY WORDS** glycyrrhetic acid; neutrophils; oxygen; calcium

**摘要** 18β-甘草次酸钠(SGA) 0.8-12.7 μmol · L<sup>-1</sup> 选择性地抑制 A-23187 诱导的 Neu 活性氧生成; 25.4-203 μmol · L<sup>-1</sup> 刺激 Neu 生成活性氧, 并增强 f-MLP 的活性氧生成作用. SGA 25.4-203 或 6.3-50.7 μmol · L<sup>-1</sup> 抑制 A-23187 或 f-MLP 诱导的 Neu [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 增加, 101.5 μmol · L<sup>-1</sup> 以上也有升高 Neu[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的作用.

**关键词** 甘草次酸; 嗜中性白细胞; 氧; 钙

18β-甘草次酸钠(sodium 18β-glycyrrhetic acid, SGA)是甘草甜素水解产物甘草次酸(glycyrrhetic acid)光学异构体的钠盐, 有抗炎、抑制炎症组织前列腺素 PGE<sub>2</sub> 生成和拮抗炎症介质活性的作用<sup>(1,2)</sup>. 近年的研究表明, 白细胞在受刺激时释放的活性氧也和急性炎症密切相关<sup>(3,4)</sup>. 为进一步阐明 SGA 的作用机制, 本文探讨了其对大鼠嗜中性白细胞(Neu)活性氧生成及对 Neu 细胞内游离 Ca<sup>2+</sup>浓度[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响.

Received 1989 Dec 6

Accepted 1990 Oct 15