

Marchlinski FE, Buxton AE. Limited role of intravenous propafenone hydrochloride in the treatment of sustained ventricular tachycardia, electrophysiologic effects and results of programmed ventricular stimulation *J Am Coll Cardiol* 1984; 4 : 378-81.

12 Klein RC, Huang SK, Marcus FI, Horwitz L, Fenster PE, Rushforth N, *et al.* Enhanced antiarrhythmic efficacy of propafenone when used in combination with procainamide or quinidine. *Am Heart J* 1987, 114 : 551-8.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Jul; 13 (4) : 367-370

367-370

酮替芬对人血中性粒细胞呼吸爆发和细胞内游离钙离子的影响¹

辛小华、卞如濂 (浙江医科大学药理教研室, 杭州 310006, 中国)

Effects of ketotifen on human neutrophil respiratory burst and intracellular free calcium

XIN Xiao-Hua, BIAN Ru-Lian
(Department of Pharmacology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT The stimulatory effect of FMLP $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, OAG $25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and calcimycin $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ on luminol-dependent chemiluminescence (CL) was observed in human neutrophils (Neu). The rest level of Neu intracellular free calcium ($[\text{Ca}]_i$) measured by Ca^{2+} -sensitive probe Quin 2/AM was calculated to be $200 \pm 19 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. By the addition of FMLP $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ or calcimycin $0.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the peak $[\text{Ca}]_i$ increased to $769 \pm 104 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $953 \pm 53 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Ketotifen ($50\text{--}300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) inhibited Neu CL in a dose-dependent manner with activator FMLP. Inhibition was also seen when Neu CL was activated by calcimycin and OAG, respectively. However, ketotifen did not inhibit Neu $[\text{Ca}]_i$ increment activated by FMLP and calcimycin.

KEY WORDS ketotifen; neutrophils; luminescence; luminol; calcium; calcimycin; *N*-formylmethionine leucyl-phenylalanine

提要 以鲁米诺为化学发光剂测定人血中性粒细胞 (Neu)呼吸爆发能力表明, FMLP, calcimycin 和

OAG 激活 Neu 形成化学发光。Quin 2 为荧光探针测得 FMLP 和 calcimycin 攻击 Neu 引起细胞内 $[\text{Ca}]_i$ 升高分别达 $769 \pm 104 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $953 \pm 53 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Ket 抑制 FMLP 激活的 Neu 化学发光呈剂量依赖性。Ket 对 calcimycin 和 OAG 激活的 Neu 化学发光也有明显的抑制作用。但 Ket 不抑制 FMLP, calcimycin 攻击的 $[\text{Ca}]_i$ 升高。

关键词 酮替芬; 中性粒细胞; 发光; 鲁米诺; 钙; 卡西霉素; *N*-甲酰甲硫氨酸亮氨酸基苯丙氨酸

酮替芬(ketotifen, Ket)是预防过敏性哮喘发作的有效药物⁽¹⁾。但关于 Ket 的作用机制目前尚未完全明确。中性粒细胞(neutrophil, Neu)的激活与气道高反应性密切相关⁽²⁻⁴⁾。本实验取人外周血 Neu 为研究对象, 观察 Ket 对 Neu 激活剂 FMLP, OAG 和 calcimycin 激活的呼吸爆发和胞浆内游离钙离子 $[\text{Ca}]_i$ 的作用, 探索 Ket 的抗过敏作用机制。

MATERIALS AND METHODS

FMLP (*N*-formylmethionine leucyl-phenylalanine), calcimycin (Ca^{2+} ionophore), OAG (1,2-oleoyl-acetyl-glycerol), Quin 2/AM 均系美国 Sigma 产品, 鲁米诺 (luminol, 德国 Merck-Schuchardt 药厂), 右旋糖酐(dextran T-500, 瑞典 Pharmacia), HEPES(德国 Merck), Hypaque-Ficoll 白细胞分离液(sp gr = 1.077 ± 0.002 , 中科院上海细胞所), 牛血清白蛋白(BSA, 中科院上海生化所), 酮替芬(上海第十六制药厂), 液闪仪(美国 PACKARD

Received 1990 Oct 29

Accepted 1991 Dec 6

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, № 3861201

MINAXI-4430)、荧光分光光度计(日本 Hitachi MPF-4)。

人外周血 Neu 的分离⁽⁵⁾ 取健康献血员新鲜静脉血 50 ml, 置于预先经过硅化的容器内, 用肝素(20 IU/ml)抗凝。加入 5% 右旋糖酐(血与右旋糖酐容量比为 5:1), 轻轻混匀后, 室温下静置 30 min。小心吸取富含白细胞的上清液, 在含 3 ml Hypaque-Ficoll 白细胞分离液的硅化试管中叠加 6 ml 上清液, 800 × g 离心 15 min。吸去血清层、淋巴细胞和单核细胞层, 吸出白细胞分离液层, 剩余的底层即为富含 Neu 的细胞团。加入适量的双蒸水破除污染的红细胞, 再用适量的 Hanks'液(Hanks' balanced salt solution)洗 2 次。将分离所得的 Neu 悬于含 0.5% BSA 的 Hanks'液中, 部分实验要求 Neu 悬于无 Ca²⁺ 的 Hanks'液中, 则在 Hanks'液配方中去 CaCl₂, 加入 EGTA 2 mmol · L⁻¹。Neu 用 Wright 染色检查纯度 >95%, 台盼蓝检查活性 >95%。

人血 Neu 呼吸爆发(respiratory burst)的检测⁽⁶⁾

以鲁米诺为发光剂用液闪计测量 dpm 来检测 Neu 受激活剂激活后的化学发光(chemiluminescence, CL)表示 Neu 被激活的呼吸爆发能力。

分离所得的 Neu 用含或无 Ca²⁺ 的 Hanks'液混悬成 2 × 10⁶–2.5 × 10⁶ cells/ml。取约 2 × 10⁶ Neu 于 20 ml 液闪管中, 先置于 37℃ 水浴 6 min 再加入鲁米诺(终浓度 2 nmol · L⁻¹)和相应的 Neu 激活剂, 立即进行 CL 测定。加药组 Ket 在温育开始 3 min 时加入。反应液终容量为 1 ml。不加 Neu 激活剂时, 本底值不大于 1500 dpm。FMLP 激活的 Neu CL 每隔 30 s 进行计数。由于 FMLP 激活的 Neu CL 在第一峰值出现后又出现第二次上升过程, 每个样本观察时间不少于 7 min。Calcimycin 和 OAG 激活的 Neu CL 每隔 1 min 进行计数, 直至高峰期。

人血 Neu [Ca]_i 的测定⁽⁷⁾ 分离所得 Neu 用 Hanks'液(不含 BSA)悬成 5 × 10⁷ cells/ml。37℃ 水浴 5 min 后加入 Quin 2/AM 30 μmol · L⁻¹, 继续温育 10 min, 然后用含 0.5% BSA 的 37℃ Hanks'液稀释至 1 × 10⁷ cells/ml, 再温育 40 min。洗去胞外 Quin 2/AM, 重新悬于 Hanks'液中成 2 × 10⁷ cells/ml。台盼蓝检查活性 >90%。

取上述 Quin 2 负荷的细胞悬液 0.5 ml 置于 37℃ 的微量测定杯中, 静置 5 min 后加入相应的攻击剂立即进行荧光测定。加药组 Ket 预先与细胞悬液在 37℃ 作用 5 min 后再加入攻击剂, 立即进行荧光测定。激发波长 339 nm, 激发狭缝 3 nm, 发射波长 492

nm, 发射狭缝 15 nm。计算 [Ca]_i = K_d(I - 0.16 I_{tot}) / (I_{tot} - I), 其中 K_d = 115 nmol · L⁻¹, I = L - L_{min}, I_{tot} = L_{max} - L_{min}, L 为 Neu 在静息或不同攻击剂攻击后的荧光强度, L_{max}, L_{min} 分别为加入洋地黄皂甙和 MnCl₂ 后的荧光强度。

RESULTS

FMLP、calcimycin 和 OAG 激活人血 Neu 形成 CL 及 Ket 的作用

1 Ket 对 FMLP 激活的 Neu CL 的抑制作用 FMLP 5 nmol · L⁻¹ 激活的 Neu CL 在 1.5 min 出现第一峰值, 缓慢下降后, 在 4 min 时又出现第二次上升, 其上升速率较第一次慢, 观察 7 min 时仍呈上升趋势。Ket 50, 100, 200 和 300 μmol · L⁻¹ 呈剂量依赖性抑制 FMLP 激活的 Neu CL 第一峰(线性相关系数 r = 0.97)。Ket 100 和 200 μmol · L⁻¹ 对 FMLP 激活的 Neu CL 有抑制作用(F = 350.1, P < 0.01)(Fig 1)。

2 Calcimycin 10 nmol · L⁻¹ 激活的 Neu CL 是一缓慢过程, 其高峰 dpm 在 13 min 时出现。结果表明 Ket 100 和 200 μmol · L⁻¹ 可抑制 calcimycin 激活的 Neu CL (F = 286.2, P < 0.01)(Fig 1)。

3 OAG 25 nmol · L⁻¹ 激活 Neu 形成 CL 在 14 min 时达峰值。Ket 100 μmol · L⁻¹ 明显抑制 OAG 激活的 Neu CL (F = 797.2, P < 0.01)(Fig 1)。

4 Neu 悬于无 Ca²⁺ Hanks'液中受激活剂激活的 CL Calcimycin 和 OAG 在无 Ca²⁺ Hanks'液中均不能激活 Neu 形成 CL。FMLP 虽能在无 Ca²⁺ Hanks'液中激活 Neu 形成 CL, 而且在 1–1.5 min 时出现一个峰值, 但其数值 < 2000 dpm。

FMLP 和 calcimycin 攻击人血 Neu 的 [Ca]_i 变化及 Ket 的作用 Neu 静息 [Ca]_i 为 200 ± 19 nmol · L⁻¹, 加入 FMLP 0.1 nmol · L⁻¹ 后约 30 s 即上升达峰值 769 ± 104 nmol · L⁻¹, 维持 1 min 左右后下降。Calcimycin

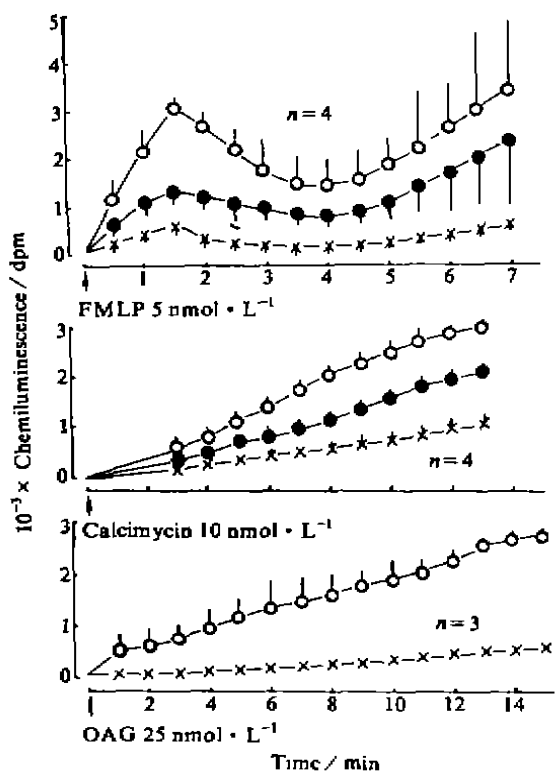


Fig 1. Luminol-dependent neutrophil chemiluminescence after activation with *N*-formylmethionine leucyl-phenylalanine (FMLP), calcimycin, and 1,2-oleoyl-acetyl-glycerol (OAG). Neutrophils were exposed to ketotifen 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (●), 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (×) or diluent without drug (○), $\bar{x} \pm s$.

0.5 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引起 Neu $[\text{Ca}]_i$ 升高经 2 min 达峰值 $953 \pm 53 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 维持约 2 min 后下降. 见 Fig 2.

加 Ket 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, FMLP 和 calcimycin 攻击的 Neu $[\text{Ca}]_i$ 分别为 $577 \pm 61 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $839 \pm 147 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 结果表明 Ket 对 FMLP 和 calcimycin 攻击的 Neu $[\text{Ca}]_i$ 升高无抑制作用 ($P > 0.05$, $n = 4$).

DISCUSSION

Neu 激活后产生的呼吸爆发伴有 O_2 形

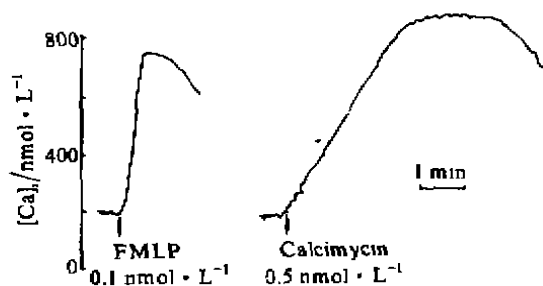


Fig 2. Intracellular free calcium of neutrophil stimulated by *N*-formylmethionine leucyl-phenylalanine (FMLP) or calcimycin. (a typical experiment)

成⁽⁸⁾. O_2^- 可诱发形成某些炎症介质, 如补体、趋化因子、组胺和花生四烯酸代谢产物等, 对某些炎症介质, 如 LTB_4 , LTD_4 , PG 和 α -抗胰蛋白酶等则具灭活作用⁽⁹⁾. O_2^- 与 luminol 反应生成氨基邻苯阴离子, 此阴离子跃迁到基态时释放出的光子对自然 CL 起放大作用⁽¹⁰⁾. 因此, 观察 Ket 对 Neu CL 的作用, 有助于探讨 Ket 的抗过敏作用机制. 普遍认为 FMLP 和 calcimycin 通过 Ca^{2+} 信号系统和 DAG 信号系统两条途径激活 Neu, 而 OAG 不升高 Neu $[\text{Ca}]_i$, OAG 激活 Neu 只通过 DAG 信号系统途径⁽⁸⁾. 本实验结果表明, 在无 Ca^{2+} 介质中 OAG 和 calcimycin 均不能激活 Neu 形成 CL, FMLP 激活 Neu 能力大大降低, 说明生理浓度的胞外 Ca^{2+} 为 Neu 形成 CL 所必需. FMLP 激活的 Neu CL 第一上升峰被认为是 $[\text{Ca}]_i$ 介导的过程, 第二次 CL 上升与 DAG 信号系统激活有关⁽¹¹⁾. 分析 FMLP 和 calcimycin 攻击的 Neu CL 与其 $[\text{Ca}]_i$ 变化之间的关系, 发现 Neu CL 与 $[\text{Ca}]_i$ 升高存在时相上的差异. Ket 呈剂量依赖性抑制 FMLP 攻击的 Neu CL, Ket 对 calcimycin 和 OAG 攻击的 Neu CL 也有明显的抑制作用, 而 Ket 不影响 FMLP, calcimycin 攻击的 Neu $[\text{Ca}]_i$, 说明 Ket 通过抑制 Ca^{2+} 信号系统途径和 DAG 信号系统途径抑制 Neu 的激活, 但 Ket 对攻击剂攻击的 Neu $[\text{Ca}]_i$ 升高环节没有

抑制作用。Ket 是否对 Neu 蛋白激酶 C (PKC) 有直接抑制作用有待研究。

REFERENCES

- Martin U, Romer D. The pharmacological properties of a new, orally active antianaphylactic compound; ketotifen, a benzocycloheptathiophene. *Arzneimittel-forschung* 1978; **28**: 770-82.
- Neijens HJ, Raatgeep RE, Degenhart HJ, Duijverman EJ, Kerrebijn KF. Altered leukocyte response in relation to the basic abnormality in children with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1984; **130**: 744-7.
- Marsh WR, Irvin CG, Murphy KR, Behrens BL, Larsen GL. Increases in airway reactivity to histamine and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage after the late asthmatic response in an animal model. *Am Rev Respir Dis* 1985; **131**: 875-9.
- Nagy L, Lee TH, Kay AB. Neutrophil chemotactic activity in antigen induced late asthmatic reactions. *N Engl J Med* 1982; **306**: 497-501.
- Boyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol* 1976. Suppl 5: 9-15.
- Rest RF, Farrell CF, Nields FL. Mannose inhibits the human neutrophil oxidative burst. *J Leukocyte Biol* 1988; **43**: 158-64.
- Tsien RY, Pozzan T, Rink TJ. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* 1982; **94**: 325-34.
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973; **52**: 741-4.
- Rossi F. The O_2^- -forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanism of activation and function. *Biochim Biophys Acta* 1986; **853**: 65-89.
- DeChatelet LR, Long GD, Shirley PS, Bass DA, Thomas MJ, Henderson FW, et al. Mechanism of the luminol-dependent chemiluminescence of human neutrophils. *J Immunol* 1982; **129**: 1589-93.
- Rasmussen H. The calcium messenger system. *N Engl J Med* 1986; **314**: 1164-70.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Jul; 13 (4): 370-374

370-374

甘草酸差向异构体对大鼠肝损害的治疗作用

吴锡铭、吕坚、李冰如、张本根、茹仁萍 (杭州市第六人民医院临床药理室, 杭州 310014, 中国)

Therapeutic effects of epimeric glycyrrhizic acids on hepatic injury in rats

WU Xi-Min, LU Jian, LI Bing-Ru, ZHANG Ben-Gen, RU Ren-Ping
(Department of Clinical Pharmacology, Hangzhou Sixth Hospital, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT The effects of the epimeric glycyrrhizic acids (GA), 18 α -form and 18 β -form, on D-galactosamine (Gal)-induced acute liver injury and fulminating hepatic failure (FHF) in rats were studied. In rats of acute liver injury, extensive liver parenchymal cell damage was observed by the elevation of alanine aminotransferase (ALT) activity and confirmed by significant histopathological changes 24 and 48 h after

ip Gal 450 mg · kg⁻¹. Moreover, marked elevation in the liver putrescine levels occurred along with that of serum ALT. The spermidine and spermine levels did not alter significantly. GA 18 α -form 300 mg · kg⁻¹ ip suppressed the elevation of serum ALT and liver putrescine levels, and improved all the histopathologic features. On the other hand, GA 18 β -form 300 mg · kg⁻¹, which exhibited inhibitory effects 24 h after ip Gal, showed no action 48 h after ip Gal. The ALT levels in the serum from GA 18 α -form, 18 β -form, vs control groups after 24 h were 70 ± 24 (P < 0.01) and 78 ± 42 (P < 0.01) vs 155 ± 57, and after 48 h were 74 ± 25 (P < 0.01) and 258 ± 99 (P > 0.05) vs 293 ± 110. The putrescine contents (nmol · g⁻¹) in the liver from GA 18 α -form, 18 β -form, vs control after 24 h were 34 ± 9 (P < 0.01) and 51 ± 12 (P < 0.01) vs 139 ± 29, and after 48 h were 16 ± 3 (P < 0.01) and 150 ± 11 (P > 0.05) vs 156 ± 23.

Received 1990 May 10

Accepted 1992 Jan 24