

粉防己碱的抗炎作用与磷脂酶 A₂的关系¹

何华美, 李新芳, 张敏 (第三军医大学药理教研室, 重庆630038, 中国)

R965.2

Relationship between effect of tetrandrine on pleurisy and phospholipase A₂HE Hua-Mei, LI Xin-Fang, ZHANG Min
(Department of Pharmacology, Third Military Medical College, Chongqing 630038, China)

ABSTRACT A model of pleurisy was established with an intrapleural injection of carrageenan (Car, 10 mg·kg⁻¹) in rats to explore the anti-inflammatory action of tetrandrine (Tet) and its mechanism. After the injection of Car, the exudate, protein and neutrophils appeared in the pleural cavity of rats at 2 h, then increased progressively, and reached a peak level at 12 h and remained high up to 48 h. The phospholipase A₂ (PLA₂) activity of neutrophils (Neu-PLA₂) and of the acellular component (ACC-PLA₂) in the pleural exudate intensified at 2 h, rose to maximal intensity at 8 h, and started to decline at 48 h. The changes of the amount of exudate, protein content and neutrophil count, and parameters indicating the inflammatory response, were closely related to that of the PLA₂ activity ($r=0.749-0.928$, $P<0.05$ or 0.01). By ig gavage of Tet (10-80 mg·kg⁻¹) to rats at 30 min before and 4 h after the injection of Car, the inflammatory parameters were reduced and the PLA₂ activity was inhibited, dose-dependently. The reductions of the inflammatory parameters were significantly associated with the inhibition of the PLA₂ activity ($r=0.928-0.993$, $P<0.05$ or 0.01).

These results indicate that Tet has a fine anti-inflammatory action and its mechanism may involve the inhibition on the activation and release of PLA₂ of inflammatory cells.

KEY WORDS tetrandrine; carrageenan; pleural effusion; neutrophils; phospholipases A

摘要 为探讨 Tet 的抗炎作用及机制, 在大鼠胸膜腔内注射 Car 复制胸膜炎。注射后 2-48 h, Neu-和 ACC-PLA₂ 活性明显增强, 胸膜渗出液量、蛋白质渗出量和白细胞游出数随之增加。Tet 剂量依赖性地抑制上述各指标的变化, 且 Tet 引起的 PLA₂ 活性的降低与炎症指标的减少密切相关。提示 Tet 有良好抗炎作用, 其机制可能涉及抑制 PLA₂ 激活和释放。

关键词 粉防己碱; 角叉菜; 胸膜积液; 嗜中性白细胞; 磷脂酶 A 类

抗炎作用

粉防己碱(tetrandrine, Tet)主要存在于粉防己的根中, 为双苄基异喹啉衍生物, 具有广泛的抗炎抗过敏作用^[1]。全身性和局部炎症时, 磷脂酶 A₂(phospholipase A₂, PLA₂)的合成和分泌增多, 细胞外 PLA₂活性明显升高^[2,3]。PLA₂既是细胞合成释放前列腺素、白三烯、血小板活化因子、氧自由基、溶血磷脂等炎症介质的关键酶, 又是一种重要的炎症介质, 可引起动物多种实验性炎症反应^[4,5]。然而, Tet 对 PLA₂有无影响, 其抗炎作用与 PLA₂的关系怎样, 未见文献报道。本文用角叉菜胶致大鼠胸膜炎模型, 探讨此问题。

MATERIALS AND METHODS

药品 Tet (浙江金华制药厂), 地塞米松(dexam-

Received 1992-12-05

Accepted 1994-04-15

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 38970906.

ethasone, Dex, 重庆第六制药厂, 批号911204), 角叉菜胶(carrageenan, Car)和 edetic acid 为 Sigma 产品, 脱氧胆酸钠为 Serva 产品, 卵磷脂为上海禽蛋三厂生化试剂。

动物模型 体重 186 ± 27 g, δ , Wistar 大鼠146只, 随机分为生理盐水(NS)对照组(36只)、Car 致炎对照组(60只)和药物处理组(Tet 10, 20, 40, 80 mg·kg⁻¹及 Dex 0.15 mg·kg⁻¹各一组, 每组10只)。各组大鼠经乙醚轻度麻醉后向右胸膜腔内注入0.5% Car 2 ml·kg⁻¹或等容量 NS。

给药方法 致炎前30 min 和致炎后4 h, 各鼠 ig 相应药物(10 ml·kg⁻¹, 用5%葡萄糖盐水配制)或等容量5%葡萄糖盐水。

指标测定 NS 对照组和 Car 致炎组大鼠分别于胸腔内注射 NS 和 Car 后2, 4, 8, 12, 24, 48 h 脱颈椎处死, 各药物处理组于胸腔内注射 Car 后8 h 处死。用玻璃吸管将胸腔内全部渗出液吸出计量, 并测定下述指标。

1 **白细胞数** 渗出液按试管稀释法在光学显微镜下计数白细胞总数, 瑞氏染色法行白细胞分类计数。

2 **蛋白质量** 渗出液离心, 取上清, 按比色法^[6]测定蛋白质含量。

3 **细胞外 PLA₂ 活性** 渗出液离心得上清按1:4加组织稀释液, 60 °C 水浴30 min, 用酸滴定法^[7]测定 PLA₂ 活性。

4 **中性白细胞 PLA₂ 活性** 渗出液离心得沉淀白细胞分别用 Tris-HCl 缓冲液和 Hanks 液各洗涤一次, 然后 trypan blue 检查白细胞活力。中性白细胞比例 >95%, 活细胞比例 >97% 者, 用 Hanks 液调整细胞数至 $5 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 按1:4加组织稀释液, 超声破碎至镜检无细胞形态, 60 °C 水浴30 min, 测定 PLA₂ 活性。

统计处理 实验数据采用统计程序“PDA-2”, “PDA-3”及“MRA-1”进行单因素方差分析和线性回归处理, 同时作相关分析和相关系数检验。

RESULTS

胸膜炎48 h 内的炎症指标 Car 致炎后2 h 胸膜腔内已有少量渗出, 以后随时间推移, 渗出液量、蛋白渗出量、白细胞游出数逐渐增加, 至12 h 达峰值, 24 h 后呈下降趋势。Car 组除致炎后2 h 白细胞游出数与 NS 对照组无差别($P > 0.05$)外, 其它各时相点上述三项指标均较 NS 对照组为高($P < 0.01$) (Tab 1)。

Tab 1. Carrageenan-induced pleural effusion in rats. ¹n=6; ²n=10. $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ¹ $P < 0.01$ vs normal saline (NS) control. ¹ $P < 0.01$ vs 2, 4 h group; ² $P < 0.05$, ¹ $P < 0.01$ vs 8 h group; ¹ $P > 0.05$ vs 12 h group; ² $P > 0.05$ vs 24 h group; ² $P > 0.05$, ¹ $P < 0.05$ vs 48 h group.

Pleural effusion		Time after intrapleural injection of carrageenan 10 mg·kg ⁻¹					
		2 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
Exudate amount /ml	NS ¹	0.32±0.15	0.27±0.16	0.20±0.09	0.17±0.08	0.17±0.08	0.13±0.05
	Car ²	0.61±0.12 ^c	1.3±0.5 ^c	2.1±0.4 ^c	3.1±0.5 ^{cdmq}	3.3±0.3 ^c	2.5±0.5 ^c
Protein content /g·L ⁻¹	NS ¹	8.8±2.0	12.6±2.5	8.1±2.8	10.4±1.4	9.0±1.0	7.3±0.6
	Car ²	74±12 ^c	88±24 ^c	92±26 ^c	109±18 ^{cdmq}	98±11 ^c	96±29 ^c
Neutrophil count /×10 ⁹ ·L ⁻¹	NS ¹	8.6±2.4	14.9±1.8	14±4	16±5	10.0±2.1	8.4±1.8
	Car ²	7.8±1.8 ^a	36±13 ^c	50±17 ^c	74±18 ^{cdmq}	74±25 ^c	82±18 ^c
Neutrophil-PLA ₂ /μmol HCl·s ⁻¹ ·L ⁻¹	NS ¹	0.73±0.18	0.70±0.25	0.73±0.20	0.66±0.13	0.82±0.22	0.71±0.09
	Car ²	1.01±0.13 ^c	1.49±0.21 ^c	2.39±0.24 ^{cdmq}	2.25±0.26 ^c	2.24±0.26 ^c	2.08±0.26 ^c
Acellular component-PLA ₂ /μmol HCl·s ⁻¹ ·L ⁻¹	NS ¹	0.81±0.17	0.87±0.19	0.82±0.19	0.83±0.21	0.86±0.21	0.85±0.15
	Car ²	5.4±1.1 ^c	8.5±1.6 ^c	13.3±1.8 ^{cdmq}	13.1±1.9 ^c	12.7±2.1 ^c	11.7±2.0 ^c

胸膜炎48 h 内的 PLA₂活性 Car 致炎后2 h, Neu-和 ACC-PLA₂活性开始升高, 至8 h 达峰值, 并持续到24 h, 以后呈下降趋势. 相比较, Car 组各时相点 Neu-和 ACC-PLA₂活性均较 NS 对照组为高 ($P < 0.01$), ACC-PLA₂活性的最大值约为 NS 对照组的16倍, Neu-PLA₂活性的最大值约为 NS 对照组的3倍 (Tab 1).

Tet 对炎症指标和 PLA₂活性的影响 Tet 20, 40, 80 mg·kg⁻¹分别使胸膜腔渗出液量、蛋白渗出量、白细胞游出数较 Car 对照组减少 ($P < 0.01$), 并呈剂量依赖性, 相比较, Tet 抑制白细胞游出的作用较抑制体液和蛋白质渗出的作用强. Tet 各剂量组对三项炎症指标的抑制作用均较 Dex 0.15 mg·kg⁻¹的作用弱 ($P < 0.01$). Tet 10 mg·kg⁻¹对胸膜炎 Neu-和 ACC-PLA₂活性无明显作用 ($P > 0.05$); Tet 20, 40, 80 mg·kg⁻¹能降低 Neu-和 ACC-PLA₂活性 ($P < 0.01$). Tet 40, 80 mg·kg⁻¹降低 Neu-和 ACC-PLA₂活性的作用均与 Dex 0.15 mg·kg⁻¹组无显著差别 ($P > 0.05$) (Tab 2).

DISCUSSION

本实验中, Car 致胸膜炎后 Neu-和 ACC-PLA₂活性均随时间推移而逐渐升高, 二者的峰值较渗出液量、蛋白渗出量、白细胞游出数的峰值出现得早, 且随着它们的升高, 炎症反应明显加重, 提示 Car 可能通过激活 PLA₂, 从而合成释放大量炎症介质, 引起或加重炎症反应.

Tet 可明显减少炎症胸膜腔渗出液量、蛋白渗出量和白细胞游出数, 表明其有良好的抗炎作用. 同时, Tet 明显抑制 Neu-和 ACC-PLA₂活性, Tet 的这种作用与其所致的上述胸膜腔内三项指标的减少密切相关. 联系 Tet 抑制白细胞合成释放血栓素 A₂、前列腺素 E₂、白三烯 B₄ 等的作用可被外源性花生四烯酸逆转^(8,9)的事实, 我们认为通过抑制 PLA₂活性, 从而影响花生四烯酸等的释放, 减少多种炎症介质的合成, 可能是 Tet 抗炎作用的主要机制.

Tab 2. Effects of tetrandrine ig at 30 min before and 4 h after an intrapleural injection of carrageenan 10 mg·kg⁻¹ on the pleurisy at 8 h in rats. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.01$ vs normal saline (NS) control. ^a $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs carrageenan control, ^d $P > 0.05$, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ vs dexamethasone control.

Pleural effusion	NS (n=6)	Car (n=10)	Tet 10	Car+drug/mg·kg ⁻¹ (n=10)			Dex 0.15
				Tet 20	Tet 40	Tet 80	
Exudate amount /ml	0.21±0.09	2.7±0.8 ^c	2.4±0.8 ^d	2.0±0.7 ^e	1.9±0.8 ^f	1.9±0.7 ^f	0.6±0.2 ^f
Protein content /g·L ⁻¹	8.1±2.8	94±24 ^c	85±7 ^d	86±10 ^d	80±7 ^e	83±6 ^e	64±24 ^f
Neutrophil count /×10 ⁶ ·L ⁻¹	14±4	61±8 ^c	45±8 ^e	36±6 ^{de}	30±8 ^h	25±4 ^f	34±7 ^f
Neutrophil-PLA ₂ /μmol HCl·s ⁻¹ ·L ⁻¹	0.73±0.20	1.74±0.14 ^c	1.68±0.13 ^d	1.35±0.09 ^{de}	1.23±0.14 ^e	1.18±0.11 ^e	1.20±0.16 ^f
Acellular component-PLA ₂ /μmol HCl·s ⁻¹ ·L ⁻¹	0.82±0.20	15.6±1.5 ^c	15.1±1.1 ^d	13.3±1.2 ^d	11.3±1.2 ^{de}	10.8±1.2 ^{de}	11.5±1.6 ^f

本文观察到, Tet 与 Dex 对 PLA₂活性的抑制作用无显著差别时, Tet 的抗炎作用比 Dex 弱, 表明二者的抗炎作用除涉及 PLA₂活性外, 还与其它因素有关.

REFERENCES

- 1 Zhang HQ, Bian RL. Anti-SRS-A effect of tetrandrine. *Acta Pharm Sin* 1984; **19**: 616-8.
- 2 Vadas P, Pruzanski W. Biology of disease: role of secretory phospholipases A₂ in the pathobiology of disease. *Lab Invest* 1986; **55**: 391-404.
- 3 Kaiser E, Chiba P, Zaky K. Phospholipases in biology and medicine. *Clin Biochem* 1990; **23**: 349-70.
- 4 Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A₂— a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunologytoday* 1991; **12**: 143-6.
- 5 Vadas P, Wasi S, Movat HZ, Hay JB. Extracellular phospholipase A₂ mediates inflammatory hyperaemia. *Nature* 1981; **293**: 583-5.
- 6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265-75.
- 7 Chen SF, Wu ZL. A rapid and convenient method of phospholipases A₂ determination in the tissue and body fluid. *Acad J Sec Mil Med Univ* 1989; **10**: 354-6.
- 8 Du ZY, Huang YH, Ou-Yang Y. Effects of tetrandrine on the metabolism of arachidonic acid in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Acta Acad Med Mil Ter* 1990; **12**: 291-4.
- 9 Teh BS, Seow WK, Li SY, Thong YH. Inhibition of prostaglandin and leukotriene generation by the plant alkaloids tetrandrine and berbamine. *Int J Immunopharmacol* 1990; **12**: 321-6.

《中国药理学报》欢迎订阅

《中国药理学报》是中国药理学会主办的高级学术期刊。荣获国家优秀学术期刊一等奖。内容主要为药理学及其邻近学科基础或临床创新的研究原著。双月刊, 国内外公开发行人。国内统一刊号 CN 31-1347, 邮发代号4-295, 定价¥8.10元。国际统一刊号 ISSN 0253-9756, Code number BM-388. 欢迎订阅。国内订购单位: 全国各地邮电局。国外订购单位: 北京市399信箱, 中国国际图书贸易总公司。(China International Book Trading Corporation, P O Box 399, Beijing, China).