

蛋白激酶 C 激活剂和抑制剂对小鼠腹腔巨噬细胞 释出肿瘤坏死因子的影响¹

胡振林, 钱定华 (第二军医大学药学院中西药研究室, 上海 200433, 中国)

Effects of protein kinase C activator and inhibitor on release of tumor necrosis factor from mouse peritoneal macrophages

HU Zhen-Lin, QIAN Ding-Hua
(Research Laboratory of Natural and Synthetic Drugs, College of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT The effects of protein kinase C (PKC) activator 1-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and inhibitor 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) and quercetin were studied on release of tumor necrosis factor (TNF) from mouse peritoneal macrophages primed with *Propionibacterium acnes* (PA). The results showed that TPA (1-100 ng·ml⁻¹) and lipopolysaccharides (LPS) (1-100 ng·ml⁻¹) induced the release of TNF from PA-primed mouse peritoneal macrophages in dose- and time-dependent manners *in vitro*, and the effects of TPA and LPS were inhibited by H-7 (12.5-100 μmol·L⁻¹) or quercetin (6.25-25 μmol·L⁻¹) in a dose-dependent manner. After ip H-7 (50 mg·kg⁻¹), LPS-induced release of TNF *in vivo* decreased significantly. These results suggest that PKC may play a critical role in release of TNF from PA-primed macrophages

KEY WORDS protein kinase C; quercetin; tumor necrosis factor; macrophages; *Propionibacterium acnes*

摘要 本文研究蛋白激酶 C (PKC) 激活剂 TPA 和抑制剂 H-7, 槲皮素对痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*, PA) 启动的小鼠腹腔巨噬细胞 (macrophage, MΦ) 释出肿瘤坏死因子 (TNF) 的影响。表明 TPA 可

Received 1991-07-09

Accepted 1992-09-09

¹ Project supported by the Shanghai Natural Science Foundation, No (88) BB03403

诱导 PA 启动的 MΦ 分泌 TNF, 其作用可被 H-7 和槲皮素抑制, LPS 体外和体内诱导 TNF 的作用亦可被两者抑制, 提示 PKC 在 PA 启动的 MΦ 分泌 TNF 过程中具有关键性作用。

关键词 蛋白激酶 C; 槲皮素; 肿瘤坏死因子; 巨噬细胞; 痤疮丙酸杆菌

巨噬细胞 (MΦ) 接受启动和诱出信号后分泌的 TNF 不仅参与多种机体肿瘤防御机制, 而且是导致炎症、内毒素休克和恶液质等疾病的重要介质⁽¹⁻³⁾。因此研究 MΦ 激活的分子机制并寻找能有效调控 MΦ 分泌 TNF 的药物具有重要实际意义。

蛋白激酶 C (PKC) 在多种细胞的激活过程中有重要作用⁽⁴⁾。在 MΦ 激活过程中亦伴有胞内 PKC 活性增强^(5,6)。本文观察了已知的 PKC 激活剂佛波醇-1-O-肉豆蔻酸盐-13-乙酸盐 (TPA)⁽⁷⁾ 和选择性抑制剂 1-(5-异喹啉磺酰基)-2-甲基哌嗪 (H-7)⁽⁸⁾、槲皮素⁽⁹⁾ 对 PA 体内激活的小鼠腹腔 MΦ 分泌 TNF 的影响, 旨在探讨 PKC 在 TNF 分泌过程中的作用, 以进一步寻找能有效调控 MΦ 分泌 TNF 的药物。

MATERIALS AND METHODS

H-7, 淡黄针状结晶, mp 140-141°C, 由本室合成, 以异喹啉为原料经氯化、磺化和子胺反应得到⁽⁸⁾, 纯度 >99%, 用前溶于 RPMI-1640 培养液; 槲皮素, 黄色针状结晶, 由本室从槐花米中提取得到芦丁, 经水解, 纯化, 重结晶后得到, mp 315-316°C, 纯度 >99%, 以 Me₂SO 配成贮备液, 用前以 RPMI-1640 培养液稀释 (Me₂SO 终浓度 <0.1%); TPA 和脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 均为 Sigma 产品, PA, 针剂, 兰州生物制品研究所

产品; 放线菌素 D (dactinomycin, Dac), 粉针剂, 上海新亚制药厂产品. 培养液为 RPMI-1640 (Sigma), 每升补充 2-巯基乙醇 0.1 mmol, 青霉素 5000 IU, 链霉素 25 mg, NaHCO₃ 2 g. 结晶紫染色液, 取结晶紫 0.5 g, 40% 甲醛 8 ml, NaCl 0.17 g, 乙醇 22.3 ml, 加水至 100 ml, 混匀备用. 结晶紫提取液, 取柠檬酸三钠 897 mg, HCl (12 mol·L⁻¹) 162.5 μl, 无水乙醇 47.5 ml, 加水至 100 ml, 混匀备用.

小鼠 ICR 小鼠, -, 24.2 ± s 2.0 g, 8-12 wk. 本校动物所提供.

TNF 的体外诱生 ICR 小鼠, ip PA 0.5 ml/mouse, d 7 收集腹腔渗出细胞, 用含 10% 小牛血清的培养液调整细胞浓度为 5 × 10⁶/ml, 加 2 ml 细胞悬液于小培养瓶中 (25 ml, 细胞贴壁面积 5 cm × 3 cm), 置孵箱中 2 h, 使 MΦ 贴壁, 用培养液洗除悬浮细胞, 加入 2 ml RPMI-1640 培养液和一定量的 TNF 诱生剂 (LPS 或 TPA), 继续培养 6 h (时-效关系实验除外), 取上清, -30℃ 保存, 待测. 试验药物对 TNF 分泌的抑制作用时, 一般将药物和诱生剂同时加入.

TNF 的体内诱生 ICR 小鼠 ip PA 0.5 ml/mouse, d 7 iv LPS 1 μg/mouse, 90 min 后摘除小鼠眼球, 收集血液, 置 4℃ 2h, 使凝固, 400 × g 离心 30 min, 吸取上层血清, 置 -30℃ 保存待测.

TNF 生物活性测定 采用以 L929 细胞为靶细胞的细胞毒结晶紫染色法^[10]. L929 细胞以 5 × 10⁴/孔接种于 96 孔细胞培养板. 37℃ 培养过夜后, 加入倍比稀释的待测上清和 Dac (终浓度 1 μg·ml⁻¹), 继续培养 18 h 弃上清, 将培养板浸入结晶紫染色液中染色 20 min, 漂洗除去未被细胞结合的染料, 晾干后每孔加入 100 μl 结晶紫提取液, 于 595 nm 处测定各孔吸收率 (A). A 值为对照孔 (仅加 Dac) A 值一半处样品的稀释倍数 (即样品杀伤 50% 靶细胞时的稀释倍数) 定为样品的 TNF 单位数 (U·ml⁻¹).

RESULTS

ip PA 对小鼠腹腔 MΦ 产生 TNF 具有启动作用
7 d 前 ip PA (0.25-1 ml/mouse) 的小鼠, 其腹腔 MΦ

在体外培养时不能自发分泌 TNF, 但对诱出剂 LPS 的反应性显著增强. 当 PA 剂量为 0.5 ml/mouse 时, 以 LPS (10 μg·ml⁻¹) 攻击 2 h, MΦ 培养上清中 TNF 活性可达 24 ± 12.3 U·ml⁻¹ (n=3, P<0.05). 而未经 PA 刺激的小鼠腹腔 MΦ 对 LPS 反应性极低, 以 LPS (10 μg·ml⁻¹) 攻击 2 h 的 MΦ 培养上清中 TNF 活性仅 4.1 ± 0.9 U·ml⁻¹ (n=3).

LPS 和 TPA 诱导经 PA 启动的 MΦ 分泌 TNF 的作用 以不同浓度的 LPS 或 TPA 与经 PA 启动的 MΦ 共同孵育 6 h, 发现在 1-100 ng·ml⁻¹ 浓度范围内两者均可以剂量依赖方式诱出 TNF. 在 100 ng·ml⁻¹ 浓度, LPS 和 TPA 诱出的 TNF 单位数分别可达 95 ± 21.2 U·ml⁻¹ (n=4), 21 ± 5.8 U·ml⁻¹ (n=3).

选定 LPS 浓度为 100 ng·ml⁻¹, TPA 浓度为 10 ng·ml⁻¹ 进行时-效关系研究, 发现两者诱出 TNF 的时-效关系类似, 均为 2 h 内起效, 6 h 达峰.

PKC 抑制剂对 TNF 分泌的影响

1 H-7 和槲皮素体外抑制 LPS 或 TPA 诱导 PA 启动的 MΦ 分泌 TNF 的作用 选定 LPS 浓度为 100 ng·ml⁻¹, PMA 浓度为 10 ng·ml⁻¹, 在加入 LPS 或 TPA 的同时加入不同浓度的 H-7 (12.5-100 μmol·L⁻¹) 或槲皮素 (6.25-25 μmol·L⁻¹) 与经 PA 启动的 MΦ 共同孵育 6 h, 测上清中 TNF 活性, 发现 H-7 和槲皮素对 LPS 或 TPA 刺激的 TNF 分泌均有抑制作用, 且随浓度增大, 抑制作用增强 (Tab 1).

为排除 H-7 和槲皮素抑制 MΦ 产生 TNF 的作用为非特异性的细胞毒作用, 将 PA 启动的 MΦ 预先以药物处理 6 h, 之后洗除药物, 并以 TPA (10 ng·ml⁻¹) 攻击 2 h 观察 MΦ 是否仍具有同样的分泌 TNF 的能力. 同时进行台盼蓝染色试验, 观察 MΦ 的存活情况. 结果表明: 经 H-7 (50 μmol·L⁻¹) 或槲皮素 (12.5 μmol·L⁻¹) 预处理 6 h, 对随后的 TNF 分泌无影响. 此时的 MΦ 为拒染的存活细胞, 说明在这些浓度以下, 两种药物对 MΦ 没有非特异性的细胞毒作用. 在更高浓度下, H-7 (100 μmol·L⁻¹) 或槲皮素 (25 μmol·L⁻¹) 同 MΦ 预孵 6 h 并洗去后, 仍表现出对 TNF 分泌的抑制作用 (Tab 2). 此时可被台盼蓝染

Tab 1. Effects of 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) and quercetin on lipopolysaccharides (LPS) (100 ng · ml⁻¹) or 1-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (10 ng · ml⁻¹)-induced release of tumor necrosis factor (TNF) from *Propionibacterium acnes*-primed macrophages. $\bar{x} \pm s$ (n). n = times of experiments. *P > 0.05, **P < 0.05, *P < 0.01 vs control.**

Drug / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF activity / $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$		Inhibition / %	
	LPS	TPA	LPS	TPA
Control	115 ± 18 (6)	10.2 ± 1.8 (6)		
H-7	12.5	103 ± 8 (3)*	10.4	34.3
	25	79.2 ± 1.2 (3)**	31.3	49.0
	50	58 ± 15 (3)**	49.6	71.6
	100	23 ± 10 (3)**	80.0	90.2
Quercetin	6.25	74 ± 25 (3)*	35.6	39.2
	12.5	32 ± 10 (3)**	72.2	61.8
	25	3.2 ± 0.8 (3)**	97.4	84.3

Tab 2. TPA (10 ng · ml⁻¹)-induced release of TNF from *Propionibacterium acnes*-primed macrophages after incubated with H-7 or quercetin for 6 h. n = 3. $\bar{x} \pm s$. *P > 0.05, **P < 0.01 vs control.

Drug	$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Release of TNF · $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$
Control		4.7 ± 0.3
H-7	50	4.3 ± 0.9*
	100	1.6 ± 0.3**
Quercetin	12.5	4.5 ± 1.3*
	25	2.1 ± 0.4**

Tab 3. Effects of H-7 and quercetin on TNF production induced by LPS *in vivo*. Each mouse ip *Propionibacterium acnes* 0.5 ml and 7 d later received an iv injection and the serum was assayed for TNF activity in 1.929 lytic assay. $\bar{x} \pm s$. *P > 0.05, **P < 0.05 vs control.

Drug	ip 30 min before iv LPS	iv at the same time of iv LPS	Mice	TNF activity in serum $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$
Control	0	0	25	1899 ± 2645
H-7	50	0	10	150 ± 244*
Quercetin	75	0	9	1478 ± 2475*
	50	25	16	346 ± 462**

色的细胞明显增多。说明两种药物在高浓度时对小鼠有细胞毒作用。

2 H-7 和槲皮素对 LPS 体内诱生 TNF 的影响

ICR 小鼠 ip PA 0.5 ml/mouse, d 7 iv LPS 1 μg /mouse, 90 min 后血清中出现高水平 TNF 活性。在 iv LPS 前 30 min 预先 ip H-7 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 或槲皮素 75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 发现 H-7 可明显抑制 LPS 诱导的 TNF 分泌。但槲皮素作用不明显。改变槲皮素的给药方式。先于 iv LPS 前 30 min ip 槲皮素 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 然后于 iv LPS 的同时 iv 槲皮素 25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, TNF 的分泌则受到明显抑制 (Tab 3)。

DISCUSSION

本文中 TPA 诱生 TNF 的剂量与其激活 PKC 的有效剂量一致。提示 TPA 是通过直接激活 MΦ 内的 PKC 导致了 TNF 分泌。H-7 和槲皮素可在对 MΦ 无非特异性损伤的剂量范围内有效地抑制 LPS 或 TPA 诱导 PA 启动的 MΦ 分泌 TNF 的作用。总结 PKC 激活剂和抑制剂的正反作用。本文结果表明: PKC 的激活在 PA 启动的 MΦ 分泌 TNF 过程中具有关键性的作用。

我们在实验中还发现处于不同激活状态的 MΦ 对 TPA 的反应性不同。未受到任何刺激的小鼠腹腔 MΦ (resident MΦ) 和疏基乙醇酸钠培养基诱出的应答性 MΦ (responsive MΦ), TPA 均不能诱导其分泌 TNF。而只有经 PA 预先启动的 MΦ 方能在 TPA 刺激下分泌 TNF。提示处于不同激活状态的 MΦ, 其胞内 PKC 在 TNF 合成及分泌过程中的作用亦不相

同,在TNF的诱出阶段,PKC可能具有更重要的作用.

鉴于TNF在机体抗肿瘤及恶液质、休克和炎症损伤等病理过程中的重要作用,研究PKC激活剂和抑制剂对TNF分泌的影响,有希望提供一类新的临床治疗肿瘤或防治TNF介导的病理损害的药物. 本文发现H-7和槲皮素具有很强的体外抑制TNF分泌的作用,初步体内实验表明,两者在体内亦能有效抑制LPS诱导的TNF分泌,提示它们在临床治疗TNF病理损害方面具有潜在的应用前景,因此,H-7和槲皮素防治内毒素休克及其他TNF机体损伤的作用值得进一步研究.

REFERENCES

- 1 Philip R, Epstein LB. Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon and interleukin-1. *Nature* 1986; 323 : 86-9.
- 2 Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Welpé S, Milsark IW, *et al*. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986. 234 : 470-4.
- 3 Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, *et al*. Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J*

- Exp Med* 1988; 167 : 1211-27.
- 4 Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984; 308 : 693-8.
- 5 Hamilton TA, Becton DL, Somers SD, Gray PW, Adams DO. Interferon- γ modulates protein kinase C activity in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 1985; 260 : 1378-81.
- 6 Weiel JE, Hamilton TA, Adams DO. LPS induces altered phosphate labeling of proteins in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 1986; 136 : 3012-8.
- 7 Castagna M, Takai Y, Kikuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982; 257 : 7847-51.
- 8 Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Sasaki Y. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 1984; 23 : 5036-41.
- 9 Gschwendt M, Horn F, Kittstein W, Marks F. Inhibition of the calcium- and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117 : 444-7.
- 10 Flick DA, Gifford GE. Comparison of *in vitro* cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 1984; 68 : 167-75.

186-187

(26)

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1993 Mar; 14 (2) : 186-189

尼可地尔对缺氧和复氧致豚鼠右心室肌细胞电生理变化的保护作用

宿燕岗, 杨学义, 姚瑞明, 杨英珍, 陈灏珠

(上海市心血管病研究所, 上海医科大学附属中山医院, 上海 200032, 中国)

R972.2

Protective effects of nicorandil on action potentials in anoxia and reoxygenated ventricular myocardium of guinea pig

XU Yan-Gang, YANG Xue-Yi, YAO Rui-Ming, YANG Ying-Zhen, CHEN Hao-Zhu

(Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital of Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT Standard microelectrode techniques were used to study the effects of nicorandil (500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on action potentials in anoxia and reoxygenated ventricular myocardium of guinea pig. The main results: (a) Nicorandil shortened the action

Received 1992-01-03

Accepted 1992-09-09