

苦参碱对内毒素致炎大鼠 PLA₂活性影响及其抗炎机制研究邱 耕¹,涂植光¹,李 晓文^{2*}

(1. 重庆医科大学 临床生化教研室,重庆 400016 2 重庆医科大学附属儿童医院,重庆 400016)

摘要:目的 研究苦参碱抗炎机制和其抑制磷脂酶 A₂ (PLA₂) 活性的作用。方法 用 [³H]花生四烯酸掺入大肠杆菌膜为底物检测细胞内外 PLA₂方法,测定了苦参碱对内毒素 (LPS) 造成的大鼠急性内毒素血症时血清中分泌型磷脂酶 A₂ (sPLA₂) 活性和外周血白细胞中胞浆型磷脂酶 A₂ (cPLA₂) 活性的影响,同时用 Fura2-AM 作荧光指示剂检测胞内游离 Ca²⁺ 浓度的变化,并通过大鼠足跖肿胀实验证实苦参碱的抗炎作用。结果 在 LPS 介导的急性内毒素血症大鼠,30 mg/mL 的苦参碱 0.2 mL ip 1 h 对外周血 sPLA₂抑制效果最好,抑制率达 (81.9±1.8)%,此时胞内 cPLA₂活性抑制率是 (28.4±6.0)%,而 Ca²⁺ 浓度是 (157.10±20.56) nmol/L,比对照升高 15.3%。足跖肿胀实验亦证明苦参碱对炎症有显著抑制作用。结论 苦参碱是一种具有抗炎作用的新型 PLA₂抑制剂。

关键词:苦参碱;磷脂酶 A₂; Ca²⁺;炎症;内毒素

中图分类号:R286.87 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2002)07-0630-03

Effect of matrine on PLA₂ activity of LPS-induced inflammatory rats and its mechanismQIU Geng¹, TU Zhi-guang¹, LI Xiao-wen²

(1. Department of Clinical Biochemistry Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China;

2. Affiliated Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract Object To study the antiinflammatory effect of matrine and its active mechanism. **Methods**

The matrine effects on activities of secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in peripheral serum and cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) in leucocyte were measured with *Escherichia coli* membrane incorporated by [³H] arachidonic acid as the substrate; the Ca²⁺ level of leucocyte was determined using Fura2-AM loading method, and the rat plantar swelling test was used to examine the antiinflammatory effect of matrine. **Results** One hour after ip 30 mg/mL matrine, the inhibitory rate of sPLA₂ activity was (81.9±1.8)%, cPLA₂ (28.4±6.0)%, while Ca²⁺ concentration was (157.10±20.56) nmol/L which was 15.3% higher than that of the control. Plantar swelling test showed that matrine had a significant anti-inflammatory effect. **Conclusion** Matrine is a novel PLA₂ inhibitor with anti-inflammatory effect.

Key words matrine; phospholipase A₂ (PLA₂); Ca²⁺; inflammation; endotoxin

苦参碱是豆科植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根中提取的生物碱,具有多种药理作用。磷脂酶 A₂ (PLA₂) 为一类重要的代谢调节酶类,在哺乳动物体内有比较广泛的分布,为一簇能催化水解甘油磷酸酯的 Sn-2 位脂肪酸酯键,释放出自由脂肪酸和溶血磷脂的酶。各种 PLA 特别是分泌型 (sPLA₂) 和胞内型 (cPLA₂) 在细胞损伤、炎症和细胞信号传导等过程中的作用及地位一直是研究的热点^[1]。本实验研究了苦参碱的抗炎作用及对急性内毒素血症大鼠 sPLA₂和 cPLA₂活性的影响。

1 材料和方法

1.1 试验动物及材料:Wistar 大鼠购自重庆医科

大学实验动物中心,大肠杆菌 JM 109 为本教研室保存菌种。

1.2 仪器与试剂:苦参碱 (纯度 99%) 由重庆医科大学蒋纪恺教授惠赠。 [³H] 花生四烯酸 (1 MBq/mL) 购自中国原子能研究所。内毒素 (LPS), Fura2-AM, 无脂酸牛血清白蛋白 (FAF-BSA), 抑肽酶, 亮抑蛋白酶肽, EGTA, 苯甲磺酰氟 (PMSF), HEPES 和二油酸甘油均购自 Sigma 公司。EDTA, 甲醛, Triton-100, Brij-35, 2,5-二苯基噻唑 (PPO), 1,4-双-[5-苯基噻唑基]-2-苯 (POPOP) 均为分析纯,购自上海试剂一厂。磷酸氯喹 (纯度 99.8%) 购自重庆康乐制药有限公司。ALOKA 公

* 收稿日期:2001-09-04

基金项目:重庆市教委重点科学研究项目经费资助 (9952)

作者简介:邱 耕 (1971-),男,四川宜宾人,医师,硕士研究生,主要从事临床生物化学及诊断分子生物学研究,现通讯地址:广州医学院第二附属医院检验科,邮编 510260 Tel (020) 84310900 E-mail qiugeng928@yahoo.com

司 LSC-700型液体闪烁仪,日立公司 Hmac CF15型低温高速离心机 岛津 RF-540荧光分光光度计。

1.3 动物模型: 200 g 的 Wistar大鼠,以 5只为一组随机分成多组备用。急性内毒素炎症模型按大鼠处死取外周血前 1 h 每只大鼠 ip 0.8 mg/kg LPS 一次制造 苦参碱由 ip 给药。

1.4 大白鼠足跖肿胀试验: 参见文献方法^[4]。30 mg/mL 苦参碱 ip 0.2 mL, 1 h 后,新鲜鸡蛋清 0.05 mL 由足踝向足趾方向注入足掌,用容积测量法测量体积。

1.5 外周血白细胞制备: Wistar大鼠 10% 水合氯醛 ip 麻醉,立即开胸,心脏穿刺取血,EDTA-Na₂抗凝,淋巴细胞分离液(质量体积比 1.077±0.008)分离白细胞,PBS洗涤 2次,细胞记数并调整为 $\times 10^6$ /L 细胞裂解缓冲液(10 mmol/L HEPES, pH 7.4, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 0.34 mol/L 蔗糖,10% 甘油,10 μ g/mL 亮抑蛋白酶肽,10 μ g/mL 抑肽酶,1 mmol/L PMSF) 悬浮白细胞,0℃,2×30 s, 600 W 超声匀浆 10 000 g, 4℃,离心 30 min,取上清液备用。

1.6 sPLA₂, cPLA₂活性测定: 参见改良 [³H]花生四烯酸掺入大肠杆菌膜为底物的酶反应方法^[2]。

1.7 外周血白细胞内游离 Ca²⁺ 浓度测定: 参见方福德等的方法^[3],用 Fura2-AM 作荧光指示剂,双波长测定法测定胞内游离 Ca²⁺ 浓度。

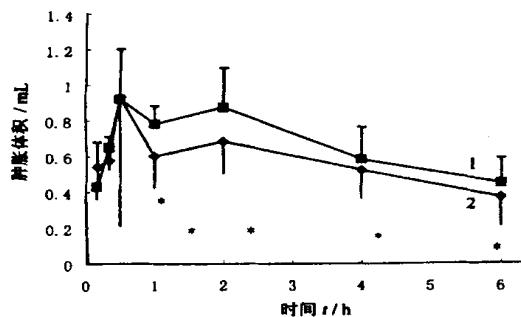
1.8 各苦参碱处理组抑制 PLA₂活性抑制率计算:
抑制率(%) = $\frac{\text{对照组平均活性} - \text{处理组平均活性}}{\text{对照组平均活性}} \times 100\%$

1.9 统计方法: 各组结果分别以 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异性比较采用方差分析。

2 实验结果

2.1 足跖肿胀实验: 实验组与对照组相比水肿消除加快,从 1 h 起消肿效果更明显 ($P < 0.05$),见图 1

2.2 苦参碱对外周血 sPLA₂活性抑制作用: 对



1-对照组 2-苦参碱 与对照组比: * $P < 0.05$

图 1 足跖肿胀试验趋势图

LPS致炎大鼠,分别观察注射 30 mg/mL 苦参碱 0.2 mL 后,1, 4, 16, 24 h 对 sPLA₂活性的抑制作用。对照组以生理盐水(NS)替代药物。与对照组相比各时间点苦参碱都有抑制作用 ($P < 0.05$),且注射苦参碱 1 h 后抑制效果最好,此时磷酸氯喹(3 mg/kg)阳性对照抑制率是 (82.3±2.4)%,结果见表 1

表 1 苦参碱抑制 sPLA₂活性的时-效关系 ($n=5$)

时 间 (h)	抑制率 (%)
1	81.9±1.8
4	24.7±0.3
16	23.7±15.1
24	34.2±2.4

与 1 h 组比较: * $P < 0.05$

2.3 苦参碱对外周血 sPLA₂活性抑制作用量效关系: 浓度分别是 15, 30, 60, 120 mg/mL 的苦参碱溶液及生理盐水(NS)对照 0.2 mL 分别注射 LPS 致炎大鼠,1 h 后测定 sPLA₂活性。与对照组相比各苦参碱组都有抑制作用 ($P < 0.05$)。从表 2 可见苦参碱浓度为 30 mg/mL 时抑制效果最好。

表 2 苦参碱抑制 sPLA₂活性的量-效关系 ($n=5$)

苦参碱剂量 (mg/mL)	抑制率 (%)
15	52.9±1.6
30	81.9±1.8
60	72.8±3.5
120	69.9±1.8

与 30 mg/mL 组比较: * $P < 0.05$

2.4 苦参碱对外周血白细胞 cPLA₂活性及白细胞内游离 Ca²⁺ 浓度的影响: LPS 致炎大鼠模型,浓度为 30 mg/mL 的苦参碱注射 1 h 后测定外周血白细胞 cPLA₂活性及白细胞内游离 Ca²⁺ 浓度,NS 替代苦参碱为对照组。胞内 cPLA₂活性抑制率是 (28.4±6.0)% ($n=5$),而胞内 Ca²⁺ 浓度 (157.10±20.56) nmol/L ($n=5$) 比对照组升高 15.3%。

3 讨论

苦参碱临床常用作抗肿瘤药物及升白细胞药,同时其抗心律失常作用也很明显,这些作用都与苦参碱调节细胞膜 Ca²⁺ 通道及影响 cAMP 含量有关。最近又发现苦参碱在体外能杀死肿瘤细胞,使人们对它的药理作用更加重视和具有新的认识。我们在足跖肿胀试验证实了苦参碱具有抗炎作用,不仅使肿胀体积缩小,而且使消除肿胀加快。进一步研究表明:用了苦参碱后,血清中 sPLA₂活性明显下降,而白细胞内 cPLA₂也有所下降,这些都证明其对 PLA₂活性的影响是十分显著的。由于 PLA₂在炎症中的重要作用已得到公认,因此,上述结果提示,苦

参碱对 PLA₂活性的抑制,可能是其抗炎机制之一。

有研究认为苦参碱的抗炎症作用主要表现在对 TNF 与 IL-6 的抑制作用^[5],我们的前期工作也证实 TNF α 的确参与了 LPS 的肝损害过程,但有报道认为 PLA₂ 参与了 TNF α 的产生机制,并且 sPLA₂ 特异抑制剂 Quinacrine 及 cPLA₂ 特异抑制剂 NDGA 都能降低血中 TNF α 的水平^[6],由此可见苦参碱的抗炎作用机制中,对 PLA₂ 活性的抑制可能是更上游的调节因素 Ca²⁺ 在其中的作用可能是把它们联系起来的关键,外周血白细胞内 Ca²⁺ 在用了苦参碱后的浓度反而有所增加说明了这一点,而这可能与苦参碱有 Ca²⁺ 通道激活作用相关。

寻找一种合适的 PLA₂ 抑制剂应用在炎症损伤病理过程中是人们普遍关心的问题,因为 PLA₂ 不但是炎症作用的关键酶,也是正常生理活动中必不可少的,怎样抑制过多产生的 PLA₂ 而不影响正常

生命过程是问题的关键 苦参碱作为一种中草药的天然成分,可能为此问题的解决开辟新思路。

参考文献:

- [1] Nakazato Y, Simonson M S, Herman W H, *et al*. Interleukin-1 stimulates prostaglandin biosynthesis in serum-activated mesangial cells by induction of a non-pancreatic (Type II) phospholipase A₂ [J]. J Biol Chem, 1991, 266: 14119-14127.
- [2] 邱耕,涂植光,唐旭. [³H]花生四烯酸掺入大肠杆菌膜检测细胞内外磷脂酶 A₂ 活性 [J]. 中华核医学杂志, 2001, 21 (4): 242-243.
- [3] 方福德. 现代医学实验技巧全书 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1995.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [5] 林文,张俊平,胡振林,等. 苦参碱对细菌脂多糖诱导大鼠枯否细胞释放肿瘤坏死因子及白细胞介素-6 的影响 [J]. 药理学报, 1997, 32 (2): 93-96.
- [6] Mohri M, Spriggs D K, Kufe D, *et al*. Effects of lipopolysaccharide on phospholipase A₂ activity and tumor necrosis factor expression in HL-60 cells [J]. J Immunol, 1990, 144: 2678-2682.

“五子四物瓜石汤”对雷公藤多苷所致雄性大鼠生殖系统毒性的对抗作用及其机制研究

杨静娴¹,徐红¹,韩国柱¹,梁文波²,李传勋^{1*}

(1. 大连医科大学 药理教研室,辽宁 大连 116023; 2. 大连大学医学院 药理教研室,辽宁 大连 116022)

摘要: 目的 研究自拟中药复方“五子四物瓜石汤”(WT)对雷公藤多苷(GTW)所致雄性大鼠生殖系统毒性的对抗作用及其机制。方法 雄性大鼠分别 ig 大、中、小剂量的 WT 与固定剂量的 GTW,连续给药 80 d,以单独 ig GTW 或 NS 为对照,观察各组雄性大鼠睾丸脏器指数、精子数、精子活率、睾丸病理结构的变化,并用免疫放射分析法(IRMA)测定各组雄性大鼠血清性激素水平。结果 与单用 GTW 组比较,大或中剂量 WT 可使睾丸重量明显增加,精子数明显升高,精子活率显著提高,其中大剂量 WT 可完全对抗 GTW 对生殖上皮的损害,使睾丸结构完全正常,血清睾酮维持于正常水平。结论 “五子四物瓜石汤”能显著对抗雷公藤多苷对雄性大鼠生殖系统的毒性作用,其对抗作用与 WT 保护睾丸生精上皮免受 GTW 的损害,并使血清睾酮水平维持于正常有关。

关键词: 雷公藤多苷;五子四物瓜石汤;毒性;睾丸脏器指数

中图分类号: R285.53 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)07-0632-03

Studies on counteractive effects of WUZI SIWU GUASHITANG* against GTW-induced genital system toxicity in male rats and its mechanism

YANG Jing-xian¹, XU Hong¹, HAN Guo-zhu¹, LIANG Wen-bo², LI Chuan-xun¹

(1. Department of Pharmacology, Dalian University of Medical Sciences, Dalian 116023, China;

2. Department of Pharmacology, Medical College of Dalian University, Dalian 116022, China)

Abstract Object To study the effects of WUZI SIWU GUASHITANG (WT) against multi-glycosides of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. (GTW)-induced genital system toxicity in male rats and its mechanism. **Methods** Male rats in treatment groups were treated respectively with a 80-days oral administration of large-, middle- and small-doses of WT plus a fixed dose of GTW. The rats as control were

* 收稿日期: 2001-12-04

基金项目: 大连市科委资助项目,现已通过成果鉴定,并获大连市科技进步三等奖

作者简介: 杨静娴 (1963-),女,辽宁大连人,大连医科大学药理教研室副教授,博士研究生。辽宁省教委基金课题主持人,国家自然科学基金

基金项目主要完成者,主要从事抗炎免疫药理及心血管药理研究,曾发表论文 10 余篇,专著 2 部。Tel (0411) 4664538

E-mail: xiyang9999@sina.com