

喘宁软胶囊对多形核粒细胞生成和释放白三烯的抑制作用

金赛红^{1,2}, 谢强敏¹, 陈季强¹, 赵余庆³, 徐有信^{3*}

(1. 浙江大学医学院呼吸药物研究重点实验室, 浙江 杭州 310031; 2. 杭州师范学院医学院, 浙江 杭州 310012; 3. 辽宁省中药新药研制开发中心, 辽宁 沈阳 110032)

摘要: 目的 探讨喘宁软胶囊 (简称喘宁) 平喘作用机制。方法 分别采用生物检定法、HPLC法、免疫 ELISA 法离体测试大鼠多形核粒细胞 (PMNs) 生成和释放慢反应物质 (SRS-A)、白三烯 B₄ (LTB₄)、白三烯 C₄ (LTC₄)。结果 在离体试验中, 喘宁 0.1, 0.4, 1.6, 6.4 g/L 浓度及喘宁 4 g/kg ig 20 d 所得血清能明显抑制大鼠 PMNs 生成和释放 SRS-A; 喘宁 0.025, 0.05, 0.1 g/L 及 0.1, 0.4, 1.6 g/L 浓度呈量效关系分别抑制大鼠 PMNs 生成和释放 LTB₄, LTC₄。结论 初步证明喘宁有平喘作用, 其机制与抑制花生四烯酸 (AA) 生成和释放白三烯有关。

关键词: 喘宁软胶囊; 多形核粒细胞 (PMNs); 白三烯

中图分类号: R286.43 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)03-0244-04

Inhibitory effect of Chuanning Soft Capsule on production and release of leukotriene generated by polymorphonuclear leukocytes

JIN Sai-hong^{1,2}, XIE Qiang-min¹, CHEN Ji-qiang¹, ZHAO Yu-qing³, XU You-xin³

(1. Key Laboratory of Respiratory Drug Research, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310031, 2. Medical College of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310012, China; 3. Center of New Drug Research and Development of Liaoning Province, Shenyang 110032, China)

Abstract Object To explore the anti-asthmatic mechanism of Chuanning Soft Capsule (CNSC).

Methods The slow reaction substance of anaphylaxis (SRS-A), leukotriene (LTB₄) and LTC₄ products in rat polymorphonuclear leukocytes (PMNs) were determined by bioassay, HPLC and ELISA *in vitro*.

Results CNSC 0.1, 0.4, 1.6, 6.4 g/L and the serum extracted from rats ig with 4 g/kg CNSC for 20 days significantly reduced SRS-A products in rat PMNs. CNSC 0.025, 0.05, 0.1 g/L and 0.1, 0.4, 1.6 g/L markedly inhibited LTB₄, LTC₄ products in rats PMNs. **Conclusion** The anti-asthmatic mechanism of CNSC may be correlated with suppression of leukotriene products generated by arachidonic acid.

Key words Chuanning Soft Capsule (CNSC); polymorphonuclear leukocytes (PMNs); leukotriene

白三烯 (leukotriene, LTs) 是引起哮喘患者气道慢性炎症和高反应性的重要介质, 在各种诱发因素作用下, 体内多种炎症细胞, 如肥大细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞产生并释放 LTs。与哮喘密切相关的是从花生四烯酸 (AA) 转化而来的 LTs (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄)。LTB₄ 能强烈吸引中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞至炎症部位, 增加血管壁通透性, 使炎症成分外渗, 激活环氧酶途径产生前列腺素 (PG), 引起气管平滑肌收缩。LTC₄, LTD₄, LTE₄ 的混合物也称为慢反应物质 (SRS-A), 是速发型变态反应的重要介质, 能引起气道平滑肌收缩、粘膜肿胀、腺体分泌增加和炎症反应^[1]。实验已经证明喘宁对致敏小鼠抗原攻击后肺灌洗液

和周围血中的嗜酸性粒细胞聚集反应及致敏大鼠抗原攻击后腹腔肥大细胞脱颗粒反应有明显抑制作用^[2]。为了进一步探讨喘宁的平喘作用机制, 本实验首先用生物检定法确定喘宁对 PMNs 生成和释放 SRS-A 有无抑制作用, 然后用 HPLC 和免疫 ELISA 法进一步定量测定喘宁对 PMNs 生成和释放 LTB₄, LTC₄ 量的影响

1 材料与方法

1.1 动物: SD 大鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体重 180~240 g; Hartley 豚鼠, 雄性, 体重 350~450 g。以上动物均由浙江大学医学院实验动物中心提供, 合格证号: 医动字第 22-9601018

1.2 药品与试剂: 喘宁软胶囊的原料药由辽宁省中

* 收稿日期: 2002-08-01

基金项目: 国家重点科技 (攻关) 项目 (96-901-05-213)

作者简介: 金赛红 (1965-), 女, 浙江人, 杭州师范学院医学院讲师, 1988年在浙江中医学院获学士学位, 后在浙江大学医学院获药理学硕士学位, 主攻呼吸药理。Tel, Fax: (0571) 87217380 E-mail: Xieqin@zju.edu.cn

药新药研制开发中心植化室提供,呈油状,应用时以 1% 吐温-80 配制成适当浓度备用; Glycogen, Calcium ionophore A₂₃₁₈₇, Pyrilamine, PGB₂, leukotriene B₄, leukotriene D₄均为 Sigma 公司产品; leukotriene C₄ EIA Kit 为 Cayman 公司产品; L-Cysteine 为上海康达氨基酸厂产品; Indomethacin 为金华第三制药厂产品;富马酸酮替芬为上海第十六制药厂产品;反相色谱柱 (4.0 mm×250 mm, 5 μm, C₁₈ ODS) 为德国 HP 公司产品; Sep-Pak C₁₈ 小柱为 Waters 公司产品; 甲醇为 HPLC 级, 上海吴泾化工厂产品; EDTA 乙醇 石油醚、乙酸、NH₄OH 为普通分析纯。

1.3 仪器: 德国 HP 高效液相色谱仪; 德国 Eppendorf 5804R 冷冻离心机; 美国 BIO-TEK ELX800 酶标仪; PCLAB 生物信号采集处理系统 2.1.1 版 (PCLAB 开发组); Sigma Stat 统计软件。

1.4 血清的制备: 将 SD 大鼠分成 5 组, 即生理盐水对照组 喘宁 1, 2, 4 g/kg 组 酮替芬 5 mg/kg 阳性对照组; 每组 6 只, 雌雄各半。每天 1 次等容 ig, 连续 20 d 末次 ig 1.5 h 后, 股动脉放血收集于试管内, 1 000 g 离心 15 min 分离血清, 置 -80℃ 保存备用。

1.5 LTs 的生成和提取^[3]: 取正常 SD 大鼠, 0.2% Glycogen 20 mL/kg ip, 16 h 后股动脉放血处死大鼠, 每只 20 mL Hanks 溶液 ip, 轻揉腹部 1 min, 打开腹腔, 收集腹腔内含 PMNs 的液体, 500 g 离心 10 min, 弃去上清液, 用 Hanks 溶液洗 2 次。显微镜低倍镜下白细胞计数, 取 2 滴混合液置玻片上, 室温吹干, 用 Wright-Giemsa 染色液染色, 高倍镜下观察 PMNs > 80%, 其余为单核细胞。将 PMNs 调整到 $\times 10^7$ cells/mL, 每管 1 mL 平均分成几个样本组 (生理盐水对照组、喘宁组、酮替芬阳性对照组、生理盐水血清对照组、喘宁软胶囊血清组、酮替芬血清阳性对照组), 分别加 Hanks 液、不同浓度的喘宁软胶囊、酮替芬及各组血清 0.1 mL, 再分别加入 indomethacin 1 μg/mL, L-Cysteine 10 mmol/L, 37℃ 孵育 10 min, 最后加入 Calcium ionophore A₂₃₁₈₇ 10 μmol/L, 37℃ 继续孵育 10 min, 5 000 g 离心 10 min, 取上清液, -80℃ 冷冻保存备用。

1.6 SRS-A 含量的生物测定^[3]: 取正常豚鼠, 击昏豚鼠, 取出回肠, 分成 1 cm 段, 用 Tyrods 液将肠内容物冲洗净, 一端结扎后固定于盛有 10 mL Tyrods 营养液 [含 Pyrilamine $\times 10^{-7}$ g/mL (阻断 H 受体), 硫酸阿托品 5×10^{-8} g/mL (阻断 M 受体)] 的

37℃ 恒温浴槽中, 另一端与张力换能器连接, 静息张力 1.5 g, 用 Pclab 生物信号采集系统描记回肠平滑肌的收缩张力的变化。给恒温浴槽中通 100% O₂, 回肠标本在 Tyrods 营养液中至少稳定 30 min 先定标准: 以 LTD₄ 引起回肠高度为标准, 然后开始检测不同的样本中 SRS-A 的含量。每次样本滴加间隔 15 min, 并且用 Tyrods 营养液洗回肠 3 次。张力单位以 g 表示。

1.7 RP-HPLC 分离测定 LTB₄^[3]: 将提取的 LTs 样本每管加入无水乙醇 2 mL 终止反应, 随后每管加入内标 PGB₂ 50 ng, 蒸馏水 5 mL, 4℃, 5 000 g 离心 10 min 沉淀蛋白, 取上清加水 5 mL 使乙醇浓度稀释为 15%, 用 1 mol/L HCl 调 pH 至 3.5, 通过 Sep-Pak C₁₈ 小柱, 并依次用 0.1% EDTA 蒸馏水、15% 乙醇、石油醚及甲醇各 10 mL 连续洗脱, 收集甲醇组分, N₂ 吹干, 每管 0.1 mL 甲醇复溶, 进样 20 μL 进行 RP-HPLC 分离测定 LTB₄。流动相: 甲醇-水-乙酸 (70:30:0.01), 用 NH₄OH 调 pH 至 5.8, 流速 1 mL/min, 检测波长 270 nm, 柱温 35℃。

1.8 LTC₄ 含量的测定: 用 LTC₄ EIA Kit 测定 LTC₄ 含量。该试剂盒测定原理是根据 LTC₄ 与 LTC₄-乙酰胆碱酯酶结合点 (LTC₄ tracer) 竞争限量的 LTC₄ 抗血清。具体操作按照该试剂盒说明书。

1.9 统计学处理: 所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的显著性用 *t* 检验。

2 结果

2.1 喘宁对体外 PMNs 生成和释放 SRS-A 的影响: 喘宁在 0.1, 0.4, 1.6, 6.4 g/L 浓度范围内呈量效关系抑制 PMNs 生成和释放 SRS-A, 见表 1。

表 1 喘宁对体外 PMNs 生成和释放 SRS-A 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

Table 1 Inhibitory effect of CNSC on SRS-A from PMNs in rats *in vitro* ($\bar{x} \pm s$, *n* = 8)

组别	浓度 /(g·L ⁻¹)	相当于 LTD /(ng·10 ⁶ 细胞)	抑制率 %
对照	-	78.25±32.00	
喘宁	0.1	69.40±30.90	11.3
	0.4	54.50±26.35 [*]	30.3
	1.6	49.55±18.00 [*]	36.7
	6.4	39.45±23.20 [*]	49.2
	酮替芬	10 μmol/L	38.80±13.70 [*]

与对照组比较: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01

* *P* < 0.05 ** *P* < 0.01 vs control group

2.2 喘宁血清对体外 PMNs 生成和释放 SRS-A 的影响: 如表 2 所示, 生理盐水及喘宁 1, 2 g/kg ig 所得血清对大鼠 PMNs 生成和释放 SRS-A 无明显影

响,喘宁 4 g/kg 和酮替芬 5 mg/kg ig 所得血清对大鼠 PMNs 生成和释放 SRS-A 有明显抑制作用

表 2 喘宁血清对 PMNs 生成和释放 SRS-A 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of CNSC serum on SRS-A from PMNs in rats *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 $/(g \cdot kg^{-1})$	相当于 LTD $/(ng \cdot 10^{-7} \text{细胞})$	抑制率 %
生理盐水血清	-	18.89± 2.76	-
喘宁血清	1	18.50± 1.68	2.06
	2	17.63± 4.20	6.67
	4	14.78± 1.89	21.80
酮替芬血清	0.005	15.55± 1.83	17.70

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.3 喘宁对体外多形核粒细胞生成和释放白三烯 B_4 (LTB_4) 的影响: 如表 3 所示,喘宁在 0.025, 0.05, 0.1 g/L 浓度范围内呈量效关系 ($R=0.992$) 明显抑制 PMNs 生成和释放 LTB_4 IC_{50} (95% 可信限) = 0.083 (0.067~0.102) g/L

表 3 喘宁对体外 PMNs 生成和释放 LTB_4 的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effect of CNSC on LTB_4 from PMNs in rats *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	浓度 $/(g \cdot L^{-1})$	LTB_4 $/(ng \cdot 10^{-7} \text{细胞})$	抑制率 %
对照	-	58.00± 5.80	
喘宁	0.025	50.05± 8.45	13.74
	0.05	38.95± 15.40	32.86
	0.10	25.25± 9.90**	56.46
酮替芬	10 ⁻⁴ mol/L	26.60± 8.55**	54.17

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.4 喘宁对体外多形核粒细胞生成和释放白三烯 C_4 (LTC_4) 的影响: 喘宁软胶囊 0.1, 0.4, 1.6 g/L 呈浓度依赖关系 ($R=0.893$) 明显抑制 PMNs 生成和释放 LTC_4 IC_{50} (95% 可信限) = 0.576 (0.46~0.71) g/L, 见表 4

3 讨论

喘宁软胶囊主要成分为亚麻酸等不饱和脂肪酸类。亚麻酸与亚油酸一样,是人体必需的脂肪酸,是体内 n-3 系多不饱和脂肪酸的前体,经脱饱和酶(限速酶)及碳链延长酶作用,生成一系列代谢产物,其中最重要的为二十碳五烯酸(EPA)。亚麻酸和亚油酸在体内有各自的代谢途径,但在相同步骤中所需的酶为同一酶系,所以这两大系列不饱和脂肪酸在体内代谢竞争同一酶系时,存在着竞争性抑制作用。体内亚麻酸含量增高, EPA 的产生增加,使

表 4 喘宁对体外 PMNs 生成和释放 LTC_4 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 Effect of CNSC on LTC_4 from PMNs in rats *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	浓度 $/(g \cdot L^{-1})$	LTC_4 $/(pg \cdot mL^{-1})$	抑制率 %
对照	-	656.53± 13.49	
喘宁	0.1	625.24± 10.99	4.76
	0.4	342.13± 9.33**	47.89
	1.6	166.40± 43.66**	74.65

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group

花生四烯酸(AA)的合成受到抑制,从而使炎症介质白三烯的生成和释放减少^[4]。许多实验证明,体内补充 α -亚麻酸成分能明显抑制白三烯的生成和释放,从而改善过敏反应及炎症的症状。如富含 α -亚麻酸的苏子油饲料分别连续喂饲两代大鼠,结果使多形核粒细胞(PMNs)释放的 LTB_4 减少 27%, SRS-A 活性下降 59%^[3]。临床哮喘患者连服苏子油 2 周或 4 周,结果患者体内 LTB_4 , LTC_4 含量减少,与对照组比较有显著性差异^[5,6]。

本实验首先用生物检定法初步测定了喘宁离体 0.1, 0.4, 1.6, 6.4 g/L 浓度和整体 1, 2, 4 g/kg ig 对 PMNs 生成和释放 SRS-A 的作用,结果显示离体有抑制作用,而整体却无作用。我们推测整体实验的阴性结果可能是因为取腹腔 PMNs 时用 Hanks 液清洗而使药物浓度稀释有关,故又采用含药血清进行离体实验,结果证明 4 g/kg ig 所获得血清对 PMNs 生成和释放 SRS-A 有抑制作用,而剂量较低的 1 和 2 g/kg 则无明显作用,表明与药物浓度相关。这两项结果可以说明,喘宁对 AA 脂氧酶代谢产物白三烯的活性有明显影响,但还不足以说明它对 AA 脂氧酶代谢产物白三烯产量的影响。为了进一步说明这一问题,我们选择了 RP-HPLC 法定量测定了喘宁对 AA 脂氧酶代谢产物 LTB_4 和 LTC_4 生成水平的影响。结果显示,我们的提取方法和 HPLC 测定法能很好地测定 LTB_4 , 而 LTC_4 生成水平较低, HPLC 测定法灵敏度不够,故采用免疫特异性的 ELISA 定量测定 LTC_4 的含量,并取得了比较满意的结果。本实验证明了喘宁对 AA 脂氧酶代谢产物 LTB_4 和 LTC_4 的生成确有明显抑制作用。

本结果证明喘宁具有平喘抗炎作用,其作用机制与抑制 AA 生成和释放白三烯有关。

References

[1] Nicosia S, Capra V, Rovati G E. Leukotrienes as mediators of asthma [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2001, 14 (1): 3-19.

- [2] Jin S H, Xie Q M, Shen W H, *et al.* Inhibitory effect of Chuanning Soft Capsule on eosinophils and mast cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (3): 242-244.
- [3] Hashimoto A, Katagiri M, Torii S, *et al.* Effect of dietary α -linolenate/linoleate balance on leukotriene production and histamine release in rats [J]. *Prostaglandins*, 1998, 36(1): 3-16.
- [4] James M J, Gibson R A, Cleland L G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71(1 Suppl): 343-348.
- [5] Okamoto M, Mitsunobu F, Ashida K, *et al.* Effects of perilla seed oil supplementation on leukotriene generation by leukocytes in patients with asthma associated with lipometabolism [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2000, 122 (2): 137-142.
- [6] Okamoto M, Mitsunobu F, Ashida K, *et al.* Effects of dietary supplementation with n-3 fatty acids compared with n-6 fatty acids on bronchial asthma [J]. *Intern Med*, 2000, 39 (2): 107-111.

槲皮素抑制纤维蛋白纤维蛋白原降解产物诱导小鼠腹腔巨噬细胞释放白细胞介素-1

周 斌¹, 张俊平¹, 刘 宏², 钱定华^{1*}

(1. 第二军医大学药学院 药理教研室, 上海 200433; 2 第二军医大学长海医院, 上海 200433)

摘要: 目的 研究槲皮素对纤维蛋白纤维蛋白原降解产物 (FFDP) 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞释放白细胞介素-1 (IL-1) 的作用及其机制。方法 采用小鼠胸腺细胞增殖法测定 IL-1 结果 FFDP (0.2~1 g/L) 能促使小鼠腹腔巨噬细胞分泌 IL-1, 槲皮素 (5~20 μ mol/L) 可抑制 FFDP 的作用, 其作用可能与蛋白激酶 C 有关。结论 槲皮素对 FFDP 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞释放 IL-1 有抑制作用, 对心脑血管疾病的防治具有一定意义。

关键词: 槲皮素; 纤维蛋白纤维蛋白原降解产物 (FFDP); 白细胞介素-1; 腹腔巨噬细胞

中图分类号: R286.26 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)03-0247-03

Effects of quercetin on release of interleukin-1 from peritoneal macrophages of mice induced by fibrin fibrinogen degradation products

ZHO U Bin¹, ZHANG Jun-ping¹, LIU Hong², QIAN Ding-hua¹

(1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Key words quercetin; fibrin fibrinogen degradation products (FFDP); interleukin-1; peritoneal macrophage

心脑血管疾病是威胁人类健康的重大疾病。近年来研究表明, 高水平血浆纤维蛋白原是一重要的、独立的心脑血管疾病危险因素。动脉粥样硬化斑块中有大量纤维蛋白原降解相关抗原, 且其存在形态与斑块发展程度相关。纤维蛋白纤维蛋白原降解产物 (fibrin fibrinogen degradation products, FFDP) 在斑块中的出现甚至早于氧化低密度脂蛋白^[1,2]。白细胞介素-1 (IL-1) 通过其自身及其诱生的其他因子的作用, 在心脑血管疾病发生中发挥着重要的作用^[3,4]。槲皮素 (quercetin, Quer) 是提取的植物黄酮, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗血小板聚集等多方面的作用^[5,6]。前期研究发现其对多种炎症因子的产生也有抑制作用。本研究旨在观察槲皮素对 FFDP 诱导

IL-1 产生的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与动物: 槲皮素 (纯度 > 98%, HPLC 法), 纤维蛋白, 纤溶酶, 抑肽酶, PMA 美国 Sigma 公司产品。ICR 小鼠, 由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 FFDP 的制备^[7]: 在含 1 mmol/L CaCl₂ 条件下, 用纤溶酶消化纤维蛋白, 每克蛋白用 10 单位纤溶酶, 6 h 后用抑肽酶 (200 kU/cu 纤溶酶) 终止反应。

1.3 小鼠腹腔巨噬细胞的制备^[8]: ICR 小鼠 ip 3% 硫代乙醇酸钠培养液 1.5 mL, 4 d 后颈椎脱臼处死, 用磷酸缓冲液充分洗出腹腔细胞, 经离心, 破红细胞, 洗涤后, 种入培养板, 37℃, 5% CO₂ 孵育 2 h,

* 收稿日期: 2002-10-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39370798 和 30200344)

作者简介: 周 斌 (1969-), 男, 博士, 讲师。研究方向: 老年性疾病发病机制及药物防治研究

Tel (021) 25074470 E-mail zhoubin@smmu.edu.cn