



Fig 2 Chemical structures of DMDP and PMDP.

材 料 和 方 法

药品和试剂 欧芹素乙、异欧芹素乙由本院植物化学教研室提取；DMDP 及 PMDP 由本院药物化学教研室合成；维拉帕米(Ver)为天津中央药厂产品。

细胞培养 按文献⁽⁵⁾所载方法进行。

TNF 对平滑肌细胞增殖的影响 取生长致密的牛脑微血管平滑肌细胞，以 0.1% 胰酶消化后，用含 10% 血清的培养基将细胞稀释至 $1 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ ，按每孔 100 μl 接种于 96 孔细胞培养板(每孔 1×10^4 细胞)，37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳孵育箱内孵育 12 h，加入不同剂量 TNF (50, 250, 500, 2500, 5000 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$)，各孔加含 10% 血清培养基至 200 μl ，继续孵育不同时间(24 h, 48 h, 72 h)后取出，以细胞固定染色液浸染 20 min，再以去离子水荡洗、浸泡 15 min，待自然晾干后，每孔加入结晶紫提取液 100.0 μl ，在酶联免疫检测仪上(DG 3022 型 第四军医大学与国营华东电子管厂联合研制)于 594 nm 处测定吸收度。

药物对 TNF 诱导的平滑肌细胞增殖的影响 BCSMC 之制备、孵育等与上相同，但接种细胞数为每孔 2×10^4 cells。

结 果

TNF 刺激平滑肌细胞增殖的时效曲线

TNF 在 2500 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时与平滑肌细胞一起孵育 24 h, 48 h 及 72 h 后，测量其吸收度，算出细胞增殖率，计算公式为：

$$\text{增殖率} = \frac{\text{TNF 组测定值} - \text{对照组测定值}}{\text{对照组测定值}} \times 100\%$$

实验结果显示：TNF 刺激 24 h 即可明显诱导平滑肌细胞增殖，其增殖率为 34.1%；48 h 的增殖率达高峰，其增殖率为 42.0%；72 h 的增殖率为 40.0%，与 48 h 相比，稍有降低。故做药物抑制作用时，为节省时间，选取 24 h 为孵育时间。

TNF 刺激平滑肌细胞增殖的量效曲线

TNF 与平滑肌细胞孵育 48 h，在 50, 250, 2500, 5000 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度范围内呈剂量依赖性地

刺激平滑肌细胞的增殖;在 $2500 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度时达坪值,刺激率为 42.0%,随后保持稳定 ($5000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的刺激率为 40.0%)。

药物对 TNF 诱导平滑肌细胞增殖的影响

依据 TNF 对平滑肌细胞增殖影响的时效、量效曲线,我们选取 TNF 刺激浓度为 $2500 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$,刺激时间为 24 h,以 Ver 为阳性对照药物,考察了欧芹素乙、异欧芹素乙、DMDP、PMDP 等 4 种药物对 TNF 诱导的平滑肌细胞增殖的影响,结果见表 1。结果显示, $10^{-6} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内,欧芹素乙与异欧芹素乙剂量依赖性地显著抑制 TNF 诱导的平滑肌细胞增殖,当药物浓度为 $10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,欧芹素乙的抑制率分别为 15.8, 32.9 和 42.2%。异欧芹素乙的抑制率分别为 19.1, 29.7 和 36.1%。DMDP 和 PMDP 在低浓度时 (DMDP $10^{-6}, 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; PMDP $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 明显抑制 TNF 诱导的该平滑肌细胞增殖, DMDP 的抑制率分别为 28.6 和 46.5%; PMDP 的抑制率为 36.1%,较高浓度时 ($10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 不呈现此抑制作用。Ver 在 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的抑制率为 40.8%。

Tab 1 Drug inhibition of TNF-induced proliferation of BCSMC *in vitro*

Drug	Absorption (rates of inhibition%) at different concentration ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)			
	0 (control)	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Imp	0.47 ± 0.04	$0.39 \pm 0.03^{**}$ (15.79)	$0.31 \pm 0.02^{**}$ (32.92)	$0.27 \pm 0.03^{**}$ (42.20)
Isi	0.47 ± 0.04	$0.37 \pm 0.02^{*}$ (19.06)	$0.34 \pm 0.02^{**}$ (29.71)	$0.31 \pm 0.02^{**}$ (36.10)
DMDP	0.47 ± 0.04	$0.33 \pm 0.01^{**}$ (28.64)	$0.25 \pm 0.02^{**}$ (46.48)	0.44 ± 0.02 (5.29)
PMDP	0.31 ± 0.04	$0.20 \pm 0.01^{**}$ (36.10)	0.28 ± 0.01 (9.48)	0.28 ± 0.05 (13.42)
Ver	0.47 ± 0.04	$0.28 \pm 0.05^{**}$ (40.77)		$0.09 \pm 0.02^{**}$ (80.73)

$\bar{x} \pm s, n=12, *P<0.05, **P<0.01$ vs control

讨 论

文献报道 TNF 可增强血小板凝集活性^(6~8),内皮细胞及平滑肌细胞是 TNF 的靶向和来源⁽⁹⁾,提示 TNF 在动脉粥样硬化及其它心血管疾病中起一定作用。本文表明, TNF 对培养的牛脑微血管平滑肌细胞增殖具有明显的促进作用,提示 TNF 在脑动脉粥样硬化等脑血管疾病中可能有重要的作用。因而,寻找拮抗 TNF 诱导的血管平滑肌增殖作用的药物,在心脑血管疾病的防治中可能有应用前景。

Imp 和 Isi 是从植物中提取的有效成分,结构很相似。本室以前的研究结果表明,它们均可抑制花生四烯酸诱导的血小板聚集。本文又证实 Imp 和 Isi 还可抑制 TNF 诱导的血管平滑肌细胞增殖,进一步表明两药在心脑血管疾病的防治中有意义。DMDP 和 PMDP 则是本院新合成的吡嗪酮类衍生物,为磷酸二酯酶抑制剂。本室曾报道 DMDP 和 PMDP 都可显著抑制花生四烯酸、ADP 和血小板活化因子诱导的血小板聚集,升高血小板内环腺苷酸水平,是这一作用的可能机理。现在我们又证明 DMDP 和 PMDP 也能抑制 TNF 诱导的血管平滑肌细胞增殖,表明它们在心脑血管疾病的防治中也可能有意义。两类药物结构不同,作用却有相似之处,其机理有待进一步研究探讨。

参 考 文 献

- 1 Froehlich HH, Mueller-Limmroth W. The sedative effects of the Kneipp hay sack and balneological preparations of hay. *Muench Med Wochenschr* 1976;118: 317; *CA* 1976;84: 184815h.
- 2 Abyshev AZ, et al. Synthesis and pharmacology of monomeric coumarins and their copolymers.

Khim Farm Zh 1977;11: 41; *CA* 1977;87: 15688a.

- 3 曾国钱,等. 欧芹素乙和异欧芹素乙对兔血小板聚集及兔血小板内血栓素 B₂, 环腺苷酸水平的影响. 第二军医大学学报 1993;14: 369.
- 4 GQ Zeng, et al. Effects of 6-(α , α -diphenylacetyl)piperazinyl) phenyl-5-methyl-4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinone on rabbit platelet aggregation and TXB₂, cAMP production. *Acta Pharm Sin* 1993;28: 256.
- 5 孙笃新,等. 牛脑微血管平滑肌细胞的体外培养及产生血小板活化因子的观察. 解剖学杂志 1992;15: 27.
- 6 Bevilacqua M P, et al. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human endothelial cells; characterization and comparison with the action of interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83: 4533.
- 7 Van Hinsberg E, et al. Tumor necrosis factor increases the production of plasminogen activator inhibitor in human endothelial cells *in vitro* and in rats *in vivo*. *Blood* 1988;72: 1467.
- 8 Camussi G, et al. Tumor necrosis factor/cachectin stimulates peritoneal macrophage, polymorphonuclear neutrophil and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J Exp Med* 1987;166: 1390.
- 9 Stephen J C, et al. Human vascular smooth muscle cells. Target for and source of tumor necrosis factor. *J Immunol* 1989;142: 100.

DRUG ANTAGONISM OF TNF INDUCED PROLIFERATION OF BOVINE CEREBROMICROVASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS

Y Ji, GQ Zeng and DX Sun

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

ABSTRACT Effects of tumor necrosis factor (TNF) on the proliferation of bovine cerebromicrovascular smooth muscle cells (BCSMC) were investigated. At concentrations from 50 to 5000 U · ml⁻¹, TNF was shown to induce proliferation of cultured BCSMC in a dose-dependent manner. After 24 h incubation of the cells, TNF significantly stimulated the proliferation of BCSMC and reached maximal effects after 48 h incubation, then the effects slightly decreased.

At concentrations from 10⁻⁶ to 10⁻⁴ mol · L⁻¹, both imperatorin (Imp) and iso-imperatorin (Isi) were found to antagonize the TNF induced proliferation of BCSMC. Their maximal inhibitory effects were 42.2 and 36.1% at 10⁻⁴ mol · L⁻¹ respectively. 6-(α , α -diphenylacetyl)piperazinyl) phenyl-5-methyl-4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinone (DMDP) and 6-(α -phenylacetyl)piperazinyl) phenyl-5-methyl-4,5-dihydro-3(2H)-pyridazinone (PMDP) were also found to possess similar effect at lower concentration (10⁻⁶ mol · L⁻¹), but no significant effect was observed when the drug concentration was higher.

Key words Tumor necrosis factor; Smooth muscle; Imperatorin; Iso-imperatorin; Pyridazinone derivatives