

# 来氟米特抑制 PAF 诱导的兔滑膜细胞 DNA 合成 及 PAF 自大鼠腹腔巨噬细胞中产生

鞠佃文 郑钦岳 王洪斌 方 军

(第二军医大学药学院药理教研室, 上海 200433)

**提要** 异噁唑类衍生物来氟米特(leflunomide)是一种新型抗炎及免疫调节剂。本文首次发现脂类炎症介质血小板激活因子(PAF)可显著诱导体外培养的兔滑膜细胞 DNA 合成。来氟米特及其主要代谢产物 A771726 在  $0.1 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内呈剂量依赖性地抑制 PAF 诱导滑膜细胞 DNA 合成。对于钙离子载体 A23187 诱导的大鼠腹腔巨噬细胞释放 PAF, 来氟米特和 A771726 亦呈时间和剂量依赖性的抑制作用。来氟米特在 PAF 生成和作用两个环节上都呈现出显著的抑制作用。

**关键词** 来氟米特; 滑膜细胞; 脱氧核糖核酸; 巨噬细胞; 血小板激活因子

来氟米特(leflunomide, HWA 486, LFM)是一种新型抗炎及免疫调节剂,能有效地预防和治疗多种关节炎和自身免疫性疾病<sup>(1)</sup>。药理实验发现它有与一般抗炎药物完全不同的作用特点<sup>(2)</sup>。血小板激活因子(PAF)是一种重要的脂质类炎症介质<sup>(3)</sup>,能激活中性粒细胞和单核细胞释放炎症介质,招引炎症细胞聚集于炎症区<sup>(4)</sup>。为了解来氟米特抗炎作用是否与 PAF 产生及作用有关,本文研究了 PAF 对体外培养的兔滑膜细胞 DNA 合成的影响以及 LFM 和其代谢产物 A771726 的抑制作用。同时,还观察了两种药物对卡西霉素 A23187 诱导的大鼠腹腔巨噬细胞释放 PAF 的影响。

## 材 料 与 方 法

MEM, RPMI-1640 完全培养基, A23187 购自美国 Sigma 公司;  $^3\text{H-TdR}$  购自中国科学院上海原子核研究所; PAF 标准品由瑞士 Hoffmann-La Roche 公司的 Hadvary 博士惠赠。小牛血清白蛋白(BSA), 磷酸肌酸激酶(CPK)为上海生物制品研究所产品。磷酸肌酸(CP)为 Merck 公司产品。LFM 及其主要代谢物 A771726 由德国 Hoechst 药厂的 Gert 博士提供。小牛血清(FCS)由本校病理教研室购得。

体重 200~300 g, 雌雄兼有的 Sprague-Dawley 大鼠及体重 2.5~3.0 kg 新西兰兔,均由第二军医大学动物中心提供。

**滑膜细胞的培养** 参照文献组织块培养法<sup>(5)</sup>。无菌条件下取新西兰兔膝关节滑膜组织,切成小块,将组织块贴到培养瓶壁上,内膜朝向瓶壁,加入含有 10% FCS, 青霉素  $100 \text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$  和链霉素  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  的 MEM 培养基,置于  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  和完全湿度条件下培养,2~3 d 换液一次至瓶内长满细胞后用 0.25% 胰酶传代培养。

**DNA 合成的测定** 待细胞(2~4代)长满瓶底时,用胰酶消化下来按2万/孔接种到96孔板上,贴壁24h,倾去培养基,换入含有待试药物的新培养基,同时加入 $^3\text{H-TdR}$   $1.85 \times 10^3 \text{ Bq}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 培养24h,然后收集细胞,烘干,加入0.2ml闪烁液于液闪计数仪上测定 $^3\text{H-TdR}$ 的参入值。

**大鼠腹腔巨噬细胞 PAF 的诱导<sup>(6)</sup>** 无菌条件下用RPMI-1640冲洗大鼠腹腔,冲洗液经洗涤后配成 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液。按每孔1ml加到24孔培养板中孵育2h,洗去未贴壁细胞,每孔加入含A23187  $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的培养基及不同浓度的LFM,A771726。继续培养30min后每孔加入乙酸0.2ml中止反应,加入甲醇和氯仿各1ml振荡提取,离心取氯仿层,氮气吹干, $-20^\circ\text{C}$ 冻存待测。

**PAF 生物测定** 用免洗涤血小板生物检定样品中PAF含量<sup>(7)</sup>。细胞提取液复溶于含0.25%BSA的台氏液中,取10 $\mu\text{l}$ 加入经消炎痛预孵的免洗涤血小板中,根据血小板聚集程度确定样本中PAF含量。测定前加入CP  $0.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,CPK  $39.3 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$ 阻断ADP对血小板聚集的影响。

## 结 果

### PAF对兔滑膜细胞DNA合成的影响

不同浓度的PAF呈剂量依赖性地促进兔滑膜细胞DNA合成,当PAF浓度为1,10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时, $^3\text{H-TdR}$ 参入值比对照组高出近一倍,另外,前列腺素 $\text{E}_2$ ( $\text{PGE}_2$ )在所测试浓度1,10 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时显著抑制滑膜细胞DNA的合成(表1)。

Tab 1 Effect of platelet-activating factor (PAF) on DNA synthesis in rabbit synovial cells in culture

Drug ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	$[\text{}^3\text{H}]\text{-TdR}$ incorporation (cpm)
Control	9457 $\pm$ 1276
PAF 0.01	12105 $\pm$ 2436
0.1	12936 $\pm$ 1529*
1	16450 $\pm$ 750**
10	16812 $\pm$ 2175**
$\text{PGE}_2$ 1	7450 $\pm$ 828*
10	5279 $\pm$ 672**

$n=4$ ,  $\bar{x} \pm s$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control

### LFM,A771726抑制PAF诱导的兔滑膜细胞DNA合成

对自然生长状态及PAF诱导的兔滑膜细胞增殖,LFM和A771726在0.1~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内都呈现剂量依赖性的抑制作用。此外,对于这两种状态下的细胞增殖,PAF拮抗剂WEB 2086也呈现明显的抑制作用(表2)。

### LFM,A771726对大鼠腹腔巨噬细胞释放PAF的影响

将巨噬细胞与A23187  $2 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 及不同浓度的LFM,或A771726一起温孵30min,提取后测PAF含量。结果发现,二者在0.1~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内均能显著抑制PAF的产生,且此

作用呈剂量依赖性(表 3)。

**Tab 2 Inhibitory effects of leflunomide and its metabolite A771726 on platelet activating factor (PAF  $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) induced DNA synthesis in rabbit synovial cells in culture**

Drug		$[^3\text{H}]\text{-TdR}$ incorporation (cpm)	
( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )		RPMI-1640	PAF
Control		12590 $\pm$ 1773	7644 $\pm$ 941
Leflunomide	0.1	11527 $\pm$ 2941	5696 $\pm$ 948*
	1	10251 $\pm$ 1474	4859 $\pm$ 594**
	10	9921 $\pm$ 1251*	4342 $\pm$ 531**
A771726	0.1	10212 $\pm$ 1067	4327 $\pm$ 531**
	1	9278 $\pm$ 803*	3893 $\pm$ 479**
	10	7521 $\pm$ 892**	3590 $\pm$ 526**
WEB 2086	1	9948 $\pm$ 1052*	4950 $\pm$ 655**
	10	7274 $\pm$ 903**	4807 $\pm$ 349**

$n=4, \bar{x} \pm s, *P<0.05, **P<0.01$  vs control

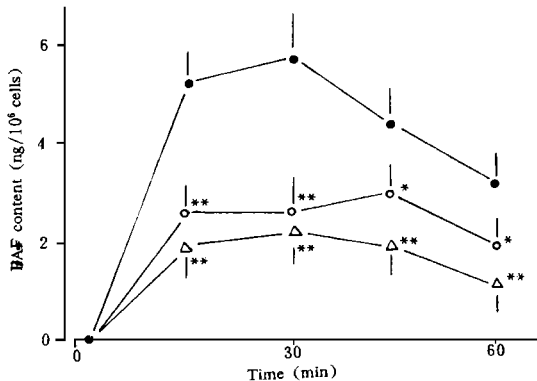
**Tab 3 Inhibitory effects of leflunomide and A771726 on the production of platelet-activating factor (PAF) from A23187 stimulated rat peritoneal macrophages**

Drug	PAF content (ng/ $10^6$ cells)	
	Leflunomide	A771726
( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )		
Control	7.01 $\pm$ 0.82	6.85 $\pm$ 0.73
0.1	5.83 $\pm$ 1.21*	5.49 $\pm$ 1.45*
1	4.45 $\pm$ 0.92**	4.57 $\pm$ 0.61**
10	3.52 $\pm$ 0.68**	2.49 $\pm$ 0.87**

$n=5, \bar{x} \pm s, *P<0.05, **P<0.01$  vs control

### LFM 抑制 PAF 产生的时效关系

结果表明, A23187 刺激的巨噬细胞释放 PAF 在 30 min 达到高峰, 在所有测定时间点上, LFM 和 A771726  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  都呈现显著抑制作用(图 1)。



**Fig 1 Time course of platelet-activating factor (PAF) production from rat peritoneal macrophages (●—●) and inhibition by leflunomide (○—○  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and A771726 ( $\Delta$ — $\Delta$   $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).  $n=5, \bar{x} \pm s, *P<0.05, **P<0.01$  vs control.**

## 讨 论

滑膜细胞过度增殖是类风湿性关节炎中一个非常重要的病理改变过程<sup>(8)</sup>。许多炎症介质,包括肿瘤坏死因子和白细胞介素 1 等都能诱导人滑膜细胞增殖<sup>(8)</sup>。本文首次报道 PAF 对兔滑膜细胞增殖具有显著的诱导作用,而 PGE<sub>2</sub> 却抑制该细胞合成 DNA。这更进一步确证了 PAF 在类风湿性关节炎中的病理地位。来氟米特是近年来合成的一种新的异噁唑类抗炎与免疫调节剂。实验发现它对大鼠佐剂关节炎,小鼠多发性关节炎,人类类风湿性关节炎都有较好的疗效<sup>(2,9,10)</sup>。LFM 的作用机理不同于免疫抑制剂或非甾体抗炎药<sup>(2)</sup>。我们发现 LFM 及其在体内主要代谢产物 A771726 对兔滑膜细胞增殖具有较强的抑制作用,PAF 拮抗剂 WEB 2086 也能抑制自然及 PAF 诱导的兔滑膜细胞增殖,提示这种抑制不是由 PAF 受体介导的。

PAF 广泛地参与炎症的病理生理过程,巨噬细胞是产生 PAF 的主要细胞之一。我们发现,LFM 及 A771726 都能显著抑制 A23187 诱导大鼠腹腔巨噬细胞释放 PAF。LFM 从不同的途径拮抗 PAF 的作用。抑制其产生可能是其抗炎机理之一。本实验还发现,LFM 的主要代谢物 A771726 具有与 LFM 相似的作用,提示 LFM 可能是通过代谢物 A771726 而起作用。

## 参 考 文 献

- 1 Bartlett RR. Immunopharmacological profile of HWA 486, a novel isoxazol derivative. II. *In vivo* immunomodulating effects differ from those of cyclophosphamide, prednisolone, or cyclosporin A. *Int J immunopharmacol* 1986;8 : 199.
- 2 Bartlett RR, et al. Leflunomide (HWA 486), a novel immunomodulating compound for the treatment of autoimmune disorders and reactions leading to transplantation rejection. *Agents Actions* 1991;32 : 10.
- 3 Braquet P, et al. Perspectives in platelet-activating factor research. *Pharmacol Rev* 1987;39 : 97.
- 4 Peter J. et al. Inflammatory mediators and asthma. *Ibid* 1988;40 : 49.
- 5 Ju DW, et al. Inhibitory effect of leflunomide on cytokine-induced DNA synthesis of rabbit synovial cells in culture. *Acta Pharmacol Sin* 1994(in press).
- 6 Fang J, QY Zhang. Inhibitory effect of esculentoside A on platelet-activating factor released from calcimycin induced rat peritoneal macrophages. *Ibid* 1991;26 : 721.
- 7 Sun DX, et al. Platelet activating factor production in bovine cerebral microvascular endothelial cells and its drug inhibition. *Ibid* 1993;14 : 26.
- 8 Gitter BD, et al. Retinoid acid potentiates interleukin-1 and fibroblast growth factor-induced human synovial fibroblast proliferation. *Clin Immunol Immunopathol* 1991;61 : 191.
- 9 Bartlett RR, et al. Immunopharmacological profile of a novel isoxazol derivative, HWA 486, with potential antirheumatic activity. I. Disease modifying action on adjuvant arthritis of the rat. *Int J Immunopharmacol* 1985;7 : 7.
- 10 Glant TT, et al. Immunomodulation of proteoglycan-induced progressive polyarthritis by leflunomide. *Immunopharmacology* 1992;23 : 105.

# LEFLUNOMIDE INHIBITS PAF INDUCED DNA SYNTHESIS IN RABBIT SYNOVIAL CELLS AND PAF PRODUCTION FROM RAT PERITONEAL MACROPHAGES

DW Ju, QY Zheng, HB Wang and J Fang

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

**ABSTRACT** Leflunomide (LFM, HWA 486) is an isoxazol derivative with antiphlogistic and novel immunomodulating properties. It has been shown to be very effective in preventing and curing arthritis. In this report we found that platelet-activating factor (PAF) at  $0.1 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  significantly stimulated DNA synthesis in cultured rabbit synovial cells. While LFM and its metabolite A771726 elicited inhibitory effects on this action of PAF. These two agents were also shown to markedly inhibit A23187 induced PAF production from rat peritoneal macrophages. The inhibition was dose and time-dependent. The inhibitory effects of LFM and A771726 on DNA synthesis in synovial cells and PAF production from macrophages may play an important role in the anti-inflammatory effects of LFM.

**Key words** Leflunomide; DNA; Synovial cells; Macrophages; Platelet-activating factor