

白三烯拮抗剂 ONO 1078 的一般神经药理特点

胡全^{1,2}, 魏尔清¹, 章征¹, 朱朝阳¹ (1. 浙江大学医学院药理学教研室, 浙江 杭州 310031; 2. 杭州师范学院医学院药理教研室, 浙江 杭州 310012)

摘要:目的 观察白三烯拮抗剂 ONO-1078 对小鼠的一般神经药理作用, 评价其对中枢的安全性。方法 测定自发活动、运动及协调能力试验、水迷宫试验、跳台实验以及镇痛试验等, 研究 ONO-1078 (0.2, 1.0, 5.0 mg·kg⁻¹, ip) 对小鼠神经活动的影响。结果 大剂量 ONO-1078 (5.0 mg·kg⁻¹) 对小鼠自发活动有抑制作用, 但是未观察到其它明显的神经作用。结论 ONO-1078 对中枢神经系统作用轻微, 提示抗脑缺血应用时对中枢神经系统有较好的安全性。

关键词: ONO-1078; 自发活动; 行为学作用; 学习记忆; 镇痛

中图分类号: R971; R964 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2003)04-0259-04

Neuropharmacological properties of ONO 1078, a leukotriene antagonist in mice

HU Quan^{1,2}, WEI Er-qing¹, ZHANG Zheng¹, ZHU Chao-yang (1. Department of Pharmacology, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; 2. Medical College of Hangzhou Teachers College, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE ONO-1078, a leukotriene antagonist, has neuroprotective effect on brain ischemia. This study aims to determine the effects of ONO-1078 on central nervous system to evaluate its safety in mice. **METHOD** Spontaneous locomotor test, neuromuscular and vestibulomotor functions, water maze test, step down test and analgesic tests were used to observe the central effects of ONO-1078 (0.2, 1.0, 5.0 mg·kg⁻¹, ip) in mice. **RESULTS** ONO-1078 had suppressive effect on spontaneous locomotor activity in a larger dose (5.0 mg·kg⁻¹), but no other significant central effects were observed in mice. **CONCLUSION** ONO-1078 has a lower toxicity on central nervous system and may be safe for the use in the treatment of brain ischemia.

KEY WORDS: { pranlukast, 4-oxo-8-[p-(4-phenylbutyloxy) benzoyl-amino]-2-(tetrazol-5-yl)-4H-1-benzopyran-hemihydrate }; spontaneous locomotor activity; behavioral activity; learning and memory; analgesia

ONO-1078 是日本小野制药有限公司研制的半胱氨酰白三烯受体拮抗剂, 已在临床用于治疗哮喘^[1-4]。我们实验室最近发现该药能够有效地减轻大鼠和小鼠脑缺血损伤, 特别对脑缺血引起的白蛋白渗出和脑水肿有较好的效果, 提示具有治疗脑缺血潜在的应用价值^[5]。但是, 要用于治疗脑缺血还必须了解其对中枢神经的其它作用。兴奋性氨基酸 NMDA 受体拮抗剂 (如 MK801 等) 也具有较强的抗脑缺血作用, 但是由于可以引起精神-神经症状, 不能用于脑缺血治疗^[6,7]。为此, 我们对 ONO-1078 的一般神经药理作用作了观察。

1 材料与方法

1.1 药品

ONO-1078 { 4-氧-8-[对-(4-苯丁氧基)苯甲酰氨基]-2-(5-四唑基)-4H-1-苯并吡喃半水合物 }, 日本小野制药株式会社赠送; 地西洋 (江苏济川制药集团公司); 氢溴酸东莨菪碱 (宁波第二制药厂); 哌替啶 (沈阳第一制药厂), 其它药品均为市

售产品。

1.2 动物

ICR 小鼠, 雌雄兼用, 体重 18 ~ 23 g, 自由进食进水, 由浙江省医学科学院实验动物中心提供, 合格证号 96-201。

1.3 自发活动的测定

用本实验室开发的自发活动装置和计算机实时图像分析系统, 记录 30 min 小鼠运动路程, 分别腹腔注射地西洋 10 mg·kg⁻¹, 咖啡因 10 mg·kg⁻¹, ONO-1078 5.0, 1.0, 0.2 mg·kg⁻¹, 给药 10 min 后, 观察 30 min 内小鼠自发活动的变化。

1.4 运动及协调能力的测定

将实验动物分对照组 (生理盐水 10 mL·kg⁻¹); 地西洋组 2.0 mg·kg⁻¹; 戊巴比妥组 15 mg·kg⁻¹; ONO-1078 组 5.0, 1.0, 0.2 mg·kg⁻¹, 腹腔注射给药 10 min 后参照文献^[8], 从三个方面观察小鼠的运动及协调能力: ①木棒平衡实验 (balance

基金项目: 获国家自然科学基金项目 (No. 39770270)。

beam test) 在一根 60cm × 0.5cm × 0.5 cm 的横棒上观察其平衡的能力; ②竖板爬行实验 (inclined board test), 在一块 23.5cm × 17.5 cm 的有机玻璃板包一层铁丝网, 把小鼠置于板的底部, 待其爬至顶部时, 迅速将板翻转 180 度, 观察其转身并继续爬至顶部的能力; ③逃避实验 (beam walk test): 将小鼠置于一根 60cm × 1.0cm × 1.0 cm 的横棒上, 制造响声刺激, 观察小鼠从一端进入另一端暗室的逃避行为, 并记录所需时间。上述三个试验按表 1 方法作为行为学评分^[8], 分值越高, 其运动协调能力受损越严重。

表 1 小鼠运动协调能力评价标准

Tab 1 Scoring criteria of locomotion and coordination in mice

项目	评分	症状描述
木条平衡实验	0.0	能用四脚平衡在木棒上
	1.0	脚位于木棒的一侧, 但也能用脚站立
	2.0	一只脚或两只脚滑落
	3.0	三只脚滑落
	4.0	试图平衡, 但最终从棒上落下
	5.0	用单脚挂在横棒上, 然后落下
竖板爬行实验	0.0	根本不能站立, 立刻落下
	0.0	能转 180 身并继续爬行至顶部
	0.5	能攀在板上但不能爬行至顶部
	1.0	试图攀住, 但最终滑落
逃避实验	1.5	试图攀住, 但立刻滑落
	2.0	根本不能攀在板上, 立刻滑落
	0.0	4s 或小于 4s 到达暗室
	1.0	5 至 7s
	2.0	8 至 10s
	3.0	11 至 15s
	4.0	大于 15s
	5.0	不能逃避

1.5 中枢抑制作用的观察

腹腔注射生理盐水, 地西洋 10, 2mg·kg⁻¹, ONO-1078 5.0, 1.0, 0.2 mg·kg⁻¹, 间隔 15 min 后腹腔注射戊巴比妥阈下催眠剂量 30 mg·kg⁻¹, 观察 ONO-1078 对戊巴比妥睡眠时间的影 响, 以翻正反射消失达 1 min 以上为发生睡眠, 记录发生睡眠的动物只数及睡眠时间, 计算睡眠发生率。

1.6 学习记忆功能测定

1.6.1 水迷宫试验 (water maze test) 采用中国医学科学院药物研究所的水迷宫, 按文献[9]方法, 在水迷宫注满水, 水温 (25 ± 1) °C, 按困难程度的顺序递增训练小鼠, 从 A 点、B 点、C 点入水, 每次训练 120s, 记录到达终点所需时间。在限定时间内, 未达到终点者, 按 120s 记, 连续训练 5d, d6 训练前 15 min 给药, 腹腔注射被试药物 ONO-1078 5.0, 1.0, 0.2 mg·kg⁻¹, 生理盐水; 阳性对照东莨菪碱 3 mg·kg⁻¹。

1.6.2 跳台试验 (step down test) 小鼠置跳台仪上, 适应环

境 3 min 后, 底部栅板通电, 记录小鼠 5 min 内遭受的电击数 (错误次数), 电击前 15 min 给药, 分组同上。

1.7 镇痛作用测定

1.7.1 热板法 (hot plate test) 雌性小鼠预选合格后随机分组, 腹腔注射 ONO-1078 5.0, 1.0, 0.2 mg·kg⁻¹, 阳性对照为哌替啶 25 mg/kg, 生理盐水作空白对照, 给药后 15, 30, 60 min 记录小鼠自放在热板上至出现舐后足所需时间作为该鼠的痛阈值, 求出每组痛阈提高百分率。

1.7.2 扭体法 小鼠雌雄各半, 随机分组, 分组情况同热板法, 腹腔注射 0.6% 醋酸溶液 0.2 mL, 记录 15 min 内小鼠发生扭体次数。

1.8 统计

结果以 $\bar{x} \pm s$ 来表示, 组间差异用 *t* 检验。

2 结果

2.1 对自发活动的影响

表 2 结果显示, 在 ONO-1078 剂量为 5 mg·kg⁻¹ 时, 30 min 内的自发活动量低于对照组 (*P* < 0.05), 也比给药前 3d 平均活动量减少 (*P* < 0.05), 但 1, 0.2 mg·kg⁻¹ 对自发活动无明显影响; 咖啡因显著增加自发活动量 (*P* < 0.001); 地西洋也减少活动量 (*P* < 0.05), 与给药前 3d 相比平均活动量也减少 (*P* < 0.05)。

表 2 ONO-1078 对小鼠自发活动的影响

Tab 2 Influence of ONO-1078 on spontaneous locomotor activity in mice

药物及剂量 (mg·kg ⁻¹)	<i>n</i>	给药前 3d 平均活动量 (m)	给药后活动量 (m)
生理盐水	20	79.3 ± 38.2	75.7 ± 39.2
咖啡因	10 20	78.0 ± 38.2	142.2 ± 64.6 ⁽²⁾
地西洋	10 21	77.5 ± 37.3	43.1 ± 39.2 ^(1,3)
ONO-1078	5.0 11	78.0 ± 36.2	43.5 ± 29.5 ^(1,3)
	1.0 11	78.5 ± 38.2	53.4 ± 39.1
	0.2 11	79.6 ± 40.3	74.3 ± 41.8

注: ⁽¹⁾ *P* < 0.05, ⁽²⁾ *P* < 0.001 与生理盐水比; ⁽³⁾ *P* < 0.05 与给药前 3d 平均活动量比

Note: ⁽¹⁾ *P* < 0.05, ⁽²⁾ *P* < 0.001 vs saline, ⁽³⁾ *P* < 0.05 vs the average value in three days before administration

2.2 对运动及协调能力的作用

表 3 结果显示, 木条平衡实验中, 地西洋 (2 mg·kg⁻¹) 和戊巴比妥 (15 mg·kg⁻¹) 的评分增加 (*P* < 0.001); 竖板爬行实验中, 地西洋和戊巴比妥无影响; 逃避实验中, 地西洋对评分增加无统计意义 (*P* > 0.05); 戊巴比妥使评分增加 (*P* < 0.001); 地西洋和戊巴比妥使总分显著增加 (*P* < 0.001); ONO-1078 对三项实验评分及总分均无影响。

2.3 对催眠药作用的影响

表 4 显示, 腹腔注射地西洋 (10, 2.0 mg·kg⁻¹) 可使戊巴比妥阈下催眠剂量 (30 mg·kg⁻¹) 发生睡眠, ONO-1078 各个剂量则无此作用。

表 3 ONO-1078 对小鼠运动及协调能力的影响

Tab 3 Influence of ONO-1078 on locomotion and coordination in mice

药物及剂量 (mg·kg ⁻¹)	n	木条平衡试验	竖板爬行试验	逃避试验	总分	
对照	-	20	0.05 ± 0.22	0.05 ± 0.15	0.65 ± 0.81	0.75 ± 0.80
地西洋	2.0	20	0.70 ± 0.47 ¹⁾	0.00 ± 0.00	1.45 ± 1.14	2.15 ± 1.39 ¹⁾
戊西比妥	15.0	20	0.90 ± 0.55 ¹⁾	0.05 ± 0.22	2.50 ± 1.54 ¹⁾	3.45 ± 1.93 ¹⁾
ONO-1078	5.0	20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.10 ± 0.97	1.10 ± 0.97
	1.0	20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.80 ± 0.83	0.80 ± 0.83
	0.2	20	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.50 ± 0.69	0.50 ± 0.69

注: $\bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0.001$, 与对照比较

Note: $\bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0.001$, vs control

表 4 ONO-1078 对小鼠戊巴比妥(30 mg·kg⁻¹)睡眠时间的
影响

Tab 4 Influence of ONO-1078 on sleeping time Induced by pentobarbital (30 mg·kg⁻¹) in mice

药物及剂量 (mg·kg ⁻¹)	动物数	睡眠只数	睡眠发生率 (%)	睡眠时间 (s)
对照		0	0	0
地西洋	10	10	100	988 ± 391 ²⁾
ONO-1078	2.0	10	80	478 ± 422 ¹⁾
	5.0	10	0	0
	1.0	10	0	0
	0.2	10	0	0

注: $\bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$, 与对照比较

表 5 ONO-1078 对小鼠学习记忆功能的影响(水迷路实验 d6)

Tab 5 Influence of ONO-1078 on learning and memory in mice (sixth day of water maze test)

药物及剂量 (mg·kg ⁻¹)	n	A 点成绩(s)	B 点成绩(s)	C 点成绩(s)	
对照	-	10	8.9 ± 2.7	76.5 ± 34.1	83.3 ± 42.7
东莨菪碱	3.0	10	18.8 ± 11.9 ³⁾	100.1 ± 42.0	112.0 ± 20.6
ONO-1078	5.0	10	11.3 ± 4.3	69.1 ± 38.5	90.7 ± 32.5
	1.0	10	10.9 ± 5.5	52.3 ± 29.6 ²⁾	93.1 ± 28.3
	0.2	10	8.6 ± 3.6 ¹⁾	73.3 ± 30.1 ¹⁾	74.8 ± 32.6 ²⁾

注: ³⁾ $P < 0.05$ 与对照比; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 与东莨菪碱比

Note: ³⁾ $P < 0.05$ vs control; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ vs scopolamine

表 6 ONO-1078 对小鼠学习记忆影响(跳台法)

Tab 6 Influence of ONO-1078 on learning and memory in mice (step down test)

药物及剂量(mg·kg ⁻¹)	n	错误次数	
对照	-	10	2.80 ± 1.48
东莨菪碱	3.0	10	8.30 ± 3.37 ¹⁾
ONO-1078	5.0	12	3.92 ± 1.31
	1.0	10	2.70 ± 1.25
	0.2	10	3.90 ± 2.08

注: ¹⁾ $P < 0.001$ 与对照比较

Note: $\bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$, vs control

2.4 对学习记忆功能的影响

2.4.1 水迷路试验 表 5 显示, ONO-1078 低剂量 0.2 mg·kg⁻¹ 时, A, B, C 三点成绩与对照比无差异, 与阳性对照东莨菪碱比均有差异; ONO-1078 中剂量 1.0 mg·kg⁻¹, 则 B 点成绩与东莨菪碱比有明显差异 ($P < 0.01$)。东莨菪碱组 A 点出发到达终点时间长于对照组, 有记忆能力下降。

2.4.2 跳台试验 表 6 显示, 与对照比较, ONO-1078 (5.0, 1.0, 0.2 mg·kg⁻¹) 5 min 内错误次数增加不明显, 东莨菪碱组错误次数明显增加 ($P < 0.001$)。

Note: ¹⁾ $P < 0.001$ vs control

2.5 镇痛作用

2.5.1 热板法 表 7 显示, 与对照比, 哌替啶给药后痛阈增加, 持续至 60 min, 痛阈提高百分率有统计学差异; ONO-1078 痛阈给药前后无明显变化。

2.5.2 醋酸扭体法 表 8 显示, 与对照比, 哌替啶使醋酸诱发的小鼠扭体反应次数显著减少; ONO-1078 则无此镇痛效应。

表 7 ONO-1078 对小鼠热刺激痛阈提高百分率的影响

Tab 7 Influence of ONO-1078 on pain threshold enhancement rate induced by heat in mice

药物及剂量 (mg·kg ⁻¹)	n	给药后不同时间的痛阈提高百分率(%)		
		15 min	30 min	60 min
对照	8	0.09 ± 0.18	0.19 ± 0.21	0.25 ± 0.26
哌替啶	8	2.76 ± 1.13 ²⁾	2.59 ± 0.99 ²⁾	0.81 ± 0.64 ¹⁾
ONO-1078	8	0.23 ± 0.58	0.30 ± 0.42	0.44 ± 0.36
	8	0.24 ± 0.31	0.11 ± 0.30	0.10 ± 0.32
	8	0.14 ± 0.45	0.02 ± 0.29	0.08 ± 0.37

注: $\bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$ 与对照比较

Note: $\bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$ vs control

表 8 ONO-1078 对小鼠醋酸诱发扭体试验的影响

Tab 8 Influence of ONO-1078 on twisting test induced by acetic acid in mice

药物及剂量(mg·kg ⁻¹)	n	扭体次数(次)
对照	12	21.8 ± 5.5
哌替啶	10	1.7 ± 1.2 ¹⁾
ONO-1078	10	23.3 ± 4.4
	10	22.4 ± 4.4
	10	20.8 ± 4.5

注: $\bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0.001$ 与对照比较

Note: $\bar{x} \pm s$; ¹⁾ $P < 0.001$ vs control

3 讨论

本实验室首次证明 ONO-1078 在 0.01 ~ 1.0 mg·kg⁻¹ 范围内可减小小鼠^[5]和大鼠(未发表资料)局灶性脑缺血时的脑梗死体积和脑水肿,降低微血管渗漏,抑制神经元数量的减少。其中,最佳剂量在 0.1 mg·kg⁻¹ 左右,可对各种指标均有效;大于 0.3 mg·kg⁻¹ 保护作用反而降低,仅对脑水肿有较弱的抑制作用。实验观察 ONO-1078 对小鼠的一般精神神经药理作用,以确定对中枢神经的安全性,采用的剂量为 0.2 ~ 5.0 mg·kg⁻¹,为保护脑缺血损伤最佳剂量的 2 ~ 50 倍。

实验结果表明,ONO-1078 仅在较大剂量(5.0 mg·kg⁻¹) 时抑制小鼠自发活动;对运动及协调能力无明显影响,不增强戊巴比妥的催眠作用;在跳台法和水迷路试验中不造成学习记忆障碍;对物理和化学因素致痛无保护作用。这些结果说明 ONO-1078 在小鼠急性实验中,大于脑缺血治疗剂量时没有明显的精神神经作用。

ONO-1078 对半胱氨酰白三烯受体(cysLT-1 和 cysLT-2 亚型)有选择性拮抗作用,能够抑制抗原诱导的支气管痉挛、微血管渗漏^[1-3],已经在临床应用于哮喘治疗,称为 pranlukast^[4]。据临床前一般药理研究表明,除了静脉注射大剂量(>10 mg·kg⁻¹)可产生低血压反应之外,对心血管、呼吸、消化、泌尿、子宫、血液凝固系统无明显作用,亦对大鼠一般活动、小鼠戊巴比妥催眠及电惊厥无作用(小野公司内部资

料),但是,对精神-神经系统缺少系统研究。本研究在小鼠较为系统地证明该药对中枢神经系统具有较好的安全性,为今后应用于脑缺血损伤治疗提供了实验依据。

参考文献

- [1] Obata T, Nambu F, Kitagawa T, et al. ONO-1078: an antagonist of leukotrienes [J]. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res, 1987, 17A: 540.
- [2] Obata T, Kobayashi T, Okada Y, et al. Effect of a peptide leukotriene antagonist, ONO-1078 on antigen-induced airway microvascular leakage in actively sensitized guinea pigs [J]. Life Sci, 1992, 51(20): 1577.
- [3] Yoshida S, Ishizaki Y, Shoji T, et al. Effect of pranlukast on bronchial inflammation in patients with asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2000, 30(7): 1008.
- [4] Kohroggi H, Iwagoe H, Fujii K, et al. The role of cysteinyl leukotrienes in the pathogenesis of asthma: clinical study of leukotriene antagonist pranlukast for 1 year in moderate and severe asthma [J]. Respirology, 1999, 4(3): 319.
- [5] 曾玲晖,张纬萍,王仁定,等.白三烯拮抗剂 ONO-1078 对小鼠局灶性脑缺血的保护作用[J].药学学报,2001,36(2):148.
- [6] Loscher W, Wlaczek P, Szabo L. Focal ischemia enhances the adverse effect potential of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in rats [J]. Neurosci Lett, 1998, 240(1): 33.
- [7] Linden AM, Vaisanen J, Lakso M, et al. Expression of neurotrophins BDNF and NT-3, and their receptors in rat brain after administration of antipsychotic and psychotropic agents [J]. J Mol Neurosci, 2000, 14(1-2): 27.
- [8] Petullo P, Masonic K, Lincoln C, et al. Model development and behavioral assessment of focal cerebral ischemia in rats [J]. Life Sci, 1999, 64(13): 1199.
- [9] 张均田,石成璋,梅宝幸,等.“水迷宫”自动控制仪的研制及在神经药理研究中的应用 [J]. 药物分析杂志, 1991, 11(1): 23.

收稿日期:2001-5-23