

罗氟司特和齐留通对哮喘大鼠气道平滑肌收缩功能的影响

郑绪阳¹, 宋顺德², 洪燕云², 梅思斌², 张兴², 黄浩杰², 宋斌², 魏臻元², 景易彪², 汤慧芳² (1. 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院儿科, 杭州 310001; 2. 浙江大学医学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 通过观察磷酸二酯酶 4 抑制剂罗氟司特和 5-脂氧酶抑制剂齐留通对哮喘气道平滑肌收缩功能的影响, 探讨罗氟司特和齐留通对气道平滑肌的药理作用。方法 取正常及哮喘大鼠的气道平滑肌条, 采用乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)梯度累积给药进行肌条收缩功能研究, 并进行罗氟司特或齐留通梯度累积给药的肌条舒张功能研究, 同时设置药物预孵处理, 利用张力换能器和计算机生物信号采集系统观察和记录各种方式处理下其收缩功能的变化。结果 采用累积剂量给药法加入收缩剂 Ach(10^{-8} ~ 10^{-3} mol·L⁻¹)后, 正常大鼠和哮喘模型大鼠气道平滑肌收缩无显著性差异。由 Ach 诱发平滑肌条收缩达到最大程度, 采用累积剂量给药法加入罗氟司特或齐留通(10^{-8} ~ 10^{-3} mol·L⁻¹)后, 哮喘大鼠气道平滑肌对罗氟司特的敏感性高于正常大鼠, 而对齐留通的敏感性低于正常大鼠。使用罗氟司特预孵, 并采用累积给药法加入收缩剂 Ach(10^{-8} ~ 10^{-3} mol·L⁻¹), 哮喘大鼠气道平滑肌和正常大鼠对 Ach 的反应性无明显差异, 而齐留通预孵后, 累积给药法加入 Ach(10^{-8} ~ 10^{-3} mol·L⁻¹), 哮喘大鼠平滑肌对 Ach 的反应性明显高于正常健康大鼠。结论 罗氟司特能抑制哮喘气道平滑肌的收缩功能, 同时不诱导气道的高反应性, 而齐留通对哮喘气道平滑肌的收缩抑制作用不明显, 且可能诱导气道高反应性。

关键词: 罗氟司特; 齐留通; 哮喘; 大鼠; 气道平滑肌; 收缩功能; 乙酰胆碱

中图分类号: R962 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)03-0269-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.03.002

引用本文: 郑绪阳, 宋顺德, 洪燕云, 等. 罗氟司特和齐留通对哮喘大鼠气道平滑肌收缩功能的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 269-273.

Effect of Roflumilast and Zileuton on the Contraction of Airway Smooth Muscle of Asthmatic Rat

ZHENG Xuyang¹, SONG Shunde², HONG Yanyun², MEI Sibin², ZHANG Xing², HUANG Haojie², SONG Bin², WEI Zhenyuan², JING Yibiao², TANG Huifang² (1. Department of Pediatrics, Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310001, China; 2. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of PDE4 inhibitor(roflumilast) and 5-lipoxygenase inhibitor(zileuton) on the contraction of airway smooth muscle of asthma rat, and try to discuss their pharmacologic action on airway smooth muscle. **METHODS** Asthmatic and normal rats were executed for the airway smooth muscle strips. Gradual cumulative dose of acetylcholine(Ach) was used to study the contraction of muscle strips. Roflumilast or zileuton gradient cumulative administration or pre-incubation were used to study their diastolic and contractile function of muscle strips. Tension transducer, biological signal collecting system were used to record changes under various treatments. **RESULTS** Ach(10^{-8} ~ 10^{-3} mol·L⁻¹) could induce the contraction of airway smooth muscle of asthma rat and normal rat, there were no significant difference. The maximal contraction of smooth muscle was induced by Ach, and the sensitivity of airway smooth muscle to roflumilast in asthmatic rats after cumulative dose administration was higher than normal rats, while the sensitivity of airway smooth muscle to zileuton in asthmatic rats was less sensitive than that of normal rats. Using roflumilast pre-incubation and cumulative administration of the constrictor Ach(10^{-8} ~ 10^{-3} mol·L⁻¹), there was no significant difference in the reactivity of airway smooth muscle for Ach between normal rats and asthmatic rats. But pre-incubated with zileuton, after the cumulative administration of Ach (10^{-8} ~ 10^{-3} mol·L⁻¹), the reactivity of airway smooth muscle of asthmatic rats for Ach was more significant than that of normal rats. **CONCLUSION** Roflumilast can inhibit the contraction of airway smooth muscle of asthma rats. However, zileuton has no obvious inhibitory effect on the contraction of asthmatic airway smooth muscle and may induce airway hyperresponsiveness. **KEYWORDS:** roflumilast; zileuton; asthma; rat; airway smooth muscle; contraction; Ach

支气管哮喘是一种常见、多发的慢性炎症性肺疾病, 表现为气道壁嗜酸性粒细胞、肥大细胞等炎症细胞的浸润、气道高反应性以及结构重建。

全球哮喘患者约 3 亿人, 中国哮喘患者约 3 000 万人。哮喘在全球的发病率和致残率呈逐年增加趋势^[1]。罗氟司特为磷酸二酯酶 4(PDE4)选择性抑制

基金项目: 浙江省科技计划项目(2017C37132); 杭州市卫生科技计划项目(2014A01)

作者简介: 郑绪阳, 女, 硕士, 主治医师 Tel: (0571)56007041 E-mail: zxy780928@126.com

剂,能选择性抑制 PDE4,从而特异性抑制腺苷-3',5'-环化一磷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)水解生成相应的无活性的 5'核苷酸^[2],通过调节细胞内 cAMP 水平,阻断炎症反应信号传递,进而抑制如慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)和哮喘等呼吸道疾病对肺组织造成的损伤,是近年来上市的治疗 COPD 的一类新型药物。在多数情况下,平滑肌中 cAMP 含量升高可使其张力下降,反之则张力升高。其影响机制可能为:①导致膜的超极化^[3];②影响平滑肌细胞中 Ca^{2+} 浓度^[4];③影响肌肉收缩蛋白的磷酸化作用^[5]。因此 PDE4 抑制剂罗氟司特可能具有抑制气道平滑肌收缩的功能从而起到缓解哮喘症状的作用,但其对于哮喘和正常状态下的气道平滑肌功能的影响尚无明确报道。齐留通作为 5-脂氧酶抑制剂,通过抑制半胱氨酰白三烯的合成,可有效控制哮喘炎症发展过程^[6]。因此,本实验以哮喘和正常大鼠气道平滑肌为研究对象,旨在比较选择性 PDE4 抑制剂罗氟司特与齐留通对哮喘气道平滑肌收缩功能的影响,进一步了解 PED4 抑制剂在哮喘治疗中的价值。

1 材料和方法

1.1 动物

SD 大鼠 12 只,♂,由浙江大学动物实验中心提供,合格证号:SCXK(浙)2008-0033,清洁级。

1.2 药品试剂及仪器

卵白蛋白(批号:A5503)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach, 批号:A2661)、齐留通(批号:Z4277)均购自美国 Sigma;罗氟司特(济南诺康医药科技有限公司,批号:20120201)。试剂配制:Krebs-Henseleit buffer(K-H)液(NaCl 118 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, CaCl_2 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, MgSO_4 1.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaHCO_3 24.9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 1.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, KCl 4.7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, glucose 5.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, HEPEs 12.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); Ach 用生理盐水配制,浓度为 $10^{-6}\sim 10^{-1}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;罗氟司特用 DMSO 配制,浓度为 $10^{-6}\sim 10^{-1}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。齐留通以无水乙醇溶解,浓度为 $10^{-6}\sim 10^{-1}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。JZJ01 型张力换能器、HSS-1(B)恒温水浴箱、RM 6240 生物信号采集处理系统均购自成都仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 哮喘大鼠模型的制备 采用十点法,用新鲜配制的 0.2%卵白蛋白(10%新鲜制备的氢氧化铝

凝胶为佐剂)作皮下注射致敏,共 1 mL。从致敏后第 14 天起每天上午以 1%卵白蛋白溶液超声雾化 20~30 min 激发哮喘,连续激发 7 d。

1.3.2 大鼠离体气管片的制备 处死大鼠后,分离气管,置含氧的 K-H 液中,将气管软骨从正中剪开,横行剪成 3 mm 宽的气管片。将 3 个气管片缝合成 1 个样本待用,操作时必须保持气管片始终在含氧 K-H 液中。

1.3.3 仪器连接和参数设置 通过张力换能器连接 RM 6240 多道生理信号采集处理系统,采样参数:频率(800 Hz),时间常数(直流),滤波(30 Hz),灵敏度(1.5 g),扫描速度($10\text{ s}\cdot\text{div}^{-1}$)。在麦氏浴槽中加入 37 °C 恒温的 K-H 液 20 mL,并通入混合气体(95% O_2 /5% CO_2),每秒 4~6 个气泡,将气管片样本一端连于金属挂钩,另一端连接张力换能器与生物信号采集处理系统,调节仪器,使气管片静息张力为 0.5 g,在浴槽内稳定 30 min 后开始实验。

1.3.4 实验内容

1.3.4.1 Ach 对气管片的收缩作用 采用累计给药法,向浴槽中分别加入 200 μL Ach($10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach($10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach($10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach($10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach($10^{-2}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach($10^{-1}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),即 Ach 的终浓度为 $10^{-8}\sim 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,每次待收缩张力曲线稳定后再加药,记录不同浓度 Ach 下气管片的收缩张力幅度。以给药前的收缩张力为基线 0, $10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ach 终浓度时的收缩张力为 100%。

1.3.4.2 齐留通或罗氟司特对气管片的舒张作用 由 $10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ach 诱发气管片收缩达到最大程度,采用累积剂量给药法向浴槽中分别加入 200 μL 齐留通($10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL 齐留通($10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL 齐留通($10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL 齐留通($10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL 齐留通($10^{-2}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL 齐留通($10^{-1}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),每次待收缩张力曲线稳定后再加药,记录不同浓度齐留通下气管片的舒张幅度。同上累积剂量给药法加入罗氟司特(终浓度 $10^{-8}\sim 10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),分别记录各浓度水平下气管片舒张活动的变化。

1.3.4.3 齐留通或罗氟司特预孵后 Ach 对气管片收缩作用的影响 用预热的 K-H 液清洗浴槽数次,至气管片张力恢复至实验前,加入 20 mL K-H 液稳定 10 min。再加入 200 μL 齐留通

($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 终浓度 $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)或 200 μL 罗氟司特($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 终浓度 $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)预孵 5 min 后累计给药, 向浴槽中分别加入 200 μL Ach ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach ($10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach ($10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、180 μL Ach($10^{-1} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每次待收缩张力曲线稳定后再加药, 记录齐留通和罗氟司特预孵后加不同浓度 Ach 气管片的收缩张力幅度, 以给药前的收缩张力为基线 0, $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ach 终浓度时的收缩张力为 100%。

1.4 数据采集与统计

所有数据经 Excel 软件处理, 经 GraphPad Prism 5 作图, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, n 代表实验组数统计分析, 行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 哮喘大鼠和正常大鼠对 Ach 收缩反应的比较

采用累积剂量给药法加入收缩剂 Ach($10^{-8} \sim 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)后, 以给药前的收缩张力为基线 0, $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ach 时的收缩张力为 100%。正常大鼠平滑肌收缩百分比($10^{-8} \sim 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ach)分别为 (0.125 ± 0.337)%, (1.20 ± 0.02)%, (1.79 ± 2.77)%, (17.83 ± 12.75)%, (59.77 ± 9.72)%, 与给药前相比, $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ach 起收缩百分比即有显著性差异 ($P < 0.05$); 哮喘模型大鼠平滑肌收缩百分比 ($10^{-8} \sim 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ach) 分别为 (0.03 ± 0.05)%, (0.44 ± 0.86)%, (1.75 ± 2.59)%, (19.93 ± 13.35)%, (59.95 ± 11.28)%, 与给药前相比, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ach 起收缩百分比即有显著性差异 ($P < 0.05$)。在 Ach 刺激下, 正常大鼠的 ED_{50} (以 10 的负对数计)为 (4.31 ± 0.24) $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而哮喘大鼠的 ED_{50} (以 10 的负对数计)为 (4.24 ± 0.18) $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 两者比较虽无显著性差异, 但在低剂量 Ach 刺激时, 哮喘大鼠的气道平滑肌的反应性较正常大鼠弱, 可能与大鼠在哮喘状态时对 Ach 的反应障碍有关。结果见图 1。

2.2 药物干预实验

由 Ach 诱发平滑肌条收缩达到最大程度, 采用累积剂量给药法加入 PDE4 抑制剂罗氟司特($10^{-8} \sim 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)后, 正常大鼠平滑肌舒张百分比分别为 (4.77 ± 9.54)%, (29.76 ± 25.49)%, (50.14 ± 42.44)%, (61.73 ± 45.34)%, (77.96 ± 36.67)%, (106.25 ± 5.21)%, 与给药前相比, $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 罗氟司特起舒张百分比即有高度显著性差异 ($P < 0.01$);

哮喘模型大鼠平滑肌舒张百分比分别为 (9.39 ± 9.83)%, (38.96 ± 21.82)%, (86.49 ± 13.60)%, (104.85 ± 7.89)%, (111.21 ± 7.92)%, (111.21 ± 7.92)%, 与给药前相比, $10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 起舒张百分比即有显著性差异 ($P < 0.05$)。另外组间比较有显著性差异, 提示哮喘大鼠气道平滑肌对罗氟司特的敏感性优于正常组。结果见图 2。

累积剂量法给予齐留通, 也出现明显的抑制效应。在齐留通($10^{-6} \sim 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)时, 正常大鼠的舒张百分比分别为 (60.39 ± 15.41)%, (84.39 ± 12.9)%, (95.31 ± 6.04)%, 而哮喘大鼠舒张百分比分别为 (44.01 ± 9.81)%, (69.68 ± 9.08)%, (83.37 ± 10.93)%。对正常大鼠, 齐留通的 ED_{50} 为 (6.54 ± 0.72) $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 10 的负对数计), 而对哮喘大鼠, 齐留通的 ED_{50} 为 (5.64 ± 0.61) $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 10 的负对数计), 两者比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。提示哮喘大鼠气道平滑肌对齐留通的敏感性不如正常组。结果见图 2。

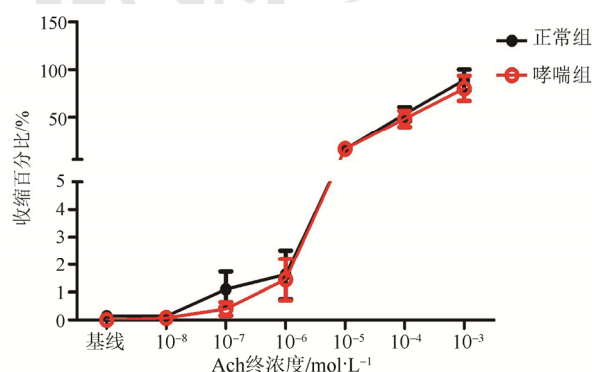


图 1 不同浓度 Ach 对大鼠气道平滑肌收缩的影响($n=6$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of Ach on the contraction of airway smooth muscle in rats($n=6$)

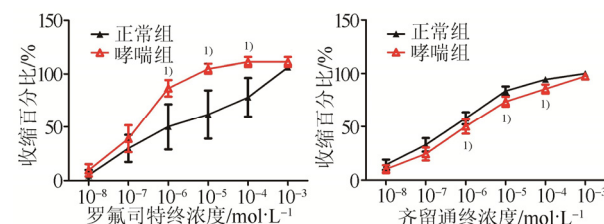


图 2 罗氟司特及齐留通对 Ach 诱导大鼠气道平滑肌收缩的舒张作用($n=6$)

与正常组比, $^{1)}P < 0.05$ 。

Fig. 2 Diastolic function of roflumilast and zileuton on Ach induced contraction of airway smooth muscle in rats($n=6$) Compared with the normal group, $^{1)}P < 0.05$.

2.3 药物预孵实验

使用罗氟司特 $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预孵, 并采用累积

剂量给药法加入收缩剂 Ach(10^{-8} ~ 10^{-3} mol·L⁻¹)后,以给药前的收缩张力为基线 0, 10^{-3} mol·L⁻¹ 时的收缩张力为 100%。正常大鼠平滑肌收缩百分比(10^{-8} ~ 10^{-4} mol·L⁻¹ Ach)分别为(3.87±10.94)%, (3.87±10.31)%, (5.64±9.31)%, (27.36±14.92)%, (72.60±14.72)%, 与给药前相比, 10^{-5} mol·L⁻¹ 起收缩百分比有高度显著性差异($P<0.01$); 哮喘模型大鼠平滑肌收缩百分比(10^{-8} ~ 10^{-4} mol·L⁻¹ Ach)分别为(5.00±15.81)%, (7.50±23.72)%, (11.74±23.48)%, (37.13±28.09)%, (76.55±20.90)%, 与给药前相比, 10^{-5} mol·L⁻¹ 起收缩百分比有高度显著性差异($P<0.01$), 提示罗氟司特预孵并不明显影响气道平滑肌对 Ach 的反应性。结果见图 3。

使用齐留通 10^{-4} mol·L⁻¹ 预孵后, Ach 再次刺激, 在 Ach 浓度为 10^{-4} mol·L⁻¹ 时正常大鼠的收缩百分比为(25.79±24.12)%, 哮喘大鼠收缩百分比为(52.03±13.93)%, 两者比较有显著性差异($P<0.05$)。正常大鼠的 ED₅₀(以 10 的负对数计)为(2.41±1.96)mol·L⁻¹, 而哮喘大鼠的 ED₅₀(以 10 的负对数计)为(4.11±0.41)mol·L⁻¹, 两者比较有显著性差异($P<0.05$)。提示齐留通预孵会上调气道平滑肌对 Ach 的反应性。结果见图 3。

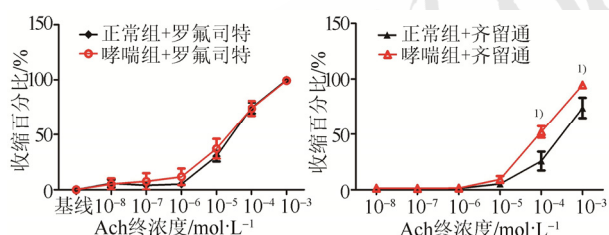


图3 齐留通及罗氟司特预孵对 Ach 诱导的大鼠气道平滑肌收缩功能的影响($n=6$)
与正常组比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of zileuton and roflumilast pretreatment on Ach induced rat airway smooth muscle contractile function ($n=6$)

Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$.

3 讨论

支气管哮喘的病因大多认为与多基因遗传有关, 并与环境因素相互作用。环境因素中主要为某些激发因素, 包括各种吸入物(尘螨、花粉、真菌、二氧化硫等)、多种病原体所致的感染、食物、药物、气候变化、妊娠等^[7]。多数学者认为哮喘主要与变态反应、气道炎症、气道高反应性及神经因素等相互作用有关。其中, 气道炎症被认为是哮喘的本质。过敏原经呼吸道或其他途径进入机

体后, 可激活 T 淋巴细胞并使其分化为 Th1、Th2, 同时释放多种白细胞介素, Th2 可释放 IL-4、IL-5。IL-4 可促进 B 细胞增殖、分化, 形成浆细胞, 产生 IgE, IgE 与肥大细胞、嗜酸性粒细胞表面的高亲和力 IgE 受体结合。IL-5 可选择性促进嗜酸性粒细胞分化, 并使其激活, 参与过敏反应。当过敏原再次进入体内, 可与肥大细胞、嗜碱性粒细胞表面的 IgE 相结合, 并使该细胞合成释放多种炎症介质导致平滑肌收缩, 黏液分泌增加, 血管通透性增强^[1]。

在哮喘中, 气管与支气管的剧烈收缩往往是由于气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)对多种刺激因素的敏感性升高, 也表现为支气管收缩剂引起的 ASMCs 收缩程度升高。ASMCs 除具有维持通气, 增加肺泡通气量, 保护肺泡免受有害气体损害等生理功能外, 它的增生和肥大可引起气道结构重建, 直接影响哮喘患者气道高反应性的产生^[8]。本次实验中, 在 Ach 刺激下, 哮喘模型大鼠与正常大鼠相比, ED₅₀ 没有显著性差异, 即哮喘大鼠与正常大鼠对于收缩剂 Ach 的敏感度没有明显差异, 但从两者的张力曲线趋势中, 可以看出对于同一浓度的 Ach, 哮喘大鼠对低剂量 Ach 反应性较正常大鼠稍弱, 见图 1。支气管平滑肌受副交感神经与交感神经双重神经支配, 根据所释放递质的不同, 将副交感神经与交感神经分为胆碱能神经和去甲肾上腺素能神经 2 大类。Ach 吸入后直接与 ASMCs 上的 M 胆碱受体结合而使平滑肌收缩, 同时 Ach 还作用于腺体、血管, 使黏液分泌增加, 血管扩张。传统观点认为 Ach 主要引起大气道的收缩, 从而改变气道管径。很多研究对此提出了质疑。Brown 等^[9]利用高分辨 CT 技术证明雾化吸入 Ach 引起狗的大、小气道收缩的程度没有明显差别。另外, 过敏原诱发的支气管动物模型中 M2 mAChR 发生了功能障碍。在过敏原诱发支气管哮喘的豚鼠模型中, 嗜酸性粒细胞造成了 M2 mAChR 丧失功能。因为发现这种豚鼠模型中, 嗜酸性粒细胞可以通过自身表面的 CD11/18 和神经纤维上表达的细胞间黏附分子(ICAM-1)和血管黏附分子(VCAM-1)相互作用, 聚集到气道神经节周围和沿着神经纤维周围, 影响 M2 受体的功能^[10]。这可部分解释哮喘大鼠气管片对低剂量 Ach 反应性比正常大鼠稍弱的实验结果。

哮喘发病中,许多炎症介质参与气管炎症变化,但仅有白三烯类调节药物有较好的抗哮喘作用。白三烯类是花生四烯酸经 5-脂氧合酶代谢后的产物,其中 LTB₄ 与炎症细胞趋化有关;半胱氨酰白三烯类与产生炎症效应有关。目前,作用于临床的本类药物有半胱氨酰白三烯受体 1 拮抗药和 5-LOX 抑制药两类,统称为白三烯调节药。齐留通为 5-脂氧酶抑制药,除了具有抑制半胱氨酰白三烯类作用外,还能抑制 LTB₄^[6]。齐留通通过抑制脂氧酶而拮抗白三烯合成。白三烯是四烯酸经脂氧酶途径合成的高活性炎性物质,在哮喘发病过程中起重要作用。齐留通的作用机制是通过抑制白三烯的合成来有效控制哮喘炎症的发展过程,作为抗哮喘病的全新类别药物,齐留通具有一定的气管保护、气管扩张和抗炎作用,与本次实验结果相符。但本次实验中发现,齐留通预孵后下,哮喘模型大鼠与正常大鼠的 ED₅₀ 相比,有显著性差异($P<0.05$),哮喘大鼠对于 Ach 的敏感性强于正常大鼠,提示有可能诱导气道高反应。

罗氟司特为 PDE4 选择性抑制剂,能特异性抑制 cAMP 和 cGMP 水解生成相应的无活性的 5'核苷酸,从而调节细胞内 cAMP 和 cGMP 水平,抑制气管收缩。除了抗炎作用,PDE4 抑制剂的药理机制还包括气道平滑肌的松弛和抗增殖作用,体外实验中 PDE4 抑制剂可以逆转人气道平滑肌的张力,可能的机制有:①直接升高细胞内 cAMP 含量;②与肾上腺素 β_2 受体激动剂协同;③调节气道壁内非胆碱能非肾上腺能神经元的活性;④抑制 IgE/IgG 依赖的介质释放。在动物实验中,PDE4 抑制剂还可逆转 5-羟酪氨酸或组胺诱导的支气管收缩^[11]。本次实验中,罗氟司特能够有效抑制 Ach 刺激的正常大鼠平滑肌和哮喘大鼠组平滑肌的收缩,而且对哮喘大鼠平滑肌作用显著。在罗氟司特预孵实验,正常大鼠和哮喘大鼠组平滑肌的收缩百分比与给药前的收缩百分比相比都显著性升高,Ach 的 ED₅₀ 均无显著性差异,说明对 Ach 的敏感性相当。在预孵实验中,哮喘大鼠的平滑肌产生显著性收缩的 Ach 浓度均为 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,高于没有预孵时的 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,在一定程度上说明使用罗氟司特药物预孵后,哮喘

小鼠的平滑肌细胞对收缩诱导因素的反应都是敏感度有所下降,提示罗氟司特在哮喘的预防有一定的作用。

综上,本实验结果发现罗氟司特能抑制哮喘气管平滑肌的收缩功能,同时不诱导气道的高反应性,而齐留通对哮喘气道平滑肌的收缩抑制作用不明显,且可能诱导气道高反应性。这一结果可为 PDE4 抑制剂罗氟司特临床治疗和预防哮喘提供一定参考依据。

REFERENCES

- [1] ANDERSSON C, BONVINI S J, HORVATH P, et al. Research highlights from the 2017 ERS international congress: airway diseases in focus [J]. ERJ Open Res, 2018, 4(1): 163-2017. Doi: 10.1183/23120541.00163-2017.
- [2] DAVID M, ESSAYAN M D. Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology cyclic nucleotide phosphodiesterases [J]. J Allerg Clin Immunol, 2001(108): 671-680.
- [3] ZHOU J, IWASAKI S, YAMAKAGE M. Time- and dose-dependent effects of desflurane in sensitized airways [J]. Anesth Analg, 2017, 124(2): 465-471.
- [4] LI Z, ZENG B H, WANG H Y, et al. Microbiota modulates behavior and protein kinase C mediated cAMP response element-binding protein signaling [J]. Sci Rep, 2016(6): 29998.
- [5] MORALES S, CAMELLO P J, MAWE G M, et al. Cyclic AMP-mediated inhibition of gallbladder contractility: role of K⁺ channel activation and Ca²⁺ signaling [J]. Br J Pharmacol, 2004, 143(8): 994-1005.
- [6] CINGI C, MULUK N B, IPCI K, et al. Antileukotrienes in upper airway inflammatory diseases [J]. Curr Allergy Asthma Rep, 2015, 15(11): 64.
- [7] VERCELLI D. Gene-environment interactions in asthma and allergy: the end of the beginning? [J]. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2010, 10(2): 145-148.
- [8] MAKINDE T, MURPHY R F, AGRAWAL D K. The regulatory role of TGF-beta in airway remodeling in asthma [J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85(5): 348-356.
- [9] BROWN R H, GEORGAKOPOULOS J, MITZNER W. Individual canine airways responsiveness to aerosol histamine and methacholine *in vivo* [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(2): 491-497.
- [10] KINGHAM P J, MCLEAN W G, SAWATZKY D A, et al. Adhesion-dependent interactions between eosinophils and cholinergic nerves [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(6): L1229-L1238.
- [11] GALE D D, HOFER P, SPINA D, et al. Pharmacology of a new cyclic nucleotide phosphodiesterase type 4 inhibitor, V11294 [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2003, 16(2): 97-104.

收稿日期: 2018-03-20

(本文责编: 李艳芳)