

· 论 著 ·

硝普钠松弛气管平滑肌作用与巯基的关系

117 医院 药 理 室 冯友根

浙江医科大学药理教研室 卞如濂

提要 豚鼠离体气管片经利尿酸(50 μ g/ml)孵育1小时后,对硝普钠的反应性显著降低($P<0.05$, $n=4$);豚鼠气管纵行平滑肌用氯化汞(50 μ g/ml)孵育后,组织中可测定的-SH基含量显著减少($P<0.01$, $n=4$),同时,硝普钠松弛气管平滑肌的作用也几乎完全消失,而加入1:1000二巯基丁二酸钠,又可使氯化汞对硝普钠的抑制作用逆转,表明硝普钠松弛气管平滑肌的作用与组织中的-SH基有关。本文讨论了硝普钠与组织中-SH结合后引起平滑肌松弛作用机制的二种假设。

硝普钠对血管及气管平滑肌有松弛作用,是众所周知的。最近,我们发现,硝普钠对豚鼠离体气管平滑肌的作用强度与异丙肾上腺素相似;对豚鼠组胺和乙酰胆碱性哮喘及狗过敏性哮喘具有保护作用^[1]。临床应用的观察表明,硝普钠对各种哮喘有一定疗效。有人认为硝普钠对血管的作用与提高cGMP水平有关,而对cAMP水平没有影响,选择性磷酸二酯酶抑制剂能增强硝普钠的作用^[2]。但是,最近实验证明,硝普钠在 3.4×10^{-9} M浓度时明显提高豚鼠气管平滑肌cAMP的含量,这一剂量与它直接松弛豚鼠离体气管平滑肌的阈剂量(1×10^{-9} M)接近,提示其对气管平滑肌的作用可能与提高cAMP水平有关^[1]。然而,硝普钠松弛平滑肌作用的确切机理仍不清楚。本实验目的在于探讨硝普钠松弛气管平滑肌作用与组织中巯基的关系。

材料和方法

一、材料:健康豚鼠,体重300~450g,雌雄均可。5,5'-二巯代双(2-硝基苯)甲酸(DTNB, Carl Roth KG生产),硝普钠、利尿酸、氯化汞、氨甲酰胆碱、L-半胱氨酸、

二巯基丁二酸钠均为国产品。

二、豚鼠离体气管片的制备和描记:按照Akcanis氏法制备豚鼠离体气管片^[3],将每只豚鼠气管平分为六段,按1、3、5和2、4、6次序,将每三段连成一串,制成二个适宜作平行对照试验的豚鼠离体气管片标本。然后,将标本置于盛有5ml克一亨氏营养液的离体器官浴槽中固定,恒温37℃,通氧气,稳定1小时(负荷1~1.5g)后,通过张力换能器,用自动平衡记录仪描记气管平滑肌张力变化。

三、气管平滑肌中巯基含量的测定:按照Ellman法^[4],通过与DTNB反应,测定气管平滑肌中巯基的含量。在15ml试管中,加入克一亨氏营养液2ml,然后加入刚处死的豚鼠的气管纵行平滑肌(大约20mg湿重),37℃时通氧气孵育1小时后,加入1:100氯化汞溶液10 μ l(使溶液中氯化汞浓度为大约50 μ g/ml),继续孵育15分钟。然后加入DTNB 40 μ l(10mM),摇动试管反应5分钟。将溶液倾入离心管,离心(3000转/分,10分钟),在412nm波长处测定吸收度。用L-半胱氨酸作为巯基来源制备标准曲线,计算每克组织中-SH基的含量。

结 果

一、利尿酸对硝普钠作用的影响

用 $0.025\mu\text{g/ml}$ 氨甲酰胆碱, 使气管标本达到最大收缩以后, 用 $10^{-8}\sim 10^{-4}\text{M}$ 硝普钠, 得到气管松弛反应的累积剂量—反应曲线。然后, 用克—亨氏液换洗 4~6 次 (每 10~15 分钟一次), 再以 $50\mu\text{g/ml}$ 利尿酸孵育 1 小时, 得到第二个剂量—反应曲线。图 1 表示用利尿酸孵育和不用利尿酸的四组气管标本前后两次硝普钠剂量—反应曲线的比较。经 $50\mu\text{g/ml}$ 利尿酸孵育 1 小时后气管平滑肌对硝普钠的反应性, 与孵育前相比较, 在浓度为 $10^{-7}\sim 10^{-4}\text{M}$ 时均有显著性差异, 说明利尿酸孵育后的气管平滑肌对硝普钠的反应性显著降低。而不用利尿酸孵育的气管标本对硝普钠的反应性, 在换洗前后无显著差异。

二、氯化汞对硝普钠作用的影响

豚鼠气管标本在 37°C 通氧气的克——亨

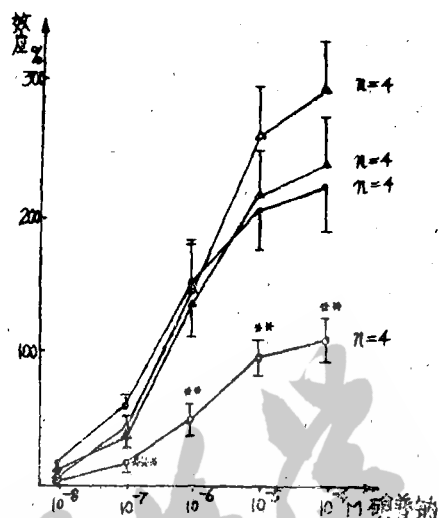
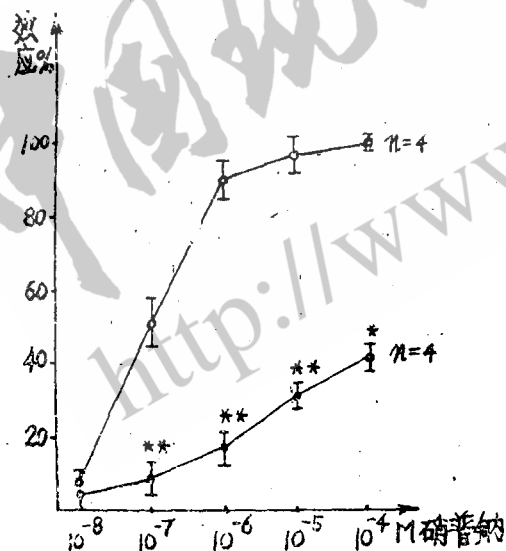


图 1 利尿酸($100\mu\text{g/ml}$)孵育前后硝普钠引起气管平滑肌松弛效应的比较

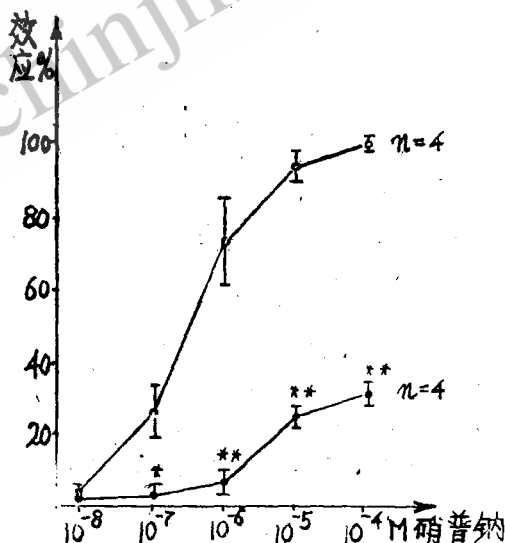
△ 利尿酸孵育前的反应曲线; ○ 利尿酸孵育后的反应曲线; ▲ 对照组换洗前的反应曲线; ● 对照组换洗后的反应曲线。

*** $P<0.001$; ** $P<0.01$, $n=4$

氏液中平衡 1 小时后, 用氯化汞($100\mu\text{g/ml}$)孵育 15 分钟, 在张力曲线稳定后, 得到硝普



a



b

图 2 氯化汞对硝普钠引起气管平滑肌直接松弛作用的影响

a. 氯化汞($100\mu\text{g/ml}$)孵育后气管平滑肌对硝普钠反应性的变化; ● 对照组反应曲线; ○ 加入氯化汞后的反应曲线; b. 二巯基丁二酸钠对氯化汞作用的逆转; ● 单用氯化汞; ○ 氯化汞加二巯基丁二酸钠(1mg/ml)。

* $P<0.05$; ** $P<0.01$, $n=4$

钠对气管平滑肌直接松弛作用的剂量——反应曲线。从图 2-a 可以看出,豚鼠气管平滑肌在孵育后对硝普钠的反应性显著降低。

三、二巯基丁二酸钠对氯化汞抑制作用的逆转

用氯化汞孵育15分钟后的豚鼠气管标本,加入1:1000二巯基丁二酸钠,继续孵育20分钟,在张力曲线稳定后,得到硝普钠直接松弛气管平滑肌的剂量——反应曲线。从图 2-b 看出,氯化汞对硝普钠引起的气管平滑肌直接松弛的抑制作用,能被二巯基丁二酸钠完全逆转。和不加二巯基丁二酸钠的对照组较,有显著性差异(10^{-7} M 时 $P<0.05$; 10^{-6} M 时 $P<0.01$; 10^{-5} M 时 $P<0.01$; 10^{-4} M 时 $P<0.01$, $n=4$)。

四、氯化汞对气管平滑肌中-SH 基含量的影响

豚鼠气管纵行平滑肌预先用氯化汞(50 μ g/ml)孵育15分钟,再以Ellman法测定-SH基含量,发现组织中可测定的-SH基几乎完全消失($0.035\pm0.07\mu$ M/g 湿重组织)与对照组测得的值($0.91\pm0.20\mu$ M/g 湿重组织)相比较,有显著性差异($P<0.01$, $n=4$)。

讨 论

硝酸甘油能使预先用去甲肾上腺素收缩的兔主动脉条松弛,这种作用依赖于组织中巯基的存在^[5]。用利尿酸使组织中巯基烷基化后,组织中可滴定的-SH基显著减少,同时,血管平滑肌对硝酸甘油的反应性显著降低,而去甲肾上腺素引起兔主动脉条收缩的作用不受利尿酸的影响^[6]。利尿酸的这种作用并不是对硝酸甘油特异性的,它也能明显降低血管条对硝普钠的反应性。在我们另一实验中,也证实利尿酸能和巯基结合^[7]。由于利尿酸本身能使气管平滑肌张力降低,因此,难以比较利尿酸对硝普钠引起气管平滑肌直接松弛作用的影响。然而,利尿酸不影

响氨甲酰胆碱引起气管平滑肌收缩的作用。在本实验中,氨甲酰胆碱引起收缩的气管平滑肌,在利尿酸孵育后,对硝普钠的反应显著降低,这可能是由于利尿酸使气管平滑肌中巯基烷基化后的结果。也就是说,硝普钠松弛被氨甲酰胆碱收缩的气管平滑肌的作用,可能依赖于组织中巯基的存在。虽然利尿酸和-SH基的结合不能通过换洗溶液被解除,也不能被巯基复活剂逆转^[6],但根据我们初步试验,利尿酸的这一作用能被DTNB竞争^[7]。

HgCl₂是一种强的巯基酶抑制剂。Needleman不用HgCl₂进行试验,是因为汞剂不但抑制硝酸甘油引起的松弛平滑肌作用,也可能抑制去甲肾上腺素引起的血管平滑肌收缩反应^[5]。本实验用氯化汞(50 μ g/ml)显著地抑制了气管平滑肌中的巯基,同时,硝普钠引起的气管平滑肌的直接松弛作用也几乎完全消失,而加入1:1000二巯基丁二酸钠又可使这一作用逆转。这些证据进一步说明,硝普钠对气管平滑肌的直接松弛作用与组织中-SH基的存在有关。

至于硝普钠如何通过巯基有关的过程引起平滑肌的松弛,有待进一步实验阐明。近来,Ignarro等^[8]提出硝普钠作用机制的假设。他们认为硝普钠能自动地释放NO,并和组织中-SH基结合,生成S-亚硝基硫醇,再经过一些中间环节,最终引起平滑肌松弛。当然,也存在另一种可能,即硝普钠引起含-SH基的受体活性部位中巯基化物——二硫化物互变(Thiol/Disulfide Exchange),从而产生一系列与CAMP水平的改变有关的生物学效应。此外,硝普钠其它的作用途径和机理仍有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 卞如源等;硝普钠平喘作用的观察 中华结核和呼吸系疾病杂志,待发表。