

青蒿琥酯对豚鼠气管平滑肌的影响

秧茂盛^① 肖建初

(中山医科大学药理学教研室; 广州, 510089)

摘要 青蒿琥酯能松弛豚鼠气管平滑肌, 并能非竞争性拮抗乙酰胆碱、组织胺的缩气管作用。β 肾上腺素受体阻断剂噻吗洛尔不能阻断青蒿琥酯的松弛气管作用; 青蒿琥酯对豚鼠气管组织腺苷酸环化酶活性呈药物浓度依赖性明显的激活作用。在一定剂量范围内, 药物浓度与酶的激活作用呈明显的线性关系。提示青蒿琥酯松弛气管作用与激活腺苷酸环化酶有关。

主题词 青蒿素/类似物和衍生物; 青蒿素/药理学; 琥珀酸盐/药理学; 气管/药物作用; 腺苷酸环化酶/药物作用

中图分类号 R 974

青蒿琥酯是青蒿素的衍生物。青蒿素的作用较广, 其作用机制、作用特点和应用研究仍处于初级阶段。青蒿素有独特的抗疟、抗炎、抗病毒^[1, 2]作用, 还有一定的平喘、镇咳、祛痰作用^[2]。青蒿琥酯抗疟效价超过青蒿素, 且具有阻断钙依赖性氯电流作用^[3], 因而可能也具有平喘作用。近年来国内外文献未见青蒿琥酯对气管平滑肌作用的报道。为此, 作者研究青蒿琥酯对豚鼠气管平滑肌张力及对气管组织腺苷酸环化酶活性的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂与药物

青蒿琥酯(artesunate ART), 广西桂林第二制药厂, 批号 940602; 盐酸异丙肾上腺素(ISP), 上海天丰药厂, 批号 9112011; 氯化乙酰胆碱(ACh), 上海试剂二厂, 批号 931214; 马来酸噻吗洛尔(timolol Tim), 天津市中央制药厂, 批号 950505; 磷酸组胺酸(His), 中科院上海生化所; ATP(SERVA); EGTA(Sigma); Tris-HCl(FARCO); 牛血清白蛋白(Fluka); 茶碱(theophyllin); r-¹²⁵I-cAMP 放免药盒, 上海中医药大学同位素室; 其余试剂均为市场销售的分析纯试剂。

1.2 气管螺旋条的制备及气管张力测定

选用本校实验动物中心饲养的 250~350 g 豚

鼠, 雌雄不拘。击头处死, 立即取出全部气管, 放入盛有氧气的(持续供给 95% O₂+5% CO₂)Thornton 平衡盐溶液的平皿中。按螺旋形将气管剪成条索状, 宽度约为 2~3 mm, 并剪成 3 段, 每段长约为 2 cm 作为一个标本。将标本放入盛有 Thornton 液的 10 ml 离体气管浴槽中, 下端固定于玻璃通气钩上, 上端用线连至拉力换能器, 温度恒定在 37 °C, 持续给予 95% O₂+5% CO₂, 初始负荷调节在 1.5 g。标本平衡 2 h, 期间每 15 min 换液 1 次, 待基线稳定后, 用累积给药法观察药物的效应; 用双笔台式自动平衡记录仪(型号 XWTD-264, 上海大华仪表厂)记录张力的变化。

1.3 气管组织匀浆腺苷酸环化酶(AC)活性的测定

1.3.1 豚鼠气管组织匀浆制备 用本校实验动物中心饲养的 250~350 g 豚鼠, 雌雄兼用, 击头处死, 立即取出气管, 用冰冷生理盐水冲洗两次后, 滤纸吸干, 称重, 按 $w(\text{tris})=0.5\%$ 加预冷的缓冲液, 冰浴下用玻璃匀浆器手动匀浆。此匀浆称气管组织 AC 制备物。

1.3.2 AC 活性的测定 反应系统缓冲液 pH 7.4 内含 50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L MgSO₄, 25 mmol/L 茶碱, 1 mmol/L EGTA, 5 mmol/L ATP。根据实验目的加入试验药物及 AC 制备物(加入 100 μL。AC 制备物, 约含蛋白 35 μg)。反应最终溶积为 500 μL。上述操作在冰浴下进行。加入 ATP

^① 第一作者, 1965 年出生, 男, 硕士, 助教。现在广东医学院药理学教研室(湛江, 524023)

后立即移到 37 °C 水浴, 温育 15 min, 然后置沸水浴 (98 ~ 100 °C) 3 min 以终止反应。冷却后经 3500 r/min (半径 15 cm) 离心 15 min, 取出上清, 待测 cAMP。每批实验, 每一药物浓度均设复反应管, 并始终跟随一个空白对照系统, 即其中的 AC 制剂预置沸水浴 3 min 灭活后再参与酶促反应。AC 制备物的蛋白含量按 Lowry 法测定。cAMP 含量按蛋白竞争结合法测定, 以反应管的 cAMP 量减去空白对照管的环磷腺苷 cAMP 量为 AC 催化生成的 cAMP 量, 用 $\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 表示 AC 活性 (A)。我们所用的药物反应值和基础值均系同一份 AC 制备物取相同量参与反应, 故计算各实验组相对 AC 活性时均用实验值 (生成的 cAMP 量 $\text{pmol} \cdot (\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$) 与基础值 (生成的 cAMP 量, 单位为 $\text{pmol} \cdot (\text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$) 求出相对活性 $\% = (\text{实验值} / \text{对照值}) \times 100\%$ 。

1.4 统计分析

所有资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。药物的作用以 Scott 法求半效浓度 (EC_{50} , mol/L), 其负对数即为 pD_2 (亲和力指数); 竞争性拮抗剂用 Schild 法求其 pA_2 (拮抗指数); 非竞争性拮抗时, 求出激动剂量效曲线压低 50% 时的非竞争性拮抗剂浓度 (mol/L), 进而求其负对数即为 pD_2' (减活指数)。线性回归按最小二乘法^[4]统计。以上均在 IBM 微机上用自编药理与统计程序计算和绘图。

2 结果

2.1 青蒿琥酯对豚鼠游离气管平滑肌张力的影响

青蒿琥酯能松弛静息状态下气管平滑肌, 在 $10^{-11} \sim 10^{-7} \text{mol/L}$ 剂量范围内, 其作用强度随青蒿琥酯浓度升高而加强, pD_2 值为 9.88 ± 0.37 ($n = 12$), 见图 1; 异丙肾上腺素 (阳性对照) 作用表现与青蒿琥酯相似, pD_2 值为 8.98 ± 0.41 ($n = 8$); 青蒿琥酯的效能为异丙肾上腺素的 74%。青蒿琥酯能非竞争性拮抗乙酰胆碱和组织胺的收缩气管作用, 并呈浓度依赖性, 其 pD_2' 值分别为 9.99 ± 0.71 ($n = 8$) 和 11.69 ± 0.53 ($n = 8$), 结果如图 2 所示。无内在拟交感活性的非选择性 β 肾上腺素受体阻断药噻吗洛尔 ($10^{-10} \sim 10^{-9} \text{mol/L}$) 能竞争性阻断异丙肾上腺素松弛气管作用, pA_2 值为 11.42 ± 0.24 ($n = 6$), 但对青蒿琥酯的扩张气管作用无明显影响 ($n = 6$), 结果如图 3 所示。

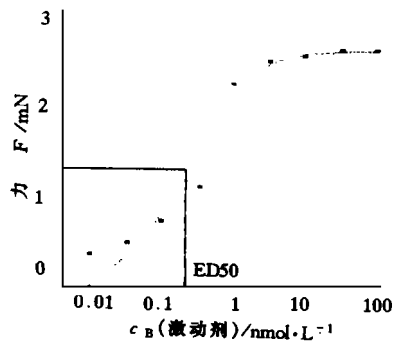


图 1 ART 松弛豚鼠气管平滑肌量效曲线

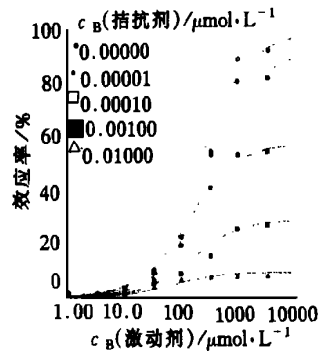


图 2 ART 影响 ACh 收缩气管平滑肌作用的量效关系

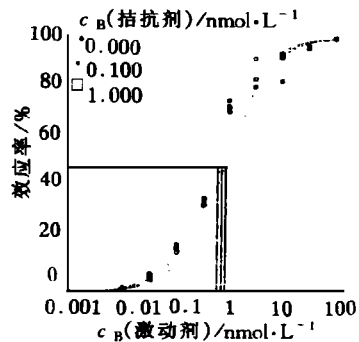


图 3 timolol 抗 ART 作用量效关系

2.2 青蒿琥酯对豚鼠气管组织 AC 活性的影响

用相同浓度豚鼠气管组织匀浆的 AC 制备物进行反应, 生成的 cAMP 量代表酶的反应速度。用不同浓度的青蒿琥酯在 37 °C 条件下与气管组织匀浆反应 15 min, 然后测定腺苷酸环化酶的活力, 同时观察不同浓度的异丙肾上腺素对气管组织匀浆腺苷酸环化酶活力的影响, 结果如表 1、表 2 和图 4 所示。表明 AC 激活剂异丙肾上腺素能明显提高酶活力,

其线性方程为 $y = 0.36x - 0.75$ [$P < 0.01, n = 4, r = 0.9839$, y 为 $cAMP(\text{pmol})$, $x = 1g c_B(\text{ART}) + 12$]; 与此同时, 青蒿琥酯亦表现激活腺苷酸环化酶的活性, 其活性随青蒿琥酯浓度的升高而增加, 其

线性方程为 $y = 0.22x - 0.071$ [$P < 0.01, n = 4, r = 0.9917$, y 为 $cAMP(\text{pmol})$, $x = 1g c_B(\text{ART}) + 12$]. 青蒿琥酯和异丙肾上腺素在一定的浓度下与酶的反应速度呈良好的线性关系。

表1 异丙肾上腺素对豚鼠气管组织 AC(A) 活性的影响

$c_B(\text{ISP})/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$A(cAMP)^{1)}/\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	AC 相对活性 ¹⁾
0	0.12±0.02	1.00±0.00
10^{-10}	0.13±0.01	1.07±0.09
10^{-9}	0.26±0.02	2.01±0.21
10^{-8}	0.58±0.26	4.77±2.56
10^{-7}	0.92±0.22	7.61±2.70
10^{-6}	1.39±0.21	11.43±3.13
10^{-5}	1.88±0.12	14.90±0.85

1) $n = 4, \bar{x} \pm s$

表2 青蒿琥酯对豚鼠气管组织 AC 活性(A) 的影响

$c_B(\text{ART})/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$A(cAMP)^{1)}/\text{pmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	AC 相对活性 ¹⁾
0	0.12±0.02	1.00±0.00
10^{-11}	0.17±0.01	1.42±0.29
10^{-10}	0.31±0.09	2.52±0.78
10^{-9}	0.65±0.17	5.29±1.49
10^{-8}	0.82±0.12	6.75±1.33
10^{-7}	0.96±0.13	7.85±1.38
10^{-6}	1.29±0.11	10.58±2.18

1) $n = 4, \bar{x} \pm s$

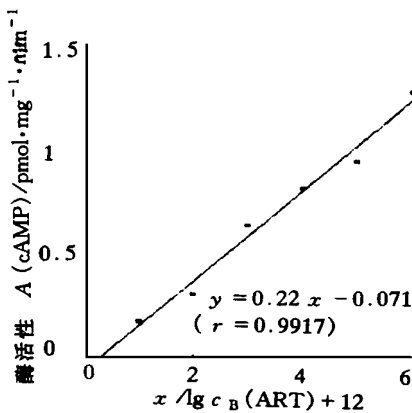


图4 ART对豚鼠气管组织AC活性的影响

3 讨论

作者的结果表明, 青蒿琥酯能松弛豚鼠气管平滑肌, 其作用不受 β -R 阻断剂噻吗洛尔的影响, 并能

非竞争性拮抗乙酰胆碱和组织胺的收缩气管作用, 提示其作用位点可能不在气管组织的 M-R, H-R 和 β -R 上。

青蒿琥酯对豚鼠气管组织匀浆 AC 有较明显的激活作用。cAMP 在生物体内有广泛的生物活性, 其水平的高低与许多细胞功能活动密切相关。cAMP 由腺苷酸环化酶(AC)催化 ATP 环化反应而生成。一方面 cAMP 能激活依赖 cAMP 的特异性蛋白激酶, 此酶再激活磷酸化酶激酶, 进而磷酸化多种功能蛋白^[5], 调节多种代谢和产生多种生理功能。另一方面, 细胞内 cAMP 水平受磷酸二酯酶(PDE)的调节。PDE 能催化 cAMP 降解成 5'-AMP 而使 cAMP 浓度降低, 终止细胞内 cAMP 增多引起的生理效应。气管平滑肌细胞的松弛或收缩状态与细胞内 cAMP 水平的高低有一定的相关关系。气管平滑肌细胞内 cAMP 水平升高, 通过激活蛋白激酶导致 Ca^{2+} 依赖性肌凝蛋白-肌动蛋白偶联数减少, 从而产生气管平滑肌松弛作用^[5], 反之, 则产生收缩作

用。作者的实验结果表明,青蒿琥酯的松弛豚鼠气管平滑肌的作用与激活气管组织腺苷酸环化酶有关。cAMP对机体许多细胞的生理功能和病理生理起着调控作用,是介导机体多种生理、生化功能的“第二信使”。参与神经突触的递质传递,参与调节心脏、气管和血管的舒缩状态、血小板的聚集和凝血系统的激活等。因此,青蒿琥酯对腺苷酸环化酶的影响值得进一步研究。

(本校实验核医学教研室曾熙兰教授、刘秀琴老师给予技术指导,特致衷心感谢)

参 考 文 献

1 黄 黎,刘菊福,刘林祥,等. 中药青蒿的解热抗炎作用

研究. 中国中药杂志 1993, 18(1):45

2 徐旭祥,朱师晦,林金胜. 青蒿素的药理研究. 广东医学 1986, 7(4):25

3 Luo L, Diane M, Loilliam B G. Blockade of Calcium-dependent chloride current in *Xenopus* Oocytes by chloride channel blockers and antimalarial drugs. *Cell Physiol Biochem*. 1991, 1(5-6):251

4 孙端元. 定量药理学. 北京:人民卫生出版社, 1987. 404, 430, 446

5 Daniel L, Meltzer MA, Janes PK. Beta 2-Agonists; Pharmacology and Recent Developments. *J Asthma* 1991, 28(3):179

(1996-08-12 收稿 1997-06-20 修回)

EFFECTS OF ARTESUNATE ON TRACHEAL SMOOTH MUSCLE FROM THE GUINEA-PIG

Yang Maosheng^① Xiao Jianchu

(Department of pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510089)

Artesunate was capable to relax tracheal smooth muscle, and able to antagonize non competitively the effects of spasmogens like Acetylcholine and Histamine on trachea from guinea pig. Timolol, a nonselective blocker of the beta-adrenergic receptor, was not able to inhibit the relaxant action of Artesunate. Artesunate had an action to activate significantly the adenylate cyclase of tracheal tissue from guinea-pig in a concentration-dependent manner. The concentration of Artesunate and this activated action present significant linear relationship in the given concentration ranges. These results indicated that the relaxant effects of Artesunate on tracheal smooth muscle were related to its action on the activation of adenylate cyclase.

Subject headings artemisinin/ analogs & derivatives; artemisinin/ pharmacology; succinates/ pharmacology; trachea/ drug effects; adenyl cyclase/ drug effects

^① Department of pharmacology, Guangdong Medical College(Zhanjiang, 524023)