

托美汀对豚鼠离体气管平滑肌反应性的影响

高贤龙、周汉良、杨秋火、卞如濂 (浙江医科大学药理教研室, 杭州 310006)

Acta Pharmacologica Sinica 1989 Mar; 10(2): 165-169

Effect of tolmetin on responsiveness of isolated guinea pig tracheal smooth muscles

GAO Xian-Long, ZHOU Han-Liang, YANG Qiu-Huo, BIAN Ru-Lian
(Department of Pharmacology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310006)

Abstract Tolmetin directly relaxed the
isolated guinea pig tracheal smooth muscles,

increased the muscle responsiveness to
histamine or carbachol and enhanced the
tracheal Schultz-Dale reaction. Prostaglan-
din E₂ synthesized by cyclooxygenase was

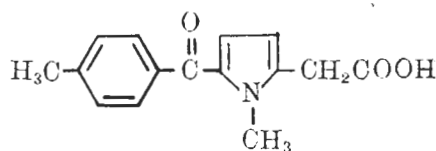
transformed into prostaglandin B₂ (PGB₂) with alkali. PGB₂ and the lipoxygenase metabolite leukotriene B₄ (LTB₄) were measured by high-performance liquid chromatography, whereas slow-reacting substance of allergy (SRS-A) was determined by bioassay. Tolmetin showed inhibitory effects on prostaglandin E₂ synthesis, with the IC₅₀ being 30 μmol/L, but no effect on LTB₄ synthesis (up to 100 μmol/L). SRS-A release was potentiated by tolmetin at 10 and 50 μmol/L. The effects of tolmetin on arachidonic acid metabolism may be responsible for its effects on tracheal smooth muscles. It is suggested that asthma attacks may be induced or enhanced by tolmetin in patients with asthma.

Key words tolmetin; prostaglandins; leukotrienes B; SRS-A; trachea

提要 托美汀能直接松弛豚鼠离体气管平滑肌, 提高平滑肌对组胺、氨甲酰胆碱、卵白蛋白的反应性。抑制绵羊精囊腺环氧酶活力, IC₅₀ = 30 μmol/L。对猪颗粒白细胞脂氧酶无影响, 对致敏豚鼠肺组织慢反应物质 A (SRS-A) 释放有促进作用。托美汀对气管的松弛作用可能与 PGF_{2α} 合成抑制有关, 加强气管收缩作用可能与其抑制 PGE₂ 合成、促进 SRS-A 释放有关。

关键词 托美汀; 前列腺素类; 白细胞三烯 B 类; 慢反应物质 A; 气管

托美汀 (tolmetin, Tol) 化学名 1-甲基-5-(对-甲苯甲酰)-吡咯-2-乙酸, 是一个新型的非甾体抗炎药。国内外报道 Tol 对多种实验性炎症抗炎作用强, 临床应用对类风湿性关节炎、骨关节炎、强直性脊椎炎等有良效而致胃溃疡作用轻^(1,2)。因此, Tol 有可能取代吲哚美辛等非甾体抗炎药而用于临床。已发现一些非甾体抗炎药可影响气道平滑肌反应性, 甚至可诱发哮喘的发作⁽³⁾。此问题引起了人们的重视, Tol 对气道平滑肌反应性的影响尚未见详细报道。为了给临床应用提供有关 Tol 与哮喘关系方面的信息, 本文报道 Tol 对豚鼠离体气管平滑肌反应性及对环氧酶与脂氧酶活性的影响。



Tolmetin (1-methyl-5-p-toluoylpyrrole-2-acetic acid, McN-2259)

Materials and methods

Tol (杭州民生药厂), 磷酸组胺 (上海生物化学研究所), HPLC 淋洗液甲醇 (上海吴泾化工厂), 聚蔗糖-400 (Pharmacia 公司), 氨甲酰胆碱、花生四烯酸 (arachidonic acid, AA), 卡西霉素 (calcimycin), PGE₂, PGB₂ 均为 Sigma 公司产品, leukotriene B₄ (LTB₄) 由加拿大 J Rokach 教授赠送。

高效液相色谱仪系 Varian-5000 型 (北京分析仪器厂组装)。

豚鼠, ♀♂ 兼用, 正常豚鼠体重 354 ± SD 29 g, 致敏豚鼠 302 ± 19 g。致敏豚鼠预先 im 和 ip 卵白蛋白 100 mg, 2-4 wk 之间实验。

豚鼠离体气管平滑肌实验 按文献 (4) 法制备气管条。取整条气管, 腹面剖开, 均分成 9 段, 取 3 段串成一个气管条, 悬于 Krebs-Henseleit 液中, 37°C, 持续供给 100% O₂, 气管张力通过拉力换能器记录在记录仪上, 标本平衡 60 min 后分别进行下列实验。

1 对平滑肌的直接作用 以累积法加 Tol 并记录豚鼠离体气管平滑肌张力的变化。

2 对致痉剂所致的气管平滑肌收缩反应的影响 正常豚鼠的气管条平衡 60 min 后, 加磷酸组胺 50 μmol/L 或氨甲酰胆碱 2 μmol/L, 记录气管张力。换液平衡后, 加 Tol 接触 30 min, 再加组胺或氨甲酰胆碱, 在同一气管条上依次加入不同浓度的 Tol 和相同浓度的组胺或氨甲酰胆碱, 以观察 Tol 对气管收缩反应的影响。

3 对致敏豚鼠气管 Schultz-Dale 反应的影响 取自同一致敏豚鼠的气管条分成对照组和处理组。处理组先接触 Tol 30 min, 再用

卵白蛋白 10 $\mu\text{g/ml}$ 攻击气管条。

绵羊精囊腺环氧酶活力测定 按文献(5)法制得绵羊精囊腺微粒体环氧酶粗制品粉末。测定环氧酶活力(6)。取酶粗品 3 mg, 加 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.3) 1 ml, 加 glutathione 1 mmol/L, hydroquinone 50 $\mu\text{mol/L}$, 30 $^{\circ}\text{C}$ 预孵 5 min, 加 AA 50 $\mu\text{mol/L}$ 继续温育 30 min。反应产物 PGE₂ 经碱化转变成 PGB₂, 用高效液相色谱法测 PGB₂, 再折算成 PGE₂ 含量。色谱柱 MCH-5, ODS 柱。流动相: 甲醇:水:乙酸为 70:30:0.01, 以 uv 278 nm 检测。

粒性白细胞脂氧酶活力的测定(7) 粒性白细胞经自然沉降、低渗破碎及聚蔗糖-泛影酸钠分离液分离后制得(8)。细胞经台盼兰染色活力 > 90%, 瑞氏染色纯度达 95%。粒性白细胞悬浮于磷酸缓冲液中浓度 $2.5 \times 10^7/\text{ml}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min 后, 加 calcimycin 10 $\mu\text{mol/L}$, AA 100 $\mu\text{mol/L}$, 继续温育 5 min, 反应产物 LTB₄ 经提取后用 HPLC 法测定。层析柱和流动相同前段, uv 269 nm, 样品中 LTB₄ 峰以标准品 LTB₄ 来鉴别(Fig 1)。该峰流出液作 uv 扫描, uv 特征同标准品 LTB₄。

致敏豚鼠肺慢反应物质 A(SRS-A)含量的测定(9) 取致敏豚鼠肺组织碎块 0.2 g, 加台氏液 1.8 ml, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min, 加卵白蛋白 1 mg/ml, 继续温育 15 min, SRS-A 含量以正常豚鼠离体回肠生物检定法来测定。

结果用方差分析法统计。

Results

对豚鼠离体气管平滑肌反应性的影响

1 对静息气管平滑肌张力的影响 Tol 对正常和致敏豚鼠离体气管平滑肌均有直接的松弛作用。其松弛效应呈剂量依赖关系。Tol 500 $\mu\text{mol/L}$ 时正常气管松弛张力为 1.0 ± 0.4 g ($n=5$), 致敏豚鼠松弛张力为 0.37 ± 0.05 g ($n=6$, $P<0.05$) (Fig 2)。Tol 引起的平滑肌松弛缓慢而持久。

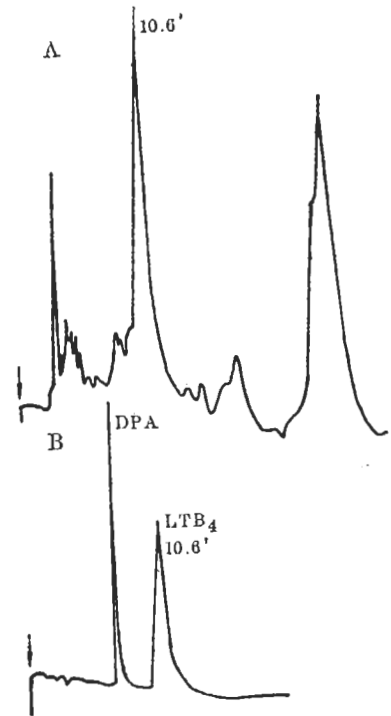


Fig 1. Reverse phase high-performance liquid chromatography for leukotriene B₄ (LTB₄) A) polymorphonuclear leukocytes were incubated with arachidonic acid and calcimycin. B) LTB₄ standard, DPA; diphenylamine.

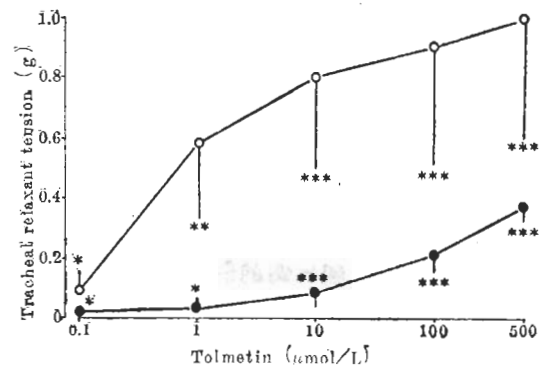


Fig 2. Relaxation of resting guinea pig tracheal strips by tolmetin. Unsensitized trachea (○); sensitized trachea (●). * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs control.

2 对组胺或氨甲酰胆碱引起的平滑肌收缩反应的影响 如 Tab 1 所示, 组胺 50 $\mu\text{mol/L}$ 引起的气管平滑肌收缩张力可被 Tol 1, 10,

Tab 1. Effects of tolmetin on histamine (His)- or carbachol (Car)-induced guinea pig tracheal contraction. $n=6$, $\bar{x}\pm SD$. * $P>0.05$, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$.

Tolmetin ($\mu\text{mol/L}$)	Tracheal contraction (g)		Increase (%)	
	His	Car	His	Car
0	0.24 ± 0.05	0.36 ± 0.15		
1	0.35 ± 0.10 ***	0.44 ± 0.18 *	45.8	22.2
10	0.44 ± 0.14 ***	0.51 ± 0.22 *	83.3	41.7
30	0.45 ± 0.12 ***	0.58 ± 0.30 **	87.5	61.1
100	0.45 ± 0.11 ***	0.59 ± 0.29 **	87.5	63.9

30, 100 $\mu\text{mol/L}$ 提高 45.8, 83.3, 87.5 和 87.5%, Tol 30, 100 $\mu\text{mol/L}$ 也可提高氨甲酰胆碱的收缩强度 61 和 64%。因此, Tol 可提高豚鼠气管对组胺或氨甲酰胆碱的反应性。

3 对豚鼠气管 Schultz-Dale 反应的影响 (Tab 2) 卵白蛋白 10 $\mu\text{g/ml}$ 攻击, 致敏豚鼠气管条出现明显的收缩。加 Tol 后, 收缩强度提高, 其效应在 3 个剂量组随剂量的增加而减弱。

Tab 2. Effects of tolmetin on ovalbumin-induced guinea pig tracheal contraction. $n=6$, $\bar{x}\pm SD$. * $P>0.05$, *** $P<0.01$ vs control.

Tolmetin ($\mu\text{mol/L}$)	Tracheal contraction (g)	Enhancement (%)
0	0.22 ± 0.07	
10	0.51 ± 0.18 ***	131.8
0	0.23 ± 0.14	
50	0.49 ± 0.21 ***	113.0
250	0.29 ± 0.13 *	26.1

对花生四烯酸代谢的影响

1 对环氧酶活力的影响 绵羊精囊腺环氧酶粗制品 3 mg, 加 AA 50 $\mu\text{mol/L}$, PGE_2 量为 $10.8\pm 0.6 \mu\text{g}$, PGE_2 的产率为 72.4%。如图 3 所示, Tol 可明显抑制环氧酶的活力, 其抑制强度呈剂量依赖关系。 $\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{mol/L}$ 。阳性对照药吲哚美辛(indomethacin)对环氧酶有较强的抑制作用, $\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{mol/L}$ 。Tol 对环氧酶的抑制作用为吲哚美辛的 1/10。

2 对粒性白细胞脂氧酶活力的影响 猪

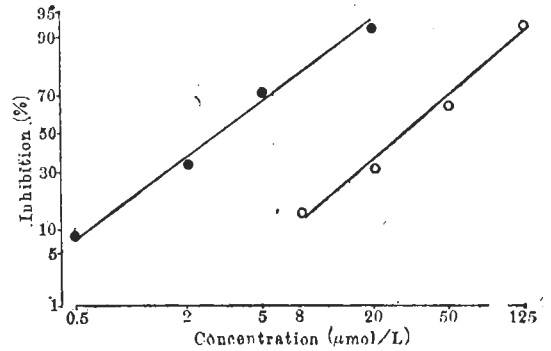


Fig 3. Inhibition of ram seminal vesicular microsome cyclooxygenase by tolmetin (○) or indomethacin (●).

粒性白细胞 4 ml ($2.5\times 10^7/\text{ml}$) 加花生四烯酸 100 $\mu\text{mol/L}$, calcimycin 10 $\mu\text{mol/L}$, LTB_4 产量为 $1.18\pm 0.19 \mu\text{g}$ ($n=5$); 加 Tol 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$, LTB_4 量分别为 0.94 ± 0.14 ($n=4$), 1.0 ± 0.3 ($n=5$) 和 $0.88\pm 0.23 \mu\text{g}$ ($n=5$)。3 个剂量组与对照组相比差别均不显著, 说明 Tol 对猪粒性白细胞脂氧酶活力无影响。阳性药槲皮素(quercetin)⁽¹⁰⁾ 50 $\mu\text{mol/L}$ 对猪粒性白细胞有很强的抑制作用, 抑制率为 93.3%。

3 对致敏豚鼠肺 SRS-A 释放的影响 对照组肺组织 SRS-A 释放量为 $200\pm 50 \text{ IU/g}$ 肺组织 ($n=5$), 加 Tol 10, 50, 250 $\mu\text{mol/L}$ 后, SRS-A 释放量分别为 320 ± 60 ($P<0.01$), 290 ± 90 ($P<0.01$), $190\pm 40 \text{ IU/g}$ 肺 ($P>0.05$), n 均为 5, 说明 Tol 低浓度时有促进 SRS-A 释放的作用, 而高浓度时不增加 SRS-A 的释放。

Discussion

以上实验表明, Tol 有提高豚鼠气管对组胺、氨甲酰胆碱和卵白蛋白反应性以及抑制 PGE_2 合成、促进 SRS-A 释放的作用。这些作用提示 Tol 可能引起病人哮喘的发作或加重, 所以临床使用该药时应予以注意。

静息状态气管张力的维持主要依靠 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 。静息气管环氧酶产物主要为 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ⁽¹¹⁾,

Tol 有抑制环氧酶作用, 推测其松弛豚鼠气管平滑肌作用可能是其抑制环氧酶、减少 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的结果。Tol 对致敏豚鼠气管松弛效应差, 其原因不清, 有待继续研究。

PGE_2 参与致痉剂引起的气管收缩的调节⁽¹²⁾。气管收缩时, PGE_2 释放增加而 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 无明显变化。脂氧酶产物 SRS-A 能强烈收缩气管平滑肌, 组胺等致痉剂引起气管收缩时有 SRS-A 释放⁽¹³⁾。Tol 能抑制环氧酶、减少 PGE_2 合成并且促进 SRS-A 的释放, 因此推测 Tol 加强致痉剂引起的气管收缩效应可能与其抑制 PGE_2 合成促进 SRS-A 释放有关。

Tol 引起致敏豚鼠 SRS-A 释放增加可能是其抑制环氧酶所致。前列腺素和白细胞三烯均由 AA 转化而来。环氧酶受抑制时, AA 经脂氧酶途径合成的产物增多; 此外, PGE_2 有抑制脂氧酶的作用⁽¹⁴⁾, PGE_2 减少时脂氧酶抑制解除, SRS-A 合成增加。Tol 低浓度时 SRS-A 增加明显, 而高浓度时不明显, 提示 Tol 高浓度时可能有抑制脂氧酶作用。

以上实验研究了 Tol 对豚鼠气管平滑肌反应性的影响以及脂氧酶、环氧酶的影响。由于同时在豚鼠气管测定脂氧酶、环氧酶活力比较困难, 因此实验分别采用了不同种属的动物组织, 这可能给实验结果带来种属差异, 有必要今后用豚鼠气管来研究 Tol 对这两酶的影响。

References

- 1 Wong S, Gardocki JF, Pruss TP. Pharmacologic evaluation of tolectin (tolmetin, McN-2559) and McN-2891, two anti-inflammatory agents. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 185 : 127
- 2 程彰华、王珏英、江明华、颜寿琪、张祖彬、杨岳洲。痛灭定的药理作用和临床应用的评价。新药与临床 1983; 2 : 65
- 3 Szczeklik A, Gryglewski RJ. Asthma and anti-inflammatory drugs. *Drugs* 1983; 25 : 533
- 4 Akcasu A. The actions of drugs on the isolated trachea. *J Pharm Pharmacol* 1952; 4 : 671
- 5 Wallach DP, Daniels EG. Properties of a novel preparation of prostaglandin synthetase from sheep seminal vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1971; 231 : 445
- 6 Corey EJ, Shih C, Cashman JR. Docosa-hexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80 : 3581
- 7 Henke DC, Kouzan S, Eling TE. Analysis of leukotrienes, prostaglandins, and other oxygenated metabolites of arachidonic acid by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1984; 140 : 87
- 8 Bøyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* 1974; 4 : 269
- 9 Brocklehurst WE. The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. *J Physiol (Lond)* 1960; 151 : 416
- 10 Yoshimoto T, Furukawa M, Yamamoto S, Horie T, Watanabe-Kohno S. Flavonoids: potent inhibitors of arachidonate 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 116 : 612
- 11 Orehek J, Douglas JS, Lewis AJ, Bouhuys A. Prostaglandin regulation of airway smooth muscle tone. *Nature* 1973; 245 : 84
- 12 Grodzinska L, Panczenko B, Gryglewski RJ. Generation of prostaglandin E-like material by the guinea-pig trachea contracted by histamine. *J Pharm Pharmacol* 1975; 27 : 88
- 13 Mitchell HW. The effect of mixed inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase on the indomethacin-induced hyper-reactivity in the isolated trachea of the pig. *Br J Pharmacol* 1982; 77 : 701
- 14 Kuehl FA, Dougherty HW, Ham EA. Interactions between prostaglandins and leukotrienes. *Biochem Pharmacol* 1984; 33 : 1