

REFERENCES

- 1 Langford HG. Dietary potassium and hypertension: epidemiologic data. *Ann Intern Med* 1983; 98 : 770
- 2 Suzuki H, Kondo K, Saruta T. Effect of potassium chloride on the blood pressure in two-kidney, one clip, Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension* 1981; 3 : 566
- 3 Tannen RL. Effects of potassium on blood pressure control. *Ann Intern Med* 1983; 98 : 773
- 4 Cheng JX, Shi YQ, Duan JH. Radioimmunoassay for prostaglandin E₂ (PGE₂). *Acta Acad Med Sin* 1987; 9 : 230
- 5 丁 鑫、朱忠义. 尿醛固酮放射免疫测定. *上海医学* 1979; 2 : 111
- 6 Song DJ, Gu DG, Gu TH. Spectrophotometric determination of urinary kallikrein activity in rats. *Acta Univ Second Shanghai* 1985; 2 : 111
- 7 阿部 圭志. Prostaglandin, kallikrein-kinin 系. *日本臨牀* 1979; 37 : 3398
- 8 Young DB, McCaa RE, Pan Y, Guyton AC. The natriuretic and hypotensive effects of potassium. *Circ Res* 1976; 38 (Suppl 2) : 84
- 9 Croxatto HR, Silva G, Boric M. Inhibition of urinary kallikrein excretion by semi-purified renin in the rat. *Clin Sci* 1979; 57 (Suppl 5) : 243s

* * * * *

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Sep, 10 (5) : 421-424

伊吗唑坦和达唑氧苯对培养血管内皮细胞 cAMP 含量和 PGI₂ 生成的影响¹

姜远英、龙 焜、盛民立² (第二军医大学药学院药理教研室, 上海 200433, 中国)

Effects of imazodan and dazoxiben on cAMP levels and PGI₂ production in cultured bovine aortic endothelial cells

JIANG Yuan-Ying, LONG Kun, SHENG Min-Li (Department of Pharmacology, College of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT We have investigated the effects of imazodan, a potent inhibitor of phosphodiesterase III (PDE III) and dazoxiben, a selective inhibitor of thromboxane synthetase on cAMP levels and PGI₂ production in cultured bovine aortic endothelial

cells by radioimmunoassay. When cultured endothelial cells were incubated with imazodan, intracellular levels of cAMP were increased in a dose-dependent manner. PGI₂ production induced by arachidonic acid (AA) was not affected by imazodan 0.1-10 μmol/L. But imazodan 100 μmol/L caused a 35% inhibition of PGI₂ production. In the presence of AA, dazoxiben could also elevate intracellular levels of cAMP. Furthermore, dazoxiben 1-10 μmol/L caused a marked increase in PGI₂ production, but

Received 1988 Aug 18 Accepted 1989 Mar 24

¹ Project supported by The Science and Technology Fund of The Scientific Committee of Shanghai No. 86343096

² Shanghai Research Institute of Radiomedicine, Shanghai 200032, China

1000 $\mu\text{mol/L}$ inhibited PGI_2 production.

KEY WORDS vascular endothelium; cultured cells; adenosine cyclic monophosphate; arachidonic acids; prostaglandins X; imidazoles; aspirin; radioimmunoassay

摘要 放射免疫分析法(RIA)测定培养血管内皮细胞内 cAMP 水平及其 6-keto-PGF_{1 α} 的生成量发现, 伊吗唑坦 0.1-10 $\mu\text{mol/L}$ 能升高 cAMP 水平, 但不影响 6-keto-PGF_{1 α} 的生成, 只有剂量为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时才抑制 6-keto-PGF_{1 α} 的生成, 抑制率约 35%。达唑氧苯 1-1000 $\mu\text{mol/L}$ 也能升高 cAMP 水平, 并在 1-10 $\mu\text{mol/L}$ 时增加 6-keto-PGF_{1 α} 的生成量, 而 1000 $\mu\text{mol/L}$ 时则抑制 6-keto-PGF_{1 α} 的生成。

关键词 血管内皮; 培养的细胞; 腺苷环一磷酸; 花生四烯酸类; 前列腺素 X 类; 咪唑类; 阿司匹林; 放射免疫测定

血栓素 A₂ (TXA₂) 和前列环素 (PGI₂) 与血栓栓塞性心脑血管疾病关系密切。TXA₂ 能降低细胞内 cAMP 含量, 促进血小板聚集。PGI₂ 则能升高细胞内 cAMP 含量, 抑制血小板聚集。以往发现, 磷酸二酯酶 III (PDE III) 抑制剂伊吗唑坦 (imazodan, Ima) 和 TXA₂ 合成酶抑制剂达唑氧苯 (dazoxiben, Daz) 都能抑制血小板聚集^(1,2), 降低血小板内 TXA₂ 生成量^(1,3), 升高血小板内 cAMP 水平^(2,4)。为进一步评价两药在抗血栓治疗中的意义, 本文以体外培养的小牛主动脉内皮细胞为模型, 观察了它们对细胞内 cAMP 水平和 PGI₂ 生成的影响, 并探讨了细胞内 cAMP 水平和 PGI₂ 生成量之间的相互关系。

MATERIALS AND METHODS

Ima 即 4,5-二氢-6-[4-(1H-咪唑-1-基)-3-(2H)-吡嗪酮盐酸盐 (CI-914), 由本院药化教研室合成, 溶于生理盐水。Daz 即 4-[2-(1H-咪唑-1-氧乙基)苯甲酸盐 (UK-37248), 由本院有机教研室合成, 溶于生理盐水。II 型胶原酶系 Sigma 公司产品。cAMP 放免测定箱由上海第二医科大学同位素室提供, 6-keto-PGF_{1 α} 放免测定箱由中国医学科学院

基础医学研究所药理室提供。

细胞培养与鉴定 小牛主动脉内皮细胞培养参照文献(5)的方法稍加改进。翻转主动脉使内膜向外, 将其放入 37℃ 含有 0.1% II 型胶原酶的消化液中消化 10-20 min, 含有细胞的消化液 250 × g 离心 10 min, 沉淀的内皮细胞用含有 20% 小牛血清的 199 培养基悬浮, 置 37℃ 含有 5% CO₂ 的孵箱中培养。用 0.25% 胰蛋白酶消化收集内皮细胞做传代培养。内皮细胞鉴定用倒置相差显微镜作形态学观察并用酶标法(双 PAP)检测 VIII 因子相关抗原⁽⁶⁾。

细胞孵育过程 第 5 代内皮细胞培养到 d3 并呈单层铺满孔底者用于实验。先用 Hanks 缓冲液将细胞洗涤两次, 然后加入含有或不含有药物的 Hanks 缓冲液, 37℃ 静止状态孵育 15 min, 再加入终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的花生四烯酸(AA)或相应的对照液继续孵育 5 min。最后吸取上清液用于提取 6-keto-PGF_{1 α} , 内皮细胞用来提取 cAMP。

6-keto-PGF_{1 α} 的提取与测定 上清液酸化后用其 3 倍容量的重蒸乙酸乙酯提取两次, 收集两次提取的有机相, 干燥器内水泵减压烘干, -30℃ 保存。用 RIA 法⁽⁶⁾测定 6-keto-PGF_{1 α} 的含量。

cAMP 的提取与测定 内皮细胞被 1 mol/L 冰冷的高氯酸酸化并中止反应后, 用有机玻璃条轻轻刮下, 静置 5 min, 再加入 KOH 2 mol/L 中和高氯酸, 使溶液的 pH 为 5-6, 1100 × g 离心 15 min, 取上清液 -30℃ 保存。用 RIA 法⁽⁷⁾测定 cAMP 的含量。

RESULTS

AA 对内皮细胞产生 PGI₂ 和细胞内 cAMP 水平的影响 在不加诱导剂的情况下, 内皮细胞产生的 PGI₂ (以其稳定的代谢产物 6-keto-PGF_{1 α} 表示) 量很低, 只有 0.44 ± SD 0.12 ng/孔 (n = 12), 细胞内 cAMP 含量为 0.92 ± 0.17 pmol/孔 (n = 12)。用终浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 AA 诱导 5 min, 内皮细胞产生的 PGI₂ 增加到

3.66±0.63 ng/孔($n=17$),相差非常显著($P<0.01$),而细胞内 cAMP 含量则没有明显改变,为 0.94±0.30 pmol/孔($n=17$)($P>0.05$)。

阿司匹林对 AA 诱导内皮细胞产生 PGI₂ 和细胞内 cAMP 含量的影响 阿司匹林是已知的环氧化酶抑制剂,在 1 和 100 μmol/L 的浓度下,都能显著抑制内皮细胞产生 PGI₂,其抑制强度呈剂量依赖性,但对细胞内 cAMP 含量则没有显著的影响(Tab 1)。

Tab 1. Effects of aspirin, imazodan and dazoxiben on cAMP levels and PGI₂ production induced by AA in cultured bovine aortic endothelial cells. Number of experiments in parentheses, $\bar{x}\pm SD$. * $P>0.05$, *** $P<0.01$ vs control.

Drug (μmol/L)	6-keto-PGF _{1α} (ng/well)	cAMP (pmol/well)
Control	3.66±0.63(17)	0.94±0.30(17)
Aspirin		
1.0	0.67±0.88*** (6)	1.30±0.98* (5)
100	0.29±0.05*** (6)	0.94±1.00* (5)
Imazodan		
0.1	3.27±0.55* (11)	2.89±0.80*** (12)
1.0	4.03±0.45* (9)	3.60±1.32*** (12)
10	3.16±1.02* (11)	5.03±1.54*** (12)
100	2.38±0.56*** (12)	7.37±2.10*** (11)
Dazoxiben		
1.0	6.07±0.58*** (6)	2.13±1.11*** (6)
10	9.05±1.52*** (5)	4.73±2.51*** (6)
100	3.31±0.87* (6)	3.97±3.15*** (6)
1000	1.38±0.42*** (6)	4.08±2.54*** (6)

Ima 对 AA 诱导内皮细胞产生 PGI₂ 和细胞内 cAMP 含量的影响 Ima 0.1-100 μmol/L 能显著升高内皮细胞内的 cAMP 含量,并呈剂量效应相关,但 0.1-10 μmol/L 对 AA 诱导的内皮细胞产生 PGI₂ 并没有显著的影响,只有 100 μmol/L 才能抑制 PGI₂ 的生成,其抑制率约 35% (Tab 1)。

Daz 对 AA 诱导内皮细胞产生 PGI₂ 和细胞内 cAMP 含量的影响 Daz 1-10 μmol/L 能显著增加内皮细胞产生 PGI₂ 的量,升高细胞内的 cAMP 水平,而且细胞内的 cAMP 含

量随着 PGI₂ 生成量的增加而增加,但在 1000 μmol/L 时 Daz 反而能抑制 PGI₂ 的生物合成,细胞内的 cAMP 水平也不再继续随着剂量的增加而升高(Tab 1)。

DISCUSSION

Ima 在 0.1-10 μmol/L 时虽然能显著升高细胞内 cAMP 水平,但并不抑制内皮细胞产生 PGI₂,而在 100 μmol/L 时 Ima 能升高细胞内 cAMP 水平也能抑制 PGI₂ 的生成。虽有文献报道^(8,9),升高细胞内 cAMP 水平能抑制内皮细胞生成 PGI₂,但 Brotherton 等人认为这种对 PGI₂ 生成的抑制作用,可能主要来自于升高细胞内 cAMP 水平的药物本身对 AA 代谢的直接影响^(10,11)。根据以上事实,本文认为 Ima 在 100 μmol/L 时对 PGI₂ 生成的抑制作用,可能是其本身高浓度时直接抑制磷脂酶或环氧化酶或 PGI₂ 合成酶的结果,而与其升高细胞内 cAMP 含量无关。

Daz 低浓度时能增加 PGI₂ 的生成量,而高浓度时则能抑制 PGI₂ 的生成。这主要是因为 Daz 在低浓度时能选择性抑制 TXA₂ 合成酶,而高浓度时(1000 μmol/L)对环氧化酶还有明显的抑制作用⁽¹²⁾。Daz 升高细胞内 cAMP 含量可能与 AA 诱导内皮细胞产生大量 PGI₂ 和其抑制 TXA₂ 的生物合成都有关。

在抗血小板治疗中,Daz 与升高细胞内 cAMP 含量的药物合用,具有明显的协同作用⁽¹³⁾。本文结果显示,Ima 和 Daz 都能升高细胞内 cAMP 水平,并且高浓度时都能抑制内皮细胞产生 PGI₂,低浓度下则能增加或不影响 PGI₂ 的生成量。这进一步提示,Ima 和 Daz 两者低浓度时合并使用,可能对防治血栓栓塞性心脑血管疾病,比高浓度单独使用其中任何一种药物都更有意义。

致谢 上海放射医学研究所四室朱涵能同志协助进行部分实验工作。本院药化教研室孙常晟教授和万维勤副教授提供伊吗唑坦。本院有机教研室魏金友同志提供达唑氧苯。

REFERENCES

- 1 Randall MJ, Parry MJ, Hawkeswood E, Cross PE, Dickinson RP. UK-37248, a novel, selective thromboxane synthetase inhibitor with platelet anti-aggregatory and anti-thrombotic activity. *Thromb Res* 1981; 23 : 145
- 2 Chen XS, Long K, Wan WQ. Effects of CI-914 on platelet aggregation, thrombosis and cAMP content in platelets. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1988; 2 : 252
- 3 Chen XS, Long K, Yue TL, Wan WQ. Selective effects of CI-914 on the metabolites of arachidonic acid via cyclooxygenase pathway. *Ibid* 1989; 3 : 85
- 4 Sills T, Heptinstall S. Effects of a thromboxane synthetase inhibitor and a cAMP phosphodiesterase inhibitor, singly and in combination, on platelet behaviour. *Thromb Haemost* 1986; 55 : 305
- 5 Sheng ML, Chen SB, Jin WF, et al. Endothelial cells culture and distinguish. *Acta Acad Med Shanghai* 1987; 14 : 71
- 6 Si YQ, Li ZJ, Ma KR, et al. Radioimmunoassay for 6-keto-PGF_{1α}. *Acta Acad Med Sin* 1986; 8 : 310
- 7 Zhang XY, Ren SQ, Xong J, Di H, Yang BH. A sensitive method to determine cyclic adenosine monophosphate in platelets. *Chin J Cardiol* 1980; 8 : 142
- 8 Adler B, Gimbrone MA, Schafer AI, Handin RI. Prostacyclin and β-adrenergic catecholamines inhibit arachidonate release and PGI₂ synthesis by vascular endothelium. *Blood* 1981; 58 : 514
- 9 Hopkins NK, Gorman RR. Regulation of endothelial cell cyclic nucleotide metabolism by prostacyclin. *J Clin Invest* 1981; 67 : 540
- 10 Brotherton AFA, Macfarlane DE, Heak JC. Prostacyclin biosynthesis in vascular endothelium is not inhibited by cyclic AMP. Studies with 3-isobutyl-1-methylxanthine and forskolin. *Thromb Res* 1982; 28 : 637
- 11 Whorton AR, Collawn JB, Montgomery ME, Young SL, Kent RS. Arachidonic acid metabolism in cultured aortic endothelial cells. Effect of cAMP and 3-isobutyl-1-methylxanthine. *Biochem Pharmacol* 1985; 34 : 119
- 12 Martin TJ, Smith IL, Nolan RD, Dusting GJ. Prostanoids in platelet-vascular interactions. *Am J Cardiol* 1983; 52 : 22A
- 13 Sills T, Cowley AJ, Heptinstall S. Aspirin and dazoxiben as inhibitors of platelet behaviour; modification of their effects by agents that alter cAMP production. *Thromb Res* 1986; 42 : 91

* * * * *

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Sep; 10 (5) : 424-428**链霉素聚合物引发链霉素速发型过敏反应¹**

胡昌勤、赵建西、金少鸿 (中国药品生物制品检定所, 北京 100050, 中国)

Immediate type anaphylaxis of streptomycin allergy elicited by streptomycin polymers¹

HU Chang-Qin, ZHAO Jian-Xi, JIN Shao-Hong

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

ABSTRACT It has been known that strep-

Received 1988 Nov 25 Accepted 1989 Apr 12

¹ The abstract was posted in 5th Southeast Asian and Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, 1988 July, Beijing

tomycin (SM) can cause some immediate type anaphylaxis even anaphylactic shock in clinical therapy. The characteristic of the substance that elicits the allergic reaction has not been reported. Using gel fil-