DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.06.017

哮喘豚鼠淋巴细胞 β-受体下调及酮替芬预防作用的实验研究

赖克方* 凌培基 宋平方 (第三军医大学大坪医院呼吸科) 630042

提 要 本实验采用^{3}H－DHA 放射配基结合法，以卵白蛋白致敏的哮喘豚鼠模型为研究对象，观察了 β-受体激动剂间羟舒喘灵和抗过敏药物酮替芬对豚鼠外周血淋巴细胞 β-受体的作用。结果表明：间羟舒喘灵治疗使淋巴细胞 β-受体密度显著降低(下调)，酮替芬对间羟舒喘灵诱发的 β-受体下调具有预防作用，这可能是酮替芬能够预防和治疗哮喘的一个机制，建议临床上两药联用，防止可能出现的药物耐受现象。

关键词 哮喘；淋巴细胞；受体，肾上腺素能 β；酮替芬；特普他林

近年来有愈来愈多的资料表明，持续给予 β-受体激动剂可使不同组织中的 β-肾上腺素能受体密度及反应性降低，即 β-受体下调(douth regulation)。这可能是部分哮喘患者对 β-受体激动剂疗效降低或药物耐受的一个原因[1]。因此，探讨能预防 β-受体下调的药物，对支气管哮喘的治疗，无疑具有重要的临床意义。

酮替芬是 70 年代末期问世的一种抗过敏药物，具有抑制过敏介质释放和提高细胞内 CAMP 水平的作用，对各种类型的哮喘均有一定的预防和治疗作用，特别是与 β-受体激动剂联用时疗效更佳[2]。本文旨在研究酮替芬对 β-受体是否具有调节作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

^{3}H-DHA(比放射性 37ci/mmol。北京原子能研究院)，dl-心得安(Sigma)，间羟舒喘灵定量雾化剂(无锡华瑞制药公司)，酮替芬(上海第十六制药厂)，玻璃纤维滤膜(海光 49。上海虹光造纸厂)。仪器：多头细胞抽滤器(绍兴坡塘医疗器械厂)，液体闪烁计数仪(LKB-1217 型，芬兰)。

1.2 实验动物及分组

本校动物室提供的健康雄性豚鼠，体重 300～500 g。动物分组：(1) 正常对照组($n=9$)：腹腔内注射生理盐水 1.0ml，两周后以上述溶液雾化吸入，1 周后心脏抽血作分离淋巴细胞用。以下各组取材相同。(2) 哮喘对照组($n=6$)：腹腔内注射 10%卵白蛋白生理盐水溶液 1.0ml，2 周后以 10%卵白蛋白生理盐水溶液雾化吸入，诱发豚鼠哮喘发作。以下各组均在哮喘的基础上用药时间 1 周。(3) 间羟舒喘灵治疗组($n=7$)：间羟舒喘灵 3×0.25mg/d，雾化吸入。(4) 酮替芬治疗组($n=5$)：酮替芬 9mg·kg^{-1}·d^{-1}，灌胃。(5) 联合用药组($n=6$)：按(3)、(4)组同样方法给予间羟舒喘灵和酮替芬。

1.3 淋巴细胞分离

心脏抽血 3ml，1%肝素抗凝，用 Hank's 液将血液稀释 3 倍，按 2∶1 的比例使血液徐缓地加在淋巴分离液上面(用前将比重调至 1.090)，以 400×g 的速度在 10℃离心 15min，收集淋巴细胞层，以适量 Hank's 液悬浮洗涤两次，最后将淋巴细胞调至 5～7×10^6 个细胞/ml。立即用于结合试验。

1.4 放射配基结合试验

取淋巴细胞悬液 100 μl 与终浓度为 0.5～8.0 mmol/L 的^{3}H-DHA 反应，总结合管加入 50mmol Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)，非特异结合管加入浓度高于标记配基 1000 倍的心得安，使反应总体积为 0.25 ml，反应液在 25℃水浴中保温 15min，用冰冷缓冲液终止反应，迅速以玻璃纤维滤膜行负压抽滤，5ml 冰冷缓冲液冲洗两次。滤膜烤干，置于含有 0.4% PPO

---

* 现在昆明总医院呼吸科

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的甲苯闪烁液中，用液闪计数仪测定其放射性，根据 Scatchard 法作图和计算，求出受体最大结合值(B_{max})和平衡解离常数(Kd)。

1.5 实验数据的统计学处理

采用非配对资料 t 检验。

2 结果

根据 Scatchard 法作图，获得各组外周血淋巴细胞 β-受体与^{3}H-DHA 最大结合值如下表：

附表 间羟舒喘灵和酮替芬对淋巴细胞 β-受体的作用

实验分组	动物数	B_{max}(fmol/107 cell)	kd (nM)
正常对照组	9	2098.37±625.53△	12.45±3.40
哮喘对照组	6	1963.07±688.79	9.98±5.02
间羟舒喘灵组	7	1055.74±296.82*	8.66±4.46
酮替芬组	5	1866.71±392.31△	10.05±2.11
联合用药组	6	1805.13±348.45△	9.93±2.50

与哮喘对照组比较，*$P<0.01$，△$P>0.05$

如附表所示：哮喘对照组与正常对照组相比，B_{max} 值相差无显著意义。间羟舒喘灵治疗使淋巴细胞 β-受体密度显著降低，与对照组相比，β-受体约减少 50%；酮替芬与间羟舒喘灵联用则防止了 β-受体下调，单独使用酮替芬组，β-受体无明显变化。各组 kd 值无显著性差异。

3 讨论

既往研究多采用淋巴细胞膜制剂，但有证据显示，膜制备过程中，β-受体的性质可能发生变化[3]。为此，本实验采用完整淋巴细胞为研究材料。与肺组织类似，淋巴细胞以 β_2-受体为主，其变化可反映肺组织 β_2-受体的变化。

支气管哮喘是一种反复发作，需长期治疗的慢性疾病。β-受体激动剂为常用治疗药物之一，特别是雾化型 β_2-受体激动剂，由于给药方便，疗效迅速，应用日趋普遍，同时亦造成某些患者长期过量使用。临床观察发现，部分患者长期使用 β-受体激动剂导致疗效降低，甚至病情进一步恶化。目前对其机制仍不清楚。

本实验采用间羟舒喘灵雾化给药，导致淋巴细胞 β-受体密度显著降低。β-受体密度降低必然导致受体功能低下，这已为国内外的研究所证实[4,5]。动物实验表明，β-受体下调表现在气道平滑肌上就是对异丙肾上腺素刺激反应减弱，即异丙肾上腺素松弛平滑肌的能力减弱[6]。因此，β-受体激动剂治疗导致 β-受体密度降低，这可能是部分患者对 β-受体激动剂产生药物耐受的原因。

本实验不仅观察到间羟舒喘灵治疗导致 β-受体下调，更有实际意义的是，酮替芬与间羟舒喘灵联用可抑制后者诱发的 β-受体下调，这可能是酮替芬能够预防和治疗哮喘的一个机制。临床上观察到酮替芬与 β-受体激动剂合用治疗哮喘时，可使后者的用量减少，疗效增强[2]，可能与酮替芬能够预防 β-受体下调有关。

酮替芬作为一种抗过敏药物，何以具有预防 β-受体下调的作用？其机理尚不明确。与 T 淋巴细胞相比，B 淋巴细胞 β-受体密度较高，由此推测，酮替芬可能通过增加 B 淋巴细胞数量来防止 β-受体下调。但本实验并未观察到单用酮替芬有增加淋巴细胞 β-受体的作用，因而可排除酮替芬有增加 B 淋巴细胞数量的作用。既然单用酮替芬对 β-受体密度无影响，酮替芬使淋巴细胞 β-受体合成增加的可能性也可排除。分子生物学研究表明，激动剂诱发的 β-受

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

体下调与受体内移和磷酸化有关[7,8]。内移就是受体离开细胞膜表面进入细胞内，并与腺苷酸环化酶脱偶联。酮替芬是否具有抑制受体内移和磷酸化的作用值得进一步研究。

尽管酮替芬调节 β-受体的作用机制尚不清楚，但在临床上，我们可以利用酮替芬防止 β-受体下调的作用，将酮替芬与间羟舒喘灵联用治疗哮喘，可使后者的疗效增加和用量减少。防止可能出现的药物耐受现象。

参考文献

1. Brodde OE, Brinkman M, Schemuth R, et al. Terbutaline-induced desensitization of human lymphocyte β-adrenoceptors. J Clin Invest, 1985; 76: 1096～1101
2. 朱惠如 陈秀梅 张瑞芳，等。预防哮喘新药噻哌酮预防支气管哮喘 100 例临床观察。新药与临床，1984；5：1～4
3. Remien J. β-adrenoceptor recognition sites in living lymphocytes: a model for receptor properties in human disease? Eur J Respir Dis, 1984; 65: 208～214
4. 吕宝璋 单京瑞 徐菊芬，等。过敏性哮喘肺组织 β 和 M 受体变化机理的初步探讨。中华医学杂志，1986；66：401～404
5. Abbrachio MP, Daffonchio L, Di Luca M, et al. β-adrenoceptor desensitization in rat lung: funtional and biochemical aspects. Eur J Pharmacol, 1985; 89: 35～42
6. Daffonchio L, Abbrachio MP, Di Luca M, et al. Beta-adrenoceptor desensitization induced by antigen challenge in guinea pig trachea. Eur J Pharmacol, 1990; 178: 21～27
7. Sibley DR, Lefkowitz RJ. Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β-adrenogic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. Nature, 1985; 317: 124～129
8. Lohse MJ, Benovic JL, Carou MG, et al. Multiple pathways of rapid β-adrenergic receptor desensitization. J Biol Chem, 1990; 265: 3202～3209

（收稿：1992-01-29；修回：1992-06-19）

Prevention of terbutaline-induced down-regulation of beta-adrenoceptors in lymphocytes with ketotifen in asthmatic guinea-pigs

Lai Kefang, Ling Peiji, Song Pingfang (Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract An experimental model of asthma was established with ovalbumin sensitization in guinea-pigs, and then the preventive effects of ketotifen on the terbutaline-induced down regulation of beta-adrenoceptors in lymphocytes were investigated with radioligand binding assay. It was found that terbutaline significantly reduced the density of beta-adrenoceptors in lymphocytes, ketotifen administered simultaneously with terbutaline prevented the density of beta-adrenoceptors in lymphocytes from reducing, and neither ketotifen nor terbutaline changed the Kd values in either group. These findings suggest that ketotifen is of value to provent asthmatic patients from the adverse effects of tachyphylactic therapy of beta-adrenoceptor stimulants.

Key words asthma; receptors, adrenergic, beta; ketotifen; terbutaline

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net