

研究论文

依他尼酸抑制小鼠气管平滑肌收缩

赵晓雪[#], 陈微微[#], 陈媛媛, 柳梦苏, 李孟悦, 曹磊, 刘庆华^{*}

中南民族大学医学生物研究所, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 生命科学院, 武汉 430074

摘要: 本研究旨在探讨依他尼酸(ethacrynic acid, EA)抑制气管平滑肌(airway smooth muscle, ASM)收缩的作用及其机制。利用BL-420S系统测量小鼠气管环张力, 用全细胞膜片钳技术记录ASM细胞通道电流, 用钙成像系统测量ASM细胞内Ca²⁺浓度。结果显示, EA剂量依赖性地抑制高-K⁺ (80 mmol/L)和乙酰胆碱(acetylcholine, ACh, 100 μmol/L)引起的小鼠气管环收缩, 最大舒张百分比分别为(97.02 ± 1.56)%和(85.21 ± 0.03)%, 半数有效浓度(median effective concentration, EC₅₀)分别为(40.28 ± 2.20) μmol/L和(56.22 ± 7.62) μmol/L。EA分别降低高-K⁺和ACh诱导的细胞内Ca²⁺浓度, 分别从0.40 ± 0.04降到0.16 ± 0.01, 0.50 ± 0.01降到0.39 ± 0.01。此外, EA抑制ASM细胞L-型电压依赖钙通道(L-type voltage-dependent calcium channel, LVDCC)和钙库操纵的钙离子通道(store-operated calcium channel, SOCC)电流, 以及高-K⁺和ACh引起的外Ca²⁺内流。同时, EA可以降低小鼠呼吸系统阻力(resistance of the respiratory system, Rrs)。以上结果提示, EA通过抑制小鼠ASM细胞LVDCC和SOCC, 抑制Ca²⁺的内流, 降低细胞内Ca²⁺浓度, 导致ASM舒张, 提示EA是一种潜在的支气管扩张剂。

关键词: 气管平滑肌; L-型电压依赖钙通道; 钙库操纵的钙离子通道; 依他尼酸

中图分类号: R363

Ethacrynic acid inhibits airway smooth muscle contraction in mice

ZHAO Xiao-Xue[#], CHEN Wei-Wei[#], CHEN Yuan-Yuan, LIU Meng-Su, LI Meng-Yue, CAO Lei, LIU Qing-Hua^{*}

Institute for Medical Biology & Hubei Province Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China; College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the inhibitory effect and the underlying mechanism of ethacrynic acid (EA) on the contraction in mice. BL-420S force measuring system was used to measure the tension of mouse tracheal rings. The whole cell patch clamp technique was utilized to record the channel currents of airway smooth muscle (ASM) cells. The calcium imaging system was used to determine the intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) in ASM cells. The results showed that EA significantly inhibited the high K⁺ (80 mmol/L) and acetylcholine (ACh, 100 μmol/L)-induced contraction of mouse tracheal rings in a dose-dependent manner. The maximal relaxation percentages were (97.02 ± 1.56)% and (85.21 ± 0.03)%, and the median effective concentrations were (40.28 ± 2.20) μmol/L and (56.22 ± 7.62) μmol/L, respectively. EA decreased the K⁺ and ACh-induced elevation of [Ca²⁺]_i from 0.40 ± 0.04 to 0.16 ± 0.01 and from 0.50 ± 0.01 to 0.39 ± 0.01, respectively. In addition, EA inhibited L-type voltage-dependent calcium channel (LVDCC) and store-operated calcium channel (SOCC) currents in ASM cells, and Ca²⁺ influx. Moreover, EA decreased the resistance of the respiratory system (Rrs) *in vivo* in mice. These results indicated that EA inhibits LVDCC and SOCC, which results in termination of Ca²⁺ influx and decreases of [Ca²⁺]_i, leading to relaxation of ASM. Taken together, EA might be a potential bronchodilator.

Key words: airway smooth muscle; L-type voltage-dependent calcium channel; store-operated calcium channel; ethacrynic acid

Received 2019-03-19 Accepted 2019-07-10

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81400015, 31571200) and Fund for Key Laboratory Construction of Hubei Province, China (No. 2018BFC360).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-27-67842576; E-mail: liu258q@yahoo.com

据世界卫生组织统计, 2015 年约有 3 亿哮喘患者^[1], 25.5 万人死于哮喘^[2], 这极大地降低了相关人群的生活质量, 增加了患者家庭乃至整个社会的负担。哮喘是一种以慢性气道炎症和气道高反应 (airway hyperresponsiveness, AHR) 为特征的异质性疾病。AHR 指的是气道对非特性刺激 (例如: 胆碱能受体激动剂 ACh, 冷空气等) 反应增强的状态或表型^[3]。AHR 的机制尚不清楚, 但气管平滑肌 (airway smooth muscle, ASM) 是 AHR 的主要效应器, ASM 的收缩直接造成了气道狭窄^[4-6]。临床治疗 AHR 常用药物是 β_2 受体激动剂, 但此类药物容易出现脱敏现象, 并有半数以上患者不能得到有效治疗^[7]。因此, 寻找更为安全有效的气管扩张药物是亟需的。

新药研发不仅难度大、周期漫长, 还需要大量的人力财力。老药因其药代动力学和安全性已知, 被认为是新药研发最快捷有效的方法之一。阿奇霉素 (azithromycin, AZM) 为半合成大环内酯类抗生素, 可以与核糖核蛋白的 50S 亚单位结合, 抑制肽酰基转移酶的活性, 影响核糖核蛋白的移位, 从而阻止细菌蛋白质的合成, 合成初期主要用于治疗敏感菌导致的皮肤软组织感染、呼吸道感染等。后来有研究证明, AZM 对预收缩的兔和小鼠离体气管有直接舒张作用, 其原因可能是因为 AZM 降低了细胞内 Ca^{2+} 浓度^[8, 9]。AZM 已用于哮喘的治疗^[10]。因此, 本研究致力于筛选能用于治疗哮喘的老药。

利尿剂是能通过不同机制使机体内的水、钠通过肾脏排出体外而起到调节水、电解质平衡的一类药物, 临床上主要用于消除水肿、降血压、抑制高血钾和高血钙等。其中某些利尿剂具有舒张血管的功能, 原因是其增强血管平滑肌细胞膜上的 Na^+ - Ca^{2+} 交换, 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度降低^[11]。依他尼酸 (ethacrynic acid, EA) 属于 α , β 不饱和酮类, 是一种半合成的利尿剂, 可以剂量依赖性地抑制由碳酸酐酶和内皮素引起的小梁网和睫状肌的预收缩, 降低食蟹猴的眼内压^[12, 13], 说明 EA 可以抑制肌肉组织张力。有文献进一步报道, EA 可以舒张新生豚鼠气道以及新生猪气管、支气管, 并且对于偏亚硫酸氢钠引起的哮喘具有抑制作用^[14, 15]。这些结果表明, EA 能够抑制 ASM 收缩, 但是其机理尚不清楚。本研究旨在探讨 EA 抑制 ASM 收缩的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 5~6 周龄雄性昆明小鼠,

体重 (20 ± 2) g, 购于华中农业大学实验动物中心, 合格证号: SCXK(鄂)2015-0018, 饲养于中南民族大学 SPF 级动物房。动物实验和处理遵照《中南民族大学实验动物使用与福利指导手册》, 并获得中南民族大学伦理委员会批准 (编号: Q2017-3)。

1.2 主要试剂及溶液 EA 购自中国食品药品检定研究院 (生产批号: 100259-201301); ACh、HEPES、木瓜蛋白酶、胶原蛋白酶、牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、L-型电压依赖钙通道 (L-type voltage-dependent calcium channel, LVDCC) 阻断剂硝苯地平 (nifedipine)、钙库操纵的钙离子通道 (store-operated calcium channel, SOCC) 阻断剂 YM58483、 Cl^- 通道阻断剂尼氟酸 (niflumic acid) 以及 K^+ 通道阻断剂氯化四乙胺 (tetraethylammonium chloride, TEA) 均购自美国 Sigma 公司; Fura-2/AM 荧光染料购自美国 Invitrogen 公司; 其它分析纯度试剂购自国药集团化学试剂有限公司。生理盐溶液 (in mmol/L): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 HEPES, 10 葡萄糖 (pH = 7.40)。0 Ca^{2+} 溶液 (in mmol/L): 135 NaCl, 5 KCl, 0.5 EGTA, 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 10 葡萄糖 (pH = 7.40)。气管平滑肌解离液 (in mmol/L): 120 NaCl, 5.2 KCl, 1.2 MgCl_2 , 0.1 CaCl_2 , 10 HEPES, 11 葡萄糖, 0.6 KH_2PO_4 , 25 NaHCO_3 (pH = 7.10)。LVDCC 电流记录细胞内液 (in mmol/L): 130 CsCl, 10 EGTA, 4 MgCl_2 , 10 HEPES, 4 Mg-ATP (pH = 7.30); 细胞外液 (in mmol/L): 107 NaCl, 27.5 BaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, 11 葡萄糖 (pH = 7.30)。细胞外液在使用时加入 10 mmol/L TEA。SOCC 电流记录细胞内液 (in mmol/L): 1 CaCl_2 , 1.2 MgCl_2 , 108 乙酸铯 (cesium acetate), 3 EGTA, 18 CsCl, 10 HEPES (pH = 7.20); 细胞外液 (in mmol/L): 11 葡萄糖, 1.5 CaCl_2 , 126 NaCl, 10 HEPES (pH = 7.20)。

1.3 气管环张力测量 参照本研究组以前发表文章的方法测量气管环张力^[16]。腹腔注射戊巴比妥钠 (150 mg/kg) 处死小鼠, 取其气管和肺置于预冷生理盐溶液, 分离气管, 从其下端剪取约 5 mm 的气管环, 固定于离体组织灌流槽, 其中一端连接张力换能器, 前负荷设为 300 mg。灌流槽内为生理盐溶液, 恒温 37 °C 并通氧。气管环张力变化由 BL-420S 系统 (泰盟, 四川成都) 采集和分析。气管环平衡 1 h, 期间每 15 min 换液一次, 并重置气管环前负荷为 300 mg。之后利用高- K^+ 溶液 (80 mmol/L K^+) 或 ACh (100 $\mu\text{mol/L}$) 预收缩 2 次, 然后用移液

器往灌流槽中加入 EA 进行气管张力测量实验。研究上皮作用时, 标本上皮被去除^[17], 实验结束后, 将其切片并采用苏木精-伊红染色, 然后镜下观察确认上皮是否被去除。

1.4 ASM 单细胞的分离 按照本研究组以前使用的两步酶解法分离单个小鼠 ASM 细胞^[18], 第一步: 将分离得到的肌条在含有二硫苏糖醇 (0.1 mg/mL) 的 2.5 mg/mL 木瓜蛋白酶中处理约 20 min, 第二步: 在 1 mg/mL 胶原蛋白酶中继续消化 6 min, 最后将肌条转移到含有 1 mg/mL BSA 的解离液中, 洗涤后机械振荡获得单个 ASM 细胞, 4 °C 保存备用。木瓜蛋白酶和胶原蛋白酶用含有 1 mg/mL BSA 的解离液溶解, 两步酶解均在 37 °C 水浴条件下进行。

1.5 LVDCC 和 SOCC 电流记录 根据本研究组

以前的方法^[19]记录电流, 将细胞钳制在 -70 mV, 并从 -70 mV 开始, 以每步阶 10 mV 跃到 +40 mV, 每步脉冲持续 50 ms, 记录 LVDCC 电流。将细胞钳制在 -60 mV, 500 ms 内完成 -80 mV 到 +60 mV 的 ramp, 记录 ramp 电流, -70 mV 下电流值代表 SOCC 电流。运用 EPC-10 放大器 (HEKA, 德国) 进行记录, 通过 Patchmaster 软件分析电流大小。

1.6 细胞内 Ca^{2+} 浓度测定 采用本研究组以前的方法^[20]测量细胞内 Ca^{2+} 浓度。细胞在细胞槽内用 Fura-2/AM (2 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 15 min。然后用生理盐溶液灌流, 去除多余染料。利用 Polychrome V 钙成像系统 (TILL, 德国) 动态检测荧光强度, 激发波长设置为 340 nm 和 380 nm, 两波长的曝光时间均为 100 ms, 成像间隔为 1 s。340 nm 和 380 nm

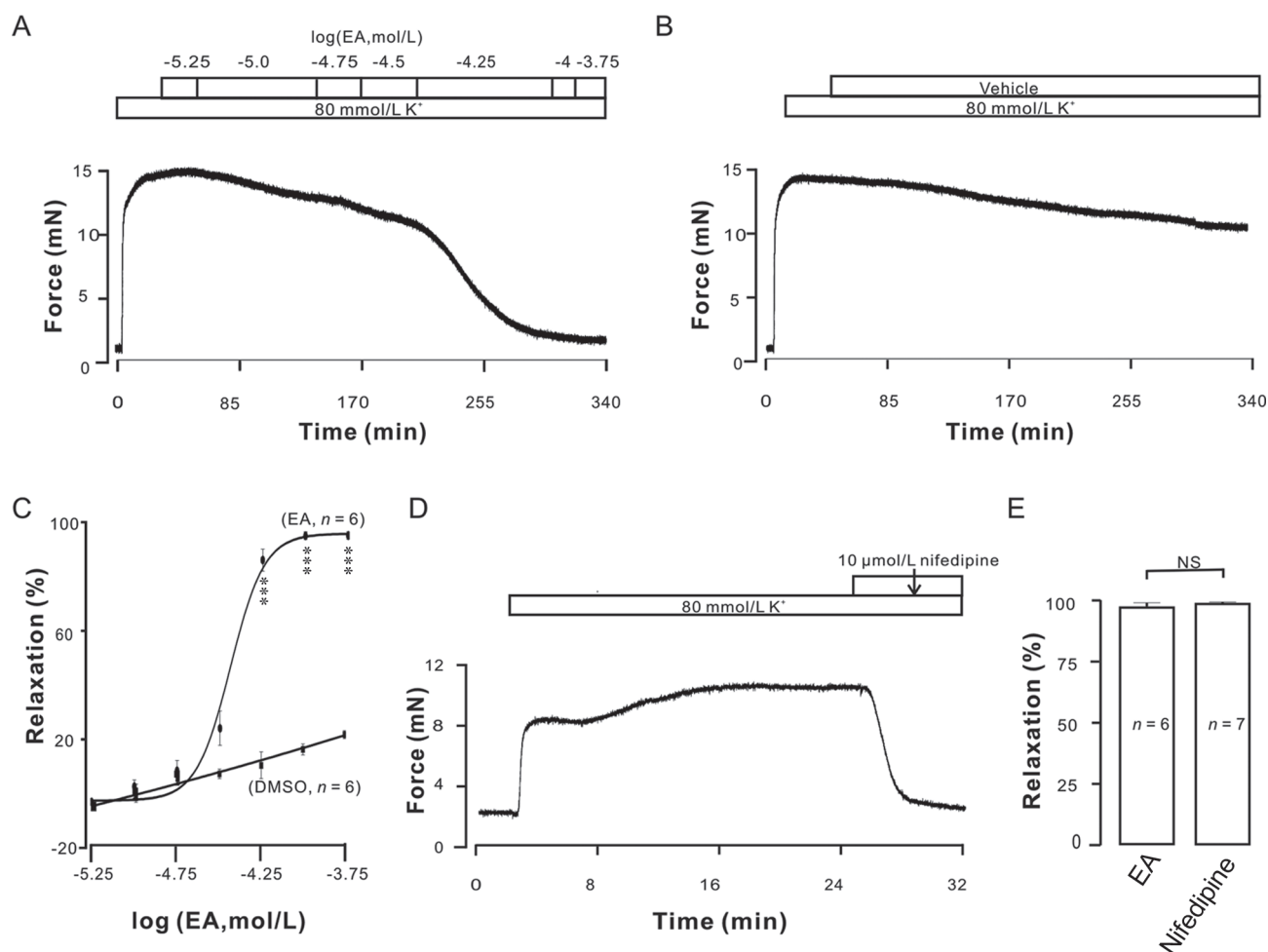


图 1. EA 对高- K^+ 预收缩的小鼠气管环的舒张作用

Fig. 1. EA relaxes high K^+ -induced precontraction of mouse tracheal rings. A: EA inhibited high K^+ -evoked contraction in a tracheal ring in a dose-dependent manner. B: A representative of control experiments. C: The dose-relaxation curve of EA. D: Nifedipine inhibited the contraction induced by high K^+ . E: The relaxations induced by EA and nifedipine were similar. NS: $P > 0.05$. *** $P < 0.001$. Mean $\pm$ SEM. For each experiment, $n = 6-7$ tracheal rings.

的荧光比值 (Ratio) 代表细胞内 Ca^{2+} 水平。

1.7 小鼠呼吸系统阻力 (resistance of the respiratory system, Rrs) 测定 采用文献报道的方法^[21] 对小鼠 Rrs 进行测定。小鼠用 1% 的戊巴比妥钠进行麻醉, 钝性注射器针头插入小鼠气管, 然后连接于 flexiVent 系统 (SCIREQ Inc., 加拿大)。呼吸速率 150 次/min, 潮气量 10 mL/kg, 每个浓度药物雾化时间为 10 s, 然后测量 Rrs。

1.8 统计学处理 采用 Origin 8.0 软件 (OriginLab, 美国) 对数据进行统计分析, 实验数据以 mean $\pm$ SEM 表示, 采用 *t* 检验进行组间比较, 统计学显著性设为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 EA抑制小鼠ASM收缩

为了研究 EA 对于小鼠 ASM 收缩的影响, 本研

究利用高- K^+ (80 mmol/L)^[22] 和 ACh (100 $\mu\text{mol/L}$)^[23] 诱导小鼠离体气管环预收缩。高- K^+ 诱发的收缩到达平台期后加入 EA, 气管收缩被剂量依赖性地抑制, 当 EA 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 达最大舒张 [(97.02 $\pm$ 1.56)%], 与硝苯地平 (10 $\mu\text{mol/L}$) 引起的舒张 [(98.69 $\pm$ 0.01)%] 相似, EC_{50} 为 (40.28 $\pm$ 2.20) $\mu\text{mol/L}$, 在对照实验中, 气管收缩无明显变化 (图 1)。此外, EA 也能抑制 ACh 所引发的气管环收缩, 100 $\mu\text{mol/L}$ EA 对 ACh 诱发的小鼠气管环收缩的抑制作用为 (85.21 $\pm$ 0.03)%, EC_{50} 为 (56.22 $\pm$ 7.62) $\mu\text{mol/L}$ (图 2A~C)。然而在静息状态下加入 EA, 气管环基础张力没有变化 (图 2D)。

为了研究 EA 对 ASM 的舒张作用是否依赖于上皮, 我们在上皮剥离的气管环上进行了实验, 发现 EA 仍然可以舒张高- K^+ 和 ACh 引起的气管环收缩, 100 $\mu\text{mol/L}$ EA 的舒张百分比分别为 (89.84 $\pm$ 4.69)%

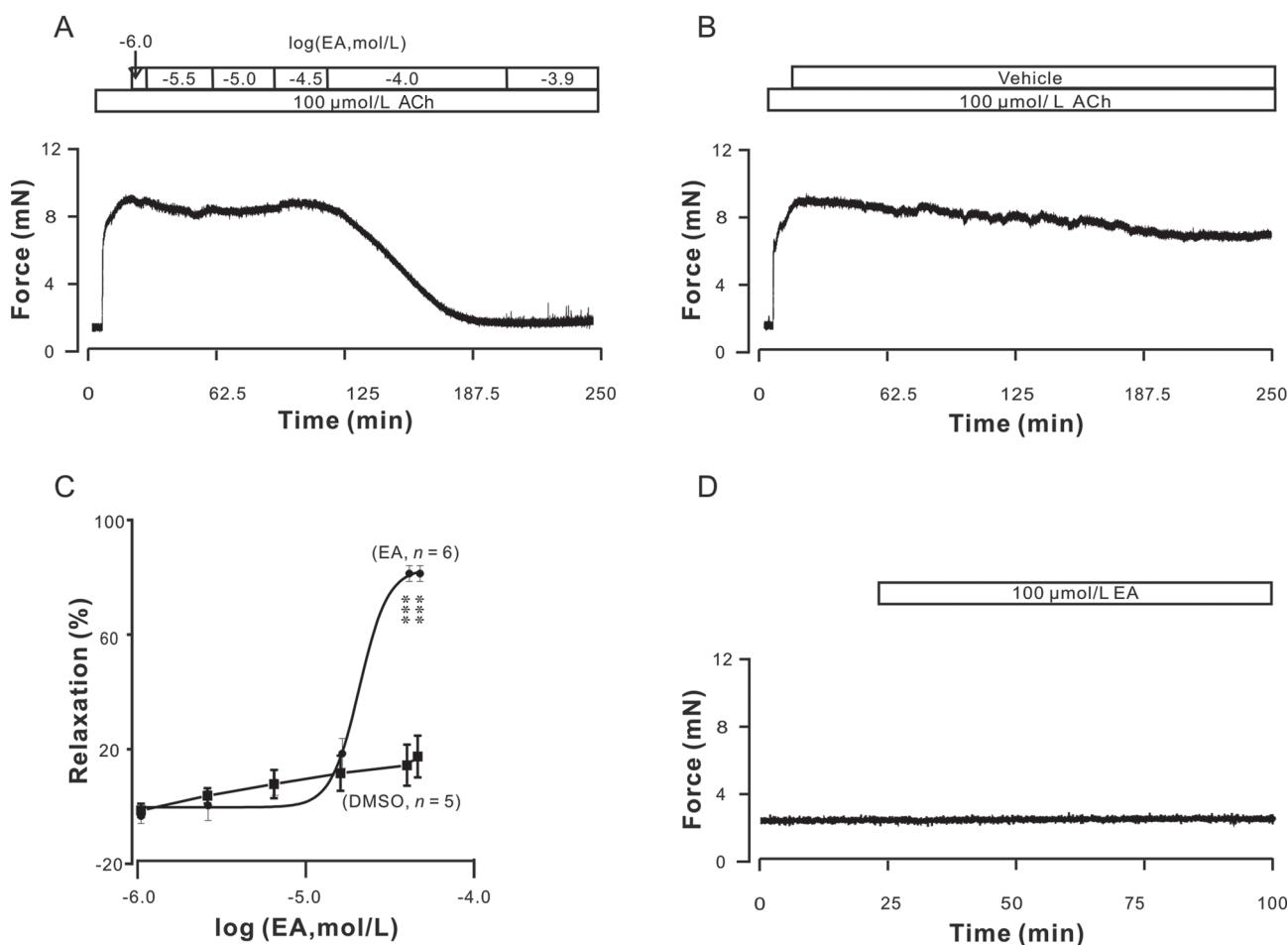


图 2. EA对ACh预收缩的小鼠气管环的舒张作用

Fig. 2. EA relaxes ACh-precontracted mouse tracheal rings. A: EA inhibited the contraction induced by ACh in a dose-dependent manner. B: A control experiment. C: The dose-relaxation curve of EA. D: The effect of EA on a resting tracheal ring. *** $P < 0.001$. For each experiment, $n = 6$ tracheal rings.

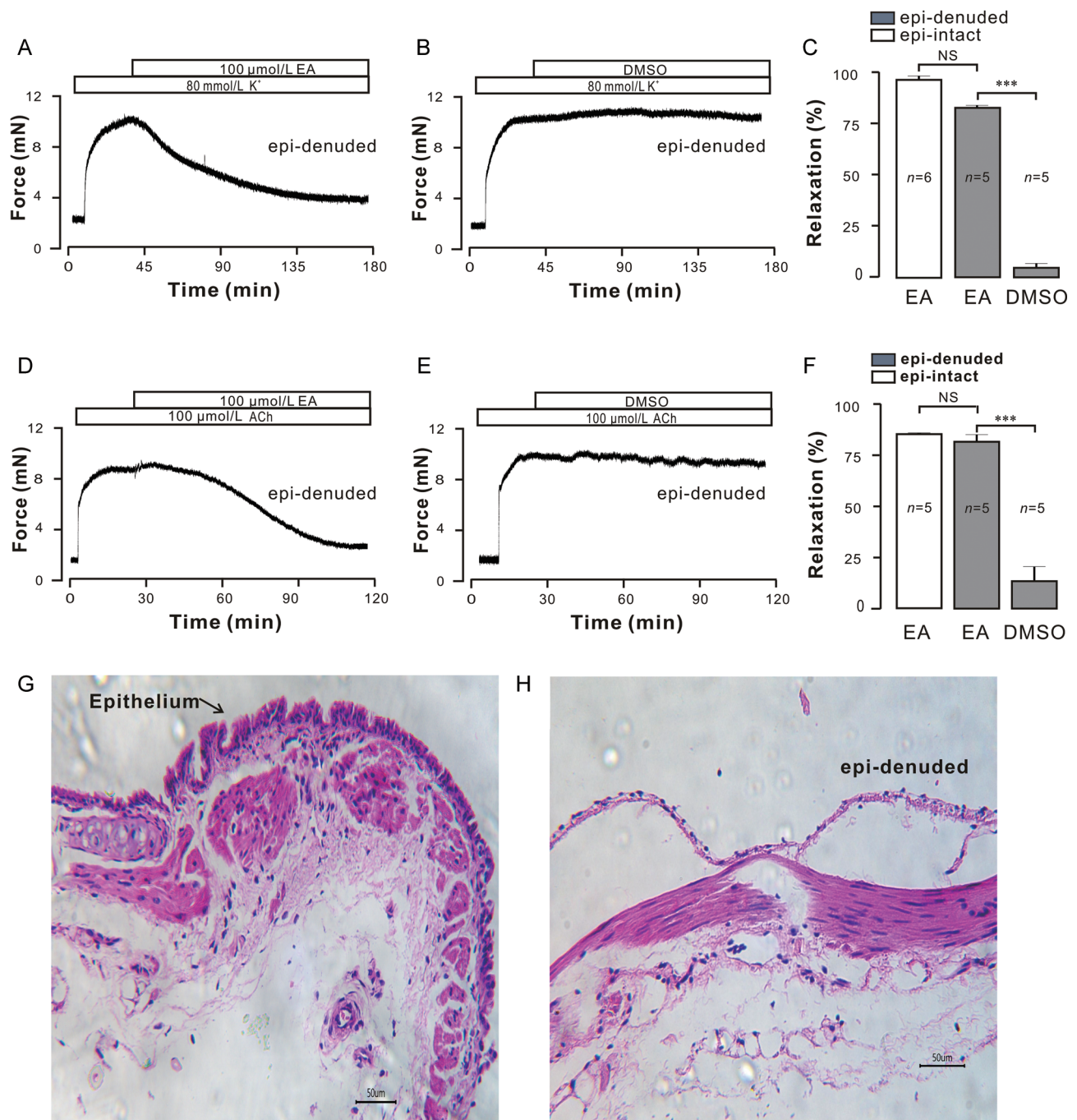


图 3. EA对预收缩的小鼠气管环的舒张作用不依赖于上皮

Fig. 3. EA epithelium-independently relaxes precontracted mouse tracheal rings. *A*: EA inhibited the contraction induced by high- K^+ in epithelium-removed tracheal rings. *B*: A control experiment. *C*: The summary results from similar experiments shown in *A*, *B* and those performed in epithelium-removed tracheal rings. *D*–*F*: Similar experiments and analysis as shown in *A*–*C*, except that high- K^+ was replaced by ACh. *** $P < 0.001$. NS: $P > 0.05$. *G*, *H*: Hematoxylin and eosin staining showed that the epithelium was removed from tracheal rings. Scale bar, 50 μ m. Epi-intact: epithelium is unremoved; Epi-denuded: epithelium is removed. Mean $\pm$ SEM. For each experiment, $n = 5$ tracheal rings.

(图 3A–C) 和 $(80.02 \pm 0.03)\%$ (图 3D–F), 与正常组 (上皮未剥离) 相比差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 EA 对 ASM 的收缩不依赖于上皮细胞。

2.2 EA降低ASM细胞内 Ca^{2+} 浓度

图 4 显示: 高- K^+ 和 ACh 诱发 ASM 细胞内 Ca^{2+} 浓度快速升高, 达平稳后加入 EA, 使细胞内 Ca^{2+}

浓度降低。高- K^+ 诱发细胞内 Ca^{2+} 升高的稳态水平为 0.40 ± 0.04 , 加入 EA 后细胞内的 Ca^{2+} 水平下降到 0.16 ± 0.01 (图 4A–C), 两者差异达到明显的统计学意义 ($P < 0.001$)。ACh 诱发的细胞内 Ca^{2+} 升高的稳态水平为 0.50 ± 0.01 , EA 处理后下降到 0.39 ± 0.01 (图 4D–F), 两者差异达到明显的统计学意义 ($P < 0.001$)。该结果说明 EA 抑制高- K^+ 和 ACh 诱导的 ASM 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高。

2.3 EA抑制LVDCC电流

利用膜片钳全细胞技术记录 ASM 细胞 LVDCC 电流, 图 5 结果显示电流被硝苯地平 (LVDCC 特异阻断剂) 和 EA 完全阻断 ($P < 0.05$), 说明 EA 抑制 ASM 细胞 LVDCC 电流。

2.4 EA抑制SOCC电流

图 6 实验结果表明, 在外液中加入尼氟酸、TEA 和硝苯地平分别阻断 Cl^- 电流、 K^+ 电流和 Ca^{2+} 电流,

从而分离出非选择性阳离子通道 (non-selective cation channel, NSCC) 介导的电流。在 -70 mV 下, ACh 引起的 NSCC 电流峰值为 (-8.64 ± 1.50) pA, 加入 YM58483 (SOCC 特异阻断剂) 后电流被完全阻断 (图 6B), 提示该 NSCC 电流是由 SOCC 介导。这种电流也可被 EA 阻断 (图 6C), 说明 EA 可以抑制 SOCC 电流。

2.5 EA抑制 Ca^{2+} 内流

在 0 Ca^{2+} 条件下 (0 mmol/L Ca^{2+} , 0.5 mmol/L EGTA), 高- K^+ 未引起气管环收缩, 但是, 当 Ca^{2+} 恢复为 2 mmol/L 时, 气管环立即收缩, 加入 EA 后, 气管舒张 (图 7A)。然而在 0 Ca^{2+} 条件下, ACh 可以引起气管环一个收缩, 当 Ca^{2+} 恢复为 2 mmol/L 时, 气管环再次收缩, 加入 EA 后, 气管舒张 (图 7B)。结合前面 2.2 节得到的结果, 说明 EA 通过抑制 Ca^{2+} 内流来抑制两者引起的收缩。

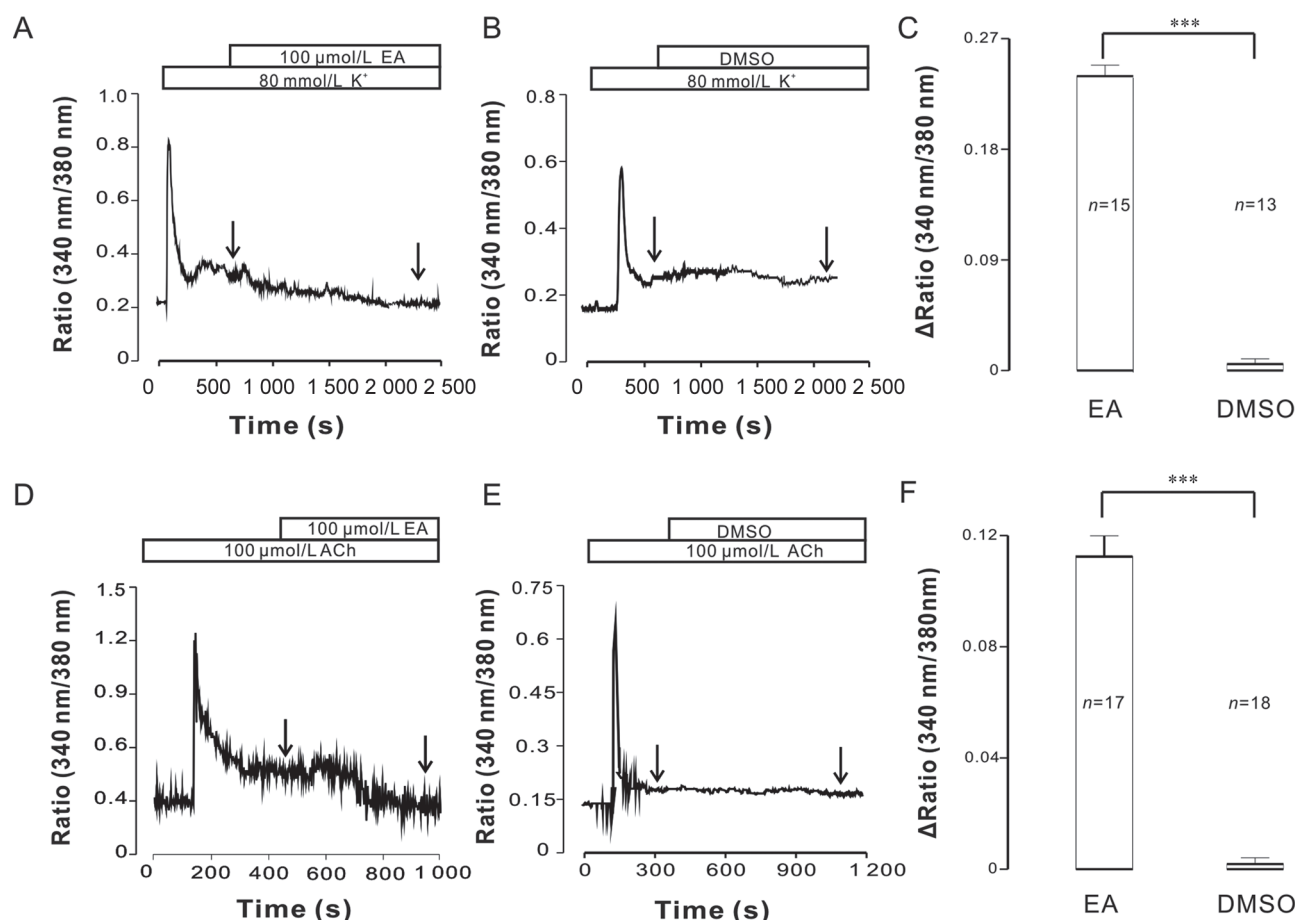


图 4. EA抑制气管平滑肌细胞内 Ca^{2+} 升高

Fig. 4. EA inhibits Ca^{2+} increases in single airway smooth muscle cells. A, B, C: EA inhibited high K^+ -induced Ca^{2+} increases. The vehicle failed. The summary results are shown. D, E, F: Similar experiments and analysis for EA-induced inhibition on ACh-induced Ca^{2+} increases. *** $P < 0.001$. Mean $\pm$ SEM. For each experiment, $n = 13$ –17 cells.

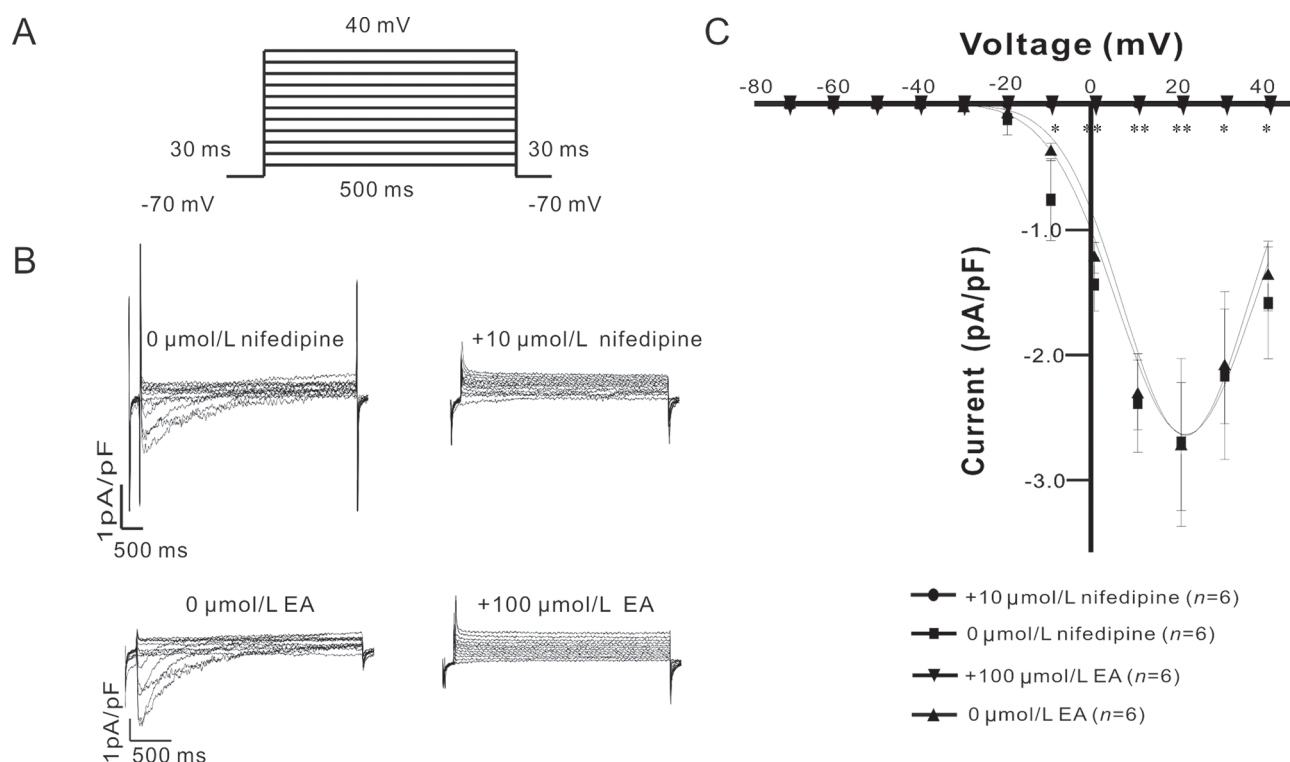


图 5. EA阻断气管平滑肌细胞LVDCC电流

Fig. 5. EA inhibits LVDCC currents in airway smooth muscle cells. *A*: The protocol for the recording of LVDCC currents. *B*: EA (bottom) and nifedipine (top) completely blocked LVDCC currents. *C*: The voltage-current curves based on the results obtained from the experiments shown in *B*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Mean $\pm$ SEM. For each experiment, $n = 6$ cells from 3 mice.

2.6 EA降低小鼠Rrs

我们进一步研究了EA对活体小鼠Rrs的影响。在EA存在的条件下,ACh诱发的Rrs升高明显减低,说明EA降低Rrs(图8)。

3 讨论

AHR是哮喘的典型特征之一,表现为气管对各种刺激的过度敏感,是ASM过度收缩所致,因此,ASM是治疗哮喘的重要靶点^[24]。本研究证实EA以非上皮依赖性舒张高- K^+ 和ACh诱发的小鼠气管环预收缩,阻断LVDCC和SOCC电流,降低细胞内 Ca^{2+} 浓度,抑制 Ca^{2+} 内流诱发的收缩,并减弱小鼠Rrs增加。这些实验结果提示EA通过阻断LVDCC和SOCC,导致细胞内 Ca^{2+} 浓度降低,诱发小鼠ASM细胞舒张。ASM细胞外给予高- K^+ ,可导致细胞内外 K^+ 浓度梯度减小,细胞膜电位发生去极化,激活LVDCC,介导细胞外 Ca^{2+} 内流,触发ASM细胞收缩。ACh是一种M受体激动剂,与ASM上的M3受体结合,激活兴奋性G蛋白后活化磷脂酶C,通过双信使系统使内质网中的 Ca^{2+}

释放和细胞外 Ca^{2+} 内流,细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,导致ASM细胞收缩。因此,本研究采用高- K^+ 和ACh刺激ASM收缩,然后研究EA的影响。结果显示,EA可剂量依赖性地抑制高- K^+ 和ACh引起的收缩(图1,2)。有研究表明,EA可以完全舒张组胺诱发的新生豚鼠的气道收缩^[25]。在本研究中,EA对高- K^+ 诱发的预收缩舒张效果为 $(97.02 \pm 1.56)\%$,对ACh引发的收缩舒张效果为 $(85.21 \pm 0.03)\%$,说明EA抑制收缩的作用可能与阻断外 Ca^{2+} 内流相关。

EA可以舒张气管,那可能的机理是什么呢? ASM收缩与细胞内游离的 Ca^{2+} 浓度相关^[26],Takebayashi等人^[27]报道EA可以减小 γ 氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)引起的急性分离的原代皮层细胞内 Ca^{2+} 浓度上升,Hattori等人^[28]的研究也证实EA显著降低高渗引起的PC12细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,但Li等人^[29]的实验证明EA增加醛固酮的分泌是因为其增加了H295R细胞的 Ca^{2+} 内流。因此本研究利用Polychrome V钙成像系统检测了EA对细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响,结果显示EA可以降低ASM细胞内的 Ca^{2+} 水平(图4),说明EA是通

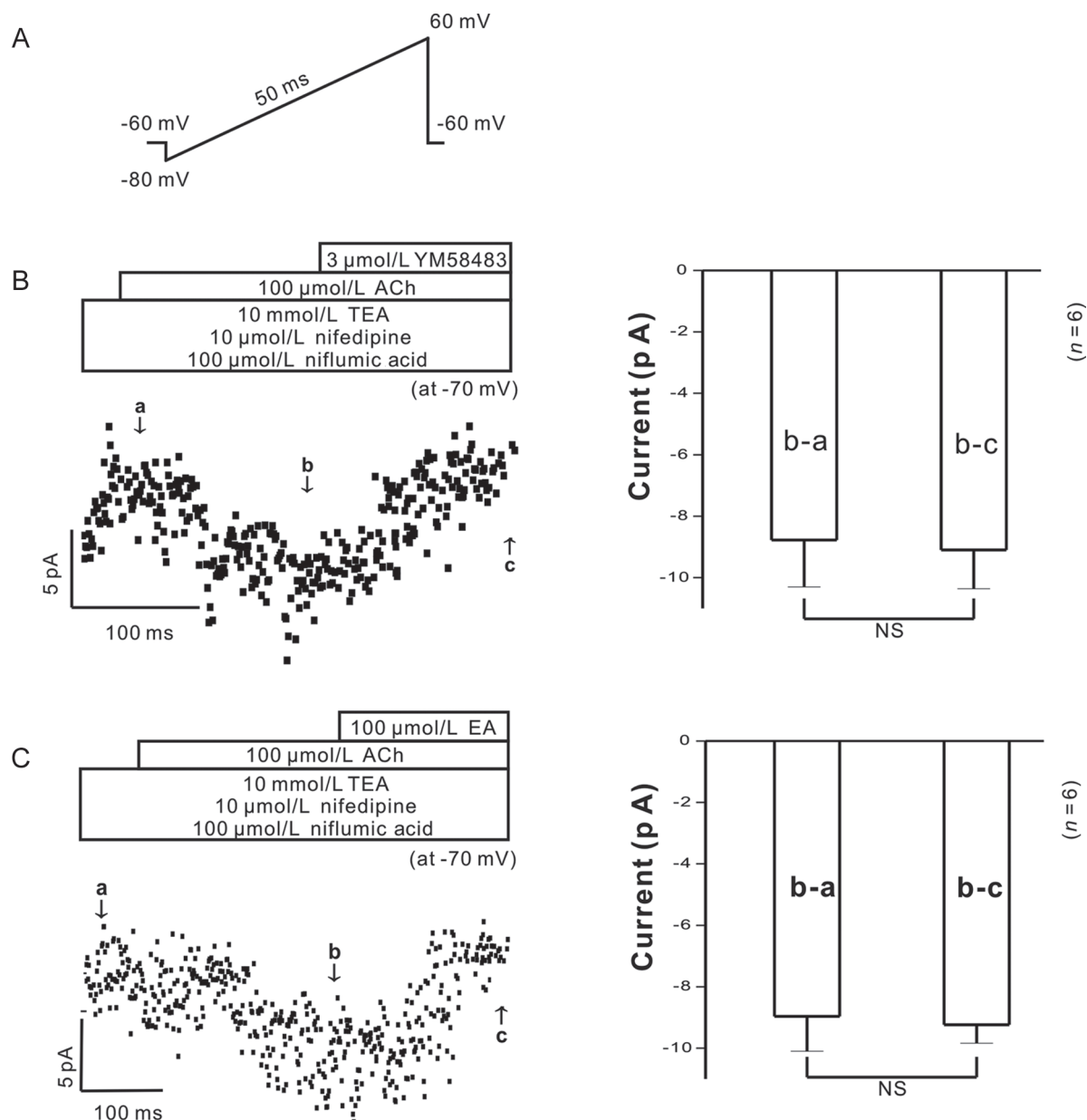


图 6. EA阻断SOCC电流

Fig. 6. EA blocks ACh-induced SOCC currents. *A*: A ramp for recording SOCC currents. *B*: YM58483 blocked the currents at -70 mV. *C*: The same currents were blocked by EA. NS: $P > 0.05$. a: the baseline of SOCC currents; b: the currents after adding ACh; c: the currents were blocked by YM58483 or EA. Mean $\pm$ SEM. For each experiment, $n = 6$ cells from 3 mice.

过降低 ASM 细胞内的 Ca^{2+} 水平来舒张气管。EA 抑制 LVDCC 和 SOCC 电流，这些通道介导 Ca^{2+} 流入以维持 ASM 的收缩^[30–32]，与 AHR 具有直接联系^[33]，是治疗哮喘的靶标。因此，本研究记录了 LVDCC 和 SOCC 电流并观察了其特异性阻断剂（硝苯地平 and YM58483）以及 EA 的影响，结果证实 EA 阻断 LVDCC 和 SOCC 介导的电流（图 5，6）。本研究进一步证明，EA 阻断 LVDCC 和 SOCC 后， Ca^{2+} 内

流停止，细胞内 Ca^{2+} 浓度降低，导致舒张（图 7）。此外，在活体水平，EA 降低小鼠 Rrs（图 8）。

总之，本研究结果证明 EA 抑制 LVDCC 和 SOCC，降低细胞内 Ca^{2+} 浓度，导致 ASM 舒张，提示 EA 是一种潜在的支气管舒张剂。目前使用的支气管扩张剂存在脱敏和其他副作用，本研究结果对于解决这些问题可能会有帮助。

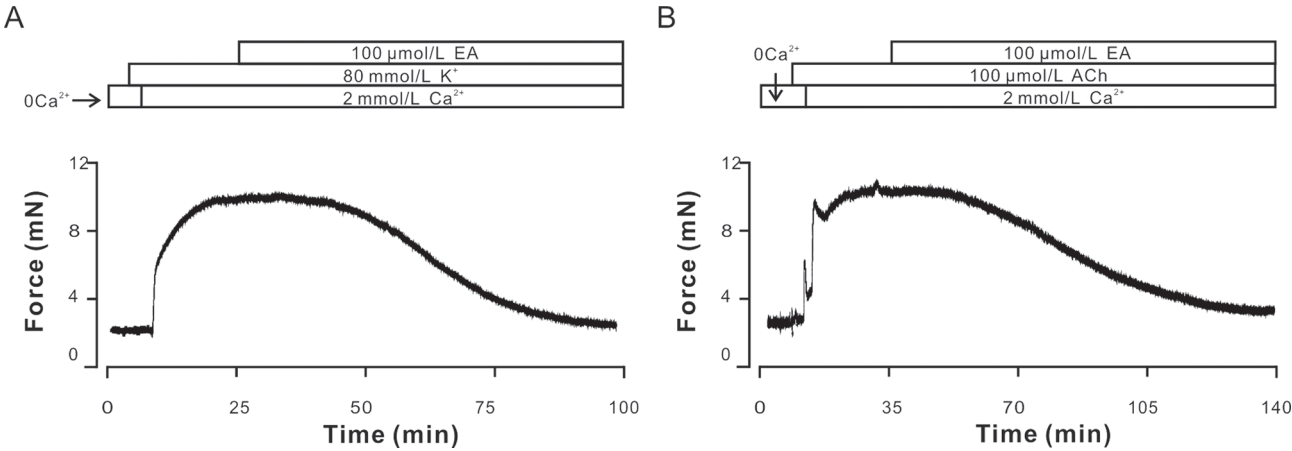


图 7. EA抑制Ca²⁺内流
Fig. 7. EA inhibits Ca²⁺ influx. Under the conditions of Ca²⁺ free, high K⁺ failed to induce contraction (A), however, ACh caused a transient contraction (B). After the addition of 2 mmol/L Ca²⁺, large contractions occurred. All these contraction were reversed after adding EA.

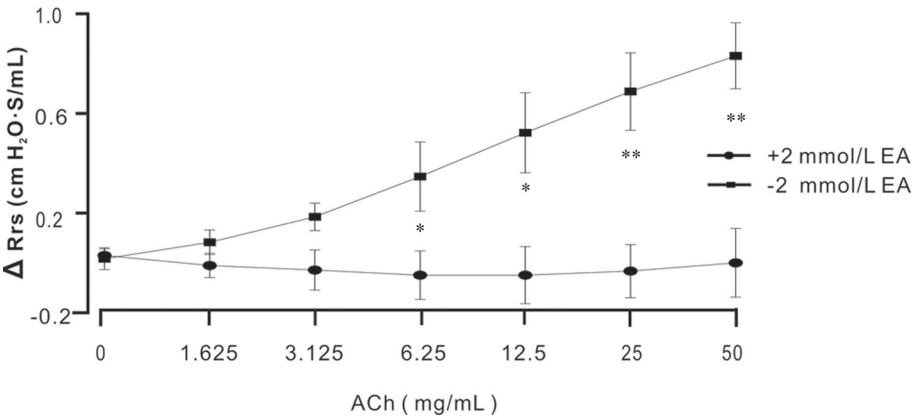


图 8. EA降低小鼠呼吸系统阻力
Fig. 8. ACh induced the increase of mouse resistance of the respiratory system (Rrs) *in vivo*, but the increase was inhibited by EA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Mean $\pm$ SEM. For each experiment, $n = 6$ mice.

参考文献

- 1 Ferguson JE, Patel SS, Lockey RF. Acute asthma, prognosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139(2): 438–447.
- 2 Webley WC, Hahn DL. Infection-mediated asthma: etiology, mechanisms and treatment options, with focus on *Chlamydia pneumoniae* and macrolides. *Respir Res* 2017; 18(1): 98.
- 3 Su Y, Zhu L, Yu X, Cai L, Lu Y, Zhang J, Li T, Li J, Xia J, Xu F, Hu Q. Mitochondrial transplantation attenuates airway hyperresponsiveness by inhibition of cholinergic hyperactivity. *Theranostics* 2016; 6(8): 1244–1260.
- 4 Qiao Y, Tam JKC, Tan SSL, Tai YK, Chin CY, Stewart AG, Ashman L, Sekiguchi K, Langenbach SY, Stelmack G, Halayko AJ, Tran T. CD151, a laminin receptor showing increased expression in asthmatic patients, contributes to airway hyperresponsiveness through calcium signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 139(1): 82–92.e85.
- 5 Xu BM, Zhang JH, Wang JL, Xiao JH. TRPC3 overexpression and intervention in airway smooth muscle of ovalbumin-induced hyperresponsiveness and remodeling. *Cell Biol Int* 2018; 42(8): 1021–1029.
- 6 Lauzon AM, Martin JG. Airway hyperresponsiveness; smooth muscle as the principal actor. *F1000Res* 2016; 5. pii: F1000 Faculty Rev-306. doi: 10.12688/f1000research.7422.1. eCollection 2016.
- 7 Yin LM, Xu YD, Peng LL, Duan TT, Liu JY, Xu Z, Wang WQ, Guan N, Han XJ, Li HY, Pang Y, Wang Y, Chen Z, Zhu W, Deng L, Wu YL, Ge GB, Huang S, Ulloa L, Yang YQ.

- Transgelin-2 as a therapeutic target for asthmatic pulmonary resistance. *Sci Transl Med* 2018; 10(427). pii: eaam8604. doi: 10.1126/scitranslmed.aam8604
- 8 Wang Q, Yu MF, Zhang WJ, Liu BB, Zhao QY, Luo X, Xu H, She YS, Zang DA, Qiu JY, Shen J, Peng YB, Zhao P, Xue L, Chen W, Ma LQ, Nie X, Shen C, Chen S, Chen S, Liu Q, Dai J, Qin G, Zheng YM, Wang YX, ZhuGe R, Chen J, Liu QH. Azithromycin inhibits muscarinic 2 receptor-activated and voltage-activated Ca^{2+} permeant ion channels and Ca^{2+} sensitization, relaxing airway smooth muscle contraction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2019. doi: 10.1111/1440-1681.13062
 - 9 Daenas C, Hatziefthimiou AA, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA. Azithromycin has a direct relaxant effect on precontracted airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2006; 553(1–3): 280–287.
 - 10 Gibson PG, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, Jenkins C, Peters MJ, Marks GB, Baraket M, Powell H, Taylor SL, Leong LEX, Rogers GB, Simpson JL. Effect of azithromycin on asthma exacerbations and quality of life in adults with persistent uncontrolled asthma (AMAZES): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2017; 390(10095): 659–668.
 - 11 Huang HL (黄鹤龄), Xie LD. Clinical use of diuretics as antihypertensive drugs. *Chin J Pract Intern Med (中国实用内科杂志)* 2015; 35(4): 306–310 (in Chinese with English abstract).
 - 12 Shimazaki A, Ichikawa M, Rao PV, Kirihara T, Konomi K, Epstein DL, Hara H. Effects of the new ethacrynic acid derivative SA9000 on intraocular pressure in cats and monkeys. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(7): 1019–1024.
 - 13 Wiederholt M, Dorschner N, Groth J. Effect of diuretics, channel modulators and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork. *Ophthalmologica* 1997; 211(3): 153–160.
 - 14 Pye S, Pavord I, Wilding P, Bennett J, Knox A, Tattersfield A. A comparison of the effects of inhaled furosemide and ethacrynic acid on sodium-metabisulfite-induced bronchoconstriction in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(2 Pt 1): 337–339.
 - 15 Marinkovich GA, Pichoff BE, Iwamoto LM, Dressel MV, Nakamura KT. Acute hyperoxic injury attenuates the relaxing effects of “loop” diuretics and salbutamol on large airways of newborn guinea pigs. *Pediatr Res* 1995; 38(3): 280–285.
 - 16 Tan L, Chen W, Wei MY, Shen J, Yu MF, Yang G, Guo D, Qin G, Ji G, Liu QH. Relaxant action of plumula nelumbinis extract on mouse airway smooth muscle. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015: 523640.
 - 17 Wu BN, Lin RJ, Lo YC, Shen KP, Wang CC, Lin YT, Chen IJ. KMUP-1, a xanthine derivative, induces relaxation of guinea-pig isolated trachea: the role of the epithelium, cyclic nucleotides and K^{+} channels. *Br J Pharmacol* 2004; 142(7): 1105–1114.
 - 18 Zhang T, Luo XJ, Sai WB, Yu MF, Li WE, Ma YF, Chen W, Zhai K, Qin G, Guo D, Zheng YM, Wang YX, Shen JH, Ji G, Liu QH. Non-selective cation channels mediate chloroquine-induced relaxation in precontracted mouse airway smooth muscle. *PLoS One* 2014; 9(7): e101578.
 - 19 Luo X, Xue L, Xu H, Zhao QY, Wang Q, She YS, Zang DA, Shen J, Peng YB, Zhao P, Yu MF, Chen W, Ma LQ, Chen S, Chen S, Fu X, Hu S, Nie X, Shen C, Zou C, Qin G, Dai J, Ji G, Su Y, Hu S, Chen J, Liu QH. Polygonum aviculare L. extract and quercetin attenuate contraction in airway smooth muscle. *Sci Rep* 2018; 8(1): 3114.
 - 20 Wu YF, Zhao P, Luo X, Xu JC, Xue L, Zhou Q, Xiong M, Shen J, Peng YB, Yu MF, Chen W, Ma L, Liu QH. Chloroquine inhibits Ca^{2+} permeable ion channels-mediated Ca^{2+} signaling in primary B lymphocytes. *Cell Biosci* 2017; 7: 28.
 - 21 Figueira RL, Costa KMD, Marsico AL, Milani TMD, Gonçalves WA, Borges MC, Silva OCE, Sbragia L. Vascular and ventilatory mechanical responses in three different stages of pulmonary development in the rabbit model of congenital diaphragmatic hernia 1. *Acta Cir Bras* 2018; 33(10): 879–888.
 - 22 Marinko M, Jankovic G, Nenezic D, Milojevic P, Stojanovic I, Kanjuh V, Novakovic A. (-)-Epicatechin-induced relaxation of isolated human saphenous vein: Roles of K^{+} and Ca^{2+} channels. *Phytother Res* 2018; 32(2): 267–275.
 - 23 Wu Y, Gunst SJ. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) regulates actin polymerization and contraction in airway smooth muscle by a vinculin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2015; 290(18): 11403–11416.
 - 24 Doeing DC, Solway J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J Appl Physiol* (1985) 2013; 114(7): 834–843.
 - 25 Marinkovich GA, Pichoff BE, Iwamoto LM, Dressel MV, Nakamura KT. Acute hyperoxic injury attenuates the relaxing effects of “loop” diuretics and salbutamol on large airways of newborn guinea pigs. *Pediatr Res* 1995; 38(3): 280–285.
 - 26 Zhao QY, Peng YB, Luo XJ, Luo X, Xu H, Wei MY, Jiang QJ, Li WE, Ma LQ, Xu JC, Liu XC, Zang DA, She YS, Zhu H, Shen J, Zhao P, Xue L, Yu MF, Chen W, Zhang P, Fu X, Chen J, Nie X, Shen C, Chen S, Chen S, Chen J, Hu S, Zou C, Qin G, Fang Y, Ding J, Ji G, Zheng YM, Song T, Wang YX, Liu QH. Distinct effects of Ca^{2+} sparks on cerebral artery and airway smooth muscle cell tone in mice and humans. *Int J Biol Sci* 2017; 13(10): 1242–1253.
 - 27 Takebayashi M, Kagaya A, Hayashi T, Motohashi N, Yam-

- awaki S. gamma-Aminobutyric acid increases intracellular Ca^{2+} concentration in cultured cortical neurons: role of Cl^- transport. *Eur J Pharmacol* 1996; 297(1–2): 137–143.
- 28 Hattori T, Wang PL. Involvement of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporters in hypertonicity-induced rise in intracellular calcium concentration. *Int J Neurosci* 2006; 116(12): 1501–1507.
- 29 Li X, Wang B, Tang L, Zhang Y, Chen L, Gu L, Zhang F, Ouyang J, Zhang X. GSTA1 expression is correlated with aldosterone level in KCNJ5-mutated adrenal aldosterone-producing adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103(3): 813–823.
- 30 Boie S, Chen J, Sanderson MJ, Sneyd J. The relative contributions of store-operated and voltage-gated Ca^{2+} channels to the control of Ca^{2+} oscillations in airway smooth muscle. *J Physiol* 2017; 595(10): 3129–3141.
- 31 Chen J, Sanderson MJ. Store-operated calcium entry is required for sustained contraction and Ca^{2+} oscillations of airway smooth muscle. *J Physiol* 2017; 595(10): 3203–3218.
- 32 Ding S, Zhang J, Yin S, Lu J, Hu M, Du J, Huang J, Shen B. Inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α and interleukin-8 enhance airway smooth muscle contraction by increasing L-type Ca^{2+} channel expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2019; 46(1): 56–64.
- 33 Sweeney M, McDaniel SS, Platoshyn O, Zhang S, Yu Y, Lapp BR, Zhao Y, Thistlethwaite PA, Yuan JX. Role of capacitative Ca^{2+} entry in bronchial contraction and remodeling. *J Appl Physiol* (1985) 2002; 92(4): 1594–1602.