文章编号:1000-5404(2005)11-1097-03

论著

普罗托品对大鼠血管平滑肌收缩反应及细胞内游离钙浓度的影响

李 斌,吴 芹,孙安盛,石京山,黄燮南 (遵义医学院药理学教研室,遵义 563003)

提 要: 目的 探讨普罗托品(protopine, Pro)对大鼠血管平滑肌细胞内游离钙浓度的影响。**方法** 采用无 Ca^{2+}-复 Ca^{2+} 的实验法,间接观察 Pro 对大鼠血管平滑肌细胞内游离钙浓度($[Ca^{2+}]_i$)的可能影响,再利用钙荧光指示剂 Fura-2/AM 负载的培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞,直接观察在 Pro 存在下,对去甲肾上腺素(NA)和高钾所致的 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高的影响。**结果** 在无钙 Krebs 液中,Pro 10、30、100 μmol/L 对 NA 所致血管条的短暂收缩均有明显的浓度依赖性抑制作用,对复 Ca^{2+} 后 NA 所诱发的持续收缩也呈剂量依赖性抑制作用。在 Fura-2/AM 负载血管平滑肌细胞的实验表明,Pro (50 μmol/L, 100 μmol/L) 对静息时的 $[Ca^{2+}]_i$ 无明显影响;在有外钙存在条件下,Pro 50 μmol/L 能明显降低 NA 所致 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高,对 KCl 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有降低趋势;当 Pro 的浓度增加到 100 μmol/L 时,对 NA 和 KCl 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高均有明显的抑制作用。**结论** Pro 可能通过抑制 Ca^{2+} 释放和(或)Ca^{2+} 内流来降低 NA 和高钾所致血管平滑肌 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高,从而抑制血管平滑肌的收缩反应。

关键词: 普罗托品;细胞内游离钙;大鼠胸主动脉条;血管平滑肌细胞
中图法分类号: R329.26; R337.2; R972.4 **文献标识码**: A

Effect of protopine on contraction and intracellular free calcium concentration of smooth muscle of thoracic aorta in rats

LI Bin, WU Qin, SUN An-sheng, SHI Jing-shan, HUANG Xie-nan (Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: Objective To study the effect of protopine (Pro) on the intracellular free calcium ions of the smooth muscular cells of the thoracic aorta in rats. **Methods** The procedure of calcium absence-calcium addition was designed to observe the changes of the level of calcium ions in the strips of the smooth muscle of the thoracic aorta indirectly. The concentration of calcium ions in the smooth muscle of the thoracic aorta was determined with Fura-2/AM loaded SMCs. The elevation of calcium ions was induced with norepinephrine (NE). The concentration of potassium ions was observed in the presence of Pro. **Results** Pro significantly inhibited the NE-induced transient contract of the smooth muscle of the thoracic aorta in calcium-free medium and long-lasting contraction after the addition of calcium ions in a concentration-dependent manner. In Fura-2/AM loaded SMCs, Pro (50 μmol/L or 100 μmol/L) exerted no effect on the resting calcium ions but obvious effect on the NE-induced and high potassium level-induced elevation of calcium ions. In the presence of extracellular calcium ions, Pro (50 μmol/L) decreased the NE-induced elevation of calcium ions but showed no effect on potassium-induced elevation of calcium. Pro (100 μmol/L) significantly decreased NE-induced and high potassium level-induced elevation of calcium ions. **Conclusion** Pro reduces NE-induced or high potassium level-induced elevation of calcium ions in the smooth muscle of the thoracic aorta through its effect on calcium release and/or calcium influx.

Key words: protopine; intracellular free calcium; thoracic aorta; smooth muscle

普罗托品(protopine, Pro)是从罂粟科、蓝堇科的紫金龙、夏天无等植物中提取的一种异喹啉生物碱,具有松弛血管平滑肌、抑制血小板的聚集[1]等药理作用。本实验室近年来的研究表明,Pro 能增加血管平滑肌细胞内 cAMP 和 cGMP 水平,这可能是其舒张血管平滑肌的机制之一[2];通过 Pro 对家兔胸主动脉血管平滑肌

基金项目:贵州省省长基金资助项目[黔科教办(2001)4号]
Supported by the Nomarch Foundation of Guizhou Province (2001)
作者简介:李 斌(1977-),男,四川省犍为县人,硕士,助教,主要从事心血管药理学方面的研究,现在第三军医大学药理学教研室工作。电话:(023)68752265, E-mail: libin6033@sina.com
通讯作者:黄燮南,电话:(0852)8204139,E-mail: jsshi@zmc.gz.cn
收稿日期:2005-01-01;**修回日期**:2005-03-30

在无钙液中的收缩反应影响的观察，发现 Pro 的扩血管作用可能还与其降钙作用有关[3]，但其只是间接反映了 Pro 对 $[Ca^{2+}]_i$ 的可能影响。本研究旨在间接研究的基础上，采用更直接和准确的方法观察 Pro 对培养的大鼠胸主动脉血管平滑肌 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响，从而进一步阐明其扩血管的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

Pro：为白色粉末，由中国科学院贵州省天然药物化学重点实验室提供，纯度 98%。Fura-2/AM：美国 Sigma 公司产品，由 DMSO 配制。正常 Krebs 保养液的组成(mmol/L)：NaCl 118，KCl 4.7，KH_2PO_4 0.12，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.18，$NaHCO_3$ 25，葡萄糖 11.1，溶液 pH 7.4。无钙 Krebs 保养液：不含 $CaCl_2$，并加入 EGTA 0.5 mmol/L，其它同正常 Krebs 保养液。Hanks 液的组成(mmol/L)：NaCl 137.0，$CaCl_2$ 1.3，KCl 5.4，$MgSO_4$ 0.8，Na_2HPO_4 0.38，KH_2PO_4 0.44，$NaHCO_3$ 4.2，葡萄糖 5.6，溶液 pH 7.4。XWTD-204 台式自动平衡记录仪：上海大华仪器厂。RF-5000 荧光分光度仪：日本岛津公司。

1.2 实验动物

SD 大鼠 50 只，雄性，体质量(200 ± 20)g，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.3 方法

1.3.1 血管条的准备　大鼠，击头致昏后，迅速取出胸主动脉，剥离周围结缔组织去除内皮，剪成长约 20 mm，宽约 2.5 mm 的螺旋条，置于含有 Krebs 营养液 20 ml 的恒温(37 ℃)水浴槽中，持续通入 95% O_2 + 5% CO_2 混合气体，pH 7.3 ~ 7.4，静息负荷 1 g，每隔 15 min 更换营养液 1 次，反复冲洗、平衡 90 min 后加入试药。血管的收缩经张力换能器记录于 XWTD-204 台式自动平衡记录仪。实验中所用药物浓度均用最终浴槽浓度计算。

1.3.2 Pro 对 NA 在无 Ca^{2+} 液中缩血管效应的影响　在含正常 Krebs 液的浴槽内加入 NA 1 μmol/L，动脉条出现快速而明显的收缩，反复冲洗、平衡至给药前水平。重复刺激 3 次，收缩高度基本一致，表明动脉条收缩状态达到稳定。冲洗平衡 1 h 后，用无钙 Kreb's 液置换正常 Krebs 液，稳定 3 min 后，再加入等量 NA，可见动脉条产生迅速而短暂的收缩，待其舒张平稳后，累积加入 $CaCl_2$ 1.1、2.2 mmol/L，可见随 Ca^{2+} 浓度增加，动脉条再次收缩并达峰值，以此为药前对照。然后用正常 Krebs 液反复冲洗，平衡 1 h 后改用无钙 Krebs 液，同时分别加入不同浓度 Pro (10、30、100 μmol/L)，稳定 3 min，重复上述实验。实验结束前再做一次无 Ca^{2+} NA 收缩对照，收缩高度与给 Pro 前基本一致。

1.3.3 细胞培养及鉴定　采用贴壁法进行大鼠胸主动脉平滑肌细胞原代培养，当细胞为 50% ~ 70% 单层融合时将组织块推掉，继续培养 3 ~ 5 d 便可进行传代。实验采用 3 ~ 5 代细胞进行测定。分别采用 HE 染色和特异性抗体(SMA)染色对培养之细胞进行鉴定。

1.3.4 血管平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定　用 0.06% 的胰蛋白酶消化液消化细胞，150 × g 离心 5 min 并弃上清，用含 0.2% BSA 的 Hank 液洗 2 次，制成细胞密度约 1 × 10^6/ml 细胞悬液。经台盼蓝染色显示细胞成活率为 90% ~ 95%，方可用于负载使用。上述细胞悬液于 37 ℃放置 5 min，加入 3 μmol/L 的 Fura-2/AM，恒温(37 ℃)避光振摇负载 40 min。负载后的细胞 150 × g 离心 5 min 并弃上清，再用含 0.2% BSA 的 Hanks 液洗两次以防止胞内 Fura-2/AM 外排，最后用 Hanks 液重新悬浮，并调整细胞数为 1 × 10^6/ml 用于荧光测定。

参照文献[4]方法，采用 RF-5000 荧光分光度仪，双波长测定。测定时激发波长 340 nm 和 380 nm，发射波长(480 ± 2) nm $[Ca^{2+}]_i$ 按如下公式计算：$[Ca^{2+}]_i = Kd \times [(R-R_{min})/(R_{max}-R)] \times FD/FS$。式中 Kd 为 Fura-2/AM 与 Ca^{2+} 结合反应的解离常数，生理条件下 Kd 为 224 nmol/L；$R(F_{340}/F_{380})$ 为荧光强度比值；R_{max} 为加入 Tritonx-100(终浓度 0.1%)测得的最大荧光强度比值，R_{min} 为加入 EGTA(终浓度为 5 mmol/L)后的最小荧光强度比值；FD 和 FS 分别为无 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 饱和状态下 Fura-2 在 380 nm 处的荧光强度。加入刺激剂 NA(1 μmol/L)及 KCl(50 mmol/L) 1 min 后测定 Fura-2/AM 荧光的反应值，并按公式计算 NA 和高钾对 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高水平。为了观察 Pro 对 NA 和高钾所诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高的影响，在测定前 5 min 加入不同浓度的 Pro，37 ℃ 温育并振荡，并按同法加入刺激剂 NA 及 KCl 1 min 后测定。同时，观察了钙通道阻滞剂维拉帕米(10 μmol/L) 作为阳性药对高钾所致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响。

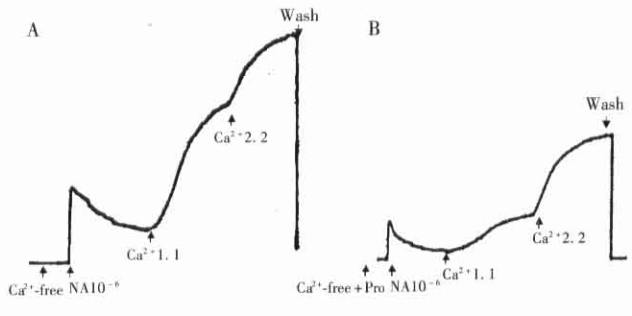
1.4 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Excel 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 Pro 对 NA 在无 Ca^{2+} 液中缩血管效应的影响

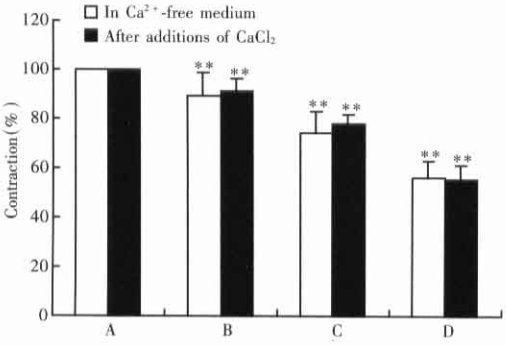
结果表明，在无钙液中，Pro 对静息状态时的收缩曲线没有影响，但却可明显降低 NA 所致短暂收缩和复 Ca^{2+} 诱发的持续收缩的收缩曲线的高度(图 1)；Pro 10、30、100 μmol/L 对 NA 所致短暂收缩均有明显浓度依赖性抑制作用($P < 0.01$)；对复 Ca^{2+} 诱发的持续收缩，Pro 10、30、100 μmol/L 均有抑制作用，并呈量效关系(图 2)。



A: Without Pro; B: With Pro

图 1 Pro 对 NA 在无钙液中的短暂收缩和复钙后持续收缩的影响

Fig 1 Typical traces of the effect of Pro on the contractions induced by NA in Ca^{2+}-free medium and after addition of $CaCl_2$



A：NA；B：NA + Pro 10 μmol/L；C：NA + Pro 30 μmol/L；D：NA + Pro 100 μmol/L；** ：$P<0.01$，*vs* A

图 2　Pro 对无钙液中 NA 所诱发的血管条短暂收缩和复钙后所导致的血管条持续收缩的影响

Fig 2　Effects of Pro on contraction of rat aorta strips induced by NA (1 μmol/L) in Ca^{2+}-free medium and after addition of $CaCl_2$ (2.2 mmol/L)

2.2　Pro 对高钾去极化引起的血管平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增高的影响

在细胞外钙为 1.3 mmol/L 时，KCl（50 mmol/L）能显著增加血管平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$，由静息时的（177.2 ± 10.3）nmol/L 增高至（301.7 ± 18.0）nmol/L，Pro 50 μmol/L 对 KCl 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有降低趋势，但无显著统计学意义，当 Pro 的浓度增加到 100 μmol/L 时，对 KCl 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高有明显的抑制作用，达到（224.3 ± 16.4）nmol/L（$P<0.05$）。阳性药维拉帕米可明显抑制 KCl 所致的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高，达到（199.3 ± 4.5）nmol/L（$P<0.01$）。

2.3　Pro 对去甲肾上腺素引起的血管平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 增高的影响

在细胞外钙为 1.3 mmol/L 时，NA（1 μmol/L）显著增加细胞 $[Ca^{2+}]_i$，由静息时的（182 ± 12.6）nmol/L 增加到（312.6 ± 31.8）nmol/L，各浓度的 Pro 对细胞内静息状态下的 $[Ca^{2+}]_i$ 明显影响（$P>0.05$）。Pro（50 μmol/L 和 100 μmol/L）明显降低 NA 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高，且分别只能达到（281.5 ± 17.6）nmol/L（$P<0.05$）和（246.6 ± 12.1）nmol /L（$P<0.01$）。

3　讨论

血管平滑肌细胞内游离钙浓度（$[Ca^{2+}]_i$）的变化对血管张力的变化起着重要的影响[5]。目前认为，所有 α1AR 的激活均导致 $[Ca^{2+}]_i$ 升高，$[Ca^{2+}]_i$ 来源于细胞内贮 Ca^{2+} 的动员和细胞外 Ca^{2+} 的内流。NA 通过开放受体操纵性钙通道（ROC）促使细胞外 Ca^{2+} 内流进入胞内，同时通过 α 受体激活 G 蛋白与磷酯酶 C，产生三磷酸肌醇（IP3）增加，继而引起内质网 Ca^{2+} 释放，使 $[Ca^{2+}]_i$ 增加而致平滑肌收缩[6]。激动剂在正常保养液中所产生的持久性血管收缩主要系细胞外 Ca^{2+} 的内流所致，其在无 Ca^{2+} 液引起的短暂收缩则是细胞内 Ca^{2+} 释放的结果[7,8]。我们采用无 Ca^{2+} 和复 Ca^{2+} 液的实验结果表明，Pro10、30、100 μmol/L 在无 Ca^{2+} 液中对 NA 所致短暂收缩有浓度依赖性抑制作用，提示 Pro 对 NA 所导致的内质网 Ca^{2+} 释放有一定的抑制作用，且作用随剂量的增加而增强；同时 Pro 还对复钙后的持久性血管收缩有明显浓度依赖性抑制作用，从而间接提示 Pro 对 NA 所致的细胞外 Ca^{2+} 的内流也具有抑制作用的可能性。上述结果与本实验室先前利用兔胸主动脉条中的实验结果基本一致，进一步印证了 Pro 的扩血管作用与 $[Ca^{2+}]_i$ 的改变存在密切关系。

但此方法只能间接反映 Pro 对 $[Ca^{2+}]_i$ 的可能影响，为了进一步证实 Pro 的上述效应，我们采用钙荧光指示剂 Fura-2/AM 负载的血管平滑肌培养细胞作了进一步探讨，该法能直接而动态地观察 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化，结果显示，Pro 对静息状态下的 $[Ca^{2+}]_i$ 没有影响，但对 NA 和高钾所引起的血管平滑肌 $[Ca^{2+}]_i$ 增加均有明显的抑制作用，此结果与我们早先观察到的 Pro 对 NA 和高钾所诱导的大鼠血管条收缩实验相一致[9]，这种一致性进一步证实了 Pro 的扩血管作用可能与降低血管平滑肌 $[Ca^{2+}]_i$ 有密切关系。因本实验仅在常钙的条件下进行，故该结果仅能反映 Pro 对 NA 所致 Ca^{2+} 内流和细胞内贮 Ca^{2+} 的动员的综合影响。结合 Pro 对高钾和 NA 所致血管收缩的抑制强度大致相同的特点，似可认为，Pro 可能通过抑制 Ca^{2+} 释放和（或）Ca^{2+} 内流来降低 NA 和高钾所致血管平滑肌 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高。

参考文献：

[1] 马国义，张子昭，陈植和. 普罗托品对家兔血小板功能的影响[J]. 中国药理学报，1994，15(4)：367 - 371.

[2] 余丽梅，黄燮南，孙安盛，等. 普鲁托品对家兔主动脉扩血管作用的机理[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2000，14(1)：21 - 25.

[3] 余丽梅，黄燮南，孙安盛，等. 原阿片碱对兔胸主动脉的松弛作用[J]. 遵义医学院学报，1999，22(3)：5 - 7.

[4] Xu Y J, Panagia V, Shao Q, *et al*. Phosphatidic acid increases intracellular free Ca^{2+} and cardiac contractile force[J]. Am J Physiol, 1996, 271(2 Pt 2)：H651 - H659.

[5] Walsh M P, Kargacin G J, Kendrick Jones J, *et al*. Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone[J]. Can J physiol pharmacol, 1995, 73(5)：565 - 573.

[6] Karaki H, Ozaki H, Hori M, *et al*. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle[J]. Pharmacol Rev, 1997, 49(2)：157 - 230.

[7] Deth R, Casteels R. A study of releasable Ca fractions in smooth muscle cells of the rabbit aorta[J]. J Gen Physiol, 1977, 69(4)：401 - 416.

[8] Huang X N, Hisayama T, Takayanagi I. Endothelin-1 induced contraction of rat aorta: contributions made by Ca^{2+} influx and activation of contractile apparatus associated with no change in cytoplasmic Ca^{2+} level[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1990, 341(1-2)：80 - 87.

[9] 李　斌，黄燮南，吴　芹，等. 普鲁托品对大鼠血压的影响[J]. 遵义医学院学报，2003，26(3)：209 - 212.

（编辑　张大春）