

# 间硝苯地平对血管紧张素 II 促进血管平滑肌细胞增殖和蛋白质合成的影响

古宏标 汤聿海\* 徐毅\*\*

(广东药学院病理生理教研室, 广州 510224; \* 湖南医科大学药理教研室,

\*\* 湖南医科大学心血管生理室, 长沙 410079)

**摘要** 以培养血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)为模型, 观察了间硝苯地平(*m*-nifedipine, *m*-Nif)对血管紧张素 II(angiotensin II, ANG II)促进 VSMC 增殖和蛋白质合成的影响。结果表明, *m*-Nif 抑制 ANG II( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )引起 VSMC [ $^3\text{H}$ ] thymidine 和 [ $^3\text{H}$ ] leucine 参入, 并呈剂量依赖性。*m*-Nif( $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )可抑制 ANG II 对 VSMC 的刺激、DNA 及蛋白质合成速率, 分别降低了 46%, 58%, 53%。提示 *m*-Nif 可抑制 ANG II 对 VSMC 增殖和蛋白质合成的促进作用。

**关键词** 间硝苯地平; 血管紧张素 II; 血管平滑肌细胞; 蛋白质合成

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的异常增殖是高血压的一个基本病理特征。VSMC 增殖并向内膜下迁移可造成血管壁肥厚, 管腔变窄并进而引起外周阻力增高<sup>[1]</sup>。近年来研究证实血管紧张素 II(angiotensin II, ANG II)在高血压血管肥厚的发生发展中起重要作用<sup>[1,2]</sup>。因此, 抑制或逆转 VSMC 增殖是防治高血压的一条重要途径。

近年的研究揭示, 钙拮抗剂不仅扩张血管、降低血压, 而且可以抑制 VSMC 的过度增殖<sup>[3]</sup>, 间硝苯地平是硝苯地平的新衍生物, 它在改善心肌氧摄取率和心功能方面优于硝苯地平, 增加冠脉血流量, 降低血压和外周血管阻力也较硝苯地平强而持久; 且能逆转肾血管性高血压心肌肥厚<sup>[4]</sup>; 但对 ANG II 诱发的 VSMC 增殖和蛋白质合成增加的影响尚无报道。本研究以培养的 VSMC 为模型, 观察 *m*-Nif 对 ANG II 促进 VSMC 增殖和蛋白质合成的影响。

## 材 料 和 方 法

**试剂** DMEM 培养基(Gibco 公司, 美国), 新生小牛血清(杭州四季青生物工程研究所), *m*-Nif(天津医药工业研究院), [ $^3\text{H}$ ] thymidine( $8.51 \times 10^{11} \text{ Bq} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ ), [ $^3\text{H}$ ] leucine( $2.4 \times 10^{12} \text{ Bq} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ )(上海原子核研究所)。

**细胞培养** 无菌取出家兔(8 周龄)的主动脉段, 按 Southgate<sup>[5]</sup>的贴壁法培养 VSMC。用含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液静置培养 7 d 后, 可见有少量细胞开始从组织边缘长出, 待细胞长满培养瓶底即传代培养。本实验采用 4~6 代细胞, 并经光镜, 免疫组化染色鉴定<sup>[5]</sup>, VSMC 纯度  $\geq 95\%$ 。

**细胞计数** 以 0.1% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA(1:1) 消化贴壁的细胞并调制成  $5 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$  细胞悬液转入 24 孔培养板中(每孔 1 ml), 培养 24 h 后换成含 5% 小牛血清培养液, 继续培养 24 h, 加不同浓度 *m*-Nif( $10^{-9} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 1 h 后再加入 ANG II( $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 继续孵育 48 h 后中止反应, 进行细胞计数。

**[ $^3\text{H}$ ] thymidine, [ $^3\text{H}$ ] leucine 参入速率测定** 以  $5 \times 10^4 \cdot \text{ml}^{-1}$  细胞悬液移入 24 孔板(每孔 1 ml)加入含 20% 小牛血清的 DMEM, 静置 24 h 后( $\text{CO}_2$  箱,  $37.5^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), 换成含 5% 小牛血清的 DMEM 培养液, 培养 24 h 后加入 *m*-Nif( $10^{-9} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 1 h 后再加入 ANG II( $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 继续培养 48 h。然后分别加入每孔  $3.70 \times 10^4 \text{ Bq}$  [ $^3\text{H}$ ] thymidine, 和  $3.7 \times 10^4 \text{ Bq}$  [ $^3\text{H}$ ] leucine, 孵育 4 h 后中止反应, 经胰酶消化, 将细胞收集于玻璃纤维滤膜上, 烘干置闪烁瓶, 加闪烁液, 在液闪计数仪(Beckman, LS3801)上测定 cpm, 并以 Lowry 法<sup>[5]</sup>测定蛋白。

**统计分析** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 每个样本采用 3 平行孔, 共 3~4 批实验, 结果采用方差分析处理。

## 结 果

### *m*-Nif 对 ANG II 诱导的血管平滑肌的 DNA 和蛋白质合成的影响

结果如图 1, 2 所示, *m*-Nif 显著抑制 ANG II( $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 引起 VSMC DNA 和蛋白质合成增加, 在  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  范围内呈剂量依赖性。 [ $^3\text{H}$ ] thymidine 的  $\text{IC}_{50}$  为  $6.4 \pm 2.7 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , [ $^3\text{H}$ ] leucine 的  $\text{IC}_{50}$  为  $7.5 \pm 1.6 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

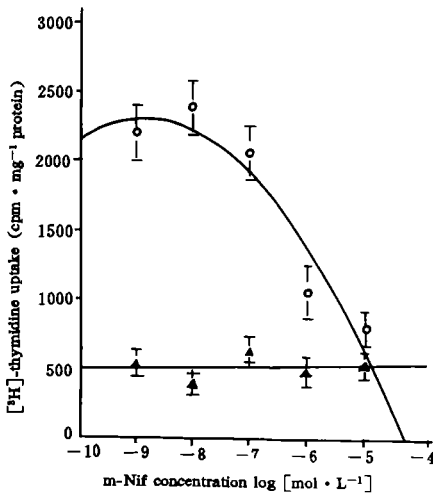


Fig 1 Inhibitory effect of *m*-nifedipine in various concentrations on angiotensin II ( $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) stimulated [ $^3\text{H}$ ]-thymidine uptake in cultured rabbit aortic smooth muscle cells.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ , for each concentration. (○) *m*-nifedipine + angiotensin II; (▲) *m*-nifedipine.

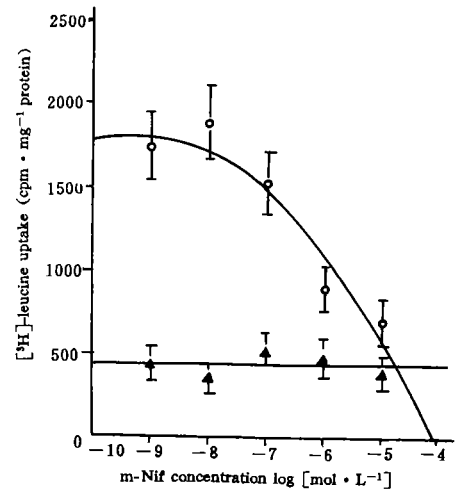


Fig 2 Inhibitory effect of *m*-nifedipine in various concentrations on angiotensin II ( $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) stimulated [ $^3\text{H}$ ]-leucine incorporation in cultured rabbit aortic smooth muscle cells.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ , for each concentration. (○) *m*-nifedipine + angiotensin II; (▲) *m*-nifedipine.

由表 1 可见,  $m$ -Nif( $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 明显抑制 ANG II( $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 促进 [ $^3\text{H}$ ] thymidine 和 [ $^3\text{H}$ ] leucine 的参入, 较 ANG II 组分别降低了 58% 和 53% ( $P < 0.001$ ), 与对照组比较无差异 ( $P > 0.05$ ); 单用  $m$ -Nif 对基础状态下 VSMC 的 DNA 和蛋白质合成无影响(表 1)。

**Tab 1 Effect of  $m$ -nifedipine( $m$ -Nif,  $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on angiotensin II (ANG II,  $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) stimulated [ $^3\text{H}$ ]-thymidine, [ $^3\text{H}$ ]-leucine incorporation and cell number in cultured smooth muscle cells**

	[ $^3\text{H}$ ]-Thymidine (cpm·mg <sup>-1</sup> protein)	[ $^3\text{H}$ ]-Leucine (cpm·mg <sup>-1</sup> protein)	Cells number ( $\times 10_4$ /dish)
Control	568.9 $\pm$ 145.3	546.5 $\pm$ 123.1	17.5 $\pm$ 4.6
ANG II	2368.9 $\pm$ 432.0***	1966.5 $\pm$ 365.8***	43.2 $\pm$ 1.5***
$m$ -Nif	601.7 $\pm$ 165.5 <sup>△△△</sup>	624.8 $\pm$ 123.5 <sup>△△△</sup>	18.9 $\pm$ 3.2 <sup>△△△</sup>
ANG II + $m$ -Nif	1002.0 $\pm$ 246.2 <sup>△△△</sup>	921.6 $\pm$ 246.2 <sup>△△△</sup>	23.4 $\pm$ 4.6 <sup>△△△</sup>

$\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with control,  $^{\Delta} P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta} P < 0.01$ ,  $^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.001$  compared with ANG II.

### $m$ -Nif 对 ANG II 促血管平滑肌细胞增殖作用的影响

如表 2 所示,  $m$ -Nif( $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 显著抑制 ANG II 引起的兔主动脉 VSMC 的细胞数目增加, 在  $10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内, 随着  $m$ -Nif 浓度增高, 抑制作用逐渐加强,  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  达到最大抑制效应。在  $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度时,  $m$ -Nif + ANG II 组的 VSMC 的细胞数目较 ANG II 组降低了 46% ( $P < 0.01$ ), 而与对照组比较无差异 ( $P > 0.05$ ); 单用  $m$ -Nif 对基础状态下的 VSMC 无抑制作用 ( $P > 0.05$ , 表 1)。

**Tab 2 Effects of  $m$ -nifedipine in various concentrations on cell number in culture rabbit aortic smooth muscle cells in the absence or presence of angiotensin II( $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )**

$m$ -Nif concentration( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Cell number( $\times 10^4$ )/dish	
	$m$ -Nif + ANG II	$m$ -Nif
$10^{-9}$	39.8 $\pm$ 5.3	14.3 $\pm$ 2.5 <sup>△△△</sup>
$10^{-8}$	42.8 $\pm$ 1.2	15.2 $\pm$ 2.6 <sup>△△△</sup>
$10^{-7}$	28.3 $\pm$ 5.1***	12.4 $\pm$ 3.2 <sup>△△△</sup>
$10^{-6}$	23.4 $\pm$ 4.6***	16.2 $\pm$ 3.2 <sup>△△</sup>
$10^{-5}$	18.2 $\pm$ 3.1***	12.1 $\pm$ 1.2 <sup>△△</sup>

$\bar{x} \pm s$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared with  $m$ -Nif( $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ );  $^{\Delta\Delta} P < 0.01$ ,  $^{\Delta\Delta\Delta} P < 0.001$  compared with  $m$ -Nif + ANG II,  $n = 6$  for each concentration.

## 讨 论

近年来研究提示, ANG II 是 VSMC 生长的有效刺激因素<sup>[1,2]</sup>。它刺激 VSMC 生长包括肥大(细胞体积的增大)和增殖(细胞数量增加)。有学者发现 ANG II 引起大动脉和较大的小动脉结构变化主要是 VSMC 肥大和细胞外基质扩张, 在功能上表现为血管顺应性和扩张性降低; VSMC 增殖还可改变小动脉结构, 并进而导致外周阻力升高<sup>[7,8]</sup>。但 Gohlke 认为 ANG II 既能促进 VSMC 增殖又能刺激 VSMC 肥大<sup>[9]</sup>。本结果也说明 ANG II 可刺激 VSMC 生长(增殖和肥大)。究其原因, 人们发现无血清培养基中 ANG II 可以刺激 VSMC 肥大而不能产生 VSMC 的增殖, 而加血清

培养基 ANG II 可以促 VSMC 生长(肥大和增殖)<sup>[9]</sup>。

研究表明小动脉壁的肥厚和增殖既是高血压的病因又是高血压的结果<sup>[1,2]</sup>。因此,一个理想的治疗高血压的药物不仅仅是控制血压,而且能够抑制小动脉壁的肥厚和增殖。钙拮抗剂 *m*-Nif 扩张血管,降低血压作用已得到证实<sup>[4]</sup>。本研究则表明, *m*-Nif 通过抑制 ANG II 诱发的 VSMC 的 DNA 和蛋白质合成,可抑制血管壁的进一步肥厚和增殖(如果治疗的持续时间长达数倍于平滑肌细胞蛋白质的半衰期,则有可能逆转小动脉壁的肥厚),此结果与 Sachinidis 报道<sup>[10]</sup>相一致。

钙拮抗剂 *m*-Nif 抑制 ANG II 刺激 VSMC 的增殖和肥大的机制尚不清楚。但人们发现 ANG II 刺激 VSMC 的增殖和肥大作用与 VSMC 内  $Ca^{2+}$  升高有关<sup>[11]</sup>。也有实验证实,钙拮抗剂 nifedipine 可以抑制 VSMC 三磷酸肌醇( $IP_3$ )引起的胞内  $Ca^{2+}$  释放<sup>[12]</sup>。

致谢 饶曼人教授惠赠 *m*-Nif。

### 参 考 文 献

- 1 Griffin SA, Brown WCB, Macpherson F *et al.* Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension*, 1991, **17**:626
- 2 Heagerty AM. Angiotensin II: vasoconstrictor or growth factor? *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991, **18**(Suppl 2):S14
- 3 Veniant M, clozel JP, Heudes D *et al.* Effects of Ro 40-5967, a new calcium antagonist, and enalapril on cardiac remodeling in renal hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, **12**:544
- 4 Xi T, Rao MR. Effects of *m*-Nif on dihydropyridine binding sites in cardiac and cerebral cortex membranes from left ventricular hypertrophied rats. *Acta Pharmacol Sin*, 1993, **14**:405
- 5 Southgate KM, Newby AC. Serum-induced proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells from the contractile state is inhibited by 8-Br-cAMP but not 8-Br-cGMP. *Atherosclerosis*, 1990, **80**:113
- 6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL *et al.* Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**:265
- 7 Owens GK, Schwartz SM, McCanna M *et al.* Evaluation of medial hypertrophy in resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1988, **11**:198
- 8 Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK *et al.* Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*, 1988, **62**:749
- 9 Gohlke P, Lamberty V, Kuwer I *et al.* Vascular remodeling in systemic hypertension. *Am J Cardiol*, 1993, **71**:2E
- 10 Sachinidis A, Ko YO, Graack GKH *et al.* Action of metoprolol, bralaprill, diltiazem, verapamil, and nifedipine on cell growth of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Phammacol*, 1992, **19**(Suppl 2):960
- 11 Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM *et al.* Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1989, **13**:305
- 12 Turla MB, Thompson MM, Corjay MH *et al.* Mechanisms of angiotensin II and arginine vasopressin-induced increases in protein synthesis and content in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*, 1991, **68**:288

# INHIBITORY EFFECTS OF *M*-NIFEDIPINE ON ANGIOTENSIN II STIMULATED PROLIFERATION AND PROTEIN SYNTHESIS IN CULTURED RABBIT AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS

HB Gu, YH Tang and Y Xu

(*Department of Pathophysiology, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510224*)

**ABSTRACT** By using rabbit aortic smooth muscle cells (VSMC) in culture as a model, the effects of *m*-nifedipine (*m*-Nif) on the growth of VSMC were observed. The results showed that *m*-Nif inhibited [<sup>3</sup>H]-thymidine and [3H]-leucine incorporation into DNA and protein, decreased cell number in a concentration-dependent manner in angiotensin II (ANG II) induced VSMC. At the concentration of 2 μmol·L<sup>-1</sup>, *m*-Nif was found to reduce the ANG II (100 nmol·L<sup>-1</sup>) stimulated [<sup>3</sup>H]-thymidine, [<sup>3</sup>H]-leucine incorporation and cell number by 46%, 58% and 53%, respectively. Our results suggest that *m*-Nif can inhibit ANG II stimulated proliferation and protein synthesis in cultured rabbit aortic VSMC.

**Key words** *m*-Nifedipine; Angiotensin II; Smooth muscle cell; Protein synthesis