

钙拮抗剂 TMB-8 抑制 BHQ, NE 和 KCl 引起的培养乳牛基底动脉单个平滑肌细胞内游离钙的升高

王 斌 张孝清 王金晞* 杨思军* 肖继皋

(南京医科大学药理教研室, 南京 210029; * 南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要 用 AR-CM-MIC 阳离子测定系统, 测量单个细胞内游离钙浓度($[Ca^{2+}]_i$), 研究 8-(*N,N*-二乙胺)-*n*-辛基-3,4,5-三甲氧基苯甲酸酯(TMB-8) 对培养乳牛基底动脉平滑肌 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用。在细胞外钙浓度为 $1.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, TMB-8 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可明显抑制 BHQ, NE 及 KCl 引起 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高。在细胞外钙为零 + EGTA $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, TMB-8 ($10, 30$ 及 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可浓度依赖性地降低静息 $[Ca^{2+}]_i$, TMB-8 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可几乎完全阻断 BHQ 及 NE 引起 $[Ca^{2+}]_i$ 的增加。研究表明 TMB-8 降低培养乳牛基底动脉平滑肌 $[Ca^{2+}]_i$ 的机制, 主要是抑制肌浆网 Ca^{2+} 的释放, 或增加肌浆网对 Ca^{2+} 的摄入, 并由此间接地抑制细胞外钙的内流。

关键词 8-(*N,N*-二乙胺)-*n*-辛基-3,4,5-三甲氧基苯甲酸酯(TMB-8); 细胞内游离钙浓度; 乳牛基底动脉平滑肌细胞

1975 年 Chiou GCY 等^[1]报道, TMB-8 系一种钙拮抗剂, 可减少肠道平滑肌和骨骼肌细胞膜的 Ca^{2+} 内流和胞内 Ca^{2+} 的释放, 并作为一种内钙释放抑制剂的工具药被广泛应用。近年发现 TMB-8 对大鼠实验性脑缺血有良好的防治作用^[2]。我们发现 TMB-8 能显著抑制组胺, 去甲肾上腺素及 KCl 引起的兔基底动脉收缩^[3], 并能剂量 ($0.5 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 依赖性地增加大鼠脑血流量(CBF)和增强脑血流自动调节功能, 而对血压影响不大^[4]。虽然已证实 TMB-8 可降低主动脉 A7r5 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ ^[5], 但由于脑血管和外周血管对血管活性物质及药物的反应有着明显的差异^[6,7]。因此仅从 TMB-8 对主动脉平滑肌的作用仍不能完全说明其扩张脑血管, 增加 CBF 的机理。本实验通过对培养乳牛基底动脉单个平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的分析, 阐明 TMB-8 扩张脑血管, 增加 CBF 及抗脑缺血可能的作用机制。

材 料 与 方 法

药品与仪器 Fura-2/AM, 二甲亚砜(DMSO), 去甲肾上腺素(NE), TMB-8 购自 Sigma 公司。TMB-8 用蒸馏水配制, Fura-2/AM 用 DMSO 溶解后, 置于 -20°C 避光保存。2, 5-di (tert-butyl)-1, 4-benzohydroquinone (BHQ) 由美国 Texas A&M 大学医学院药理学系 Dr George C. Y. Chiou 惠赠, DMEM 为 GIBCO 公司产品, 其他试剂均为分析纯。AR-CM-MIC 阳离子测定系统系美国 SPEX 公司产品。

乳牛基底动脉平滑肌细胞培养及负载 参照文献^[8]略加修改: 新生 1~2 d 健康小牛, 雌雄兼用, 由南京卫岗小牛血清厂提供, 颈动脉放血处死, 无菌条件下断头, 开颅, 取出全脑, 仔细分离出基底动脉条放入 Hank's 液中, 冲洗 2 次, 沿正中剪开动脉, 用棉拭子刮擦内膜, 并冲洗, 以去除内皮细胞, 将基底动脉条剪成 1 mm^3 左右小块, 内膜朝下贴于培养瓶中, 各块间隔约 1 mm, 加入 DMEM 培养液, 放入 CO_2 孵箱

培养,约 5 d,有平滑肌细胞从小块中跳出,在瓶壁上生长,待细胞长满后,小心去掉动脉块,再培养 2 d 后用 0.125% 胰蛋白酶消化,进行传代培养。实验用 3~4 代细胞。

负载时,培养瓶中加入终浓度为 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Fura-2/AM 负载液,于 37°C 温孵 40 min,再用 Hank's 或 D-Hank's 液冲洗 2 次,细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化,置于室温 Hank's 或 D-Hank's 液 (pH 7.2~7.4) 中备用,测定于负载后 2 h 内完成。

细胞内游离钙的测定 在 AR-CM-MIC 阳离子测定系统上,用 DM 3000 软件,激发光波长为 340 nm 和 380 nm,发射光波长为 505 nm,将负载好的细胞放于倒置显微镜下,每次取一个细胞,在避光条件下,连续记录单个细胞在给药前后的荧光变化, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的计算公式^[9]为:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = Kd \times (sb1/sb2) \times [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$$

式中 $R = F_{340} / F_{380}$

$$R_{\min} = F_{340\min} / F_{380\min}$$

$$R_{\max} = F_{340\max} / F_{380\max}$$

$$sb1/sb2 = F_{380\min} / F_{380\max}$$

37°C 时, $Kd = 224 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。F 代表荧光强度, R_{\max} 和 R_{\min} 通过顺次加入 ionomycin 和 EGTA 获得。输入相应参数,计算机自动算出 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 值。

统计方法 用“Student” *t* test 进行组间比

较, $P < 0.05$ 为显著性差异。

结 果

1 TMB-8 对细胞静息 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

在普通 Hank's 液 (钙 $1.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 钾 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中,静息状态下牛基底动脉平滑肌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $99.3 \pm 5.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当 TMB-8 10, 30, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别为 $97.5 \pm 5.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P > 0.05$), $95 \pm 4.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P > 0.05$) 及 $92.2 \pm 4.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P > 0.05$)。在外钙为零 + EGTA $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $81.7 \pm 5.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当在 10, 30 及 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TMB-8 作用后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分别降至 76.2 ± 10.8 ($P < 0.05$), 68.7 ± 9.4 ($P < 0.01$) 及 $61.5 \pm 6.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$)。

2 TMB-8 对 BHQ 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的影响

在普通 Hank's 液中, BHQ 为 10, 20 及 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显升高, 当加入 TMB-8 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预先作用 20 min 后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上升幅度明显减小, 如表 1 所示。

在外钙为零 + EGTA $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, BHQ 10, 20 及 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 仍可使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显升高, 当在 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TMB-8 作用后, 可明显抑制 BHQ 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高。TMB-8 浓度达到 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 则几乎完全阻断 BHQ 升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的作用, 如表 1 所示。

Tab 1 Effect of TMB-8 on BHQ induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in cultured single smooth muscle cell of calf basilar artery in Hank's solution

	TMB-8 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	BHQ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
		0	10	20	40
Normal	0	99 ± 5	137 ± 15 ^{**}	163 ± 17 ^{**}	199 ± 10 ^{**}
Ca-medium	30	98 ± 7	114 ± 12 [†]	131 ± 14 ^{††}	152 ± 15 ^{††}
Ca-free	0	82 ± 4	118 ± 7 ^{**}	151 ± 15 ^{**}	174 ± 10 ^{**}
Medium	10	77 ± 6	108 ± 10	127 ± 9 [†]	156 ± 9 ^{††}
	30	74 ± 11 [†]	80 ± 9 ^{††}	85 ± 11 ^{††}	86 ± 9 ^{††}

$\bar{x} \pm s$, $n = 6$, ^{**} $P < 0.01$ vs before BHQ. [†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$ vs TMB-8 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

3 TMB-8 对 NE 引起的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响

在普通 Hank's 液中, NE 浓度为 0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可明显升高 $[Ca^{2+}]_i$, 在 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TMB-8 预先作用 20 min 后, $[Ca^{2+}]_i$ 上升幅度明显减小。

在外钙为零 + EGTA 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, NE 为 0.1, 1.0 和 10.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 仍可明显升高 $[Ca^{2+}]_i$, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TMB-8 预先作用 20 min 后, 可几乎完全阻断 $[Ca^{2+}]_i$ 的上升, 如表 2 所示。

Tab 2 Effect of TMB-8 on NE induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in cultured single smooth muscle cell of calf basilar artery in Hank's solution

	TMB-8 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	NE($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
		0	0.1	1	10
Normal	0	108 ± 6	141 ± 16**	176 ± 24**	219 ± 19**
Ca-medium	30	102 ± 5	123 ± 11 [†]	151 ± 12 ^{††}	167 ± 9 ^{††}
Ca-free	0	83 ± 6	119 ± 16**	155 ± 23**	176 ± 10**
Medium	30	72 ± 9 [†]	78 ± 8 ^{††}	83 ± 9 ^{††}	84 ± 10 ^{††}

$\bar{x} \pm s$, $n = 6$, ** $P < 0.01$ vs before NE. [†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$ vs TMB-8 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

4 TMB-8 对高钾引起的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响

在普通 Hank's 液中, KCl 浓度在 25, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可明显升高 $[Ca^{2+}]_i$ 。用 TMB-8 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预先作用 20 min 后, 可明显抑制 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高(表 3)。

Tab 3 Effect of TMB-8 on KCl induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in cultured single smooth muscle cell of calf basilar artery in Hank's solution containing Ca^{2+} 1.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

TMB-8 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	KCl($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)		
	0	25	50
0	103 ± 6	155 ± 18**	192 ± 9**
30	97 ± 6	135 ± 6 [†]	165 ± 18 [†]

$\bar{x} \pm s$, $n = 6$, ** $P < 0.01$ vs before KCl. [†] $P < 0.05$, ^{††} $P < 0.01$ vs TMB-8 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

讨 论

TMB-8 除了能抑制骨骼肌和平滑肌的张力^[1]外, 还能有效地预防和治疗实验性脑缺血^[2], 对抗多种血管活性物质收缩脑血管的作用^[3]以及增加大鼠脑血流量和增强脑血流自

动调节功能^[4]。这些作用可能与 TMB-8 影响胞外 Ca^{2+} 内流和胞内 Ca^{2+} 的释放或促进肌浆网对 Ca^{2+} 的摄取有关。由于脑血管和外周血管对血管活性物质的反应不同^[6,7], 因此从主动平滑肌细胞所得出的结论^[5]不能直接解释 TMB-8 扩张脑血管, 增加 CBF 和抗脑缺血的机理。本实验通过对培养乳牛基底动脉单个平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的分析, 结果可直接说明 TMB-8 对脑血管作用的机制。

已知 BHQ 通过抑制肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶而促进 Ca^{2+} 释放, 使 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。BHQ 排空细胞内钙贮库而不影响细胞膜上钙泵^[10]。在细胞外液有或无钙的情况下, TMB-8 均能抑制 BHQ 升高细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用。在细胞外液无钙的情况下, TMB-8 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可几乎完全阻断 BHQ 增加 $[Ca^{2+}]_i$ 的作用, 说明 TMB-8 能对抗 BHQ 的促肌浆网 Ca^{2+} 排空作用, 减少肌浆网 Ca^{2+} 的释放, 降低 $[Ca^{2+}]_i$ 。这可解释在细胞膜钙通道阻断剂 Nifedipine 存在的情况下, BHQ 可使兔脑基底动脉张力显著提高, 而 TMB-8 可对抗 BHQ 的这种作用^[3]。

在无外钙的情况下, TMB-8 可降低静息 $[Ca^{2+}]_i$, 可能是因为 TMB-8 影响 Ca^{2+} 贮库的

代谢,促进肌浆网对 Ca^{2+} 的摄取,降低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 所致。

NE 系通过受体依赖性钙通道促进外钙内流并促进肌浆网 Ca^{2+} 释放,使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高^[11]。不论在细胞外液有或无钙的情况下,TMB-8 都能抑制 NE 的这种作用,在细胞外液无钙情况下,NE 升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的作用依赖于 Ca^{2+} 从肌浆网释放,TMB-8 可几乎完全抑制 NE 的这种作用。说明 TMB-8 可抑制培养乳牛基底动脉单个平滑肌细胞肌浆网内 Ca^{2+} 的释放,或促使肌浆网对 Ca^{2+} 的摄取。TMB-8 浓度依赖性地抑制 NE 引起的兔基底动脉收缩以及抑制无钙液中兔基底动脉的张力^[3],可能与 TMB-8 的这种作用有关。

KCl 通过开放电压依赖式钙通道,引起 Ca^{2+} 内流^[12], TMB-8 可抑制高钾引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,说明 TMB-8 除了对肌浆网 Ca^{2+} 贮库有作用外,对跨膜 Ca^{2+} 转运也有一定的影响。Putney 等认为^[13],如果肌浆网内钙一旦饱和,就能间接地抑制外钙内流。因此有可能 TMB-8 通过抑制肌浆网 Ca^{2+} 的释放,或增加肌浆网对 Ca^{2+} 的摄取,引起肌浆网内 Ca^{2+} 贮存的增加,继而抑制胞外 Ca^{2+} 的内流。这可能是 TMB-8 浓度依赖性地抑制 KCl 引起兔基底动脉环张力^[3]的机制之一。

从 NE 对牛基底动脉平滑肌细胞与主动脉平滑肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响比较,发现在正常外钙液中,NE $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可引起主动脉平滑肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,而在无钙液中,NE $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 仍不能引起主动脉平滑肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上升^[5]。而在牛基底动脉平滑肌细胞上不论是有钙或无钙液中,NE 均需达 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 才能明显升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,提示脑血管平滑肌对 NE 的敏感性远比外周血管平滑肌为低。

参 考 文 献

1 Chiou GCY, Malagodi MH. Studies on the mechanism of action of a new Ca^{2+} antagonist, 8-(N, N-diethylamino)-n-octyl-3, 4,

5-trimethoxybenzoate hydrochloride(TMB-8) in smooth and skeletal muscle. *Br J Pharmacol*, 1975, **53**:279

- 2 Chiou GCY, Hong SJ. Prevention and reduction of neural damage in ischemic strokes by ω -(N, N-diethylamino)-n-alkyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate compounds. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, **271**:474
- 3 Xiao JG, Liu SXL, Chen Z, et al. Vasodilation effects and action mechanisms of TMB-8 on basilar artery in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 1996, **1**:325
- 4 张孝清,张明英,肖继皋. TMB-8 对大鼠脑血流量和脑血流自动调节功能的影响. *中国药理学与毒理学杂志*, 待发表
- 5 Liu SXL, Chiou GCY, Chen Z. 8-(N, N-diethylamino)-n-octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate actions on calcium dynamics in cultured vascular smooth muscle cells. *中国药理学报*, 1997, **18**:21
- 6 McCalden TA, Bevan JA. Sources of activator calcium in rabbit basilar artery. *Am J Physiol*, 1981, **241**:H129
- 7 Van Breemen C, Siegal B. The mechanism of alpha-adrenergic activation of the dog coronary artery. *Circ Res*, 1980, **46**:426
- 8 Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*, 1979, **59**:1
- 9 Grynliewicz G, Poenie M, Tsien PY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, **260**:3440
- 10 Moore GA, McConkey DJ, Kass GEN, et al. 2, 5-Di(tert-butyl)-1, 4-benzohydroquinone, a novel inhibitor of liver microsomal calcium sequestration. *FEBS Lett*, 1987, **224**:331
- 11 Kanaide H, Shogakiuchi Y, Nakamura M.

- The norepinephrine sensitive Ca^{2+} -storage site differs from the caffeine-sensitive site in vascular muscle of the rat aorta. *FEBS Lett*, 1987, **214**:130
- 12 Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. *J Gen Physiol*, 1985, **86**:1
- 13 Putney JW. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium*, 1990, **11**:611

8-(*N, N*-DIETHYLAMINO)-*n*-OCTYL-3, 4, 5-TRIMETHOXYBENZOATE(TMB-8) REDUCED THE ELEVATION OF $[\text{Ca}^{2+}]_i$ INDUCED BY BHQ, NE AND KCl IN CULTURED SINGLE SMOOTH MUSCLE CELLS OF THE CALF BASILAR ARTERY

B Wang, XQ Zhang, JX Wang*, SJ Yang* and JG Xiao

(*Department of Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029*;

* *The State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093*)

ABSTRACT The effect of 8-(*N, N*-diethylamino)-*n*-octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate (TMB-8) on the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by 2, 5-di(tert-butyl)-1, 4-benzohydroquinone (BHQ), norepinephrine (NE), KCl in cultured single smooth muscle cells of the calf basilar artery was studied by a system of measurement of AR-CM-MIC, using Fura-2/AM as a fluorescent indicator. In the presence of extracellular Ca^{2+} $1.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was not changed by TMB-8 (10, 30 and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), but the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by BHQ, NE and KCl were reduced by TMB-8 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) significantly. In Ca^{2+} free Hank's solution containing EGTA $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was markedly reduced by TMB-8 (10, 30 and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ evoked by BHQ and NE was blocked completely by TMB-8 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). The result suggested that TMB-8 inhibited the Ca^{2+} release from intracellular stores or increased the up-take of Ca^{2+} into sarcoplasmic reticulum and the inhibition of Ca^{2+} -influx from extracellular site may be an indirect mechanism.

KEY WORDS 8-(*N, N*-diethylamino)-*n*-octyl-3, 4, 5-trimethoxybenzoate; $[\text{Ca}^{2+}]_i$; Calf basilar artery smooth muscle cells