

预适应和前胡丙素对缺氧肥厚血管平滑肌胞内钙离子浓度及 NO 含量的影响

饶曼人*, 刘宛斌, 张晓文

(南京医科大学心血管药理研究室, 江苏 南京 210029)

摘要: 观察了预适应和前胡丙素对缺氧肥厚血管平滑肌胞内钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)及 NO 含量的影响。

①建立两肾一夹肾血管性高血压大鼠模型, 分离培养主动脉血管平滑肌细胞(VSMC), 以 fura-2/AM 为钙指示剂。测得前胡丙素($20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 术后第 9 周起 ig 9 周)治疗和缺氧预适应(5 min N_2 , 5 min 95% O_2 + 5% CO_2 混合气体, 循环 3 次)对缺氧(30 min N_2)所致肥厚 VSMC 对 KCl 和去甲肾上腺素刺激反应性升高($[Ca^{2+}]_i$ 升高)有明显的拮抗效应。②用血管紧张素 II 刺激致 VSMC 肥厚, 前胡丙素($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 温育 24 h)和缺氧预适应合用使缺氧肥厚 VSMC 的 NO 含量恢复至正常 VSMC 水平。结果提示前胡丙素与缺氧预适应对肥厚 VSMC 缺氧损伤有协同性的保护作用。

关键词: 前胡丙素; 缺血预适应; 肌, 平滑, 血管; 细胞, 培养的; 钙, 细胞内; 一氧化氮

中图分类号: R972.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-300X(2001)02-0141-04

心肌缺血性损伤若预先经短暂的缺血或轻度缺氧的重复预适应可触发或动员机体内的防护能力, 从而对随后的严重缺氧或缺血损伤产生强大的防御和保护作用^[1]。近年来对正常血管平滑肌缺氧预适应研究较多, 但临床高血压病患者由于长期的血压增高, 左心室和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)发生增殖或(和)肥厚, 因此在肥厚的血管平滑肌上研究缺氧预适应保护非常必要。

前胡丙素(praeuptorine C)是从中药白花前胡中提取的一种有效单体, 本室近年研究证实它具有钙拮抗剂作用, 防止缺血及肥厚心肌细胞内钙水平升高, 逆转肾血管性高血压(renovascular hypertension, RH)大鼠左心室肥厚, 降低高血压大鼠尾动脉对 KCl 和去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)所致收缩的反应性^[2~6]。本文以正常及 RH 大鼠主动脉平滑肌细胞内游离钙离子浓度($[Ca^{2+}]_i$)和 NO 含量为指标, 研究缺氧预适应及前胡丙素对肥厚 VSMC 缺氧损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药品与动物

前胡丙素, 纯度为 98%, 由南京中医药研究院植化室提供, 以纯聚乙二醇 400 配成 2% 浓度。血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II), NE 和 fura-2/AM 均购自美国 Sigma 公司。KCl 为分析纯。健康 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 190~230 g, 雌雄各半, 由江苏省实验动物中心提供。

1.2 肾血管性高血压大鼠模型的形成及血管平滑肌细胞的分离培养

采用两肾一夹 RH 模型。大鼠在清醒及保温状态下, 采用尾容积法, 以 MRB-III A 型大鼠血压心率记录仪(上海高血压研究所)测定 3 次动脉血压, 取平均值作为手术前正常血压。大鼠在 3% 戊巴比妥钠($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ip)麻醉下开腹, 游离左侧肾动脉, 夹以直径 0.2 mm 的银夹, 使其产生部分狭窄。假手术组大鼠除不狭窄左肾动脉外, 余同。术后 4 周, 收缩压在 20 kPa 以上视为已形成高血压, 用于实验。据报道^[7], RH 大鼠术后第 8 周即可形成明显的左心室肥厚。本文采用倒置显微镜下直接观察确定主动脉亦形成肥厚。大鼠分为 3 组, 前胡丙素治疗组于术后第 9 周开始口服前胡丙素 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 共 9 周, 假手术组与 RH 模型对照组给予同等容量溶剂。

收稿日期 2001-01-15 接受日期 2001-03-09

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39570819)

作者简介 饶曼人(1930-), 女, 福建建阳人, 教授, 心血管药理研究室主任, 主要从事心血管药理研究。

* 联系作者。Tel: (025) 6663597,

E-mail: Raomanren@263.net

给药结束, 无菌条件下取出大鼠主动脉从弓至髂总动脉段, 按文献 [8] 方法分离培养。用药勺轻轻刮去内皮, 切割成 2 mm × 2 mm 组织块, 以内膜面贴入灭菌的 25 mL 培养瓶中, 在 37°C 5% CO₂ 孵箱中培养 2 h 后加入含青霉素 (100 kU · L⁻¹), 链霉素 (100 mg · L⁻¹) 和 10% 胎牛血清的 M199 培养基, 3 d 后换液 1 次, 4 ~ 6 d 后可见动脉片周围细胞形成单层生长, 呈明显的极向排列, “峰和谷”各半, 将融合的细胞用 0.125% 的胰蛋白酶进行消化, 在倒置显微镜下见到细胞间连接疏松将要脱落时, 加入含 10% 小牛血清的 M199 培养基终止消化, 调整细胞密度为 3 × 10⁸ L⁻¹, 继续分瓶培养传代, 实验用 3 ~ 5 代细胞, 用电子显微镜确认为 VSMC。

1.3 单细胞 [Ca²⁺] 测定

用第 3 ~ 5 代 VSMC, 参照文献 [9] 将同步化后的 VSMC 用 0.125% 胰蛋白酶消化, 接种于培养瓶内, 并用含 0.5% 小牛血清的培养基培养 48 h, 将培养的细胞移至培养皿内, 调细胞密度为 5 × 10⁸ L⁻¹。缺氧预适应组先用 N₂ 气排除培养皿中氧气, 缺氧孵育 5 min, 然后换以 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体 5 min, 如此循环 3 次, 最后持续纯 N₂ 30 min。不预适应组直接持续纯 N₂ 30 min。以终浓度为 3 μmol · L⁻¹ 的 Fura-2/AM 37°C 水浴中孵育 30 min, 用 Hanks 液冲洗 5 次, 加入 KCl 60 mmol · L⁻¹ 或 NE 10 μmol · L⁻¹ 后即于 AR-CM-MIC 阳离子测定系统 (SPEX, 美国) 中测定 [Ca²⁺] [10]。激发波长分别为 340 和 380 nm, 采用间隔为 300 ms。每次选取 1 个细胞记录给药前后的荧光强度。计算机 DM3000 软件分析并计算单细胞内 [Ca²⁺]。在没有负载时测定细胞自身荧光, 计算 [Ca²⁺] 前减去细胞自身荧光。

1.4 血管紧张素 II 致血管平滑肌细胞肥厚及细胞内 NO 含量的测定

正常大鼠主动脉, 按照 1.2 中方法分离培养 VSMC, 实验用 3 ~ 5 代细胞。用含 0.5% 胎牛血清 M199 培养基继续培养 48 h, 使 VSMC 同步于 G₀/G₁ 期。于 24 孔培养板中将细胞调成每孔 3 × 10⁴, 分为正常组: 加等量溶剂; Ang II 组: 加 Ang II 10 nmol · L⁻¹ 培养 4 d 后进行细胞计数和体积测量。将细胞注入自制的细胞池中, 池底载玻片中部打一圆孔, 底部用乳胶粘一盖玻片, 在倒置显微镜闭路电视系统下用 MICC 软件测定细胞的长和宽, 每次测定 10 个视野内的全部细胞。细胞体积 = 长 × 宽。确认细胞肥厚后, 给药组在培养基中加入 10 μmol · L⁻¹ 前胡丙

素, 在含 0.5% 小牛血清的 M199 培养基中继续培养 24 h, 然后缺氧预适应组先用 N₂ 气排除 24 孔板中氧气, 缺氧孵育 5 min, 然后换以 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体 5 min, 如此循环 3 次, 最后持续纯 N₂ 30 min。不预适应组直接持续纯 N₂ 30 min。参照微盘测定法及蛋白校正法 [11] 进行亚硝酸测定。取 500 μL 培养液加入等量 Griess 试剂, 25°C 放置 20 min, 于紫外分光光度计 550 nm 处测其吸光度值。根据亚硝酸浓度和蛋白质含量的标准曲线, 计算培养液中 NO 含量。

1.5 统计学处理

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以方差分析和 *q'* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 缺氧预适应和前胡丙素对肥厚血管平滑肌细胞 [Ca²⁺] 的影响

经缺氧预适应或不经缺氧预适应处理的各组大鼠 VSMC, 缺氧 30 min 后给予 KCl 60 mmol · L⁻¹ 或 NE 10 μmol · L⁻¹。表 1 结果可见, 缺氧使正常 VSMC 对 KCl 和 NE 的反应明显增强 [Ca²⁺] 明显增高, 经缺氧预适应可明显缓解缺氧所致的反应增高。RH 时 VSMC 对缺氧的反应较正常 VSMC 更明显增强。

Tab 1. Effect of praeruptorine C (Pra-C) and hypoxic preconditioning (PC) on high activities of [Ca²⁺] induced by hypoxia (H) in aortic smooth muscle cells of rats with renovascular hypertension (RH)

Group	[Ca ²⁺] / nmol · L ⁻¹	
	KCl	NE
Normal	144 ± 8	178 ± 16
H	266 ± 16* *	258 ± 11* *
PC + H	197 ± 12* * # #	210 ± 12* * # #
RH + H	526 ± 17* *	514 ± 24* *
RH + PC + H	431 ± 20* * # #	436 ± 26* * # #
RH + Pra-C + H	252 ± 8* * # #	239 ± 20* * # #
RH + Pra-C + PC + H	191 ± 14* * # # △△	204 ± 18* * # # △△

RH was induced by 2K1C for 17 weeks. Pra-C 20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ was given ig for 9 weeks from week 9 after 2K1C operation. H: 30 min pure N₂; PC + H: 3 cycles of 5 min pure N₂ and 5 min 95% O₂ + 5% CO₂, followed by 30 min pure N₂. KCl 60 mmol · L⁻¹ or norepinephrine (NE) 10 μmol · L⁻¹ was given *in vitro* 5 min after pure N₂ for 30 min. $\bar{x} \pm s$, n = 8 (cell). * * P < 0.01, compared with normal; # # P < 0.01, compared with H or RH + H; △△ P < 0.01, compared with RH + PC + H or RH + Pra-C + H.

Tab 2. Angiotensin II (Ang II)-induced vascular smooth muscle cells hypertrophy

Ang II / nmol · L ⁻¹	10 ⁻⁴ × number per hole	Length / μm	Width / μm	Volume / μm ³
0	5.10 ± 0.32	14.5 ± 2.4	2.46 ± 0.28	35.67 ± 2.68
10	5.24 ± 0.25	20.1 ± 1.1 ^{**}	3.33 ± 0.25 ^{**}	66.93 ± 0.28 ^{**}

Cells 3 × 10⁴ per hole were cultured with Ang II for 4 d. $\bar{x} \pm s$, $n = 12$. ^{**} $P < 0.01$, compared with 0 nmol · L⁻¹.

[Ca²⁺]进一步增高 ($P < 0.01$)。给予缺氧预适应可以部分消除RH时缺氧所致的高反应。给予9周前胡丙素治疗使RH时的缺氧反应明显降低,而在前胡丙素治疗的基础上再给予缺氧预适应则效果更明显。

2.2 缺氧预适应和前胡丙素对 Ang II 所致肥厚血管平滑肌细胞产生 NO 能力的影响

VSMC 经 Ang II 10 nmol · L⁻¹刺激 4 d 后,与正常组比,细胞数目没有明显增多,而细胞体积明显增大,即主要表现为肥厚,表示肥厚模型建立成功(表 2)。

由表 3 可见,缺氧使正常 VSMC 产生 NO 减少,缺氧预适应可完全拮抗缺氧所致的 NO 减少。Ang II 致 VSMC 肥厚后 NO 的产生进一步减少,缺氧预适应或前胡丙素 10 μmol · L⁻¹可明显增加 NO 的产生,而二者合用可使 NO 含量达到正常 VSMC 水平。说明前胡丙素与缺氧预适应对肥厚 VSMC 产生 NO 的能力具有协同性地保护作用。

Tab 3. Effects of praeruptorine C and preconditioning on NO content in hypertrophied vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II

Group	NO / μmol · g ⁻¹ protein
Normal	6.02 ± 0.50
H	5.17 ± 0.40 ^{**}
PC + H	6.07 ± 0.24 ^{##}
Ang II + H	2.70 ± 0.37 ^{***}
Ang II + PC + H	4.20 ± 0.28 ^{***}
Ang II + Pra-C + H	5.70 ± 0.37 [#]
Ang II + Pra-C + PC + H	6.25 ± 0.46 [△]

Vascular smooth muscle cells were cultured with Ang II for 4 d, then Pra-C 10 μmol · L⁻¹ was added, 24 h later 3 cycles of 5 min pure N₂ and 5 min 95% O₂ + 5% CO₂ (PC), followed by 30 min pure N₂ (H). $\bar{x} \pm s$, $n = 8$ (hole). ^{**} $P < 0.01$, compared with normal group; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, compared with H group; [△] $P < 0.05$, compared with Ang II + PC + H or Ang II + Pra-C + H group.

3 讨论

本文结果可见,缺氧使正常 VSMC 对 KCl 和 NE

的反应性增强 [Ca²⁺]升高,NO 生成减少。肥厚 VSMC 对 KCl 和 NE 的反应性较正常 VSMC 更增强 1 倍,NO 含量又降低 50%。NO 是血管内皮细胞合成和释放的血管舒张因子,具有抑制细胞增殖和血管重构,调节血管平滑肌张力,抗氧化,抗自由基,保护血管内皮等作用。钙作为细胞内信息传递的重要物质,其代谢异常是多种心肌和血管平滑肌细胞异常的共同表现,与血管平滑肌肥厚的发生发展及缺血缺氧损伤也有密切关系。

缺血预适应可以产生很强的内源性缺血保护作用,其机理与 NO 等多种内源性活性物质的释放,蛋白激酶的激活及 ATP 敏感性钾通道开放等多种机制有关^[12]。NO 含量增加是缺氧预适应介导的内源性保护的重要方面之一^[13]。本实验中给予缺氧预适应可明显拮抗正常 VSMC 的缺氧反应 [Ca²⁺]明显降低,NO 含量恢复至正常组水平。但在肥厚 VSMC 单给缺氧预适应只有部分拮抗作用。前胡丙素是从中药白花前胡中提取的有效单体,具有钙拮抗作用,可以通过抑制 Ca²⁺ 内流而降低 [Ca²⁺];长期用药可降低高血压大鼠尾动脉对 KCl 和 NE 所致收缩的反应性^{2~6]}。本实验单给前胡丙素即对肥厚 VSMC 有明显的拮抗缺氧的效果,可能是通过保护细胞钙稳态及提高细胞产生 NO 的能力对缺氧肥厚 VSMC 发挥保护作用。与缺氧预适应合用,可更完全地拮抗缺氧引起的 [Ca²⁺]升高和 NO 生成减少。本实验结果提示,长期使用前胡丙素可能对肥厚心肌的缺血损伤产生经常性的保护作用,并协同性地增强缺血预适应对肥厚心肌缺血损伤的保护作用。

4 参考文献:

[1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, **74**(5):1124-1136.
 [2] 孙 兰,饶曼人,刘培庆. 前胡丙素对肾性高血压左室肥厚大鼠心功能,左室顺应性及心肌胶原含量的影响 [J]. *药学报*, 1997, **32**(8):578-582.
 [3] 王洪新,饶曼人,王金晞,杨思军. 前胡丙素对培养

心肌细胞⁴⁵Ca²⁺ 摄入及细胞内游离钙的影响 J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(3):184-188.

[4] Rao MR, Shen XH, Zou X. Effects of praeuroptorin C and E isolated from Qian-Hu on swine and guinea-pig coronary arteries[J]. *Eur J Pharmacol*, 1988, 155:293-296.

[5] 孙 兰, 饶曼人, 王金唏. 前胡丙素对分离的成年鼠正常及肥厚心室肌细胞内游离钙的影响 J]. 中国药理学报, 1997, 18(3):251-254.

[6] 吴冬梅, 李庆平, 饶曼人. 前胡丙素对肾型高血压大鼠血压及尾动脉反应性的影响 J]. 中国药理学通报, 1997, 18(3):242-243.

[7] 丁小凌, 李云霞. 大鼠肾血管性高血压心肌肥厚的产生和逆转[J]. 湖南医科大学学报, 1989, 14(3):209-212.

[8] Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture[J]. *Physiol Rev*, 1979, 59(1):1-61.

[9] Williford DJ, Sharma VK, Korth M, Sheu SS. Spatial het-

erogeneity of intracellular Ca²⁺ concentration in nonbeating guinea pig ventricular myocytes[J]. *Circ Res*, 1990, 66(1):241-248.

[10] Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties[J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(6):3440-3450.

[11] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and ¹⁵N-nitrate in biological fluids[J]. *Anal Biochem*, 1982, 126(1):131-138.

[12] 宋秋景, 李元建. 缺血预适应的研究现状和前景 J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2000, 14(1):1-7.

[13] Massoudy P, Becker BF, Gerlach E. Nitric oxide accounts for postischemic cardioprotection resulting from angiotensin-converting enzyme inhibition: indirect evidence for a radical scavenger effect in isolated guinea pig heart[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, 25(3):440-447.

Effects of preconditioning and praeuroptorine C on intracellular free calcium level and NO content in hypertrophied vascular smooth muscle cells with hypoxia

RAO Man-Ren, LIU Wan-Bing, ZHANG Xiao-Wen

(Department of Cardiovascular Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: Effects of preconditioning (PC) and praeuroptorine C (Pra-C) on intracellular free calcium level ($[Ca^{2+}]_i$) and NO content in hypertrophied vascular smooth muscle cells (VSMC) with hypoxia were studied. ① The aorta VSMC of rats with renovascular hypertension induced by two-kidney-one-clip (2K1C) were isolated and cultured. Fura-2/AM was as a calcium fluorescent indicator. It was seen that Pra-C (20 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, i.g, for 9 weeks from week 9 after 2K1C) and PC (3 cycles of 5 min pure N₂ and 5 min 95% O₂ + 5% CO₂) antagonized the elevated activities (higher $[Ca^{2+}]_i$) induced by KCl and norepinephrine in VSMC with hypoxia (30 min pure

N₂). ② In hypertrophied VSMC stimulated by angiotensin II, combination of Pra-C (10 μmol · L⁻¹ for 24 h) and PC enhanced NO content to the normal level in hypertrophied VSMC with hypoxia. The results suggest that combination of Pra-C and PC have cooperative protection for hypertrophied VSMC with hypoxia injury.

Key words: praeuroptorine C; preconditioning; muscle, smooth, vascular; cells, cultured; calcium, cytosolic; nitric oxide

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (39570819)

(本文编辑 董立春)