

## Cl<sup>-</sup>通道及 Ca<sup>2+</sup>通道阻断剂对 ATP 触发的牛脑血管平滑肌细胞 Ca<sup>2+</sup>内流作用的影响

宜全<sup>2\*</sup>, 关永源<sup>1</sup>, 贺华<sup>1</sup>

(1. 中山医科大学药理学教研室, 广东广州 510089; 2. 广州医学院药理学教研室, 广东广州 510182)

**摘要:**采用 Fura-2 荧光测定胞浆游离 Ca<sup>2+</sup> 浓度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 变化技术, 在培养的牛脑中动脉平滑肌细胞上, 观察电压依赖 Ca<sup>2+</sup> 通道 (VDCC) 抑制剂尼莫地平, 非电压依赖 Ca<sup>2+</sup> 通道 (NVDCC) SK&F96365 以及 Cl<sup>-</sup> 通道抑制剂呋塞米, 印防己毒素对 ATP 引起的 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 反应的影响. 实验表明 ATP 可使 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 呈现双相升高反应, 即快速峰相及随后持续稳定的平台相. 尼莫地平, SK&F96365 及印防己毒素对 ATP 触发的 Ca<sup>2+</sup> 内流无明显影响, 而呋塞米能呈浓度依赖性地抑制 ATP 触发的 Ca<sup>2+</sup> 内流. 提示 ATP 触发的牛脑中动脉平滑肌细胞 Ca<sup>2+</sup> 内流是经 SK&F96365 不敏感的 NVDCC, 与呋塞米敏感的 Cl<sup>-</sup> 通道开放有关.

**关键词:**细胞, 培养的; 肌, 平滑, 血管; 脑动脉; 钙, 细胞内; 氯通道; 腺苷三磷酸; 尼莫地平; 呋塞米

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2001)05-0347-06

脑血管收缩, 痉挛是脑血管疾病的重要病理变化之一. 脑血管平滑肌细胞在血管活性物质, 如 ATP, 5-HT, 神经肽, 血红蛋白及其代谢物等刺激下, 导致胞浆 Ca<sup>2+</sup> 浓度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 升高, 继而使脑血

管平滑肌收缩<sup>[1]</sup>. 而持续性 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高, 主要与胞膜通道开放引起的 Ca<sup>2+</sup> 内流相关. 同外周血管平滑肌一样, 脑血管平滑肌细胞 (SMCs) 存在电压依赖性 Ca<sup>2+</sup> 通道 (voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, VDCC) 和非电压依赖性 Ca<sup>2+</sup> 通道 (non-voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, NVDCC), 目前通常把 NVDCC 简单认为是受体操纵性 Ca<sup>2+</sup> 通道 (receptor-operated Ca<sup>2+</sup> channels, ROCC). 但与外周血管平滑肌细胞相比, 在脑血管平滑肌细胞上的 Ca<sup>2+</sup> 内流, ROCC 比 VDCC 更为重要<sup>[2]</sup>. 在外周血管平滑肌细胞, Cl<sup>-</sup> 通道的开放可促进 Ca<sup>2+</sup> 内流<sup>[3]</sup>. 脑血管平滑细胞的 Ca<sup>2+</sup> 内流似乎亦为 Cl<sup>-</sup> 通道参与, 因为一些 Cl<sup>-</sup> 通道阻断剂如 APPB, 9-AC 及氟芬那酸 (氟灭酸, flufenamic acid), 可减弱大鼠脑血管平滑肌细胞的 Ca<sup>2+</sup> 电流及抑制压力引起的收缩反应<sup>[4,5]</sup>. 但目前对脑血管平滑肌细胞 Ca<sup>2+</sup> 内流和相关 Ca<sup>2+</sup> 通道特性, 及其与 Cl<sup>-</sup> 通道之间的关系, 尚未完全了解. 本研究采用 Fura-2 荧光测定 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 技术在培养的牛脑中动脉平滑肌细胞上, 观察不同 Ca<sup>2+</sup> 通道阻断剂及 Cl<sup>-</sup> 通道阻断剂对 ATP 触发 Ca<sup>2+</sup> 内流的影响, 从而探索 Ca<sup>2+</sup> 内流, Ca<sup>2+</sup> 通道及 Cl<sup>-</sup> 通道之间关系.

### 1 材料与方法

#### 1.1 标本

乳牛脑由广州市奶牛研究所提供 (纯种荷斯坦牛).

#### 1.2 试剂

Fura-2/AM, 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购于 Boehringer Mannheim 公司; DMEM/F<sub>12</sub> 购于 Gibco BRL 公司; 尼莫地平 (nimodipine) 购于 Bayer 公司; SK&F 96365 购于 Biomol Research Labs 公司; 呋塞米 (furosemide), 印防己毒素 (picrotoxin) 购于 RBI 公司; ATP, 胰蛋白酶 (trypsin), HEPES, Tri-

收稿日期: 2000-09-30 接受日期: 2001-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970849); 广东省自然科学基金资助项目 (省字: 98-302); 美国纽约人寿国际公司资助项目

作者简介: 宜全 (1965-), 女, 山西省临汾县人, 讲师, 医学硕士. 主要研究方向: 心血管药理; 关永源 (1946-), 男, 广东省新会人, 教授, 主要研究方向: 血管平滑肌细胞信号转导及药物作用.

\* 联系作者. Tel: (020)81340203, Fax: (020)81340137

E-mail: yiquanquan@163.net

ton X-100, 乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸[ethylene glycol-( $\beta$ -aminoethylether)-*N, N, N, N*-tetracetic acid, EGTA], 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)购于Sigma公司; 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)购于杭州四季青生物研究所. 其余试剂均为国产分析纯.

### 1.3 仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Napco6100 型); 倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂); RF-5000 荧光分光光度计(日本 Shimadzu 公司); CG-817PH 计(Schott Gerate 公司).

### 1.4 牛脑血管平滑肌分离与细胞培养

新生 1~2 d 健康小牛, 处死后, 无菌条件下取出全脑, 仔细分离出大脑中动脉条, 放入含有抗菌素(青霉素 100 kU·L<sup>-1</sup>, 链霉素 100 mg·L<sup>-1</sup>), 1% BSA 的 DMEM/F<sub>12</sub> 营养液中, 在倒置显微镜下剪去分枝, 小心去除血管周围结缔组织及外膜, 然后纵向剪开管腔, 去除血块和内皮, 再把血管剪成 1 mm<sup>3</sup> 左右大小, 植入 15 mL 培养瓶中, 各块间隔约 1 mm<sup>2</sup>, 均匀分散平铺瓶底, 放入 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中, 待组织块贴壁后, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM/F<sub>12</sub> 培养液, 覆盖组织块静置培养. 10 d 左右见有细胞从组织块边缘跳出, 去除组织块, 换液, 待 20 d 左右细胞融合成片, 长满瓶底, 进行传代. 传代时倒去营养液, PBS 洗涤 1 次, 用消化液(0.05% 胰蛋白酶 + 0.53 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA)在 37℃ 消化贴壁细胞, 镜下见细胞收缩变圆, 立即倒去消化液, 加含 10% 胎牛血清的 DMEM/F<sub>12</sub> 营养液终止反应, 轻轻吹打使之形成细胞悬液, 以 (3~5) × 10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup> 细胞密度分装入新的培养瓶进行传代培养. 2~3 d 换液 1 次, 7 d 左右细胞长满瓶底, 再依同法做传代培养. 所有实验均采用第 2~4 代血管平滑肌细胞.

### 1.5 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 测定

#### 1.5.1 培养细胞悬液制备及 Fura-2/AM 负载

取培养的 2~4 代融合率 70%~80% 的单层血管平滑肌细胞, 用 HBSS 缓冲液 (mmol·L<sup>-1</sup>: KCl 5.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, NaCl 138.0, NaHCO<sub>3</sub> 4.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3, 葡萄糖 5.6, pH 7.4) 清洗 2 遍, 加入含 0.05% 胰蛋白酶和 0.53 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA 的 HBSS 缓冲液消化贴壁细胞后, 用含血清的营养液终止反应制成细胞悬液, 离心 (350 × *g*, 2 min), 收集细胞, 台盼蓝染色实验证实活细胞在 90% 以上, 取出 1 份重悬于 HBSS 缓冲液中 (细胞密度 10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>), 作为细胞自身

荧光测定, 其余用 Fura-2/AM (终浓度为 2 μmol·L<sup>-1</sup>) 的负载液 (0.05% BSA + DMEM/F<sub>12</sub>) 重悬细胞, 然后放入 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中负载 45 min, 每隔 15 min 轻轻晃动 1 次.

#### 1.5.2 Fura-2/AM 荧光测定 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>

按本实验建立的方法进行<sup>[6]</sup>, 简述如下: 负载完毕后, 离心 (350 × *g*, 2 min), 收集细胞, 将细胞沉淀以含 0.1% BSA 的 BSS 测定液 (mmol·L<sup>-1</sup>: NaCl 130.0, KCl 5.0, HEPES 20.0, 葡萄糖 10.0, MgCl<sub>2</sub> 1.0, CaCl<sub>2</sub> 1.5, pH 7.4) 重悬细胞, 离心洗涤 2 遍, 再按 10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup> 细胞密度重悬于 BSS 测定液中, 室温下放置 10 min, 37℃ 温育 2 min, 然后每份 1.5 mL 悬液置于石英测量杯中, 用 RF-5000 荧光光度计, 在 37℃ 恒温, 磁力搅拌下, 进行荧光测定.

实验采用 RF-5000 荧光分光光度计激发波长为 340 nm 和 380 nm, 发射波长为 510 nm, 激发光栅为 5 nm, 发射光栅为 10 nm, 采样间隔为 1 s. 荧光分光光度计自动把荧光强度按公式转换成 Ca<sup>2+</sup> 浓度并打印出来. 细胞的自身荧光在没有负载时测定, 计算 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 时应减去细胞自身的荧光. 所有试剂需鉴定有无荧光干扰.

### 1.6 统计学处理

所有数据均表达为均数 ± 标准差. 用药前后的 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 差异进行配对 *t* 检验 (Sigma plot 软件), 药物对 ATP 触发 Ca<sup>2+</sup> 内流的抑制率按下列公式计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{加阻断剂之前平台相}[\text{Ca}^{2+}]_i - \text{加阻断剂之后平台相}[\text{Ca}^{2+}]_i) / (\text{阻断剂之前平台相}[\text{Ca}^{2+}]_i - \text{静息}[\text{Ca}^{2+}]_i) \times 100\%}$$

## 2 结果

### 2.1 脑血管平滑肌细胞鉴定情况

倒置相差显微镜下观察乳牛大脑中动脉平滑肌细胞呈梭形, 平行生长, 束状排列, 经电镜鉴定第 2~4 代细胞胞体细长, 均富含肌丝, 肌束间还可见许多密体, 是“收缩表型”平滑肌细胞的典型表现. 故本实验均取第 2~4 代平滑肌细胞做为实验对象.

### 2.2 Fura-2 荧光法测定 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 瞬即变化结果

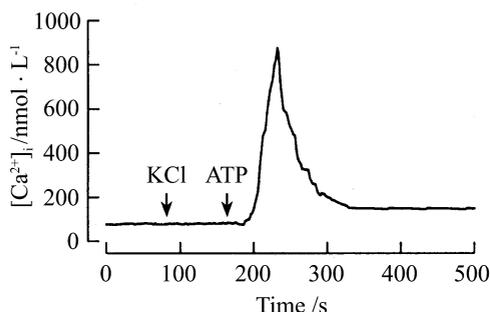
#### 2.2.1 ATP 触发的牛大脑中动脉平滑肌细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 变化

在 BSS 测定液中, 静息 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 为 (108 ± 23) nmol·L<sup>-1</sup>, 加入 10 μmol·L<sup>-1</sup> ATP 后, 可引起 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高的双相反应, 先是快速短暂升高相, 峰值为

(926 ± 37) nmol · L<sup>-1</sup>, 随后 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 急速下降并维持一平台相, 可长达 10 min, 峰值为 (190 ± 37) nmol · L<sup>-1</sup>. 二者与静息 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 相比均有明显的升高 (P < 0.01, n = 45; n 为实验数, 下同).

### 2.2.2 KCl 对静息 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响

在 BSS 测定液中, 加入 KCl 30 ~ 120 mmol · L<sup>-1</sup>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 在 (82 ± 10) ~ (83 ± 10) nmol · L<sup>-1</sup> 之间, 与静息 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (79 ± 7) nmol · L<sup>-1</sup> 相比没有明显的升高. 而 70 s 后加入 10 μmol · L<sup>-1</sup> ATP 可引起一个明显 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 双相升高的反应 (图 1). 提示培养的乳牛脑 SMCs 上 L 型 VDCC 的密度和活性很低或无功能.



**Fig 1. Effects of KCl and ATP on resting [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in cultured calf middle cerebral artery smooth muscle cells (SMCs).** An original record showing: during the resting state at the time indicated, addition of 120 mmol · L<sup>-1</sup> KCl failed to increase resting [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and subsequent addition of 10 μmol · L<sup>-1</sup> ATP after 70s induced a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> biphasic elevation response, a transient peak phase and followed by a sustained plateau phase.

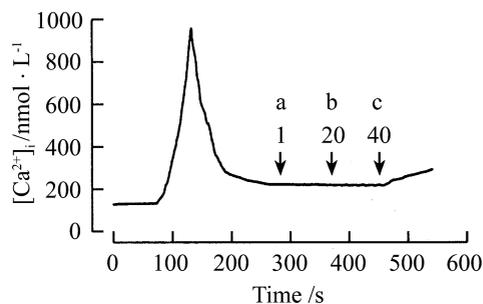
### 2.2.3 ATP 触发的 Ca<sup>2+</sup> 内流特点

BSS 测定液中, 在 ATP 触发的平台相上, 加入特异性 VDCC 阻断剂尼莫地平 1 和 10 μmol · L<sup>-1</sup>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 分别为 (172 ± 18) 和 (173 ± 18) nmol · L<sup>-1</sup>, 与未加尼莫地平前 (172 ± 19) nmol · L<sup>-1</sup> 比较没有明显改变. 加入低浓度 NVDCC 阻断剂 SK&F96365, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 与未加 SK&F96365 前比较也没有明显改变 (表 1, P > 0.05), 但 40 μmol · L<sup>-1</sup> SK&F96365 使平台相 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高 (图 2). 提示 ATP 触发的 Ca<sup>2+</sup> 内流与 VDCC 和 SK&F96365 敏感的 NVDCC 成分相关性不大, 高浓度的 SK&F96365 可能会引起 Ca<sup>2+</sup> 释放.

**Tab 1. Effect of SK&F96365 on plateau [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induced by 10 μmol · L<sup>-1</sup> ATP**

SK&F96365/μmol · L <sup>-1</sup>	Plateau [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> /nmol · L <sup>-1</sup>
0	168 ± 12
5 <sup>△</sup>	168 ± 13
10	168 ± 12
20	168 ± 13
30	172 ± 14
40	196 ± 20 <sup>**</sup>

The resting [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is (95 ± 10.2) nmol · L<sup>-1</sup>.  $\bar{x} \pm s$ , n = 6 (<sup>△</sup>n = 3). <sup>\*\*</sup> P < 0.01, compared with pre-SK&F96365 level by paired t test.



**Fig 2. Effects of nimodipine and SK&F96365 on plateau [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induced by 10 μmol · L<sup>-1</sup> ATP in cultured calf middle cerebral artery SMCs.** An original record showing: during the plateau phase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation induced by 10 μmol · L<sup>-1</sup> ATP at the time indicated, addition of 1 μmol · L<sup>-1</sup> nimodipine (a) and subsequent 20 μmol · L<sup>-1</sup> SK&F96365 (b) after 70 s failed to reduce the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> plateau level, whereas addition of 40 μmol · L<sup>-1</sup> SK&F96365 (cumulative concentration) (c) elevated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> plateau level.

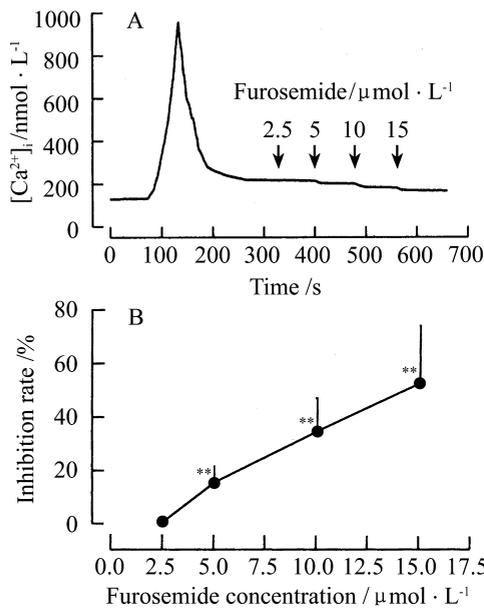
### 2.2.4 咪塞米和印防己毒素对 ATP 触发的 Ca<sup>2+</sup> 内流的影响

BSS 测定液中, 在 ATP 触发的平台相加入咪塞米, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 与未加咪塞米前比较明显降低, 并呈浓度依赖性 (表 2, 图 3). 由于咪塞米浓度达 20 μmol · L<sup>-1</sup> 以上时开始对荧光产生干扰, 故未能观察更高浓度的作用. 但加入印防己毒素, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 与未加印防己毒素前比较没有明显改变 (表 3, P > 0.05). ATP 触发的 Ca<sup>2+</sup> 内流可被咪塞米部分阻断, 提示咪塞米敏感的 Cl<sup>-</sup> 通道的开放与 ATP 触发的 Ca<sup>2+</sup> 内流有关, 与印防己毒素敏感的 Cl<sup>-</sup> 通道的无关.

**Tab 2. Effect of furosemide on plateau  $[Ca^{2+}]_i$  induced by  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP**

Furosemide/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Plateau $[Ca^{2+}]_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	Inhibition/%
0	224 ± 23	0
2.5	223 ± 22	0
5	210 ± 20**	16 ± 6
10	194 ± 18**	36 ± 12
15	179 ± 21**	54 ± 21

The resting  $[Ca^{2+}]_i$  is  $(141 \pm 22)\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ .  
\*\*  $P < 0.01$ , compared with pre-furosemide level by paired  $t$  test.



**Fig 3. Effect of furosemide on plateau  $[Ca^{2+}]_i$  induced by  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP in cultured calf middle cerebral artery SMCs.** A: An original record showing: during the plateau phase of  $[Ca^{2+}]_i$  elevation induced by  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP at the time indicated, addition of 2.5, 5, 10, 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  furosemide (cumulative concentration) produced a concentration-dependent reduction of plateau level. B: concentration response curve of furosemide to inhibit plateau  $[Ca^{2+}]_i$  induced by  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP.

**Tab 3. Effect of picrotoxin on plateau  $[Ca^{2+}]_i$  induced by  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP**

Picrotoxin/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Plateau $[Ca^{2+}]_i/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$
0	197 ± 17
10	197 ± 19
20	197 ± 20
40	196 ± 18
80	196 ± 22
160	195 ± 24

The resting  $[Ca^{2+}]_i$  is  $(101 \pm 18)\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ .  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ .

### 3 讨论

ATP 是细胞内能量物质, 而胞外 ATP 通过激活细胞膜表面  $P_2$  嘌呤受体或 ATP 激活的离子通道, 导致胞内  $Ca^{2+}$  浓度的改变, 产生广泛的生理效应. 在脑血管平滑肌细胞上存在  $P_2$  嘌呤受体<sup>[7]</sup>. 在病理状态下如蛛网膜下腔出血, 可产生过量 ATP, 通过激活  $P_2$  嘌呤受体, 导致的脑血管痉挛<sup>[1]</sup>. 本实验用 Fura-2 荧光测定技术, 观察到 ATP 可引起牛大脑中动脉平滑肌细胞  $[Ca^{2+}]_i$  双相升高的反应: 快速峰相 (由胞内  $Ca^{2+}$  释放引起) 及持续稳定的平台相 (由胞外  $Ca^{2+}$  内流引起). 在持续的内流相  $[Ca^{2+}]_i$  不能被特异性 L 型 VDCC 阻断剂尼莫地平减少, 说明 ATP 不是通过激活 L 型 VDCC 开放导致胞外  $Ca^{2+}$  内流. 这与关于脑血管平滑肌细胞  $[Ca^{2+}]_i$  增加不是通过 L 型 VDCC 的报道<sup>[2,8]</sup> 一致. 可能是脑血管平滑肌细胞上的 L 型 VDCC 的活性或密度比较低<sup>[9]</sup>. 说明脑血管平滑肌细胞的生理特性与外周血管平滑肌细胞存在一定差异. 另外, ATP 触发的  $Ca^{2+}$  内流也不能被低浓度的 ( $< 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) SK&F96365 减少, 提示 ATP 激活的 ROCC 是 SK&F96365 不敏感的. 此结果与 Zhang 等<sup>[2]</sup> 取新鲜分离的大鼠单个脑基底动脉平滑肌细胞, 用  $Ca^{2+}$  影像学技术观察到的现象一致. SK&F96365 曾被当作新型的 ROCC 阻断剂应用, 但其特异性不高, 除了对  $Ca^{2+}$  运动有影响外, 它还可抑制  $Mn^{2+}$  及  $Ba^{2+}$  离子流动, 对内皮细胞, 血小板及中性粒细胞这类非兴奋性细胞, SK&F96365 在一定浓度范围内 ( $5 \sim 30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 对 ROCC 有较特异的阻断作用, 但浓度稍高会引起  $Ca^{2+}$  释放<sup>[10,11]</sup>, 而本研究显示, 在高浓度下, SK&F96365 可使  $[Ca^{2+}]_i$  升高, 与其作用特性相一致; 除此之外, 对平滑肌这类兴奋性细胞, SK&F96365 还可阻断 VDCC, 且 SK&F96365 的效应并不依赖激动剂的类型. 但尤为特别的是, 在脑  $PC_{12}$  细胞, 垂体 GH<sub>3</sub> 细胞及兔耳动脉平滑肌细胞上都已证实 SK&F96365 对 ATP 门控性  $Ca^{2+}$  通道均不敏感<sup>[11,12]</sup>; 对小脑 NMDA 受体  $Ca^{2+}$  通道也不敏感, 结合我们的实验结果, 提示不同配体激动受体引起  $Ca^{2+}$  内流相关的 ROCC 似乎是非同一性的. 说明 ROCC 的复杂性.

目前在外周血管平滑肌细胞上, 已确认与血管平滑肌收缩功能及血管平滑肌细胞增殖密切相关的  $Cl^-$  通道有二类型:  $Ca^{2+}$  激活  $Cl^-$  通道及容积调节性  $Cl^-$  通道. 对于  $Ca^{2+}$  激活  $Cl^-$  通道, 认为多种血管活性物质 (如内皮素, 血管紧张素 II, 去甲肾上腺

素及ATP均可激活血管平滑肌细胞上相应的受体,促进胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 释放,胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度瞬即升高,继而导致 $\text{Ca}^{2+}$ 激活的 $\text{Cl}^-$ 通道开放,使膜去极化,促使VDCC开放,导致胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流<sup>[3,13]</sup>。有报道,特异性 $\text{Ca}^{2+}$ 激活 $\text{Cl}^-$ 通道阻断剂尼氟酸(niflumic acid, NFA)可通过阻断此类 $\text{Cl}^-$ 通道松弛血管平滑肌的收缩反应。而对于容积调节性 $\text{Cl}^-$ 通道,最近在肾动脉及肺动脉平滑肌细胞发现,容积调节性 $\text{Cl}^-$ 通道主要由CIC-3基因编码,当细胞处于低渗条件时,此类 $\text{Cl}^-$ 通道开放,继而引起水与 $\text{Cl}^-$ 共转运出胞外,使细胞容积调节性减低。也可能参与血管平滑肌张力调节<sup>[14]</sup>。吠塞米是 $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ 共同转运抑制剂,亦是 $\text{Cl}^-$ 通道抑制阻断剂,它可以阻断 $\text{Ca}^{2+}$ 激活 $\text{Cl}^-$ 通道<sup>[15,16]</sup>。本实验发现,它可抑制ATP触发的 $\text{Ca}^{2+}$ 内流,提示吠塞米敏感的 $\text{Cl}^-$ 通道参与了ATP触发的ROCC的 $\text{Ca}^{2+}$ 内流。但这是由于ATP引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的反应使 $\text{Cl}^-$ 通道开放而进一步促进 $\text{Ca}^{2+}$ 内流,还是直接触发 $\text{Cl}^-$ 通道开放引起 $\text{Ca}^{2+}$ 内流尚需进一步的研究。而中枢神经细胞 $\text{Cl}^-$ 通道阻断剂印防己毒素不能抑制ATP触发的 $\text{Ca}^{2+}$ 内流。这可能由于①不同的组织存在不同的 $\text{Cl}^-$ 通道亚型;②不同的 $\text{Cl}^-$ 通道阻断剂特异性不同;③ $\text{Cl}^-$ 通道在多种组织受体介导的 $\text{Ca}^{2+}$ 内流中发挥不同的作用;④细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 运动的特性可因细胞种类不同而不同。

本研究结果提示:ATP触发的牛脑中动脉平滑肌细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 内流,是由SK&F9636不敏感的NVDCC参与,且与吠塞米敏感的 $\text{Cl}^-$ 通道开放相关。

#### 4 参考文献:

- [1] Mayberg MR. Cerebral vasospasm [J]. *Neurosurg Clin North Am*, 1998, **9**(3):615 - 627.
- [2] Zhang H, Weir R, Marton LS, Macdonald RL, Bindokas V, Milier RJ, et al. Mechanisms of hemolysate-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevation in cerebral smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol*, 1995, **269**(6 Pt 2):H1874 - H1890.
- [3] White CR, Elton TS, Shoemaker RL, Brock TA.  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive  $\text{Cl}^-$  channels in vascular smooth muscle cells [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995, **208**(3):255 - 262.
- [4] Doughty JM, Miller AL, Langton PD. Non-specificity of chloride channel blockers in rat cerebral arteries: block of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel [J]. *J Physiol (Lond)*, 1998, **507**(Pt 2):433 - 439.
- [5] Nelson MT, Conway MA, Knot HJ, Brayden JE. Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries [J]. *J Physiol (Lond)*, 1997, **502**(Pt 2):259 - 264.
- [6] Tao L, Guan YY, He H, Han C, Zhang YY, Sun JJ. Comparison of the  $\text{Ca}^{2+}$  movement by activation of alpha 1-adrenoceptor subtypes in HEK293-cells [J]. *Life Sci*, 1997, **61**(21):2127 - 2136.
- [7] Bo X, Karoon P, Nori SL, Bardini M, Burnstock G.  $\text{P}_2\text{x}$  purinoceptors in post mortem human cerebral arteries [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, **31**(5):794 - 799.
- [8] Kim CJ, Weir B, Macdonald RL, Marton LS, Zhang H. Hemolysate inhibits L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat basilar smooth muscle cells [J]. *J Vasc Res*, 1996, **33**(3):258 - 264.
- [9] Langton PD, Standen NB. Calcium currents elicited by voltage steps and steady voltages in myocytes isolated from the rat basilar artery [J]. *J Physiol (Lond)*, 1993, **469**:535 - 548.
- [10] Taylor CW, Broad LM. Pharmacological analysis of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling: problems and pitfalls [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1998, **19**(9):370 - 375.
- [11] Merritt JE, Armstrong WP, Benham CD, Hallam TJ, Jacob R, Jaxa Chamiec A, et al. SK&F96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry [J]. *Biochem J*, 1990, **271**(2):515 - 522.
- [12] Lin WW, Chen BC. Pharmacological comparison of UTP- and thapsigargin-induced arachidonic acid release in mouse RAW 264.7 macrophages [J]. *Br J Pharmacol*, 1998, **123**(6):1173 - 1181.
- [13] Lamb FS, Kooy NW, Lewis SJ. Role of  $\text{Cl}^-$  channels in alpha-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in the anesthetized rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, **401**(3):403 - 412.
- [14] Remillard CV, Lupien MA, Crepeau V, Leblanc N. Role of  $\text{Ca}^{2+}$ - and swelling-activated  $\text{Cl}^-$  channels in alpha 1-adrenoceptor-mediated tone in pressurized rabbit mesenteric arterioles [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, **46**(3):557 - 568.
- [15] Greenwood IA, Hogg RC, Large WA. Effect of frusemide, ethacrynic acid and indanyloxyacetic acid on spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$ -activated currents in rabbit portal vein smooth muscle cells [J]. *Br J Pharmacol*, 1995, **115**(5):733 - 738.
- [16] Kawasaki E, Hattori N, Miyamoto E, Yamashita T, Inagaki C. mRNA expression of kidney-specific CIC-K 1 chloride channel in single-cell reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of outer hair cells of rat cochlea [J]. *Neurosci Lett*, 2000, **290**(1):76 - 78.

## Effects of $\text{Cl}^-$ and $\text{Ca}^{2+}$ channels blockers on ATP-induced $\text{Ca}^{2+}$ influx in cultured calf middle cerebral artery smooth muscle cells

YI Quan<sup>2</sup>, GUAN Yong-Yuan<sup>1</sup>, HE Hua<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China;

2. Department of Pharmacology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

**Abstract:** In order to understand the ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx characterization, we studied the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers (nimodipine and SK&F96365) and  $\text{Cl}^-$  channel blockers (furosemide and picrotoxin) on ATP-induced influx in cultured calf middle cerebral artery smooth muscle cells, with Fura-2 fluorescence technique. ATP evoked the increase in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) level. The response to ATP was biphasic, a transient peak followed by a sustained plateau. This sustained plateau was not significantly reduced by (1) voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel (VDCC) blocker nimodipine; (2) receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel (ROCC) blocker SK&F96365; (3)  $\text{Cl}^-$  channel blocker picrotoxin. However, it was significantly inhibited by

furosemide in a concentration-dependent manner. These data suggest that ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx be related to NVDC, which is not sensitive to SK&F96365, instead of the VDCC, and furosemide-sensitive  $\text{Cl}^-$  channel is related to this  $\text{Ca}^{2+}$  influx.

**Key words:** cells, cultured; muscle, smooth, vascular; cerebral arteries; calcium, cytosolic; chloride channels; adenosine triphosphate; nimodipine; furosemide

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (39970849); the project supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (98-302); the project supported by Life Insurance grant of New York, America

(本文编辑 乔虹)

### 《中国新药与临床杂志》2002年改为月刊

经有关方面批准,《中国新药与临床杂志》从2002年起改为月刊.《中国新药与临床杂志》(原名《新药与临床》),为全国科技期刊,被确定为全国中文核心期刊(内科学,药学),也是统计源期刊.荣获首届国家期刊奖,第2届全国,中国科协,上海市优秀科技期刊一等奖.《中国新药与临床杂志》报道国内外新药,着重报道国内新药的临床研究,合并用药,合理用药和不良反应等.适用于医师,药师,医药教学和科研人员等阅读和参考.2002年起内芯改为胶版纸.欢迎在11月份内向当地邮局订阅.2002年每期定价7.80元,全年93.60元.本刊邮发代号:4-347.