

甲状旁腺素对大鼠输精管收缩的影响和钙的作用

杨 武 高慧英 王振纲 金荫昌 (中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

提要 bPTH-(1-34)抑制电刺激离体大鼠输精管收缩, 增加溶液中 Ca^{2+} 浓度则减弱 bPTH-(1-34) 的作用. bPTH, LaCl_3 , MnCl_2 均能延迟 Ca^{2+} 诱发收缩的

时间曲线. bPTH-(1-34), LaCl_3 , MnCl_2 和戊脉安能抑制在高 K^+ 溶液中 Ca^{2+} 诱发的大鼠输精管收缩. 并且 bPTH-(1-34)减少单位时间 Ca^{2+} 的内流量. 结果表明: bPTH-(1-34)可能直接影响了平滑肌细胞兴奋收缩过程中 Ca^{2+} 的作用.

1983年8月17日收稿 1984年5月22日修回

关键词 甲状旁腺素; 钙; 输精管; 钙通道阻滞剂; 铜; 锰

甲状旁腺素(PTH)能舒张离体和 在体动物的血管、降低血压。也抑制电刺激及 ACh 引起的大鼠子宫、胃肠平滑肌收缩。推测 PTH 可能直接作用于平滑肌细胞⁽¹⁾。但还缺少 PTH 直接结合平滑肌细胞膜受点的证据。根据 Ca^{2+} 在平滑肌细胞兴奋-收缩过程中的重要作用, 本实验观察和探讨了 bPTH-(1-34) 对大鼠输精管收缩的抑制效应以及 与 Ca^{2+} 的关系。

材料与 方法

药品 bPTH-(1-34) 是 Beckman 公司生物制品。戊脉安为天津中央制药二厂生产。 $^{45}CaCl_2$ 为中国科学院原子能研究所生产, 比度为 2.84 mCi/mmol 其余试剂均为 AR。

测定方法

1. 离体大鼠输精管实验 Wistar 大鼠(中国医学科学院动物中心提供), 体重 268 ± SD 27 g 输精管用 Krebs 液冲洗。悬挂在含有 10 ml 营养液的浴槽中, 37°C, pH 7.5, 通 95% O_2 + 5% CO_2 的混合气。无 Ca^{2+} 高 K^+ 液含 80 mM KCl 和 40 mM NaCl。两根铂丝电极做成环形位于浴槽上下端, 距标本 1 mm。电刺激器为日本 SEN 2201 型, 刺激强度 20 V, 频率 0.1 Hz, 波宽 4 ms。收缩记录用日本光电 TB 611 型等长换能器。高 K^+ 液中 Ca^{2+} 诱发收缩实验, 使用国产 YL-1 型机械电换能器。

电刺激前将肌条在正常 Krebs 液中平衡 1 h 每 10 min 冲洗 1 次。给电刺激前 10 min 加药入浴槽中。每次观察 10-15 min, 并作等时间对照记录。观察电刺激下加 Ca^{2+} 增加收缩的时间曲线, 以及药物对曲线的影响时, 肌条在无 Ca^{2+} Krebs 液中平衡。

观察高 K^+ 液中 Ca^{2+} 诱发收缩时, 肌条在无 Ca^{2+} Krebs 液中平衡 1 h。换用无 Ca^{2+} 高 K^+ Krebs 液平衡 10 min 后加入 2 mM Ca^{2+} , 并记录张力变化。每次观察后使肌条在无 Ca^{2+} Krebs

液中松弛。

各项实验外加药物容量不超过浴槽中溶液容量的 1%, 使之不影响溶液的 pH 和温度。

2. 离体大鼠输精管标本的 $^{45}CaCl_2$ 示踪实验。输精管 1 cm 长, 置 Krebs 液中平衡 1 h。给药组加入 bPTH-(1-34), 对照组加入等容量无离子水。反应 10 min 后取出肌条放到含有 $^{45}CaCl_2$ 的 Krebs 液中 (0.1 μ Ci/ml), 此 Krebs 液不加 bPTH-(1-34) 分别反应 3, 5, 10 min 后取出, 放到含有 2mM EGTA 的无 Ca^{2+} Krebs 液于冰浴中 30 min 以终止反应。然后肌条在滤纸上吸干, 称重并加入 1 N NaOH 250 μ l, 在沸水浴中 10 min 消化后, 加入含有 2.5 ml 无水乙醇的甲苯闪烁液 7.5 ml (5 g ppo + 100 mg popop/L 甲苯) 在国产 FJ-2100 型液闪仪测定放射计数。

结 果

bPTH-(1-34)对电刺激大鼠输精管收缩的影响

1. bPTH-(1-34)的作用 bPTH(1-34)的浓度为 6.25 nM-0.1 μ M 时, 抑制电刺激收缩且与剂量相关, 0.1 μ M 时达到最大抑制作用, IC_{50} 约为 20 nM(图 1)。

2. Ca^{2+} 的作用 电刺激收缩依赖溶液中 Ca^{2+} 浓度。当 Ca^{2+} 浓度在 0.5-10 mM 之间, 肌张力幅度的变化呈 S 形量-效关系。在无

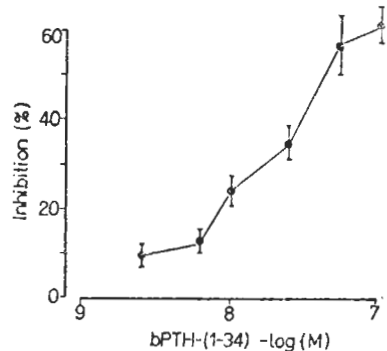


Fig 1. Concentration-inhibitory effect of bPTH-(1-34) on contraction of rat vas deferens elicited by electrical stimulation (n = 11)

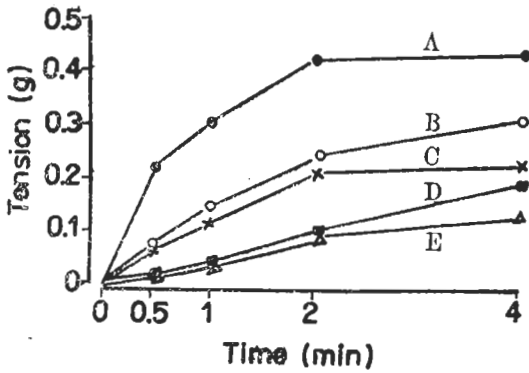


Fig 2. Effects of bPTH-(1-34) 25 nM (B), 50 nM (D), LaCl_3 0.1 mM (C), MnCl_2 1 mM (E) and control (A) on contraction of rat vas deferens elicited by electrical stimulation with the Ca^{2+} concentration changes from Ca^{2+} -free to 2.5 mM Ca^{2+} in medium

Ca^{2+} 溶液中电刺激不能使肌条收缩, 补充 2.5 mM Ca^{2+} 后, 肌条在电刺激下收缩幅度逐渐增加, 并在 10 min 内达到稳定, 见(图 2)。

3. bPTH-(1-34)与 Ca^{2+} 的拮抗关系 当溶液中 Ca^{2+} 浓度从 2.5 mM 增加到 5 mM 时, bPTH-(1-34)抑制电刺激大鼠输精管收缩的曲线右移(图 3)。当 bPTH-(1-34)产生抑制作用时, 外加 Ca^{2+} 也能逆转这一作用。bPTH-(1-34)还能延迟补充 Ca^{2+} 后肌张力变化的时间曲线, 此作用与 La^{3+} 和 Mn^{2+} 的效应近似(图 2)。

4. bPTH-(1-34)对钙内流的影响 大鼠输精管肌条与 0.1 μM bPTH-(1-34)反应 10 min 后, 换到含有 ^{45}Ca 的 Krebs 液中, 分别反应 3, 5, 10 min 后, 肌条中的放射性 $^{45}\text{CaCl}_2$

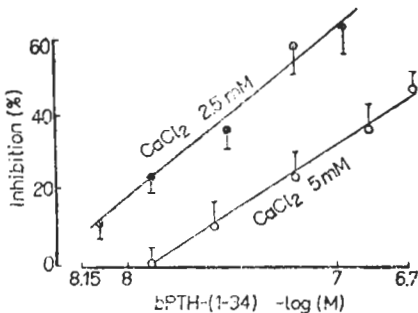


Fig 5. Inhibitory effect of bPTH-(1-34) on the contraction of rat vas deferens in Krebs solution containing 2.5 or 5 mM CaCl_2 , $n=7$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

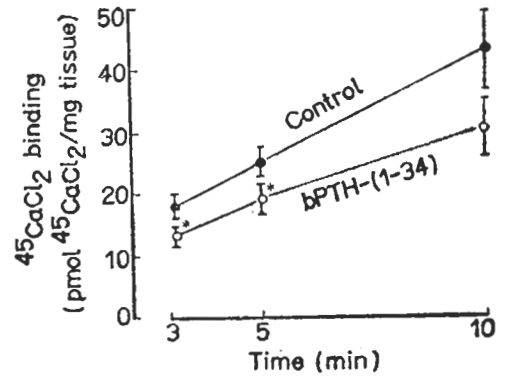


Fig 4. Influence of bPTH-(1-34) 0.1 μM on influx of Ca^{2+} in rat vas deferens after incubation with $^{45}\text{CaCl}_2$ for 3, 5, 10 min. $n=4$, $\bar{x} \pm \text{SD}$, * $p < 0.01$.

含量在 3, 5 min 都明显低于对照组(图 4)。

bPTH-(1-34)对高 K^+ 液中 Ca^{2+} 诱发大鼠输精管收缩的抑制作用

1. Ca^{2+} 诱发的肌张力变化 大鼠输精管在高 K^+ 液中 10 min 后给 Ca^{2+} 引起单次张力变化, 此变化包括两部分: 先有一个快速出现但维持时间很短的变化, 称为快相(phasic)。数 s 后紧接着出现一个持续时间较长的张力变化, 称为慢相(tonic)。 Ca^{2+} 浓度在 0.1-10 mM 之间, 这两相张力变化一致。

2. bPTH-(1-34), La^{3+} , Mn^{2+} 和戊脉安对两相张力变化的作用 bPTH-(1-34)在所观察的浓度范围能明显抑制 phasic 而不影响 tonic(图 5 A), La^{3+} 在 1-5 mM 范围抑制 phasic 不改变 tonic(图 5 B) Mn^{2+} 在 0.01-1 mM 范围抑制 phasic 但增加 tonic(图 5 C), 戊脉安在 0.01-10 μM 能抑制 phasic 和 tonic, 最大抑制 phasic 和 tonic 的浓度分别为 1 和 10 μM (图 5 D)。

讨 论

本文表明, bPTH-(1-34)具有抑制电刺激大鼠输精管收缩作用, 与 Pang 等在大鼠子宫、胃肠平滑肌所得结果⁽¹⁾一致。电刺激大鼠输精管收缩依赖溶液中 Ca^{2+} 浓度, 当 Ca^{2+} 浓度低于 1 mM 时, 电刺激后不能引起张力变化, 提

示细胞内外一定的 Ca^{2+} 浓度差是决定张力变化的关键。当溶液中 Ca^{2+} 浓度增加后, bPTH-(1-34)抑制电刺激大鼠输精管收缩的曲线右移, 而 bPTH-(1-34)产生抑制效应时, 外加 Ca^{2+} 能逆转其抑制作用, 说明 bPTH-(1-34)可能是影响 Ca^{2+} 对平滑肌细胞的收缩作用。在无 Ca^{2+} 溶液中, 电刺激不能使大鼠输精管收缩, 补充 Ca^{2+} 后, 随着电刺激, 肌张力逐渐增加。bPTH-(1-34), La^{3+} , Mn^{2+} 都能延迟这一张力变化(图 3)。可以认为这是 bPTH-(1-34) 直接影响了 Ca^{2+} 对肌条诱发收缩作用。

为了说明 bPTH-(1-34) 可能的作用部位, 本实验还观察了 bPTH-(1-34)对高 K^+ 去极化后 Ca^{2+} 诱发收缩的影响。已知高 K^+ 去极化作用可使平滑肌细胞膜上 Ca^{2+} 通道打开, Ca^{2+} 通过膜上对电位敏感的通道进入细胞。虽然目前对 Ca^{2+} 通道的结构还不清楚, 但应用 Ca^{2+} 通道阻断剂可以清楚地表明, 当通道受抑制后, 或一些金属离子占据 Ca^{2+} 结合点后都可以影响依

赖 Ca^{2+} 的细胞活动⁽⁴⁻⁶⁾。本文观察到高 K^+ 液中 Ca^{2+} 诱发大鼠输精管收缩引起两相张力变化。从图 5 可见, bPTH-(1-34), La^{3+} , Mn^{2+} 和戊脉安对两相张力变化的抑制方式不同, 提示两相变化通过不同的机制。根据近年来对 Ca^{2+} 通道的药理学研究发现, 戊脉安与放射性标记的 Ca^{2+} 拮抗剂竞争结合反应得到一个双相置换曲线, 表明戊脉安具有多点结合的性质。提示, 存在对通道拮抗剂不同亲和力的通道亚型。Hurwitz 根据豚鼠回肠纵行肌的实验结果也曾提出这样两相张力变化分别与两种不同的 Ca^{2+} 通道有关⁽⁵⁾。

图 5 的结果表明, bPTH-(1-34)与 La^{3+} 的抑制效应相似。 La^{3+} 是特异性较强的 Ca^{2+} 结合点竞争拮抗剂, 并且对 Ca^{2+} 结合点的亲和力大于 Ca^{2+} 本身。因此, La^{3+} 通过结合 Ca^{2+} 的结合点而干扰了 Ca^{2+} 在肌肉收缩中的作用, 产生抑制效应。本文首次观察到 bPTH-(1-34)对大鼠输精管收缩的抑制作用, 并提出 PTH 抑制平滑肌收缩可能是通过减少 Ca^{2+} 内流产生作用。但究竟是否直接作用于平滑肌细胞的 Ca^{2+} 转运过程, 还是通过抑制促发内源神经介质释放所需的 Ca^{2+} , 值得研究。

参 考 文 献

- 1 Pang PKT, Tenner T E Jr, Yee JA, Yang M, Janssen HF. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 675
- 2 Pang PKT, Shew RL, Sawyer WH. *Life Sci* 1981; 28: 1317
- 3 Braunwald E. *N Engl J Med* 1982; 307: 1618
- 4 Hurwitz L, McGuffee LJ, Smith PM, Little SA. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 220: 382
- 5 Hurwitz L, McGuffee LJ, Little SA, Blumberg H. *ibid* 1980; 214: 574
- 6 Hay DWP, Wadsworth RM. *Br J Pharmacol* 1982; 76: 103
- 7 Glossman H, Ferry DR, Lubbecke F, Mewes R, Hofmann F. *Trends Pharmacol Sci* 1982; 3: 431

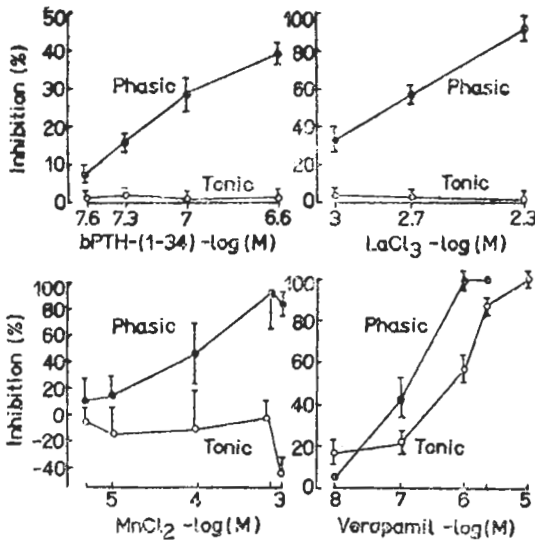


Fig 5. inhibitory effects of bPTH-(1-34), LaCl_3 , MnCl_2 and verapamil on contractions of rat vas deferens elicited by Ca^{2+} in high K^+ solution. $n = 6$, $\bar{x} \pm \text{DS}$.

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Mar; 6 (1) : 51-55

INFLUENCE OF BOVINE PARATHYROID HORMONE-(1-34) ON CONTRACTION OF RAT VAS DEFERENS AND EFFECT OF CALCIUM

YANG Wu, GAO Hui-ying, WANG Zhen-gang, JIN Yin-chang

(Inst Basic Medical Sciences, Chinese Acad Medical Sciences, Beijing 100005)

ABSTRACT The inhibitory effect of bovine PTH fragment, bPTH-(1-34) on rat vas deferens contraction was studied *in vitro*. bPTH-(1-34) inhibited the contraction elicited by either electrical stimulation or depolarization with 80 mM K⁺. Increase of Ca²⁺ from 2.5 to 5 mM in the medium shifted the dose-response curve of bPTH-(1-34) to the right. In addition, bPTH-(1-34), similar to La³⁺ and Mn²⁺, delayed the development of tension induced by Ca²⁺.

bPTH-(1-34) reduced the Ca²⁺ content in rat vas deferens incubated with ⁴⁵CaCl₂ for 3 or 5 min.

Similar to LaCl₃, MnCl₂ and verapamil, bPTH-(1-34) influenced the contraction of rat vas deferens induced by Ca²⁺ in depolarizing high K⁺ solution.

We suggest that the inhibitory effect of bPTH-(1-34) on the contraction of rat vas deferens is acted by interfering with the Ca²⁺-dependent process of smooth muscle contraction.

KEY WORDS parathyroid hormone; calcium; calcium channel blockers; vas deferens; lanthanum; manganese

* * * * *