

粉防己碱对依 Ca^{2+} 性内皮源松弛因子释放的影响

郑秀凤、潘红卫、卞如濂 (浙江医科大学药理教研室, 杭州 310006)

摘要 在无 Ca^{2+} Krebs 液中, ACh 诱发兔主动脉松弛受抑制, 恢复 Ca^{2+} 后抑制解除。在 $\text{KCl } 40\text{ mmol/L}$ 和 $\text{PE } 1\mu\text{mol/L}$ 组中, $\text{Tet} < 30\mu\text{mol/L}$ 和 $\text{Ver} < 10\mu\text{mol/L}$ 对肌条的 ACh 松弛均无抑制, 但超过上述剂量则呈抑制。结果提示兔主动脉 EDRF 释放与 Ca^{2+} 有关。大剂量 Tet 及 Ver 对 EDRF 释放有抑制。表明兔主动脉内皮细胞 Ca^{2+} 通道的特性可能与平滑肌细胞不同。

关键词 粉防己碱; 维拉帕米; 内皮; 血管平滑肌; 乙酰胆碱; 氯化钾; 去氧肾上腺素; 主动脉

1986年7月10日收稿 1987年4月6日修回

随着内皮源松弛因子 (endothelium-derived relaxant factor, EDRF) 的发现^(1,2), 及 EDRF 的释放与 Ca^{2+} 关系的提出^(3,4), 钙拮抗剂对血管内皮细胞的作用, 引起人们关注。Miller 等⁽⁵⁾用去氧肾上腺素 (phenylephrine, PE) 作刺激剂发现钙拮抗剂氟桂嗪 (flunarizine) 对内皮细胞钙通道的作用不明显。本文使用 $\text{KCl } 40\text{ mmol/L}$ 及 $\text{PE } 1\mu\text{mol/L}$ 作刺激剂, 分析粉防己碱 (tetrandrine, Tet) 及维拉帕米 (verapamil,

Ver) 对乙酰胆碱(ACh)诱发EDRF释放的影响,以便了解血管内皮细胞膜 Ca^{2+} 通道的特性。同时,证实EDRF的释放是依 Ca^{2+} 的。

方 法

兔 11 只, 体重 $2.1 \pm \text{SD } 0.4 \text{ kg}$, 放血处死, 取出降主动脉, 制成 2 mm 宽环, 放于 Krebs bicarbonate 液 3 ml 中, 37°C , 通 O_2 , 连接换能器, 静止张力 4 g。平衡 2 h 后, 分别用 $\text{KCl } 40 \text{ mmol/L}$ 及 $\text{PE } 1 \mu\text{mol/L}$ 激动 3 次, 待反应基本稳定后, 开始实验^(6,7)。

去内皮细胞实验 肌环先用 $\text{KCl } 40 \text{ mmol/L}$ 或 $\text{PE } 1 \mu\text{mol/L}$ 引起收缩反应, 达高峰恒定后, 以累加法分别加入 $\text{ACh } 0.01, 0.1, 1 \mu\text{mol/L}$, 引起松弛反应, 证实内皮完整。然后, 去除内皮⁽¹⁾, 再平衡 30 min 后, 重复上述步骤, ACh 不呈松弛反应, 证实内皮已去除。同时纪录有或无内皮的肌环对 $\text{KCl } 40 \text{ mmol/L}$ 或 $\text{PE } 1 \mu\text{mol/L}$ 引起的收缩反应, 并进行比较。

Ca^{2+} 实验 1. 对照组: 取肌环用 $\text{PE } 1 \mu\text{mol/L}$ 引起收缩, 达坪顶恒定后, 分别加入上述浓度 ACh , 引起松弛反应。2. 无 Ca^{2+} 组: 肌糟换液, 待标本回复基线后, 用无 Ca^{2+} Krebs 液(在 Krebs 液中去 Ca^{2+} , 加 EDTA 1 mmol/L)每隔 5 min 换液一次, 共三次, 直至 20 min 后, 重复对照步骤, 观察在无 Ca^{2+} 情况下, 肌环对不同浓度 ACh 松弛反应的影响。3. 补 Ca^{2+} 后组: 换液, 待标本回复基线后 30 min, 重复对照步骤, 观察 ACh 引起松弛的恢复程度。以对照组 ACh 松弛反应为对照, 计算无 Ca^{2+} 或补 Ca^{2+} 后, ACh 诱发松弛反应的抑制%。同时纪录上述三步骤中 PE 收缩的变化情况, 并按同法对数据作处理。

内皮细胞钙通道的实验 仿照平滑肌细胞实验⁽⁶⁾, 用 KCl 和 PE 分别打开内皮细胞膜上电位依赖通道(potential-dependent channel, PDC)和受体控制通道(receptor operated channel, ROC)⁽⁸⁾。取兔主动脉环, 分成 $\text{KCl } 40 \text{ mmol/L}$ 及 $\text{PE } 1 \mu\text{mol/L}$ 两组, 每组再分

Tet 及 Ver 两个小组, 共 4 个小组。先描记由 KCl 或 PE 诱发收缩反应, 达坪顶恒定后, 加入 $\text{ACh } 0.01, 0.1, 1 \mu\text{mol}$, 导致松弛的正常曲线。换液, 待回复基线后, 分别加不同浓度 Tet 及 Ver。加药 30 min 后, 重复上述步骤。以用药前不同浓度 ACh 的松弛反应作对照, 计算用药后抑制或促进松弛%。同时, 以同法计算用药前后由 KCl 或 PE 引起收缩反应抑制%。

结 果

去内皮细胞实验 兔主动脉环有或无内皮细胞对 KCl 或 PE 均引起收缩反应(见图 1)。然而, 由 $\text{ACh } 0.01, 0.1, 1 \mu\text{mol/L}$ 诱发松弛反应, 仅在内皮完整情况下发生, 一旦去除内皮, 此作用消失。这一结果与早期发现⁽¹⁾完全一致。

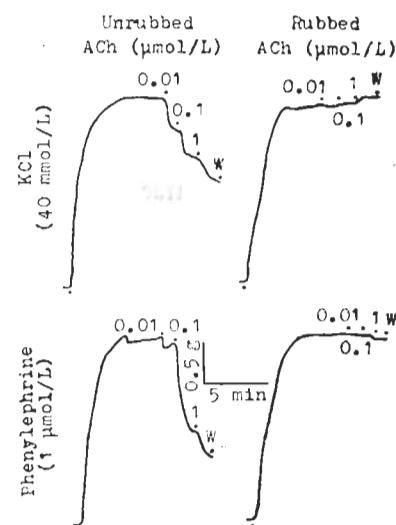


Fig 1. Loss of relaxing responses of rabbit aorta to $\text{ACh} (\mu\text{mol/L})$ after rubbing the intimal surface.

ACh 松弛反应与 Ca^{2+} 关系 兔主动脉由 ACh 诱发松弛反应结果见表 1。无 Ca^{2+} Krebs 液中, 肌环对 PE 的收缩, 以及 ACh 引起的松弛反应, 均呈明显抑制($p < 0.01$)。当重新加入 Ca^{2+} 后, 肌环则恢复其对 PE 及 ACh 的反应, 并接近于对照水平。

Tet 及 Ver 对 KCl 或 PE 的收缩以及对

Tab 1. Effects of Ca^{2+} on endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (ACh) in rabbit aortic rings preconstricted with phenylephrine (PE 1 $\mu\text{mol/L}$). Numbers of rings in parentheses. $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

Groups	Inhibition(%) of PE	Relaxation(%)	induced by ACh ($\mu\text{mol/L}$) in the rings	
	1 $\mu\text{mol/L}$	0.01	0.1	1
Control	(9) 0	(8) 14 \pm 17	(9) 47 \pm 20	(9) 66 \pm 16
Ca^{2+} -free	(9) 44 \pm 12 ***	(8) 8 \pm 11 *	(9) 20 \pm 14 ***	(9) 36 \pm 19 ***
Ca^{2+} -added	(6) 1 \pm 12 *	(5) 15 \pm 19 *	(6) 47 \pm 14 *	(6) 60 \pm 19 *

Tab 2. Effects of tetrandrine (Tet) and verapamil (Ver) on rabbit aortic contractile reaction (g) evoked by KCl 40 mmol/L and phenylephrine (PE) 1 $\mu\text{mol/L}$. Numbers of rings in parentheses. $\bar{x} \pm \text{SD}$. *** $p < 0.01$, PE vs KCl

Drugs	$\mu\text{mol/L}$	Agonists	Before	After	Inhibition(%)
Tet	3	PE	(5) 2.7 \pm 0.6	(5) 2.5 \pm 0.6	3 \pm 7
	10	KCl	(8) 2.5 \pm 0.8	(8) 1.5 \pm 0.6	44 \pm 10
	10	PE	(9) 2.8 \pm 0.6	(9) 2.4 \pm 1.0	9 \pm 14 ***
	30	KCl	(5) 2.5 \pm 0.9	(5) 1.9 \pm 0.7	60 \pm 16
	30	PE	(7) 2.4 \pm 0.6	(7) 1.7 \pm 0.8	17 \pm 19 ***
Ver	0.1	KCl	(5) 2.8 \pm 0.5	(5) 1.9 \pm 0.7	39 \pm 22
	0.1	PE	(4) 2.7 \pm 0.3	(4) 2.6 \pm 0.3	3 \pm 4 ***
	1	KCl	(8) 2.9 \pm 0.6	(8) 0.8 \pm 0.6	73 \pm 11
	1	PE	(5) 2.7 \pm 0.3	(5) 2.4 \pm 0.6	17 \pm 14 ***
	10	KCl	(4) 2.7 \pm 0.4	(4) 0.4 \pm 0.2	92 \pm 4
	10	PE	(6) 2.5 \pm 0.4	(6) 1.3 \pm 0.5	46 \pm 19 ***

Tab 3. Effects of tetrandrine (Tet) and verapamil (Ver) on % relaxation induced by acetylcholine in rabbit aortic rings preconstricted with KCl and phenylephrine (PE). Number of rings in parentheses. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

Drugs	$\mu\text{mol/L}$	% Relaxation induced by acetylcholine					
		0.01 $\mu\text{mol/L}$		0.1 $\mu\text{mol/L}$		1 $\mu\text{mol/L}$	
		Before	After	Before	After	Before	After
KCl 40 mmol/L	Ver 0.1	(6) 4 \pm 6	(6) 8 \pm 12 *	(6) 14 \pm 9	(6) 30 \pm 15 **	(6) 33 \pm 14	(6) 49 \pm 12 *
	1	(7) 4 \pm 6	(7) 7 \pm 13 *	(8) 16 \pm 9	(8) 33 \pm 17 **	(8) 34 \pm 13	(8) 53 \pm 27 *
	10			(4) 15 \pm 7	(4) 7 \pm 8 *		
Tet	10	(7) 1 \pm 1	(6) 1 \pm 2 *	(7) 12 \pm 15	(7) 3 \pm 4 *	(7) 27 \pm 18	(7) 17 \pm 17 *
	30			(5) 6 \pm 3	(5) 0 \pm 2 ***	(5) 21 \pm 6	(5) 2 \pm 16 **
PE 1 $\mu\text{mol/L}$	Ver 0.1	(5) 11 \pm 16	(5) 9 \pm 16 *	(5) 53 \pm 12	(5) 40 \pm 14 *	(5) 75 \pm 14	(5) 65 \pm 16 *
	1	(5) 11 \pm 16	(5) 8 \pm 15 *	(5) 53 \pm 12	(5) 40 \pm 14 *	(5) 75 \pm 15	(5) 62 \pm 16 *
	10	(6) 8 \pm 113	(6) 6 \pm 11 *	(6) 50 \pm 11	(5) 22 \pm 8 ***	(6) 68 \pm 12	(6) 48 \pm 22 *
Tet	3	(4) 6 \pm 9	(4) 1 \pm 11 *	(5) 58 \pm 10	(5) 46 \pm 9 *	(5) 76 \pm 12	(5) 68 \pm 12 *
	10	(9) 9 \pm 12	(9) 11 \pm 16 *	(9) 43 \pm 20	(5) 36 \pm 21 *	(9) 70 \pm 15	(9) 59 \pm 20 *
	30	(7) 6 \pm 7	(7) -1 \pm 7 *	(7) 47 \pm 16	(7) 5 \pm 15 ***	(7) 72 \pm 16	(6) 6 \pm 26 ***

ACh 的松弛反应的影响 Tet 及 Ver 对 KCl 及 PE 诱发肌环收缩的结果见表 2。Tet 及 Ver 对 KCl 组的收缩抑制作用均比 PE 组强得多，试

药每一浓度相应点 $p < 0.01$ 。这与本室以前结果⁽⁶⁾相一致。

Tet 及 Ver 对 ACh 诱发松弛反应的影响结

果见表3。在KCl组中，Tet 1, 3 μmol/L对肌条由ACh诱发松弛反应无明显抑制作用；然而，Tet 30 μmol/L时，ACh的松弛作用才明显受抑制($p<0.01$ 或 <0.05)。在PE组中，Tet对ACh松弛反应的结果与KCl组完全相一致。

在KCl组中，Ver 0.1, 1 μmol/L对肌条由ACh诱发松弛反应均有增强趋势，但在统计学上，仅对ACh 0.1 μmol/L松弛有明显增强($p<0.05$)。KCl组Ver 10 μmol/L对ACh 0.1 μmol/L引起松弛反应无抑制。在PE组中，Ver 0.1, 1 μmol/L对肌条不同浓度ACh的松弛反应均无抑制，而在Ver 10 μmol/L时，ACh 0.1 μmol/L的松弛反应显著受抑制。这与Ver 10 μmol/L KCl组有差别。

讨 论

兔主动脉有或无内皮细胞对KCl及PE引起收缩无影响，说明收缩反应与血管平滑肌细胞有关。肌环对不同浓度ACh的松弛作用，仅在内皮完整情况下发生，表明其松弛反应似乎与血管平滑肌细胞无直接关系，而是由内皮细胞EDRF的释放引起^(1,2)。

在无Ca²⁺液中，肌环对ACh的松弛反应明显受抑制，一旦Ca²⁺恢复，抑制即消除，表明肌环由ACh诱发EDRF的释放是依赖于Ca²⁺的。

本文选用KCl及PE分别模拟内皮细胞膜上PDC和ROC被打开，观察Tet及Ver的作用。Miller等⁽⁵⁾单用PE仅打开ROC，Ca²⁺内流，钙拮抗剂对其作用可以不明显。本结果表明Tet及Ver对KCl引起肌环收缩的抑制作用强于PE，这与以前结果⁽⁸⁾相一致，再次证实两药对平滑肌细胞膜PDC Ca²⁺内流有选择性抑制作用。

Tet 3, 10 μmol/L对肌环ACh的松弛，

KCl和PE组均无抑制。大剂量Tet 30 μmol/L KCl和PE组，及Ver 10 μmol/L PE组才显示抑制作用。结果提示一般剂量Tet及Ver对ACh诱发EDRF的释放无影响；但大剂量Tet的KCl和PE组，Ver的PE组才对EDRF的释放呈抑制。实验也证实Tet及Ver对兔主动脉内皮细胞与平滑肌细胞膜钙通道在特征上可能有区别。

必须指出，表3可见Ver 0.1, 1 μmol/L组，肌环对不同浓度ACh诱发EDRF的释放均有增强倾向，但仅对ACh 0.1 μmol/L的松弛增强是显著的($p<0.05$)。这说明Ver与Tet对兔主动脉ACh诱发EDRF释放的影响是有差别的。

参 考 文 献

- 1 Furchtgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288 : 373
- 2 Vanhoutte PM, Miller VM. Heterogeneity of endothelium-dependent responses in mammalian blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7 (suppl 3) : S 12
- 3 Singer HA, Peach MJ. Calcium- and endothelial-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. *Hypertension* 1982; 4 (suppl 2) : 19
- 4 Long CJ, Stone TW. The release of endothelium derived relaxant factor is calcium dependent. *Br J Pharmacol* 1985; 84 : 152 p
- 5 Miller RC, Schoeffter P, Stoclet JC. Insensitivity of calcium-dependent endothelial stimulation in rat isolated aorta to the calcium entry blocker, flunarizine. *Ibid* 1985; 85 : 481
- 6 郑秀凤、卞如濂。粉防己碱对KCl, CaCl₂和去甲肾上腺素诱发兔肺动脉收缩的影响。中国药理学报 1986; 7 : 40
- 7 郑秀凤、陈莲凤、卞如濂。α-萜品烯醇对兔肺动脉的作用。浙江医科大学学报 1983; 12 : 293
- 8 Janis RA, Triggle DJ. New developments in Ca²⁺ channel antagonists. *J Med Chem* 1983; 26 : 775

Acta Pharmacologica Sinica 1987 Nov; 8 (6) : 525-529

Effects of tetrandrine on release of calcium-dependent endothelium-derived relaxant factor

ZHENG Xiu-Feng, PAN Hong-Wei, BIAN Ru-Lian

(Department of Pharmacology, Zhejiang Medical University Hangzhou 310006)

ABSTRACT In calcium-free Krebs solution, the inhibition of endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (ACh) in rabbit aortic rings was observed, but the inhibition was antagonized when Ca^{2+} was added. In KCl 40 mmol/L and phenylephrine (PE) 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ groups, the relaxations evoked by ACh in aortic rings were not inhibited by tetrandrine (Tet) $< 30 \mu\text{mol}/\text{L}$ and verapamil (Ver) $< 10 \mu\text{mol}/\text{L}$, but were suppressed by Tet 30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ and Ver 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$. It is concluded that the release of endothelium-derived relaxant factor (EDRF)

induced by ACh is depended on extracellular calcium. The stimulated liberation of EDRF is inhibited by a large dose of Tet (30 $\mu\text{mol}/\text{L}$) or Ver (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$). The results may indicate that the characteristics of calcium channel of endothelial cells are not identical with those of the smooth muscle cells.

KEY WORDS tetrandrine; verapamil; endothelium; vascular smooth muscle; acetylcholine; potassium chloride; phenylephrine; aorta