

尼莫地平对大鼠主动脉收缩及钙内流的影响¹

董 辉、杨藻宸、魏 湘 (上海医科大学基础医学部药理教研室, 上海 200032, 中国)

Effect of nimodipine on the contraction and the Ca influx of rat aortaDONG Hui, YANG Zao-Chen, WEI Xiang
(Department of Pharmacology, Faculty of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT The relaxant effect of nimodipine (Nim) on rat aorta was studied *in vitro*. Nim inhibited KCl-induced contraction ($IC_{50} = 40 \text{ nmol/L}$) more potently than NE-induced contraction ($IC_{50} = 20 \mu\text{mol/L}$), but did as equipotently as KCl-induced ^{45}Ca influx ($IC_{50} = 30 \text{ nmol/L}$). There was a positive correlation between inhibiting the KCl-induced ^{45}Ca influx and the contraction ($r = 0.98$). However, it inhibited the NE-induced ^{45}Ca influx ($IC_{50} = 60 \text{ nmol/L}$) more potently than the NE-induced contraction. Verapamil inhibited the 2 components of NE-induced contraction significantly, while Nim only inhibited the contraction evoked by extracellular Ca^{2+} influx significantly. Nim did not influence the ^{45}Ca influx into resting cells of rat aorta. These results suggest that the relaxant effect of Nim on rat aorta may be closely related to the blockade of Ca^{2+} entry through both potential-dependent calcium channels (PDC) and receptor-operated calcium channels (ROC), while the action on PDC seems to play a more important role than that on ROC.

KEY WORDS nimodipine; verapamil; potassium chloride; calcium chloride; norepinephrine; calcium isotopes; aorta

摘要 在离体大鼠胸主动脉, 尼莫地平(Nim)抑制KCl所致收缩作用比抑制NE强, 且抑制KCl所致 ^{45}Ca 内流与抑制收缩作用呈正相关; 抑制NE所致 ^{45}Ca 内流比抑制收缩强。Ver对NE所致两种收缩成

分的抑制作用均显著, 而Nim只显著地抑制 Ca^{2+} 内流所致的收缩。结果提示Nim阻滞PDC的作用比ROC强, 并证实其扩张血管作用与阻滞 Ca^{2+} 内流密切相关。

关键词 尼莫地平; 维拉帕米; 氯化钾; 氯化钙; 去甲肾上腺素; 钙同位素; 主动脉

尼莫地平(nimodipine, Nim)为1,4-二氢吡啶类钙拮抗剂第二代的新药, 对脑血管具有选择性扩张作用, 并已提供临床治疗多种脑血管疾病^(1,2), 但对其作用机理的研究远不及硝苯吡啶充分, 资料是在兔、猫、犬血管上获取的, 且偏重于对离体血管收缩效应的影响, 对其阻滞 Ca^{2+} 内流作用缺乏直接证据, 尤其未见文献报道Nim对血管平滑肌 ^{45}Ca 内流的影响。本文在大鼠胸主动脉上同时研究Nim对血管收缩及 ^{45}Ca 内流的影响, 进一步探讨其作用机理。

MATERIALS AND METHODS

血管收缩实验 Wistar大鼠, ♂, 体重 $280 \pm \text{SD } 68 \text{ g}$, 击头处死后取出胸主动脉, 剪成 $20 \times 2 \text{ mm}$ 螺旋条, 置于Krebs液浴槽中, 37°C 通以 $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$, pH 7.2-7.4, 负荷 2 g 。每20 min换液一次, 平衡2 h。血管张力经肌力换能器接XMT-200型台式自动平衡记录仪描记。每次加入浴槽的药液不超过 0.1 ml , 按最终浴槽药物浓度计算结果。

^{45}Ca 内流实验 参照文献(3,4)法略加改进, 取大鼠胸主动脉, 剪成 5 mm 宽的动脉环, 置于Tris缓冲生理液并通 $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$, 37°C , 平衡60 min。每20 min换液一次, 实验组用试药预处理10 min。在研究药物对静息细胞 ^{45}Ca 内流的影响时, 实验组和对照组均置于 ^{45}Ca (放射性比浓度为 55.5 kBq/ml)

Received 1989 Sep 30 Accepted 1990 Apr 17

¹Project supported by the Fund of Chinese National Educational Commission No. 880084. Reported on the 2nd Conference of Chinese Biochemical Pharmacology Association. 1987 Oct 19-23, Tianjin

的 Tris 缓冲生理液中 5 min; 当研究药物对兴奋细胞⁴⁵Ca 内流的影响时, 实验组和对照组均先分别暴露于高 K⁺去极化液或去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE) 10 min 后, 再置于含同样放射性比浓度的生理液内 5 min, 然后取出标本转移到含有 EGTA 2 mmol/L 的冰冷无 Ca²⁺生理液内, 以除去细胞外⁴⁵Ca。1 h 后取出标本用滤纸吸干, 精确称重, 加入 0.05 ml HClO₄ + H₂O₂ 消化液, 在 80℃ 水浴中消化 30 min。冷却后加入 2 ml 乙二醇乙醚和 5 ml 0.6% 二甲苯-丁基 PBD 闪烁液。用 LKB 1210 型液闪计数仪测量 cpm, 依淬灭曲线校正为 dpm, 再按下式计算:⁴⁵Ca 内流量 (μmol/kg wet tissue) = 标本内 dpm × 营养液 Ca μmol / 标本湿重(kg) × 营养液 dpm

Nim(河北医学院药理学系药物化学教研室惠赠)。维拉帕米(verapamil, Ver 天津市和平制药厂)。重酒石酸去甲肾上腺素注射液(上海天丰药厂)。EGTA(Sigma 公司)。⁴⁵Ca-CaCl₂ 水溶液(北京原子能研究所, 放射性比度为 703 MBq/g CaCl₂, pH 5-6)。其他试剂均系 AR 或 CP。

无钙液从正常营养液中除去 CaCl₂ 加 EDTA 0.1 mmol/L。高 K⁺去极化液用 KCl 160 mmol/L 替代等量的 NaCl。

RESULTS

Nim 对高 K⁺去极化所致收缩的影响 肌条在正常 Krebs 液内平衡 2 h 后, 换为高 K⁺去极化液使肌条达最大收缩。当收缩曲线平稳后, 将 Nim 从低浓度至高浓度加入浴槽直至最大舒张效应。对照曲线加入溶媒无作用, 且收缩曲线能持续稳定 1 h 以上。结果见 Fig 1。经计算得 Nim 对高 K⁺去极化所致收缩的抑制强度 IC₅₀ = 40 nmol/L。

Nim 对 NE 所致收缩的影响 肌条在正常 Krebs 液内平衡 2 h 后, 在浴槽内加入 NE 10 μmol/L。当肌条收缩曲线平稳后, 按前法实

验。结果见 Fig 1。经计算得 Nim 对 NE 所致收缩的抑制强度 IC₅₀ = 20 μmol/L。

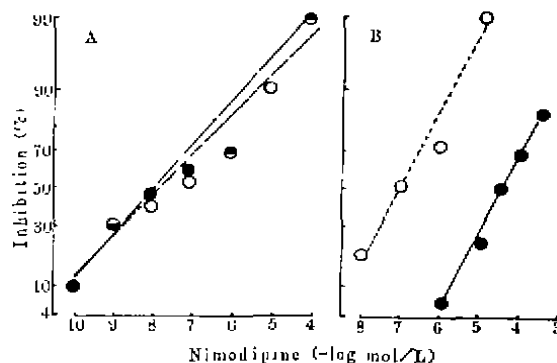


Fig 1. Inhibitory effects of nimodipine on KCl-induced (A, n=5) and NE-induced (B, n=6) contraction and ⁴⁵Ca influx in the rat aorta. (○) ⁴⁵Ca influx; (●) contraction.

Nim 对 NE 的两种收缩成分的影响 将取自同一大鼠胸主动脉的两个肌条, 一个用作对照, 另一个用做钙拮抗的试验。两者同时加入 NE 10 μmol/L, 使在正常 Krebs 液中的肌条出现快速而明显的收缩。当收缩达高峰后, 用无 Ca²⁺Krebs 液洗 3 次并稳定 30 min, 然后再给同剂量的 NE, 待收缩高峰时加入 CaCl₂ 2.5 mmol/L 以恢复原 Krebs 液的 Ca²⁺ 浓度, 肌条继续收缩并达峰值, 再用无 Ca²⁺ Krebs 液洗 3 次, 然后分别在对照肌条的浴槽内加入溶媒 0.1 ml, 实验肌条的浴槽内加入钙拮抗剂, 接触 30 min 后, 重复给予 NE 和 CaCl₂, 以比较用不同的钙拮抗剂处理后对 NE 两种收缩成分的影响。在用钙拮抗剂处理前, 对照组与实验组之间, NE 引起的两种收缩成分的张力无差异 (P > 0.05), 表明在用药前两组肌条对 NE 的敏感性相同。用钙拮抗剂处理后的结果见 Tab 1, Ver 显著地抑制 NE 的两种收缩成分, 而 Nim 只显著抑制 CaCl₂ 所致的收缩成分 (P < 0.01), 对加入 NE 时的收缩虽有作用, 但不显著 (P > 0.05)。

Nim 对 ⁴⁵Ca 内流的影响 为检验国产 ⁴⁵Ca 用于血管平滑肌钙内流实验的可靠性,

Tab 1. Effects of verapamil (10 $\mu\text{mol/L}$) and nimodipine (10 $\mu\text{mol/L}$) on Ca^{2+} -dependent contraction evoked by NE (10 $\mu\text{mol/L}$) in rat aortic strips. $n=5$; $\bar{x} \pm \text{SD}$; * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control.

	Contractility (mg)	
	NE	CaCl_2
Control	57 \pm 20	110 \pm 36
Verapamil	21 \pm 11***	63 \pm 33**
Control	45 \pm 26	81 \pm 43
Nimodipine	16 \pm 12*	41 \pm 22***

我们首先进行了方法学的研究。在静息状态时,随着血管平滑肌与 ^{45}Ca 孵育时间的延长, ^{45}Ca 内流量增加显著($P < 0.01$);高 K^+ 和NE都能明显增加标本孵育5min时 ^{45}Ca 内流量($P < 0.01$);Ver虽不影响静息细胞的 ^{45}Ca 内流量,却明显阻滞经高 K^+ 或NE兴奋时的 ^{45}Ca 内流量($P < 0.01$ 及 $P < 0.05$),结果见图2,与文献报道的同类结果^(3,4)接近,表明本方法可靠。

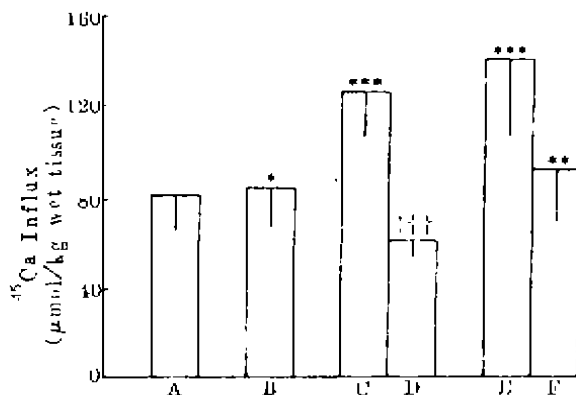


Fig 2. Effects of different treatments on ^{45}Ca influx in 5 min. A) Basic ^{45}Ca influx, $n=31$; B) Verapamil 0.1 mmol/L, $n=4$; C) KCl 160 mmol/L, $n=20$; D) KCl + Verapamil 0.1 mmol/L, $n=4$; E) NE 0.01 mmol/L, $n=15$; F) NE + Verapamil 0.1 mmol/L, $n=4$; * $P > 0.05$, *** $P < 0.01$ vs A); ** $P < 0.01$ vs C); ** $P < 0.05$ vs E).

1 Nim对静息细胞 ^{45}Ca 内流量的影响
实验组血管先分别用Nim 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 预处理

10 min后再与 ^{45}Ca 接触5 min并测定 ^{45}Ca 内流量($\mu\text{mol/kg wet tissue}$)分别为 95 ± 31 ($n=5$)和 92 ± 14 ($n=9$)与对照相比 $P > 0.05$ 。

2 Nim对高 K^+ 兴奋细胞 ^{45}Ca 内流量的影响
实验组血管先用不同浓度的Nim预处理10 min后,对照组和实验组血管均置于含 ^{45}Ca 的高 K^+ 去极化Tris缓冲液内孵育5 min,再测定细胞 ^{45}Ca 内流量,并计算不同浓度Nim对 ^{45}Ca 内流的抑制%,结果见图1, Nim对 ^{45}Ca 内流的抑制强度 $\text{IC}_{50} = 30$ nmol/L,与对肌收缩的抑制强度相近,将两者进行相关分析, $r = 0.98$ ($P < 0.02$),表明两者的相关性很密切。

3 Nim对NE兴奋细胞 ^{45}Ca 内流量的影响
实验组血管先用不同浓度的Nim预处理10 min后,对照组和实验组血管均置于含 ^{45}Ca 和NE 10 $\mu\text{mol/L}$ 的Tris缓冲液内孵育5 min,再测定细胞 ^{45}Ca 内流量,并计算不同浓度Nim对 ^{45}Ca 内流的抑制%,结果见图1, Nim对 ^{45}Ca 内流的抑制强度 $\text{IC}_{50} = 60$ nmol/L,这比其对NE所致肌收缩的抑制强

DISCUSSION

Nim对大鼠主动脉的作用未见文献报道。本工作表明,Nim明显抑制高 K^+ 去极化所致的主动脉平滑肌收缩,而抑制NE所致主动脉平滑肌收缩的作用较弱,提示Nim对电压依赖性钙通道(potential-dependent calcium channels, PDC)的抑制强于对受体操纵性钙通道(receptor-operated calcium channels, ROC),与Towart等⁽⁸⁾在兔胸主动脉上的结果相符。 ^{45}Ca 流动测定法是一种分析钙拮抗剂对细胞膜上钙通道作用的灵敏方法,已被成功地用于研究多种钙拮抗剂的作用机理⁽⁶⁾,而EGTA 2 mmol/L的冰冷生理液不仅能有效地去除细胞外非特异结合 Ca^{2+} ,而且比 La^{3+} 更有效地保存已流入细胞的 ^{45}Ca ⁽⁷⁾。我们的结果表明,Nim不影响静息细胞的 ^{45}Ca 内

流,却明显抑制高 K^+ 和 NE 兴奋时的 ^{45}Ca 内流,且对前者抑制强于后者,提示 Nim 不影响渗漏性(Leak)钙通道,却明显抑制 PDC 和 ROC,而对前者的作用更强.与用同类方法研究其它钙拮抗剂所得结论⁽⁶⁾相符.由于高 K^+ 去极化所致肌收缩完全依赖于胞外 Ca^{2+} 内流,而 NE 所致的肌收缩还涉及胞内结合 Ca^{2+} 的释放⁽⁹⁾,这可能是 Nim 抑制高 K^+ 所致 ^{45}Ca 内流与抑制收缩作用呈正相关,而抑制 NE 所致 ^{45}Ca 内流比抑制收缩强的原因.

为研究 Nim 对细胞的作用部位,我们还观察了其对于 NE 两种收缩成分的影响并与 Ver 进行比较.结果 Ver 同时抑制 NE 所致的两种收缩成分 与其它作者在兔胸主动脉所得 Ver 只抑制 NE 依胞内 Ca^{2+} 收缩而不抑制 NE 依胞外 Ca^{2+} 收缩的结果⁽¹⁰⁾不同,这可能是大鼠胸主动脉上的 ROC 对钙拮抗剂比兔胸主动脉更敏感所致⁽⁶⁾,而 Nim 则对 NE 依胞内 Ca^{2+} 收缩的抑制作用不显著,与文献⁽¹¹⁾报道同类药硝苯啶的结果相同.1,4-双氢吡啶类钙拮抗剂的作用部位是否只在胞膜值得探讨.

ACKNOWLEDGMENTS 河北医学院药化教研室张婧群老师赠送尼莫地平,本室徐端正主任技师指导实验资料统计工作

REFERENCES

- 1 Kazda S, Towart R. Differences in the effects of the calcium antagonists nimodipine (BAY e 9736) and bencyclan on cerebral and peripheral vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1980; 72 : 582 P
- 2 Towart R. The selective inhibition of serotonin-

induced contractions of rabbit cerebral vascular smooth muscle by calcium antagonistic dihydropyridines, An investigation of the mechanism of action of nimodipine. *Circ Res* 1981; 48 : 650

- 3 Godfraind T. Calcium exchange in vascular smooth muscle, action of noradrenaline and lanthanum. *J Physiol (Lond)* 1976; 260 : 21
- 4 van Breemen C, Hwang O, Meisneri KD. The mechanism of inhibitory action of diltiazem on vascular smooth muscle contractility. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 218 : 459
- 5 Broekaert A, Godfraind T. A comparison of the inhibitory effect of cinnarizine and papaverine on the noradrenaline- and calcium-evoked contraction of isolated rabbit aorta and mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol* 1979; 53 : 281
- 6 Flaim SF. Comparative pharmacology of calcium blockers based on studies of vascular smooth muscle. In: Flaim SF, Zelis R, eds. *Calcium blockers: Mechanisms of action and clinical applications*. Baltimore : Urban & Schwarzenberg, 1982 : 155-78.
- 7 van Breemen C, Aaronson PI, Cauvin CA, Loutzenhiser RD, Mangel AW, Saida K. The calcium cycle in arterial smooth muscle. *Ibid* 53-63
- 8 Towart R, Kazda S. the cellular mechanism of action of nimodipine (BAY e 9736), a new calcium antagonist *Br J Pharmacol* 1979; 67 : 409 P
- 9 Hudgins PM, Weiss GB. Differential effects of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by norepinephrine, histamine and potassium. *J Pharmacol Exp Ther* 1968; 159 : 91
- 10 Chen SH, Hu CJ. Action of dauricine on aortic strips. *Acta Pharmacol Sin* 1982; 3 : 178
- 11 Wilson C, Cooper SM, Buckingham RE, Clapham JC. α_1 -Adrenoceptor-mediated contraction of rabbit mesenteric artery : A role for intra- and extracellular calcium pools. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 9 : 401

Instructions to authors

Please read *Acta Pharmacol Sin* 1990 Jan; 11 (1) : 1-6
Ann Intern Med 1988 Feb; 108 (2) : 258-65
Br Med J 1988 Feb 6; 296 (6619) : 401-5