

维拉帕米增强猴肾上皮细胞低密度脂蛋白受体活性

刘乃丰 (南京铁道医学院心血管病研究室, 南京210009, 中国)

R 965.2

Enhancement on expression of LDL receptors in cultured rhesus renal epithelial cells by verapamil

LIU Nai-Feng (Cardiovascular Division, Nanjing Railway Medical College, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT In order to investigate the anti-atherogenic properties of calcium antagonists, human serum low density lipoproteins (LDL) were isolated by density gradient ultracentrifugation and iodinated with ^{125}I by iodine monochloride method. Effects of verapamil on activity of LDL receptors in cultured rhesus renal epithelial cells were examined by radioligand analysis. The receptor-mediated binding, internalization, and degradation of cultured cells pretreated with verapamil $4.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h and cells pretreated for 24 h and incubated for 10 h with verapamil were increased compared with control group (61 ± 11 , 52 ± 8 vs 20 ± 3.5 , 1006 ± 106 , 579 ± 124 vs 253 ± 78 , 630 ± 43 , 541 ± 4.6 vs 374 ± 53 ^{125}I -LDL/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ cell protein). In verapamil-treated cells without verapamil pretreatment, increased internalization and degradation were not significant, and binding was not increased. When the cells were pretreated with verapamil $22 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 24 h and then incubated with 5, 20, 50 ^{125}I -LDL/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, binding and internalization were increased, increased degradation was seen only with 50 ^{125}I -LDL/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The results indicated that the verapamil enhances expression of LDL receptor in cultured rhesus renal epithelial cells, which might contribute to the protective effects of calcium antagonists in experimental and human atherosclerosis.

KEY WORDS verapamil; LDL lipoproteins; LDL receptors; cultured cells; iodine radio-isotopes; radioligand assay

A 摘要 本文用放射配体法观察了维拉帕米(Ver)对恒河猴肾上皮细胞 LDL 受体活性的影响,发现 Ver 以浓度和时间依赖的方式明显增强受体介导的结合和内移过程,对降解的影响不显著。Ver 作用浓度为 $44 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 效应最明显。

关键词 维拉帕米; 低密度脂蛋白; 低密度脂蛋白受体; 培养细胞; 核素碘; 放射配基测定

~~钙拮抗剂~~
钙拮抗剂延缓及阻止动物和人的早期动脉粥样硬化发展, 主要与保护内皮完整性、抑制动脉平滑肌细胞增殖及动脉壁基质合成、减少细胞钙离子过度负荷及改善细胞脂质代谢有关^(1,2)。Ver 可明显减少饲胆固醇家兔胸主动脉中胆固醇含量, 但对血脂水平无明显影响⁽³⁾, 这可能涉及到细胞水平低密度脂蛋白(LDL)受体途径代谢的变化, 尤其是 LDL 受体介导的入胞及从动脉壁间质清除胆固醇酯的过程增强。以放射配体法探讨 Ver 对恒河猴肾上皮细胞(MA 细胞) LDL 受体活性的影响, 尚未见报道。本文旨在阐明钙拮抗剂抗动脉粥样硬化的机制。

MATERIALS AND METHODS

人血清脂蛋白的分离和纯度鉴定⁽⁴⁾ 取空腹12 h 的正常人混合血清, 用固体 KBr 调密度, 形成单个不连续的密度梯度, 用 RPV-50T 型垂直转头, 日立 SCP-85H 型超速离心机, 10°C , $206\,800 \times g$, 离心150 min, 分部收集各层脂蛋白并经聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定纯度, 证实为单一区带, 无脂蛋白间的混杂。再经

Received 1992-06-23

Accepted 1993-11-08

透析、浓缩、测脂蛋白含量及除菌过滤后4℃保存备用。

细胞培养 恒河猴胚肾上皮细胞 (rhesus renal epithelial cells) 由本校微生物学教研室惠赠, 实验用40-50代, 常规单层培养于含10%小牛血清的 Eagle MEM 培养液中。

LDL 核素标记和鉴定¹⁴ 用 IC1 法将 LDL 标记成¹²⁵I-LDL, 透析和凝胶过滤柱层析法纯化标记物, 放射性活度2.55-6.66 GBq/g LDL, 游离碘含量0.13-1.9%, 脂质标记率<1%, 受体结合试验证明保留生物活性。

LDL 受体活性测定 按 Goldstein 的 LDL 受体活性测定法¹⁵进行。每次实验均取细胞代次及生长状态相同的细胞随机分组, 每培养瓶含 MA 细胞约5×10⁶个, 接近汇合时开始实验, 实验组加 Ver (上海天丰药厂产品, 为 pH 4-6 的盐酸无菌水溶液) 22-44 mmol·L⁻¹, 对照组加入相同容量的 pH 4-6 无菌生理盐水。每次实验均取4复管, 用平行管加过量非标记 LDL 的方法测算受体特异性结合、摄入和降解值。LDL 结果以 μg·g⁻¹细胞蛋白表示, F 检验显著性, Q 检验进行各组均数间的相互比较。

RESULTS

猴肾上皮细胞 LDL 放射受体分析 细胞与浓度递增的放射性配体共同培育进行饱和试验, 可测得细胞 LDL 受体特异性结合 LDL 的浓度效应曲线, 呈可饱和性指数曲线图形。用 Woolf 法和最小二乘法直线回归处理受体特异性结合数据可得一直线方程, $\hat{Y} = 0.4161 + 0.0234X$, 由此可测算出该受体37℃时最大高亲和性结合 (B_{max}) LDL 为43 μg/g 细胞蛋白, 表观亲合常数 (K_m) 为17.8 mg·L⁻¹。

Ver 影响 LDL 受体活性浓度 在11-44 mmol·L⁻¹的浓度范围内, Ver 的作用随浓度增加而增加, 呈浓度依赖性, 浓度为44 mmol·L⁻¹时作用显著, 此后浓度增加作用反而减弱 (Fig 1)。

Ver 温育不同时间对 LDL 受体活性影响 Ver 44 mmol·L⁻¹ 预温育细胞24 h能显著增加受体特异性结合, 内移和降解值 ($P < 0.05$),

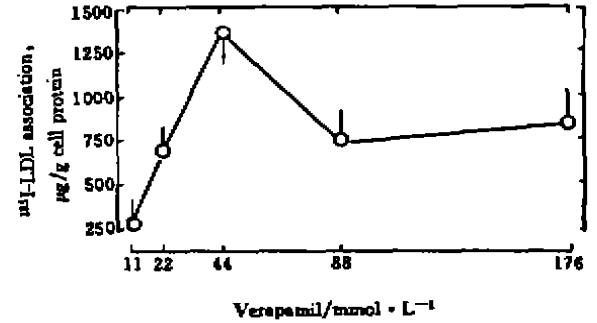


Fig 1. Effect of verapamil on association of ¹²⁵I-LDL by MA cells.

但预温育细胞24 h后再以相同浓度 Ver 继续温育10 h, 结合、内移和降解值不仅无继续增加, 反比仅预温育组有所减少, 但仍明显高于对照组 ($P < 0.05$). 仅用 Ver 温育10 h 而无预温育, 对结合过程几乎无影响, 内移和降解过程与对照组相比无显著增加 ($P > 0.05$, Tab 1).

Tab 1. Effect of Ver on binding, internalization, and degradation of ¹²⁵I-LDL by rhesus renal epithelial cells pretreated with Ver 44 mmol·L⁻¹ for 24 h and/or incubated with Ver 44 mmol·L⁻¹ for 10 h. * $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$ vs drug-free group.

Pretreated with Ver for 24 h	Incubated with Ver for 10 h	Binding	Internalization Degradation (¹²⁵ I-LDL/μg·g ⁻¹ cell protein)	
No	No	20±3.5	253±78	374±53
44 mmol·L ⁻¹	No	61±11 ^b	1006±106 ^b	630±43 ^b
No	44 mmol·L ⁻¹	20±0.6 ^a	383±49 ^a	449±63 ^a
44 mmol·L ⁻¹	44 mmol·L ⁻¹	52±8 ^b	579±124 ^b	541±46 ^b

Ver 对不同放射配体浓度 LDL 受体活性的影响 先与 Ver 22 mmol·L⁻¹ 温育24 h后, 分别用5, 20和50 mg ¹²⁵I-LDL·L⁻¹ 三种放射配体浓度测定 LDL 受体活性, 结合和内移值明显增加, 对降解过程影响不显著 (Fig 2)。

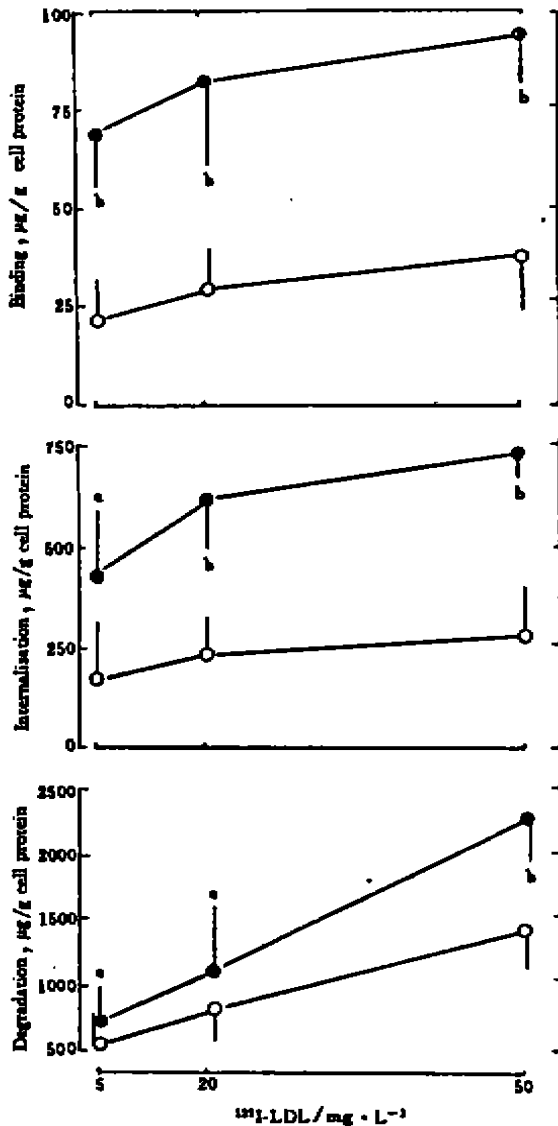


Fig 2. Effect of verapamil (●) on ¹²⁵I-LDL binding internalization, and degradation of ¹²⁵I-LDL by MA cells pretracted with Ver 22 mmol · L⁻¹ and then incubated with ¹²⁵I-LDL. *P > 0.05, †P < 0.05, ‡P < 0.01 vs control group (○).

DISCUSSION

Ver 可明显减慢动脉粥样硬化的进展速度和减少新动脉粥样硬化病灶的出现, 较多病例

出现病变的消退^[6]. 其作用机制包括许多方面^[2], 增强 LDL 受体活性是钙拮抗剂抗动脉粥样硬化作用机制之一. Ver 增强 LDL 受体介导的 LDL 入胞作用, 缩短 LDL 在细胞外间质停留的时间, 减少 LDL 被修饰为致动脉粥样硬化作用较强的修饰脂蛋白的机会. 另一方面有助于将细胞外胆固醇酯转移至细胞内降解, 增强其清除过程^[7].

Ver 增强 LDL 受体活性的机制尚未最后阐明. 不同钙拮抗剂的作用也不相同, 钙拮抗剂共有的阻断电压依赖性钙通道作用在此不起作用. Ver 增强 LDL 受体活性主要是受体数目增加, 而不是亲和力增加. Ver 50-100 mmol · L⁻¹ 可使 [³⁵S] 甲硫氨酸参入人皮肤成纤维细胞 LDL 受体蛋白的量增加 2.5 倍, 但不影响整个细胞蛋白的合成及 LDL 受体的半寿期^[8]. 进一步研究表明, Ver 可增加 LDL 受体 mRNA 的含量从而增加受体蛋白合成及受体的数目^[9]. 从 LDL 受体 mRNA 的增加直至受体数目增加并表达生物活性需要一定的时间过程, 一般 Ver 需作用 24-48 h, 效应才较明显, 而预处理 24 h 后, 既使不用 Ver 继续处理, 仍有很明显的上调 LDL 受体活性的作用^[10], 这可解释本文 Ver 预处理和未经预处理组作用的明显差别, 至于 Ver 何以增加 LDL 受体 mRNA 的表达有待探讨.

REFERENCES

- Weinstein DB, Heider JG. Antiatherogenic properties of calcium antagonists. *Am J Cardiol* 1987; **59**: 163B-72B.
- Schmitz G, Hankowitz J, Kovacs EM. Cellular processes in atherogenesis: potential targets of Ca²⁺ channel blockers. *Atherosclerosis* 1991; **88**: 109-32.
- Stender S, Ravn H, Haugegaard M, Kjeldsen K. Effect of verapamil on accumulation of free and esterified cholesterol in the thoracic aorta of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1986; **61**: 15-23.
- Liu NF. Isolation by density gradient ultracentrifugation and radiiodination of human serum low density lipopro-

- ten. *Railway Med J* 1990; **18**: 264-5.
- 5 Liu NF, Huang YW, Lou DA, Hu CR. An experimental study of glucosylated low density lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Chin J Cardiol* 1990; **18**: 353-6.
- 6 Kober G, Schneider W, Kaltenbach M. Can the progression of coronary sclerosis be influenced by calcium antagonists? *J Cardiovasc Pharmacol* 1989; **13** Suppl 4: 2-6.
- 7 Keogh AM, Schroeder JS. The antiatherogenic effects of calcium antagonists. *Am J Hypertens* 1991; **4**: 512S-8S.
- 8 Filipovic I, Buddecke E. Calcium channel blockers stimulate LDL receptor synthesis in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; **136**: 845-50.
- 9 Eckardt H, Filipovic I. Calcium antagonists increase the amount of mRNA for the low density lipoprotein receptor in skin fibroblasts. *Artery* 1991; **18**: 168-83.
- 10 Stein O, Leitersdorf E, Stein Y. Verapamil enhances receptor-mediated endocytosis of low density lipoproteins by aortic cells in culture. *Arteriosclerosis* 1985; **5**: 35-44.

86-188

24

美西律对大鼠背根神经节细胞钠电流的抑制作用¹

张旭峰, 王天佑, 张 莉 (北京市神经外科研究所, 北京100050, 中国)

R965.2

Inhibition of mexiletine on sodium current in dorsal root ganglion neurons of rats

ZHANG Xu-Feng, WANG Tian-You, ZHANG Li (Beijing Neurosurgical Institute, Beijing 100050, China)

ABSTRACT Using whole-cell configuration of patch clamp technique we found that mexiletine (Mex) reversibly inhibited the sodium current in a voltage- and use-dependent manner in cultured dorsal root ganglion (DRG) neurons. The threshold concentration of Mex was 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The inhibitory action heightened with increasing concentrations of Mex. Complete inhibition was achieved at 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and the 50% inhibition concentration was 31 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. It is suggested that the inhibition of Mex on sodium current in neurons may be one of the mechanisms of its anti-ischemic and anti-anoxic effects on the neuron.

KEY WORDS mexiletine; sodium channels;

Received 1992-08-06

Accepted 1993-04-15

¹ This work was finished in the Laboratory of Neurophysiology, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

spinal ganglia; cultured cells

A 摘要 应用膜片钳技术, 全细胞钳位方式可见 Mex 对大鼠背根神经节细胞 Na^+ 电流有明显的抑制作用。其临界作用浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 50% 抑制浓度为 31 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 完全抑制浓度为 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其抑制作用具有电压和频率依赖性。抑制剂量与小鼠抗脑缺血缺氧作用量相近。提示 Mex 抗脑缺血缺氧作用的机制之一可能是通过对 Na^+ 电流的抑制。

关键词 美西律; 钠通道; 脊神经节; 培养的细胞

美西律 (mexiletine, Mex) 系 IB 类抗心律失常药, 并有止痛^[1] 和抗惊厥^[2] 的作用, 对小鼠脑缺血缺氧还有保护作用^[3]。Mex 对心肌及外周神经作用的共同特点是抑制 Na^+ 内流, 增加膜稳定性^[4], 但尚未见到对神经细胞作用的报道。本实验旨在研究 Mex 对神经细胞 Na^+ 通道的作用, 了解其抗脑缺血缺氧作用的机制。

MATERIALS AND METHODS

药物 盐酸美西律, 常州第三制药厂, 批号