

- 5 Jin GZ, Xu SX, Yu LP. Different effects of enantiomers of tetrahydropalmatine on dopaminergic system. *Sci Sin [B]* 1986; 29 : 1054-64.
- 6 Jin GZ, Wang XL, Shi WX. Tetrahydroprotoberberine—a new chemical type of antagonist of dopamine receptors. *Sci Sin [B]* 1986; 29 : 527-34.
- 7 Shi WX, Chen Y, Jin GZ. Effect of (-)-stepholidine on rotational behavior in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1984; 5 : 222-5.
- 8 Roth RH, Wolf ME, Deutch AY. Neurochemistry of midbrain dopamine systems. In: Meltzer HY, editor. *Psychopharmacology* New York: Raven, 1987 : 81-91.
- 9 Jin GZ, Han YR, Gonon FG, Yu LP, Xei Y, Xia Y. Inhibition of (-)-stepholidine on feedback regulation of striatal presynaptic DA receptor. *Chin J Physiol Sci* 1991; 7 : 195-203.
- 10 Huang KX, Sun BC, Jin GZ. (-)-stepholidine: a dopamine receptor antagonist shows agonistic effect on rotational behavior in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Acta Pharmacol Sin* 1992; 13 : 17-22.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1992 Sep; 13 (5) : 445-448

④ 445-448
山莨菪碱对兔离体胸主动脉平滑肌的钙拮抗作用

陈锦明、张明志¹、谷淑玲、张光毅¹ (徐州医学院药理教研室, 徐州 221002, 中国) R 965.1

Calcium antagonism of anisodamine on isolated rabbit thoracic aorta

CHEN Jin-Ming, ZHANG Ming-Zhi¹, GU Shu-Ling, ZHANG Guang-Yi¹
 (Department of Pharmacology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

ABSTRACT Anisodamine (Ani) or verapamil (Ver) relaxed the contracted thoracic aortic strips induced by CaCl₂ and KCl in a noncompetitive manner with pD₂' 3.6 and 5.8, respectively. Ani 50 μmol · L⁻¹ and Ver 1 μmol · L⁻¹ inhibited the intracellular Ca²⁺-dependent component of norepinephrine-induced contraction of aorta, but Ani 0.1 mmol · L⁻¹ did not decrease the extracellular Ca²⁺-dependent component.

In the presence of Ca²⁺, Ani 2.3 μmol · L⁻¹ inhibited the proliferation of aortic smooth muscle cells. In the absence of Ca²⁺, the effect induced by Ani was biphasic-stimulatory at 2.3 μmol · L⁻¹ concentrations and inhibitory at 61.7 μmol · L⁻¹ concentrations.

These results suggest that Ani, similar to

Ver, mainly inhibits the potentially operated calcium channels.

KEY WORDS atropine derivatives; verapamil; thoracic aorta; drug dose-response relationship; vascular smooth muscle; cultured cells

提要 Ani, Ver 对 CaCl₂ 和 Ani 对 KCl 所致兔胸主动脉条收缩的 pD₂' 分别为 3.6, 5.8 和 3.6. Ani 50 μmol · L⁻¹ 能抑制 NE 引起细胞内 Ca²⁺ 释放所致收缩的 21 ± 7%. Ani 0.1 mmol · L⁻¹ 对 NE 引起细胞外 Ca²⁺ 内流的收缩无影响. Ani 2.3 μmol · L⁻¹ 对有 Ca²⁺ 胸主动脉平滑肌细胞培养增殖有抑制, 对无 Ca²⁺ 培养, Ani 61.7 μmol · L⁻¹ 也能抑制其增殖. 提示 Ani 对 Ca²⁺ 有拮抗作用.

关键词 阿托品衍生物; 维拉帕米; 胸部动脉; 药物剂量-效应关系; 血管平滑肌; 培养细胞 山莨菪碱 平滑肌.

山莨菪碱(anisodamine, Ani)能对抗乙酰胆碱所致平滑肌痉挛, 也能解除血管痉挛, 改善微循环, 一般认为与阻断 M 受体和 α 受体有关⁽¹⁾. 我们曾在离体兔耳血管灌流中, 观察到 Ani 能拮抗去甲肾上腺素的作用⁽²⁾. Ani 有拮抗钙的作用⁽³⁾. 本文研究 Ani 对家兔离体胸主动脉平滑肌作用与 Ca²⁺ 的关系.

Received 1991-07-29

Accepted 1992-04-23

¹ Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China.

MATERIALS AND METHODS

大耳白兔, 雌雄兼用, 2.5 ± 0.3 kg, 由本校实验动物中心供给。山莨菪碱(北京制药一厂); 维拉帕米(verapamil, Ver, 东北制药一厂); 去甲肾上腺素(norepinephrine, NE, 广州明兴制药厂); CaCl_2 (上海兴塔化工厂), 经 105°C 烤至恒重。细胞生长液: 于 Eagle (Gibco)培养基中加入 10-20%新生胎牛血清(中国医科院天津血研所), *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2'-ethanesulphonic acid (HEPES, E Merck) $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, NaHCO_3 $14 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 谷氨酰胺 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和青霉素 $100 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$, 链霉素 $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, pH 7.2. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] Sigma 公司产品, 用磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)配成 $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 溶液, 再用直径 $2.2 \mu\text{m}$ 滤孔的滤膜过滤除菌, 4°C 避光保存。

家兔放血处死, 取出胸主动脉(TA)将其剪成螺旋形 $3 \times 30 \text{ mm}$ 肌条, 置于无 Ca^{2+} Krebs-Henseleit (K-H)溶液的 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的 15 ml 浴槽中, 通 $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$, pH 7.4 ± 0.5 。肌条负荷 2 g , 连接于张力换能器, 平衡 2 h 。用 XWT 台式自动平衡记录仪记录。

取兔 TA 平滑肌细胞(ASMC)作细胞培养^[4]。取 4-5 代细胞于含 0.5% 胎牛血清无 Ca^{2+} 的 Eagle 培养液中培养 56 h , 使其同步化于静止期。采用 MTT 比色法^[5]作 ASMC 增殖测定, 按 $(5-10) \times 10^4 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 细胞密度接种于 55 孔平底培养板上, 每孔 $100 \mu\text{l}$ 。 37°C 培养过夜。用无 Ca^{2+} , Mg^{2+} -Hank 氏液洗 3 遍, 加入 Ani 于有或无 Ca^{2+} Eagle 培养液 $100 \mu\text{l}$ 中, 继续培养 72 h 。然后加入 MTT 溶液 $10 \mu\text{l}$, 继续培养 4 h 。吸弃培养液, 每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 酸化异丙醇(含 HCl $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 充分混匀至紫蓝色甲(formazon)结晶完全溶解。 1 h 内用 GXM-202 型酶标分光光度计于 570 nm 和 630 nm 分别测定吸收率(*A*)作为细胞增殖的指标。每个药物浓度各设 4 个培养孔。

RESULTS

Ani 对 CaCl_2 所致 TA 收缩的影响 在无

Ca^{2+} 的 K-H 液中平衡后, 加入高 K^+ (KCl $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)使肌条去极化。 15 min 后按累积浓度加入 CaCl_2 $0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作量-效曲线。比较给 Ani 或 Ver 前后的变化, 结果 Ani 与 Ver 能使 CaCl_2 所致 TA 的收缩减弱(Fig 1), 呈非竞争性拮抗, 它们的 pD'_2 分别为 3.6 与 5.8 。

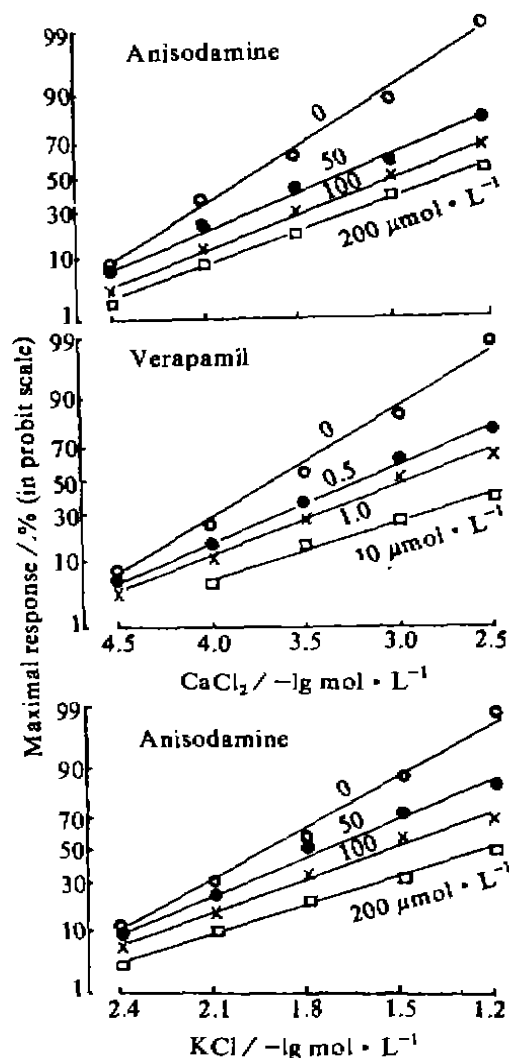


Fig 1. Effects of anisodamine and verapamil on rabbit thoracic aortic strips contraction induced by CaCl_2 and KCl . $n=5, \bar{x} \pm s$.

Ani 对 KCl 所致 TA 收缩的影响 先给 KCl $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 试验 TA 活性, 然后洗去, 稳定 10 min. 用累积加入 KCl 4, 8, 16, 32, $64 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 获得 KCl 的量-效曲线后, 冲洗 TA 使反应至基线, 稳定 10 min. 分别加入 Ani $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 0.1 和 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 重复上述 KCl 的量-效曲线. Ani 使 KCl 所致 TA 收缩减弱(Fig 1), 表现非竞争性拮抗, 其 pD'_2 为 3.6.

Ani 对 NE 引起 TA 细胞内 Ca^{2+} 释放和细胞外 Ca^{2+} 内流所致收缩的影响 参考文献⁽⁶⁾ 方法, TA 在 K-H 液中平衡 90 min 后, 用无 Ca^{2+} K-H 液冲洗 3 次, 并在此液中平衡 10 min. 然后加入 NE $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, TA 出现快而短暂收缩(细胞内 Ca^{2+} 释放的收缩反应), 此时再加 CaCl_2 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, TA 出现慢而持久收缩(细胞外 Ca^{2+} 内流所致的收缩). 用 K-H 液冲洗之, 待 TA 恢复正常张力后, 换上 Ani 或 Ver 的无 Ca^{2+} K-H 液, 15 min 后, 重复上述步骤. 结果 NE 引起内 Ca^{2+} 释放收缩: 在给 Ani $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后, 使 TA 收缩减少 $21 \pm 7\%$ ($n=7$), 给 Ani $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使其收缩减少 $39 \pm 8\%$ ($n=7$); 给 Ver $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使其收缩减少 $21 \pm 7\%$ ($n=5$), 给 Ver $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使其收缩减少 $48 \pm 8\%$ ($n=5$). NE 引起细胞外 Ca^{2+} 内流所致收缩: Ani $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使 TA 收缩减少 $7 \pm 5\%$ ($n=7$), 给 Ani $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使其收缩减少 $6 \pm 6\%$ ($n=7$); 给 Ver $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使其收缩减少 $16 \pm 7\%$ ($n=5$), 给 Ver $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 使其收缩减少 $50 \pm 13\%$ ($n=5$). 由此可见 Ani 两个浓度对 NE 引起内 Ca^{2+} 释放所致 TA 收缩有抑制作用($P < 0.01$). 对 NE 引起细胞外 Ca^{2+} 内流所致 TA 收缩影响小; Ver 两个浓度对 NE 引起的两种收缩成分均有明显抑制作用($P < 0.01$).

Ca^{2+} 对 ASMC 增殖的影响 ASMC 在含有不同浓度 Ca^{2+} 培养液中培养 72 h 后, 用

MTT 比色法测定各培养孔中细胞增殖的变化. 结果 Ca^{2+} 能刺激 ASMC 增殖, 呈剂量依赖性. 如以无 Ca^{2+} 培养对照组 ASMC 增殖能力为 100% 则 Ca^{2+} 的 31, 63, 125, 250 和 $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 刺激 ASMC 增殖能力为 ($\bar{x} \pm s$): 115 ± 11 , 144 ± 31 , 152 ± 29 , 156 ± 21 和 $189 \pm 31\%$.

有 Ca^{2+} 培养时 Ani 对 ASMC 增殖的影响 用 Ani $2.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 ASMC 增殖开始抑制, 并呈剂量-抑制依赖关系(Tab 1). Ani 对 ASMC 增殖的 IC_{50} 为 $920 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

无 Ca^{2+} 培养时 Ani 对 ASMC 增殖的影响 在无 Ca^{2+} Eagle 培养液中, Ani $2.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 表现刺激, 其增殖能力为无 Ca^{2+} 对照培养组的 1.61 倍. 当浓度继续增加时, 其刺激作用逐渐减弱. 至 Ani $61.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 则出现抑制作用, 并表现剂量-抑制依赖性. 当 Ani 增加至 $555.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ASMC 增殖抑制 22%, 与相同浓度有 Ca^{2+} 培养抑制 44% 相比, 显著减轻($P < 0.01$, Tab 1).

Tab 1. Effects of anisodamine on proliferation of aortic smooth muscle cells in the presence or absence of Ca^{2+} . MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], $n=4$, $\bar{x} \pm s$.

Anisodamine / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Absorbance at 570-630 nm	
	With Ca^{2+}	Without Ca^{2+}
0	0.05	0.04
2.3	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01
6.9	0.036 ± 0.004	0.06 ± 0.01
20.6	0.034 ± 0.003	0.05 ± 0.01
61.7	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
185.2	0.029 ± 0.01	0.03 ± 0.002
555.7	0.028 ± 0.01	0.025 ± 0.004

DISCUSSION

在离体血管平滑肌标本中, 用高 K^+ 开放电压依赖 Ca^{2+} 通道(PDC), 与受体激动剂激活受体操纵 Ca^{2+} 通道(ROC)进行研究, 是适合评定 Ca^{2+} 通道阻滞剂的方法⁽⁷⁾. 本实验观察

到 Ani 和 Ver 对 CaCl_2 、KCl 引起主动脉条收缩均有拮抗, 说明它们对 PDC 的抑制, 但 Ani 作用较弱且对 ROC 影响也小。在 ASMC 培养中, Ca^{2+} 能刺激 ASMC 增殖, Ani 对有 Ca^{2+} 时 ASMC 增殖表现抑制作用, 对无 Ca^{2+} 时 ASMC 增殖, Ani 的抑制程度轻, 说明 Ani 对 ASMC 的作用与细胞外 Ca^{2+} 浓度有密切关系。

因此 Ani 拮抗 Ca^{2+} 可降低血管平滑肌的收缩力或张力和抑制血管平滑肌细胞增殖。由于血管平滑肌细胞增殖是动脉粥样硬化和引起动脉管腔狭窄的关键因素⁽⁸⁾。Ani 的上述作用, 对于疏通与改善血液循环治疗心血管出现的病理变化是有利的。虽然 Ani 拮抗 Ca^{2+} 所用的剂量较大, 但临床应用有时可达到这样剂量 ($1-3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)⁽¹⁾, 这可能也是 Ani 抗休克、解除血管痉挛、改善微循环和抗心律失常作用⁽⁹⁾的机制之一。

REFERENCES

1 Yang GD, Yao XM. New concept of henbane drugs in

the treatment of septic shock. *Chin J Critical Care Med* 1984; 4 : 32-7.

2 Chen JM, Zhang JF, Mu LQ, Qin W. Effect of anisodamine on left ventricular function and blood vessel. *Acta Acad Med Xuzhou* 1984; 4 : 29-31.
 3 Tang CS, Yang XH, Wang X, Zhao Q, Su JY. Calcium antagonist effect of anisodamine (654-2). *J Beijing Med Coll* 1985; 17 : 165-8.
 4 Campbell JC, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979; 59 : 1-51.
 5 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J Immunol Methods* 1983; 65 : 55-63.
 6 Brockaert A, Godfraind T. A comparison of the inhibitory effect of cinnarizine and paraverine on the noradrenaline and calcium evoked contraction of isolated rabbit aorta and mesenteric arteries. *Eur J Pharmacol* 1979; 53 : 281-8.
 7 Hof RP, Vuorela HJ. Assessing calcium antagonism on vascular smooth muscle: a comparison of three methods. *J Pharmacol Methods* 1983; 9 : 41-52.
 8 Schwartz SM, Ross R. Cellular proliferation in atherosclerosis and hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 1984; 26 : 355-72.
 9 Chen JM, Gu SL. Antiarrhythmic effect of anisodamine. *Acta Pharm Sin* 1988; 23 : 857-9.

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 Acta Pharmacologica Sinica 1992 Sep; 13 (5) : 448-451

448-451

阿替洛尔和尼群地平单用或合用对三种高血压模型大鼠的降压作用

缪朝玉、朱铨英、杨友才、苏定冯 (第二军医大学药理学教研室, 上海 200433, 中国)

R 969.4

Antihypertensive effects of atenolol and nitrendipine alone or in combination on three hypertensive models of rats

MIAO Chao-Yu, ZHU Quan-Ying, YANG You-Cai, SU Ding-Feng
 (Department of Pharmacology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT The antihypertensive effects of

atenolol (Ate) or nitrendipine (Nit) alone or in combination (Ate+Nit) were studied in conscious experimental hypertensive rats. The hypotensive effects of single ig of Ate 20+Nit 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ were rapid and persistent in spontaneously hypertensive rats (SHR). In renovascular hypertensive rats (RVHR) and DOCA-salt hypertensive rats (DHR), Ate+Nit (6+3, 20+10, 60+30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) given ig once a day for 10 d reduced the blood pressure in a dose-dependent manner. But Ate 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ or Nit 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ alone given ig once a day for 10 d caused no obvious reduction in blood pressure in RVHR.

Received 1991-07-09

Accepted 1992-04-21