

腺苷及腺嘌呤衍生物对离体猪冠状动脉环和 主动脉平滑肌细胞增殖的影响

杨小毅 万载阳 黄红林 涂玉林 杨永宗

(衡阳医学院心血管病研究所, 衡阳 421001)

Effects of Adenosine and Its Analogues on Relaxation of Porcine Coronary Ar- teries and Proliferation of Porcine Aor- tic Smooth Muscle Cells in Culture

YANG Xiao-Yi, WAN Zai-Yang, HUANG Hong-
Ling, TU Yu-Lin and YANG Yong-Zong

(Institute of Cardiovascular Disease, Hengyang Medical Col-
lege, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT It has been recognized for many years that adenosine and adenosine 5'-monophosphat (AMP), adenosine 5'-diphosphate (ADP) and adenosine 5'-triphosphat (ATP) are potent vasoactive substances. In this paper, it was demonstrated that ATP, ADP induced endothelium dependent relaxation on isolated porcine coronary arterial rings but adenosine produced endothelium-independent relaxation on above preparations. It was also observed with MTT colorimetric assay that AMP, ADP and ATP inhibited proliferation of porcine aortic smooth muscles in dose-dependent manner, similar to adenosine. The results suggest that purine nucleoside adenoside and its analogues act as growth regulators of vascular smooth muscle cells. In addition, the clinical application of adenosine drugs was discussed in detail.

KEY WORDS AMP; ADP; ATP; Adenosine; Smooth muscle cell; Endothelium; Coronary artery

摘要 腺苷以及 AMP、ADP、ATP 等腺嘌呤衍生物是一类强有力的血管扩张剂。离体猪冠状动脉实验证明, ATP、ADP 为内皮依赖性舒张作用, 而腺苷本身

则为非内皮依赖性舒张效应。用噻唑蓝比色法观察到与腺苷一样, AMP、ADP、ATP 也能剂量依赖性抑制培养的主动脉平滑肌细胞增殖。结果表明, 腺苷以及 AMP、ADP、ATP 等腺嘌呤衍生物可能是平滑肌细胞增殖的调节因子。本文还对腺苷类药物的临床应用价值进行了讨论。

关键词 AMP; ADP; ATP; 腺苷; 冠状动脉; 内皮细胞; 平滑肌细胞

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成中起着关键作用。许多血管活性物质对 VSMC 增殖均有不同程度的调控作用。腺苷存在于心肌细胞、血管内皮细胞、肾上腺素能和嘌呤能神经元中, 具有明显的生物学活性。尽管已知腺苷以及 AMP、ADP、ATP 等腺嘌呤衍生物是一类强有力的血管活性物质, 但腺嘌呤衍生物之间对冠状动脉循环作用的差异如何^[1], 是否亦对 VSMC 增殖具有调节作用, 尚未见报道。本工作以猪冠状动脉为对象, 观察了腺苷、ADP 和 ATP 对冠状动脉的作用及与内皮的关系, 并且应用噻唑蓝比色法系统比较了 AMP、ADP、ATP 及腺苷对培养的主动脉平滑肌细胞增殖的影响, 以期对腺苷类药物的临床应用提出一些理论依据。

1 材料与方法

腺苷、AMP、ADP 和 ATP 均购自 Sigma, 5-羟色胺(serotonin, 5-HT)瑞士进口分装, 噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT]购自 Fluka。新鲜的猪冠状动脉和主动脉

取自衡阳市肉联加工厂。

1.1 离体冠状动脉实验

自屠宰现场将心脏取出后,立即置于冰冷 Kerbs-Ringer 液中,分离冠状动脉右旋支,制备成 3.5~4 mm 血管环,置于 37 °C Kerbs-Ringer 液浴槽中,通入 95% O_2 +5% CO_2 混合气,借助张力传感器,记录仪记录血管环的张力。给药前血管环在静息张力 2.0 克下平衡 2 h,先用 $1 \mu mol \cdot L^{-1}$ 5-HT 使血管环收缩,待收缩达到稳定状态后,再依次向浴槽内加入不同浓度的待测药物。记录血管环张力变化。Krebs-Ringer 液成分($mmol \cdot L^{-1}$): NaCl 118, KCl 4.8, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $NaHCO_3$ 24, Glucose^[11]。部分血管环去除内皮,以缓激肽测定其效果。

1.2 猪主动脉平滑肌细胞培养

自屠宰现场无菌取材,猪主动脉经 Hank 氏液洗涤,沿纵轴剪开,刮去内膜,剥离外膜,将中膜剪成 0.2~0.3 mm^2 小块,按贴块法^[2]接种于培养瓶内,用 20% FCS 血清的 M-199 培养。细胞长成致密层时,以 0.125% 胰蛋白酶及 0.02% EDTA 混合液消化处理后传代。实验用 5~10 代细胞。

1.3 平滑肌细胞增殖的测定

采用文献[3]方法,(5~10) $\times 10$ 细胞/L 接种于 96 孔培养板上,每孔 100 μL , 37 °C 正常培养过夜,无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -Hank 液洗三遍,根据实验要求加入用含 10% FCS 血清培养液所配制的待测药物培养液 100 μL ,继续培养 72 h,然后加入 MTT 溶液 10 μL ;继续培养 4 h,吸弃培养液;每孔加 100 μL 酸化异丙醇,并混匀呈紫蓝色甲臍(formazane)结晶完全溶解,1 h 内用 DG-3022 型酶标仪(华东电子管厂)于 570 nm 处测定吸光值 A,每个药物浓度设 6 个培养孔。

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异显著性用 t 检验。

2 结果

2.1 腺苷、ADP 和 ATP 对离体冠状动脉环的影响

当保留内皮时,三者均呈现不同程度的血管舒张效应,其中尤以 ATP 作用最强(Figure 1);当去除内皮后,三者反应差异较大,ATP 由舒张转为收缩,ADP 舒张作用取消,而腺苷仍然具有舒张作用(Figure 2)。

2.2 腺苷、AMP、ADP 及 ATP 对猪主动脉平滑肌细胞增殖的影响

如 Figure 3 所示,腺苷及其腺嘌呤衍生物对 SMC 增殖均呈现不同程度的抑制作用,且呈剂量依赖关系。

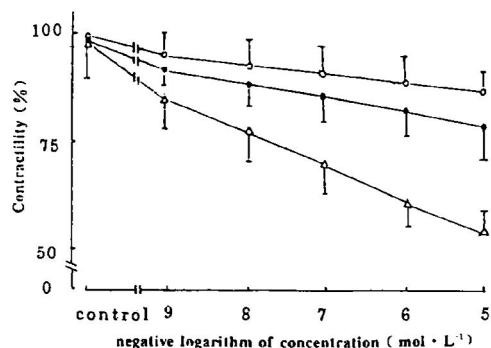


Figure 1. Effects of adenosine and its analogues on isolated porcine coronary arterial rings. (○)ADP, (●)adenosine, (△)ATP, $n=5$, $\bar{x} \pm s$.

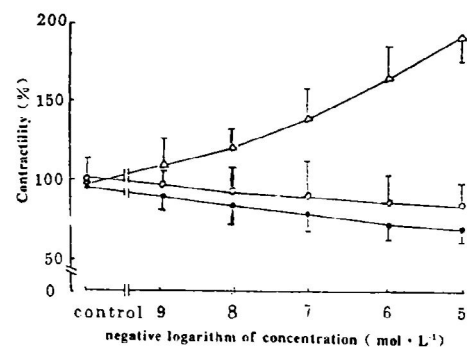


Figure 2. Effects of adenosine and its analogues on isolated porcine coronary arterial rings after denudation. (○)ADP, (●)adenosine, (△)ATP, $n=5$, $\bar{x} \pm s$.

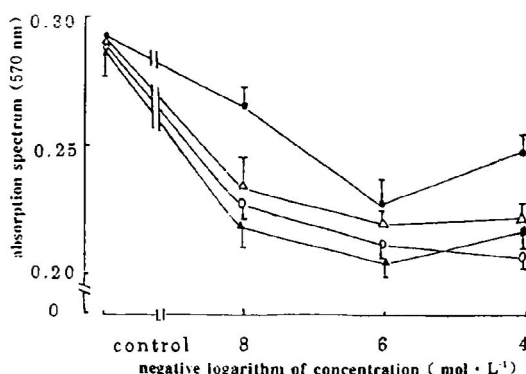


Figure 3. Effects of adenosine and its analogues on porcine aortic smooth muscle cells in culture (○)ADP, (●)adenosine, (▲)AMP.

3 讨论

本实验通过腺苷、ADP 和 ATP 对离体冠状动脉环作用的比较,在保留内皮时,三者均呈现不同程度的松弛效应。但在去内皮时,ATP 由舒张转为收缩,ADP 舒张作用取消,而腺苷仍有具有舒张作用。即 ATP、ADP 为内皮依赖性舒张冠状动脉,而腺苷本身则为非内皮依赖性舒张冠状动脉,这表明 ATP、ADP 与腺苷在舒张冠状动脉机制上有较大差异。Burnstock 等^[4]根据识别天然配基的性质将嘌呤受体分为两类: P_1 受体和 P_2 受体,前者识别腺苷和 AMP,后者识别 ATP 和 ADP。从本实验结果判断,内皮细胞上可能存在 P_2 受体。内皮细胞释放的内皮源性舒张因子(endothelium-derived relaxing factor,EDRF)介导了 ATP、ADP 的冠状动脉舒张效应。腺苷的舒张作用机理尚未完全阐明,Rose Meyer^[5]等发现腺苷对大鼠胸主动脉呈现内皮依赖性血管舒张,Toda^[6],Ramagopal^[7]等分别观察腺苷对猴、人冠状动脉诱发非内皮性依赖舒张,这与本实验所观察到腺苷对猪冠状动脉所呈现的非内皮依赖性血管舒张相吻和,表明腺苷的扩血管作用存在血管种类的差异。King^[8]报告腺苷可以通过 A_2 受体发挥作用。

药物的依内皮血管舒张的反应对冠状动脉疾病的危险性具有良好的预测作用。Vita 等^[6]用乙酰胆碱注入病人左前降支和左旋支,定量造影患者冠状动脉直径变化,同时用多元逐步回归方法分析冠心病危险因素与 Ach 反应的关系,观察到冠状动脉疾病危险因素与依赖内皮的血管舒张反应的丧失有关。血管收缩的发生意味着内皮机能异常,而这种异常要先于动脉粥样硬化斑块形成,因此,依内皮松弛血管药物所致的血管舒张反应可作为血管造影不能发现的动脉粥样硬化的早期标志。本实验通过对 ATP、ADP 及腺苷冠状动脉作用的比较,观察到 ATP、ADP 会引起冠状动脉内皮依赖性舒张,而腺苷则否。这提示若在临床上利用 ATP 或 ADP 的冠状动脉反应有可能会在较早期发

现冠状动脉的内皮功能损害以及 As。

ATP 作为能量合剂的重要成分之一,广泛用于心绞痛、心肌梗塞病人。诚然 ATP 可以提供心肌做功的能量,并且很快在体内分解为腺苷,但对于已发生内皮功能损害、动脉粥样硬化的冠心病病人而言,大量输注 ATP,同样有可能引起血管痉挛,诱发新的心绞痛及局部梗塞,这有待于进一步严格的临床观察,而腺苷的舒张冠状动脉作用与内皮保留与否无关。Wilosn^[1]曾证实腺苷冠状动脉内给药每分钟 $140 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重即可引起多数病人产生近乎最大的冠状动脉舒张,出现剂量依赖性血流增加,表明腺苷比 ATP 可能更有利于冠心病的治疗。

血管平滑肌细胞是一种高度特化的细胞,它不仅具有收缩功能,并且在动脉粥样硬化、高血压时,由于大量生长因子及细胞因子的刺激,它可由“收缩型”向“合成型”转化,形成具有较强分裂、增殖及分化能力的细胞。许多血管活性物质如血小板源性生长因子、表皮生长因子和前列腺素 E 等对 VSMC 增殖均有不同程度的调节作用。Jonzo 等^[10]用放射性自显影方法标记培养的大鼠 SMC,发现腺苷能抑制血小板源性生长因子刺激所致的 DNA 合成,本实验应用 MTT 法系统观察到 ATP、ADP、AMP 及腺苷对培养的 VSMC 增殖均呈现不同程度的抑制作用,表明腺嘌呤物质也与腺苷一样,参与了 SMC 增殖的调节,可能与腺嘌呤物质迅速代谢为腺苷有关,更详细的机制有待深入探讨。

参考文献

- 1 Wilson RF, Wyche K, Christensen BV. Effects of adenosine on human coronary arterial circulation. *Circulation*, 1990, **82**: 1 595.
- 2 Ross R. The smooth muscle cell I. Growth of smooth-muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol*, 1971, **50**: 172.
- 3 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method*, 1983, **65**: 55.
- 4 Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Bolis L, Straub RW (ed). *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multi-*

- disciplinary approach . New York: Raven Press. 107 ~ 118.
- 5 Rose Meyer RB, Hope W. Evidence that A_2 purinoceptors are involved in endothelium dependent relaxation of the rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*, 1990, **100**: 576~580.
- 6 Ramagopal MV, Chitwood RW, Mastafa SJ. Evidence for an A_2 adenosine receptor in human coronary arteries. *Eur J Pharmacol*, 1988, **151**: 483~486.
- 7 Toda N. Isolated human coronary arteries in response to vasoconstrictor substances. *Am J Physiol*, 1983, **245**: H937~941.
- 8 King AD, Milavec-Krization M, Müller-Schweinitzer E. Characterization of the adenosine receptor in porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol*, 1990, **100**: 483~486.
- 9 Vita JA, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*, 1990, **81**(2): 491~497.
- 10 Jonzon B, Nilsson J, Fredholm BB. Adenosine receptor-mediated changes in cyclic AMP production and DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 1985, **124**: 251~256.
- (本文 1995-11-12 收到)