

[文章编号] 1007-3949(2001)-04-0277-04

• 实验研究 •

# Cl<sup>-</sup> 通道在小牛血清引起的血管平滑肌细胞增殖中的作用

肖贵南<sup>1</sup>, 关永源, 贺 华(中山大学药理学教研室, 广州 510089; <sup>1</sup>广东省药品检验所, 广州 510180)[关键词] Cl<sup>-</sup> 通道阻断剂; 小牛血清; 肌, 平滑, 血管; 细胞增殖; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨 Cl<sup>-</sup> 通道在小牛血清引起的血管平滑肌细胞增殖中的作用, 采用细胞计数和氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验, 并结合 *fura-2* 荧光测定细胞浆 Ca<sup>2+</sup> 浓度等技术, 研究了 Cl<sup>-</sup> 通道阻断剂对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响。结果发现, Cl<sup>-</sup> 通道阻断剂 4,4'-二异硫氰酸二丙乙烯 2,2'-二磺酸 (DIDS, 0.01 μmol/L~0.1 mmol/L) 可抑制 5% 小牛血清引起的血管平滑肌细胞增殖, 其作用具有时效性和量效性, 其它 Cl<sup>-</sup> 通道阻断剂如茚满羟基丙酸 (IAA-94, 0.1 μmol/L~1 mmol/L)、5-硝基-2-(3-苯丙氨基)苯甲酸 (NPPB, 0.1 μmol/L~1 mmol/L)、4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸-2,2'-二磺酸 (SITS, 0.1 μmol/L~1 mmol/L)、二苯丙氨基-2,2'-二羧酸 (DPC, 0.1 μmol/L~1 mmol/L) 和速尿 (10 μmol/L~1 mmol/L) 等均无此作用, 且 DIDS 对电压依赖性钙通道没有直接的影响。结果提示小牛血清可以开放 DIDS 敏感的 Cl<sup>-</sup> 通道, 且该通道可能在小牛血清引起的血管平滑肌细胞增殖的调控上起着一定的作用。

[中图分类号] Q74

[文献标识码] A

## Role of Cl<sup>-</sup> Channels in Fetal Calf Serum Induced Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

XIAO Gui-Nan<sup>1</sup>, GUAN Yong-Yuan, and HE Hua(Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089; <sup>1</sup> Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)**MeSH** Cl<sup>-</sup> Channels Blockers; Fetal Calf Serum; Muscle, Smooth, Vascular; Proliferation; Atherosclerosis

**ABSTRACT** **Aim** To examine the role of Cl<sup>-</sup> channels in fetal calf serum (FCS) induced proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Through cell count and <sup>3</sup>H-TdR incorporation, together with [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> measurement technology of *fura-2* fluorescence, we studied the effects of Cl<sup>-</sup> channel blockers on proliferation of VSMC induced by FCS. **Re-**

**sults** Cl<sup>-</sup> channel blocker 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid (DIDS, 0.01 μmol/L~0.1 mmol/L) inhibited 5% FCS-induced increase in cell count and <sup>3</sup>H-TdR incorporation into VSMC, this inhibition was time and dose dependent. Other Cl<sup>-</sup> channel blockers such as indanyloxyacetic acid (IAA-94, 0.1 μmol/L~1 mmol/L), 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB, 0.1 μmol/L~1 mmol/L), diphenylamine-2,2'-dicarboxylic acid (DPC, 0.1 μmol/L~1 mmol/L), 4-acetamid-4'-isocyanatostilbene-2,2'-disulphonate (SITS, 0.1 μmol/L~1 mmol/L) and furosemide (10 μmol/L~1 mmol/L), however, had no obvious effects (*P* > 0.05, *n* = 7 for cell count and *n* = 8 for <sup>3</sup>H-TdR incorporation), and DIDS had no direct effect on voltage-gated calcium channel. **Conclusion** FCS can open DIDS-sensitive Cl<sup>-</sup> channel, and this channel may play an important role in modulating the proliferation of VSMC induced by FCS.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 的增殖是动脉粥样硬化及血管成型术后再狭

[基金项目] 国家自然科学基金 (项目编号 39970849)、国家科技部攀登计划 (国科基字 [1999] 045 号) 和广东省自然科学基金团队项目 (2000) 资助。

[作者简介] 肖贵南, 男, 1972 年 12 月出生, 江西省南康市人, 医学药理学硕士, 主管药师, 从事药品监督检验和药理研究工作。关永源, 男, 1946 年 1 月出生, 广东省新会市人, 教授, 博士生导师, 多次赴美国和加拿大进行合作研究, 中国药学会心血管药理专业委员会常务委员, 国务院学位委员会药理学评议组成员。

窄的基本病理变化和重要原因<sup>[1]</sup>。在多种细胞的研究结果表明<sup>[2,3]</sup>: 血清作为一种强力的促血管平滑肌细胞增殖剂, 可以开放 Cl<sup>-</sup> 通道, 并且这一作用可被某些 Cl<sup>-</sup> 通道阻断剂所阻断。近年来, Cl<sup>-</sup> 通道在某些细胞增殖上所起的重要作用<sup>[4-6]</sup> 及其在血管平滑肌的 Ca<sup>2+</sup> 调控功能<sup>[7]</sup> 日益为人们所重视。那么 Cl<sup>-</sup> 通道在小牛血清引起的血管平滑肌细胞增殖中又有何作用呢? 这方面目前国内外未见报道。本研究以小牛血清 (fetal calf serum, FCS) 为促增殖剂, 通过细胞计数和 <sup>3</sup>H-TdR 掺入实验, 并结合 *fura-2* 荧光

测定胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  浓度等技术研究了  $\text{Cl}^-$  通道阻断剂对 FCS 引起的血管平滑肌细胞增殖的影响, 试图为寻找有效的抗动脉粥样硬化药物提供新的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

Fura-2 (美国 Sigma); 茚满羧基丙酸 (indanyloxy-acetic acid, IAA-94)、5-硝基-2-(3-苯丙氨基)-苯甲酸 (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid, NPPB)、二苯丙氨基-2,2-二羧酸 (diphenylamine-2,2'-dicarboxylic acid, DPC)、4,4'-二异硫氰酸二丙乙烯 2,2'-二磺酸 (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulphonic acid, DIDS)、4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸-2,2'-二磺酸 (4-acetamidostilbene-2,2'-disulphonate, SITS) 和速尿 (英国 RBI); FCS、DMEM、DMEM/F12 (美国 Gibco); 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷 ( $^3\text{H-TdR}$ , 中国科学院上海原子能研究所);  $\text{CO}_2$  培养箱 (美国 Napco 6100); RF-5000 型荧光分光光度计 (日本 Shimadzu); 液体闪烁计数器 (美国 Beckman); 多头细胞收集仪 (海军医学研究所)。

### 1.2 血管平滑肌细胞的培养及鉴定

取 8~10 周龄大鼠, 用改良组织块接种法进行细胞培养。待细胞长成单层后进行传代培养, 所用培养基为含 10% FCS 的 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM 培养基)。倒置相差显微镜及电镜下细胞呈梭型, 有大量肌丝。免疫细胞化学方法检测  $\alpha$ -str-actin 蛋白阳性, 证实为血管平滑肌细胞, 所有的实验均采用第 5~15 代细胞。

### 1.3 血管平滑肌细胞计数及氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验

待细胞长成单层后, 消化细胞并制成密度为  $(1 \sim 2) \times 10^8$  个/L 的细胞悬液, 移入 24 孔培养板, 每孔的细胞量为 1 mL, 24 h 后换成含 0.5% FCS 的 DMEM 培养基, 同步化 48 h 后使大多数细胞阻滞于 G0/G1 期, 分组加入药物 (0.5% FCS 对照组; 5% FCS 组; 5% FCS 加不同浓度的  $\text{Cl}^-$  通道阻断剂, 阻断剂先于 5% FCS 0.5 h 加入), 继续孵育 72 h 后终止反应进行活细胞计数。

在进行  $^3\text{H-TdR}$  掺入实验时, 配制密度为  $2 \times 10^8$  个/L 的细胞悬液, 移入 96 孔板, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$ , 如上法进行同步化及分组加药, 继续培养 18 h, 加入稀释好的  $^3\text{H-TdR}$  0.5  $\mu\text{Ci}$ /孔, 作用 6 h 后终止反应, 以多头细胞收集仪抽滤细胞, 在液闪计数器上测定 10% 三氯醋酸不溶性的放射强度。

### 1.4 血管平滑肌细胞生长曲线的绘制

消化并制备密度为  $1 \times 10^8$  个/L 的细胞悬液, 加入 24 孔培养板, 每孔 1 mL, 每个浓度组作二复孔, 24 h 后将细胞同步化 48 h, 分组加入药物 (0.5% FCS 对照组; 0.5% FCS 加 DIDS 组; 5% FCS 组; 5% FCS 加 DIDS, DIDS 的浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ ), 于加药后的第 0、1、3、5 天每组各取二孔进行细胞计数作生长曲线。

### 1.5 Fura-2 荧光测定胞浆 $[\text{Ca}^{2+}]_i$

按本实验室已建立的方法进行<sup>[8]</sup>。简述如下: 取接近长满单层的血管平滑肌细胞 (收集前先以含 0.5% FCS 的 DMEM 培养基同步化 48 h) 制成细胞悬液, 以含 2  $\mu\text{mol/L}$  Fura-2 的 DMEM/F12 培养基在  $\text{CO}_2$  培养箱中 37  $^\circ\text{C}$  负载 45 min。收集重悬细胞并离心洗涤二遍, 按  $2 \times 10^9$  个/L 的密度重悬于测定液中进行测定。

### 1.6 资料统计

应用本教研室的药理学计算软件进行资料的组间  $t$  检验及 IC50 和线性方程的计算。

## 2 结果

### 2.1 $\text{Cl}^-$ 通道阻断剂对小牛血清促血管平滑肌细胞增殖的影响

在不同的  $\text{Cl}^-$  通道阻断剂中, 仅 DIDS 对 5% FCS 引起的血管平滑肌细胞增殖有较强的抑制作用, 而 IAA-94、NPPB、SITS、DPC (0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ , 1 mmol/L) 和速尿 (10  $\mu\text{mol/L}$ , 0.1 mmol/L, 1 mmol/L) 对 5% FCS 引起的血管平滑肌细胞计数 ( $n = 7$ ) 和  $^3\text{H-TdR}$  掺入 ( $n = 8$ ) 的增加没有抑制作用 ( $P > 0.05$ )。

如表 1 (Table 1) 所示, DIDS 呈浓度依赖性地抑制 5% FCS 引起的血管平滑肌细胞的增殖, 其半数抑制浓度 IC50 在细胞计数实验为 23.7 nmol/L, 线性方程为  $Y = -1.656 \lg X + 9.625$  (单位为 X:  $\mu\text{mol/L}$ ; Y:  $10^7$  cells/L), 相关系数  $r = -0.952$ ; 半数抑制浓度 IC50 在  $^3\text{H-TdR}$  掺入实验为 120 nmol/L, 线性方程为  $Y = -687.31 \lg X + 2719.89$  (单位为 X: mol/L; Y: cpm/well), 相关系数  $r = -0.983$ 。最大效应在 DIDS 浓度为 0.1 mmol/L 时达到, 此时最大抑制率分别为 61.6%  $\pm$  10.2% (细胞计数) 和 37.5%  $\pm$  5.1% ( $^3\text{H-TdR}$  掺入), 浓度再高时则显示出明显的细胞毒 (台盼蓝染色强阳性)。

表 1. 递增浓度的 DIDS 对 5% 小牛血清引起的血管平滑肌细胞增殖的影响

Table 1. Effects of increasing concentration of DIDS on 5% FCS induce proliferation of VSMC ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	Cell count ( $\times 10^7/L, n=6$ )	$^3H$ -TdR incorporation (cpm/well, $n=8$ )
Control	18.469 $\pm$ 2.040	9129 $\pm$ 1193
1 nmol/L	16.500 $\pm$ 2.008	8925 $\pm$ 1058
10 nmol/L	13.937 $\pm$ 2.265 <sup>a</sup>	8252 $\pm$ 752
0.1 $\mu$ mol/L	10.375 $\pm$ 1.425 <sup>b</sup>	7622 $\pm$ 958 <sup>a</sup>
1 $\mu$ mol/L	9.219 $\pm$ 1.470 <sup>b</sup>	6795 $\pm$ 1285 <sup>b</sup>
10 $\mu$ mol/L	7.500 $\pm$ 1.010 <sup>b</sup>	5843 $\pm$ 1067 <sup>b</sup>
0.1 mmol/L	7.094 $\pm$ 1.082 <sup>b</sup>	5706 $\pm$ 791 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ ; b:  $P < 0.01$ , compared with their own control group, respectively.

2.2 DIDS 对血管平滑肌细胞生长曲线的影响

由图 1 ( Figure 1 ) 可见: 对照组与 5% FCS 组血管平滑肌细胞均随时间延长而逐渐增殖, 细胞计数无论在第 1、3、5 天 FCS 组均明显高于对照组。而 DIDS 对 5% FCS 引起的细胞增殖在第 1、3、5 天均有明显的抑制作用。可见 DIDS 对 5% FCS 引起细胞增殖的抑制具有时间效应性。

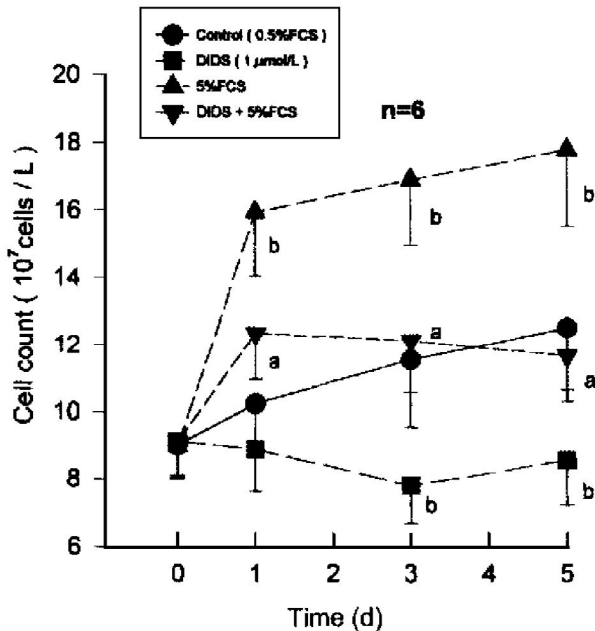


图 1. DIDS 对血管平滑肌细胞生长曲线的影响

Figure 1. Effect of DIDS on growth curve of VSMC. a:  $P < 0.01$ , compared with 5% FCS group b:  $P < 0.01$ , compared with control group.

2.3 DIDS 对电压依赖性钙通道的影响

预先将细胞悬液与 3  $\mu$ mol/L DIDS 孵育 10 min 并不影响 30 mmol/L KCl 引起的峰值[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, 结果见表 2 (Table 2)。提示 DIDS 对电压依赖性钙通道没有直接的阻断作用。

表 2. 3  $\mu$ mol/L DIDS 对 30 mmol/L KCl 引起的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高的影响

Table 2. Effect of 3  $\mu$ mol/L DIDS on 30 mmol/L KCl induced elevation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> at VSMC ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	n	Resting level (nmol/L)	Peak level (nmol/L)	Increase (%)
Control	6	63.2 $\pm$ 7.0	125.6 $\pm$ 10.8	102.7 $\pm$ 14.8
DIDS	7	62.1 $\pm$ 8.8	120.1 $\pm$ 14.3	95.0 $\pm$ 12.3 <sup>a</sup>

a:  $P > 0.05$ , compared with control group

3 讨论

血清是血液中的一种营养复合物, 主要含溶血磷脂酸及 PDGF、bFGF 等成分。研究表明: 在静息的成纤维细胞<sup>[3]</sup>, 血清可与细胞膜上 G 蛋白耦联的受体结合, 动员胞内 Ca<sup>2+</sup> 释放并开放一种新型的 Cl<sup>-</sup> 通道使细胞膜去极化, 从而开放电压依赖性钙通道, 导致 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高。Cl<sup>-</sup> 通道开放最终引起的 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高在细胞激活、分化等效应通路上起重要作用, 这一作用可被某些 Cl<sup>-</sup> 通道阻断剂所阻断。

DIDS 作为一种 Cl<sup>-</sup> 通道阻断剂和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> / Cl<sup>-</sup> 交换阻断剂, 已证实可以抑制肿瘤细胞<sup>[4]</sup>、许旺细胞<sup>[9]</sup> 等细胞的增殖, 其机制在于电压门控的 Cl<sup>-</sup> 通道或 Na<sup>+</sup> 依赖性的 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> / Cl<sup>-</sup> 联合转运受到抑制所致。本研究发现 DIDS 能抑制 5% 小牛血清引起的 VSMC 增殖, 且对电压依赖性钙通道没有直接的影响。已证实同步化的人皮肤成纤维细胞<sup>[10]</sup> 及 VSMC<sup>[11]</sup>: Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -Cl<sup>-</sup> 的联合转运可显著地被小牛血清和生长因子所激活, 而 VSMC 的生长及增殖与 Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -Cl<sup>-</sup> 的联合转运增加是密切相关的。综合以上分析, 似乎 DIDS 抑制 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> -Cl<sup>-</sup> 交换后可阻断小牛血清引起的 Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -Cl<sup>-</sup> 联合转运增加, 因而使 VSMC 增殖受到抑制。但同样是 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> -Cl<sup>-</sup> 交换抑制剂的 SITS 却无此作用, 速尿作为 Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -Cl<sup>-</sup> 转运抑制剂也并无作用。所以更可能的是 DIDS 敏感的电压门控性 Cl<sup>-</sup> 通道受到抑制所致, 这和以前对许旺细胞的研究结果一致。最新研究发现<sup>[12]</sup>: CLCN3 型 Cl<sup>-</sup> 通道在 VSMC 有高效表达, 该 Cl<sup>-</sup> 通道使细胞膜去极化开放电压依赖性钙通道可引起 Ca<sup>2+</sup> 内流, 本研究排除了 DIDS 对电压依赖性钙通道的直接影响,

推测 DIDS 可作用于 CLCN3 型  $\text{Cl}^-$  通道, 从而因小牛血清开放  $\text{Cl}^-$  通道使细胞膜去极化而引起的  $\text{Ca}^{2+}$  内流及血管平滑肌细胞增殖受到抑制; 另一原因是 DIDS 也可能通过直接抑制  $\text{Cl}^-$  通道而影响血管平滑肌细胞的生长, 这在内皮细胞<sup>[5]</sup> 及人的角化细胞<sup>[6]</sup> 已得到证实。

关于  $\text{Cl}^-$  通道如何影响 VSMC 增殖的具体细节尚需进一步研究以明了。无论如何,  $\text{Cl}^-$  通道有可能是直接或间接影响血管平滑肌细胞生长的又一个靶通道, 这为寻找有效的抗动脉粥样硬化药物提供了另一个新的思维方向。

#### 参考文献

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, **362**: 801- 809
- [2] Matsuoka T, Nishizaki T, Ikeuchi Y. Regulation of the serum activated  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chloride channel in *Xenopus* oocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **218**: 633- 637
- [3] Postmar FR, Jalink K, Hengeveld T, et al. Serum induced membrane depolarization in quiescent fibroblasts: activation of a chloride conductance through the G protein coupled LPA receptor [J]. *EMBO J*, 1996, **15**(1): 63- 72
- [4] Horvat B, Taheri S, Salihagic A. Tumor cell proliferation is abolished by inhibitors of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  and  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  exchange [J]. *Eur J Cancer*, 1992, **29A**(1): 132- 137
- [5] Panet R, Markus M, Atlan H. Bumetanide and furosemide inhibited vascular endothelial cell proliferation [J]. *J Cell Physiol*, 1994, **158**(1): 121- 127
- [6] Wohlrab D, Markwardt F. Influence of ion channel blockers on proliferation and free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of human keratinocytes [J]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 1999, **12**(5): 257- 265
- [7] Nelson MT, Conway M, Knot HJ, et al. Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries [J]. *J Physiol*, 1997, **502**(2): 259- 264
- [8] Tao L, Guan YY, He H, et al. Comparison of the calcium movements induced by  $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes in HEK cells [J]. *Life Sci*, 1997, **61**: 2 127- 136
- [9] Pappas CA, Ritchie JM. Effects of specific ion channel blockers on cultured Schann cell proliferation [J]. *Glia*, 1998, **22**(2): 113- 120
- [10] Panet R, Atlan H. Stimulation of bumetanide-sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransport by different mitogens in synchronized human skin fibroblasts is essential for cell proliferation [J]. *J Cell Biol*, 1991, **114**(2): 337- 342
- [11] Tseng H, Berk BC. The  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  cotransport is increased in hypertrophied vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1992, **267**(12): 8 161- 167
- [12] Lamb FS, Clayton GH, Liu BX, et al. Expression of CLCN voltage-gated chloride channel genes in human blood vessels [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, **31**: 657- 666

(此文 2000- 12- 25 收到, 2001- 08- 26 修回)

(此文编辑 胡必利)

#### •会议征文•

### 全国第二届临床心脑血管病学术会议征文通知

由中国药理学会和中华医学会青岛分会联合主办的“全国第二届临床心脑血管病学术会议”定于 2002 年 5 月在昆明或西安召开, 现将会议征文有关事项通知如下:

1、征文内容: 心脑血管疾病的基础与应用基础研究; 心脑血管疾病的临床研究; 心脑血管药理学的基础与应用基础研究; 心脑血管疾病药物治疗学研究; 心脑血管疾病介入治疗学研究; 心脑血管疾病护理; 临床研究方案的设计与统计方法研究等。

2、论文撰写要求: 所投论文必须是未公开发表的学术论文, 或具有本人研究工作的综述。声明无一稿多投, 文稿首页加盖单位公章, 文责自负。参照《中国临床药理学与治疗学》杂志论文格式要求撰写, 中英文摘要按结构式书写。来稿最好打印或通过 E-mail 投稿。每篇论文需交审稿费 30 元。

3、论文截稿日期: 2002 年 3 月 30 日。

4、入选论文将以全文、摘要形式分期刊登于《中国临床药理学与治疗学》杂志(CN34- 1206/R, ISSN 1009- 2501) 和《青岛医药卫生》杂志(CN37- 1249/R, ISSN 1006- 5571)

5、来稿请寄: 安徽省芜湖市皖南医学院弋面山医院内《中国临床药理学与治疗学》杂志编辑部收, 邮政编码 241001, 信封上请注明“心脑血管病学术会议”。

6、联系电话: 0553- 5738856- 2333, 0553- 5738350。E-mail: editorys@mail. ahwhptt. net. cn

中国药理学会  
中华医学会青岛分会  
2001 年 9 月 8 日