

[文章编号] 1007-3949(2002)10-05-0369-06

• 实验研究 •

氯通道参与脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流

陈临溪, 关永源, 贺华, 丁岩, 熊大志

(中山大学中山医学院药理教研室, 广东省广州市 510080)

[主题词] 氯通道; 钙; 脑动脉; 平滑肌细胞; 内皮素; 三磷酸腺苷

[摘要] 研究 Cl^- 通道在牛脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流中的作用。采用培养的脑血管平滑肌细胞, 在生物荧光双波长影像分析系统用 Fura2/Am 荧光探针测定单个细胞内游离 Ca^{2+} 浓度。结果发现: Cl^- 通道阻断剂 DIDS(0.75 $\mu\text{mol/L}$) 能降低内皮素 1(10^{-7} mol/L) 刺激引起的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流, 抑制率为 29.6% \pm 3.9%, 随后加入 Cl^- 通道阻断剂 NPPB(10 $\mu\text{mol/L}$) 能继续降低平台相, 抑制率为 44.9% \pm 8.7%; 交换加药顺序, NPPB 能降低内皮素 1 刺激引起的 Ca^{2+} 内流, DIDS 能进一步降低 Ca^{2+} 内流。④DIDS(0.75 $\mu\text{mol/L}$) 能降低三磷酸腺苷(10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激引起的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流, 抑制率为 26.7% \pm 10.5%, 随后加入 NPPB(10 $\mu\text{mol/L}$) 能继续降低平台相, 抑制率为 54.3% \pm 9.6%; 交换加药顺序, NPPB 能降低三磷酸腺苷刺激引起的 Ca^{2+} 内流, DIDS 能进一步降低 Ca^{2+} 内流。④DIDS(0.75 $\mu\text{mol/L}$) 能降低环匹阿尼酸(10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激引起的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流, 抑制率为 26.5% \pm 5.0%, 随后加入 NPPB(10 $\mu\text{mol/L}$) 能继续降低平台相, 抑制率为 46.1% \pm 4.2%; 交换加药顺序, NPPB 能降低环匹阿尼酸刺激引起的 Ca^{2+} 内流, DIDS 能进一步降低 Ca^{2+} 内流。提示对 DIDS、NPPB 敏感的非同一性 Cl^- 通道参与内皮素 1、三磷酸腺苷、环匹阿尼酸触发的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流。

[中图分类号] R966

[文献标识码] A

Chloride Channels Participated in Cerebrovascular Smooth Muscle Cells Ca^{2+} Store-operated Ca^{2+} Influx

CHEN Lin-xi, GUAN Yong-Yuan, HE Hua, DING Yan, and XIONG Da-zhi

(Department of Pharmacology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

[MeSH] Chloride Channel; Calcium; Cerebral Arteries; Smooth Muscle Cell; Endothelin; Adenosine Triphosphate

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of chloride channels on cultured bovine cerebrovascular smooth muscle cells (CSMC) Ca^{2+} store-operated Ca^{2+} influx. **Method** Cell culture and single intracellular free Ca^{2+} concentration was measured in Fura2/Am fluorescence probed by MetaFluor Fluorescence Ratio Imaging System. **Results** Chloride channel inhibitors 4,4'-diisothiocyanostibene-2,2'-disulphonate (DIDS, 0.75 $\mu\text{mol/L}$) decreased Ca^{2+} influx significantly induced by endothelin 1 (ET-1), adenosine triphosphate (ATP), cyclopiazonic acid (CPA); Subsequent addition 5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino)-benzoate (NPPB, 10 $\mu\text{mol/L}$) further produced the decrease effect. ④NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$) decreased Ca^{2+} influx significantly induced by ET-1, ATP, CPA; Subsequent addition DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$) also further produced the effect of decreasing.

Conclusion Chloride channel inhibitors DIDS, NPPB inhibited Ca^{2+} store-operated Ca^{2+} influx induced by ET-1, ATP, CPA. DIDS, NPPB sensitive chloride channels participated in the signal transduction of Ca^{2+} store-operated Ca^{2+} influx in cerebrovascular smooth muscle cells.

Ca^{2+} 是细胞内非常重要的第二信使, 细胞受刺激后, 可通过细胞内信号转导通路引起胞内 Ca^{2+} 池的 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流, 引起胞内 Ca^{2+} 的升高。胞外 Ca^{2+} 内流是引起胞浆 Ca^{2+} 水平持续升高的关键因素, 主要由细胞膜上两种性质不同的 Ca^{2+} 通道即电压依赖性 Ca^{2+} 通道和受体操纵性 Ca^{2+} 通

道介导^[1-5]。1985 年 Putney^[3,4] 对受体操纵的 Ca^{2+} 内流提出以下假说: 受体激活后, 通过兴奋性 G 蛋白激活磷脂酶 C, 后者催化胞膜上磷脂酰肌醇代谢为 1,4,5-三磷酸肌醇(1,4,5-triphosphate inositol, IP_3) 和甘油二酯, 激活内质网上 IP_3 受体引起胞内 Ca^{2+} 释放, 导致胞内 Ca^{2+} 池耗竭, 使细胞膜上 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 通道开放而触发胞外 Ca^{2+} 内流, 使 Ca^{2+} 池重新充盈。这种 Ca^{2+} 内流方式称之为 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流。但是 Ca^{2+} 池耗竭后如何触发 Ca^{2+} 内流还知之甚少。近年来, Cl^- 通道参与细胞 Ca^{2+} 运动引起关注。在外周血管平滑肌细胞上, 已发现 Ca^{2+} 激活 Cl^- 通道与血管平滑肌收缩功能密切相关, 多种血管活性物质如内皮素、血管紧张素^④、

[收稿日期] 2002-04-11 [修回日期] 2002-09-25

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

[作者简介] 陈临溪, 男, 1965年出生, 博士研究生, 副教授; 现在中山大学药理教研室; E-mail: chenlinxi@163.net。关永源, 男, 1946年出生, 教授, 博士生导师, 国务院学位委员会药理学学科评议组成员, 中国药学会心血管专业委员会常务委员。

去甲肾上腺素及三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)均可激活血管平滑肌细胞上相应的受体,激活磷脂酶C,引起胞内IP₃增加,后者导致胞内Ca²⁺池释放,胞内Ca²⁺浓度瞬即升高,继而导致Ca²⁺激活的Cl⁻通道开放,Cl⁻外流,使胞膜去极化,促进电压依赖性Ca²⁺通道开放,导致胞外Ca²⁺内流^[6,7]。Cl⁻通道阻断剂4,4'-二异硫氰酸二丙乙烯2,2'-二磺酸(4,4'-diisothiocyanostibene-2,2'-disulphonate, DIDS)、茛菪碱可松弛大鼠脑动脉平滑肌,抑制压力引起的收缩反应^[8]。Cl⁻通道参与Ca²⁺内流过程,但其详细机理仍不清楚^[9,10]。本实验在培养的脑血管平滑肌细胞上,采用生物荧光双波长影像分析系统测定单个细胞内游离钙离子([Ca²⁺]_i)动态变化,研究Cl⁻通道阻断剂对内皮素1、ATP及Ca²⁺泵抑制剂环匹阿尼酸(cyclopiazonic acid, CPA)刺激细胞引起Ca²⁺内流的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

DMEM/F₁₂培养基(Gibco公司);小牛血清(calf serum, CS; Gibco公司);牛血清白蛋白(Gibco公司);Fura-2/Am(Sigma, USA),内皮素1(Sigma, USA),ATP(Sigma, USA),以上3种试剂均用蒸馏水溶解;DIDS(避光保存),5-硝基-2-(3-苯丙氨基)苯甲酸[5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoate, NPPB], CPA,以上3种试剂均购自Sigma公司,均用二甲基亚砜溶解,实验使用的二甲基亚砜终浓度小于0.01%,对细胞内[Ca²⁺]_i无影响。

1.2 仪器

CO₂培养箱(Forma scientific, USA),倒置相差显微镜(重庆光学仪器厂),高速低温离心机(Heraeus),倒置荧光显微镜(Nikon, Japan),生物荧光双波长影像分析系统(MetaFluor Fluorescence Ratio Imaging System, Universal Imaging Co., USA)。

1.3 动物

雄性新生乳牛,广州市奶牛研究所提供。

1.4 新生乳牛脑动脉平滑肌细胞培养

采用本室建立的方法^[11],无菌条件下迅速取出新生乳牛大脑基底动脉,放入预冷的含抗生素(100 ku/L青霉素,100 mg/L链霉素)的PBS缓冲液(NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na₂HPO₄ 8.1 mmol/L, KH₂PO₄ 1.5 mmol/L, pH 7.4)中。在手术显微镜下把动脉周围结缔组织剪干净,去除血块,剪成1 mm左右的碎块,均匀铺于培养瓶上,37℃放置4~6 h,

加入适量含20% CS的DMEM/F₁₂培养液,置于5% CO₂培养箱中37℃静置培养。待细胞生长成单层基本融合后,用胰酶(0.05%胰蛋白酶+0.53 mmol/L乙二胺四乙酸)消化后1:2进行传代培养,传代培养用含10% CS的DMEM/F₁₂培养液。倒置相差显微镜下观察细胞呈长梭型,鹅卵石样排列,峰谷相间,电镜及免疫组织化学鉴定为血管平滑肌细胞。实验采用第5~10代平滑肌细胞。实验前细胞在含0.5% CS的DMEM/F₁₂培养液中培养24 h,使细胞同步化,静止于G₀期。

1.5 Fura-2 荧光测定单个细胞内游离钙离子

取种植于费希尔(Fisher)玻片上的细胞,去培养基,PBS冲洗1次,以Fura-2/Am(终浓度为2 μmol/L)负载,负载液为含0.1%牛血清白蛋白的BSS测定液(NaCl 145.0 mmol/L, KCl 3.0 mmol/L, HEPES 10.0 mmol/L, 葡萄糖 10.0 mmol/L, MgCl₂ 1.0 mmol/L, CaCl₂ 2.0 mmol/L, pH 7.4),避光室温负载40 min,去上清液,37℃预温测定液,灌流约5~10 min,加入预温的测定液。室温下用生物荧光双波长影像分析系统进行荧光测定^[12]。以340 nm、380 nm为激发波长,取值间隔为1 s,持续记录,MetaFluor软件自动分析每个细胞荧光强度,单个细胞内Ca²⁺浓度以340 nm的吸收率(absorbance, A)与380 nm的A值之比,即A_{340 nm/380 nm}表示,此比值与[Ca²⁺]_i成正比。静息期记录20 s,加入激动剂,记录曲线到达平台期后加入第1个阻断剂,待作用稳定后再加入第2个阻断剂。取80个细胞的数据进行统计学分析。

1.6 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 10.0统计软件分析,采用F检验,P<0.05为有显著性差异。激动剂引起的Ca²⁺净内流量和药物对Ca²⁺内流的抑制率按以下公式计算:

$$\text{Ca}^{2+} \text{ 净内流量} = \text{平台相} [\text{Ca}^{2+}]_i - \text{静息} [\text{Ca}^{2+}]_i$$

$$\text{抑制率} (\%) = (\text{加药前平台相} [\text{Ca}^{2+}]_i - \text{加药后平台相} [\text{Ca}^{2+}]_i) / (\text{加药前平台相} [\text{Ca}^{2+}]_i - \text{静息} [\text{Ca}^{2+}]_i) \times 100\%$$

2 结果

2.1 内皮素1对脑血管平滑肌细胞单个细胞内游离钙离子的影响及Cl⁻通道阻断剂DIDS、NPPB顺序加药的阻断作用

采用Ca²⁺图像分析系统(Ca²⁺ Image system)测定脑血管平滑肌细胞内静息[Ca²⁺]_i,以A_{340 nm/380 nm}值表示细胞内游离Ca²⁺浓度,其浓度为0.684 ±

0.002。用 10^{-7} mol/L 的内皮素 1 刺激细胞,引起细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 呈双相升高反应,先是快速短暂升高相,达峰值,代表细胞内 Ca^{2+} 池 Ca^{2+} 释放,随后逐渐下降并持续维持,形成一平台相,代表细胞外 Ca^{2+} 内流,以平台相与静息 $[Ca^{2+}]_i$ 的差值表示的内流的量是 0.056 ± 0.007 。 Cl^- 通道阻断剂 DIDS (0.75 μ mol/L) 能降低平台相,说明能减小 Ca^{2+} 内流。由于荧光淬灭的影响,未能观察到 DIDS 的最大抑制效应;随后加入 NPPB (10 μ mol/L, 最大抑制浓度) 能继续降低平台相(表 1, Table 1; 图 1, Figure 1)。说明 DIDS、NPPB 敏感的 Cl^- 通道参与了内皮素 1 刺激引起的 Ca^{2+} 内流。

表 1. DIDS (0.75 μ mol/L)、NPPB (10 μ mol/L) 对内皮素 1 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响。

Table 1. Effects of DIDS, NPPB on Ca^{2+} influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by endothelin 1 (10^{-7} mol/L) ($A_{340\text{ nm}/380\text{ nm}}$, $n = 80$, $\bar{x} \pm s$).

Treatment	$[Ca^{2+}]_i$
Resting	0.684 ± 0.002
Transient	0.877 ± 0.015
Plateau	0.740 ± 0.015
Ca^{2+} of influx	0.056 ± 0.007
DIDS (0.75 μ mol/L)	0.038 ± 0.008^a
NPPB (10 μ mol/L)	0.029 ± 0.006^a
Inhibition of DIDS	$29.6\% \pm 3.9\%$
Total inhibition	$44.9\% \pm 8.7\%^b$

a: $P < 0.01$, compared with Ca^{2+} of influx; b: $P < 0.01$, compared with inhibition of DIDS.

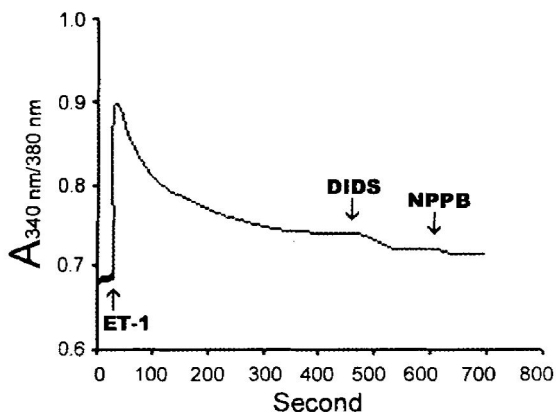


图 1. DIDS (0.75 μ mol/L)、NPPB (10 μ mol/L) 对内皮素 1 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响。

Figure 1. Effects of DIDS (0.75 μ mol/L), NPPB (10 μ mol/L) on Ca^{2+} influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by endothelin 1 (10^{-7} mol/L) ($A_{340\text{ nm}/380\text{ nm}}$).

2.2 Cl^- 通道阻断剂 NPPB、DIDS 顺序加药对内皮素 1 刺激脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的阻断作用

Cl^- 通道阻断剂 NPPB (10 μ mol/L) 能降低内皮素 1 刺激引起的 Ca^{2+} 内流平台相;随后加入 DIDS (0.75 μ mol/L) 能继续降低平台相。NPPB、DIDS 交换加药顺序并不影响各自的作用(表 2, Table 2; 图 2, Figure 2)。说明对 NPPB、DIDS 敏感的不同类型的 Cl^- 通道参与了内皮素 1 刺激引起的 Ca^{2+} 内流。

表 2. NPPB (10 μ mol/L)、DIDS (0.75 μ mol/L) 对内皮素 1 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响。

Table 2. Effects of NPPB, DIDS on Ca^{2+} influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by endothelin 1 (10^{-7} mol/L) ($A_{340\text{ nm}/380\text{ nm}}$, $n = 80$, $\bar{x} \pm s$).

Treatment	$[Ca^{2+}]_i$
Resting	0.669 ± 0.004
Transient	0.909 ± 0.008
Plateau	0.733 ± 0.002
Ca^{2+} of influx	0.064 ± 0.005
NPPB (10 μ mol/L)	0.052 ± 0.003^a
DIDS (0.75 μ mol/L)	0.033 ± 0.005^a
Inhibition of NPPB	$18.0\% \pm 4.9\%$
Total inhibition	$47.6\% \pm 6.9\%^b$

a: $P < 0.01$, compared with Ca^{2+} of influx; b: $P < 0.01$, compared with inhibition of NPPB.

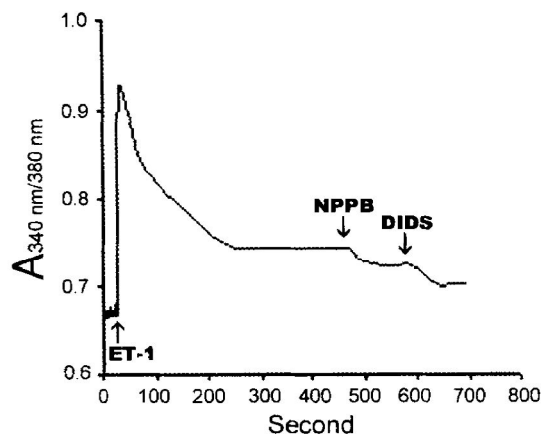


图 2. NPPB (10 μ mol/L)、DIDS (0.75 μ mol/L) 对内皮素 1 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响。

Figure 2. Effects of NPPB (10 μ mol/L), DIDS (0.75 μ mol/L) on Ca^{2+} influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by endothelin 1 (10^{-7} mol/L) ($A_{340\text{ nm}/380\text{ nm}}$).

2.3 三磷酸腺苷对脑血管平滑肌细胞单个细胞内游离钙离子的影响及 Cl^- 通道阻断剂 DIDS、NPPB 顺序加药的阻断作用

三磷酸腺苷 (10 μ mol/L) 刺激细胞引起细胞内

[Ca²⁺]_i 呈双相升高反应, 先是快速短暂升高相, 达峰值, 随后逐渐下降并持续维持, 形成一平台相, Ca²⁺ 的内流的量是 0.065 ± 0.011, 与内皮素 1 作用相似。Cl⁻ 通道阻断剂 DIDS (0.75 μmol/L) 能降低平台相, 使 Ca²⁺ 内流降低; 随后加入 NPPB (10 μmol/L) 能继续降低平台相 (表 3, Table 3; 图 3, Figure 3)。说明 DIDS、NPPB 敏感的 Cl⁻ 通道参与了 ATP 刺激引起的 Ca²⁺ 内流。

表 3. DIDS (0.75 μmol/L)、NPPB (10 μmol/L) 对三磷酸腺苷 (10 μmol/L) 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca²⁺ 内流的影响。

Table 3. Effects of DIDS, NPPB on Ca²⁺ influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by ATP (10 μmol/L) (A_{340 nm/380 nm}, n = 80, $\bar{x} \pm s$).

Treatment	[Ca ²⁺] _i
Resting	0.638 ± 0.014
Transient	0.876 ± 0.015
Plateau	0.726 ± 0.005
Ca ²⁺ of influx	0.088 ± 0.013
DIDS (0.75 μmol/L)	0.065 ± 0.011 ^a
NPPB (10 μmol/L)	0.042 ± 0.014 ^a
Inhibition of DIDS	26.7% ± 10.5%
Total inhibition	54.3% ± 9.6% ^b

a: P < 0.01, compared with Ca²⁺ of influx; b: P < 0.01, compared with inhibition of DIDS.

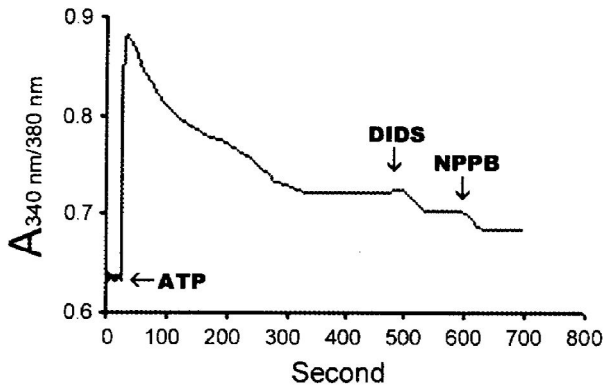


图 3. DIDS (0.75 μmol/L)、NPPB (10 μmol/L) 对三磷酸腺苷 (10 μmol/L) 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca²⁺ 内流的影响。

Figure 3. Effects of DIDS (0.75 μmol/L), NPPB (10 μmol/L) on Ca²⁺ influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by ATP (10 μmol/L) (A_{340 nm/380 nm}).

2.4 Cl⁻ 通道阻断剂 NPPB、DIDS 顺序加药对三磷酸腺苷刺激脑血管平滑肌细胞 Ca²⁺ 内流的阻断作用

Cl⁻ 通道阻断剂 NPPB (10 μmol/L) 能降低 ATP 刺激引起的 Ca²⁺ 内流平台相; 随后加入 DIDS (0.75

μmol/L) 能继续降低平台相。NPPB、DIDS 交换加药顺序并不影响各自的作用 (表 4, Table 4; 图 4, Figure 4)。说明对 NPPB、DIDS 敏感的不同类型的 Cl⁻ 通道参与了 ATP 刺激引起的 Ca²⁺ 内流。

表 4. NPPB (10 μmol/L)、DIDS (0.75 μmol/L) 对三磷酸腺苷 (10 μmol/L) 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca²⁺ 内流的影响。

Table 4. Effects of NPPB, DIDS on Ca²⁺ influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by ATP (10 μmol/L) (A_{340 nm/380 nm}, n = 80, $\bar{x} \pm s$).

Treatment	[Ca ²⁺] _i
Resting	0.634 ± 0.006
Transient	0.894 ± 0.016
Plateau	0.714 ± 0.003
Ca ²⁺ of influx	0.081 ± 0.005
NPPB (10 μmol/L)	0.059 ± 0.005 ^a
DIDS (0.75 μmol/L)	0.039 ± 0.004 ^a
Inhibition of NPPB	26.9% ± 4.9%
Total inhibition	51.6% ± 4.1% ^b

a: P < 0.01, compared with Ca²⁺ of influx; b: P < 0.01, compared with inhibition of NPPB.

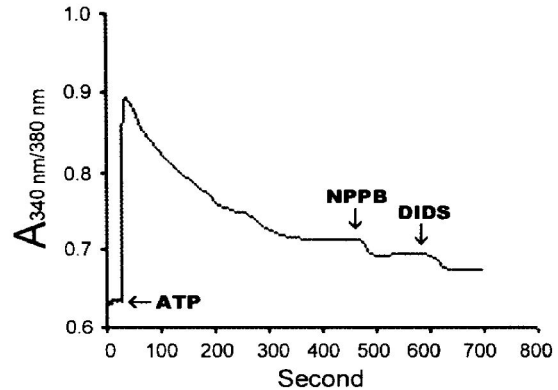


图 4. NPPB (10 μmol/L)、DIDS (0.75 μmol/L) 对三磷酸腺苷 (10 μmol/L) 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca²⁺ 内流的影响。

Figure 4. Effects of NPPB (10 μmol/L), DIDS (0.75 μmol/L) on Ca²⁺ influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by ATP (10 μmol/L) (A_{340 nm/380 nm}).

2.5 环匹阿尼酸对脑血管平滑肌细胞单个细胞内游离钙离子的影响及 Cl⁻ 通道阻断剂 DIDS、NPPB 顺序加药的阻断作用

细胞内静息 [Ca²⁺]_i 为 0.657 ± 0.004, CPA (10 μmol/L) 刺激细胞引起细胞内 [Ca²⁺]_i 呈双相升高反应, 先是慢速短暂升高相, 达峰值, 随后逐渐下降并持续维持, 形成一平台相, Ca²⁺ 的内流的量是 0.104 ± 0.006。Cl⁻ 通道阻断剂 DIDS (0.75 μmol/L) 能降低平台相, 使 Ca²⁺ 内流降低; 随后加入 NPPB (10 μmol/

L) 能继续降低平台相(表 5, Table 5; 图 5, Figure 5)。说明对 DIDS、NPPB 敏感的 Cl^- 通道参与了 CPA 刺激引起的 Ca^{2+} 内流。

表 5. DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$)、NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$) 对环匹阿尼酸 (10 $\mu\text{mol/L}$) 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响。

Table 5. Effects of DIDS, NPPB on Ca^{2+} influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by CPA (10 $\mu\text{mol/L}$) ($A_{340\text{ nm}/380\text{ nm}}$, $n = 80$, $\bar{x} \pm s$).

Treatment	[Ca^{2+}]i
Resting	0.657 \pm 0.004
Transient	0.927 \pm 0.012
Plateau	0.761 \pm 0.005
Ca^{2+} of influx	0.104 \pm 0.006
DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$)	0.076 \pm 0.008 ^a
NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.056 \pm 0.006 ^a
Inhibition of DIDS	26.5% \pm 5.0%
Total inhibition	46.1% \pm 4.2% ^b

a: $P < 0.01$, compared with Ca^{2+} of influx; b: $P < 0.01$, compared with inhibition of DIDS.

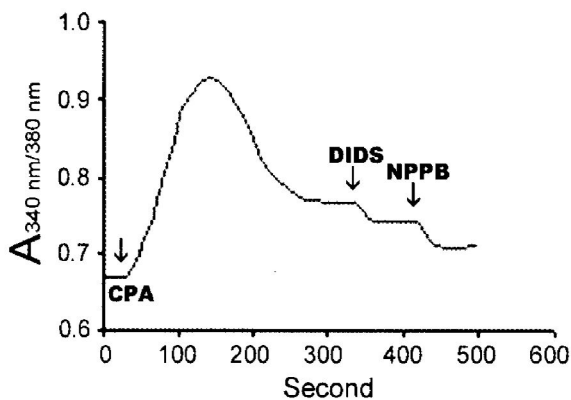


图 5. DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$)、NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$) 对环匹阿尼酸 (10 $\mu\text{mol/L}$) 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响。

Figure 5. Effects of DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$), NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$) on Ca^{2+} influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by CPA (10 $\mu\text{mol/L}$) ($A_{340\text{ nm}/380\text{ nm}}$).

2.6 Cl^- 通道阻断剂 NPPB、DIDS 顺序加药对环匹阿尼酸刺激脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的阻断作用

Cl^- 通道阻断剂 NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$) 能降低 CPA 刺激引起的 Ca^{2+} 内流平台相; 随后加入 DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$) 能继续降低平台相。NPPB、DIDS 交换加药顺序并不影响各自的作用(表 6, Table 6; 图 6, Figure 6)。说明对 NPPB、DIDS 敏感的不同类型的 Cl^- 通道参与了 CPA 刺激引起的 Ca^{2+} 内流。

表 6. NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$)、DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$) 对环匹阿尼酸 (10 $\mu\text{mol/L}$) 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响。

Table 6. Effects of NPPB, DIDS on Ca^{2+} influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by CPA (10 $\mu\text{mol/L}$) ($A_{340\text{ nm}/380\text{ nm}}$, $n = 80$, $\bar{x} \pm s$).

Treatment	[Ca^{2+}]i
Resting	0.661 \pm 0.004
Transient	0.929 \pm 0.006
Plateau	0.764 \pm 0.003
Ca^{2+} of influx	0.103 \pm 0.005
NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.083 \pm 0.006 ^a
DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$)	0.054 \pm 0.005 ^a
Inhibition of NPPB	19.1% \pm 5.1%
Total inhibition	47.7% \pm 3.8% ^b

a: $P < 0.01$, compared with Ca^{2+} of influx; b: $P < 0.01$, compared with inhibition of NPPB.

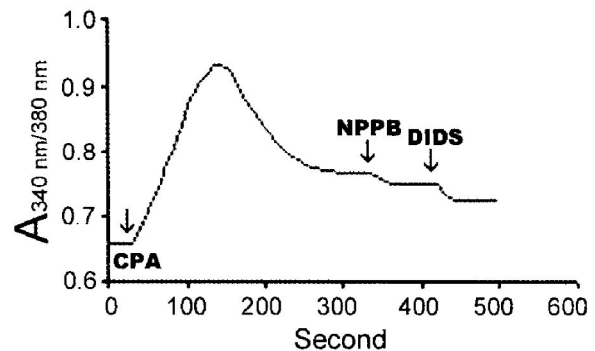


图 6. NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$)、DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$) 对环匹阿尼酸 (10 $\mu\text{mol/L}$) 诱导的脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的影响。

Figure 6. Effects of NPPB (10 $\mu\text{mol/L}$), DIDS (0.75 $\mu\text{mol/L}$) on Ca^{2+} influx of cerebrovascular smooth muscle cells induced by CPA (10 $\mu\text{mol/L}$) ($A_{340\text{ nm}/380\text{ nm}}$).

3 讨论

脑血管痉挛、脑出血、脑动脉硬化等都与细胞的 Ca^{2+} 运动异常相关。内皮素 1 可引起脑血管强烈收缩, 促进动脉粥样硬化形成和发展。在内皮素 1 刺激外周血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流的过程中有茛菪碱、DIDS 敏感的 Cl^- 通道参与^[13,14]。本实验发现内皮素 1 刺激脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流有对 DIDS、NPPB 敏感的非同一性的 Cl^- 通道参与。ATP 是细胞内能量物质, 在脑出血时大量产生, 引起血管痉挛, ATP 与嘌呤 P_2 受体结合产生广泛效应。Zhang 等^[15]报道在新鲜分离的大鼠单个脑基底动脉平滑肌细胞上, ATP 促进对 SK&F96365 不敏感的受体操纵性 Ca^{2+} 通道开放, 引起 Ca^{2+} 内流。ATP 能引发主动脉平滑肌细胞 Cl^- 电流^[16]。本实验同时也发

现 DIDS、NPPB 敏感的 Cl^- 通道参与了 ATP 触发的 Ca^{2+} 内流, 与内皮素 1 的结果相似。

血管平滑肌细胞胞外 Cl^- 浓度为 150 mmol/L, 根据 Nernst 公式计算, 血管平滑肌细胞胞浆 Cl^- 浓度为 15 mmol/L 才能达到电化学平衡。然而与其它细胞不同的是, 血管平滑肌细胞胞浆 Cl^- 浓度却高达 25 mmol/L。因此, 血管平滑肌细胞上的 Cl^- 通道开放, 胞浆 Cl^- 随电化学梯度呈现外向流动, 细胞膜去极化。已有报道 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流在调节血管平滑肌紧张性中起重要作用^[2]。本实验中, CPA (10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激脑血管平滑肌细胞, 引起细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 呈双相升高反应, 先是慢速短暂升高相, 达峰值后逐渐下降并持续维持在较高水平, 形成一平台相, 与 CPA 刺激外周主动脉平滑肌细胞所致的 Ca^{2+} 运动相似。现在常以 CPA 触发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 平台相变化作为反映 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流变化的指标。实验发现 Cl^- 通道阻断剂 DIDS 能降低平台相, 降低 Ca^{2+} 内流; 随后加入 NPPB 还能继续降低平台相。说明对 DIDS、NPPB 敏感的 Cl^- 通道参与了 CPA 刺激引起的 Ca^{2+} 内流。在先加 NPPB、再加 DIDS 的处理时, 结果不受影响, 说明两者影响的 Cl^- 通道是不同的。

维持细胞内 Ca^{2+} 稳态对机体正常生理功能有十分重要的意义, Ca^{2+} 运动异常与疾病的发生发展密切相关。最近研究表明, Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流的功能失常存在于许多病理生理学过程, 如高血压时大鼠血管平滑肌细胞肌浆网 Ca^{2+} 转运能力异常, 对 Ca^{2+} 泵抑制剂引起的收缩反应增强, 可能是由 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流功能改变引起。因此寻找 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流的选择性抑制剂, 对心脑血管疾病的防治将有诱人的应用前景^[17, 18]。

细胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流可引起 Cl^- 通道开放, 但也有 Ca^{2+} 非依赖性 Cl^- 通道开放。Iijima 等^[13] 报道血管内压力增高使 Cl^- 通道开放, 血管平滑肌去极化, 产生电压依赖性开放, 引起血管收缩, 但用 Ca^{2+} 通道阻断剂阻断 Ca^{2+} 通道后, 血管牵张和血管内压力仍能引起 Cl^- 通道开放。

在哺乳动物已发现 9 种 Cl^- 通道家族 (CIC) 同源体, CIC-1~7、CICKa、CICKb, 分属于 α 、 β 、 γ 3 个亚族, CIC-3 属 CIC 家族 β 亚族^[19]。最近, 本实验室^[20] 已发现牛脑血管平滑肌细胞上有 CIC-3 表达, 内皮素 1 能刺激 CIC-3 表达增加。本实验发现参与细胞 Ca^{2+} 内流的 DIDS、NPPB 敏感的 Cl^- 通道是否有 CIC-

3 成分, 以及 CIC-3 是否参与细胞 Ca^{2+} 内流, 都有待进一步研究。

总之, 对 DIDS、NPPB 敏感的非同一性 Cl^- 通道参与了内皮素 1、ATP、CPA 触发的 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流, 是脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 池操纵性 Ca^{2+} 内流的信号转导通路之一。

[参考文献]

- [1] Karaki H, Ozaki H, Hori M, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*, 1997, **49** (2): 157-230
- [2] Gibson A, McFadzean L, Wallace P, et al. Capacitative Ca^{2+} entry and the regulation of smooth muscle tone. *Trends Pharmacol Sci*, 1998, **19**: 266-269
- [3] Putney JW, McKay RR. Capacitative calcium entry channels. *Bio Essays*, 1999, **21**: 38-46
- [4] Putney JW Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 1986, **7** (1): 1-12
- [5] Clapham DE. Intracellular calcium replenishing the stores. *Nature*, 1995, **375**: 634-635
- [6] Greenwood IA, Large WA. Modulation of the decay of Ca^{2+} -activated Cl^- currents in rabbit portal vein smooth muscle cells by external anions. *J Physiol Lond*, 1999, **516** (Part 2): 365-376
- [7] Remillard CV, Lupien MA, Crepeau V, et al. Role of Ca^{2+} and swelling-activated Cl^- channels in α 1-adrenoceptor-mediated tone in pressurized rabbit mesenteric arterioles. *Cardiovasc Res*, 2000, **46** (3): 557-568
- [8] Nelson MT, Conway MA, Knot HJ, et al. Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries. *J Physiol*, 1997, **502** (Part 2): 259-264
- [9] Mayberg MR. Cerebral vasospasm. *Neurosurg Clin N Am*, 1998, **9** (3): 615-627
- [10] Van Breemen C, Aaronson P, Loutzenhiser R. Sodium-calcium interactions in mammalian smooth muscle. *Pharmacol Rev*, 1978, **30** (2): 167-208
- [11] 宜全, 关永源, 贺华. Cl^- 通道及 Ca^{2+} 通道阻断剂对 ATP 触发的牛脑血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流作用的影响. *中国药理与毒理学杂志*, 2001, **15**(5): 347-352
- [12] Guan YY, Weir BK, Marton LS, et al. Effects of erythrocyte lysate of different incubation times on intracellular free calcium in rat basilar artery smooth-muscle cells. *J Neurosurg*, 1998, **89** (6): 1 007-014
- [13] Iijima K, Lin L, Nasjletti A, et al. Intracellular ramification of endothelin signal. *Am J Physiol*, 1991, **260** (5 Part 1): C982-992
- [14] 肖贵南, 关永源, 贺华. Cl^- 通道在内皮素 1 引起的血管平滑肌细胞增殖中的作用. *中国药理学通报*, 2001, **4**: 443-446
- [15] Zhang H, Weir B, Marton LS, et al. Mechanisms of hemolysate-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in cerebral smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1995, **269** (6 Part 2): H1 874-890
- [16] Droogmans G, Callewaert G, Declercq I, et al. ATP-induced Ca^{2+} release and Cl^- current in cultured smooth muscle cells from pig aorta. *J Physiol*, 1991, **440**: 623-634
- [17] Nomura Y, Asano M, Ito K, et al. Potent vasoconstrictor actions of cyclopiar-zonic acid and thapsigargin on femoral arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 1997, **120** (1): 65-73
- [18] Sekiguchi F, Shimanura K, Akashi M, et al. Effects of cyclopiar-zonic acid and thapsigargin on electromechanical activities and intracellular Ca^{2+} in smooth muscle of carotid artery of hypertensive rats. *Br J Pharmacol*, 1996, **118** (4): 857-864
- [19] Maduke M, Miller C, Mindell J. A decade of CLC chloride channels: structure, mechanism, and many unsettled questions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, **29**: 411-438
- [20] 陈临溪, 关永源, 贺华. 内皮素 1 对牛脑血管平滑肌细胞 CIC-3 通道表达的影响. *中国药理学通报*, 2002, **18** (3): 260-264

(此文编辑 曾学清)