

东莨菪碱对动脉平滑肌细胞的作用

张明志 陈锦明* 纵艳艳 王 侠 张光毅 赵昇皓

(生物化学研究室)

提 要 以培养的兔ASMC为材料,研究了Scop对细胞增殖的影响。有 Ca^{2+} 时,Scop抑制ASMC的增殖;缺 Ca^{2+} 时则表现为双向作用,即低浓度刺激、高浓度抑制ASMC增殖。培养液中有 Cd^{2+} 存在时,Scop对ASMC增殖仍表现为双向作用。

关键词 东莨菪碱;镉离子;平滑肌细胞增殖;兔

东莨菪碱(Scopolamine, Scop)除具有M受体阻断剂的作用外,最近还发现其与维拉帕米一样,具有钙通道阻断作用⁽¹⁾。一定浓度的胞外 Ca^{2+} 及 Ca^{2+} 内流对细胞增殖是必须的⁽²⁻³⁾,阻断 Ca^{2+} 内流就可抑制细胞增殖。如Nilsson等⁽⁴⁾发现nifedine就可抑制ASMC的增殖。但有关Scop对细胞增殖作用的文献尚未见报道。本文以培养的家兔胸主动脉平滑肌细胞(ASMC)为材料,研究了正常培养(有 Ca^{2+} 培养),缺 Ca^{2+} 培养及 Cd^{2+} 存在时Scop对ASMC增殖的影响。

材料和方法

组织和试剂 以本地市售并经本院动物房饲料的健康家兔的胸主动脉作为组织来源。MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)为Sigma公司产品。MTT用磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)配成5mg/ml的溶液,过滤除菌,4℃避光保存。 CaCl_2 、 CdCl_2 均为A.R.级。Scop由本院药理教研室提供。其它试剂均为A.R.级或以上。实验所用试剂均用去离子,玻璃双蒸水配制。

培养液 正常培养液:DMEM(Gib-

co),加入10mmol/L HEPES(Merck)、14mmol/L NaHCO_3 、100IU/ml青霉素、100μg/ml链霉素、100μg/ml卡那霉素、0.6mg/ml谷氨酰胺和新生胎牛血清(FCS,中国医学科学院天津血液学研究所)。原代培养用20%FCS,传代培养用10%。缺 Ca^{2+} 培养液:缺 Ca^{2+} Eagle培养液(中国科学院生物物理所生化厂产品),分别加入 CaCl_2 、 CdCl_2 ,配成不同浓度的各种培养液。

细胞培养 家兔主动脉平滑肌细胞的培养按文献(5)的方法。4~10代细胞用作实验。将平滑肌细胞在0.5% FCS的缺 Ca^{2+} Eagle培养液中培养56h,即可使其同步化于 G_0 期⁽⁶⁾。

细胞增殖的测定 采用MTT比色法⁽⁷⁾。ASMC按 $5-10 \times 10^4/\text{ml}$ 细胞密度接种于55孔平底培养板上(四川重庆分析仪器厂产品),每孔100μl,37℃正常培养过夜,用无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -Hank氏液洗三遍,然后加含不同浓度 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、或Scop的无 Ca^{2+} Eagle培养液100μl,继续培养72h,然后每孔加入MTT溶液10μl,继续培养4h后,吸弃培养液,每孔加酸化异丙醇(含40mmol/L HCl)100μl,充分混匀至紫蓝色甲臞(Formazon)

*药理学教研室

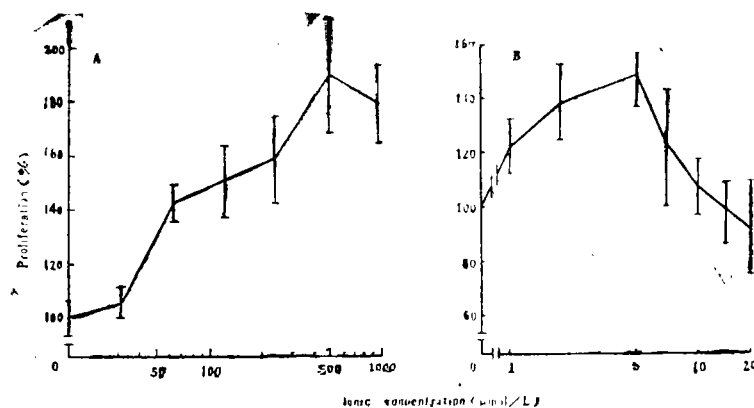


图1 Ca^{2+} 和 Cd^{2+} 对ASMC的增殖刺激作用

ASMC 先在55孔平底培养板37℃过夜培养,然后将培养液换成含 Ca^{2+} 或 Cd^{2+} 的无 Ca^{2+} ·Eagle培养液培养72h,然后MTT比色。以缺 Ca^{2+} 培养组作为100% ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 4$) A: Ca^{2+} , B: Cd^{2+}

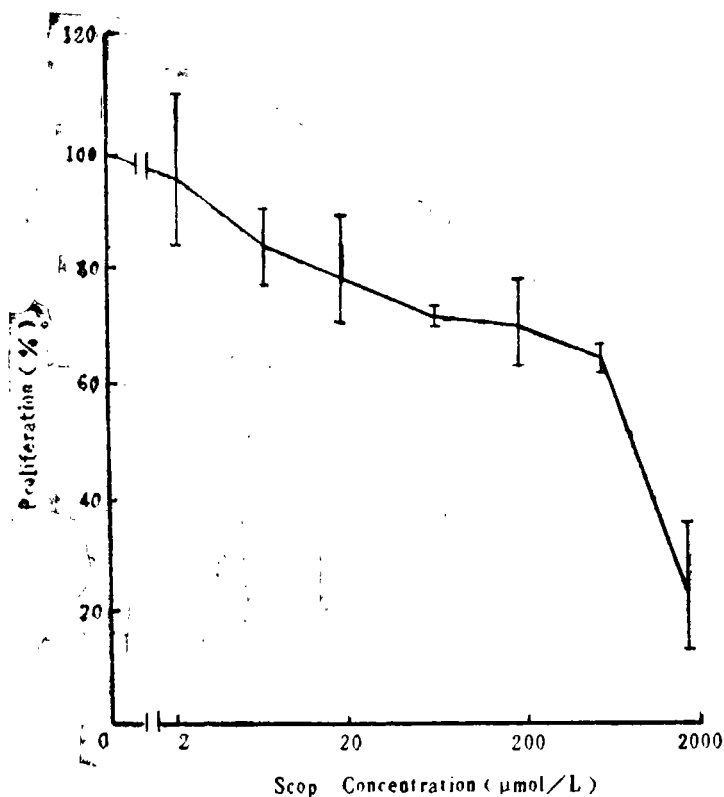


图2 有 Ca^{2+} 时Scop对ASMC增殖的影响

以不加药组作为100% ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 4$)

结晶完全溶解, 1 h内用酶标分光光度计570 nm和630nm 分别测定吸光值(A), 以 $\Delta A_{570-630}$ 作为细胞增殖的指标。各培养设4个重复孔。

实验结果

1. Ca^{2+} 和 Cd^{2+} 对ASMC增殖的作用: ASMC在含不同浓度的 Ca^{2+} 和 Cd^{2+} 的培养液中培养72h后, 用MTT比色法测定各培养孔中细胞增殖的情况。如图1所示, 与 Ca^{2+} 一样, Cd^{2+} 也能刺激ASMC增殖, 并呈现剂量依赖性关系。 Ca^{2+} 和 Cd^{2+} 的最适刺激浓度分别为500和 $5 \mu\text{mol/L}$, 此时ASMC的增殖能力分别为对照组(缺 Ca^{2+} 培养组)的 $186 \pm 33\%$ 和 $149 \pm 12\%$ 。但 Cd^{2+} 刺激ASMC增殖的范围较窄, 超过一定浓度则表现为抑制作用, 甚至使细胞变圆、脱落或死亡。 Cd^{2+} 对细胞增殖所表现的这种双向作用与它对钙调素(CaM)调节靶酶的效应相类似(8-10)。

2. 有 Ca^{2+} 培养时Scop对ASMC增殖的

影响: 正常时, Scop对ASMC的增殖表现为抑制作用, 并且是剂量依赖性的。如图2所示, $2.3 \mu\text{mol/L}$ Scop即开始抑制ASMC增殖, 其对ASMC的 IC_{50} 为 $920 \mu\text{mol/L}$ 。

3. 缺 Ca^{2+} 培养时Scop对ASMC增殖影响: 在缺 Ca^{2+} Eagle培养液中加入不同浓度的Scop, 观察其对ASMC增殖的影响。如图3所示, Scop对ASMC的增殖表现为双向作用, 即低浓度刺激、高浓度抑制ASMC增殖。Scop对ASMC的最适刺激浓度为 $20.6 \mu\text{mol/L}$, 此时ASMC的增殖能力为对照组(缺 Ca^{2+} 培养组)的 $135 \pm 23\%$ 。当Scop的浓度超过 $124 \mu\text{mol/L}$ 时, 则对ASMC的增殖又表现为抑制作用, 但其抑制程度较相同浓度有 Ca^{2+} 培养时显著降低。如在Scop的浓度为 $1667 \mu\text{mol/L}$ 时, 有 Ca^{2+} 和无 Ca^{2+} 时对ASMC的抑制率分别为 $64 \pm 7\%$ 和 $23 \pm 4.1\%$ 。

4. 培养液中含 Cd^{2+} 时Scop对ASMC增殖的影响: 当培养液中含最适刺激浓度的 Cd^{2+} , 即 Cd^{2+} 的浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 时, 向培

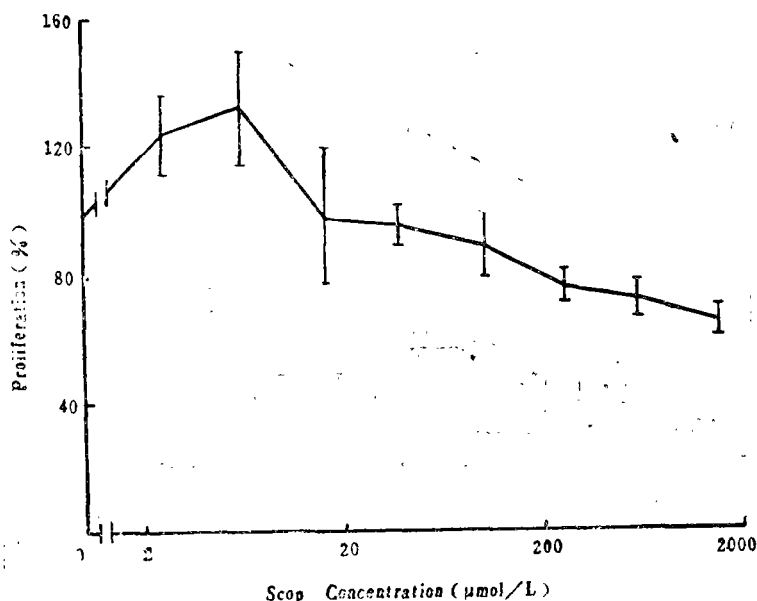


图3 缺 Ca^{2+} 时Scop对ASMC增殖的影响
以缺 Ca^{2+} 无药组作为100% ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 4$)

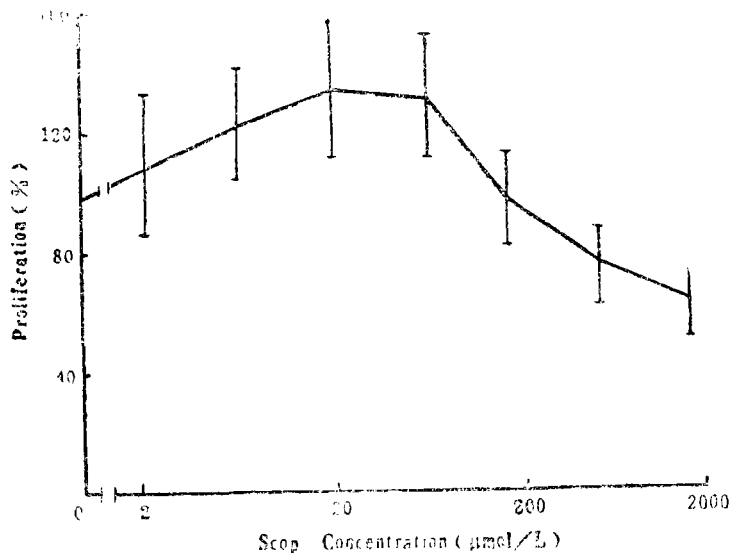


图4 有 Cd^{2+} 时Scop对ASMC增殖的影响
缺 Ca^{2+} 培养液中含 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} , 然后加不同浓度的Scop。以含 Cd^{2+} 无药组作为100% ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 4$)

养液中加入不同浓度的Scop, 观察其对ASMC增殖的影响。如图4所示, 在培养液中含有 Cd^{2+} 时, Scop对ASMC的增殖仍呈双向作用, 且是剂量依赖性的。Scop对ASMC的最适刺激浓度为 $6.1\text{ }\mu\text{mol/L}$, 此时ASMC的增殖能力为对照组(含 Cd^{2+} 培养组)的 $133 \pm 16\%$ 。这与缺 Ca^{2+} 培养时的 $135 \pm 23\%$ 相似, 所不同的刺激最适浓度减少。表明无 Ca^{2+} 和有 Cd^{2+} 时Scop对ASMC的作用相似。

讨 论

血管平滑肌细胞的增殖是动脉粥样硬化和高血压的共同病理基础, 也是引起动脉管腔狭窄的关键因素⁽¹¹⁻¹²⁾。因此, 对血管平滑肌细胞增殖调控的研究, 有助于阐明动脉粥样硬化和高血压的发病机理, 并为其预防和临床治疗提供有益的线索。

近年来赵昇皓提出了有关重金属中毒理论的新假说。根据这一假说, 凡离子半径与 Ca^{2+} 相近($0.74-1.20\text{ }\text{\AA}$)的二价重金属离子能取代 Ca^{2+} 作用于其靶子(酶或其它

钙结合蛋白), 引起与 Ca^{2+} 作用相似的结果。这在环核苷酸磷酸二酯酶(PDE)⁽⁶⁾、 Ca^{2+} -ATP⁽⁹⁾、肌球蛋白轻链激酶(MLCK)⁽¹⁰⁾、神经钙蛋白⁽¹³⁾及主动脉条⁽¹⁴⁾上都得到印证。我们的实验则从分子水平上进一步印证了重金属中毒理论的新假说。

刘元斌等⁽¹⁾首先报道Scop等对高 K^{+} 引起的兔基底动脉和肠系膜动脉环收缩有抑制作用, 且这种抑制作用是由于其阻断钙通道所致。我们从细胞水平上证实有 Ca^{2+} 时Scop对ASMC的增殖具有剂量依赖性抑制作用, 而缺 Ca^{2+} 时则表现为双向作用, 这进一步说明Scop对细胞的作用是与胞外 Ca^{2+} 浓度相联系, 与Scop具有钙通道阻断作用的结果相一致。当培养液中含有 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ Cd^{2+} 时, 尽管Scop对ASMC的增殖仍表现为双向作用, 但其抑制ASMC增殖的浓度减少(缺 Ca^{2+} 时为 $124\text{ }\mu\text{mol/L}$, 有 Cd^{2+} 为 $15\text{ }\mu\text{mol/L}$), 这可能与 Cd^{2+} 模拟 Ca^{2+} 的作用有关。至于Scop在缺 Ca^{2+} 时对ASMC刺激增殖的机理, 我们尚无法解释, 有待于进一步研究。

EFFECTS OF SCOPOLAMINE ON PROLIFERATION OF AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS

Zhang Mingzhi, et al

(Department of Biochemistry, Xuzhou Medical College, Xuzhou,
Jiangsu, China)

The effects of scopolamine on Proliferation of cultured rabbit aortic smooth muscle cells (ASMC) were studied. In the presence of Ca^{2+} , scopolamine inhibited the proliferation of ASMC, but in the absence of Ca^{2+} , the effect induced by scopolamine was biphasic, stimulatory at low concentration and inhibitory at high concentration. In the presence of Cd^{2+} , the effect of scopolamine was still biphasic.

KEY WORDS scopolamine, Cd^{2+} , smooth muscle cell proliferation, rabbits

参 考 文 献

1. 刘元斌, 等. 阿托品对基底动脉、肠系膜动脉环和门静脉条的作用. 中国药理学报 1987, 8(3): 224—227.
2. Whitfield JF, et al. The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. Mol Cell Biochem 1979, 27: 155.
3. Metcalfe JC, et al. Calcium and cell proliferation. Br Med Bull 1986, 42: 405.
4. Nilsson T, et al. The calcium antagonist inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. Atherosclerosis 1985, 58: 109—122.
5. Campbell JC, et al. The smooth muscle cell in culture. Physiol Rev 1979, 59: 1—61.
6. 卢坤平, 等. 钙和钙调素与血管平滑肌细胞增殖. 中国药理学与毒理学杂志 1988, 3: 166—171.
7. Mosman T. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983, 65: 55—63.
8. Chao SH, et al. Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius. Mol Pharmacol 1984, 26: 75—82.
9. 栗淑媛, 赵昇皓. 重金属离子对猪红细胞膜 Ca^{2+} -ATP酶的作用. 生物化学杂志 1988, 4: 166—173.
10. Mazzei GJ, et al. Environmental pollutant Cd^{2+} biphasically and differentially regulates myosin light chain kinase and differentially regulates myosin light chain kinase and phospholipid/ Ca^{2+} -dependent protein kinase. FEBS Lett 1984, 173: 124—128.
11. Schwartz SM and Ross R. Proliferation in atherosclerosis and hypertension. Progr Cardiovasc Dis 1984, 26: 355—372.
12. Ross R and Glomset J. Atherosclerosis and arterial smooth muscle. Science 1973, 180: 1332—1339.
13. 乔德永, 等. Hg^{2+} 对钙调神经磷酸酶的激活作用. 徐州医学院学报 1990, 10(2): 129—133.
14. 陈锦明, 等. 重金属离子刺激兔主动脉的收缩. 徐州医学院学报 1988, 8(1): 44—47.
(1990-10-25 收稿)