

· 实验研究 ·

雷公藤红素对血管平滑肌细胞内游离 Ca^{2+} 和 H^+ 浓度的影响*陈 星^{1△} 丰美福² 朱国英¹

内容提要 目的:观察雷公藤红素对血管平滑肌细胞(VSMC)内游离 Ca^{2+} 和 H^+ 浓度的影响。方法:采用荧光染色法,以激光扫描共聚焦显微镜动态研究了不同浓度的胎牛血清对单个血管平滑肌细胞内游离 Ca^{2+} 和 H^+ 浓度变化的影响效应。结果:30%胎牛血清可以引起细胞内一快速的、持续的游离 Ca^{2+} 浓度升高,而 30%胎牛血清加 0.3mg/L 雷公藤红素则可以产生抑制细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高的效应;20%胎牛血清可以降低细胞内 H^+ 浓度,0.2mg/L 雷公藤红素则可以促进细胞内 H^+ 浓度升高。结论:雷公藤红素可以拮抗胎牛血清诱发的血管平滑肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高的效应,其机理可能与该药物抑制了细胞膜的 Ca^{2+} 通道有关。

关键词 雷公藤红素 血管平滑肌细胞 钙 氢

Effect of Tripterine on Concentration of Free Calcium and Hydrogen in Vascular Smooth Muscle Cells Chen Xing, Feng Meifu, Zhu Guoying *The First Affiliated Hospital, Beijing Medical University, Beijing (100034)*

Objective: To investigate the effects of tripterine on concentration of free calcium (Ca^{2+}) and hydrogen (H^+) in vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods:** By using fluorescence staining method, changes of the free calcium and hydrogen in single VSMC were studied with laser confocal scanning analyzer after different concentrations of fetal calf serum (FCS), tripterine and FCS plus tripterine were added into the culture pools respectively. **Results:** The concentration of intracellular Ca^{2+} increased rapidly, sequentially and significantly after addition of 30% FCS ($P < 0.05$), 0.3mg/L tripterine plus 30% FCS had inhibition effect on the concentration of the intracellular Ca^{2+} , 20% FCS reduced the concentration of intracellular H^+ significantly ($P < 0.05$), and 0.2mg/L tripterine caused a significant increasing concentration of H^+ ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tripterine has an antagonistic action on the increasing concentration of intracellular Ca^{2+} induced by FCS, the inhibitory effect of tripterine on the Ca^{2+} channel of VSMC membrane may be responsible for this new mechanism.

Key words tripterine, vascular smooth muscle cells, calcium, hydrogen

冠状动脉介入性治疗(PTCA)是心肌血运重建的重要方法,但术后患者 3~6 个月时的再狭窄率为 30%~40%,使其临床应用受到了一定的限制⁽¹⁾,其主要原因为动脉血管平滑肌细胞(VSMC)的过度增殖。目前已有资料显示,血清中的一些生物活性物质诸如血管紧张素,血小板源性生长因子等均有促进 VSMC 增殖的功能,这些物质可以通过调节 VSMC 内的

Ca^{2+} 浓度,进而引起 VSMC 过度增殖^(2,3)。本研究应用激光扫描共聚焦显微镜动态观察了胎牛血清(FCS)调节 VSMC 内游离 Ca^{2+} 和 H^+ 浓度变化,以及雷公藤红素对此变化的影响效应。

材料和方法

1 实验动物 选用 Wistar 雄性大鼠 6 只,月龄 8~10 周,体重 100~120g,由中国科学院动物研究所养殖场提供。

2 药品及主要试剂 雷公藤红素为上海医科大学药学院天然药物化学研究室合成(1996 年产品),药品为红色针尖状结晶体,干燥室温条件下保存;RPMI 1640 培养基,胎牛血清(FCS),Hank 氏液均系 Gibco

* 卫生部科研基金资助课题(94-1-248)

1. 北京医科大学第一医院心内科(北京 100034);2. 中国科学院动物研究所

△ 现在天津市胸科医院心内科(天津 300051)

产品(美国);分子荧光探针 Fluo-3-AM 和 BCECF-AM 为 Eugene 产品(美国)。

3 主要仪器 激光扫描共聚焦显微镜系统(Laser Confocal Scanning Microscope, Insight-plus)为美国 Meridian 产品。

4 实验方法

4.1 VSMC 培养 分离大鼠胸主动脉,参照赵三妹等^[4]方法,选用第 5~8 代 VSMC,实验前将细胞置于微型培养皿中以无血清 1640 培养基培养 24h,使细胞生长处于 G_0 期。

4.2 荧光探针分别标记细胞内游离 Ca^{2+} 和 H^+ 用二甲亚砜(DMSO)将 Fluo-3-AM 和 BCECF-AM 配成 1.0mol/L 储备液, $-20^{\circ}C$ 冻存,使用时以 Hank 氏液稀释, Fluo-3-AM 工作液终浓度为 $7.5\mu mol/L$, BCECF-AM 为 $4.5\mu mol/L$;实验前将各组细胞以 Hank 氏液洗 3 次,加入荧光探针后,避光 $37^{\circ}C$ 孵育 30min,然后吸去染料,再用 Hank 氏液洗 3 次,每微型培养皿中加入 0.5ml Hank 氏液用于实验。

4.3 实验分组 FCS 组:分别加入 10%、20% 和 30% FCS 处理 VSMC,观察细胞内游离 Ca^{2+} 和 H^+ 浓度变化。雷公藤红素组:(1)单用不同浓度雷公藤红素处理 VSMC,观察细胞内 Ca^{2+} 和 H^+ 浓度变化;(2) 30% FCS 加雷公藤红素($0.3mg/L$)处理 VSMC,观察细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化。

4.4 VSMC 内游离 Ca^{2+} 和 H^+ 浓度测定 细胞培养皿置于激光扫描共聚焦显微镜的载物台上,以 488nm 波长激光激发 Fluo-3 和 BCECF 发生荧光,并用高倍油镜和低倍镜进行检测;选择合适的视野后,开始扫描,每个细胞样本均先连续扫描 40s 测定基础荧光强度,并观察强度无变化后,按分组加入不同处理因素,继续连续扫描 60s 动态观察细胞内荧光强度的变化,每组观察 6 个培养皿,每培养皿观测 1~2 个细胞。

5 数据分析 将测的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异显著性检验用方差分析。

结 果

1 VSMC 内游离 Ca^{2+} 浓度的变化 当分别以 10% FCS 和 20% FCS 处理 VSMC 时,细胞内 Ca^{2+} 荧光强度无明显变化;不同浓度雷公藤红素(0.1 、 0.2 和 $0.3mg/L$)单独处理 VSMC,细胞内 Ca^{2+} 荧光强度也无明显变化。30% FCS 处理 VSMC 时,细胞内 Ca^{2+} 荧光强度随扫描时间而逐渐明显增强, Ca^{2+} 荧光强度基线值为 $(864.0 \pm 54.6)u$, 30% FCS 刺激细胞后,于扫描第 20s 时, Ca^{2+} 荧光强度达到最强,净增值为

279u,较基线值明显增加($P < 0.05$);连续扫描结束(第 60s)荧光强度仍较基线值高,净增值为 131u;当 $0.3mg/L$ 雷公藤红素加 30% FCS 共同处理 VSMC 时,细胞内 Ca^{2+} 荧光强度经连续扫描 60s 检测较基线值无明显强弱变化,见图 1,图 3、4(插页 4)。

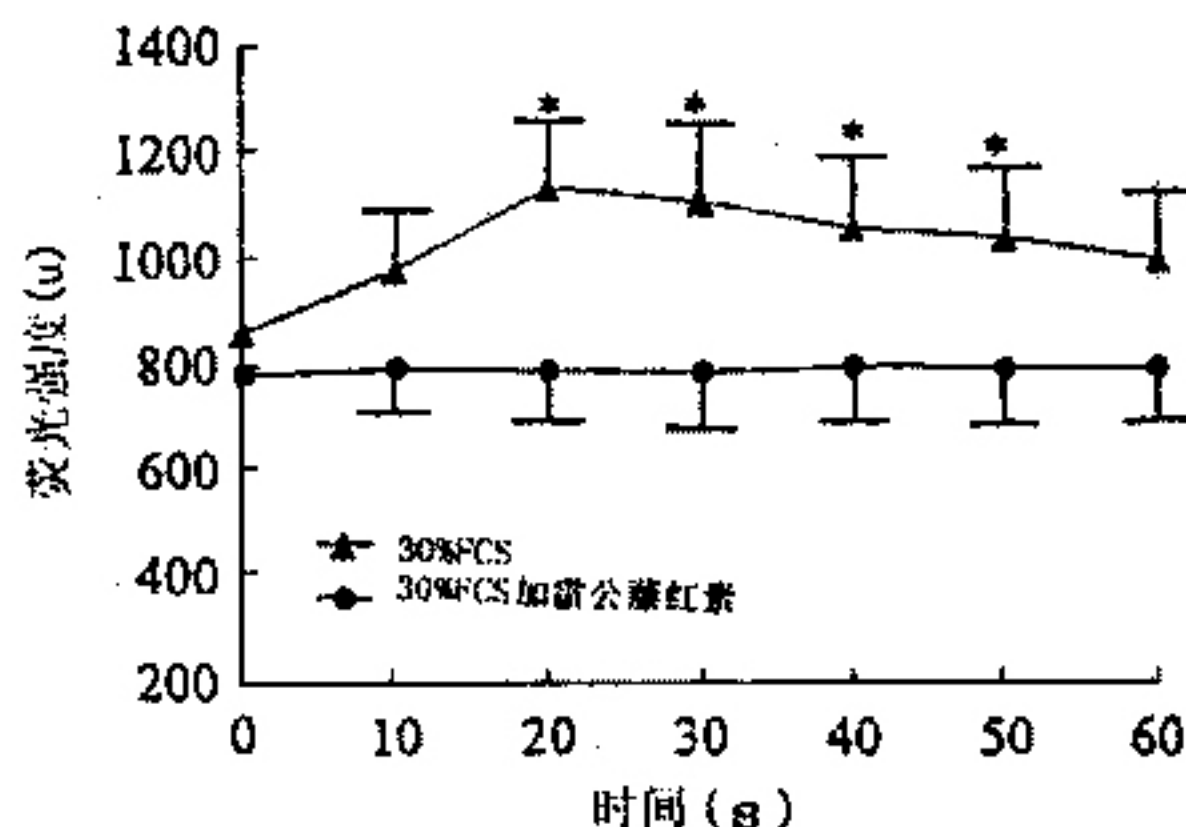


图 1 30% FCS 和 30% FCS 加 $0.3mg/L$ 雷公藤红素分别对细胞内 Ca^{2+} 荧光强度的影响

2 VSMC 的游离 H^+ 浓度的变化 当 10% FCS 处理 VSMC 时,细胞内 H^+ 荧光强度经连续扫描 60s 观察,未见明显变化。当 20% FCS 处理 VSMC 时,细胞内 H^+ 荧光强度于扫描第 50s 起明显降低。当 $0.2mg/L$ 雷公藤红素处理 VSMC 时,细胞内 H^+ 荧光强度基线值为 $(903.4 \pm 98.4)u$, 药物处理后,于扫描第 30s 时 H^+ 荧光强度达到最强,荧光强度净增值为 199u,较基线值明显增加($P < 0.05$);第 60s 连续扫描结束时,荧光强度仍较基线值高,净增值为 134u,见图 2,图 5、6(插页 4)。

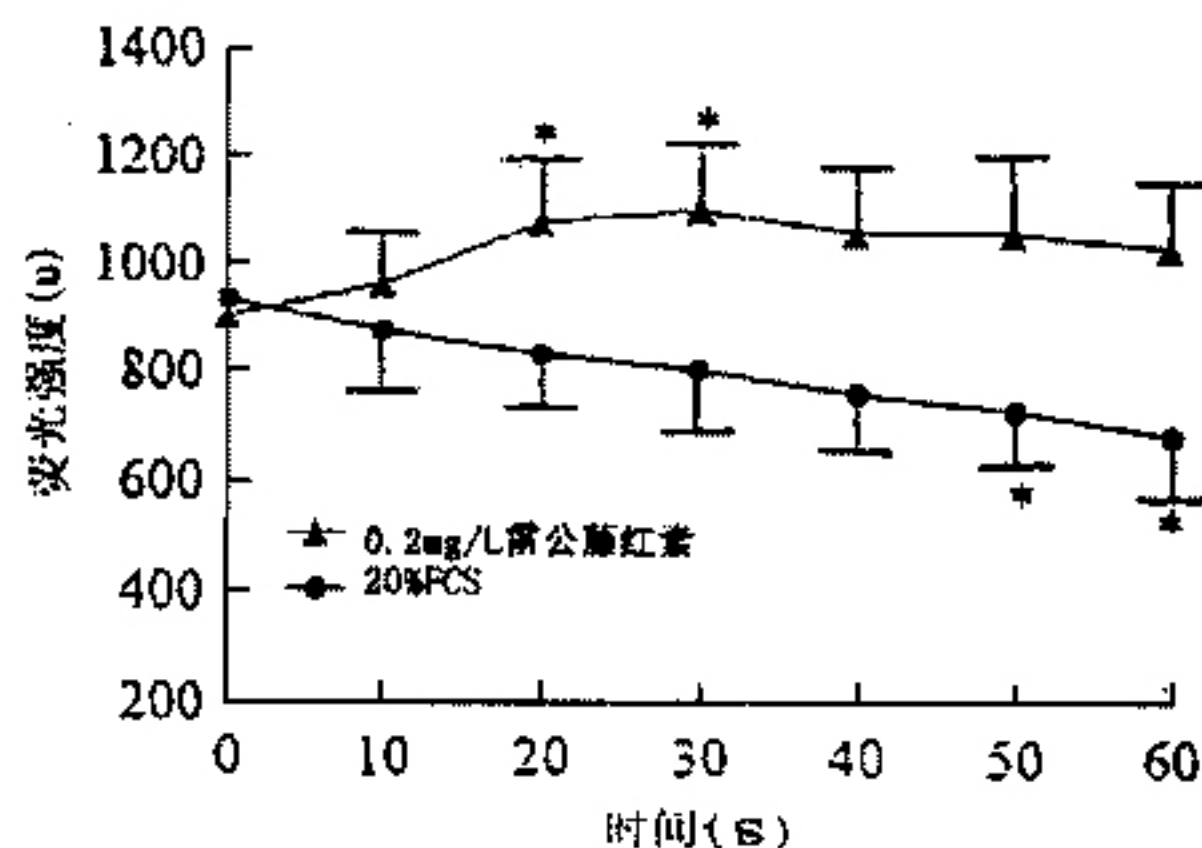


图 2 $0.2mg/L$ 雷公藤红素和 20% FCS 分别对细胞内游离 H^+ 荧光强度的影响

讨 论

目前已有研究资料显示,许多血管活性物质和生

长因子诸如血管紧张素、内皮素、去甲肾上腺素、组织胺以及血小板源性生长因子等均可以通过调节细胞内游离钙离子的浓度引起细胞的收缩与分裂^(2,5,6); PTCA 术后血管受损, 上述的一些活性物质可能在血管损伤局部的浓度明显增加, 这提示血管内皮受损后 VSMC 异常增生可能与细胞内游离钙离子的浓度升高有一定的关系。

细胞内钙离子浓度的升高是由于钙调节的改变所引起的, 细胞钙调节包括细胞膜对钙的转运和细胞器对钙的摄取、储存和释放。由于 VSMC 线粒体少, 肌浆网欠发达, 肌膜储钙量又少, 故细胞外钙的流入与肌细胞膜对钙离子的主动转运是决定细胞内钙离子浓度的主要因素⁽⁷⁾。本实验观察到, 当依次增加 FCS 浓度到一定水平(30% FCS)处理 VSMC 后, 细胞内游离钙离子浓度明显增高; 这似与 FCS 所富含的血管活性物质和生长因子可能在短时间内促进细胞膜钙离子通道的开放增加了细胞对钙的摄取有关。而当用 30% FCS 和雷公藤红素共同处理细胞后, VSMC 内钙离子浓度却无明显改变; 这提示雷公藤红素可能具有拮抗血管活性物质和生长因子促进细胞膜钙离子通道主动转运钙的作用。本实验还观察到, 20% FCS 还可以使细胞内 H^+ 浓度轻度下降, 而雷公藤红素则可以促使细胞内 H^+ 浓度升高; 这提示细胞外环境的不同处理因素可能影响到细胞内 pH 值的变化, 而 pH 值的改变与细胞对钙的摄取又有一定的关系⁽⁸⁾。钙离子是 VSMC 收缩、分裂与增殖的重要传导信号, 抑制 VSMC 内游离钙离子浓度的升高, 对防治以 VSMC 过度增殖为主要特征的再狭窄和动脉硬化疾病有重要意义⁽³⁾。雷公藤作为天然药物, 具有抑制免疫及肿瘤细胞生长的功效, 临床上多用于治疗与免疫功能失调相

关的疾病以及肿瘤的辅助治疗⁽⁹⁾, 还未有将其用于心血管疾病治疗的报告。本研究结果提示, 如果将雷公藤类药物用于防治 VSMC 过度增殖, 将有可能减少 PTCA 术后再狭窄的发生, 这是很值得进一步深入研究的课题。

参 考 文 献

1. Hamon M, Bauters EP, McFadden EP, et al. Restenosis after coronary angioplasty. *Eur Heart J* 1995;16(suppl 1):33—48.
2. Clum GF, Schachter M, Hughes AD. Contracting mechanisms of intracellular calcium (Ca^{2+}) elevation by angiotensin II and platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) in human vascular smooth muscle cells (VSMCs). *Biochem Soc Trans* 1995;23:170S—174S.
3. Adelstein R, Sellar J. Effects of Calcium on vascular smooth muscle contraction. *Am J Cardiol* 1987;57:48—51.
4. 赵三妹, 夏人仪, 王宗立, 等. 动脉平滑肌细胞的培养. *中华病理学杂志* 1987;6:260—261.
5. Tomohisa I, Hume JR, Keer KD. Modulation of K^+ and Ca^{2+} channels by histamine H_1 receptor stimulation in rabbit coronary artery cells. *J Physiol* 1993;468:379—382.
6. Yoshihito I, Oike M, Nakao L, et al. Endothelin augments unitary calcium channel current on the smooth muscle cell membrane of guinea-pig. *J Physiol* 1990;423:171—175.
7. Movesesian MA. Calcium physiology in smooth muscle. *Prog Cardiovasc Dis* 1982;25:211—213.
8. Moolenaar WH, Tertoolen LGJ, Delant SW. The regulation of cytoplasmic pH in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1984;259:7563—7566.
9. 王翠娣, 郭玉璞. 雷公藤的有效成分, 药理作用及临床应用. *中国中西医结合杂志* 1993;13(8):507—509.

(收稿:1998-07-29 修回:1999-05-03)

2000 年本刊将扩大版面

19 年来, 本刊在党的中西医结合方针指引下, 在广大的读者和作者支持下, 大量报道了我国中西医结合在临床、科研、预防、教学等方面的经验和成果, 以及国内外有关本专业的进展, 为促进中西医结合学术交流, 提高中西医结合水平, 继承和发扬我国传统医药学, 促进我国医学科学现代化作出了应有的贡献。

近几年来, 由于来稿较多, 致使文稿刊出周期延长, 影响了学术交流, 根据这一情况, 本刊决定自 2000 年起扩大版面, 由目前的大 16 开本、64 页改为大 16 开本、80 页。本刊扩版后, 仍坚持提高为主, 兼顾普及, 侧重临床, 重视实验研究的编辑方针, 相应增加临床经验及基层园地文章, 增设“博士之窗”栏目, 适当扩大“实验研究”栏目篇幅。我们希望扩版后, 能更及时传递更多中西医结合学术信息, 进一步活跃学术气氛, 也希望广大读者和作者继续给本刊以积极的支持与关注, 踊跃投稿(如系博士研究生请注明), 积极订阅, 共同把本刊办得更好。

(本刊编辑部)

雷公藤红素对血管平滑肌细胞内游离 Ca^{2+} 和 H^{+} 浓度的影响

陈 星 丰美福 朱国英

(正文见 538 页)

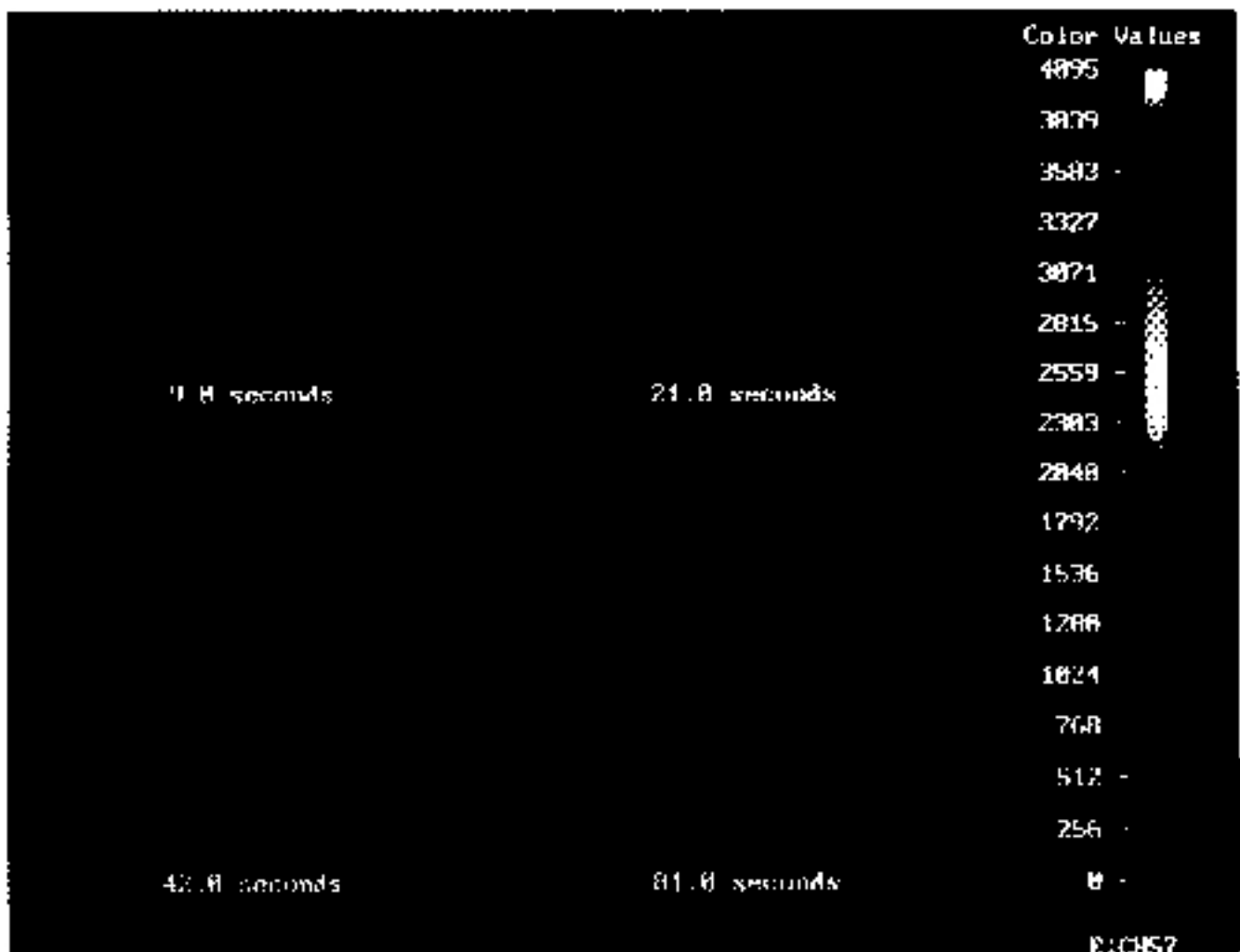


图3 VSMC内游离 Ca^{2+} 浓度变化在激光扫描共聚焦显微镜下实时分段扫描图(30% FCS 处理 VSMC)

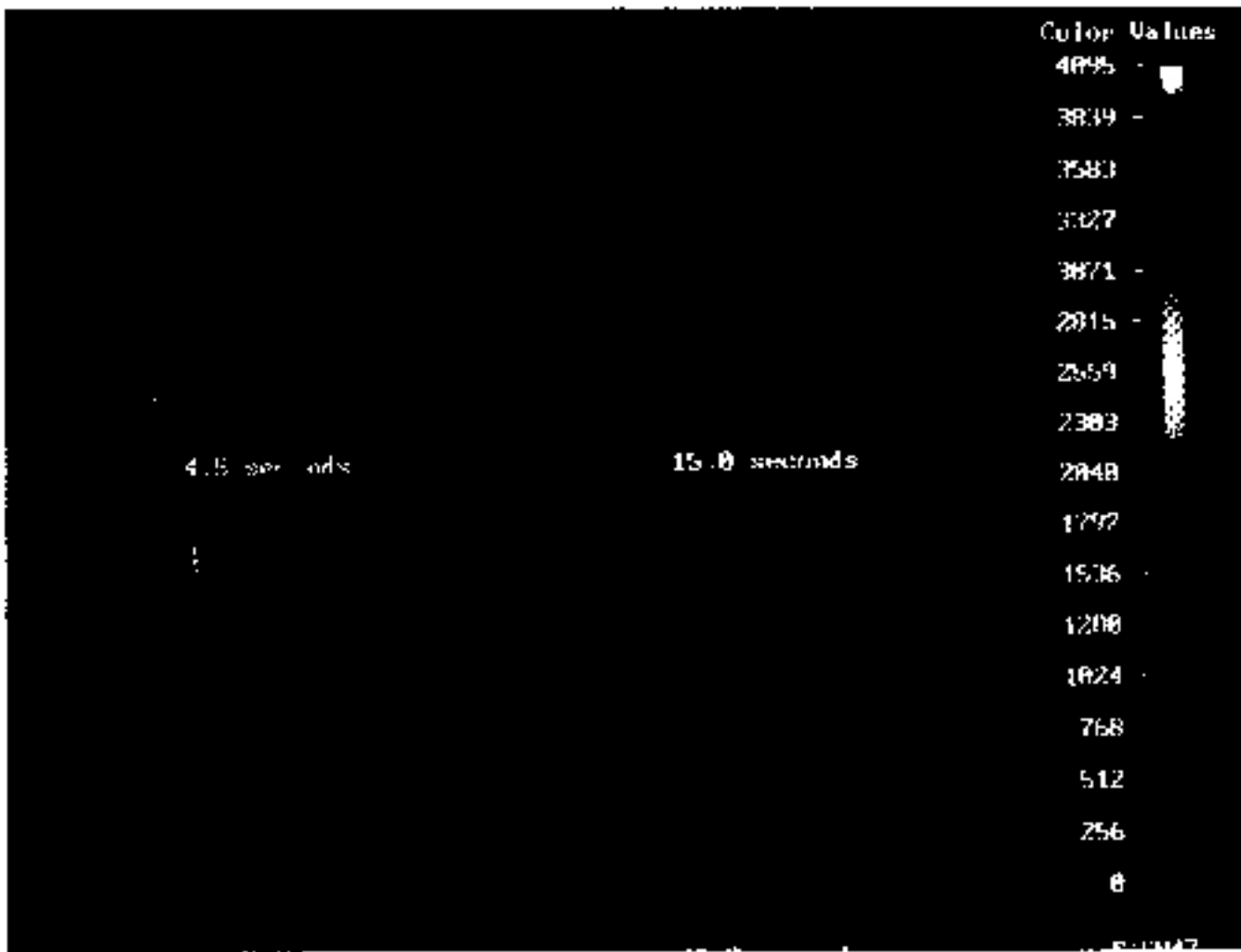


图4 VSMC内游离 Ca^{2+} 浓度变化在激光扫描共聚焦显微镜下实时分段扫描图(30% FCS 加雷公藤红素处理 VSMC)

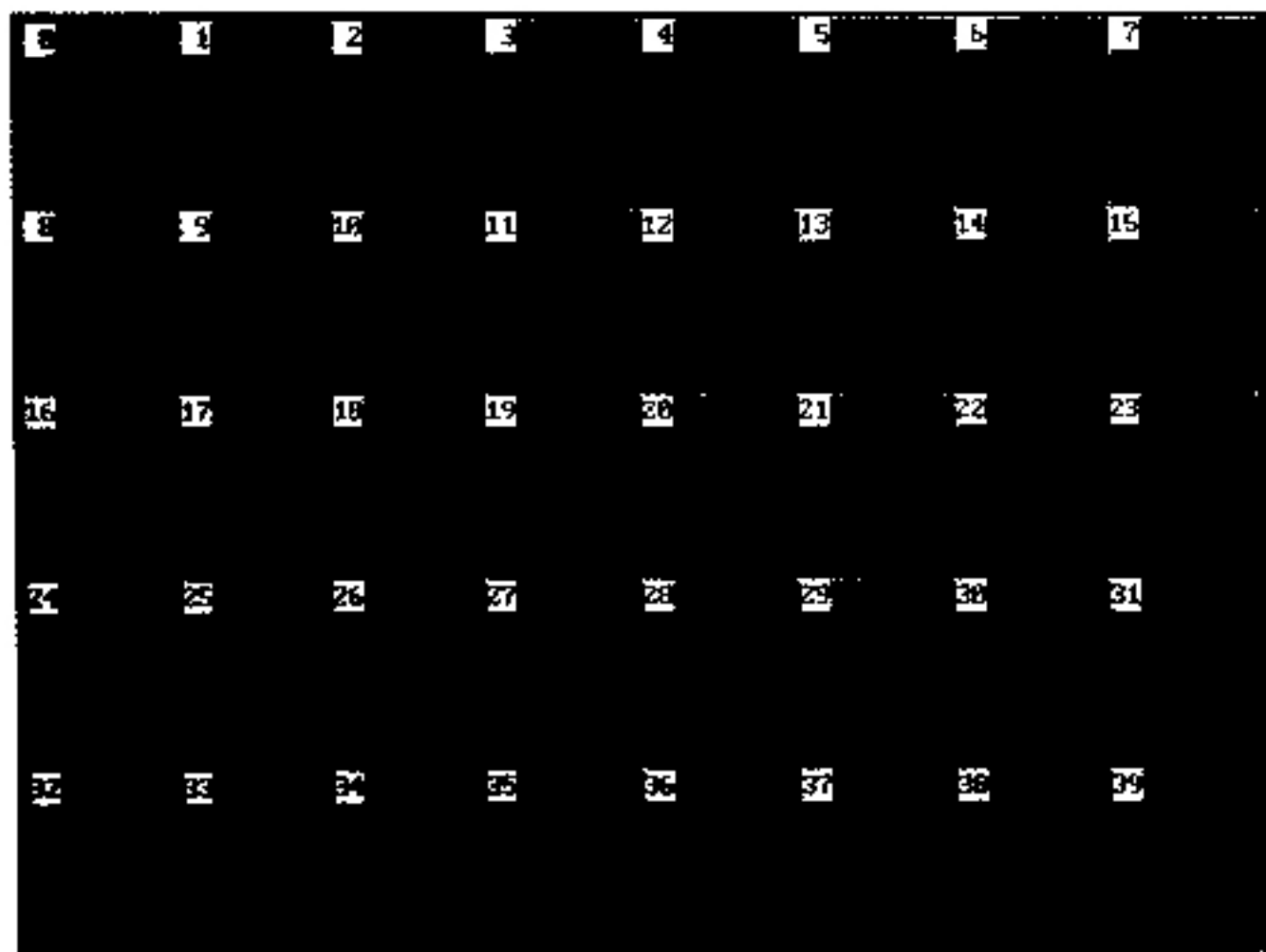


图5 VSMC内游离 H^{+} 浓度变化在激光扫描共聚焦显微镜下实时连续扫描图(20% FCS 处理 VSMC)



图6 VSMC内游离 H^{+} 浓度变化在激光扫描共聚焦显微镜下实时连续扫描图(雷公藤红素处理 VSMC)