

钙拮抗剂硝苯啶抑制培养的 动脉平滑肌细胞增殖

附属第一医院心血管病研究室 胡中江 黄元伟 陈天秩

内容提要 本文用动脉平滑肌细胞(SMC)为实验模型,观察硝苯啶(Nifedipine)对SMC增殖的影响,以探讨它抗动脉粥样硬化(AS)的机理。结果显示:在10%人血清、人高脂血清低密度脂蛋白(LDL)和胰岛素等促SMC增殖因素的作用下,硝苯啶显示了明显的抑制SMC增殖的作用,且抑制作用的时间持久。这一结果提示,硝苯啶可能通过干扰动脉SMC的增殖而有防治人类AS的作用。

关键词 钙通道阻断剂/药理学; 硝苯啶/药理学; 血管平滑肌/病理生理学; 动脉粥样硬化/病因学

80年代初以来,动物实验证明,钙拮抗剂硝苯啶等可使高胆固醇饮食的动物其主动脉壁AS病变范围明显减小,并抑制AS的形成^[1]。SMC是哺乳类动物动脉中膜唯一的细胞类型,它的增殖在AS的形成过程中起着关键性作用,SMC的大量增殖导致大量结缔组织基质成分的产生和细胞内外脂质沉积,最终导致纤维斑块的形成^[2]。虽然,对钙拮抗剂抗AS的机理研究,近年来主要从细胞水平进行^[1],但迄今关于钙拮抗剂影响动脉SMC增殖作用的报告甚少,且都是用动物的SMC进行实验。因此,本实验选用人胚胎主动脉SMC(HSMC)和新西兰兔主动脉SMC(RSMC)作为实验模型,观察钙拮抗剂硝苯啶对其增殖作用的影响。

1 材料和方法

取5~8个月胎龄的新鲜人胚胎和4月龄新西兰兔,参照文献介绍的方法^[3],用胶原酶消化培养法,进行主动脉SMC的原代及传代培养。

取入高脂混合血清(胆固醇2.22g/L,

甘油三脂1.41g/L),按Chung法^[4]进行超速离心,离心后分层收集各脂蛋白区带并与人血清同时进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离的LDL为电泳纯的单一脂蛋白组分,去脂血清(LPDS)中无脂蛋白成分混杂。经透析和浓缩后,以Lowry法^[5]测定LDL的蛋白含量为2.75g/L(以牛血清白蛋白为标准);以胆固醇酶联试剂(杭州药厂产,批号880227)测定LPDS的胆固醇含量<0.25g/L。

取第2~5代HSMC或第5~8代RSMC,经常规消化后,以10%小牛血清-RPMI 1640(日本制药株式会社,批号87705)培养液制成细胞悬液(细胞数 $2 \sim 4 \times 10^7/L$),以1ml/瓶分装于青霉素小瓶中,37℃培养48h,使SMC贴壁生长。然后随机分成若干组,每组3瓶,根据实验目的加入实验液:①10%人血清组:用含10%人血清的RPMI 1640培养液;②LDL组:用5%LPDS培养液(含蛋白25mg/L);③胰岛素组:用1%小牛血清培养液(含胰岛素10U/L)。培养24h后,实验组加入不同浓

度的硝苯啶无水乙醇溶液10 μ l (硝苯啶原药粉由浙江温岭制药厂提供), 对照组加入相应容积的无水乙醇, 无水乙醇的最终浓度小于1%。并加入³H-TdR (上海原子核研究所) 0.5~1 μ Ci/瓶。24h后, 弃去实验液, 用D-Hank 液洗涤数次, 常规消化后, 制成细胞悬液, 取出一定量的细胞悬液用0.2mol/L的NaOH溶液溶解细胞, 以Lowry法测定细胞蛋白量。其它细胞悬液以纸片法^[6]用Packard 4000型自动液闪测定仪测定cpm值。机器效率为63%, 计数时间1 min, ³H-TdR参入量以cpm/mg细胞蛋白表示。

2 结 果

2.1 硝苯啶对动脉SMC增殖的影响 在10%人血清、LDL和胰岛素等促增殖因素刺激动脉SMC增殖的条件下, 不同浓度硝苯啶对SMC增殖的抑制作用见表1。在用HSMC作实验时, 硝苯啶浓度为10⁻⁷mol/L即可明显抑制10%人血清刺激的DNA合成, 而硝苯啶浓度达10⁻⁶mol/L时, 才明显抑制LDL刺激的DNA合成。用RSMC作实验时, 明显地抑制LDL和胰岛素作用下的³H-TdR参入DNA的硝苯啶浓度为10⁻⁶mol/L。

表1 不同浓度 (mol/L) 硝苯啶对³H-TdR参入SMC的影响 (n = 3)

促SMC 增殖因素	SMC 来源	³ H-TdR参入量 (cpm/mg $\times 10^3$, $\bar{X} \pm SD$)					
		0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
10%人血清	HSMC	19.0 $\pm$ 3.7	14.1 $\pm$ 1.7	17.7 $\pm$ 4.4	12.9 $\pm$ 1.3*	5.0 $\pm$ 0.4**	3.8 $\pm$ 0.4**
LDL	HSMC	8.6 $\pm$ 3.3	9.7 $\pm$ 2.4	7.1 $\pm$ 1.5	6.2 $\pm$ 0.8	3.1 $\pm$ 0.7**	2.0 $\pm$ 0.4**
LDL	RSMC	345.1 $\pm$ 21.9		263.3 $\pm$ 2.7	326.0 $\pm$ 41.2	266.8 $\pm$ 25.3**	93.6 $\pm$ 25.0**
胰岛素	RSMC	11.4 $\pm$ 1.4		12.3 $\pm$ 1.3	12.4 $\pm$ 2.1	7.5 $\pm$ 0.8*	2.8 $\pm$ 0.2**

* P<0.05, ** P<0.01

2.2 硝苯啶作用时间与³H-TdR参入量的关系 用10%人全血清作为促增殖因素, 实验组加入10⁻⁵mol/L硝苯啶无水乙醇溶液, 对照组加入相同容积无水乙醇, 观察硝苯啶对HSMC的³H-TdR参入量的影响。在人血清作用下, 对照组³H-TdR参入量随着时间而逐渐增加 (r=0.95), 而在加入硝苯啶的实验组, 硝苯啶作用8h后, ³H-TdR参入就已明显地抑制, 在作用16、24及32h后, 硝苯啶的抑制作用均很明显 (表2), t检验显示每一培养时间两组间均存在显著性差异 (P<0.01)。

3 讨 论

10%人血清、高脂血清以及胰岛素均是引起动脉SMC增殖的重要因素, 高脂血清中刺激动脉SMC增殖的主要成分是LDL, 10%人血清对动脉SMC增殖的促进作用与血小板衍生生长因子(PDGF)有关^[7]。

Nilsson 等报道^[8], 硝苯啶对小牛血清或PDGF刺激大鼠动脉SMC增殖有抑制作用。我们用10%人血清, 人高脂血清LDL和胰岛素作为促SMC增殖因素, 观察钙拮抗剂硝苯啶抗人及兔动脉SMC增殖的作用, 使实验结果更接近临床实际。实验结果显示, 硝苯啶明显地抑制HSMC及RSMC的增殖, 并且作用时间持久。虽然, 硝苯啶抑制动脉SMC增殖的具体机理尚未阐明, 然而有理由设想, 就象硝苯啶的其他作用效果一样, 硝苯啶抑制动脉SMC增殖的作用是通过其改变钙的利用而实现的, 有研究证实^[9], 钙和它的细胞内受体钙调素 (cal-

表2 硝苯啶 (10⁻⁵mol/L) 不同作用时间 (h)对HSMC的³H-TdR参入量的影响

组 别	³ H-TdR参入量 (cpm/mg $\times 10^3$, $\bar{X} \pm SD$)			
	8	16	24	32
对照组	10.9 $\pm$ 1.2	26.8 $\pm$ 2.5	34.6 $\pm$ 2.2	38.9 $\pm$ 2.3
实验组	1.9 $\pm$ 0.5	3.9 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.5	6.8 $\pm$ 0.6

实验组、对照组均 n=3

modulin)调节着细胞(包括血管SMC)的增殖,当动脉SMC培养液中的游离钙浓度增加时,细胞增殖能力增加,钙通过活化钙调素,能触发钙调素合成,引起SMC增殖。PDGF、内皮生长因子或血清等因素加入处于休止期的人培养细胞后,可迅速地引起胞浆内游离钙浓度升高^[10],而该钙浓度的升高可被钙拮抗剂硝苯啶所阻止,导致动脉SMC增殖的抑制^[11]。

参 考 文 献

1. Weinstein DB, et al. Am J Cardiol 1987; 59(3): 163B
2. Ross R. N Engl J Med 1986; 314(8): 488
3. 赵三妹, 等, 中华病理学杂志 1987; 16(4): 260
4. Chung BH, et al. J Lipid Res 1980; 21(3): 284
5. Lowry OH, et al. J Biol Chem 1951; 193(1): 265
6. <放射性同位素在基础医学中的应用>编辑组, 放射性同位素在基础医学中的应用, 第1版, 北京: 原子能出版社, 1979; 95
7. 蔡海江, 等, 动脉粥样硬化与冠心病, 北京: 人民卫生出版社, 1982: 161
8. Nilsson J, et al. Atherosclerosis 1985; 58(1-3): 109
9. 卢坤平, 等, 中国药理学与毒理学杂志 1988; 2(3): 166
10. Moolenaar WH, et al. J Biol Chem 1984; 259(13): 8066
11. Issei Komuro, et al. Arteriosclerosis 1988; 8(5): 618a

(1989年9月25日收稿, 1990年3月25日修回)

SUPPRESSIVE EFFECT OF NIFEDIPINE ON PROLIFERATION OF AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS IN CULTURE

Hu Shenjiang, Huang Yuanwei and Chen Tianzhi.

Laboratory of Cardiovascular Diseases, The First Affiliated Hospital

Human fetal and rabbit aortic smooth muscle cells (HSMC and RSMC) were successfully cultured. The effect of nifedipine on HSMC and RSMC proliferation was observed by ³H-thymidine incorporated into the DNA of SMC. The DNA synthesis of HSMC was found to be significantly inhibited at 10⁻⁷ mol/L nifedipine in serum-containing medium (P<0.05 vs. control), at 10⁻⁸ mol/L nifedipine in LDL-containing medium (P<0.01 vs. control), and the DNA synthesis of RSMC was inhibited at 10⁻⁶ mol/L nifedipine in insulin-or LDL-containing medium (P<0.05 or <0.01 vs. control).

KEY WORDS Calcium Channel Blockers/pharmacol;
Nifedipine/pharmacol; Atherosclerosis/etiol;
Muscle, Smooth, Vascular/physiopathol