

对氯苄基四氢小檗碱(CPU-86017)及L-甲状腺素对大鼠主动脉环 α_{1A} 、 α_{1B} 亚型的选择性

何令帅, 戴德哉*, 陈静, 黄敏

(中国药科大学药理研究室, 南京 210009)

摘要 目的 研究CPU-86017及L-甲状腺素对血管平滑肌收缩的影响及对 α_{1A} 、 α_{1B} 亚型的选择性。方法 以有钙、无钙液中由累积浓度去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)引起的大鼠胸主动脉环的收缩, 比较CPU-86017($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对正常及慢性甲状腺给药组(Thy)大鼠血管平滑肌(VSM)的 α_1 受体的抑制作用。结果 在无钙液中由 α_{1B} 引起的内钙释放所致VSM收缩占有钙液中VSM最大收缩的百分率, 正常组和Thy组分别为 $48.8\% \pm 8.1\%$ 和 $69.4\% \pm 9.7\%$ ($P < 0.01$), 复钙后由 α_{1A} 引起的外钙内流所致VSM收缩百分率, 分别为正常组 $47.7\% \pm 5.0\%$, Thy组为 $22.1\% \pm 9.4\%$ ($P < 0.01$)。加入CPU-86017($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)后, 对内钙释放所致的收缩%, 正常对照组为 $35.2\% \pm 10.1\%$, Thy组为 $35.2\% \pm 10.2\%$; 而对外钙内流引起的收缩百分率则分别为 $13.9\% \pm 7.1\%$ 及 $20.7\% \pm 7.5\%$ 。结论 L-甲状腺素使 α_{1B} 的作用增强, 而减弱 α_{1A} 的作用。CPU-86017在正常情况下对VSM的 α_{1A} 的抑制强于 α_{1B} 受体亚型。

关键词 CPU-86017; L-甲状腺素; α_{1A} ; α_{1B} ; 胸主动脉; 钙

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)03-0245-05

对氯苄基四氢小檗碱(CPU-86017)是我校药化研究室合成的新型抗心律失常药, 有抗多种心律失常模型的作用。电生理结果显示^[1,2]: CPU-86017能抑制 $V_{\max}$ 及两相性调控动作电位时程, 具有III类抗心律失常药物的特征。研究证实CPU-86017对 Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 通道皆有阻断作用^[3]。

甲状腺素直接作用于肌细胞核受体, 增加rRNA, mRNA含量, 增加肌球蛋白重链基因表达, 增加蛋白质合成, 间接作用增加交感肾上腺素能神经张力, 增加对儿茶酚胺的敏感性, 经肌膜流入细胞内钙增加, 肌浆网对钙的摄取增加, 造成细胞内钙超载^[4]。我室以前研究表明, 在高钾引起的电压依赖性钙通道(VDC)开放所致VSM收缩中, CPU-86017抑制VSM的钙内流强于钙释放, 而左旋甲状腺素加强二者^[5]。本文通过在有钙及无钙中由累积浓度的NE($0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 至 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)引起的收缩, 观察CPU-86017对 α_1 受体亚型 α_{1A} 、 α_{1B} 抑制作用的选择性, 并通过甲亢大鼠血管的收缩变化观

察甲亢状态下VSM上的 α_1 受体亚型的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

SD大鼠, 体重200~250 g, 雌雄兼用, 由江浦动物中心提供(合格证号: 苏动质 97001)。CPU-86017, 本校药化研究室提供; 去甲肾上腺素, Sigma公司产品(Lot 103H0073); L-甲状腺素, 进口分装品; 其他试剂均为市售国产分析纯。

1.2 动物模型的建立

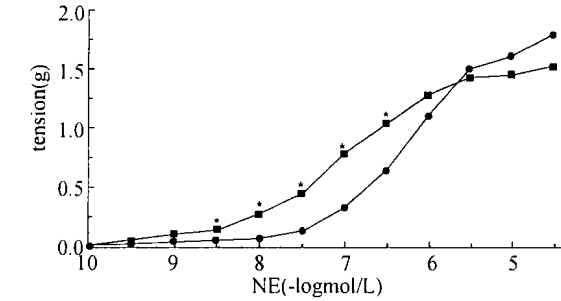
将大鼠按体重及性别随机分为正常对照组和Thy模型组, 正常组6只, Thy组8只。Thy组大鼠每只每天腹腔注射 0.5 mg/kg L-甲状腺素(L-甲状腺素混悬液于 0.5% CMC-Na溶液中), 正常对照组大鼠每只每天腹腔注射同等体积的 0.5% CMC-Na溶液, 连续10 d。第11 d为实验日, 处死动物。

1.3 血管收缩反应

大鼠击昏后开胸, 取出胸主动脉, 置于冰冷的

含 100% O_2 的 Krebs-Hendleleit (K-H) 液 (含 NaCl 119, $NaHCO_3$ 25, KCl 4.6, $MgCl_2$ 1.2, KH_2PO_4 1.2, $CaCl_2$ 2.5, 葡萄糖 $11\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中, 去掉周围结缔组织, 剪成 3 mm 左右的环, 置于含 100% O_2 的 15 ml K-H 液的浴皿中, 恒温 37°C 左右, 连接张力换能器, 并调节静息张力 1 g, 每 20 min 换一次液, 平衡 1h 后用 $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NE 预处理两次后洗脱至基线再开始实验。

取正常组、Thy 组大鼠的一段血管环, 在有钙中 NE 累积加样 ($0.1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 致血管环收缩至坪台, 然后用无钙液 (无钙 K-H 液配制: 去除 K-H 液中的 $CaCl_2$, 加钙离子螯合剂 egtazic acid, $1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 洗脱至基线。在无钙液中 NE 累积加样致血管环收缩至坪台, 复钙使进一步收缩。另一段血管环在有钙液中, 先加 $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CPU-86017 温孵 10 min, NE 累积加样 ($0.1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 然后用无钙液洗脱至基线。加 CPU-86017 在无钙液中温孵 10 min, NE 累积加样致血管



In Ca^{2+} containing K-H
—■— Thy treated; —●— normal
Fig 1. Comparison of contractile force (g) of normal and *L*-thyroxin treated rat aorta rings by cumulative concentration ($0.1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NE in K-H solution ($n=6$). * $P<0.05$ vs normal.

2.2 有钙液中 CPU-86017 对 NE 引起的正常和甲亢大鼠血管环收缩的抑制作用

CPU-86017 在有钙液中对累积浓度 NE 引起的正常和甲亢大鼠血管环收缩有明显的抑制作用, 但对两者的抑制作用没有显著的差异 ($P>0.05$) (见图 3 和图 4)

2.3 无钙液中 CPU-86017 对 NE 引起的正常及甲亢大鼠血管收缩的抑制作用

CPU-86017 在无钙液中对累积浓度 NE 引起的各组大鼠血管环的收缩均有显著的抑制作用 (见图 5 和图 6)。

环收缩至坪台后复钙。每次 NE 加样后, 记录最大收缩张力, 计算收缩百分率。收缩百分率为同一血管在相同浓度 NE 的作用下, 在无钙液和有钙液中的收缩张力之百分比。

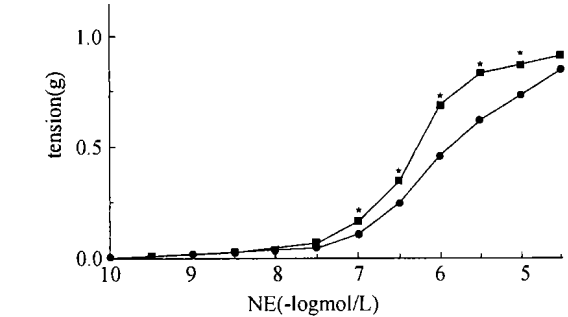
1.4 数据处理

所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间 *t* 检验检测显著性, $P<0.05$ 及 $P<0.01$ 为具有显著的统计学差异。

2 结果

2.1 有钙液和无钙液中左旋甲状腺素对血管收缩反应的影响

有钙液中, 甲亢大鼠的血管对低浓度 NE 引起的收缩比正常大鼠的血管显著增强 ($P<0.05$), 说明在甲亢状态下, α 受体对低浓度 NE 的敏感性增强 (见图 1)。而无钙液中, 甲亢大鼠的血管对 NE 引起的收缩比正常大鼠的血管显著增强 ($P<0.05$), 说明甲亢状态下, 细胞内钙释放增强 (见图 2)。

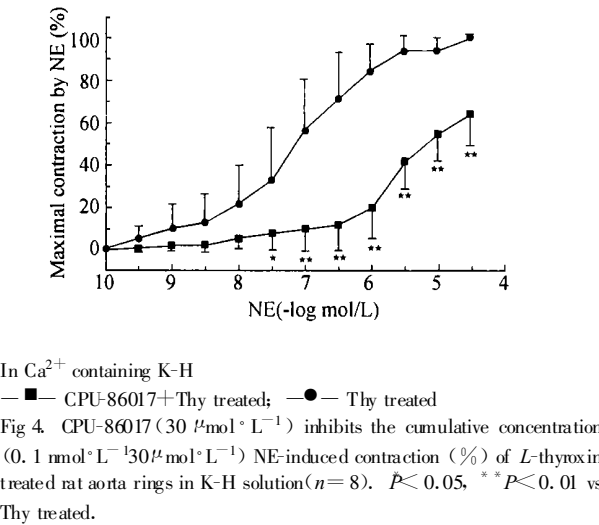
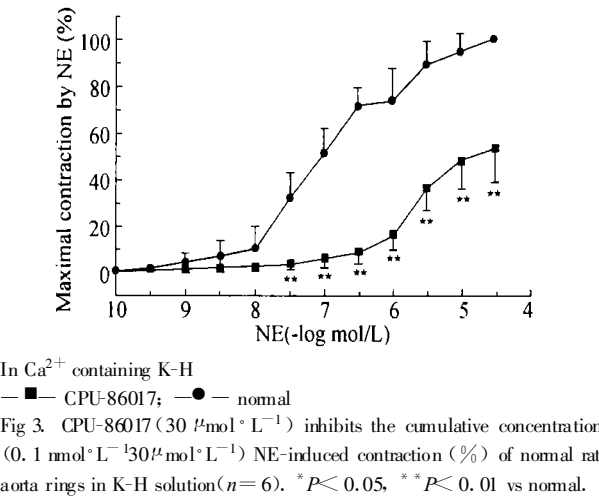


In Ca^{2+} free K-H
—■— Thy treated; —●— normal
Fig 2. Comparison of contractile force (g) of normal and *L*-thyroxin treated rat aorta rings by cumulative concentration ($0.1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) NE in Ca^{2+} free K-H solution ($n=6$). * $P<0.05$ vs normal.

2.4 钙对大鼠胸主动脉由累积浓度 NA 引起的收缩的影响

a. 有钙液中, Thy 组的 pEC_{20} 比对照组明显减小 ($P<0.05$), 而 pEC_{50} 、 pEC_{90} 与对照组无显著差异 ($P>0.05$)。本结果提示 Thy 组大鼠血管对低浓度 NA 敏感性增高。b. 在无钙液中, Thy 组与正常组 pEC_{20} 、 pEC_{50} 无明显差异 ($P>0.05$), 但 pEC_{90} 显著升高 ($P<0.05$), 说明其最大收缩反应性降低。c. 正常组在有 Ca^{2+} 液、无 Ca^{2+} 液中 pEC_{20} 、 pEC_{50} 、 pEC_{90} 无差异 ($P>0.05$), Thy 组在有 Ca^{2+} 液、无 Ca^{2+} 液中 pEC_{20} 、 pEC_{50} 、 pEC_{90} 有显著性差异 ($P<0.05$)。

01), 明显上升, 说明在甲亢状态下 α 受体的作用下
降 (见表 1)。



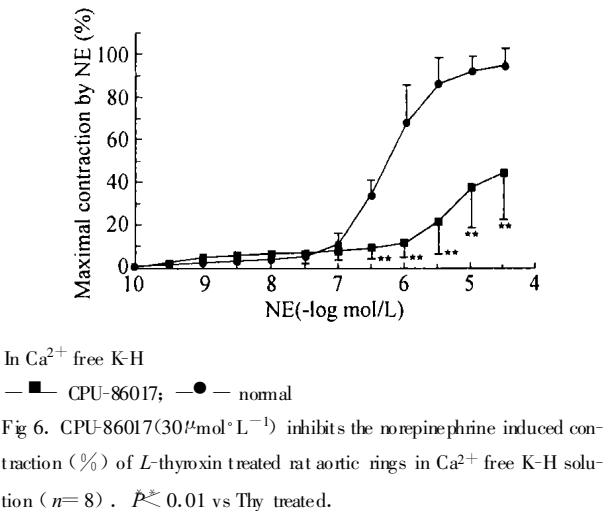
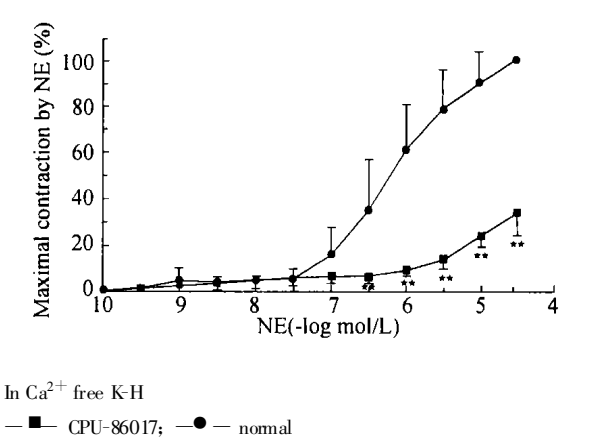
Tab 1. The pEC₂₀, pEC₅₀ and pEC₉₀ of norepinephrine induced aortic contractions in normal and hyperthyroid rats compared between in Ca²⁺-free and Ca²⁺-containing K-H solution ($\bar{x} \pm s$).

Group	K-H solution			Ca ²⁺ -free K-H solution		
	pEC ₂₀	pEC ₅₀	pEC ₉₀	pEC ₂₀	pEC ₅₀	pEC ₉₀
Control (n=6)	6.83±0.43	6.55±0.63	5.17±0.64	7.03±0.56	6.12±0.80	5.19±0.47
L-thyroxin (n=8)	7.97±0.55 *	7.14±0.67	5.84±0.95	7.11±0.35 ⁺	6.15±0.26 ⁺⁺	4.16±0.27 ⁺⁺

P<0.05, P<0.01 vs control group; P<0.05, ++P<0.01 vs K-H solution

2.5 CPU-86017 对 α₁ 受体的抑制作用

a. 有钙液中, 各给药组及甲亢组与正常组比较, 无明显差异, 说明在有钙液中, CPU-86017 对各种情况下均有相似强度的抑制作用; b. 无钙液中, 甲亢组的 pEC₉₀比正常组明显增大 (P<0.05),



说明 CPU-86017 抑制其产生最大效应; c. 正常组中, CPU-86017 在无钙液中的 pEC₂₀和 pEC₉₀显著减小 (P<0.05), 说明在无钙液中 CPU-86017 对其抑制作用比在有钙液中作用更强; d. 甲亢组在有钙及无钙液中 EC₂₀、EC₅₀、EC₉₀无明显差异 (见表 2)。

Tab 2. The pEC_{20} , pEC_{50} and pEC_{90} of norepinephrine induced aortic contractions in normal and hyperthyroid rats, determined in the presence of CPU-86017 $30\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, compared between in Ca^{2+} -free and Ca^{2+} -containing K-H solution. ($\bar{x}\pm s$).

Group	K-H solution			Ca^{2+} -free K-H solution		
	pEC_{20}	pEC_{50}	pEC_{90}	pEC_{20}	pEC_{50}	pEC_{90}
Control ($n=6$)	5.80 ± 0.37	4.58 ± 0.50	2.99 ± 0.64	$5.13\pm0.55^{++}$	$3.20\pm0.49^{++}$	$0.81\pm0.38^{++}$
L-thyroxin ($n=8$)	6.07 ± 0.66	4.87 ± 0.65	2.60 ± 0.53	5.85 ± 1.12	4.46 ± 0.61	$2.05\pm0.76^*$

$P<0.05$, $P<0.01$ vs control group; $P<0.05$, $P<0.01$ vs K-H solution.

2.6 L-甲状腺素和 CPU-86017 对内钙释放和外钙内流的影响

a. 正常情况下, 在无钙液中对 α_{1B} 亚型受体所操纵的内钙释放 (以下简称内钙释放) 所引起的血管收缩和复钙后由 α_{1A} 亚型受体操纵的外钙内流 (以下简称外钙内流) 所致的收缩相等, 二者对血管的收缩所起的作用几乎为 1:1, 而在甲亢状态下, 该比率约为 3:1, 内钙释放所致的收缩远大于外钙释放所致; b. 甲亢状态下在无钙液中内钙释放所引起的血管收缩比正常组显著增强 ($P<0.01$), 而对复钙后的外钙内流所致的收缩比正常组显著减少 ($P<0.01$), 说明甲亢时以 α_{1B} 的作用为主; c. CPU-86017 对正常大鼠胸主动脉在无钙液中由内钙释放所引起的收缩有显著的抑制作用 ($P<0.05$), 对复钙后由外钙内流所致的收缩有非常显著的抑制作用。推测 CPU-86017 在正常情况下对 α_{1A} 的抑制作用大于 α_{1B} ; d. CPU-86017 对甲亢大鼠胸主动脉由内钙释放所致的收缩有非常显著的抑制作用 ($P<0.01$), 但对外钙释放所致的收缩无抑制作用 ($P>0.05$)。由于甲亢时外钙释放所致的收缩已经明显减少, 而内钙释放显著增加, CPU-86017 则对此部分异常有明显的纠正作用 (见表 3)。

Tab 3. The effect of L-thyroxin and CPU-86017 on α_{1A} and α_{1B} receptors by suppression of norepinephrine induced vascular contraction in the Ca^{2+} -containing and Ca^{2+} -free KH solution.

Group	n	Contraction induced by intracellular releasing (%)	Contraction induced by calcium entry (%)
Normal	6	48.8 ± 8.1	47.7 ± 5.0
Normal+CPU-86017	6	$35.2\pm10.1^*$	$13.9\pm7.1^{**}$
L-thyroxin	8	$69.4\pm9.7^{**}$	$22.1\pm9.4^{**}$
L-thyroxin+CPU-86017	8	$35.2\pm10.2^{++}$	20.7 ± 7.5

$P<0.05$, $P<0.01$ vs normal group; $P<0.01$ vs levothyroxin group

4 讨论

α_1 受体分布于血管平滑肌, 至少可分为 α_{1A} 和

α_{1B} 两个亚型。 α_{1A} 亚型受体被激活, 通过激活 G 蛋白直接打开受体操纵的钙通道 (receptor operated channels, ROC), 使胞外钙内流而使细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 血管收缩。 α_{1B} 亚型受体激活时, 并不依赖于细胞外钙内流, 能激活膜上的磷脂酶 C (PLC), PLC 能分解脂质膜中 4, 5-磷酸-磷脂酰肌醇 (PIP_2) 使分裂成两种第二信使 1, 4, 5 三磷酸肌醇 (IP_3) 和二酰基甘油 (DG)。 IP_3 激活肌浆网上的 IP_3 受体, 动员胞内钙库释放钙引起血管收缩。本实验中, NE 激动平滑肌细胞膜上的 α_1 受体, 在有钙 K-H 液中激活 α_{1A} 和 α_{1B} 2 种亚型, 引起外钙内流和内钙释放, 血管收缩。而在无钙 K-H 液中, 激活 α_{1A} 亚型受体后无外钙内流, 故不产生生物效应。此时, 激活 α_{1B} 亚型受体, 动员胞内钙库释放内钙, 引起血管收缩, 血管收缩由 α_{1B} 受体激活所致。在无钙液中, 再加入 Ca^{2+} , 此时引起的收缩由 Ca^{2+} 经 ROC 内流所致, 可反映 α_{1A} 受体的生物效应。

放射性受体分析实验研究表明: 甲亢大鼠的胸主动脉上的 α 受体密度下降, 同时受体的密度上升^[9]。本实验中, 我们发现: 在中低浓度 NE 时, 胞内钙库释放明显高于正常大鼠。在高浓度下, 最大释放量却低于正常。慢性甲状腺素给药情况下, 血管平滑肌 α_{1B} 受体效应增强。在高钾引起的电压依赖性钙通道 (VDC) 开放所致 VSM 收缩中, 慢性甲状腺素给药增强胞内钙库释放^[5]。

本室以前的研究表明 CPU-86017 具有与小檗碱强度相仿的 α 阻断效应, 扩血管效应较强, 而抗心律失常作用强于小檗碱 6.8 倍^[7]。在高钾引起的电压依赖性钙通道 (VDC) 开放所致 VSM 收缩中, CPU-86017 抑制 VSM 的钙内流强于钙释放, 而 Thy 加强二者。去甲肾上腺素引起 VSM 收缩中, CPU-86017 在正常情况下对胞内钙释放和外钙内流均有显著抑制作用, 表明 CPU-86017 对 VSM 的 α_{1A} 、 α_{1B} 受体亚型均有显著的抑制作用。对钙内流的抑制作用强于胞内钙释放, 主要抑制 α_{1A} 。对慢

性甲状腺素给药大鼠, CPU-86017 对胞内钙释放的抑制作用更强, 说明主要抑制 α_{1B} 。因此, CPU-86017 对 α_{1A} 、 α_{1B} 受体亚型抑制作用具有相对选择性及病理状态下这种相对选择性有所改变。

参考文献

- [1] Dai DZ. The antiarrhythmic activity of protoberberine in relation to blockade of ion channels[J]. *Ion Channel Modulators*. 1997, 2 (10): 283-390.
- [2] Chen DD, Yu F, Zhang T, Dai DZ. Reducing L-thyroxin cardiac hypertrophy and suppressing mitochondrial calcium pump by propranolol[J]. *J Chin Pharm Uni*, 1996, 27(1): 44-47.
- [3] Dai DZ, Yu F, Li HT, et al. Blockade on sodium potassium and

calcium channels by a new antiarrhythmic agent: CPU-86017 [J]. *Drug Dev Res*, 1996, 39(2): 138.

- [4] 蒋建敏(Jiang JM), 戴德哉(Dai DZ). 对氯苄基四氢小檗碱对正常甲状腺亢进大鼠离体主动脉环的作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志* (*Chin J Pharmacol & Toxicol*), 1999, 13(2): 131-133.
- [5] Dai DZ, Jiang JM. P-chlorobenzytetrahydroberberin inhibit vascular smooth muscle contraction caused by Ca^{2+} [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1998, 19(6): 543-547.
- [6] Ranjan D, Gunasekera, Hiroshi Kuriyama. The influence of thyroid states upon responses of the rat aorta to catecholamines[J]. *Brit J Pharmacol*, 1990, 99(3): 541-547.
- [7] 戴德哉(Dai DZ), 安鲁凡(An LF), 周茂勋(Zhou MX)等. CPU-86017 提高心肌内钾 α 阻断作用及负性肌力作用[J]. *新药研究基金报* (*Bull New Drug Res Found*), 1991, 1(1): 89-93.

Selective Effects of CPU-86017 and L-thyroxin on α_{1A} and α_{1B} Subtype of Rats Aortic Rings

HE Ling-Shuai, DAI De-Zai, CHEN Jing, HUANG Min

Research Division of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

ABSTRACT **AIM** To study the influence of CPU-86017 and L-thyroxin on vascular smooth muscle (VSM) contractions and the selective effect on α_{1A} and α_{1B} subtype. **METHODS** The contractions of rat thoracic aortic rings in two groups were studied to compare the inhibitory effect of CPU-86017 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on vascular smooth muscle from normal and levothyroxin treated rats and the selective effect on the Ca^{2+} entry via receptor operated channel (α_{1A}) and intracellular Ca^{2+} release (α_{1B}) stimulated by norepinephrine. **RESULTS** The percentage of VSM contraction induced by intracellular calcium release through activation of α_{1B} receptor in Ca^{2+} -free medium was 48.8 ± 8.1 and 69.4 ± 9.7 ($P < 0.01$) respectively in normal and L-thyroxin treated groups. On the other hand, the percentage of VSM contraction induced by calcium entry through α_{1A} receptor was 47.7 ± 5.0 and 22.1 ± 9.4 ($P < 0.01$) respectively in two groups. While CPU-86017 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was added, the contraction percentage induced by intracellular calcium release was 35.2 ± 10.1 and 35.2 ± 10.2 respectively, the contraction percentage induced by calcium entry was 13.9 ± 7.1 and 20.7 ± 7.5 respectively. **CONCLUSION** CPU-86017 has significant inhibitory effect on α_{1A} and α_{1B} subtype in the normal and L-thyroxin treated rats. L-thyroxin enhances effects on α_{1B} receptor and has relatively less effect on α_{1A} subtype.

KEY WORDS CPU-86017; L-thyroxin; α_{1A} ; α_{1B} ; Aortic ring; Calcium