

几种药物对肺主动脉平滑肌细胞增殖作用影响的比较研究

陶慧林¹, 王怀良^{2*}, 郭伟³, 高山红⁴ (1. 鞍山市中心医院, 辽宁 鞍山 114001; 2. 中国医科大学临床药理教研室, 辽宁 沈阳 110001; 3. 鞍山市药品检验所, 辽宁 鞍山 114001; 4. 解放军 202 医院药剂科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 研究钙拮抗剂硝苯地平 (Nif)、地尔硫䇆 (Dil)、ACEI 类卡托普利 (Cap)、依那普利 (Ena) 抑制肺主动脉平滑肌细胞 (PASC) 增殖的作用, 比较两类药物对抑制肺主动脉平滑肌细胞增殖作用的影响。方法 培养大鼠肺主动脉血管平滑肌细胞并观察钙拮抗剂、ACEI 类及药物合用对细胞增殖作用的影响。结果 Nif, Dil, Cap, Ena 在 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} mol/L 浓度下, 对 15% 胎牛血清 (FBS) 所致的 PASC 增殖均有明显抑制, 且呈剂量依赖性的关系 ($P < 0.05$, 与对照组相比); Nif + Cap 及 Dil + Ena 合用, 在 10^{-10} mol/L 药物浓度下, 能明显抑制 15% FBS 所致的 PASC 增殖 ($P < 0.05$, 与对照组相比); Dil 与 Nif, Cap, Ena 相比较, 对 15% FBS 所致的 PASC 增殖作用的影响更明显 ($P < 0.01$, 与对照组相比); 结论 钙拮抗剂 Nif, Dil, ACEI 类 Cap, Ena 能够浓度依赖性地抑制 PASC 的增殖且作用显著。与其他药物相比, Dil 抑制 PASC 增殖的作用非常显著。Nif + Cap, Dil + Ena 合用, 在较低药物浓度下具有抑制 PASC 增殖的协同作用。

关键词: 肺动脉高压; 血管平滑肌细胞; 增殖; 抑制; 钙拮抗剂; 血管紧张素转换酶抑制剂

中图分类号: R544.16; R965 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)03-0187-03

Comparative study of the effects of several drugs on pulmonary artery smooth muscle cell proliferation

TAO Hui-lin¹, WANG Huai-liang², GUO Wei³, GAO Shan-hong⁴ (1. AnShan Central Hospital, 114001; 2. Department of Clinical Pharmacology, China Medical University, 110001; 3. AnShan Institute for Drugs Control, 114001; 4. Department of Clinical Pharmacology, China Medical University, 110001)

ABSTRACT: OBJECTIVE Study the effects that Nifedipine and Diltiazem of calcium antagonists, Captopril and Enalapril of ACEI inhibit PASC proliferation. Compare the influence of effects that two kinds of drugs have on inhibiting PASC proliferation. **METHODS** Rats PASC primary culture and observe calcium antagonists, ACEI drugs and combination of drugs influence on cell proliferation, using MTT method and H-TdR incorporation methods to measure the influence of effects which the drugs have on cell proliferation. **RESULTS** Under the concentrations 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} mol/L, Nif, Dil, Cap, Ena obviously inhibit PASC proliferation induced by 15% FBS and are dependent on dosage. ($P < 0.05$, compared with control groups). Combination of Nif + Cap and Dil + Ena, under concentrations 10^{-10} mol/L, can obviously inhibit PASC proliferation induced by 15% FBS ($P < 0.05$, compared with control groups). Compared with Nif, Cap, Ena, Dil inhibits PASC proliferation induced by 15% FBS more obviously ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSION** Calcium antagonists Nif, Dil, and ACEI, Cap, Ena all can inhibit PASC proliferation according to their concentration. Of the above mentioned four drugs, Dil is the strongest in inhibition of PASC proliferation produced by FBS. Nif combined with Cap, Dil united with Ena, both combinations produced synergism on inhibition of PASC proliferation under the condition of low drug concentration.

KEY WORDS: pulmonary artery hypertension; vascular smooth muscle cell; proliferation; calcium antagonists; angiotensin converting enzyme inhibiting.

肺动脉高压 (pulmonary artery hypertension, PAH) 是临床常见疾病, 发病率及病死率均较高, 且发病机制尚不十分清楚, 目前亦无比较满意的疗法。肺动脉高压的两大基本病理改变是肺血管收缩和肺血管平滑肌构型重建, 因此抑制肺血管收缩, 改善肺循环血流动力学以及阻止肺血管平滑肌细胞增殖增强是治疗肺动脉高压的关键^[1-3]。

许多相关研究发现, 无论在体内、体外, 刺激血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的增殖, 均能被一些药物所抑制。硝苯地平 (Nifedipine, Nif)、卡托普利 (Captopril, Cap)、依那普利 (Enalapril, Ena) 能逆转肺动脉高压时血

管重构的作用已为许多研究所证实^[4-8]。Dil 是临床近年来常用的抗肺动脉高压的治疗药物, 但对其在逆转肺动脉高压时血管构型重建方面的研究尚未见报道。不同的钙拮抗剂与血管紧张素转换酶抑制剂进行比较研究的也较少。因此, 在研究 Dil 对肺主动脉平滑肌细胞 (PASC) 增殖影响的同时, 比较 Nif、地尔硫䇆 (Diltiazem, Dil)、Cap、Ena 在抑制 PASC 增殖作用方面的异同, 为改善肺动脉高压的治疗提供临床前实验依据。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271510)

* 通讯作者: 王怀良教授, 中国医科大学临床药理教研室, 沈阳, 110001, E-mail: hhwang@mail.cmu.edu.cn

Nif:上海第十七制药厂; Dil:天津田边制药有限公司; Cap、Ena:常州制药厂; 胎牛血清 (FBS):天津 TBD 生物科技发展中心; DMEM 干粉培养基、胰酶 (Tyrosin):美国 Gibco 公司产品; MTT:上海化学试剂站分装厂; ³H-TdR:中国原子能科学研究院同位素研究所。POPOP、PPO:闪烁纯。其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Model 550 型酶标仪:日本 BIO-RAD 产品; LS 3801 型液闪烁计数仪:英国 BECKMAM 公司产品;

1.3 实验动物

雄性 Wistar 大鼠, 8 周龄, 体重 (274 ± 16) g, 中国医科大学实验动物部提供。实验动物合格证号, No. 辽实动字 034 号。

2 实验方法

2.1 大鼠肺主动脉血管平滑肌细胞原代及传代培养

参照文献^[9-11]所述方法进行, 8 周龄的雄性 Wistar 大鼠, 在无菌条件下取肺主动脉, 以贴块法进行原代 PASMC 培养。10d 左右可见 PASMC 生长, 细胞呈梭形, 典型的峰、谷状, 进行换液, 长满培养皿后, 进行传代。直至细胞数量增殖到一定数量后, 接种于 96 孔或 24 孔培养板用于实验研究。实验所用的 PASMC 为第五代细胞。

2.2 药物对 PASMC 生长曲线的影响

实验组的 96 孔培养板分别加含有相同浓度 (10⁻⁶ mol·L⁻¹) 的 Nif, Dil, Cap, Ena 的 15% FBS 的 DMEM 培养液后, 继续培养 20h 后, 以 MTT 法测定 570 nm 吸光度值; 连续测定 7d 并绘制生长曲线图。

2.3 药物对 PASMC 增殖的作用

实验组的 96 孔培养板按药物不同分成 Nif, Dil, Cap, Ena

表 1 Nif, Dil, Cap 及 Ena 对生长曲线影响的结果 (n = 9, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of time-inhibitory effective relationship produced by 10⁻⁶ mol·L⁻¹ of nifedipine, diltiazem, captopril and enalapril on proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (n = 9, $\bar{x} \pm s$)

分 组	n	MTT测定值 (A ₅₇₀)						
		第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
对照组	9	0.508 ± 0.042	0.760 ± 0.042	0.917 ± 0.117	1.044 ± 0.043	1.119 ± 0.058	1.359 ± 0.148	1.382 ± 0.138
Nifedipine	9	0.575 ± 0.029	0.711 ± 0.041	0.821 ± 0.092	0.954 ± 0.112	1.016 ± 0.087	1.166 ± 0.05	1.347 ± 0.115*
Diltiazem	9	0.535 ± 0.030	0.596 ± 0.034	0.691 ± 0.101	0.761 ± 0.079	0.767 ± 0.044	0.827 ± 0.073	0.833 ± 0.103**
Captopril	9	0.567 ± 0.030	0.707 ± 0.052	0.779 ± 0.093	0.968 ± 0.177	0.945 ± 0.104	1.123 ± 0.159	1.313 ± 0.106*
Enalapril	9	0.555 ± 0.027	0.707 ± 0.017	0.897 ± 0.135	0.989 ± 0.098	0.965 ± 0.106	1.261 ± 0.111	1.338 ± 0.167*

注: * P < 0.05, ** P < 0.01

Note: * P < 0.05, ** P < 0.01

表 2 实验组对 PASMC 增殖的影响结果 (n = 9, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of concentration-inhibitory effective relationship produced by nifedipine, diltiazem, captopril and enalapril on proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (n = 9, $\bar{x} \pm s$)

分 组	不同浓度的 MTT测定值 (A ₅₇₀)					
	10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹	10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹	10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹	10 ⁻⁷ mol·L ⁻¹	10 ⁻⁸ mol·L ⁻¹	10 ⁻⁹ mol·L ⁻¹
对 照 组	0.266 ± 0.026					
Nifedipine	0.225 ± 0.042*	0.225 ± 0.045*	0.226 ± 0.045*	0.223 ± 0.047*	0.220 ± 0.045*	0.238 ± 0.042
Diltiazem	0.146 ± 0.101**	0.194 ± 0.054**	0.198 ± 0.051*	0.209 ± 0.037*	0.215 ± 0.051*	0.217 ± 0.042*
Captopril	0.215 ± 0.045*	0.216 ± 0.050*	0.218 ± 0.041*	0.216 ± 0.048*	0.223 ± 0.048*	0.226 ± 0.038*
Enalapril	0.183 ± 0.032**	0.212 ± 0.063*	0.207 ± 0.053*	0.214 ± 0.044*	0.222 ± 0.055	0.222 ± 0.056

注: * P < 0.05, ** P < 0.01

Note: * P < 0.05, ** P < 0.01

系列浓度组 (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ mol·L⁻¹), 继续培养 20h 后, 以 MTT 法测定 570 nm 吸光度值; 比较不同的浓度条件下对 PASMC 增殖的影响。

2.4 药物合用对 PASMC 增殖的作用

实验组的 96 孔培养板按药物不同分成 Nif (10⁻¹⁰ mol·L⁻¹) + Cap (10⁻¹⁰ mol·L⁻¹) 组、Dil (10⁻¹⁰ mol·L⁻¹) + Ena (10⁻¹⁰ mol·L⁻¹) 组继续培养 20h 后, 以 MTT 法测定 570 nm 吸光度值; 比较低浓度条件下的联合用药对 PASMC 增殖的影响。

2.5 药物对 ³H-TdR 掺入的影响

实验组的 24 孔培养板按药物不同分成 Nif, Cap, Ena, Dil 系列浓度组 (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹ mol·L⁻¹) 进行 ³H-TdR 掺入实验。使用液闪烁计数仪进行测定每分钟闪烁数值^[12]。比较不同的浓度条件下对 PASMC 增殖的影响。

2.6 统计学处理

数据以均值 ± 标准差表示, SPSS 软件进行统计学分析, 多组间比较用单因素方差分析, 两组间比较用 Student Newman-Keuls t 检验。当 P < 0.05 时, 为有显著意义。

3 实验结果

3.1 药物对 PASMC 生长曲线的影响

连续测定 7d 后, 与对照组相比, 各实验组对 FBS 刺激的 PASMC 增殖的作用均有不同程度的抑制, 以 MTT 法测定 A₅₇₀ 值, 见表 1。

3.2 药物对 PASMC 增殖的作用

与对照组相比, Nif, Dil, Cap 及 Ena 系列浓度实验组对 15% FBS 刺激 PASMC 增殖的作用均有不同程度的抑制作用, 见表 2。

3.3 药物合用对 PSMC增殖的作用

与对照组相比,较低药物浓度 (10^{-10} mol·L⁻¹)的 Nif+Cap实验组及 Ena+Dil实验组对 PSMC增殖也均有不同程度的抑制,见表 3。

3.4 药物对³H-TdR掺入的影响

与对照组相比,Nif,Dil,Cap及 Ena系列浓度实验组均能减少 PSMC³H-TdR的掺入,说明 PSMC增殖均有不同程度地受到抑制,见表 4。

3.5 不同药物对 PSMC增殖作用的影响

通过 Nif,Dil,Cap,Ena在第一天、第七天对 FBS刺激的表 4 实验组对 PSMC³H-TdR掺入影响结果 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

Tab 4 Comparison of inhibitory effects on ³H-TdR incorporation produced by nifedipine, diltiazem, captopril and enalapril on proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells ($n=9, \bar{x} \pm s$)

分 组	不同浓度时每分钟闪烁的次数					
	10^{-4} mol·L ⁻¹	10^{-5} mol·L ⁻¹	10^{-6} mol·L ⁻¹	10^{-7} mol·L ⁻¹	10^{-8} mol·L ⁻¹	10^{-9} mol·L ⁻¹
对 照 组	16379 ±1546					
Nifedipine	14379 ±1274*	14404 ±1299*	14560 ±978*	14871 ±1010*	15771 ±1230	16003 ±1191
Diltiazem	4063 ±2242**	10533 ±974*	10813 ±831*	11378 ±1037*	11486 ±1037*	11160 ±681*
Captopril	13791 ±1966*	13971 ±1499*	14189 ±1437*	14203 ±761*	14456 ±1217*	14597 ±1565
Enalapril	14366 ±1461*	14571 ±817*	14794 ±1038*	14737 ±988*	15140 ±965	15104 ±791

注: * 为 $P<0.05$, ** 为 $P<0.01$

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

PSMC增殖结果的比较发现,Dil与其他药物相比,对 PSMC增殖的抑制作用有明显的差异,且在第七天,Cap与Ena、Cap与 Nif相比较,Cap对 PSMC增殖的抑制作用也有明显的差异,见表 5。

表 5 Nif,Dil,Cap,Ena对 PSMC增殖作用影响的结果比较 ($n=9, \bar{x} \pm s$)

Tab 5 Comparison of inhibitory effects on cell proliferation produced by nifedipine, diltiazem, captopril and enalapril on proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells ($n=9, \bar{x} \pm s$)

分 组 (10^{-6} mol·L ⁻¹)	MTT测定值 (A_{570})	
	第一天	第七天
Diltiazem	0.535 ±0.030	0.833 ±0.103
nifedipine	0.575 ±0.029*	1.436 ±0.115**
Captopril	0.567 ±0.030*	1.131 ±0.106*
Enalapril	0.555 ±0.027	1.338 ±0.167*

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;且在第七天,Captopril与 Enalapril比较的结果为: $P<0.01$; Captopril与 Nifedipine比较的结果为: $P<0.01$

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; on the 7th day, compared captopril group with enalapril group, $P<0.01$, compared captopril group with nifedipine group, $P<0.01$

4 讨论

肺动脉高压时,血管平滑肌在血管切应力增加及神经体液等因素改变的刺激下,动脉的肌化及平滑肌细胞表型的转化,血管平滑肌细胞发生增殖、肥大,形成高血压病和血管平滑肌细胞(VSMC)异常增殖之间的恶性循环^[13,14]。所以说,VSMC异常增殖是高血压等血管增生性疾病的病理基础^[15,16]。已往的大量研究报道均说明体液因子在肺动脉高

表 3 Nif+Cap,Ena+Dil实验组对 PSMC增殖的影响

Tab 3 Comparison of inhibitory effects produced by nifedipine plus captopril, and enalapril plus captopril on proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells by MTT assay

分 组 (10^{-10} mol·L ⁻¹)	n	MTT测定值 (A_{570}) ($\bar{x} \pm s$)
对 照 组	9	0.266 ±0.026
Nif+Cap	9	0.227 ±0.047*
Ena+Dil	9	0.219 ±0.056*

注: * 为 $P<0.05$

Note: * $P<0.05$

压时的血管构型重建过程起决定作用。由于机体是复杂的因素综合体,很难说明是某一因素在肺动脉高压的血管构型重建中起决定作用,如交感活性增高,去甲肾上腺素分泌增多,以及肾素-血管紧张素系统活性增强,循环血中增高的血管紧张素Ⅱ和血管局部分泌旁分泌的血管紧张素Ⅱ,细胞外钙离子都是 VSMC增殖的促进因素^[17,18]。既是说,不是某一个体液因子导致 PSMC增殖、肥大及迁移,是多种因素共同作用的结果。从这一观点出发,本实验选用 15% FBS做为刺激 PSMC生长的因素,并通过实验来证实这一观点。

研究的结果显示,钙拮抗剂(Nif,Dil)、ACEI(Cap,Ena)对高浓度 FBS刺激的体外培养的大鼠 PSMC的增殖均有不同程度的抑制作用。PSMC生长曲线显示,这两类药物均能不同程度地抑制细胞的生长,而且,有些药物,随着时间的推移,抑制细胞生长的作用越来越显著。这提示我们,如果长期使用某一种抗高血压药物,能够控制血压的同时,还能够抑制肺动脉高压时的 PSMC的生长、增殖,进而逆转肺血管构型重建。而且,药物组间也随着药物的不同、时间的延长,对 PSMC的生长、增殖作用的影响也有不同差异。这提示我们,在肺动脉高压治疗时,对药物选择要有针对性,这可能对逆转血管构型重建的益处更大。

实验结果显示,药物的不同浓度对 PSMC的生长、增殖的抑制程度不同。高浓度作用强一些,随着浓度的降低,作用明显降低。而且达到某一药物浓度时,起不到抑制 PSMC增殖的作用,呈浓度依赖性的关系。

通过本研究还发现,钙拮抗剂 Dil也同样具有抑制 PSMC生长及增殖的作用。而且该药物的抑制作用明显强于 Nif,而且随着时间的推移,这种作用越来越明显。

本研究还首次证明联合用药在外体培养 PASM C 时抑制细胞生长及增殖的作用。低浓度的药物对体外培养的 PASM C 的生长、增殖的抑制作用不明显或无抑制作用。当把低浓度的两种药物如硝苯地平与卡托普利联合使用时,发现培养的 PASM C 的生长、增殖明显被抑制。这一现象提示我们,在抗高血压的治疗时的联合用药,即使使用的药物的血药浓度较低,在能够控制血压的同时,也可能抑制肺动脉高压时的 PASM C 的生长、增殖,进而逆转肺血管构型重建。

参考文献

- [1] Voelkel NF, Tudor RM. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension [J]. Eur Res J, 1995, 8: 2129.
- [2] Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigert L, *et al.* Structural characterization and biological functions basic fibroblast growth factor [J]. Endoc Rev, 1987, 8(2): 95.
- [3] Bohr DF, Dominczak AF, Webb RC. Pathophysiology of the vasculature in hypertension [J]. Hypertension, 1991, 18(Suppl5): III69-III75.
- [4] Wang HL, Kilfeather SA, Martin GR, *et al.* Effects of heparin on growth factor-induced mitogenic and proliferative responses of rat pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 1997, 18(5): 397.
- [5] Wang HL, Zhang XH, Jin X, *et al.* Tetrandrine inhibited chronic " inflammatory " pulmonary hypertension in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 1997, 18(5): 401.
- [6] Xie LD, Chen DG, Zhang S, *et al.* Effects of various doses of captopril on left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 1995, 9(1): 12.
- [7] Sachinidis A, Ko Y, Grack GK, *et al.* Action of metoprolol, enalapril, diltiazem, verapamil and nifedipine on cell growth of vascular smooth muscle cells [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1992, 19(Suppl 2): S60.
- [8] Munro E, Patel M, Chan P, *et al.* Effect of calcium channel blockers on the growth of human vascular smooth muscle cells derived from saphenous vein and vascular graft stenoses [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1994, 23: 779.
- [9] Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture [J]. Physiol Rev, 1979, 59: 1.
- [10] 赵三妹,夏人仪,王宗立,等. 动脉平滑肌细胞的培养方法及其应用 [J]. 中华病理学杂志, 1987, 16(4): 260.
- [11] Campbell JH, Campbell GR. Culture techniques and their applications of vascular smooth muscle cell [J]. Clinical Science, 1993, 85(5): 501.
- [12] Porter JG, Catalano R, Mcenroe G, *et al.* C-type natriuretic peptide inhibits growth factor-dependent DNA synthesis in smooth muscle cells [J]. Am J Physiol, 1992, 263 (5 ptl): C1001.
- [13] Rosenberg RD. Vascular smooth muscle cell proliferation: basic investigations and new therapeutic approaches [J]. Thromb Haemost, 1993, 70(1): 10.
- [14] Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. Physiol Rev, 1995, 75(7): 487.
- [15] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. Nature, 1993, 362(4): 801.
- [16] Landberg BR, Frishman WH, Lerrick K. Pathophysiology and pharmacological approaches for prevention of coronary artery restenosis following coronary artery balloon angioplasty and related procedures [J]. Prog Cardiovasc Dis, 1997, 39(1): 361.
- [17] 齐建华,章鲁,王军. 卡托普利对血管平滑肌细胞结构和钙的影响 [J]. 中国药理学通报, 1996, 12(3): 229.
- [18] Xiong YL, Zhao HY. Effect of captopril on proliferation of aortic smooth muscle cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 1996, 17(6): 503.