

蜂毒肽对大鼠主动脉收缩的作用及与钙内流的关系

徐济良 俞宗跃 杨毓麟

(南通医学院药理学教研室, 南通 226001)

主题词 蜂毒肽; 主动脉; 内皮、血管; 大鼠; 血管收缩; 钙通道; 苯肾上腺素; 卡托普利; 苄普地尔

摘要 为探讨蜂毒肽对心血管系统的作用机理, 利用离体大鼠主动脉环收缩实验及血管平滑肌细胞 ^{45}Ca 内流定量测定方法, 观察了蜂毒肽对血管平滑肌的影响。结果发现: 蜂毒肽不影响内皮完整主动脉环由苯肾上腺素引起的快速收缩, 但可浓度依赖地抑制持续收缩; 蜂毒肽对去内皮主动脉环由苯肾上腺素引起的收缩无作用; 蜂毒肽对内皮完整主动脉环未能产生收缩反应, 但可使去内皮动脉环产生显著收缩和 ^{45}Ca 内流增加, 卡托普利和苄普地尔能部分拮抗这一作用。结果提示, 蜂毒肽具有内皮依赖性舒张血管平滑肌的作用, 肾素释放与 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换途径可能参与蜂毒肽使去内皮血管收缩。

The Effects of Melittin on Rat Aorta and the Relation with Ca^{2+} Influx

XU Ji- Liang, YU Zong- Yue and YANG Yu- Lin

(Department of Pharmacology, Nantong Medical College, Nantong 226001, China)

MeSH Melittin; Aorta; Endothelium, Vascular; Rat; Vasoconstriction; Calcium Channels; Phenylephrine; Cartopril; Bepridil

ABSTRACT **Aim** The effects of melittin (a polypeptide from bee venom) on rat aorta and the relation with Ca^{2+} influx were studied in this article. **Methods** The contractile test of the isolated aorta rings and the assay method of ^{45}Ca influx were used. **Results** In endothelium- intact aorta rings, melittin did not influence the rapid contractions induced by phenylephrine (PHE), but could inhibit the continuing contractions in the concentration dependent manner. In endothelium- denuded aorta rings, melittin did not have the effect on the contractile responses induced by PHE. Melittin did not cause the contraction in endothelium- intact aorta rings, but induced significantly contractions and increased the ^{45}Ca influx in endothelium- denuded aorta rings, these effects were partially antagonised by cartopril and bepridil respectively. **Conclusions** Melittin could cause the endothelium dependent relaxations to vascular smooth muscle, and the releasing renin and $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ exchange system could play partial role in the contractions of the endothelium- denuded vascular.

蜜蜂毒中含有多种蛋白质和多肽, 其多肽成分可用于风湿、类风湿关节炎及高血压、动脉粥样硬化等治疗^[1]。蜂毒肽(melittin)是蜜蜂毒中所含主要多肽之一, 约占蜂毒干重的 50%, 相对分子质量 2 840, 具有较强的心血管药理学与生物学活性。已有文献报道蜂毒肽有抑制心肌收缩^[2]和松弛血管平滑肌^[3]等作用, 但其作用机理远未搞清。本文研究蜂毒肽对血管平滑肌舒缩功能的影响及与钙离子跨膜转运的关系, 旨在进一步探索蜂毒肽对心血管系统的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠, 雌雄兼用, 体重 210~ 260 g, 由本院实验动物中心提供。蜂毒肽(melittin, Mel)与卡托普利(cartopril, Cart)系 Sigma 公司产品; 苯肾上腺素(phenylephrine, PHE)为上海日丰药厂产品; 苄普地尔(bepridil, Bep)系常州第四制药厂产品; $^{45}\text{CaCl}_2$ 为

中国科学院原子能研究所产品; 放射性活度 555 mBq/g, Backman Ls- 3133 型自动液体闪烁计数仪。

1.2 血管收缩实验

将宽 2.5 mm 的大鼠主动脉环, 按实验要求分别保留内膜或用磨擦法去除内膜^[4], 置于通 0.95 $\text{O}_2 + 0.05 \text{CO}_2$ 混合气体 pH 7.4 的浴槽中的正常 Krebs 液中。此液配制为 (mmol/L): NaCl 115.0; KCl 4.6; MgSO_4 1.16; NaH_2PO_4 1.16; NaHCO_3 21.9; CaCl_2 2.5; Glucose 11.0。标本负荷 1.5 g, 平衡 2 h, 每 20 min 换营养液 1 次, 用 100 mmol/L KCl 收缩血管, 前后连续 2 次得到的收缩幅度之差应小于 10%, 被认为标本收缩反应可重复, 否则标本将剔除。去内皮标本用乙酰胆碱(0.1 $\mu\text{mol/L}$)验证内皮存在与否。在无 Ca^{2+} Krebs 液中(无 Ca^{2+} , 含 50 $\mu\text{mol/L}$ EGTA), 记录 PHE (10 $\mu\text{mol/L}$)引起的收缩反应, 待反应达最大, 即加入 Ca^{2+} , 使含 Ca^{2+} 2.5 mmol/L, 收缩反应达坪值后, 用正常 Krebs 液冲洗 6 次, 温育 30 min, 重复以上步骤, 视细胞内 Ca^{2+} 释放引起的收缩稳定, 方

可实验。

1.3 ^{45}Ca 内流测定

去内皮大鼠主动脉环 5~10 mg, 于 37 °C 连续通混合气体的 Krebs 液中平衡 90 min, 然后移入含 ^{45}Ca (37 mBq/L) 的 Krebs 液中, 按分组加入拮抗剂, 持续通混合气体 30 min, 分别加入蜂毒肽 (2 mg/L), 接触 5 min, 将组织移入冰冷的 pH 6.9 的 LaCl_3 液。此液成分为 (mmol/L): LaCl_3 75; HEPES 5.0; Glucose 10.0; 通 O_2 60 min, 组织用 Whatman 1 号滤纸吸干后称重, 加入 1.5 mL 5 mmol/L EDTA 液室温下过夜。第二日加入 10 mL 无水乙醇和 6 mL 甲苯闪烁液, 暗处放置 2 h 后, 测 2 min 计数 (count per minine, CPM)。按文献[5]方法计算 ^{45}Ca 内流量。实验设空白对照组, 测得的 ^{45}Ca 值表示未作任何处理时, 细胞对 Ca^{2+} 的摄取, 实验组测得的 ^{45}Ca 值减去空白对照组平均 ^{45}Ca 值, 表示实验组的 ^{45}Ca 净内流值。

1.4 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 蜂毒肽对内皮完整主动脉环苯肾上腺素收缩作用的影响

选择 α_1 受体激动剂苯肾上腺素 (10 $\mu\text{mol/L}$) 引起大鼠主动脉平滑肌收缩可分为快速收缩相和持续收缩相, 两相分别占整个收缩效应的 38% \pm 6% 和 62% \pm 6%。在无 Ca^{2+} 营养液中, 蜂毒肽事先与内皮完整主动脉环接触 3 min, 苯肾上腺素引起的平滑肌快速收缩相并未见到抑制, 而随后加入 Ca^{2+} 引起持续收缩相却出现明显抑制 (图 1, Figure 1), 且随着蜂毒肽浓度在一定范围内增加, 这一抑制作用增强 (表 1, Table 1)。

表 1. 在无 Ca^{2+} 和加 Ca^{2+} 溶液中, 蜂毒肽对苯肾上腺素诱发主动脉平滑肌收缩反应的抑制效应

Table 1. The inhibition rates of Mel on PHE induced contractile response in Ca^{2+} free solution and addition of Ca^{2+}

Mel (mg/L)	n	Ca^{2+} - free Solution	addition of Ca^{2+} (2.5 mmol/L)
0 (Control)	8	0.7 \pm 3.4	0.4 \pm 4.4
0.5	8	2.4 \pm 3.8	4.5 \pm 3.6
1	8	3.5 \pm 4.1	8.5 \pm 3.8 ^a
2	8	4.7 \pm 3.1	28.9 \pm 6.9 ^{abc}
4	8	4.3 \pm 4.2	47.8 \pm 12.5 ^{abc}

PHE: 10 $\mu\text{mol/L}$. a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with 0.5 mg/L of Mel group; c: $P < 0.01$, compared with 1 mg/L of Mel group

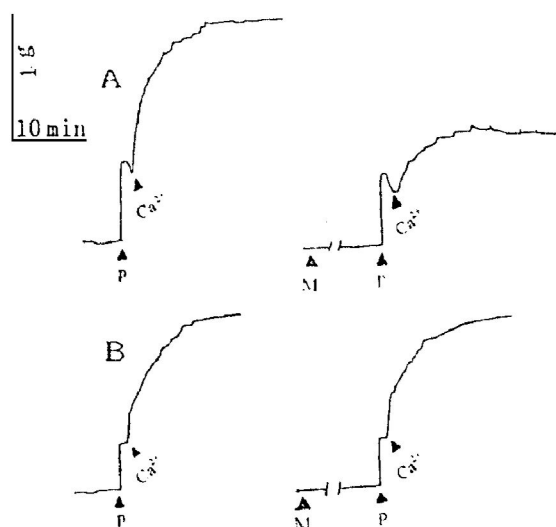


图 1. 在无 Ca^{2+} 和加 Ca^{2+} 溶液中, 蜂毒肽对苯肾上腺素诱发主动脉平滑肌收缩反应的影响. A. 内皮完整动脉环. B. 去内皮动脉环

Figure 1. The effects of melittin (M) on response to 10 $\mu\text{mol/L}$ phenylephrine (P) in Ca^{2+} - free, EGTA (50 $\mu\text{mol/L}$) containing solution and subsequent addition of 2.5 mmol/L Ca^{2+} . A. Endothelium-intact rings B. Endothelium-denuded rings

2.2 蜂毒肽对去内皮主动脉环苯肾上腺素收缩作用的影响

蜂毒肽对去内皮主动脉环苯肾上腺素引起的两相收缩时相均未产生明显抑制效应 (图 1, Figure 1), 三种浓度 (1 mg/L、2 mg/L 和 4 mg/L) 使加入 Ca^{2+} 引起持续收缩的抑制率分别为 1.4% \pm 4.9%、1.3% \pm 6.2% 和 2.6% \pm 4.8% ($P > 0.05$)。

2.3 蜂毒肽对内皮完整和去内皮主动脉环的作用

蜂毒肽 (2 mg/L) 在无 Ca^{2+} 及有 Ca^{2+} 营养液中, 均未使内皮完整的大鼠主动脉环产生收缩效应。在无 Ca^{2+} 营养液中, 蜂毒肽 (2 mg/L) 亦未使去内皮标本产生收缩作用, 但在有 Ca^{2+} 营养液中, 使去内皮主动脉环产生明显收缩, 收缩力为 330 \pm 130 mg, 如先用卡托普利 (200 $\mu\text{mol/L}$) 作用 10 min, 然后加入同一浓度蜂毒肽, 收缩力显著减小, 仅为 160 \pm 60 mg ($n = 8, P < 0.01$)。另一组去内皮标本在有 Ca^{2+} 营养液中, 单用蜂毒肽 (2 mg/L) 产生的收缩力为 310 \pm 110 mg, 而先用苄普地尔 (50 $\mu\text{mol/L}$) 作用 10 min 后, 同浓度蜂毒肽产生的收缩力为 210 \pm 50 mg ($n = 8, P < 0.05$)。

2.4 蜂毒肽对 ^{45}Ca 内流的作用

蜂毒肽 (2 mg/L) 可以增加去内皮大鼠主动脉平滑肌细胞 ^{45}Ca 内流, ^{45}Ca 净增加 43.3 \pm 12.2 nmol/g。卡托普利 (200 $\mu\text{mol/L}$) 使去内皮大鼠主动脉平

滑肌细胞由蜂毒肽(2 mg/L)引起的 ^{45}Ca 内流减少40%,而苄普地尔(50 $\mu\text{mol/L}$)使 ^{45}Ca 内流减少31%(表2, Table 2)。

表2. 在去内皮大鼠主动脉环中,卡托普利和苄普地尔对蜂毒肽引起的 ^{45}Ca 内流的影响

Table 2. The effects of Cart and Bep on ^{45}Ca influx induced by Mel in endothelium denuded aorta rings

Treatments	n	^{45}Ca (nmol/g)
Mel	6	43.3 \pm 12.2
Mel+ Cart(200 $\mu\text{mol/L}$)	6	26.0 \pm 9.5 ^b
Mel+ Bep(50 $\mu\text{mol/L}$)	6	29.7 \pm 12.8 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with Mel (2 mg/L) group

3 讨论

本研究发现蜂毒肽对大鼠主动脉平滑肌的作用性质依赖血管内皮的完整与否。在内皮完整标本,蜂毒肽对苯肾上腺素产生的快速收缩无作用,但能减弱血管的持续收缩。在去内皮标本,蜂毒肽对苯肾上腺素产生的快速与持续收缩作用均无明显影响。已知苯肾上腺素产生的血管快速收缩与细胞内 Ca^{2+} 释放有关,持续收缩与细胞外 Ca^{2+} 内流相关^[6]。实验表明蜂毒肽不影响细胞内 Ca^{2+} 释放,但能干扰 α_1 受体触发 Ca^{2+} 内流引起的收缩效应,这一作用与血管内皮有关。本研究兔离体主动脉条实验^[7]均提示蜂毒肽松弛血管的作用可能通过血管内皮舒张因子产生,但舒张因子的化学本质尚未确定^[3~7]。蜂毒肽对内皮完整的血管环均未产生收缩性改变;在无钙液中,蜂毒肽未使去内皮血管环产生收缩性变化,但在有钙液中,去内皮标本明显收缩,并显著增加 ^{45}Ca 内流量,提示蜂毒肽对去内皮血管平滑肌细胞内钙释放无作用,但可促进细胞外钙内流,引起血管收缩。

蜂毒肽兴奋去内皮血管环作用可部分被卡托普利拮抗,有实验发现蜂毒肽可使去内皮血管条肾素释放增加^[7],而内皮完整的血管条因内皮舒张因子释放而减少肾素分泌^[8]。本实验发现卡托普利可减少蜂毒肽引起的去内皮标本 ^{45}Ca 内流,可能系卡托普利拮抗肾素作用,使细胞外 Ca^{2+} 内流减少。蜂毒肽对细胞膜跨膜离子转运的作用正受到重视^[9],研

究发现蜂毒肽能显著抑制膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,增加膜对钠离子的通透性^[10];蜂毒肽能使离体心肌细胞和3Y1-B clone 1-6细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,这一作用可被苄普地尔抑制,苄普地尔是 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换抑制剂,故推测蜂毒肽通过抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,从而间接激活 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换途径,使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[9,11]。本研究发现苄普地尔能部分拮抗蜂毒肽对去内皮血管的收缩和 ^{45}Ca 内流,提示 $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交换可能部分参与蜂毒肽对血管平滑肌的作用。

参考文献

- 1 周淑平,李瑛. 蜜蜂毒溶血活性肽(melittin)的研究进展. 生物化学与生物物理进展, 1986, 4: 31-36
- 2 You Yu-Hou, Huang Zi-Qiang, Li Chang-Chun. Effects of melittin on isolated rat atrium. *Acta Pharmacol Sinica*, 1997, 18 (1): 87-89
- 3 Rapoport RM, Ashraf M, Murad F. Effects of melittin on endothelin-dependent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta. *Circ Res*, 1989, 64: 463-473
- 4 Drummond RM, Wadsworth RM. In vitro effect of nifedipine on KCl and 5-hydroxytryptamine-induced contractions of the sheep coronary, cerebral and pulmonary arteries. *Life Sci*, 1994, 54 (15): 1081-090
- 5 Guan Yong-Yuan, Chen Ke-Ming, Sun Jia-Jun. α_1 -Adrenoceptors mediate the responses to BHT-920 and rauwolfscine in dog mesenteric artery after partial depolarization by KCl. *Eur J Pharmacol*, 1991, 200: 283-287
- 6 Putney JW Jr. Receptor-regulated calcium entry. *Pharmacol Ther*, 1990, 48: 427-434
- 7 游育红,黄自强,李常春. 蜂毒素对离体血管的作用. 福建医学院学报, 1996, 30 (4): 313-315
- 8 Vidal MJ, Romero JC, Vanhoutte PM. Endothelium derived relaxing factor inhibits renin release. *Eur J Pharmacol*, 1988, 149: 401-402
- 9 Yang Shen, Carrasquer G. Effect of melittin on ion transport across cell membranes. *Acta Pharmacol Sinica*, 1997, 18 (1): 3-5
- 10 Cuppoletti J, Abbott AJ. Interaction of melittin with the ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)ATPase: evidence for a melittin-induced conformational change. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 283: 249-257
- 11 Okamoto T, Isoda H, Kubota N, et al. Melittin cardiotoxicity in cultured mouse cardiac myocytes and its correlation with calcium overload. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, 133: 150-163

(此文 1999-02-07 收到, 1999-07-09 修回)

(此文编辑 胡必利)