

氯硝柳胺乙醇胺盐对大鼠冠状动脉的舒张作用及机制研究

宋奇颖, 郭鹏美, 董丽娜, 董苗苗, 刘宇*

(山西医科大学药理学教研室, 太原 030001)

【摘要】 **目的** 探讨氯硝柳胺乙醇胺盐(niclosamide ethanolamine, NEN)对离体大鼠冠状动脉(rat coronary artery, RCA)的舒张作用及其机制。**方法** 采用微血管张力法测定 RCA 血管张力, 观察 NEN 对预收缩血管的舒张作用; 通过抑制剂实验探讨 NEN 舒张 RCA 与钾通道和 MAPK 信号通路的关系; 通过观察 NEN 对血管收缩剂所致的在去钙和复钙液中收缩的影响, 探讨 NEN 的作用与细胞内外钙的关系。**结果** NEN(0.5 ~ 3.0 $\mu\text{mol/L}$)对 KCl 或 U46619 所致的 RCA 收缩均具有浓度依赖性的舒张作用。MAPK 抑制剂 PD98059 和 SB239063 减弱 NEN 的舒张作用, 而钾通道阻断剂四乙胺、4-氨基吡啶、氯化钡和格列本脲对 NEN 的舒张作用无显著影响。NEN 减弱 KCl 或 U46619 所致的细胞外钙内流依赖性 RCA 收缩, 而对细胞内钙释放依赖性 RCA 收缩无显著影响。**结论** NEN 对离体 RCA 有显著的舒张作用, 其机制可能与其激活 MAPK 信号通路、抑制细胞外钙内流有关。

【关键词】 氯硝柳胺乙醇胺盐; 血管舒张; 冠状动脉; MAPK 信号通路; Ca^{2+}

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 05-0065-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.05.012

Vasorelaxant effect and mechanism of niclosamide ethanolamine on rat coronary artery

SONG Qiyang, GUO Pengmei, DONG Lina, DONG Miaomiao, LIU Yu*

(Department of Pharmacology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the vasorelaxant effect and possible mechanism of niclosamide ethanolamine (NEN) on isolated rat coronary artery (RCA). **Methods** Wire myograph was used to record myogenic tone of vessels. The vasorelaxant effect of NEN was studied in RCA precontracted with either KCl or U46619. Study of related inhibitors was performed to investigate possible involvement of potassium channels and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in vasorelaxation. The effect of NEN on Ca^{2+} mobilization was determined by observing vasoconstrictor-induced contractions in tissue solution deprived of Ca^{2+} followed by Ca^{2+} restoration. **Results** NEN (0.5 - 3.0 $\mu\text{mol/L}$) relaxed RCA precontracted with KCl or U46619 in a concentration-dependent manner. MAPK inhibitors (PD98059 and SB239063) reduced the relaxant effect of NEN, while the potassium-channel blockers (tetraethylamine, 4-aminopyridine, BaCl_2 , and glibenclamide) did not significantly affect relaxation. NEN specifically inhibited the contraction component dependent on extracellular Ca^{2+} influx in vessels stimulated with KCl and U46619, with a negligible effect on the component dependent on intracellular Ca^{2+} release. **Conclusions** NEN exhibits vasodilator properties in RCA. Inhibition

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号:81603111); 山西省“1331工程”重点学科建设计划支持学科。

[作者简介] 宋奇颖(1990—), 女, 硕士, 研究方向: 心血管药理学。E-mail: lemon_0920@126.com

[通信作者] 刘宇(1977—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 心血管药理学。E-mail: hitec@126.com

of extracellular Ca^{2+} influx and activation of the MAPK signaling pathway may be involved in NEN-induced RCA vasorelaxation.

【Key words】 niclosamide ethanolamine, NEN; vasorelaxation; coronary artery; MAPK signaling pathway; Ca^{2+}

氯硝柳胺乙醇胺盐(niclosamide ethanolamine, NEN)是氯硝柳胺的盐形式,具有抗血吸虫作用,是目前国内控制血吸虫媒介螺蛳的首选药物^[1]。NEN具有线粒体氧化磷酸化解偶联作用,可通过抑制细胞分裂周期 37 蛋白,阻断多种信号通路,减缓肝癌细胞的生长^[2]。NEN 增高糖尿病大鼠 AMP 激活的蛋白激酶(AMPK)的磷酸化水平而减轻肝脏脂肪变性,降低胰岛素抵抗,减缓糖尿病进程^[3]。最近研究表明,NEN 对大鼠肠系膜动脉和主动脉具有舒张作用^[4]。了解 NEN 对冠状动脉的作用及其机制对其进一步应用具有重要意义。本研究采用离体微血管张力测定法探讨 NEN 对大鼠冠状动脉(rat coronary artery, RCA)肌张力的影响及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只,8 周龄,体重为 220 ~ 250 g,购自山西医科大学实验动物中心[SCXK(晋)2015-001]。受试动物饲养于山西医科大学 SPF 级动物房[SYXK(晋)2015-001],温度为 22℃~25℃,湿度为 50%~70%,光照 12 h,期间自由饮食饮水。动物实验操作均按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀,符合本校动物实验伦理学标准,符合国家《实验动物管理条例》。

1.2 主要试剂与仪器

血栓素 A_2 受体激动药(U46619)、4-氨基吡啶(4-AP)、氯化钡(BaCl_2)、四乙胺(TEA)、格列本脲(Gli)、PD98059、SB239063、HEPES、EGTA 均购自美国 Sigma 公司,NEN 购自上海江莱生物科技有限公司,其余为市售分析纯。正常生理盐溶液(PSS 溶液)成分为:NaCl(118 mmol/L),KCl(4.7 mmol/L), CaCl_2 (2.5 mmol/L), KH_2PO_4 (1.2 mmol/L), NaHCO_3 (25 mmol/L), MgSO_4 (1.2 mmol/L),HEPES(5 mmol/L),葡萄糖(11 mmol/L)。NEN、PD98059、SB239063 用 DMSO 溶解,加药时保证浴槽中 DMSO 终浓度不超过 1%。文中所述浓度均为各试剂在浴槽 PSS 溶液中的终浓度。

Multi Myograph System-610M 微血管张力记录系统购自丹麦 DMT 公司,PowerLab 生物信号采集分析系统购自澳大利亚埃德仪器国际贸易有限公司,

Nikon 解剖显微镜购自日本 Olympus 公司,Sartorius BS124S 精密天平购自北京赛多利斯科学仪器有限公司,Heal Force 新一代超纯水仪购自新仪器(上海)有限公司,PHS-3C 精密 pH 计购自上海精科实业有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 离体 RCA 血管环标本的制备

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉处死后,立刻取出心脏,置于盛有 4℃、pH 7.4 且用 95% O_2 + 5% CO_2 混合气体饱和的 PSS 溶液中。将心脏置于显微镜下仔细分离大鼠 RCA 前降支,剪取直径为 200 ~ 240 μm 、长度约为 2 mm 的血管环,用两根直径为 40 μm 的细钢丝通过管腔将其固定于 DMT 浴槽内张力换能器上,Chart 7.3 生物信号采集软件记录其张力变化。槽内盛有 37℃、pH 7.4、95% O_2 + 5% CO_2 混合气体饱和 PSS 溶液 5 mL。RCA 在浴槽内平衡稳定 1 h,期间每隔 15 min 更换一次预热(37℃)的新鲜 PSS 溶液。在正式实验开始前,用 KCl(60 mmol/L)刺激 RCA 收缩,重复 3 次,若连续两次 RCA 收缩幅度差别小于 10%,且最大收缩幅度大于 2 mN,认为该血管环的活性良好,肌源性功能正常,稳定 30 min 后开始正式实验。血管环详细制备过程及活性检测参照课题组已发表文献^[5]。

1.3.2 NEN 对离体 RCA 的舒张作用

RCA 稳定 30 min 后,分别加入 KCl(60 mmol/L)、U46619(0.3 $\mu\text{mol/L}$),当收缩达到坪台后,向浴槽内累积加入 NEN,使其终浓度依次为 0.5、1、1.5、2、2.5、3 $\mu\text{mol/L}$,每次加药需待前一个药物浓度作用达到坪台后再加下一个浓度,记录 RCA 张力的变化。对照组则依次加入相应体积的溶剂(DMSO)以观察溶剂对 RCA 张力的影响。以收缩剂引起 RCA 收缩的最大幅度为 100%,计算不同浓度 NEN 的舒张百分比、最大舒张率和舒张 50% 时所需的药物浓度(RC_{50} 值)。

1.3.3 相关抑制剂对 NEN 舒张 RCA 作用的影响

用 U46619(0.3 $\mu\text{mol/L}$)刺激 RCA 收缩,待其收缩达到坪台后,在抑制剂不存在(对照)和抑制剂预孵并存在情况下分别记录 NEN 的舒张作用。在加入 NEN 之前 10 min 分别加入 K_v 阻断剂 4-AP(1

mmol/L)、 K_{ir} 阻断剂 $BaCl_2$ (1 mmol/L)、 K_{Ca} 阻断剂 TEA (1 mmol/L)、 K_{ATP} 阻断剂 Gli (0.01 mmol/L)、MAPK 抑制剂 PD98059 (3 μ mol/L) 或 SB239063 (3 μ mol/L), 待 RCA 收缩再次达到坪台后加入 NEN (2 μ mol/L), 观察抑制剂对 NEN 舒张 RCA 作用的影响。以最大收缩幅度为 100%, 计算 NEN 的舒张百分比。

1.3.4 NEN 对收缩剂所致的细胞内或外钙依赖性收缩的影响

用含 EGTA (1 mmol/L) 的无钙 PSS 溶液洗脱 RCA, 15 min 后将浴槽内的液体更换为不含 EGTA 的无钙 PSS 溶液^[5]。继续平衡 15 min 后将液体更换为等体积的无钙 60 mmol/L 高钾 PSS 溶液或直接加入 U46619 (0.3 μ mol/L), 待收缩达到坪台后复钙, 即加入 $CaCl_2$ 使浴槽中 Ca^{2+} 为 2.5 mmol/L, 血管继续收缩达到坪台后用正常 PSS 溶液洗脱。待 RCA 恢复静息张力后分别用 NEN (1、1.5、2 μ mol/L) 预孵 15 min, 然后在 NEN 存在的情况下重复以上去钙和复钙操作。观察不同浓度 NEN 对外钙内流和内钙释放引起的 RCA 收缩的影响。

1.4 统计学方法

数据均以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 GraphPad Prism 6.0 作图。使用 SPSS 19.0 进行 t 检验及两因素重复测量方差分析。用 Logistic 法求出 RC_{50} 。

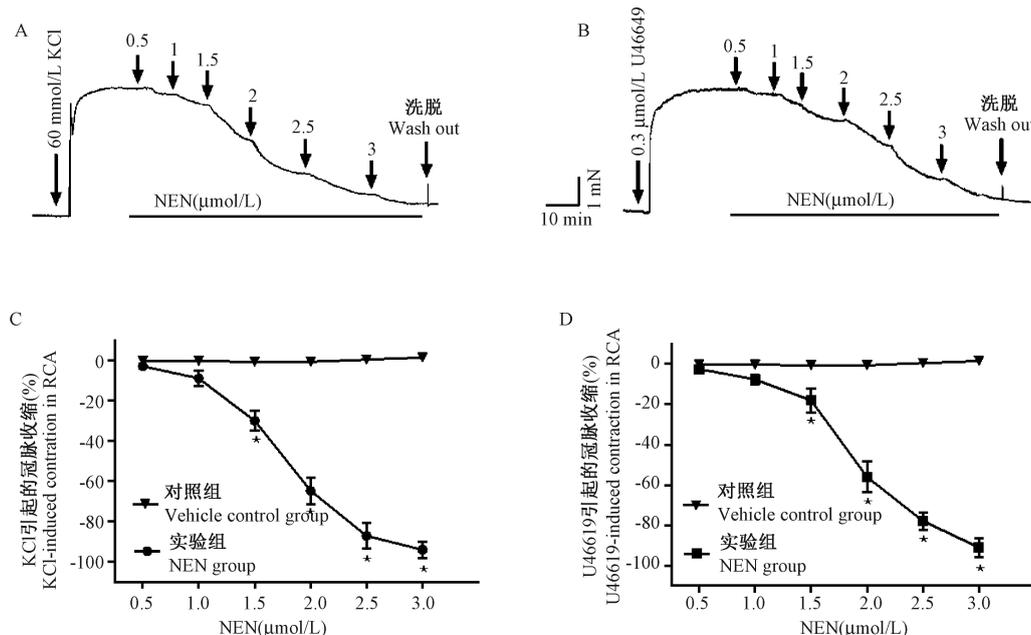
2 结果

2.1 NEN 浓度依赖性舒张离体大鼠 RCA

KCl (60 mmol/L)、U46619 (0.3 μ mol/L) 收缩离体大鼠 RCA, 最大收缩幅度分别为 (4.04 \pm 0.26) mN、(3.75 \pm 0.69) mN; NEN (0.5 ~ 3 μ mol/L) 浓度依赖性地舒张 KCl 和 U46619 收缩的离体 RCA, 其最大舒张百分率分别为 (93.97 \pm 0.85)%、(91.06 \pm 1.23)%, RC_{50} 分别为 (1.85 \pm 0.28) μ mol/L、(1.94 \pm 0.41) μ mol/L。见图 1。

2.2 钾通道阻断剂和 MAPK 抑制剂对 NEN 舒张大鼠 RCA 作用的影响

NEN (2 μ mol/L) 对 U46619 (0.3 μ mol/L) 预收缩 RCA 的最大舒张百分率为 (62.85 \pm 4.07)%。在钾通道阻断剂 4-AP (1 mmol/L)、 $BaCl_2$ (1 mmol/L)、TEA (1 mmol/L)、Gli (0.01 mmol/L) 存在情况下,



注: A、B: 分别为 NEN 舒张 KCl 或 U46619 引起大鼠 RCA 收缩的原始记录图; C、D: NEN 浓度-舒张曲线。与溶剂对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 NEN 对 KCl、U46619 预收缩的 RCA 的舒张作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Note. A and B: Typical original tracing after application of KCl or U46619 followed by cumulative application of niclosamide ethanolamine, respectively. C and D: Relaxation was expressed as percentages of maximal contraction induced by KCl (60 mmol/L) or U46619 (0.3 μ mol/L), respectively. Compared with the vehicle control group, * $P < 0.05$.

Fig. 1 Niclosamide ethanolamine-induced relaxation in rat coronary artery precontracted with KCl or U46619

NEN 的最大舒张百分率分别为 $(57.88 \pm 5.98)\%$ 、 $(54.69 \pm 4.62)\%$ 、 $(55.56 \pm 3.97)\%$ 和 $(57.51 \pm 3.61)\%$ ，与对照组相比均无显著影响 ($P > 0.05$ ，见图 2)。MAPK 抑制剂 PD98059 ($3 \mu\text{mol/L}$)、SB239063 ($3 \mu\text{mol/L}$) 存在时，NEN ($2 \mu\text{mol/L}$) 对 KCl (60 mmol/L) 预收缩 RCA 的舒张幅度分别减小 $(27.93 \pm 0.71)\%$ 和 $(30.47 \pm 0.82)\%$ ($P < 0.05$)；对 U46619 ($0.3 \mu\text{mol/L}$) 预收缩 RCA 的舒张幅度分别减小 $(25.92 \pm 0.58)\%$ 、 $(27.09 \pm 0.65)\%$ ，差异有显著性 ($P < 0.05$ ，见图 3)。

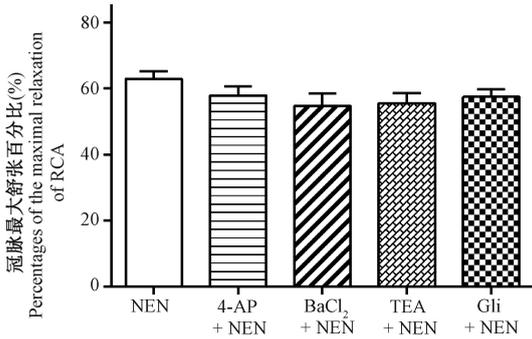
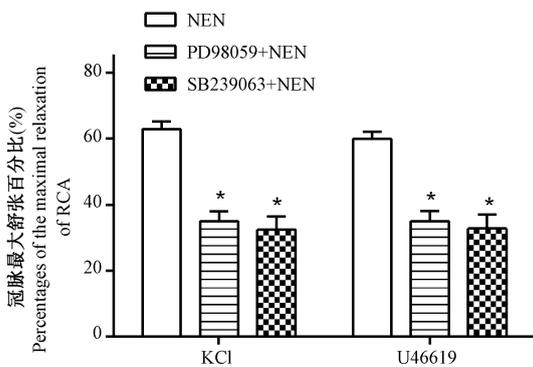


图 2 钾通道阻断剂对 NEN 舒张 U46619 预收缩 RCA 作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of K⁺ channel inhibitors on niclosamide ethanolamine-induced relaxation in isolated rat coronary artery rings precontracted with $0.3 \mu\text{mol/L}$ U46619



注：与 NEN 相比，* $P < 0.05$ 。

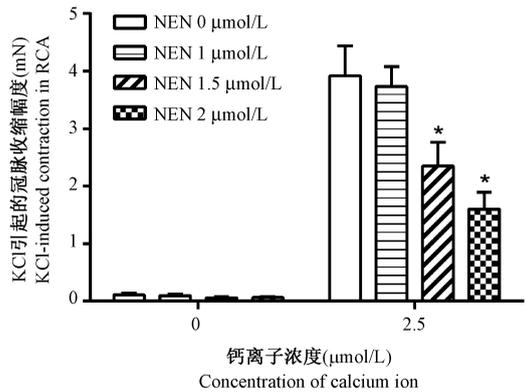
图 3 MAPK 抑制剂对 NEN 舒张 RCA 作用的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with NEN, * $P < 0.05$.

Fig. 3 Effect of mitogen-activated protein kinase inhibitors on niclosamide ethanolamine-induced relaxation in isolated rat coronary artery rings precontracted with 60 mmol/L KCl or $0.3 \mu\text{mol/L}$ U46619

2.3 NEN 对细胞内钙释放和细胞外钙内流所致收缩的影响

KCl (60 mmol/L) 在无钙 PSS 溶液中引起 RCA 收缩幅度为 $(0.11 \pm 0.13) \text{ mN}$ ，复钙后收缩幅度为 $(3.92 \pm 1.13) \text{ mN}$ 。预孵 NEN ($1, 1.5, 2 \mu\text{mol/L}$) 能明显抑制 KCl (60 mmol/L) 外钙内流引起的 RCA 收缩 (见图 4)，收缩幅度分别为 $(3.73 \pm 1.02) \text{ mN}$ 、 $(2.35 \pm 0.61) \text{ mN}$ 、 $(1.60 \pm 0.25) \text{ mN}$ 。U46619 ($0.3 \mu\text{mol/L}$) 在无钙 PSS 溶液中引起 RCA 收缩幅度为 $(0.55 \pm 0.14) \text{ mN}$ ，复钙后进一步收缩 RCA，其收缩幅度为 $(3.44 \pm 1.13) \text{ mN}$ 。预孵 NEN ($1, 1.5, 2 \mu\text{mol/L}$) 能明显抑制 U46619 ($0.3 \mu\text{mol/L}$) 复钙后外钙内流引起的 RCA 收缩，收缩幅度分别为 $(3.28 \pm 0.95) \text{ mN}$ 、 $(2.34 \pm 0.16) \text{ mN}$ 、 $(1.71 \pm 0.23) \text{ mN}$ ，差异有显著性 ($P < 0.05$ ，见图 5)；而 NEN 对内钙释放引起的收缩均无明显影响 ($P > 0.05$ ，见图 4、图 5)。



注：与 NEN $0 \mu\text{mol/L}$ 相比，* $P < 0.05$ 。

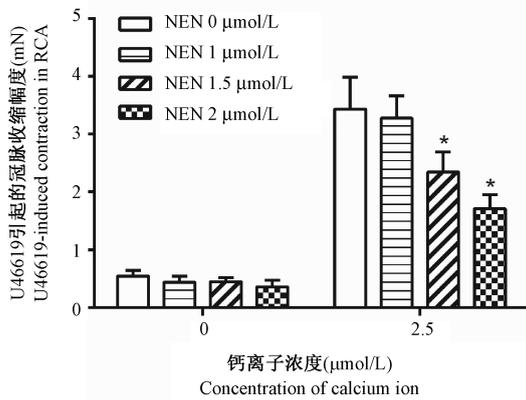
图 4 NEN 对 KCl 引起的细胞内钙依赖性和细胞外钙依赖性 RCA 收缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with vehicle control (NEN $0 \mu\text{mol/L}$), * $P < 0.05$.

Fig. 4 Effect of niclosamide ethanolamine on rat coronary artery contraction induced by KCl in a Ca^{2+} -free bath followed by restoration of 2.5 mmol/L Ca^{2+}

3 讨论

氯硝柳胺是世界卫生组织唯一推荐使用的杀灭血吸虫中间宿主的杀螺剂，其机制为对寄生虫的线粒体氧化磷酸化具有解耦联作用。另有研究发现氯硝柳胺具有抗结核、抗病毒、抗肿瘤以及改善糖尿病抵抗等作用^[6-8]。氯硝柳胺水溶性低的特点限制了其应用。NEN 是氯硝柳胺合盐，具有更高的水溶性，同时具有对哺乳动物毒性低和对环境污染小等优点。最近研究表明，NEN 对大鼠肠系膜动



注:与 NEN 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, * $P < 0.05$ 。

图 5 NEN 对 U46619 引起的细胞内钙依赖性和细胞外钙依赖性 RCA 收缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. Compared with vehicle control (NEN 0 $\mu\text{mol/L}$), * $P < 0.05$.

Fig. 5 Effect of niclosamide ethanolamine on rat coronary artery contraction induced by U46619 in Ca^{2+} -free PSS followed by restoration of 2.5 mmol/L Ca^{2+}

脉和主动脉具有显著的舒张作用,其机制可能与激活 AMPK 有关^[4]。冠状动脉形成起源、生物学特点及药理学特点均不同于其他血管^[9-10],了解药物对冠状动脉的影响对临床合理用药具有重要意义。本研究表明,NEN 对处于收缩状态的 RCA 具有强大的舒张作用,最大舒张率可达 90% 以上, $\text{RC}_{50} < 2.0 \mu\text{mol/L}$ 。其药理学特点为舒张 RCA 浓度范围相对较窄(0.5 ~ 3 $\mu\text{mol/L}$),对去极化(60 mmol/L KCl)和血管素 A_2 受体激动药所致收缩的舒张作用无明显的选择性。

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)上主要表达有 K_v 、 K_{ir} 、 K_{Ca} 和 K_{ATP} 四种钾通道,它们在 VSMC 细胞膜电位和血管阻力的调节中具有重要作用^[11-13]。该四种钾通道选择性抑制剂分别为 4-氨基吡啶、氯化钡、四乙胺和格列本脲,本研究结果表明,它们对 NEN 舒张 U46619 预收缩的 RCA 均无显著影响,提示 NEN 对离体大鼠 RCA 的舒张作用与钾通道无关。MAPK 在 VSMC 收缩中起重要作用^[14]。本实验结果显示 MAPK 抑制剂 PD98059 和 SB239063 减弱 NEN 的舒张作用,提示 NEN 舒张 RCA 可能与其激活 MAPK 有关。本研究结果还表明,NEN 选择性抑制细胞外钙依赖性收缩成分,其抑制程度与其舒张 RCA 强度相一致,而对血管收缩剂所致的细胞内钙释放依赖性的收缩成分无显著影响,这可能与其脱耦联作用促进线粒体 Ca^{2+} 释放有关^[4]。

综上所述,本研究证明 NEN 对 RCA 具有突出

的舒张作用,并提示该作用可能与其激活 MAPK 信号通路、抑制细胞外钙内流有关。本研究扩展了对 NEN 血管作用的认识,为临床合理评估 NEN 对冠状动脉的作用提供基础研究参考。

参考文献:

- [1] Li H, Wang W. Apropos: critical analysis of molluscicide application in schistosomiasis control programs in Brazil [J]. Infect Dis Poverty, 2017, 6(1): 54.
- [2] Chen B, Wei W, Li M, et al. Computational discovery of niclosamide ethanolamine, a repurposed drug candidate that reduces growth of hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and in mice by inhibiting CDC37 signaling [J]. Gastroenterology, 2017, 152(8): 2022-2036.
- [3] Tao H, Zhang Y, Zeng X, et al. Niclosamide ethanolamine-induced mild mitochondrial uncoupling improves diabetic symptoms in mice [J]. Nat Med, 2014, 20(11): 1263-1269.
- [4] Li SL, Yan J, Zhang YQ, et al. Niclosamide ethanolamine inhibits artery constriction [J]. Pharmacol Res, 2017, 115: 78-86.
- [5] Liu Y, Niu L, Cui L, et al. Hesperetin inhibits rat coronary constriction by inhibiting Ca^{2+} influx and enhancing voltage-gated K^+ channel currents of the myocytes [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 735: 193-201.
- [6] Piccaro G, Giannoni F, Filippini P, et al. Activities of drug combinations against *Mycobacterium tuberculosis* grown in aerobic and hypoxic acidic conditions [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(3): 1428-1433.
- [7] Jurgeit A, McDowell R, Moese S, et al. Niclosamide is a proton carrier and targets acidic endosomes with broad antiviral effects [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(10): e1002976.
- [8] Osada T, Chen M, Yang XY, et al. Anti-helminth compound niclosamide downregulates Wnt signaling and elicits antitumor responses in tumors with activating APC mutations [J]. Cancer Res, 2011, 71(12): 4172-4182.
- [9] Labrujere S, Chan KY, de Vries R, et al. Dihydroergotamine and sumatriptan in isolated human coronary artery, middle meningeal artery and saphenous vein [J]. Cephalalgia, 2015, 35(2): 182-189.
- [10] Wang G, Jacquet L, Karamariti E, et al. Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells [J]. J Physiol, 2015, 593(14): 3013-3030.
- [11] Dick GM, Tune JD. Role of potassium channels in coronary vasodilation [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2010, 235(1): 10-22.
- [12] Cox RH. Molecular determinants of voltage-gated potassium currents in vascular smooth muscle [J]. Cell Biochem Biophys, 2005, 42(2): 167-195.
- [13] Korovkina VP, England SK. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002, 29(4): 317-323.
- [14] Ansar S, Eftekhari S, Waldsee R, et al. MAPK signaling pathway regulates cerebrovascular receptor expression in human cerebral arteries [J]. BMC Neurosci, 2013, 14: 12.

[收稿日期]2018-02-08