

ATP 诱导的血管内皮细胞氯电流及其与 Ca^{2+} 运动的关系

魏文利¹, 关永源^{1*}, 贺 华¹, 邓春玉², 钱卫民², 阮红梅¹, 孙家钧¹

(1. 中山医科大学药理学教研室, 广东 广州 510089; 2. 广东省心血管研究所
电生理室, 广东 广州 510089)

摘要 采用全细胞膜片钳技术和 fura-2 荧光测定胞浆 $[\text{Ca}^{2+}]$ 变化技术, 在培养的牛主动脉内皮细胞上观察 ATP 诱导的 Cl^- 电流的特性及其与 Ca^{2+} 内流的关系。记录到 ATP 激活一外向电流, 其反转电位为 $-(29 \pm 8) \text{ mV}$, 与 Cl^- 的平衡电位接近, 降低细胞外 Cl^- 浓度使反转电位变化, 证明是 Cl^- 电流。ATP 激活的 Cl^- 电流具有较强的外向整流特性, 具有 Ca^{2+} 依赖性, 可被 Cl^- 通道阻滞剂呋塞米和格列本脲分别最大抑制 $(88 \pm 8)\%$ 和 $(93 \pm 4)\%$ ($+100 \text{ mV}$)。ATP 又可诱导内皮细胞外 Ca^{2+} 内流, 呋塞米和格列本脲对 Ca^{2+} 内流分别最大抑制 $(36 \pm 14)\%$ 和 $(44 \pm 12)\%$, 并且二者敏感的 Ca^{2+} 内流特性不同。结果说明 Cl^- 通道开放在调节内皮细胞 Ca^{2+} 内流中起重要作用。

关键词 内皮, 血管; 细胞, 培养的; 氯通道; 钙通道; 腺苷三磷酸; 膜片钳技术

中图分类号: Q463

文献标识码: A

文章编号: 1000-300X(2001)02-0125-06

内皮细胞是一种非兴奋细胞, 大量研究证明内皮细胞膜上不存在电压依赖性 Ca^{2+} 通道 (voltage dependent Ca^{2+} channels, VDC), 内皮细胞 Ca^{2+} 通道主要是 Ca^{2+} 池操纵的 Ca^{2+} 通道 (store-operated Ca^{2+}

channel, SOC), 它的开放受 Ca^{2+} 池充盈的程度调节, Ca^{2+} 池耗竭导致 SOC 开放而触发 Ca^{2+} 释放引起的 Ca^{2+} 内流 (Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} influx, CRAC)^[1,2]。内皮细胞膜电位对 Ca^{2+} 内流的调节起相当重要的作用, 当细胞膜 Ca^{2+} 通道开放后, 受细胞膜内外浓度差和电位差的驱动, Ca^{2+} 顺电化学梯度被动转运, 膜超极化可通过增大 Ca^{2+} 内流的驱动力促进 Ca^{2+} 内流, 而膜去极化则可通过减小 Ca^{2+} 内流的驱动力抑制 Ca^{2+} 内流^[3]。

在兴奋性细胞, 细胞膜 Ca^{2+} 通道开放时胞外 Ca^{2+} 内流, 导致细胞膜去极化而激活 VDC, 进一步促进 Ca^{2+} 快速和大量内流, 完成肌肉收缩和神经冲动。而在内皮细胞, 由于不存在 VDC, Ca^{2+} 内流引起的细胞膜去极化反而有降低 Ca^{2+} 内流的趋势, 可见维持膜电位的超极化状态是引起内皮细胞持续性 Ca^{2+} 内流的必要条件。内皮细胞膜电位主要由 K^+ 和 Cl^- 调节, 以往对 K^+ 通道的研究较多, 而对 Cl^- 通道在内皮细胞功能调节中作用的研究刚刚起步。近年来 Cl^- 通道在调节内皮细胞膜电位及 Ca^{2+} 内流中的作用已受到人们的重视, 但其机理有待研究^[4,5]。

内皮细胞膜上主要存在两种 Cl^- 通道: 容积激活的 Cl^- 通道 (Cl_{vol}) 和 Ca^{2+} 依赖性 Cl^- 通道 (Cl_{Ca}), 静息状态下 Cl_{vol} 通道部分激活, 以维持内皮细胞静息膜电位, 受体激动时 Cl^- 通道被激活, 并参与调节内皮细胞 Ca^{2+} 内流^[6,7]。但是参与调节 Ca^{2+} 内流的 Cl^- 通道的分型、特性, 及 Cl^- 通道开放与 Ca^{2+} 内流之间的关系还不清楚。

本实验采用标准全细胞膜片钳技术, 记录 ATP 诱导的内皮细胞 Cl^- 电流, 并结合 fura-2 荧光测定细胞内钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]$) 技术, 测定内皮细胞 $[\text{Ca}^{2+}]$ 变化, 研究 Cl^- 通道阻滞剂呋塞米 (furosemide) 和格列本脲 (glibenclamide) 对 ATP 诱导的 Cl^- 电流和 Ca^{2+} 内流的影响, 从而对 ATP 诱导的 Ca^{2+} 内流和 Cl^- 通道之间的关系进行研究。

收稿日期 2000-11-13 接受日期 2001-01-04

基金项目: 国家科技部攀登计划 (国科基字 [1999] 045 号); 国家自然科学基金资助 (39770858); 广东省中医药管理局科研基金资助 (98381)

作者简介 魏文利 (1968 -), 女, 安徽省太和人, 博士, 讲师; 关永源 (1946 -), 男, 广东省新会人, 教授, 中国药理学学会心血管专业委员会常务委员; 孙家钧 (1926 -), 男, 安徽省合肥人, 教授。

* 通讯作者。Tel: (020) 87331857, Fax: (020) 87331679,

E-mail: yyguan@gzsums.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

Fura-2/AM, 牛血清白蛋白购于 Boehringer Mannheim 公司(Germany); RPMI 1640 购于 Gibco BRL 公司(USA); ATP, 咪塞米, 格列本脲, 胰蛋白酶(trypsin), HEPES, EGTA, 天冬氨酸(aspartate), CsCl, CsOH, 二甲亚砜等购于 Sigma 公司(USA). 其余试剂均为国产分析纯.

1.2 牛主动脉内皮细胞分离 培养和鉴定

方法同文献 [8]. 实验用第 3~5 代细胞.

1.3 膜片钳全细胞记录

取传代后 1~2 d 内皮细胞, 用细胞外液持续灌流, 流速 $1 \sim 2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. 电极用玻璃毛细管(直径 1.6 mm , 中国科学院上海生理研究所出品)经微电极拉制仪(Narishige, Japan)二步拉制而成, 充灌电极内液后阻抗为 $1 \sim 3 \text{ M}\Omega$. 全细胞记录过程中, 刺激脉冲的产生和信号采集均采用 pCLAMP 7.0(Axon Instruments, USA)程序完成, 离子电流通过膜片钳放大器(Axopatch-200B, Axon Instruments, USA)放大和滤波, 再经 AD/DA 转换板将模拟信号转换为数字信号, 并输入 IBM-PC 机硬盘中, 供实验后分析和处理.

1.4 膜片钳实验溶液

细胞外液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 150, CsCl 6, MgCl_2 1, CaCl_2 1.5, 葡萄糖 10, HEPES 10, 以 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调 pH 至 7.3. 低 Cl^- 细胞外液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 30, Na-天冬氨酸 120, CsCl 6, MgCl_2 1, CaCl_2 1.5, 葡萄糖 10, HEPES 10, 以 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调 pH 至 7.3. 以单价阴离子天冬氨酸代替 Cl^- 而配制成低 Cl^- 细胞外液, 以观察降低细胞外 Cl^- 浓度($[\text{Cl}^-]$)对 ATP 激活的 Cl^- 电流的影响.

电极内液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): CsCl 40, Cs-天冬氨酸 100, MgCl_2 1, Na_2ATP 4, EGTA 0.1, HEPES 10, 以 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CsOH 调 pH 至 7.2. 无 Ca^{2+} 电极内液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): CsCl 40, Cs-天冬氨酸 100, MgCl_2 1, Na_2ATP 4, EGTA 5, HEPES 10, 以 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CsOH 调 pH 至 7.2. 在正常电极内液中加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA, 配制成无 Ca^{2+} 电极内液, 以测定 ATP 激活的 Cl^- 电流与细胞 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的关系. 溶液配好经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤处理, 分装冻存, 临用前加 Na_2ATP .

1.5 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]$ 测定

方法同文献 [8].

1.6 数据处理与分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 药物前后比较用配对 t 检验进行统计学分析.

2 结果

2.1 ATP 激活的牛主动脉内皮细胞 Cl^- 电流

实验中以 Cs^+ 代替 K^+ , 以排除 K^+ 电流的干扰. Cl^- 电流的记录采用电压钳制方式, 在钳制电位为 0 mV 时, 给予一从 -100 mV 至 $+100 \text{ mV}$, 阶跃为 20 mV , 时程 1 s 的去极化方波脉冲刺激, 记录到基础电流, 加 ATP($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)后记录到一激活电流(图 1A). 该电流具有较强的外向整流特性, 在正电压时缓慢激活并逐渐达到稳态, 电流几乎不随时间衰减. 以不同测试电压下的膜电流(I_m)在本实验中为细胞膜 Cl^- 电流与测试电压(V)作图, 得出 $I-V$ 关系曲线(图 1B), 计算出此电流的反转电位为 $-(29 \pm 3) \text{ mV}$ ($n=3$)接近 Cl^- 的平衡电位 -36 mV .

2.2 降低细胞外 Cl^- 浓度对 ATP 激活的 Cl^- 电流的影响

用 Na-天冬氨酸代替部分 NaCl, 将 $[\text{Cl}^-]$ 从 $160 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 降至 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 则可使 ATP 激活 Cl^- 电流的最大电流减小, 反转电位改变, 从 $-(29 \pm 3) \text{ mV}$ 转变为 $(4 \pm 3) \text{ mV}$ ($n=3$), 与 $[\text{Cl}^-]$ 为 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 Cl^- 的平衡电位(约为 0 mV)接近, 证明所记录到的电流是 ATP 激活的 Cl^- 电流(图 1).

2.3 ATP 激活的 Cl^- 电流的 Ca^{2+} 依赖性

用含 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGTA 的电极内液, 当细胞破膜并给予去极化脉冲刺激后 EGTA 迅速络合细胞内 Ca^{2+} , 消除 ATP 升高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的作用, 则 ATP 不能激活 Cl^- 电流($n=3$), 说明该 Cl^- 电流由 ATP 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高激活, 结合该电流在正电压时缓慢激活, 具有较强的外向整流特性, 符合 Ca^{2+} 激活 Cl^- 电流($I_{\text{Cl, Ca}}$)的特性^[6], 可以认为主要是 $I_{\text{Cl, Ca}}$ 成分.

2.4 Cl^- 通道阻滞剂对 ATP 激活的 Cl^- 电流的抑制作用

正常细胞外液, 给予 ATP($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)激活 Cl^- 电流, 再分别加入 Cl^- 通道阻滞剂, 记录累积浓度咪塞米和格列本脲对膜电流的影响, 每次加药后观察 $2 \sim 3 \text{ min}$, 待电流变化稳定后记录结果并继续加药. 咪塞米和格列本脲均呈浓度依赖性抑制 ATP 激活的 Cl^- 电流, 但不影响其反转电位(图 2, 表 1). 在测试电压为 $+100 \text{ mV}$ 时, 咪塞米和格列本脲对

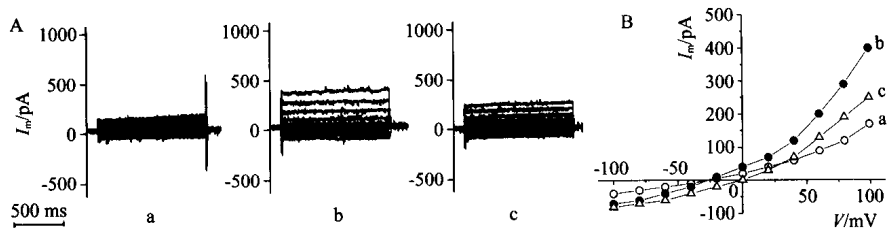


Fig 1. A. Effect of lowering extracellular Cl^- concentration on whole cell recording of ATP-activated membrane Cl^- currents (I_m) in cultured bovine aortic endothelial cells. **B.** Current-voltage curves of ATP-activated I_m before and after extracellular Cl^- concentration was lowered. Cells were clamped from a holding potential of 0 mV to a series of test potentials from -100 to +100 mV for 1000 ms in +20 mV increments. a : control ; b : ATP (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), in normal extracellular Cl^- (160 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) ; c : extracellular Cl^- was reduced from 160 to 40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ by equimolar replacement of Cl^- with aspartate.

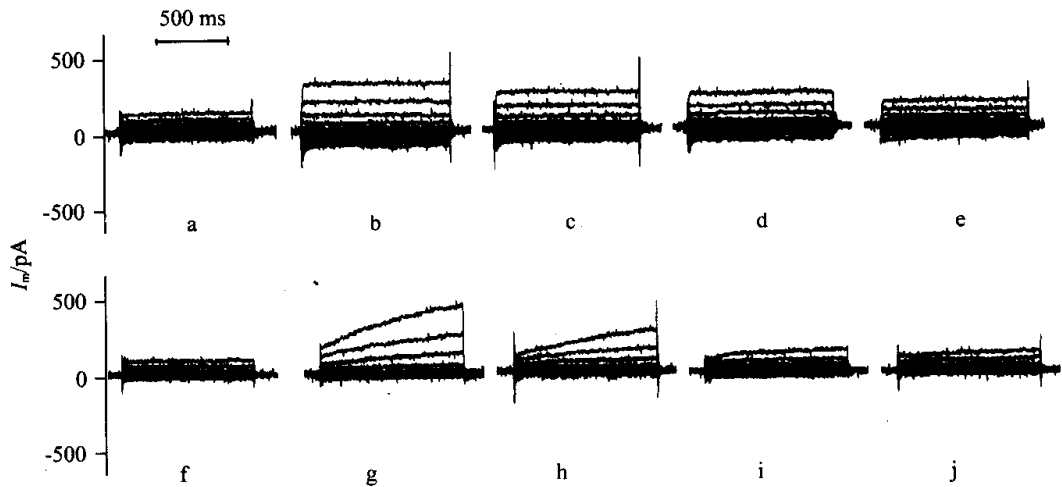


Fig 2. Effects of cumulative concentration of furosemide and glibenclamide on whole cell recordings of ATP-activated Cl^- current in cultured bovine aortic endothelial cells. a : pre-ATP , b : ATP 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, c , d , e : ATP + furosemide 5 , 10 , 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively ; f : pre-ATP , g : ATP 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, h , i , j : ATP + glibenclamide 25 , 50 , 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

Cl^- 电流抑制作用的 IC_{50} 分别为 (6.2 ± 2.6) 和 $(29.6 \pm 12.3) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.5 Cl^- 通道阻滞剂对 ATP 诱导的内皮细胞 Ca^{2+} 内流的影响

为了研究 Cl^- 通道与 ATP 诱导 Ca^{2+} 内流之间

的关系,进一步观察了 Cl^- 通道阻滞剂对 ATP 诱导 Ca^{2+} 内流的影响. 如前文报道^[8], ATP 可诱导胞内 Ca^{2+} 释放和胞外 Ca^{2+} 内流. 本实验在 Ca^{2+} 内流相稳定时加入累积浓度的呋塞米和格列本脲, 每次加药后观察 1 ~ 3 min, 待 $[\text{Ca}^{2+}]$ 变化稳定时继续加

Tab 1. Effects of cumulative concentration of furosemide (Fur) and glibenclamide (Gli) on ATP (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)-induced membrane Cl^{-} currents at +100 mV and +60 mV in cultured bovine aortic endothelial cells

Drug / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	<i>n</i>	<i>I_m</i> / pA	
		at +100 mV	at +60 mV
Pre-ATP	4	180 ± 54 ^{* *}	78 ± 16 ^{* *}
ATP		480 ± 90	232 ± 88
ATP + Fur 5		382 ± 8(33 ± 12) ^{* *}	156 ± 49(44 ± 20) [*]
ATP + Fur 10		272 ± 6(67 ± 17) ^{* *}	114 ± 2(71 ± 7) [*]
ATP + Fur 20		214 ± 6(88 ± 8) ^{* *}	88 ± 2(91 ± 3) [*]
Pre-ATP	5	128 ± 53 ^{* *}	62 ± 33 ^{* *}
ATP		482 ± 55	218 ± 66
ATP + Gli 25		342 ± 6(39 ± 11) ^{* *}	144 ± 6(47 ± 22) [*]
ATP + Gli 50		234 ± 6(70 ± 12) ^{* *}	102 ± 5(73 ± 22) [*]
ATP + Gli 100		154 ± 5(93 ± 4) ^{* *}	72 ± 3(92 ± 7) ^{* *}

Inhibition of *I_n*(%) is shown in parenthesis. $\bar{x} \pm s$. ^{*} *P* < 0.05 , ^{* *} *P* < 0.01 , compared with ATP.

药。呋塞米和格列本脲均呈浓度依赖性地抑制 Ca^{2+} 内流。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呋塞米可抑制 (36 ± 14)%。由于高于 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呋塞米对荧光有干扰,本实验未能观察 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上呋塞米对 Ca^{2+} 内流的抑制作用。100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 格列本脲可对 Ca^{2+} 内流最大抑制 (44 ± 12)% ,它对 Ca^{2+} 内流抑制作用的 *IC*₅₀ 为 (1.1 ± 0.8) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 2)。

在 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呋塞米对 ATP 诱导 Ca^{2+} 内流抑制的基础上,100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 格列本脲可进一步抑制 (10 ± 4)% ,而在 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 格列本脲对 Ca^{2+} 内流最大抑制的基础上,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 呋塞米可进一步抑制 (8 ± 4)%(图 3)。说明呋塞米敏感的 Ca^{2+} 内流和格列本脲敏感的 Ca^{2+} 内流存在非同一性,即两种 Ca^{2+} 内流的特性不同,提示呋塞米和格列本脲抑制 Ca^{2+} 内流的机理不同。

3 讨论

内皮细胞上主要存在 *Cl_{vol}* 和 *Cl_{Ca}* 两种 Cl^{-} 通道,它们在调节胞内 pH、维持细胞膜电位、参与细胞增殖和分化、调节细胞容量、及在调节受体操纵或 Ca^{2+} 池依赖性的 Ca^{2+} 内流中起重要作用^[6,7]。*Cl_{vol}* 通道和 *Cl_{Ca}* 通道相比较又有不同的电生理学特性,

Tab 2. Effects of cumulative concentration of furosemide and glibenclamide on [Ca^{2+}] plateau induced by 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP in cultured bovine aortic endothelial cells

Drug/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	[Ca^{2+}] / nmol · L ⁻¹
Pre-ATP	48 ± 22 ^{* *}
ATP	164 ± 34
ATP + Fur 1.25	156 ± 3(7 ± 6) [*]
ATP + Fur 5	149 ± 3(13 ± 7) ^{* *}
ATP + Fur 10	137 ± 3(23 ± 12) ^{* *}
ATP + Fur 20	124 ± 2(36 ± 14) ^{* *}
Pre-ATP	31 ± 13 ^{* *}
ATP	126 ± 40
ATP + Gli 0.1	117 ± 3(9 ± 3) ^{* *}
ATP + Gli 1	107 ± 2(19 ± 2) ^{* *}
ATP + Gli 10	94 ± 2(34 ± 8) ^{* *}
ATP + Gli 100	85 ± 2(44 ± 12) ^{* *}
ATP + Gli 1000	102 ± 3(25 ± 16) ^{* *}

Inhibition of Ca^{2+} influx(%) is shown in parenthesis. $\bar{x} \pm s$, *n* = 8. ^{*} *P* < 0.05 , ^{* *} *P* < 0.01 , compared with ATP.

如 *Cl_{Ca}* 在正电压缓慢激活,而 *Cl_{vol}* 在正电压缓慢失活;*Cl_{Ca}* 由 [Ca^{2+}] 升高激活,而 *Cl_{vol}* 由细胞外渗透压降低激活;*Cl_{Ca}* 比 *Cl_{vol}* 有更强的外向整流特性等^[7]。内皮细胞静息膜电位比较分散,但平均值与 Cl^{-} 的平衡电位接近^[9],所以 Cl^{-} 通道在不同膜电位开放时 Cl^{-} 电流的方向可能不同, Cl^{-} 外流时引起的内向电流可导致细胞膜去极化, Cl^{-} 内流时引起的外向电流可导致细胞膜超极化。

本研究采用标准全细胞膜片钳记录技术,在牛主动脉内皮细胞记录到 ATP 可激活一外向电流,改变细胞外 Cl^{-} 浓度可改变该电流的反转电位,证明是 Cl^{-} 电流。ATP 激活的 Cl^{-} 电流有较强的外向整流特性,具有 Ca^{2+} 依赖性,说明主要是 *I_{Cl, Ca}* 成分。 Cl^{-} 通道阻滞剂呋塞米和格列本脲呈浓度依赖性地抑制 ATP 激活的 Cl^{-} 电流,在 +100 mV 时它们分别最大抑制 (88 ± 8)% 和 (93 ± 4)%。另外,呋塞米和格列本脲对 ATP 诱导的 Ca^{2+} 内流也呈浓度依赖性地抑制,说明 ATP 激活的 Cl^{-} 通道开放参与了内皮细胞 Ca^{2+} 内流的调节。

呋塞米是一种 Na^{+} 、 $\text{K}^{+}/2\text{Cl}^{-}$ 交换抑制剂,据报道可抑制 *Cl_{Ca}* 通道^[10]。格列本脲是一种 K^{+} 通道和 Cl^{-} 通道阻滞剂,低浓度时(1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下)对

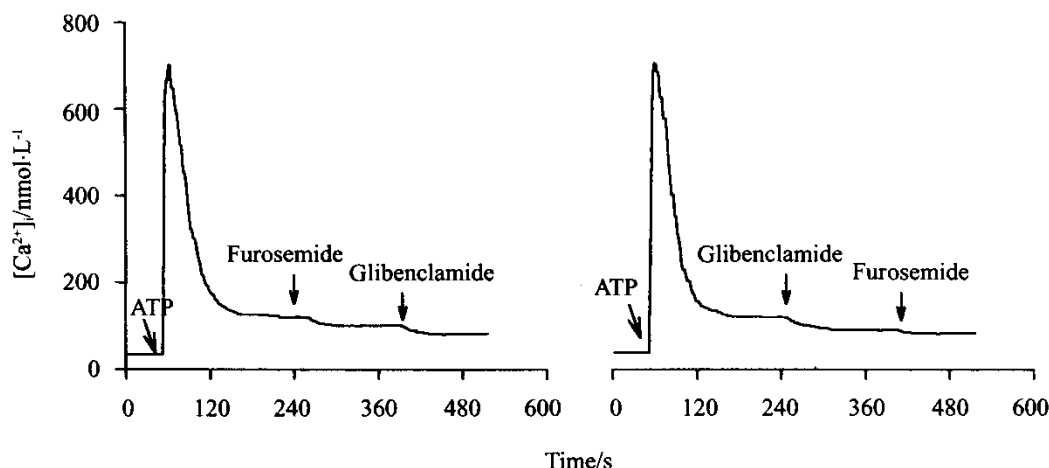


Fig 3. Inhibitory effects of furosemide($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and glibenclamide($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) combination on ATP ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)-induced Ca^{2+} entry in cultured bovine aortic endothelial cells.

K^{+} 通道有选择性抑制作用,而高浓度($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上)对 Cl^{-} 通道有抑制作用^[11,12]。本文发现,呋塞米与格列本脲对 ATP 诱导的 Ca^{2+} 内流的抑制有叠加作用,说明呋塞米敏感的 Cl^{-} 通道与格列本脲敏感的 Cl^{-} 通道参与 Ca^{2+} 内流的机理不同。值得注意的是,格列本脲对 ATP 诱导 Cl^{-} 电流的抑制作用比它对 Ca^{2+} 内流抑制作用的强度大(IC_{50} 分别为 (29.6 ± 12.3) 和 $(1.1 \pm 0.8) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),说明格列本脲敏感的 Cl^{-} 通道参与了 ATP 诱导的 Ca^{2+} 内流,但该 Ca^{2+} 内流中又包含对格列本脲敏感的非 Cl^{-} 通道机理,考虑到低浓度格列本脲对 K^{+} 通道有阻断作用,提示 K^{+} 通道也参与了 ATP 诱导的 Ca^{2+} 内流的部分调节。

综上所述, Cl^{-} 通道阻滞剂呋塞米和格列本脲呈浓度依赖性抑制 ATP 诱导的 Cl^{-} 电流和 Ca^{2+} 内流,说明 Cl^{-} 通道开放对调节内皮细胞 Ca^{2+} 内流中起重要作用,为寻找新型的影响内皮细胞功能的药物提供了实验室依据,并为心脑血管疾病的防治提供新的思路。

4 参考文献:

- [1] Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx [J]. *Physiol Rev*, 1997, **77**(4):901-930.
- [2] Clapham DE. Calcium signaling [J]. *Cell*, 1995, **80**(2):259-268.
- [3] Kamouchi M, Droogmans G, Nilius B. Membrane potential as a modulator of the free intracellular Ca^{2+} concentration in agonist-activated endothelial cell [J]. *Gen Physiol Biophys*, 1999, **18**(2):199-208.
- [4] Gericke M, Oike M, Droogmans G, Nilius B. Inhibition of capacitative Ca^{2+} entry by a Cl^{-} channel blocker in human endothelial cell [J]. *Eur J Pharmacol*, 1994, **269**(3):381-384.
- [5] Wang X, van Breemen C. Depolarization-mediated inhibition of Ca^{2+} entry in endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1999, **277**(4 Pt 2):H1498-H1504.
- [6] Nilius B, Viana F, Droogmans G. Ion channels in vascular endothelium [J]. *Annu Rev Physiol*, 1997, **59**:145-170.
- [7] Nilius B, Szucs G, Heinke S, Voets T, Droogmans G. Multiple types of chloride channels in bovine pulmonary artery endothelial cells [J]. *J Vasc Res*, 1997, **34**(3):220-228.
- [8] 魏文利,关永源,贺华,孙家钧. ATP 触发牛主动脉内皮细胞 Ca^{2+} 内流与 Cl^{-} 通道和 PKC 的关系 [J]. *中国药理学通报*, 2000, **16**(2):190-195.
- [9] Voets T, Droogmans G, Nilius B. Membrane currents and the resting membrane potential in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells [J]. *J Physiol (Lond)*, 1996, **497**(Pt 1):95-107.
- [10] Evans MG, Marty A, Tan YP, Trautmann A. Blockage of Ca-activated Cl^{-} conductance by furosemide in rat lacrimal gland [J]. *Pflugers Arch*, 1986, **406**(1):65-68.

- [11] Fujita A , Kurachi Y. Molecular aspects of ATP-sensitive K^+ channels in the cardiovascular system and K^+ channel openers[J]. *Pharmacol Ther* , 2000 , **85** (1) :39 – 53.
- [12] Yamazaki J , Hume JR. Inhibitory effects of glibenclamide

on cystic fibrosis transmembrane regulator , swelling-activated , and Ca^{2+} -activated Cl^- channels in mammalian cardiac myocytes[J]. *Circ Res* , 1997 , **81** (1) :101 – 109.

ATP-induced chlorine current in vascular endothelial cells and its relationship with Ca^{2+} movement

WEI Wen-Li¹ , GUAN Yong-Yuan¹ , HE Hua¹ , DENG Chun-Yu² ,
QIAN Wei-Min² , RUAN Hong-Mei¹ , SUN Jia-Jun¹

(1. Department of Pharmacology , Sun Yat-Sen University of Medical Sciences , Guangzhou 510089 , China ;

2. Division of Clinical Electrophysiology , Guangdong Cardiovascular Institute ,
Guangzhou 510089 , China)

Abstract : The combination of whole-cell patch clamp and fura-2 fluorescence techniques had been used to investigate the ATP-activated Cl^- current and Ca^{2+} entry in bovine aortic endothelial cells (BAEC). Application of ATP activated an outward current. The $I-V$ curve showed pronounced outward rectification and the current reversed at $-(29 \pm 3)$ mV , which was close to the equilibrium potential for Cl^- (-36 mV). Reducing the $[Cl^-]$ caused a shift in the reversal potential towards more positive potentials. It indicated that the ATP-activated current was mainly carried by Cl^- . ATP-activated Cl^- current was $[Ca^{2+}]$ dependent , it was maximally inhibited by Cl^- channel blockers furosemide and glibenclamide with $(88 \pm 8)\%$ and $(93 \pm 4)\%$ at $+100$ mV. Application of ATP activated Ca^{2+}

influx from the extracellular space. ATP-induced Ca^{2+} entry was inhibited by furosemide and glibenclamide with $(36 \pm 14)\%$ and $(44 \pm 12)\%$, respectively. The Ca^{2+} influx sensitive to furosemide is not the same as that to glibenclamide. These observations suggest that opening of Cl^- channel plays an important role in the regulation of Ca^{2+} entry in BAEC.

Key words : endothelium , vascular ; cells , cultured ; chlorine channels ; calcium channels ; adenosine triphosphate ; patch clamp technique

Foundation item : The project supported by Ministry of Science and Technology in China ([1999] D45) ; National Natural Science Foundation of China (39770858) ; Administration of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province (98381)

(本文编辑 董立春)