

去甲乌药碱对培养心肌细胞搏动的影响

韩慧婉 王家珍 孙福立 (中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

曾贵云 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

提要 DMC 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} 及 $10^{-3}M$ 时, 细胞搏动频率分别增加 19, 32, 26, 及 18%。搏动振幅改变较小, 10^{-5} 及 $10^{-4}M$ 时可轻度加大, 并对抗自发性心肌细胞团的节律失常。 10^{-4} 及 $10^{-3}M$ 使个别细胞出现节律失常。ISO $10^{-6}M$ 增加心肌细胞搏动频率和幅度, 它的作用比 DMC 明显。两药的正性肌力和心率作用均能被 PIN 10^{-6} 及 $10^{-5}M$ 所拮抗, 提示 DMC 的作用与激动心肌细胞 β 受体有关。

关键词 培养大鼠心肌细胞; 去甲乌药碱; 异丙肾上腺素; 心得静

去甲乌药碱 (*dl*-demethylcoclaurine) 是附子的强心有效成分之一, 能加强心收缩力, 加速心率和扩张血管, 并被心得安对抗⁽¹⁾。本研究观察此碱对培养的大鼠心肌细胞搏动的影响, 以进一步分析其作用性质。

材料和方法

一、材料

1. 动物 实验用 Wistar 大白鼠生后 1-3 d 的乳鼠, ♀♂兼用。

2. 培养基 Eagle MEM 由中国科学院生物物理研究所制备工厂生产, 含 NaCl 116, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgSO₄ 0.8, NaH₂PO₄ 1 mM, 用时加 10—15% 小牛血清配成培养液, 不加抗菌素。

3. 胰蛋白酶 DIFCO 厂产品 以无 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 的 Hank 氏液配成 0.06% 胰蛋白酶溶液。

上述溶液均以微孔滤膜抽滤灭菌。调至 pH 7.2—7.4, 放冰箱保存。

4. 药物 去甲乌药碱盐酸盐 (以下简称 DMC) 由中国医学科学院药物研究所合成室合成, 硫酸异丙肾上腺素注射液 (ISO) 为北京制药厂生产。心得静注射液 (PIN) 由北京大学制药厂合成。上述药物均以无血清的 Eagle 培

养液稀释。文中所指药物浓度均为加药后培养瓶内液体的最终浓度。

二、方法

1. 细胞的制备 参考文献⁽²⁾加以改进⁽³⁾。在无菌条件下取同窝或两窝乳鼠的心尖组织, 置盛有 Hank 氏液的平皿内, 剪碎后用胰蛋白酶溶液在 37℃ 下消化 4—6 次, 制成细胞悬液。加冰冷的培养液终止消化。离心收集细胞, 加培养液稀释至 60—70 万细胞/ml, 每培养瓶加 3 ml, 在 37℃ 温箱中静止培养。如欲除去大部分成纤维细胞, 可将细胞悬液静止 2 h 后接种。培养 12—15 h 后可见心肌细胞搏动, 约 30 h 后用于药物实验。

2. 记录和给药方法 用自制光电换能装置⁽⁴⁾将心肌细胞搏动记录在多道生理记录仪上。从 151 次实验中记录出心肌细胞团的搏动频率为 $124 \pm (SD) 30$ beats/min (bpm), 和文献报道⁽⁵⁾相似。

实验前 2 h 给细胞换以新鲜培养液。实验时将培养瓶放进倒置显微镜台的保温罩内 ($36.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$)。选择适当的小细胞团, 使其搏动显示于荧光屏上。给药前 5 min 及 0 min 分别记录对照值, 给药后按规定时间进行描记。给药用的注射器分别固定在保温罩的小孔内, 通过一段已知容量的塑料管与穿过培养瓶塞的注射针头相连, 这样可以避免变动细胞位置。加药时打开瓶塞上通气用的塑料管插头, 以保持瓶内压力。每次将 0.1 ml 的药液加到 1.9 ml 的培养液中。

1980 年 8 月 15 日收稿 1981 年 1 月 13 日修回
1980 年 11 月 6 日全国第一届心血管药理学专业学术会议宣读。

结 果

一、DMC 及 ISO 对心肌细胞搏动的影响

1. 对 bpm 的影响 对照组给 0.1 ml 培养液观察 15 min, 心肌细胞 bpm 无明显变化。给不同浓度 DMC 1—2 min 后, 心肌细胞 bpm 明显增加, 通常在 10—15 min 增至高峰(图 1、表 1)。当药物浓度为 $10^{-6} M$ 时, bpm 由 116 ± 17 增至 138 ± 26 ($P < 0.01$), 增加了 19%。 10^{-5} 及 $10^{-4} M$ 时分别增加 32 和 26% ($P < 0.001$)。 $10^{-3} M$ 时仅增加 18% ($P < 0.01$), 作用维持时间缩短, 给药后 15 min 恢复至给药前水平。ISO $10^{-6} M$ 使心肌细胞 bpm 由给药前的 115 ± 14 增至 160 ± 15 ($P < 0.001$), 增加了 39%。见图 1, 表 1。

2. 对搏动振幅的影响 对照组给 0.1 ml 培养液对心肌细胞搏动振幅无明显影响。ISO $10^{-6} M$ 的 10 次实验中, 平均增加 73% ($P < 0.05$)。DMC $10^{-5} M$ 对多数心肌细胞的搏动振幅增加, 14 次实验平均增加 13%, 但与给

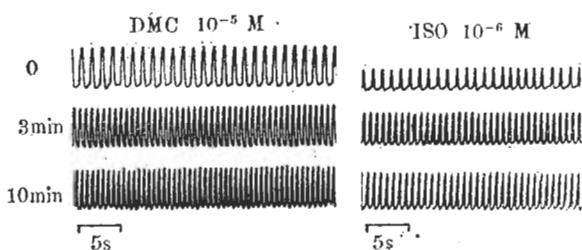


图 1 Effects of DMC and ISO on the beating rates of cultured rat heart cells

药前比无显著差异。

3. 对搏动节律的影响 DMC 10^{-6} 和 $10^{-5} M$ 时对心肌细胞的节律无明显影响, 10^{-4} 及 $10^{-3} M$ 时可使个别心肌细胞团出现节律失常。

原代培养的心肌细胞仅少数有自发性的节律失常, 而 DMC 和 ISO 可使自发性节律失常的心肌细胞团变为正常节律。ISO $10^{-6} M$ 的 9 次实验中, 全部变为同步化搏动(图 2)。DMC $10^{-5} M$ 的 17 次实验中, 11 次节律失常消失(图 2), 2 次改善, 4 次无变化。

二、PIN 分别对 DMC 和 ISO 的拮抗作用 对照组给 DMC $10^{-5} M$ 后, bpm 增加 52%, 观察 30 min, 一直维持在较高水平。若先给 DMC $10^{-5} M$ 15 min 的 bpm 增加 42%, 再给 PIN $10^{-6} M$, bpm 迅速降低, 观察 15 min 已接近给药前水平(图 3)。ISO $10^{-6} M$ 使心肌细胞团 bpm 增加 50%, 观察 30 min 一直维持在较高水平, 在给 ISO $10^{-6} M$ 后 15 min 的 bpm 增加 47%, 再加 PIN $10^{-6} M$, bpm 迅速降低, 15 min 后接近给药前水平(图 3)。

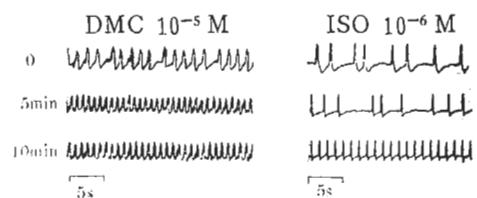


图 2 Effects of DMC and ISO on spontaneous arrhythmia of cultured rat heart cells

表 1 Effect of DMC and ISO on the beating rate of cultured rat heart cells

group	drug conc. (M)	N	beating rate(±SD)bpm				
			0 min	3 min	5 min	10 min	15 min
Control		13	140 ± 17	143 ± 30	142 ± 27	140 ± 27	140 ± 28
DMC	10^{-6}	12	116 ± 17	$125 \pm 21^*$	$128 \pm 25^*$	$138 \pm 26^{**}$	$133 \pm 26^*$
	10^{-5}	14	122 ± 25	$146 \pm 35^{**}$	$149 \pm 40^{**}$	$158 \pm 46^{**}$	$161 \pm 42^{**}$
	10^{-4}	15	129 ± 22	$151 \pm 24^{**}$	$160 \pm 26^{**}$	$161 \pm 27^{**}$	$163 \pm 28^{**}$
	10^{-3}	15	143 ± 26	$166 \pm 35^{**}$	$168 \pm 38^{**}$	$158 \pm 42^*$	142 ± 42
ISO	10^{-6}	10	115 ± 14	$143 \pm 24^{**}$	$148 \pm 19^{**}$	$160 \pm 15^{**}$	$146 \pm 27^{**}$

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

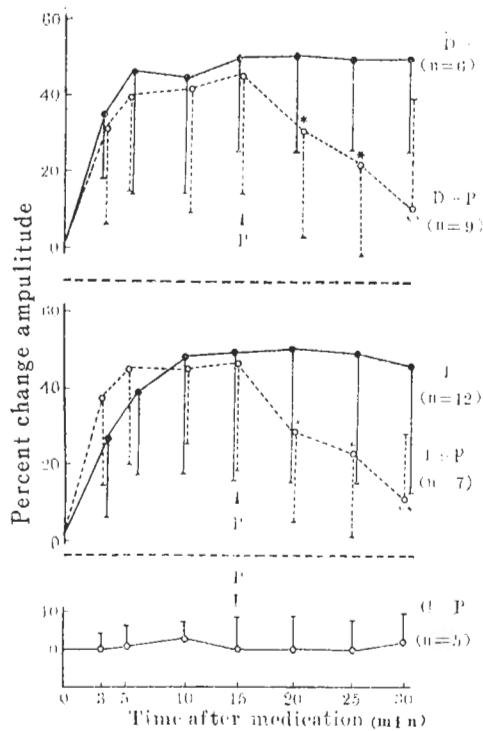


图 3 Antagonistic actions between PIN and DMC or ISO. D: DMC $10^{-5}M$; P: PIN $10^{-6}M$; I: ISO $10^{-6}M$; C: culture medium 0.1 ml.

Comparison with D or I: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

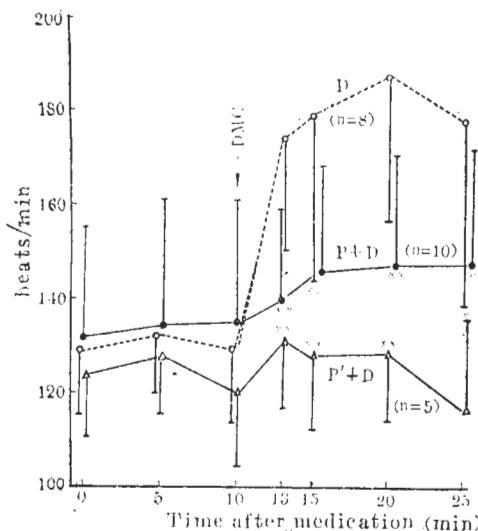


图 4 Antagonistic actions between PIN and DMC. D: DMC $10^{-5}M$; P: PIN $10^{-6}M$; P': PIN $10^{-5}M$.

Comparison with D: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

三、预先给 PIN 对 DMC 作用的影响 加 PIN $10^{-6}M$ 时心肌细胞 bpm 无明显变化。再加 DMC $10^{-5}M$ 后 bpm 虽稍有增加, 但不显著, PIN 的浓度为 $10^{-5}M$ 时, DMC 的正性频率作用消失, 而单独给 $10^{-5}M$ DMC 时 bpm 明显增加(图 4), 表明 DMC 的作用能被 PIN 对抗。

讨 论

培养心肌细胞是研究药物对 β 受体作用的良好标本, 但在制备游离心肌细胞所用的胰蛋白酶浓度过高或消化时间过长均能引起心肌细胞膜的不可逆性损害, 从而损伤或破坏细胞 β 受体⁽⁸⁾。我们用降低胰蛋白酶浓度(0.06%), 增加消化次数(4—6 次)及缩短消化时间(每次 5—15 min) 得到较满意的结果。从每批实验的抽样检查中, 多数细胞对 ISO 反应良好, 说明这些细胞保存了 β 受体的活力。

儿茶酚胺能使培养心肌细胞的搏动频率明显增加⁽⁷⁾, 认为是通过 β 受体兴奋所致^(5,7)。本实验的结果发现 DMC 10^{-5} 及 $10^{-4}M$ 和 ISO 均能显著增加心肌细胞的搏动, 并为 β 受体阻滞剂 PIN 所拮抗, 这和文献报告⁽⁸⁾心得安不对抗 DMC 的作用是相反的, 此种矛盾结果可能是由于我们所用的 β 阻滞剂的剂量较大, 给 PIN 后 10 min 就给 DMC 有关。

DMC 浓度为 $10^{-5}M$ 时, 心肌细胞 bpm 和振幅不仅不加强, 反而减弱, 可能系轻度毒性反应, 也可能由于 DMC 只是 β 受体部分激动剂⁽⁹⁾之故。本研究表明 DMC 能直接激活心肌细胞 β 受体, 因此在整体动物出现的强心作用可能是通过 β 受体所引起。

参 考 文 献

- 周运鹏、范礼理、张丽英、曾贵云。中华医学杂志 1978 年 11 月, 58(11):663
- Harary I, Farley B. *Science* 1960 Jun 3; 131 (3414):1674
- 王家珍、韩慧婉、孙福立。(待发表)
- 孙福立、王家珍、韩慧婉。*生理科学进展* 1981 年

- 1月; 12(1):90
 5 Higgins TJC, Appsopp D, Bailey PJ. *J Mol Cell Cardiol* 1979 Jun; 11(1):101
 6 Boder GB, Johnson IS. *ibid* 1972 Oct; 4(5):453
 7 Walker MJA. *Br J Pharmacol* 1978 Feb; 62(2): 185
 8 李连达、徐萃华、张金妹、高凤辉、涂新义、刘建勋、
 张京. 中华心血管杂志 1978年6月; 8(2):141
 9 冯亦璞、张远、战洪生、曾贵云. 中国药理学报
 1981年6月; 2(2):114

Acta Pharmacologica Sinica 1981 Jun; 2(2): 111—114

EFFECT OF *dl*-DEMETHYLCOCLAUERINE ON CULTURED RAT HEART CELLS

HAN Hui-wan, WANG Jia-zhen, SUN Fu-li

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

ZENG GUI-yun (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

ABSTRACT Cells from newborn rat hearts were cultured in Eagle MEM. Chronotropic and inotropic responses of the cells to *dl*-demethylcoclaurine (DMC) were recorded photoelectrically.

The rate of contractions of the cells increased significantly when DMC was added. At the final concentration of 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , and $10^{-3} M$, the beating rate increased by 19, 32, 26, and 18%, respectively. At 10^{-5} and $10^{-4} M$ the amplitudes of beats of the contractions of some cell clusters, but decreased in others.

Both the rate and amplitude of contractions were augmented significantly in 10^{-6}

M isoprenaline (ISO). The positive chronotropic and inotropic responses to ISO were greater than those elicited by DMC.

Anti-arrhythmic effect was seen in ISO $10^{-6} M$ or DMC 10^{-5} — $10^{-4} M$.

The effects of both ISO $10^{-6} M$ and DMC $10^{-5} M$ were antagonized by pindolol (PIN) 10^{-6} — $10^{-5} M$. However, PIN *per se* did not alter the beating rate. The results indicate that DMC activate the β adrenoreceptors of rat heart cells.

KEY WORDS cultured rat heart cell; *dl*-demethylcoclaurine; isoprenaline; pindolol