

心钠素对体外培养的乳鼠心肌细胞搏动率的调节作用

杨家祥、余传林 (第一军医大学药理教研组, 广州 510132)

提要 本文观察心钠素对培养的乳鼠心肌细胞搏动率的变化。心钠素 192 pg/ml 使原搏动率 < 100 bpm 的心肌细胞搏动增快, > 100 bpm 者减慢。心钠素 1920 pg/ml 可减低由 rhomotoxin 提高的搏动率, 增高被 propranolol 所降低的搏动率。Propranolol 对各频率组都减低, 提示心钠素有调节心肌细胞搏动率作用。

关键词 心钠素; 培养的心肌细胞; 心率; 普萘洛尔; 八里麻毒素

心钠素(cardionatrin)又名心房肽(atripeptin), 自 DeBold 等⁽¹⁾用组织化学染色法证实心房内存在特殊分泌颗粒后, Kangawa 等^(2,3)用逆相高压液相色谱分析, 已提出多种心房利钠多肽, 经氨基酸分析表明它们可能同源, 因蛋白酶水解而成不同的片段。心钠素由 28 个氨基酸组成, 具有利钠、利尿、舒张血管和降低血压的作用, 其利钠、尿作用比速尿强一千多倍, 从而可调节细胞外液和电解质, 但其对离体心脏, 或体外培养心肌细胞搏动率变化的影响, 尚未见有报道。为阐明其对心肌细胞的直接作用, 本文观察其对体外培养的心肌细胞搏动率的变化。

H-Ser-Leu-Arg-Arg-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly-Gly-Arg-Met-Asp-Arg-Ile-Gly-Ala-Gly-Ser-Gly-Leu-Gly-Cys-Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr-OH
cardionatrin

材 料 和 方 法

以 Wistar 种大鼠的乳鼠心肌细胞, 按文献(4)方法培养 2-10 d, 选择不同搏动频率的细胞分组进行实验, 同批对照实验用同日龄细胞。培养细胞每 3 d 换营养液, 于换液翌日直接加药于培养液中进行试验。培养瓶放置在具有恒温装置的 XSZ-D 2 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂生产)下观察, 细胞搏动应用光电换能器,

前置放大器连至 SL-1 力敏三道生理记录仪(开封民用电器厂生产)描绘。心钠素为 Peninsula Lab 产品, 以 Eagle 培养液稀释。

结 果

对照实验 空白对照组 16 个细胞培养瓶, 未加任何药品, 连续观察 15 min, 结果变化甚微。

异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso)组取 11 个细胞培养瓶, 分别加 Iso(北京制药厂生产)于 1 ml Eagle 培养液中, 使最终浓度为 0.6 或 0.9 μmol/L 结果在给药 1.5 min 后, 细胞搏动从 50 ± 28 bpm 增至 151 ± 96 和 150 ± 95 bpm (p < 0.01), 心肌细胞搏动迅速增快, 而维持时间短, 与文献(5)报道相仿。

普萘洛尔(propranolol, Pro)组另将 17 个培养瓶, 各加 Pro 使其最终浓度为 5 或 7.5 μmol/L, 结果给药前细胞搏动为 89 ± 60 bpm, 而在给药后 5, 10, 15 min 时分别降至 54 ± 30, 52 ± 28 和 50 ± 32 bpm (均 p < 0.01)。Pro 出现作用较缓慢, 可维持作用时间较长, 在给药后 5-15 min 时差别非常显著, 与文献(5)结果相符, 见表 1。

不同剂量的心钠素对乳鼠心肌细胞搏动的影响 取 35 个培养瓶, 选择心肌细胞搏动 100 bpm 以下的细胞团作实验观察, 随机分为三组, 分别加心钠素 0.128, 1.28, 或 12.8 ng/ml 各 15 μl 于 1 ml 培养液中, 使最终浓度为 19.2, 192 或 1920 pg/ml 进行实验, 结果表明 192 pg/ml 组在给药 1 min 后即有提高搏动频率的作用, 在 5, 10, 15 min 对搏动频率都有显著变化(均 p < 0.05), 而 1920 pg/ml 组仅在给药 1 min 时有明显变化, 以后可能由于某些细胞团在高度兴奋后转为抑制, 使细胞搏动的平均值降低。19.2 pg/ml 组在所检测各期均见 bpm

Tab 1. Effect of cardionatrin on beating rate of myocardial cells in culture (beats/min, $\bar{x} \pm SD$), n = number of flasks. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ compared to 0 min.

Treatment	n	0 min	1 min	5 min	10 min	15 min
Medium	16	66 ± 54	66 ± 54*	65 ± 54*	63 ± 56*	63 ± 55*
Isoproterenol 0.9 μmol/ml	11	50 ± 28	151 ± 96***	150 ± 95***	135 ± 103**	132 ± 103**
Propranolol 7.5 μmol/ml	17	89 ± 60	74 ± 62**	54 ± 30***	52 ± 28***	50 ± 32***
Cardionatrin 19.2 pg/ml	12	55 ± 26	67 ± 40*	59 ± 32*	63 ± 37*	61 ± 39*
192.0 pg/ml	12	54 ± 30	82 ± 70**	83 ± 63**	82 ± 63**	84 ± 67**
1920.0 pg/ml	11	47 ± 25	59 ± 33**	52 ± 39*	52 ± 37*	52 ± 42*

有所提高, 但无统计学差异(表 1)。

心钠素对不同搏动活性心肌细胞的影响

给药前心肌细胞搏动在 100 bpm 以下时, 192 和 1920 pg/ml 的心钠素都有提高心肌细胞搏动率的倾向, 而以 192 pg 组更为显著而持久。当心肌细胞搏动率在 100–200 bpm 时, 上述剂量的两组心钠素都有降低搏动率的作用, 也以 192 pg/ml 较明显, 在 1–10 min 期间有非常显著或显著的变化。当心肌细胞搏动率超过 200 bpm, 两种浓度的心钠素亦有降低频率的作用, 但仅 192 pg/ml 组在给药后 1 min, 1920 pg/ml 组在给药后 10 和 15 min 时有统计显著性。

以 Pro 7.5 μmol/L 作对照, 对上述三组 bpm 的心肌细胞均有降低搏动率的作用, Pro 与心钠素作用不同, (图 1)。

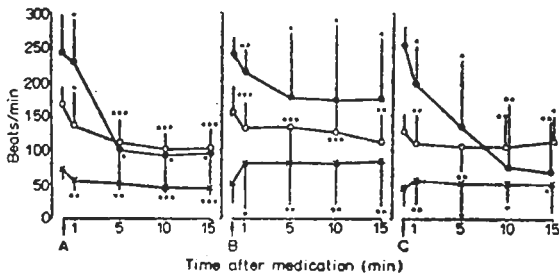


Fig 1. Effects of propranolol 7.5 μmol/L (A), cardionatrin 192 pg/ml (B) and cardionatrin 1920 pg/ml (C) on myocardial cells with different initial beating rates. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

药物改变心肌细胞搏动率后, 心钠素的调节作用

取 4 个培养瓶, 当心肌细胞搏动率低于 100 bpm 时, 加入八厘麻毒素(rhomotoxin, Rho)使最终浓度为 1 μg/ml 后 1, 5, 10, 15,

20 min, 都显著提高心搏率(均 $p < 0.05$, 表 2)。另取 6 个培养瓶, 在 Rho 的作用高峰时(1–5 min), 加入心钠素 1920 pg/ml, 1–15 min 后, 均可出现细胞搏动率减低的现象。搏动率变化值与未用 cardionatrin 组相应时间的搏动率变化值组间比较均非常显著(均 $p < 0.01$), 提示心钠素对药物引起心搏增快时也有降低频率的作用。

5 个培养瓶, 心肌细胞搏动在 100 bpm 以上, 给 Pro 后观察 35 min, 在 5–35 min 期间, 心搏率稳定降低, 10 和 15 min 作用非常显著; 另 6 个心肌细胞培养瓶, 同样给上述量 Pro, 于给药后 15 min 当搏动率明显降低时, 给心钠素 1920 pg/ml, 在其后的 1, 5, 10, 15 min 时, 显著提高心搏率; 与仅给 Pro 相应时间的搏动率变化值的组间对照, 均 $p < 0.01$, 提示心钠素也可恢复药物所降低的心搏动率。

讨 论

心钠素有很强的排钠利尿作用, 早已由 Kangawa 等⁽²⁾肯定, 目前对其在肾靶器官及其调节系统, 如醛固酮、血管紧张素等方面的研究较多; 对心血管方面的研究亦开始有报道。

Nakao 等⁽⁸⁾应用放射免疫法, 直接测量大鼠血浆心钠素的含量为 200–400 pg/ml, 本实验应用的最佳剂量 192 pg/ml 与之相近。当乳鼠心肌细胞搏动在 100 bpm 以下, 心钠素 192 pg/ml 可明显提高搏动频率, 作用时间可维持 15 min 以上; 当搏动在 100–200 或 200 bpm 以上时, 上述剂量的心钠素有降低频率的作用,

Tab 2. Effect of cardionatrin (1920 pg/ml) on beating rate of myocardial cells after rhomotoxin (Rho, 1 µg/ml) or propranolol(Pro, 7.5 µmol/ml). The bpm (beats/min, $\bar{x} \pm SD$) changed after cardionatrin from the bpm of Rho or Pro maximal effect. The difference between the maximal bpm and the bpm at the time point was vs that at the same time point without cardionatrin, respectively. All $p < 0.01$

bpm	Flasks	Drugs	Maximal bpm	Cardio-natrin	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min
86 ± 22	4	Rho	147 ± 20	no	147 ± 20	153 ± 20	150 ± 18	148 ± 12	146 ± 10
70 ± 33	6	Rho	160 ± 37	yes	132 ± 36	120 ± 40	135 ± 49	144 ± 55	—
128 ± 57	7	Pro	68 ± 24	no	68 ± 24	73 ± 34	82 ± 36	90 ± 41	92 ± 47
186 ± 79	6	Pro	103 ± 38	yes	124 ± 44	140 ± 52	138 ± 44	146 ± 42	—

提示生理浓度的心钠素可能起调节心肌细胞频率的作用。心钠素 192 pg/ml 对 100-200 或 > 200 bpm 抑制作用更明显, 提示生理浓度心钠素以抑制作用为主。余霞君等⁽⁷⁾检测心衰伴有房颤者血浆心钠素明显降低, 从另一面证实心钠素抑制心房频率的作用。

当剂量增加 10 倍时(1920 pg/ml)的效应与 192 pg/ml 效应相似, 但不如 192 pg/ml 的明显。这点难以解释母液经稀释后, 效应反而加强, 推想可能与 Manning 等⁽⁸⁾报道心房肽存在着负反馈的内分泌循环有关。

Pro 对任何频率的心肌细胞搏动都起抑制作用而心钠素由于心肌细胞搏动率不同, 效应不同。说明心钠素与 Pro 效应差异, 再用 Rho, Pro 改变心肌细胞搏动后, 加心钠素也可引起上述反应, 因此提示心钠素对心肌细胞搏动率起调节作用。这与 Atlas 等⁽⁹⁾证明心房利钠因子(ANF)对肾血管既有收缩、又有舒张作用相似, 即当解剖部位与生理机能不同时, 药物效应亦可因之而异。

本实验心钠素作用时间可维持 15 min 以上, 这比汤健报告⁽¹⁰⁾心房肽 III 在大鼠体内的生物半衰期 150 s 长, 本文在细胞培养瓶中实验, 不受肝、肾、神经体液等影响。

本文对心肌细胞搏动超过 200 次者, 实验次数少, 加之停跳与停跳前细胞颤动差距甚大, 虽平均频率下降明显, 未能做出统计显著性。

致谢 心钠素由北京医科大学心肺内分泌室惠赠。本文由本教研室刘菊芳副教授审阅。

参 考 文 献

- 1 de Bold AJ, Raymond JJ, Bencosme SA. Atrial specific granules of the rat heart light microscopic staining and histochemical reaction. *J Histochem Cytochem* 1978; 26 : 1094
- 2 Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of α -human atrial natriuretic polypeptide (α -hANP). *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118 : 131
- 3 Kangawa K, Fukada A, Matsuo H. Structural identification of β - and γ -human atrial natriuretic polypeptides. *Nature* 1985; 313 : 397
- 4 中医研究院西苑医院基础研究室、中国科学院生物物理所心血管分子基础课题组。心肌细胞的培养及其形态学的初步观察。中华心血管病杂志 1981; 9 : 216
- 5 Klein I. Colchicine stimulates the rate of contraction of heart cells in culture. *Cardiovasc Res* 1983; 17 : 459
- 6 Nakao K, Sugawara A, Morii N, et al. Radioimmunoassay for α -human and rat atrial natriuretic polypeptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 124 : 815
- 7 余霞君、郑秋甫、曹厚法, 等。心功能不全时血浆心钠素浓度的变化。中华内科杂志 1985; 24 : 530
- 8 Manning PT, Schwartz D, Katsube NC, Holmberg SW, Needleman P. Vasopressin-stimulated release of atriopeptin: endocrine antagonists in fluid homeostasis. *Science* 1985; 229 : 395
- 9 Atlas SA, Kleinert HD, Camargo MJ, et al. Purification, sequencing and synthesis of natriuretic and vasoactive rat atrial peptide. *Nature* 1984; 309 : 717
- 10 汤健。心房肽-III 在体内和体外的降解。生理科学 1984; 4 (5-6) : 43

Regulation of cardionatrin on beating rate of cultured myocardial cells of neonatal rats

YANG Jia-Cui, YU Chuan-Lin

(Dept Pharmacology, First Military Medical College, Guangzhou 510132)

ABSTRACT The 2-10 d cultured myocardial cells of Wistar neonatal rats were used. Isoproterenol accelerated the beats per min (bpm) of cultured myocardial cells. Propranolol slowed down the bpm. Cardionatrin 192 pg/ml increased the bpm when its original rate was below 100 min^{-1} and decreased the bpm as the rate was over 100 min^{-1} . Cardionatrin 1920 pg/ml induced the similar but weaker effect. These phenomena suggest the existence of negative feedback endocrine loop of cardionatrin in the

cultured myocardial cells.

Propranolol decreased the beating rates independently of the original rate. Cardionatrin reversed the effects of rhomotoxin (increased rate) and propranolol (decreased rate). These results suggest that cardionatrin is a regulator of the heart rate.

KEY WORDS cardionatrin; cultured myocardial cells; rhomotoxin; heart rate; propranolol