

# 氨利酮对培养乳鼠心肌细胞搏动功能、环核苷酸量及腺苷环化酶活性的影响

李晓江、王道生、陈星织 (苏州医学院药理教研室, 苏州 215007)

**提要** 氨利酮(Amr)增加培养乳鼠心肌细胞簇的收缩速率(dV/dt)与搏动频率.低钙及钙拮抗剂 Ver 与  $Mn^{2+}$  可使培养心肌细胞 dV/dt 减弱, 而 Amr 可使受抑的 dV/dt 再度加强. Amr 还可增加培养心肌细胞内 cAMP 含量, 而对 cGMP 与腺苷环化酶活性无作用. Amr 的正性肌力作用可能与加强  $Ca^{2+}$  内流与抑制磷酸二酯酶

活性有关.

**关键词** 氨利酮; 培养细胞; 腺苷环一磷酸; 鸟苷环一磷酸; 腺苷环化酶

氨利酮(amrinone, Amr)为非儿茶酚胺和非强心甙类的新强心药<sup>(1)</sup>. 其正性肌力机理尚未阐明. Amr 对犬<sup>(2)</sup>、猫<sup>(3)</sup>及豚鼠<sup>(4,5)</sup>心肌内

1986年3月17日收稿 1986年11月15日修回

cAMP 含量与正性肌力作用的关系有不同的实验报道。然而对培养心肌细胞内 cAMP 及搏动功能的影响尚未见报道。本文研究 Amr 对培养乳鼠心肌细胞搏动功能、环核苷酸量及腺苷环化酶活性的影响。

## 材料与方 法

**乳鼠心肌细胞培养及搏动描记** 有关细胞制备、搏动记录及给药方法参照文献<sup>(6-8)</sup>。取出生后 1-4 d 的 Wistar 乳鼠心室剪碎, 用 0.06% 胰蛋白酶液(无  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  的 Hank 氏液配制)分散心肌细胞。用含 10-15% 小牛血清、10 mmol/L 的 HEPES Eagle 液将细胞稀释至  $10^6$  cells/ml 接种于培养瓶中, 于 37°C 培养 3-6 d 的细胞用于药物实验, 实验前 3-4 h 换入不含血清的培养液。

在倒置显微镜下选择搏动节律正常的细胞簇观察, 其搏动强度与频率经光电换能器转化为电信号并输入 SJ-42 型生理记录仪中描记。细胞搏动幅度变化曲线的一阶微分( $dV/dt$ ; 时间常数 30 ms)输入 SF-1 数字式医用电信号分析仪, 立即打印出不同时间的  $+dV/dt$  平均值(反映心肌细胞收缩速率)与搏动频率。

固定好镜下观察的细胞培养瓶的位置, 用微量注射器将药物直接加入培养液中, 每次给药 10  $\mu\text{l}$ , 并用吸管轻轻来回吸三次, 使药物混匀。药前用 Eagle 液对照, 搏动功能不受给药操作步骤影响的细胞用于药物实验。

**培养心肌细胞环核苷酸及腺苷环化酶活性的测定** 心肌细胞内 cAMP 及 cGMP 提取及测定分别按文献<sup>(9)</sup>和药箱规定操作步骤进行。细胞膜腺苷环化酶活性测定参照文献<sup>(9,10)</sup>。培养心肌细胞在含茶碱 12.5 mmol/L,  $\text{MgSO}_4$  2.5 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中低速(400 rpm)匀浆 30 s。每 0.5 ml 制备的粗酶匀浆液中加入 20 mmol/L 的 ATP 50  $\mu\text{l}$ ; 药物或对照液 50  $\mu\text{l}$  于 30°C 孵育 10 min, 煮沸 3 min, 离心(3000  $\times g$ )取上清液测 cAMP 生成量。cAMP 用蛋白结合法测定<sup>(8)</sup>, cGMP 用 RIA 测

定。液闪测定仪为 FJ-353 双道液体闪烁计数器。细胞蛋白含量按蛋白结合法<sup>(11)</sup>测定。

**药品与试剂** Amr 由南京药学院提供, 黄色无味粉末, 不溶于水, 用 HCl 0.2 mmol/L 溶解后再用 Eagle 液稀释。加入药物后培养液的 pH 值为 7.0-7.2。硫酸异丙肾上腺素(isoprenaline, Iso)、茶碱(theophylline, Th)、维拉帕米(verapamil, Ver)及普萘洛尔(propranolol, Pro)均为上海第十制药厂产品。噻吗洛尔(timolol, Tim)由苏州第一制药厂提供, 白色粉末, 溶于水。上述药品均用 Eagle 液配制, 以在培养液中终浓度表示给药浓度。cAMP 及 cGMP 分析药盒由中国医科院基础所提供。

## 结 果

**Amr 对培养乳鼠心肌细胞搏动功能的影响** Amr 10  $\mu\text{mol/L}$  可明显加强培养心肌细胞的  $dV/dt$ , Amr 50  $\mu\text{mol/L}$  对  $dV/dt$  及搏动频率均有增加作用, 此作用在给药后 2 min 出现, 持续 2-5 min。Iso 同样可增加培养心肌细胞的  $dV/dt$  及搏动频率, 作用比 Amr 迅速(给药后 1 min)且更为明显, 不含 Amr 的配剂对细胞搏动功能无明显影响, Amr 在大剂量时(100  $\mu\text{mol/L}$ )并不增加  $dV/dt$  及搏动频率(表 1 及图 1)。

Tab 1. Maximal change after adding amrinone (Amr) or isoprenaline (Iso) in cultured rat heart cells.  $\bar{x} \pm \text{SD}$  of 8 plates. \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$  vs no treatment.

Group	Concn ( $\mu\text{mol/L}$ )	% Change after treatment Beating rate (b/min)	Contractile velocity ( $dV/dt$ )
None		100	100
Vehicle		102 $\pm$ 7*	103 $\pm$ 5*
Amr	10	103 $\pm$ 5*	109 $\pm$ 9*
Amr	50	114 $\pm$ 15**	110 $\pm$ 9**
Amr	100	94 $\pm$ 15*	88 $\pm$ 19*
Iso	0.5	129 $\pm$ 29**	124 $\pm$ 21**

如将细胞培养液(含  $\text{Ca}^{2+}$  1.8 mmol/L)换入低  $\text{Ca}^{2+}$  Hank's 液( $\text{Ca}^{2+}$  0.6 mmol/L)0.5 h

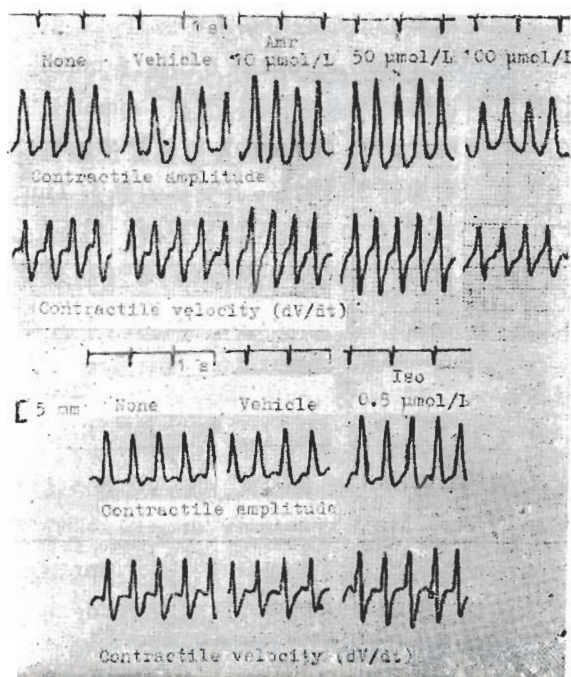


Fig 1. Contractile responses of cultured rat heart cells to amrinone (Amr, 10, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) and isoprenaline (Iso, 0.5  $\mu\text{mol/L}$ )

后,或在培养液中加入钙拮抗剂 Ver(10 nmol/L),或  $\text{Mn}^{2+}$ (50  $\mu\text{mol/L}$ )均可使培养心肌细胞的搏动功能明显减弱,此时再加入 Amr 50  $\mu\text{mol/L}$ , 2 min 后,仍可明显增加受抑细胞的  $\text{dV/dt}$ ,但在 Ver 100 nmol/L 时, Amr 不能够增加  $\text{dV/dt}$ (表 2)。从图 2 尚可见,随 Ver 剂量增大,培养心肌细胞搏动功能逐渐减弱。

**Amr 对培养心肌细胞环核苷酸量、腺苷环化酶活性的影响** Amr 于 0.2 及 1 mmol/L 剂

Tab 2. Effects of  $\text{MnCl}_2$  and verapamil on the action of amrinone on the cultured rat heart cells. BR = beating rate;  $\text{dV/dt}$  = cells contractile velocity; Amr = amrinone 50  $\mu\text{mol/L}$ ;  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$  compared with pretreatment.

Pretreatment	Number of plates	Time of pretreatment (min)	% Change after treatment			
			Prior to Amr BR	$\text{dV/dt}$	+ 2 min following Amr BR	$\text{dV/dt}$
$\text{CaCl}_2$ 0.6 mmol/L	6	30	100	100	$146 \pm 43^{**}$	$114 \pm 13^{**}$
$\text{MnCl}_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$	8	10	$99 \pm 44^*$	$81 \pm 25^{**}$	$103 \pm 47^*$	$111 \pm 10^{**}$
Verapamil 0.01 $\mu\text{mol/L}$	8	5	$86 \pm 18^{**}$	$75 \pm 26^{**}$	$97 \pm 30^*$	$117 \pm 18^{**}$
0.1 $\mu\text{mol/L}$	6	5	$46 \pm 26^{**}$	$58 \pm 29^{**}$	$86 \pm 20^*$	$87 \pm 10^*$

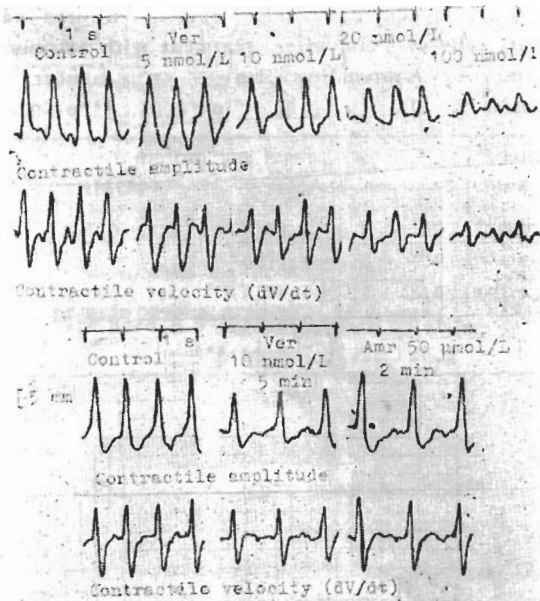
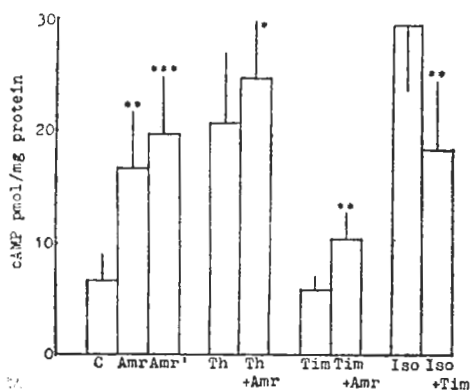


Fig 2. Contractile activity of cultured rat heart cells after treatment with verapamil (Ver, 5, 10, 20, 100 nmol/L) or amrinone (Amr, 50  $\mu\text{mol/L}$ )

量时,可明显增加培养心肌细胞内 cAMP 含量。而对 cGMP 并无明显影响。Iso 50  $\mu\text{mol/L}$  增加细胞内 cAMP 含量的作用比 Amr 更为明显(表 3),茶碱 0.5 mmol/L 亦能在给药后 5 min 明显增加培养心肌细胞内 cAMP 含量,但与 Amr 合用无明显相加作用,Amr 在  $\beta$  受体阻断剂 Tim 用后 2 min,仍能明显增加 cAMP 含量,与单用 Tim 组比较,差异显著。Iso 50  $\mu\text{mol/L}$  增加细胞内 cAMP 量的作用非常显著,但与 Tim 合用后,该作用明显减弱(图 3)。

**Tab 3. Cyclic nucleotides level in cultured rat heart cells at 5 min after treatment with amrinone (Amr) or isoprenaline (Iso). (n) = number of plates,  $\bar{x} \pm SD$ . \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$**

Drug (mmol/L)	pmol/mg protein	
	cAMP	cGMP
Control	5.9 ± 1.8(14)	2.1 ± 0.7(8)
Amr	0.1	5.7 ± 1.4(9)*
	0.2	9.7 ± 5.4(14)**
	1.0	16.9 ± 7.8(14)***
Iso	0.05	22.2 ± 7.6(14)***



**Fig 3. Effects of several agents on cAMP level in cultured rat heart cells. C = control; Amr = amrinone 0.5 mmol/L; Amr' = amrinone 1.0 mmol/L; Th = theophylline 0.5 mmol/L; Tim = timolol 0.01 mmol/L; Iso = isoprenaline 0.05 mmol/L.  $\bar{x} \pm SD$  of 5 plates. \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$**

**Tab 4. Adenyl cyclase activity of cultured rat heart cells after treatment with amrinone (Amr) or isoprenaline (Iso).  $\bar{x} \pm SD$  of 5 separate incubations. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with no treatment. †† $p < 0.01$  compared with control of Iso 0.05 mmol/L treatment.**

Drug (mmol/L)	cAMP pmol/mg protein in 10 min		
	Control	Tim	Pro
None	16 ± 2	22 ± 7	19 ± 6
Amr	0.1	14 ± 4*	
	0.2	12 ± 6*	13 ± 3*
	1.0	4 ± 3***	
Iso	0.05	76 ± 10***	23 ± 3†††

Tim, Timolol 10  $\mu$ mol/L.

Pro, Propranolol 10  $\mu$ mol/L.

测定培养心肌细胞匀浆液中腺苷环化酶活性结果如表4所示。Amr在0.1-0.2 mmol/L浓度时对该酶并无激活作用,而在1 mmol/L时还有抑制现象, Iso 50  $\mu$ mol/L可明显使腺苷环化酶活性增加近3倍之多,  $\beta$ 受体阻断剂 Tim, Pro对腺苷环化酶活性虽无明显影响,但与 Iso合用时,可完全阻断 Iso 50  $\mu$ mol/L激活该酶的作用。

## 讨 论

本文实验结果表明 Amr能增加离体培养心肌细胞 dV/dt 与搏动频率。低钙培养液或钙拮抗剂 Ver,  $Mn^{2+}$  均可使 dV/dt 减弱,此作用可能与细胞跨膜钙内流减少有关<sup>(7)</sup>。Amr对低钙液或钙拮抗剂所抑制的心肌细胞 dV/dt 可再度加强,提示 Amr可能通过加强心肌细胞内的慢钙内流而发挥正性肌力作用。

Amr对猫心肌<sup>(3)</sup>、离体豚鼠心脏<sup>(5)</sup>内cAMP含量并无增加,而本实验中发现 Amr对乳鼠离体培养心肌细胞可增加细胞内cAMP含量,但未见增加腺苷酸环化酶的活性,并且不被 Tim所阻断,因而说明 Amr增加心肌细胞cAMP的机理与 Iso不相似。曾有报道<sup>(2)</sup>, Amr能抑制犬心肌的Ⅲ型磷酸二酯酶活性,这可能是 Amr增加心肌细胞内cAMP含量的作用机理。

本实验中观察到 Amr增加心肌细胞内cAMP的剂量比增加心肌细胞搏动功能的剂量要大,而后者剂量却可对抗低钙或钙拮抗剂抑制心肌细胞 dV/dt 的作用,提示 Amr具有直接加强心肌细胞  $Ca^{2+}$  内流与增加cAMP的双重作用。后者仅在大剂量 Amr才表现出来,这可能是有的学者并未观察到强心剂量的 Amr能增加心肌内cAMP的原因。

## 参 考 文 献

- 1 LeJemtel TH, Keung E, Sonnenblick EH, et al. Amrinone: a new non-glycoside, non-adrenergic cardiotonic agent effective in the treatment of intractable myocardial in man. *Circulation* 1979; 59: 1098

- 2 Endoh M, Yamashita S, Taira N. Positive inotropic effect of amrinone in relation to cyclic nucleotide metabolism in the canine ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 221 : 775
- 3 Alousi AA, Farah AE, Leshner GY, Opalka CJ Jr. Cardiotonic activity of amrinone-wins 40680 [5-amino-3',4'-bipyridin-6(1H)-one]. *Circ Res* 1979; 45 : 666
- 4 Honerjäger P, Schäfer-Korting M, Reiter M. Involvement of cyclic AMP in the direct inotropic action of amrinone. Biochemical and functional evidence. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1981; 318 : 112
- 5 Azari J, Huxtable RJ. Differential effects of amrinone on contractility and taurine influx in rat and guinea pig hearts. *Eur J Pharmacol* 1980; 67 : 347
- 6 Sinclair AJ, Miller HA, Harrison DC. An electrooptical monitoring technique for heart cells in tissue culture. *J Appl Physiol* 1970; 29 : 747
- 7 Barry WH, Goldminz D, Kimball T, Fitzgerald JW. Influence of cell dissociation and culture of chick embryo ventricle on inotropic responses to calcium and lanthanum. *J Mol Cell Cardiol* 1978; 10 : 967
- 8 Higgins TJC, Allsopp D, Bailey PT. The effect of  $\beta$ -adrenergic blocking drugs on the intrinsic beating rate of cultured rat myocytes. *Ibid* 1979; 11 : 101
- 9 Shima S, Kawashima Y, Hirai M, Asakura M. Effect of adrenergic stimulation on adenylate cyclase activity in rat prostate. *Biochem Biophys Acta* 1980; 628 : 255
- 10 Sutherland EW, Rall TW, Menon T. Adenyl cyclase. 1. Distribution, preparation and properties. *J Biol Chem* 1962; 237 : 1220
- 11 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 1976; 72 : 248
- 12 Adams HR, Rhody J, Sutko JL. Amrinone activates  $K^+$ -depolarized atrial and ventricular myocardium of guinea pigs. *Circ Res* 1982; 51 : 662
- 13 Siegl PKS, Morgan G, Sweet CS. Responses to amrinone in isolated cardiac muscles from cat, rabbit and guinea pig. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984; 6 : 281

*Acta Pharmacologica Sinica* 1987 Sep, 8 (5) : 429-433

## Effects of amrinone on contractile activities, cyclic nucleotides and adenyl cyclase activity of cultured rat heart cells

LI Xiao-Jiang, WANG Dao-Sheng, CHEN Xing-Zhi

(Department of Pharmacology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007)

**ABSTRACT** Amrinone (Amr, 50  $\mu\text{mol/L}$ ) and isoprenaline (0.5  $\mu\text{mol/L}$ ) stimulated beating rate (BR) and contractile velocity ( $dV/dt$ ) in cultured rat heart cells. Both  $dV/dt$  and BR were attenuated after exposing the cells to verapamil (10  $\text{nmol/L}$ ),  $\text{Mn}^{2+}$  (50  $\mu\text{mol/L}$ ) or low  $\text{Ca}^{2+}$  (0.6  $\text{mmol/L}$ ) medium. Amr (50  $\mu\text{mol/L}$ ) increased  $dV/dt$  in all treatments except verapamil (100  $\text{nmol/L}$ ). Intracellular cAMP levels, but neither cGMP nor adenyl cyclase activities, of cultured rat heart cells were increased by Amr 0.2 and 1.0  $\text{mmol/L}$ . The effect of Amr on increasing cAMP level

was neither potentiated by theophylling 0.5  $\text{mmol/L}$  nor abolished by timolol 10  $\mu\text{mol/L}$ . However, timolol 10  $\mu\text{mol/L}$  blocked the effect of isoproterenol 50  $\mu\text{mol/L}$  on elevating cellular cAMP level and adenyl cyclase activity. These results suggest that the enhancement of slow  $\text{Ca}^{2+}$  flow and inhibition of phosphodiesterase caused the positive inotropic effect of amrinone.

**KEY WORDS** amrinone; cultured cells; adenosine cyclic monophosphate; guanosine cyclic monophosphate; adenyl cyclase