

翠雀固灵对培养的大鼠心肌细胞搏动率的影响

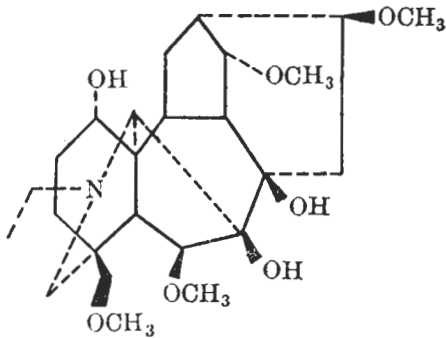
王大元、程美璋、林 励、时 芹、胡盛珊、冯鸣国、程 晨

(江西省医学科学研究所, 南昌 330029)

提要 翠雀固灵(delsoline, DS)浓度为0.5和0.75 mmol/L时, 对培养心肌细胞搏动频率分别增加7与10%, 搏动振幅无明显改变; 2.5 mmol/L时, 搏动频率减少43%, 振幅亦减小。DS 0.75 mmol/L的正性1 mmol/L又可对抗 Iso 0.01 mmol/L所对抗, 而高浓度 DS 频率作用可被 Pro 1 μmol/L的正性频率作用。

关键词 培养大鼠心肌细胞; 翠雀固灵; 异丙肾上腺素; 普萘洛尔

翠雀固灵系从 赣 皖 乌 头 (*Aconitum finetianum* Hand-Mazz) 总生物碱中分离出的二萜类生物碱⁽¹⁾。DS 具有明显的降低血压和抑制心脏作用, 减慢离体与在体心脏心率, 其降压原因与心肌收缩力减弱有关⁽²⁾。但 DS 对心脏的作用性质尚缺少研究。为此, 本文观察该品对培养的大鼠心肌细胞搏动的影响。



Delsoline

材 料

新生1-4 d的 Wistar 大鼠, ♀♂兼用。Wistar 种鼠由中国科学院上海药物研究所动物室引进。

Eagle 最低必需培养基(MEM), 日本日水製薬株式会社产品。用时按规定配制。

胰蛋白酶, Difco 厂产品, 以无 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}

的 Hank 氏液配成 0.06% 胰蛋白酶溶液。

DS, 取江西省兴国县产 赣 皖 乌 头 (根), 按陈葆仁等⁽¹⁾的方法提取、分离, 得无色多角形结晶, 经鉴定为 DS。使用前先用双重蒸馏水加适量 HCl 溶解配成浓溶液, 此时 pH 约为 6, 经离子测定, K^+ 47 μmol/L, Na^+ 99 μmol/L, Ca^{2+} 63 μmol/L, Mg^{2+} 10 μmol/L, 硫酸异丙肾上腺素 (Iso) 注射液, 上海天丰药厂产品, K^+ 12 μmol/L, Na^+ 4.348 mmol/L, Ca^{2+} 3 μmol/L, Mg^{2+} 2 μmol/L, 普萘洛尔 (Pro) 注射液, 北京制药厂产品, K^+ 9 μmol/L, Na^+ 52 μmol/L, Ca^{2+} 33 μmol/L, Mg^{2+} 5 μmol/L。上述药物均于临用时以 Eagle 培养液配成所需浓度, 其 pH 约为 7。

方 法

细胞制备与培养 仿文献(3)方法, 取新生1-4 d的乳鼠心室肌, 用 0.06% 胰蛋白酶溶液分次消化, 最后加含 20% 小牛血清的 Eagle 培养液制成细胞悬液, 10^6 个细胞/ml, 每培养瓶 2.9 ml, 加塞密封, 置 37°C 培养, 1-2 d 更换培养液一次。

观察记录与给药 以培养 3-6 d 的心肌细胞簇为观察对象, 观察前更换新鲜培养液不超过 16 h。将培养瓶置于 $37 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 的恒温罩内, 于倒置显微镜下观察。选定搏动规则的细胞簇后, 更换带有小尼龙管的给药专用橡皮塞, 约 10 min 后, 通过目镜上的光电换能放大器⁽⁴⁾, 将心肌细胞搏动描记于生理记录仪上。记录 5 min 正常搏动曲线后, 经瓶塞上的尼龙管, 将药液 (37°C) 缓缓注入瓶内。每瓶加药液 0.1 ml。药物浓度均以加药后培养瓶内液体的最终浓度计算。给药后间隔一定时间记录细胞搏动曲线 1 次。

结 果

低浓度 DS 对心肌细胞搏动的影响 对照组(细胞培养 3-6 d, 给培养液 0.1 ml)心肌细胞搏动频率(BR)无明显变化, Iso 1 $\mu\text{mol/L}$ (细胞培养 3-4 d), 15 min 心肌细胞平均 BR 增加 $36 \pm 35\%$, 与对照组比较 $p < 0.01$, 增加最大值为 45% 。DS 0.25 mmol/L (细胞培养 3-4 d), 15 min 平均 BR 稍有增加, 但不显著; 0.5 mmol/L (细胞培养 3-4 d), 平均 BR 增加 $7 \pm 7\%$, 与对照组比较 $p < 0.05$, 增加最大值为 13% ; 0.75 mmol/L (细胞培养 2-3 d), 平均 BR 增加 $10 \pm 9\%$, 与对照组比较 $p < 0.01$, 增加最大值为 13% (见表 1)。

Iso 与低浓度 DS 对多数细胞搏动振幅无明显影响, 仅少数细胞振幅略有增加(图 1)。

Tab 1. Effects of delsoline (DS), isoproterenol (Iso) and propranol (Pro) on the beating rate (beats/min) of cultured myocardial cells. $\bar{x} \pm \text{SD}$.

	mmol/L	n	Before	After	% [†]
Control		12	131 \pm 40	133 \pm 45	-0.2 \pm 6
DS	0.25	6	90 \pm 32	92 \pm 28	4 \pm 10*
	0.5	8	109 \pm 33	116 \pm 32	7 \pm 7**
	0.75	8	129 \pm 44	142 \pm 50	10 \pm 9***
	1	9	153 \pm 21	140 \pm 19	-8 \pm 12*
	2.5	6	81 \pm 9	45 \pm 22	-43 \pm 30***
Iso	0.001	6	148 \pm 29	194 \pm 26	36 \pm 35***
Pro	0.01	6	139 \pm 18	141 \pm 21	1 \pm 5*

* $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, compared with control (Eagle MEM pH 7). [†]The average of the incremental percentage for beating rate in each cell cluster.

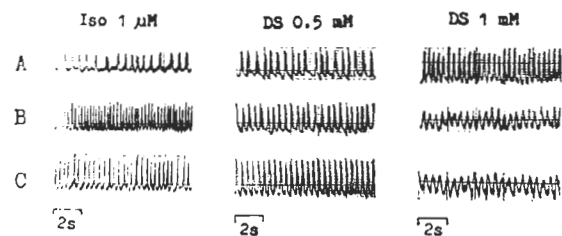


Fig 1. Effects of delsoline (DS) and isoproterenol (Iso) on beating rate and amplitude of cultured myocardial cells. A) before; B) 5 min and C) 20 min after medication. M = mol/L

高浓度 DS 对心肌细胞搏动的影响 当 DS 浓度提高到 1 mmol/L 时(细胞培养 3-6 d), 不再使心肌细胞频率增加, 而是使之减慢(表 1)。DS 1 mmol/L, 平均 BR 减少 $8 \pm 12\%$, 但与对照组比较差异不显著; 2.5 mmol/L (细胞培养 3-4 d), 平均 BR 减少 $43 \pm 30\%$, 与对照组比较 $p < 0.001$, 减少最大值为 61% ; 部分心肌细胞一度出现停搏或搏动节律失常。高浓度 DS 在使细胞 BR 极度减慢或搏动节律失常时, 细胞搏动振幅亦减小(图 1)。上述高浓度 DS 使心肌细胞搏动频率减慢、振幅减小的作用, 多数于 20-30 min 内逐渐恢复或趋向恢复。由于高浓度 DS 溶液的 pH 为 6-6.5, 乃用 pH 为 6 的 Eagle 培养液作对照试验, 结果给药前 BR 为 94 ± 25 次/min, 给药后为 92 ± 23 次/min (平均减少 $1.8 \pm 1.7\%$), 前后比较 $p > 0.1$, 给药前后细胞搏动振幅亦无明显变化, 表明此 Eagle 培养液对心肌细胞 BR 与振幅无明显影响。说明上述 DS 的作用非药液 pH 改变所致。

Pro 拮抗 Iso 与低浓度 DS 的正性频率作用

单给 Iso (1 $\mu\text{mol/L}$), 心肌细胞 BR 显著增快, 单给 Pro (0.01 mmol/L), BR 无明显变化(表 1)。给 Pro 5 min 后再给 Iso, BR 未见增加(平均增加 $0.4 \pm 10\%$), 与单给 Iso 的结果比较 $p < 0.05$, 表明 Iso 的正性频率作用被 Pro 拮抗。给 Pro 5 min 后给低浓度 DS (0.75 mmol/L), 心肌细胞 BR 略为减慢(平均减慢 $3 \pm 9\%$), 与

Tab 2. Antagonism between Pro and Iso or low concentration of DS. $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, (b) compared with (a), (d) with (c).

Treatment	n	Before	After	% [†]
Pro 0.01 mmol/L	6	139 \pm 18	141 \pm 21	1 \pm 5
Iso 1 $\mu\text{mol/L}$ (^a)	6	148 \pm 29	194 \pm 26	36 \pm 35
Pro 0.01 mmol/L + Iso 1 $\mu\text{mol/L}$ (^b)	6	178 \pm 26	177 \pm 19	0.4 \pm 10**
DS 0.75 mmol/L(^c)	8	129 \pm 44	142 \pm 50	10 \pm 9
Pro 0.01 mmol/L + DS 0.75 mmol/L(^d)	12	182 \pm 48	175 \pm 46	-3 \pm 9***

[†]The calculation of percentages is identical with Tab 1.

单给 DS 使 BR 显著增快的情况形成鲜明的差别 ($p < 0.01$), 表明低浓度 DS 的正性频率作用被 Pro 拮抗 (表 2)。

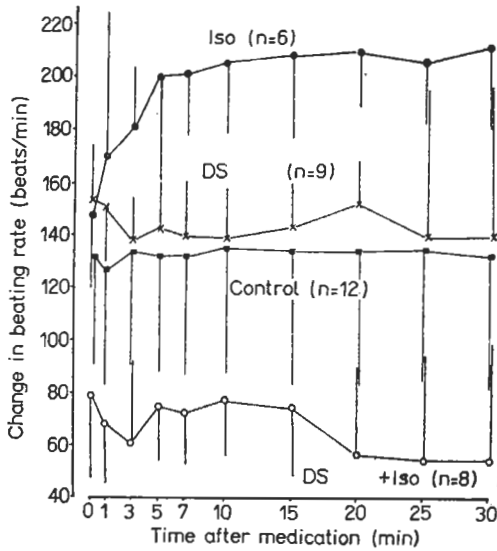


Fig 2. Antagonism between Iso and high concentration of DS. ●) Iso $1 \mu\text{mol/L}$; ○) DS 1mmol/L + Iso $1 \mu\text{mol/L}$; ×) DS 1mmol/L ; ■) Control (Eagle NEM).

高浓度 DS 拮抗 Iso 的正性频率作用 先给高浓度 DS (1mmol/L) 5 min 后再给 Iso ($1 \mu\text{mol/L}$), 心肌细胞 BR 未见增快, 反而减慢 (平均减慢 $3 \pm 27\%$), 与单给 Iso 的结果比较 $p < 0.05$, 表明高浓度 DS 可拮抗 Iso 的正性频率作用 (图 2)。

讨 论

上述结果表明, DS 对心肌细胞有直接作用。

实验中发现, 高浓度 DS 使培养心肌细胞搏动频率减慢、振幅减小, 且此种作用可以逐渐恢复, 表明高浓度 DS 对培养心肌细胞有抑制作用。这与完整心脏实验 (包括离体心脏实验与在体心脏实验) 的结果⁽²⁾基本上是一致的。本研究还发现, 低浓度 DS 对培养心肌细胞可产生正性频率作用。这在完整心脏实验中则未曾见到。这种差别的出现, 可能与培养心肌细胞和完整心脏对药物的敏感性不完全相同有

关。

培养心肌细胞由于失去在完整心脏上大量存在的非心肌细胞和细胞间质等形成的屏障, 对药物的敏感性大为增高⁽⁵⁾。在这种敏感性较高的心肌细胞标本上, 有些在完整心脏上不易显示出来的药物作用可能显示出来。例如, Pro 一般认为无内在拟交感活性⁽⁶⁾。使动物体内去甲肾上腺素耗竭后, Pro 并不增加心率⁽⁷⁾。但在培养心肌细胞上, 它可使心肌细胞 BR 加快, 显示具有内在拟交感活性⁽⁸⁾。既然培养心肌细胞与完整心脏对药物的敏感性存在一定差别, 则低浓度 DS 在敏感性较高的心肌细胞上所表现出来的兴奋作用, 在敏感性较低的完整心脏上不一定表现出来。而且, 不少药物具有小剂量 (低浓度) 产生兴奋作用、大剂量 (高浓度) 产生抑制作用这样的特性, DS 亦可以具有低浓度使心肌细胞兴奋、高浓度使之抑制这样的特性。当然, 大剂量 (高浓度) DS 使心肌细胞搏动频率减慢、振幅减小, 也有可能是药物的毒性反应。然而, 这种作用可以在短期内恢复, 且部分给药后的细胞次日进行了观察, 仍然搏动良好, 未见形态异常。故其作用似属抑制作用。显然, 如果剂量进一步增大, 必有引起中毒的可能。

至于 DS 对心肌细胞的作用与 β 受体的关系如何, 尚待探讨。由于 Pro 与低浓度 DS 之间的拮抗和高浓度 DS 与 Iso 之间的拮抗是竞争性拮抗还是非竞争性拮抗尚未分析, 故 DS 是否象 Pro 那样, 对心肌细胞既具有 β 受体阻断作用又具有内在拟交感活性, 亦待确定。

致谢 本所秦达意同志代制光电换能放大装置, 张淑娥、卢晓光同志参加部分实验工作。

参 考 文 献

- 1 陈葆仁、杨义芳、田如美、张长盘、肖幼静、刘铭勋. 赣皖乌头生物碱的研究 I 赣皖乌头中生物碱的分离与鉴定. 药学报 1981; 16: 70
- 2 连其深、冯高阔. 攀藜固灵的降压作用. 中国药理学报 1985; 6: 37
- 3 韩慧英、王家珍、孙福立、曾贵云. 去甲乌药碱

- 对培养心肌细胞搏动的影响。 中国药理学报 1981; 2 : 111
- 4 孙福立、王家珍、韩慧婉、史燕青。介绍一种描绘培养心肌细胞搏动的简便方法。生理科学进展 1981; 12 : 90
- 5 Hermsmeyer K, Robinson RB. High sensitivity of cultured cardiac muscle cells to autonomic agents. *Am J Physiol* 1977; 233 : C 172
- 6 McDevitt DG. The assessment of β -adrenoceptor blocking drugs in man. *Br J Clin Pharmacol* 1977; 4 : 413
- 7 Dunlop D, Shanks RG. Selective blockade of adrenoceptive β receptors in the heart. *Br J Pharmacol* 1968; 32 : 201
- 8 Hermsmeyer K, Mason R, Griffen SH, Becker P. Rat cardiac muscle single cell automaticity responses to α - and β -adrenergic agonists and antagonists. *Circ Res* 1982; 51 : 532

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Nov; 7 (6) : 540-543

Effects of delsoline on beating rate of cultured rat myocardial cells

WANG Da-yuan, CHENG Mei-zhang, LIN Li, SHI Qin, HU Sheng-shan, FENG Ming-guo, CHENG Chen (Jiangxi Institute of Medical Sciences, Nanchang 330029)

ABSTRACT Cells from neonatal rat ventricular myocardium were cultured in Eagle MEM. After the cells were exposed to delsoline (DS) 0.5 and 0.75 mmol/L for 15 min, the beating rate increased by 7 ± 7 and $10 \pm 9\%$, respectively. At 2.5 mmol/L, the beating rate decreased by $43 \pm 30\%$, while the amplitude of contraction was diminished. The increase in spontaneous frequency

induced by DS 0.75 mmol/L was antagonized by propranolol 0.01 mmol/L. But propranolol *per se* did not alter the beating rate. The positive chronotropic responses of isoproterenol 1 μ mol/L were reversed by DS 1 mmol/L.

KEY WORDS cultured rat myocardial cells; delsoline; isoproterenol; propranolol