

尼索地平对外培养心肌细胞的作用

杨家粹、余传林、张家新、古维新、丁明学、姚育法 (第一军医大学药理教研室, 广州 510515)

Acta Pharmacologica Sinica 1989 Mar, 10(2): 118-121

Effect of nisoldipine on cultured myocardial cells of neonatal rats

YANG Jia-Cui, YU Chuan-Lin, ZHANG Jia-Xin, GU Wei-Xin, DING Ming-Xue, YAO Yu-Fa (Department of Pharmacology, First Military Medical College, Guangzhou 510515)

Abstract Nisoldipine 1.5 nmol/L, 0.75, and 1.5 $\mu\text{mol/L}$ depressed the beat rates of myocardial cells. The effects were negatively correlated with dosages. Nisoldipine depressed the beat rates increased by calcium chloride 0.15 mmol/L or isoprenaline 1.5 $\mu\text{mol/L}$ and atropine 20 nmol/L. Conversely, the above drugs reversed the beat rates depressed by nisoldipine. Therefore, the acting nisoldipine may be antagonistic to calcium chloride, isoprenaline and atropine. In addition, nisoldipine 10 nmol/L may significantly aggravated the damage to myocardial cells induced by mitomycin C 5 $\mu\text{g/ml}$ in which elevated lactate dehydrogenase appeared.

Key words nisoldipine; calcium chloride; isoproterenol; atropine; cultured myocardial cells; mitomycin C; lactate dehydrogenase

提要 尼索地平(Nis) 1.5 nmol/L, 0.75, 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 抑制 Wistar 乳鼠心肌细胞搏动, 并与剂量有负相关效应。Nis 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 可抑制 CaCl_2 0.15 mmol/L, Iso 1.5 $\mu\text{mol/L}$, Atr 20 nmol/L 所提高的细胞搏动率, 上述药物也可逆转 Nis 抑制的细胞搏动, 因此 Nis 与 CaCl_2 , Iso, Atr 有互相拮抗作用。此外, Nis 10 nmol/L 可非常显著加重丝裂霉素 C 5 $\mu\text{g/ml}$ 引起的心肌细胞损伤, 呈乳酸脱氢酶增加。

关键词 尼索地平; 氯化钙; 异丙肾上腺素; 阿托品; 培养的心肌细胞; 丝裂霉素 C; 乳酸脱氢酶

尼索地平(nisoldipine, Nis)是二氢吡啶类钙拮抗剂, 它抑制高 K^+ 或 Ca^{2+} 引起的主动脉条收缩, 对离体心脏乳头状肌的负性肌力作用, 可由器官浴槽中增加 Ca^{2+} 浓度而拮抗之⁽¹⁾。Nis 可缩小冠脉梗塞的心肌缺血区, 减轻心脏后负荷, 而无心肌收缩减弱或频率减慢的效应⁽²⁾。但有关 Nis 对心肌细胞的作用, 尚未见报道, 本文观察 Nis 对外培养大鼠心肌细胞的作用。

Materials and methods

Nis 由河北医学院药理学系合成。用 4% 乙二醇(广州试剂厂, CP)和温热生理盐水避光溶解成 0.39 mg/ml。硫酸异丙肾上腺素(Iso, 北京制药厂)1 mg/ml 和硫酸阿托品(Atr, 3526 工厂)0.5 mg/ml 分别用 Eagle 培养基稀释成 0.1 mmol/L 和 1 $\mu\text{mol/L}$, 丝裂霉素 C(mitomycin C, 日本 Kyowa Hakko Kogyo 厂)。

体外培养乳鼠心肌细胞按文献(3)进行; 丝裂霉素 C 对心肌细胞的损伤作用, 以心肌细胞释放乳酸脱氢酶(LDH)的变化为指标⁽⁴⁾。

Results

Nis 对心肌细胞搏动的影响 加 Nis 于心肌细胞培养液中, 使其浓度分别为 1.5 nmol/L, 0.75 和 1.5 $\mu\text{mol/L}$, 此后 5, 10, 15, 20 min 心肌细胞搏动率均呈负相关效应, 相关系数 γ 依次为 -0.7385, -0.6313, -0.6652,

-0.7102 (Tab 1)。其中 Nis 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 共作 5 次实验, 结果 3 瓶细胞停在 20 min 内停搏, 2 瓶明显抑制, 此 2 瓶在 20 min 时加入 CaCl_2 2.0 mmol/L, 心肌细胞搏动率明显提高, 1 min 分别比给药前增加 18 和 150 bpm, 5 min 分别增加 24 和 138 bpm。又提示 Nis 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 有非常明显抑制心肌细胞搏动的作用, 而在 20 min 内未见有停搏现象。该浓度比 de Jong 报道⁽⁵⁾的 Nis 能增加正常心脏冠脉流量, 减少心尖移位搏动点, 在缺血心脏减少乳酸盐的形成等作用的浓度 30 nmol/L 提高 25 倍, 说明有效浓度时对心肌细胞毒性甚小, 且可用 CaCl_2 拮抗。

Tab 1. The dose-effect relationship of nisoldipine (Nis 1.5 nmol/L, 0.75, 1.5 $\mu\text{mol/L}$) on beating rates of myocardial cells of cultured neonatal rats. $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs 0 min.**

Time (min)	Beating rates (bpm)		
	1.5 nmol/L (5 flasks)	0.75 $\mu\text{mol/L}$ (4 flasks)	1.5 $\mu\text{mol/L}$ (5 flasks)
0	170 \pm 56	126 \pm 37	167 \pm 56
1	163 \pm 57*	120 \pm 27*	158 \pm 67*
5	151 \pm 48**	92 \pm 19**	44 \pm 50**
10	136 \pm 41**	99 \pm 39***	46 \pm 57**
15	133 \pm 40**	87 \pm 26***	41 \pm 56**
20	128 \pm 42**	72 \pm 13**	34 \pm 48***

Nis 和某些药物对心肌细胞的相互作用

1 Nis 和 CaCl_2 的相互作用 Nis 对 CaCl_2 的作用: 实验分两组 ($n = 5$), 一组加入 CaCl_2 0.15 mmol/L 后 1, 5, 10, 15 min 细胞搏动分别比给药前增加 33 \pm 11, 26 \pm 12, 24 \pm 4, 26 \pm 12 bpm, P 均 < 0.01 , 另一组加入 Nis 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 7 min 后, 再加入以上浓度的 CaCl_2 , 1-15 min 均未见搏动恢复到原水平, 提示 Nis 可对抗 CaCl_2 增加心肌细胞搏动的作用。

CaCl_2 对 Nis 的作用: 将 4 个培养瓶单加 Nis 0.75 $\mu\text{mol/L}$ 后 5 min, 搏动频率明显减少, 10-20 min 非常明显减少。另 5 个培养瓶, 在加 CaCl_2 0.15 mmol/L 后 15 min, 作用明显

时再加 Nis, 在 1-20 min 内均未见搏动降低至给药前的水平, 与单用 Nis 组相应时间的搏动率作组间对照, 5 min 时 $P < 0.05$, 10-20 min 时 $P < 0.01$ 。提示 CaCl_2 可拮抗 Nis 降低心肌细胞搏动频率的作用 (Tab 2)。

Tab 2. The interactions of Nis 0.75 $\mu\text{mol/L}$ and CaCl_2 0.15 mmol/L on the beating rates of cultured myocardial cells of neonatal rats. $\bar{x} \pm \text{SD}$. Number of flasks in parentheses.

Time (min)	Beating rates (bpm)			
	CaCl_2 (5)	Nis + CaCl_2 [†] (5)	Nis (4)	CaCl_2 + Nis ^{††} (5)
0	67 \pm 3	81 \pm 16	126 \pm 37	61 \pm 12
1	+33 \pm 11	-35 \pm 17***	-6 \pm 15	+25 \pm 32*
5	+26 \pm 12	-24 \pm 22***	-34 \pm 18	+39 \pm 47**
10	+24 \pm 4	-35 \pm 20***	-27 \pm 3	+23 \pm 17***
15	+26 \pm 12	-33 \pm 21***	-39 \pm 12	+24 \pm 18***
20	—	—	-54 \pm 27	+28 \pm 30***

[†] Nis 7 min, then CaCl_2 vs CaCl_2 ; ^{††} CaCl_2 15 min, then Nis vs Nis. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

2 Nis 和 Iso 相互作用 Nis 对 Iso 的作用: Nis 的浓度同上, 当给 Iso 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 后 1 min 即增加心肌细胞搏动 64 \pm 37 bpm ($P < 0.05$)。另 4 个培养瓶, 待 Nis 作用 7 min 后, 再加 Iso 在各检测点可见 Iso 使 Nis 降低的搏动率在 1-15 min 内均有所提高, 但不能恢复到给药前水平。将 Nis + Iso 组与 Iso 组相应期给药前后搏动率之差作组间比较, 1-15 min 期间 P 均 < 0.01 。提示 Nis 可减弱 Iso 的作用。

Iso 对 Nis 的作用: 先加入 Iso (浓度同上), 待作用明显时加入 Nis (浓度也同上), 观察 1-20 min, 将 Iso + Nis 前后的搏动率之差与单用 Nis 组作组间对照比较, 1 min 时 $P < 0.05$, 5-20 min P 均 < 0.01 。提示 Iso 可减弱 Nis 的作用, 以上两实验证明 Nis 与 Iso 有互相拮抗作用 (Tab 3)。

3 Nis 与 Atr 的相互作用 Nis 的浓度、方法同上, 加入 Atr 20 nmol/L, 1 min 后, 即见心肌细胞搏动率增加 104 \pm 58 bpm, 在 1-15 min 期间均明显增加细胞搏动率。

Tab 3. The interactions of Nis (0.75 $\mu\text{mol/L}$) and isoprenaline (Iso, 1.5 $\mu\text{mol/L}$) on the beating rates (bpm) of myocardial cells of neonatal rats in culture. $\bar{x} \pm \text{SD}$. Number of flasks in parentheses.

Time (min)	Beating rates (bpm)			
	Iso (5)	Nis + Iso† (4)	Nis (4)	Iso + Nis†† (5)
0	148 ± 17	186 ± 19	126 ± 37	148 ± 17
1	+64 ± 37	-49 ± 14***	-6 ± 15	+46 ± 32**
5	+43 ± 36	-34 ± 17***	-34 ± 18	+31 ± 31***
10	+42 ± 45	-37 ± 16***	-27 ± 3	+24 ± 31***
15	+47 ± 37	-40 ± 19**	-39 ± 12	+26 ± 28***
20	—	—	-54 ± 27	+8 ± 19***

† Nis 7 min, then Iso vs Iso; †† Iso 15 min, then Nis vs Nis. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$.

另4个培养瓶加 Nis 7 min 后再加 Atr, 1-15 min 内, 按平均值未见 Atr 引起心肌细胞搏动率增加, 其中仅1瓶, 给 Atr 后 15 min 搏动率增高21%, 尚未达到其给药前的水平, Nis + Atr 组与单纯 Atr 组各相应时点比较 P 均 < 0.01 , 提示 Nis 能明显抑制 Atr 引起心肌细胞搏动增加的作用。

另4个培养瓶待 Atr 作用 15 min 后再加入 Nis, 将 Atr + Nis 前后的搏动率之差与仅用 Atr 组的各相应点作组间对比, 虽 Atr + Nis 组在各检测点上都比 Atr 组搏动减少, 但 1-15 min 内均无明显差异。提示 Atr 也可减弱 Nis 抑制细胞搏动的效应 (Tab 4)。

Tab 4. The interactions of Nis (0.75 $\mu\text{mol/L}$) and atropine (Atr, 20 nmol/L) on the beating rates of cultured myocardial cells of neonatal rats. $n = 4$, $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Time (min)	Beating rate		
	Atr	Nis + Atr†	Atr + Nis††
0	50 ± 9	128 ± 30	49 ± 10
1	+104 ± 58	-66 ± 40***	+52 ± 28*
5	+85 ± 41	-60 ± 41***	+34 ± 24*
10	+65 ± 33	-71 ± 30***	+30 ± 23*
15	+57 ± 33	-67 ± 39***	+15 ± 26*

† Nis 7 min, then Atr vs Atr; †† Atr 15 min, then Atr + Nis vs Atr. * $P > 0.05$, *** $P < 0.01$.

Nis 对丝裂霉素 C 引起心肌细胞损伤的影响 分五组, 每组6个培养瓶 (Fig 1), 用无血清 Eagle 培养, 测得心肌细胞释放的 LDH 24 h 较 7 h 有非常显著的增加, 提示无血清培养时间延长, 细胞损伤所释放的 LDH 增多。

Nis 可非常明显加重丝裂霉素 C 5 $\mu\text{g/ml}$ 引起的心肌细胞损伤作用, Nis 的这一作用与其剂量相关。

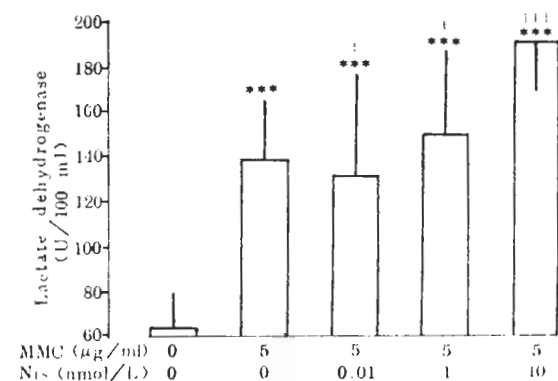


Fig 1. Lactate dehydrogenase released from myocardial cells in serum-free medium for 24 h.

其它 经用离体心脏灌注实验证明 Nis 0.18 $\mu\text{mol/L}$ ($n = 7$) 可降低心脏收缩振幅 ($P < 0.05$), 而对心率无明显变化。将溶解 Nis 的溶媒 4% 乙二醇 0.5 ml, 对离体心脏收缩振幅和频率无明显影响 ($n = 4$), 0.04% 乙二醇 15 μl 加入 Eagle 培养液中, 对心肌细胞搏动也无明显影响 ($n = 2$)。

Discussion

本实验表明, Nis 对培养的心肌细胞在 1.5 nmol/L-1.5 $\mu\text{mol/L}$ 之间其搏动率与剂量呈负相关。在 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 时可见细胞搏动受抑制或停搏, 与傅绍萱等报道 1.0, 3.0 $\mu\text{g/kg}$ iv 可使麻醉犬心率变慢的结果⁽⁶⁾ 相符, 而与 Maxwell 等报道 Nis 5 $\mu\text{g/kg}$ iv 于麻醉犬引起心搏动率增加的结果⁽⁷⁾ 迥异。这可能在整体动物实验, 除对心脏的直接作用外, 还有因剂量大, 降压明显时反射性引起心率增快的效应。我们是在对 Nis 作生物效应检验时发现此效

应。Andren 等采用新钙拮抗剂尼群地平，首次服 40 mg (常用量 20 mg) 治疗高血压患者时亦出现心率增快的效应⁽⁸⁾。

本文证实 Nis 与 Iso, Atr, CaCl₂ 有互相拮抗作用。至于它的作用机理，是与受体竟相结合，还是因 Nis 是钙拮抗剂，抑制心肌细胞的钙收缩偶联作用，尚待进一步研究。

丝裂霉素 C 5 μg/ml 作用 6 h 可见心肌细胞体积缩小，足突减少，随着时间延长，或剂量加大，形态改变更为明显⁽⁹⁾。我们应用丝裂霉素 C 以上剂量 24 h 的心肌细胞培养液，测得 LDH 量比对照组有非常明显增加，也证明心肌细胞有非常明显的损伤。当 Nis 10 nmol/L 和丝裂霉素 C 5 μg/ml 同时加入样品后 LDH 有更明显的增加，其机理不明。Nis 在相当低剂量 20 nmol/L 可部分阻止大鼠缺血心脏的 ATP 裂解⁽¹⁰⁾，而心肌细胞膜的功能依赖 ATP。Nis 加重心肌细胞损伤是否与之有关，尚待阐明。

References

1 Kazda S, Garthoff B, Rämisch K-D, Schluter G. Nisoldipine. In: Scriabine A, ed. *New drugs annual: cardiovascular drugs*; vol 1.

- NY: Raven Press, 1983 : 243-58
- 2 Tumas J, Deth R, Kloner RA. Effects of nisoldipine, a new calcium antagonist, on myocardial infarct size and cardiac dynamics following acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7 : 361
- 3 李连达、高凤辉、张金妹、李映歌、张京、秃毛冬青 II 号对体外培养乳鼠心肌细胞搏动的影响。中医杂志 1980; 21 : 468
- 4 福州部队总医院编。临床医学检验。第 1 版。上海: 上海科学技术出版社, 1978 : 340-2
- 5 de Jong JW, Huizer T. Reduced glycolysis by nisoldipine treatment of ischemic heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7 : 497
- 6 Fu SX, Li YS, Jin CJ, Ren LM. Effects of m-nisoldipine and nisoldipine on hemodynamics in anesthetized dogs. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9 : 43
- 7 Maxwell GM, Crompton S, Rencis V. Effect of nisoldipine upon the general and coronary hemodynamics of the anesthetized dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4 : 393
- 8 Andrén L, Hansson L, Orö L, Ryman T. Experience with nitrendipine - a new calcium antagonist - in hypertension. *Ibid* 1982; 4 : S387
- 9 李连达、刘志云、高凤辉, 等。丝裂霉素 C 对体外培养乳鼠心肌细胞的影响。药学通报 1985; 20 : 123
- 10 De Jong JW, Huizer T, Tijssen JGP. Energy conservation by nisoldipine in ischaemic heart. *Br J Pharmacol* 1984; 83 : 913