

较 Ver  $10 \mu\text{mol/L}$  强, 提示 PNS 除具有与 Ver 相似的抑制慢钙通道的  $\text{Ca}^{2+}$  内流外, 尚可能对  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  交换有抑制作用。

#### REFERENCES

- 1 Wu JX, Chen JX. Depressant actions of *Panax notoginseng* saponins on vascular smooth muscles. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9 : 147
- 2 Pappano AJ. Calcium-dependent action potentials produced by catecholamines in guinea pig atrial muscle fibers depolarized by potassium. *Circ Res* 1970; 27 : 379
- 3 Blondel B, Roijen I, Cheneval JP. Heart cells in culture : a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 1971; 27 : 356

- 4 Li XJ, Wang DS, Chen XZ. Effects of amrinone on contractile activities, cyclic nucleotides and adenylyl cyclase activity of cultured rat heart cells. *Acta Pharmacol Sin* 1987; 8 : 429
- 5 Barry WH, Smith TW. Mechanisms of trans-membrane calcium movement in cultured chick embryo ventricular cells. *J Physiol (Lond)* 1982; 325 : 243
- 6 高志平、李连达、李映欧, 等. 川芎与人参或丹参配伍对培养乳鼠心肌细胞  $^{45}\text{Ca}$  内流的影响. 中国药理学通报 1987; 3 : 365
- 7 Sperelakis N. Electrophysiology of calcium antagonists. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19 (Suppl 2) : S19
- 8 Wang JD, Chen JX. Cardiac and hemodynamic actions of total saponins of *Panax notoginseng*. *Acta Pharmacol Sin* 1984; 5 : 181

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 May; 11 (3) : 217-220

### 硫马唑对培养心肌细胞搏动频率和细胞内腺苷环一磷酸水平的影响

缪朝玉、顾科民 (第二军医大学训练部药理教研室, 上海 200433, 中国)

#### Effects of sulmazole on beating rate and cAMP levels in cultured cardiomyocytes

MIAO Chao-Yu, GU Ke-Ming  
(Department of Pharmacology, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT** The effect of sulmazole (Sul) on beating rate of cultured neonatal rat cardiomyocytes was similar to that of isoproterenol (Iso). They all produced a positive chronotropic action in a dose-dependent manner (Sul  $1-100 \mu\text{mol/L}$ , Iso  $1-300 \text{nmol/L}$ ). Iso increased intracellular cAMP levels in a dose-dependent manner simultaneously, while Sul did not until toxic concentration ( $1 \text{mmol/L}$ ) was given. With Sul  $300 \mu\text{mol/L}$  the cAMP levels were not elevated significantly even when the positive chronotropic effect was maximal (5 min). The results indicate that cAMP is not important in mediating the positive chronotropic effect of Sul.

**KEY WORDS** sulmazole; cardiostimulant agents; cultured cells; myocardium; adenosine cyclic monophosphate; isoproterenol

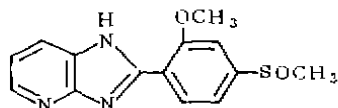
**摘要** 在培养心肌细胞模型上, 硫马唑(Sul)  $1-100 \mu\text{mol/L}$  类似异丙肾上腺素(Iso)  $1-300 \text{nmol/L}$  有明显的剂量依赖性正性频率作用, 两者的最大效应无显著差异。Iso 能剂量依赖性地同步提高细胞内腺苷环一磷酸(cAMP)水平, Sul 无此现象, 只在毒性浓度( $1 \text{mmol/L}$ )或作用时间延长( $300 \mu\text{mol/L}$ , 至少  $> 5 \text{min}$ )时细胞内 cAMP 水平才见显著升高。

**关键词** 硫马唑; 强心剂; 培养的细胞; 心肌; 腺苷环一磷酸; 异丙肾上腺素

硫马唑 (sulmazole, Sul) 是一种具有正性肌力、正性频率和细胞保护作用的新型强心药<sup>(1,2)</sup>。国外有大量文献探讨 Sul 的正性肌力作用及其机理<sup>(3,4)</sup>, 但未见报道 Sul 对培养心肌细胞搏动频率和细胞内 cAMP 水平的影响。因此, 本文旨在培养的新生大鼠心肌细胞上观察 Sul 对其搏动频率的影响, 并与已知强正性频率剂异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso)作比较; 同时观察两药对细胞内 cAMP 水平的影响, 探讨药物作用引起的搏动频率变化与 cAMP 水平变化之间的关系。

Received 1989 Sep 20

Accepted 1990 Jan 22



Sulmazole

## MATERIALS AND METHODS

**药品** 硫马唑(sulmazole, Sul)由我校药学院药化教研室合成<sup>(5)</sup>; 盐酸异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso)注射液是上海天丰药厂产品; 哇巴因(ouabain, Oua)为 Merck 厂产品。药品在实验当天用无血清 Eagle 液配制所需浓度。

**乳鼠心肌细胞培养**<sup>(2)</sup> 将出生 1-4 d 的 SD 大鼠的心室剪碎, 用 0.1% 胰蛋白酶液多次消化分离得到游离的心肌细胞, 加入适量的含 13% 小牛血清和 HEPES 10 mmol/L 的 Eagle 培养基, 在 37℃ 静止培养 2 h, 除去大部分非心肌细胞, 再用培养基将细胞稀释成  $10^6$  cells/ml, 接种培养于 37℃ 温箱中。培养 72 h 左右可见细胞单层或细胞簇呈同步化的片状或向心状搏动, 此时即可用于药物实验, 实验前 2 h 换入无血清的 Eagle 液。

**心肌细胞搏动描记和给药方法** 用光电转换器将心肌细胞搏动 ( $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , pH 7.2) 记录在生理记录仪上<sup>(6)</sup>。实验时用胶泥固定镜下观察的培养瓶, 选取向心状搏动、节律正常的细胞簇进行描记, 稳定 30 min 后用微量注射器把配成一定浓度的药物加入培养瓶中, 采用单剂量给药和累积剂量给药进行实验。累积给药时, 每次加药后, 如在 2 min 内搏动频率未见改变或不再继续增加时, 立即再次加药, 直到连续递增药量不见搏动频率增大或出现毒性表现时, 停止实验。药物浓度以培养液中所含药物的累积浓度计算, 绘制量-效曲线。

**心肌细胞内 cAMP 的测定** 用高氯酸

法<sup>(7)</sup>提取培养心肌细胞内的 cAMP。将药液或空白 Eagle 液加入培养瓶中, 在 37℃ 3, 5, 10, 20 min 后吸去上清液, 迅速向瓶中加入冰冷的高氯酸 (1 mol/L) 0.3 ml 使心肌细胞蛋白变性以中止药物作用。用有机玻璃条轻刮瓶底将心肌细胞刮下, 静止 5 min 后, 向瓶中加入 KOH (2 mol/L) 0.31 ml 使 pH 为 4-6, 离心 ( $1287 \times g$ , 15 min)。将上清液倾入有盖的塑料离心管中, -40℃ 保存。cAMP 测定按照药箱(上海第二医科大学同位素室提供)用放射免疫分析法。

## RESULTS

**正常培养心肌细胞搏动频率的稳定性** 培养 72 h 的心肌细胞自发搏动频率为  $134 \pm 16$  beats/min (bpm,  $n=41$ ), 与文献<sup>(8)</sup>报道  $155 \pm 3$  bpm 接近。其中 7 瓶标本间歇观察 120 min 内的搏动频率, 心肌细胞自发搏动频率在 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 时分别为  $131 \pm 15$ ,  $132 \pm 15$ ,  $131 \pm 14$ ,  $132 \pm 14$ ,  $131 \pm 13$ ,  $132 \pm 13$ ,  $132 \pm 10$ ,  $135 \pm 14$ ,  $132 \pm 13$  bpm, 保持相对稳定。

### 药物对培养心肌细胞搏动频率的影响

Sul 和 Iso 累积给药所得的量-效曲线可见(Fig 1): Sul 类似 Iso 在一定浓度范围内(Sul 1-100  $\mu\text{mol/L}$ , Iso 1-300 nmol/L) 有明显的剂量依赖性正性频率作用, Sul 的最大效应( $E_{\text{max}}$ ) 为较给药前平均增加 30%, 此时的蓄积浓度( $C_{\text{max}}$ )为 100  $\mu\text{mol/L}$ , Sul 1 mmol/L 时出现节律不齐等毒性现象; Iso 的  $E_{\text{max}}$  较给药前平均增加 29%, 其  $C_{\text{max}}$  为 300  $\mu\text{mol/L}$ , Sul 和 Iso 的最大效应间无显著差异(非配对  $t$  检验,  $P > 0.05$ )。模拟 Iso 和 Sul 累积给药操作每隔 3 min 累加一定量(其容量与药物试验时所加药液的容量相同)的 Eagle 液每次记录心肌细胞搏动频率, 发现累加空白 Eagle 液对心肌细胞搏动频率无明显影响(配对  $t$  检验,  $P > 0.05$ )。Sul 和 Iso 单剂量给药各观察 6 瓶标

本发现: Sul 10  $\mu\text{mol/L}$  给药后 1-2 min 就增加搏动频率, 4-5 min 达稳定状态; Iso 100  $\text{nmol/L}$  给药后 0.5 min 即增加搏动频率, 2-3 min 达稳定状态。

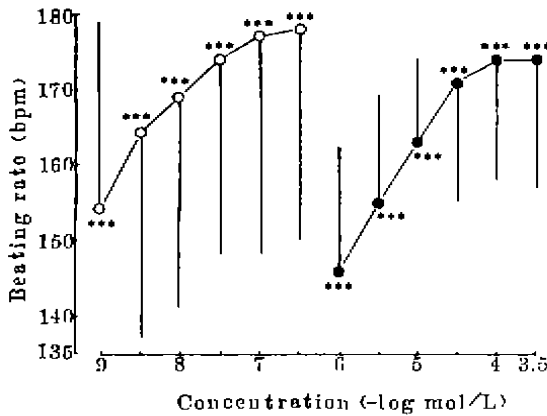


Fig 1. Effects of cumulative concentrations of isoproterenol (O,  $n=9$ ) or sulmazole (●,  $n=8$ ) on beating rate of cultured (72 h,  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , pH 7.2) neonatal rat cardiomyocytes.  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*\*\* $P < 0.01$ , vs its basal beating rate (Iso,  $138 \pm 21$  bpm; Sul,  $134 \pm 15$  bpm).

药物对培养心肌细胞内 cAMP 水平的影响

### 1 Oua 对细胞内 cAMP 水平的影响

Oua 0.1, 1, 100  $\mu\text{mol/L}$  与心肌细胞在  $37^\circ\text{C}$  一起孵育 3 或 10 min, 细胞内 cAMP 水平未见明显变化。Oua 在此仅作为 cAMP 测定方法的阴性对照药物。

2 Iso 对细胞内 cAMP 水平的影响 Iso 1, 10, 100  $\text{nmol/L}$  与心肌细胞在  $37^\circ\text{C}$  一起孵育 3 min, 能显著升高细胞内 cAMP 水平, 并呈明显的剂量效应关系, 即随着药物浓度的增加, 其升高 cAMP 水平的作用也增强 (Tab 1)。

3 Sul 对细胞内 cAMP 水平的影响 不同浓度的 Sul 与心肌细胞在  $37^\circ\text{C}$  孵育 3 min, Sul 10, 100, 300  $\mu\text{mol/L}$  时未见 cAMP 水平显著升高, 只在 1  $\text{mmol/L}$  很高浓度时才见 cAMP 非常显著的升高 (Tab 1)。Sul 300  $\mu\text{mol/L}$  与心肌细胞在  $37^\circ\text{C}$  分别孵育 3, 5, 10,

20 min, 只在 10, 20 min 时见到细胞内 cAMP 有非常显著的升高 (对照, 10, 20 min 时分别为  $2.4 \pm 0.5$ ,  $3.7 \pm 0.7$ ,  $4.0 \pm 0.8$   $\text{pmol/vial}$ .  $P < 0.01$ )。

Tab 1. cAMP level in cultured neonatal rat cardiomyocytes at 3 min after treatment with isoproterenol or sulmazole.  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \* $P > 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  vs control.

Drug	Vials	cAMP (pmol/vial)	
Iso (nmol/L)	0	7	$1.2 \pm 0.2$
	1	6	$2.5 \pm 0.1^{***}$
	10	6	$3.1 \pm 1.0^{**}$
	100	6	$17.2 \pm 2.4^{***}$
Sul ( $\mu\text{mol/L}$ )	0	6	$1.1 \pm 0.3$
	10	6	$1.2 \pm 0.3^*$
	100	6	$1.3 \pm 0.1^*$
	300	6	$1.4 \pm 0.2^*$
	1000	6	$1.9 \pm 0.4^{***}$

## DISCUSSION

在培养心肌细胞模型上, Sul 类似 Iso 有明显的剂量依赖性正性频率作用, 两者的最大效应分别为 30% 和 29%, 无显著差异, 这均较在离体豚鼠心房肌制备上观察到的结果 (36% 和 64%)<sup>(1)</sup> 为低, 而且 Iso 最大效应显著比 Sul 的高, 此种不同可能因心房制备具有完整的窦房结, 药物对心房肌搏动的影响显然要通过窦房结机理产生, 而在培养心肌细胞上则是药物直接对心室肌细胞的作用。

心肌内 cAMP 升高可致正性频率和正性肌力作用<sup>(9)</sup>。已知  $\beta$  受体激动剂 Iso 与膜上  $\beta$  受体结合激活腺苷酸环化酶, cAMP 合成增加而致正性频率作用<sup>(10)</sup>。Iso 在培养心肌细胞上出现剂量依赖性的正性频率作用时同步地出现 cAMP 水平剂量依赖性递增, 也证实了 Iso 的正性频率作用与其升高 cAMP 水平有关。但 Sul 却并不如此: Sul 在出现剂量依赖性的正性频率作用时未见细胞内 cAMP 水平同步升高, 而当 Sul 浓度递增至 1  $\text{mmol/L}$  时才见 cAMP 水平有非常显著的升高, 但在此种高浓度时已使培养心肌细胞出现搏动节律不齐等毒

性作用,提示 Sul 的正性频率作用可能不是通过 cAMP 机理所致,而 Sul 在 1 mmol/L 的高浓度时细胞内 cAMP 水平的显著升高却可能是其产生节律不齐等毒性作用的原因之一。从 Sul 300  $\mu\text{mol/L}$  影响 cAMP 水平的时程研究结果看来也不说明 Sul 正性频率作用由 cAMP 升高所启动,因为 Sul 的正性频率作用在加药后 1-2 min 就产生,4-5 min 已达到峰值(稳定状态),而 cAMP 的显著升高要在 10 min (至少是 > 5 min)后才出现,但这是否能说明 cAMP 升高在 Sul 正性频率作用的维持中起一定的作用,尚需证明。

## REFERENCES

- 1 Zuo Z, Wang SN, Gu KM. Effects of sulmazole on isolated guinea pig atria. *Acad J Second Milit Med Coll* 1985; 6 : 203
- 2 Liu JJ, Yang YC, Gu KM, Tan SJ. Comparison of cytotoxic effect of sulmazole with ouabain on cultured myocardial cells. *Acta Pharmacol Sin* 1988; 9 : 129
- 3 Endoh M, Yanagisawa T, Taira N, Blinks JR. Effects of new inotropic agents on cyclic nucleotide metabolism and calcium transients in canine ventricular muscle. *Circulation* 1986; 73 (Suppl 3): 117
- 4 van Meel JCA, Zimmermann R, Diederens W, Erdman E, Mrwa U. Increase in calcium sensitivity of cardiac myofibrils contributes to the cardiotoxic action of sulmazole. *Biochem Pharmacol* 1988; 37 : 213
- 5 Sun CS, Zhang DH, Du DH, Jiang ZY, Liu ST. Synthesis of cardiotoxic imidazopyridine. *Acad J Second Milit Med Coll* 1985; 6 : 199
- 6 Sinclair AJ, Miller HA, Harrison DC. An electrooptical monitoring technique for heart cells in tissue culture. *J Appl Physiol* 1970; 29 : 747
- 7 Shryock JC, Rubio R, Berne RM. Extraction of adenine nucleotides from cultured endothelial cells. *Anal Biochem* 1986; 159 : 73
- 8 Higgins TJC, Allsopp D, Bailey PJ. The effect of  $\beta$ -adrenergic blocking drugs on the intrinsic beating rate of cultured rat myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1979; 11 : 101
- 9 Tsien RW. Cyclic AMP and contractile activity in heart. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1977; 8 : 363
- 10 Qiu XC, Fu YF. The role of cyclic nucleotides in the regulation of cardiac function. *Prog Physiol Sci* 1982; 13 : 315

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 May; 11 (3) : 220-225

## Effects of dauricine and lidocaine alone or combined on electrophysiological properties of canine Purkinje fibers

ZHU Jie-Quan, ZENG Fan-Dian, HU Chong-Jia

(Department of Clinical Pharmacology, Tongji Medical University, Hankou 430030, China)

**ABSTRACT** Dauricine (Dau) 1 to 30  $\mu\text{mol/L}$  produced the concentration-dependent depressions in the APA,  $V_{\text{max}}$ , MDP, and prolongations of APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub> as well as ERP of the isolated canine cardiac Purkinje fibers (PF). The automaticity and excitation were significantly reduced at concentration of 30  $\mu\text{mol/L}$ . The effects of Dau on all action potential parameters of PF were observed at all stimulation

frequencies (60, 75, 100, 150 beats/min). Lidocaine (Lid) markedly shortened APD<sub>50</sub> of PF at concentration of 30  $\mu\text{mol/L}$  and also shortened APD<sub>90</sub>, ERP and significantly depressed APA,  $V_{\text{max}}$  at 100  $\mu\text{mol/L}$ . When perfused in combination with Dau, Lid appreciably shortened APD<sub>50</sub> and APD<sub>90</sub>, and lightly abbreviated ERP prolonged by Dau.

**KEY WORDS** dauricine/drug effects; lidocaine/drug effects; Purkinje fibers; action potentials;

Received 1989 May 23

Accepted 1990 Jan 3