

- A. Calcium-mediated action potentials in mammalian myocardium. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1973; **280** : 239
- 9 Li GR, Fang DC, Hu CJ, Lü FH. Effects of dauricine on physiological properties of myocardium. *Acta Pharmacol Sin* 1984; **5** : 20
- 10 Katz AM. Cardiac action potential. In: Katz AM, ed. *Physiology of the heart*. NY: Raven Press, 1977 : 229-56
- 11 Baer M, Best PM, Reuter H. Voltage-dependent action of tetrodotoxin in mammalian cardiac muscle. *Nature* 1976; **263** : 344
- 12 Watanabe T, McDonald TF. Tetrodotoxin exerts a large frequency-dependent depression of the maximum rate of rise of action potentials in guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 1986; **406** : 645

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 May; **11** (3) : 245-249

间硝苯啶对异丙肾上腺素诱发大鼠心肌损伤的保护作用¹

陈念航、饶曼人 (南京医学院心血管药理研究室, 南京 210005, 中国)

Protecting effects of *m*-nifedipine on isoproterenol-induced myocardial injury in rats¹

CHEN Nian-Hang, RAO Man-Ren (Department of Cardiovascular Pharmacology, Nanjing Medical College, Nanjing 210005, China)

ABSTRACT To test whether *m*-nifedipine (*m*-Nif) protects heart against myocardial injury induced by a single subcutaneous injection of isoproterenol (Iso) 30 mg/kg, male rats were injected subcutaneously twice daily with *m*-Nif 6 μmol/kg for 4 d. Hemodynamic changes, serum creatine kinase activity and ion contents of myocardial tissue and mitochondria were assessed about 6 h after Iso injection. While it did not notably influence blood pressure, heart rate and left ventricular contracting function of rats, *m*-Nif markedly attenuated calcium accumulation in myocardial tissue and mitochondria, reduced magnesium and potassium loss in myocardial tissue, depressed the release of creatine kinase and prevented the elevation of left ventricular end diastolic pressure. These beneficial effects of *m*-Nif were similar to those of nifedipine (Nif). However, *m*-Nif decreased minute tension-time index more significantly than the same dose of Nif. It is possible that *m*-Nif protects the rat heart from isoproterenol-induced injury by inhibiting transsarcolemmal calcium influx.

KEY WORDS *m*-nifedipine; nifedipine; isoproterenol; myocardium; mitochondria; calcium;

hemodynamics; creatine kinase

提要 给 sc 异丙肾上腺素 (Iso) 30 mg/kg 的大鼠, 预防性小剂量多次 sc 间硝苯啶 (*m*-Nif), 用 Iso 后约 6 h, *m*-Nif 未能显著改变大鼠的 BP, HR 和左室收缩功能, 但部分对抗心肌组织和线粒体钙过负荷; 减少心肌组织镁和钾的丢失; 抑制心肌 CK 释放; 防止 LVEDP 升高。作用程度均近似于等量硝苯啶 (Nif)。但降低 TTI · HR 强于等量 Nif。上述保护作用机理与钙拮抗作用有关。

关键词 *m*-硝苯啶; 硝苯啶; 异丙肾上腺素; 心肌; 线粒体; 钙; 血液动力学; 肌酸激酶

钙在异丙肾上腺素 (isoproterenol, Iso) 诱发的心肌损伤中起关键作用⁽¹⁾, 能否防止过量 Iso 诱导的心肌钙过负荷是判断钙拮抗剂的重要依据之一⁽²⁾。已经证明, 硝苯啶 (nifedipine, Nif) 等在较大剂量时可基本对抗过量 Iso 引起的心肌组织钙过负荷并防止心肌细胞坏死⁽¹⁾。但是, 小剂量钙拮抗剂能否防止 Iso 的心脏毒性作用, 尚未见文献报道。本研究拟从心肌组织和线粒体离子含量、细胞损伤程度以及血液动力学变化三方面, 观察新的二氢吡啶类钙拮抗剂间硝苯啶 (*m*-nifedipine, *m*-Nif) 在预防性小剂量多次给药时对 Iso 诱发的心肌损伤的影响, 并与等量 Nif 进行比较。

MATERIALS AND METHODS

试剂 *m*-Nif 和 Nif 系天津医药工业研

Received 1989 Jun 15 Accepted 1989 Dec 19

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No Bio 85-395

究所提供,溶于含10%无水乙醇和40%丙二醇的溶剂(solvent, Sol). Iso由中国医学科学院药物研究所提供,溶于生理盐水(NS),临用前配制.腺嘌呤核苷二磷酸单钠盐和磷酸肌酸钠盐分别由上海生物化学研究所和上海试剂二厂提供.碳酸钙、氧化镁和氯化钾为高纯,硝酸为优级纯,均由中国科学院南京土壤研究所提供.其它试剂均为国产AR级.

分组及给药 Sprague-Dawley ♂大鼠40只,体重 $286 \pm \text{SD } 55 \text{ g}$.随机分为4组:*m*-Nif + Iso, Nif + Iso, Sol + Iso和对照组.前两组分别后肢sc *m*-Nif或Nif $6 \mu\text{mol/kg}$, bid $\times 4 \text{ d}$,最后一次给药后0.5 h在对侧后肢分别sc Iso 30 mg/kg ;后两组分别后肢sc Sol 1 ml/kg , bid $\times 4 \text{ d}$,最后一次给Sol后0.5 h在对侧后肢分别sc Iso 30 mg/kg 或NS 1 ml/kg .

血液动力学参数测定 于测定前45 min,大鼠用乌拉坦 1 g/kg ip麻醉.将PE₅₀聚乙烯管自右颈动脉插入左室,稳定约10 min,于sc Iso或NS后6 h,用SJ-42型四道生理记录仪同步记录左室压(LVP),左室内压变化速率($\pm \text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$),左室舒张末期压(LVEDP)和心电图II导联.随后,将导管退回右颈动脉,测量动脉血压(BP).推算射血时间(ET),等容舒张期心室内压下降的时间常数(T值)和分钟-张力-时间指数(TTI \cdot HR)^(3,4).凡左室插管时间超过10 min的大鼠不用.

血清肌酸激酶(CK)测定 测完血液动力学参数后,立即自颈动脉取血,分离血清, -10°C 保存,于3 d内用肌酸显色法⁽⁵⁾测定血清CK活性.

心肌组织离子含量测定 精确称取左室肌500 mg,加入硝酸(1 mol/L) 10 ml/g 湿重,制成匀浆⁽⁶⁾, 25°C 振摇24 h⁽⁷⁾, $12000 \times \text{g}$ 离心10 min,取上清液,适当稀释后,在AA-1475型原子吸收分光光度计上,于波长422.7, 285.2和765.5 nm处分别测定心肌组

织钙,镁和钾离子含量.标准溶液和待测溶液均含硝酸(1 mol/L)和0.1%三氯化钨⁽⁷⁾.每个标本另取部分心室肌,于 100°C 烘6 h,计算干重与湿重比值,以 $\mu\text{mol/g}$ 干重折算心肌组织离子含量.

心肌线粒体制备及离子含量测定 另取Sprague-Dawley ♂大鼠29只,体重 $279 \pm \text{SD } 33 \text{ g}$.分组同上.于sc Iso或NS后6 h,断头放血,取心室肌.方法依文献⁽⁸⁾略有改动.用冷分离液(蔗糖 250 mmol/L , Tris-HCl 50 mmol/L , pH 7.4)冲洗心肌,剪碎,按 20 ml/g 湿重加入分离液,匀浆4.5, 10 s, 4次,每次间隔10 s,再用玻璃匀浆器研磨.将匀浆 $225 \times \text{g}$ 离心6 min,取上清液,用双层纱布过滤后, $12000 \times \text{g}$ 离心10 min,取沉淀.加入5 ml分离液,洗涤后 $8700 \times \text{g}$ 离心5 min,重复2次,最终沉淀物即为心肌线粒体.整个分离过程在 0°C 进行.用比色法⁽⁹⁾测定线粒体蛋白含量.线粒体沉淀中加入硝酸(1 mol/L)适量, 25°C 振摇24 h, $12000 \times \text{g}$ 离心10 min,取上清液,依同法测定线粒体钙,镁和钾离子含量.

离子测定中所用玻璃器皿均用稀硝酸浸泡一月,去离子水冲洗.所用试剂均用去离子水配制.

RESULTS

血液动力学 sc Iso后约6 h,收缩压(SBP)和舒张压(DBP)显著下降,心率(HR)明显增快.*m*-Nif和Nif没有明显改变Iso的上述作用. Iso还显著升高LVEDP和TTI \cdot HR.*m*-Nif和Nif均完全防止LVEDP升高,也抑制TTI \cdot HR升高,以*m*-Nif作用较强,使TTI \cdot HR比Sol+Iso和Nif+Iso组分别减少23和15%.此外,与对照组比较,*m*-Nif和Nif还显著缩短ET,而在Sol+Iso组,ET没有显著缩短.对其它血液动力学参数,各用Iso组之间无显著差异(Tab 1).

Tab 1. Hemodynamic changes and serum creatine kinase activity of rat about 6 h after a single sc isoproterenol (Iso, 30 mg/kg) with the pretreatment of *m*-nifedipine (*m*-Nif, sc 6 μ mol/kg, bid \times 4 d) or nifedipine (Nif, sc 6 μ mol/kg, bid \times 4 d). $n=10$, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs control. ††† $P < 0.01$ vs solvent(Sol)+Iso. †† $P < 0.01$ vs Nif+Iso.**

	Control	Sol + Iso	<i>m</i> -Nif + Iso	Nif + Iso
SBP(kPa)	17.8 \pm 1.2	15.5 \pm 1.5***	14.9 \pm 1.7**	16.4 \pm 1.7*
DBP(kPa)	11.5 \pm 1.3	8.9 \pm 1.2***	8.7 \pm 1.5**	9.4 \pm 1.4*
LVSP(kPa)	21.8 \pm 1.9	21.5 \pm 2.7	21.5 \pm 1.3*	20.8 \pm 2.6
LVEDP(kPa)	-0.14 \pm 0.27	0.40 \pm 0.17**	-0.3 \pm 0.4* †††	-0.2 \pm 0.3* ††
+dP/dt _{max} (kPa/s)	1038 \pm 168	1031 \pm 212*	1123 \pm 171*	1085 \pm 332*
-dP/dt _{max} (kPa/s)	640 \pm 88	637 \pm 170*	672 \pm 112*	697 \pm 212*
T(ms)	6.8 \pm 2.5	7 \pm 3*	6.2 \pm 1.7*	6.4 \pm 1.3*
HR(bpm)	407 \pm 44	483 \pm 36**	469 \pm 29***	482 \pm 36**
KsET(ms)	18.2 \pm 2.6	16.2 \pm 2.9*	14 \pm 4**	15.7 \pm 2.7*
TTI \cdot HR(kPa \cdot s \cdot min ⁻¹)	283 \pm 46	326 \pm 48*	252 \pm 40** †††	296 \pm 24*
CK(IU/ml)	2.7 \pm 0.8	4.6 \pm 0.8***	3.4 \pm 0.6* †††	3.3 \pm 0.7* ††

SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure; LVSP: Left ventricular systolic pressure; LVEDP: Left ventricular end diastolic pressure; +dP/dt_{max} The maximum rate of rise of left ventricular pressure; -dP/dt_{max} The maximum rate of fall of left ventricular pressure; T: Time constant of isovolumic diastolic pressure decay; HR: Heart rate; ET: Ejective time; TTI \cdot HR: Minute tension-time index; CK: Creatine kinase

血清 CK 活性 sc Iso 后约 6 h, 血清 CK 活性比对照组高出 72%。*m*-Nif 和 Nif 则使 Iso 所致的心肌 CK 释放分别减少 26 和 29%(Tab 1)。

心肌组织离子含量 Iso 使心肌组织钙含量增加 3.2 倍, 镁和钾含量分别减少 50 和 27%。*m*-Nif 和 Nif 均抑制 Iso 导致的心肌组织离子含量变化, 以抑制心肌组织钙聚集最为明显。与 Sol + Iso 组比较, *m*-Nif 和 Nif 使心肌组织钙含量分别减少 56 和 59%, 镁含量分

别增加 44 和 51%, 钾含量分别增加 22 和 17.5%。两药在作用程度上无显著差异 (Tab 2)。

心肌线粒体离子含量测定 Iso 使心肌线粒体钙含量增加 1.7 倍, 但对线粒体镁和钾含量并无影响。*m*-Nif 和 Nif 均部分抑制线粒体钙聚集, 使之比 Sol+Iso 组分别减少 37 和 43%, 而对线粒体镁和钾含量也无显著影响。*m*-Nif 的作用在程度上与等量 Nif 相近 (Tab, 2)。

Tab 2. Myocardial tissue and mitochondrial ion contents of rat about 6 h after a single sc Iso (30 mg/kg) with the pretreatment of *m*-Nif(sc 6 μ mol/kg, bid \times 4 d) or Nif(sc 6 μ mol/kg, bid \times 4 d). $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$ vs control. ††† $P < 0.01$ vs Sol + Iso.**

	Control	Sol + Iso	<i>m</i> -Nif + Iso	Nif + Iso
Tissue	($n=10$)	($n=10$)	($n=10$)	($n=10$)
Ca ²⁺ (μ mol/g dry wt)	3.8 \pm 1.4	16.1 \pm 2.3***	7.0 \pm 1.5** †††	6.0 \pm 1.5* †††
Mg ²⁺ (μ mol/g dry wt)	45 \pm 11	22 \pm 8***	32 \pm 3** †††	33.9 \pm 2.5 †††
K ⁺ (μ mol/g dry wt)	261 \pm 28	190 \pm 13**	233 \pm 22** †††	224 \pm 22** †††
Mitochondria	($n=7$)	($n=8$)	($n=7$)	($n=7$)
Ca ²⁺ (nmol/mg prot)	17.8 \pm 2.2	48 \pm 5***	30 \pm 4** †††	27 \pm 5** †††
Mg ²⁺ (nmol/mg prot)	17.4 \pm 2.7	18.0 \pm 2.1*	17.4 \pm 2.4*	17 \pm 3*
K ⁺ (nmol/mg prot)	43 \pm 4	48 \pm 6*	45 \pm 7**	47 \pm 5*

心肌组织钙含量与血清 CK 活性的关系

在对照组, 心肌组织钙含量与血清 CK 活性之间无相关性. 但在用 Iso 的各组, 心肌组织钙含量与血清 CK 活性呈正相关. *m*-Nif+Iso, Nif+Iso 和 Sol+Iso 组, 相关系数分别为 0.72, 0.67 和 0.65 ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Iso 通过兴奋 β 受体, 激活 cAMP 系统而开放钙通道⁽¹⁰⁾. 线粒体钙大量聚集既是胞浆游离钙浓度增高的结果, 也是 Iso 导致心肌产能障碍及细胞坏死的病理基础之一⁽¹⁾. 和 Nif 一样, 预防性小剂量多次给予 *m*-Nif 在部分对抗心肌组织和线粒体钙聚集的同时, 亦减少心肌组织钾和镁的丢失以及 CK 的释放, 提示 *m*-Nif 通过抑制钙内流减轻了心肌细胞的损伤. 用 Iso 后心肌组织钙含量与血清 CK 活性之间呈正相关似乎也支持这一点. 此外, 本文中心肌组织镁含量的变化也可能与钙镁在跨膜转运上的互相竞争作用有关⁽¹⁾.

在整体实验, LVEDP 受到心脏负荷、心率、心肌收缩力、左室舒张功能及顺应性的影响⁽¹¹⁾. *m*-Nif 和 Nif 在未明显改变用 Iso 大鼠的 BP、HR 和左室收缩功能的同时, 有效防止 LVEDP 升高, 至少部分提示它们改善了左室舒张功能或顺应性. 在本实验条件下, *m*-Nif 和 Nif 虽不能完全对抗 Iso 所致的心肌组织和线粒体钙过负荷, 但防止 LVEDP 升高却相当完全, 提示维持较正常的左室舒张功能或顺应性不必将细胞钙含量降至正常水平. 这与维拉帕米的作用⁽¹²⁾有相似之处. 其确切机理仍有待探讨.

TTI · HR 可间接反映心肌耗氧量. 过量 Iso 降低 BP, 增加 TTI · HR, 可导致心肌相对缺血缺氧⁽¹³⁾. *m*-Nif 抑制 Iso 所致的 TTI · HR 升高优于 Nif, 有利于维持心肌氧的供需平衡. 这可能是它减轻 Iso 所致心肌损伤的另一条途径.

在线粒体钙测定中, 改用稀硝酸室温振荡法消化标本, 不需特殊设备, 简化了操作. 本文中对照组的线粒体钙含量略高于猪和兔的正常值^(14,15). 可能与动物的种属差异有关.

ACKNOWLEDGMENTS 中国科学院南京土壤研究所光谱室刘兆礼同志在离子测定中给予技术指导.

REFERENCES

- 1 Fleckenstein A. *Calcium antagonism in heart and smooth muscle. Experimental facts and therapeutic prospects.* NY: Wiley, 1983: 146-52
- 2 Opie LH. Calcium ions, drug action and the heart—with special reference to calcium antagonist drugs. *Pharmacol Ther* 1984; 25: 271
- 3 Weiss JL, Frederiksen JW, Weisfeldt ML. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest* 1976; 58: 751
- 4 Chen X, Huang QX, Zhou TJ, Dai HY. Studies of *Citrus aurantium* and its hypertensive ingredients on the cardiac functions and hemodynamics in comparison with dopamine and dobutamine. *Acta Pharm Sin* 1980; 15: 71
- 5 Duma RJ, Siegel AL. Serum creatinine phosphokinase in acute myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1965; 115: 443
- 6 Watts JA, Koch CD, LaNoue KF. Effects of Ca^{2+} antagonism on energy metabolism: Ca^{2+} and heart function after ischemia. *Am J Physiol* 1980; 238: H909
- 7 Jennings RB, Sommers HM, Kaltenbach JP, West JJ. Electrolyte alterations in acute myocardial ischemic injury. *Circ Res* 1964; 14: 260
- 8 Jennings RB, Moore CB, Shen AC, Herdson PB. Electrolytes of damaged myocardial mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 135: 515
- 9 Lowry OH, Rosebrough NI, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265
- 10 Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 1983; 301: 569
- 11 Grossman W, McLaurin LP. Diastolic properties of the left ventricle. *Ann Intern Med* 1976; 84: 316
- 12 Yeager JC, Whitehurst ME. Verapamil prevents isoproterenol-induced cardiac failure in the rat. *Life Sci* 1982; 30: 299

- 13 Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17 : 291
- 14 Peng CF, Kane JJ, Murphy ML, Straub KD. Abnormal mitochondrial oxidative phosphorylation of ischemic myocardium reversed by Ca^{2+} -chelating agents. *Ibid* 1977; 9 : 897

- 15 Nayler WG, Ferrari R, Williams A. Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium. *Am J Cardiol* 1980; 46 : 242

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 May; 11 (3) : 249-253

尼可地尔对缺血区冠脉循环的作用

陈士良、朱妙章、冯晓滨、李兰荪、臧益民 (第四军医大学生理学教研室, 西安 710032, 中国)

Effect of nicorandil on coronary circulation in ischemic region

CHEN Shi-Liang, ZHU Miao-Zhang, FENG Xiao-Bing, LI Lan-Sun, ZANG Yi-Min
(Department of Physiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT To clarify the role of nicorandil (Nic) in relieving myocardial ischemia, the effects of Nic in canine models of coronary arterial stenosis were studied. During stenosis of the anterior descending coronary artery by an external micrometer constrictor, intracoronary infusion of Nic 1, 5 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$ increased coronary blood flow and decreased distal coronary pressure, total coronary arterial resistance and small coronary arterial resistance; but did not affect mean aortic pressure, heart rate and large coronary arterial resistance. Whole blood viscosity, plasma viscosity and hematocrit in coronary vein after intracoronary infusion of Nic were reduced. The results of intravenous infusion of Nic were similar to those of intracoronary infusion.

These results indicate that Nic is capable of increasing coronary blood flow, alleviating myocardial ischemia due to direct dilatation of coronary artery and reduction of blood viscosity in ischemic region.

KEY WORDS nicorandil; coronary circulation; hemodynamics; rheology; myocardium; ischemia

提要 本文在实验性冠脉狭窄犬上, 观察到冠脉内恒

流灌注尼可地尔(Nic 1, 5 $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{min}$)后, 冠脉流量增加。远端小动脉压, 冠脉血管总阻力和小冠脉血管阻力减低; 而血压和心率无明显改变。冠状静脉的全血粘度、血浆粘度和血细胞比容降低。股 iv 也得到相同的结果。表明 Nic 有扩张缺血区冠脉和降低血液粘度的双重作用。

关键词 尼可地尔; 冠脉动脉循环; 血液动力学; 血液流变学; 心肌; 缺血

冠状动脉硬化所致的狭窄可以引起心肌缺血等一系列改变, 使用扩血管药物可以纠正或缓解之。尼可地尔(nicorandil, Nic)是近年来发展起来的一种抗心绞痛新药, 它能扩张冠脉, 增加血流量⁽¹⁾, 改善缺血区心肌代谢和心脏功能⁽²⁾, 增加心外膜流向心内膜的血流量⁽³⁾等。目前尚不清楚的是: 1) Nic 改善心肌缺血是通过全身体循环作用还是直接作用于冠脉? 2) Nic 对缺血区冠脉是否有扩张作用? 其作用部位如何? 3) Nic 是否能改善缺血区血液流变学? 为此, 本文在实验性冠脉狭窄犬上, 观察 Nic 对冠脉循环的上述作用, 并探讨了它在心肌缺血时作用的机理。

MATERIAL AND METHODS

Nic 由陕西省医药科研试验厂提供。健康杂种犬 18 条, 体重 $19 \pm \text{SD } 4 \text{ kg}$, ♀♂不拘, 戊巴比妥钠 iv 麻醉开胸⁽⁴⁻⁶⁾后, 在冠脉左前降支第一分支下方安放电磁流量计(MF-27)探

Received 1989 Aug 15

Accepted 1990 Feb 14