

progress. In association with the American College of neuropsychopharmacology. New York: Raven Press, 1987; 141-9.

2 Åsberg M, Thoren P, Traskman L, Bertilsson L, Ringberger V. Serotonin Depression: a biochemical subgroup within the affective disorders. Science 1976; **191**: 478-80.

3 Roy A, De Jong J, Linnoila M. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior in depressed patients. Arch Gen Psychiatry 1989; **46**: 609-12.

4 Di Chiara G. Brain dialysis of monoamines. In: Robinson TE, Justice JB Jr, editors.

Microdialysis in the neurosciences. Amsterdam: Elsevier Science Publ, 1991; 175-87.

5 Xie F, Huang T, Kissinger PT. The application of microbore column in life sciences. Proc Biomed Chromatogr 1994; **2**: 13-16.

6 Kissinger PT, Shoup RE. Optimization of LC apparatus for determinations in neurochemistry with an emphasis on microdialysis samples. J Neurosci Methods 1990; **34**: 3-10.

7 Bohs CE, Linhares MC, Kissinger PT. The UnJet, a new electrochemical detector for microbore liquid chromatography. Current Sep 1994; **12**: 181-6.

477-480
BIBLID: ISSN 0253-9756

Acta Pharmacologica Sinica 中国药理学报 1995 Sep; 16 (5); 477-480

异丙肾上腺素
尼可地尔 心肌 钙

29

尼可地尔对体外培养乳鼠心肌细胞自发性搏动及动作电位的影响

王洪新, 王维信 (锦州医学院药理教研室, 锦州 121004, 中国)

Effects of nicorandil on spontaneous beating and action potentials of cultured myocardial cells of neonatal rats

WANG Hong-Xin, WANG Wei-Xin
(Department of Pharmacology, Jinzhou Medical College, Jinzhou 121004, China)

AIM: To study the anti-arrhythmic mechanism of nicorandil (Nic). **METHODS:** The myocardial cells of neonatal rats were cultured and effects of Nic on spontaneous beating and action potential of cultured myocardial cells were observed. **RESULTS:** Nic $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ decreased the spontaneous beating rates of cultured myocardial cells of neonatal rats. Nic $64 \mu\text{mol L}^{-1}$ prevented the beating rats induced by CaCl_2 1 mmol L^{-1} and isoproterenol $2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nic 32 and $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ reduced the amplitude, maximal rate of rise, and shortened APD_{50} and APD_{90} re-

R 965.2
larization. Nic prolonged the spontaneous sinus cycle length. **CONCLUSION:** The anti-arrhythmic mechanism of Nic is related to its direct effects on the myocardial cells.

KEY WORDS nicorandil; cultured cells; myocardium; calcium; isoproterenol; action potentials

目的: 为了研究尼可地尔(nicorandil, Nic)抗心律失常的作用机制. **方法:** 体外培养乳鼠心肌细胞并观察 Nic 对培养心肌细胞自发性搏动频率及动作电位的影响. **结果:** Nic 能使体外培养乳鼠心肌细胞自发性搏动频率下降. Nic $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ 对 CaCl_2 1 mmol L^{-1} 及异丙肾上腺素 $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ 增加的细胞搏动率有抑制作用. Nic 32 和 $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ 能使动作电位幅度(APA)及最大上升速率(V_{max})明显下降,使动作电位时程(APD_{50} , APD_{90})缩短,搏动周期(SCL)显著延长. **结论:** Nic 的抗心律失常机制与其对心肌细胞的直接作用有关.

Received 1993-03-29

Accepted 1994-11-19

关键词 尼可地尔; 培养的细胞; 心肌; 钙; 异丙肾上腺素; 动作电位

尼可地尔(nicorandil, Nic), 1978年由日本首先合成^[1]。它具有烟酰胺的结构, 主要用于心绞痛的治疗^[2,3], 动物实验证实它有抗心律失常作用^[4], 但机制不甚清楚。本实验以体外培养大鼠乳鼠心肌细胞为模型, 旨在探讨, Nic对心肌细胞的直接作用与其整体抗心律失常的关系。

MATERIALS AND METHODS

心肌细胞培养方法参照文献[5], 无菌条件下, 取生下2-4 d的Wistar大鼠心室, Hanks'液清洗, 剪成1-3 mm³, 用0.06%胰蛋白酶液分散细胞, 以 $1 \times 10^8 - 6 \times 10^8$ cells L⁻¹接种于装有20%小牛血清的培养基内, 密封培养于37℃。每隔48 h更换一次培养液。

在XSB-1A倒置显微镜下, 选择搏动规则的细胞, 计数给药前及给药后5, 10, 15, 20 min时心肌细胞搏动的频率。

将培养瓶放在倒置显微镜下, 瓶的温度通过吹风机加热控制在 36 ± 1 ℃。选用微电极直径小于0.5 μm, 内充KCl 3 mol L⁻¹, 阻抗10-30 MΩ。在培养2-5 d的心肌细胞, 引出的动作电位(AP)信号经过VDF微电极放大器放大后, 一路输入示波器上线, 一路经微分器输入示波器下线, 显示V_{max}。AP引出后, 稳定10 min开始给药, 观察给药后AP的变化, 用海鸥相机拍照记录。

所有药物均用培养基配制, Nic由锦州制药一厂生产, 略加热配成4.8 mmol L⁻¹母液备用。异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso), 配成60 μmol L⁻¹母液备用。

RESULTS

对细胞搏动频率的影响 选择搏动规则的细胞簇。实验组Nic浓度分别为32和160 μmol L⁻¹。对照组为等容积的培养基。加药后5, 10, 15, 20 min时, 自身给药前后对照, 心肌细胞搏动率明显降低($P < 0.01$)。两用药组在5, 10, 15, 20 min时与对照组相应时间搏动率相比, $P < 0.01$, 进一步说明, 搏动率的降低是由药物引起, 而且160 μmol L⁻¹较32 μmol L⁻¹搏动率降低得更明显(Tab 1)。

对CaCl₂及Iso加快细胞搏动频率的抑制作用 总数32瓶, 实验分4组: CaCl₂组, CaCl₂+Nic组, Iso组, Iso+Nic组。在这四组中, 每组8瓶细胞, 前两组观察Nic对CaCl₂加速心肌细胞搏动率的抑制作用, 后两组观察Nic对Iso加快心肌细胞搏动率的抑制作用。前两组开始时都加入CaCl₂(20 μL), 使浓度为1 mmol L⁻¹, 可见心肌细胞搏动率明显增加, 10 min时(相当于Tab 2的0 min)作用已相当明显(与用药前相比 $P < 0.01$), 第一组增加了 38 ± 10 bpm, 第二组增加 35 ± 10 bpm。此时第二组加入Nic 64 μmol L⁻¹, 而第一组加入与此等量的培养基做对照, 两组相应时间(用药后5, 10, 15 min)的心肌细胞搏动率变化值做组间比较。后两组开始时都加入Iso 2 μmol L⁻¹, 可见心肌细胞搏动率明显增加, 5 min时作用已相当明显(与用药前相比 $P < 0.01$)。这时第二组加入Nic 64 μmol L⁻¹, 而第一组加入与

Tab 1. Spontaneous beating rates of myocardial cells of cultured neonatal rats after nicorandil. $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs 0 min. n=cell clusters from 8-10 neonatal rats.

Nic/ μmol L ⁻¹	n	Myocardial cell beats per minute					
		0	1	5	10	15	20 min
0	11	96±13	95±13 ^a	96±14 ^a	97±15 ^a	96±13 ^a	96±13 ^a
32	14	102±19	94±19 ^b	82±18 ^c	76±17 ^c	74±17 ^c	73±18 ^c
160	15	105±20	76±21 ^c	52±18 ^c	38±10 ^c	31±3 ^c	29±9 ^c

Tab 2. Effects nicorandil 64 $\mu\text{mol L}^{-1}$ on beating rates (bpm) which has been induced by CaCl_2 1 mmol L^{-1} and isoproterenol 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in the cultured myocardial cells of neonatal rats. $n=8$ cell clusters from 8–10 neonatal rats. $\bar{x}\pm s$. $^aP>0.05$, $^bP<0.01$. (CaCl_2+Nic vs CaCl_2), $^cP>0.05$, $^dP<0.01$ ($\text{Iso}+\text{Nic}$ vs Iso).

		Beating rates/bpm			
		0	5	10	15 min
CaCl_2	83 ± 13	121 ± 10	123 ± 10	126 ± 13	128 ± 15
CaCl_2+Nic	79 ± 10^a	114 ± 10^a	94 ± 8^c	87 ± 7^c	89 ± 7^c
Iso	95 ± 11	130 ± 10	149 ± 12	150 ± 13	145 ± 11
Iso+Nic	93 ± 23^d	143 ± 8^d	127 ± 11^d	119 ± 8^d	114 ± 9^d

Tab 3. Effects of nicorandil on action potentials of cultured myocardial cells of neonatal rats. $n=8$ cell clusters from 8–10 neonatal rats. $\bar{x}\pm s$. $^aP>0.05$, $^bP<0.05$, $^cP<0.01$ vs 0 min.

	Nic $\mu\text{mol L}^{-1}$	Time of medication/min			
		0	5	10	15
MDP/mV	32	53.6 ± 4.0	52.5 ± 3.7^a	51.4 ± 4.0^b	52.3 ± 3.8^a
	160	55.2 ± 5.9	54.0 ± 6.4^a	52.5 ± 6.2^b	52.7 ± 6.1^b
APA/mV	32	62.8 ± 2.4	63.2 ± 3.8^b	62.9 ± 2.9^c	64.2 ± 2.6^b
	160	70.9 ± 5.6	57.1 ± 9.6^c	54.9 ± 9.0^c	54.3 ± 8.4^c
PBO/mV	32	40.7 ± 3.0	38.4 ± 4.4^a	38.6 ± 4.6^a	39.9 ± 2.5^a
	160	41.2 ± 3.0	39.4 ± 3.5^a	39.3 ± 3.6^a	40.3 ± 5.4^a
OS/mV	32	27.6 ± 1.8	24.8 ± 1.5^c	24.1 ± 3.7^c	25.4 ± 2.6^b
	160	29.9 ± 4.1	17.7 ± 9.0^c	14.9 ± 8.5^c	14.0 ± 8.3^c
APD ₅₀ /ms	32	74.1 ± 10.9	44.7 ± 10.6^c	42.0 ± 8.1^c	44.3 ± 9.9^c
	160	83.4 ± 10.7	67.9 ± 12.5^c	65.2 ± 12.1^c	60.4 ± 12.0^c
APD ₉₀ /ms	32	123.6 ± 27.7	96.7 ± 22.2^c	91.5 ± 18^c	93.6 ± 25.0^c
	160	142.1 ± 21.6	129.9 ± 25.5^c	126.2 ± 24.6^c	125.2 ± 20.4^c
$V_{\text{max}}/V s^{-1}$	32	18.0 ± 2.4	15.1 ± 2.1^b	13.3 ± 1.7^c	15.5 ± 1.5^b
	160	20.2 ± 4.3	12.2 ± 3.3^c	10.3 ± 3.1^c	11.0 ± 4.1^c
SCL/ms	32	545.8 ± 136.4	600.1 ± 137.5^c	621.1 ± 136.1^c	634.1 ± 139.2^c
	160	608.9 ± 114.1	728.7 ± 135.4^c	775.0 ± 140.8^c	791.4 ± 135.1^c

此等量的培养基做对照, 两组相应时间的心肌细胞搏动率变化值做组间比较, 结果见 Tab 2. 由此表可以看出, 单用 CaCl_2 的第一组加入培养基后, 已增高的心肌细胞搏动率变化不大, 而第二组先 CaCl_2 再加入 Nic 后, 已增高的心肌细胞搏动率明显下降, 两组心肌细胞搏动率变化值比较 5, 10, 15 min 时, $P<0.01$, 说明 Nic 对 CaCl_2 增加的心肌细胞搏率有抑制作用. 单用 Iso 的第三组加入培养基后, 已增高的心肌细胞搏动率未见下降, 第四组用 Iso 后再加入 Nic, 已增高的心肌细胞搏动率明显下降, 两组心肌细胞搏动率变化值比较 5, 10, 15

min 时 $P<0.01$, 说明 Nic 对 ISO 加快的心肌细胞搏动率有抑制作用.

对 AP 的影响 加入 Nic 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 后, AP 各项参数变化明显, 尤以动作电位幅度 (APA), 超射 (OS), 最大上升速度 (V_{max}) 以及 AP 复极 50%, 90% 的时间 (APD₅₀, APD₉₀), SCL 为显著, 但最大舒张电位 (MDP) 未见明显变化. Nic 32 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 组给药后 5 min 作用已相当明显, 其中 APA 与 V_{max} 下降 (与用药前相比 $P<0.01$), APD₅₀ 与 APD₉₀ 明显缩短 ($P<0.01$), SCL 延长 ($P<0.01$), 10 min 时各参数变化得更明显. Nic 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 组, 各参

数进一步变化,且在用药后15 min内,上述参数未见明显恢复。对照组加入等量培养基,各参数未见明显变化。

DISCUSSION

本实验的结果表明, Nic 使心肌细胞搏动率明显下降,且随剂量加入,作用增强,这与本文观察到的 Nic 使 SCL 明显延长的结果相一致。

Nic 对 CaCl_2 及 ISO 增加的心肌细胞搏动率的抑制作用,提示 Nic 可能抑制 Ca^{2+} 内流,至于 Nic 是作用于受体,还是直接作用于离子通道尚需进一步研究。

本实验记录到的心肌细胞 AP, APA 和 V_{\max} 的值符合慢反应 AP 的特点,据文献^(6,7),此期间 AP 的形成主要是慢钙内流和慢钠内流所致。Nic 对 APA 及 V_{\max} 的抑制,说明其对 Ca^{2+} 内流有明显的抑制作用, APD_{50} , APD_{90} 的明显缩短也支持这一观点。原则上,心肌细胞 AP 的复极相主要决定于 Ca^{2+} , K^+ 两种离子流⁽⁸⁾,抑制 Ca^{2+} 内流,加速 K^+ 外流均能使 APD 缩短,因此 APD 的缩短也提示 Nic 可能有加速 K^+ 外流的作用。有人认为 Nic 如 BRL34915 一样是一种钾通道开放剂⁽⁹⁾,其具体作用机制尚有等待于进一步研究。Nic 对心肌细胞的直接作用可能参与了其整体抗心律失常的机制。

REFERENCES

- 1 Uchida Y, Yoshimoto N, Murao S. Effect of 2-nicotinamideethyl nitrate (SG75) on coronary circulation. *Jpn Heart J* 1978; **19**: 112-24.
- 2 Thormann J, Schlepper M, Kramer W, Gottwik M, Kindler M. Effectiveness of Nicorandil (SG-75), a new long-acting drug with nitroglycerin effects, in patients with coronary artery disease: improved left ventricular function and regional wall motion and abolition of pacing-induced angina. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; **5**: 371-7.
- 3 Dai SW, Xu JF. Nicorandil — a new anti-anginal drug. *New Drugs Chn Remedies* 1985; **4**: 226-7 & 201.
- 4 Zhao DH, Fang KQ, Sheng BH. Antiarrhythmic effects of nicorandil. *Acta Pharm Sin* 1987; **22**: 250-3.
- 5 Jin Y, Wang WX. Effects of disodium cromproxate on spontaneous beating and action potentials of cultured myocardial cells of neonatal rats. *Acta Pharmacol Sin* 1990; **11**: 156-8.
- 6 Lehmkuhl D, Sperelakis N. Transmembrane potentials of trypsin-dispersed chick heart cells cultured *in vitro*. *Am J Physiol* 1963; **205**: 1213-20.
- 7 Hasin Ym Barry WH. Comparison of simultaneous electrophysiologic and mechanical effects of verapamil and nifedipine in cultured chick embryo ventricular cells. *J Mol Cell Cardiol* 1987; **19**: 853-63.
- 8 Beeler GW, Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. *J Physiol (Lond)* 1977; **268**: 177-210.
- 9 Goranda K, Satoh K, Taira N. Is the cardiovascular profile of BRL 34915 characteristic of potassium channel activators? *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; **12**: 239-46.