

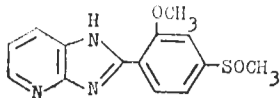
硫马唑与哇巴因对培养心肌细胞毒性的比较

刘建军¹、杨友才、顾科民、谭世杰 (第二军医大学训练部药理教研室, 上海 201903)

提要 用原代培养心肌细胞, 比较 Sul 与 Oua 对细胞毒性作用。Oua 1 mmol/L 引起明显细胞损伤, 随 Ca^{2+} 浓度增加损伤加大, Sul(0.01, 0.1, 1 mmol/L) 不引起细胞损伤, 还能保护细胞免遭高 Ca^{2+} 引起的损伤, 但在无 Ca^{2+} 时却可引起损伤。在缺氧缺糖时, Sul 不额外增加损伤。提示 Sul 可能是低细胞毒性强心药。

关键词 硫马唑; 哇巴因; 乳酸脱氢酶; 培养的心肌细胞; 氯化钙; 缺氧症

硫马唑(sulmazole, Sul, AR-L 115-BS)⁽¹⁾ 是一种新型强心药, 它既不属于儿茶酚胺类, 也不属于强心甙类⁽²⁾。与咖啡因类似, Sul 可诱发心肌肌质网释放 Ca^{2+} , 并能抑制 Ca^{2+} 的再摄取⁽²⁾。Sul 还可明显降低羊心 Purkinje 纤维动作电位坪台-20 mV, 并使动作电位时间缩短至 180 ms⁽³⁾。对 Sul 的强心作用已报道不少^(3,4,5), 但对其毒性作用却研究较少。本文利用原代培养心肌细胞作为模型, 研究 Sul 在正常 Ca^{2+} 浓度, 不同 Ca^{2+} 浓度和缺氧缺糖状态下对培养心肌细胞乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 释放量的影响, 并与哇巴因(ouabain, Oua)作比较。



Sulmazole

材料和方法

心肌细胞培养⁽⁶⁾ 出生 2-3 d 的 Sprague-Dawley 大鼠, 取心脏, 剪成约 1 mm³ 的小块, 用不含 Ca^{2+} , Mg^{2+} 的 0.1% 胰蛋白酶(Difco,

1:250)溶液消化 5 次, 离心(128 × g)收集单细胞, 加含 10% 小牛血清(中国科学院上海生化所监制, 浙江金华卫校出产)的 Eagle's 培养基(MEM, 日本製薬株式会社), 置 37°C 贴壁分离⁽⁷⁾2 h。然后计数, 分装接种于 25 ml 培养瓶或 15 × 150 mm 的试管中, 约计 10⁶ 个细胞/ml。37°C 培养, 2 d 换一次培养基, pH 7.2(精密 pH 试纸和酚红)。培养 4 d 后用于药物试验。

含药物溶液配制 实验前 1 h, 将 Sul⁽¹⁾ 按不同浓度分别溶于含有 CaCl_2 各种浓度(0, 1.35, 2.7, 4.05, 5.4 mmol/L)的平衡盐溶液(NaCl 118.0; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.8; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.8; NaHCO_3 26.2; KCl 5.4; 葡萄糖 5.6 mmol/L)。无混浊沉淀现象。Oua (Merck) 也按上法配制。

LDH 活性测定⁽⁸⁾ 细胞培养 4 d, 将培养液倒掉, 用含有 CaCl_2 2.7 mmol/L 的平衡盐溶液冲洗两遍(无 Ca^{2+} 组用无 Ca^{2+} 液冲洗), 将含 Sul 和 Oua 的溶液分别加入各组。按照等效应的原则选择 Sul 和 Oua 的浓度^(4,5), Sul 和 Oua 浓度都分别为 0.01, 0.1 和 1 mmol/L, CaCl_2 浓度因各组的需要而不同。pH 7.2, 置 37°C 培养预定时间后, 取培养液, 利用 721 分光光度计测光密度, 然后在预先制作的 LDH 测定标准曲线上查到相应的 LDH 单位, 以 LDH 单位/ml 为标准计量单位。重复实验 3 次。

缺氧缺糖培养心肌细胞⁽⁹⁾ 将不含糖的 Eagle's 培养基(不加血清)预先用 95% N_2 + 5% CO_2 饱和 30 min, Po_2 4 kPa (30 mm Hg), pH 7.2。实验时换入这种缺氧缺糖的培养基, 培养瓶内立即充入 95% N_2 + 5% CO_2 历 30 s,

1986年9月22日收稿 1987年6月24日接受

¹1983 年级研究生

塞紧瓶塞,对照组用 Eagle's 培养基(含糖)不充上述气体。

结 果

量-效关系 从图 1 中可以看出,在给药 2, 4, 12 h 后,与对照组相比, Sul 0.01, 0.1 和 1 mmol/L 均不引起 LDH 释放增加; Oua 0.01 和 0.1 mmol/L 也不引起 LDH 释放增加。然而 Oua 1 mmol/L 却非常明显地引起 LDH 释放增加。

细胞外 Ca^{2+} 浓度对 Sul 和 Oua 作用的影响 用 $CaCl_2$ 0, 1.35, 2.7, 4.05 和 5.4 mmol/L 分别与 Sul 和 Oua 各 1 mmol/L 作用, 观察 Ca^{2+} 是否对这些药物的毒性有影响。图 2 可以看出,在给药 4 h 后,与对照组相比, Sul 在细胞外无 Ca^{2+} 时,引起非常明显的 LDH 释放,随着 $CaCl_2$ 浓度增加到正常水平(2.7 mmol/L), LDH 降回到与对照组几乎相同水平。而当 $CaCl_2$ 浓度增加到 4.05-5.4 mmol/L 时,对照组 LDH 释放大增加,而 Sul 组却增加不明显,与对照组比相差非常显著($p < 0.01$)。而 Oua 在不同细胞外 Ca^{2+} 浓度下对细胞的作用却不一样,随着 $CaCl_2$ 浓度增加, LDH 释放增加, $CaCl_2$ 2.7 mmol/L 浓度以后逐渐平缓,不再增加。

Sul 在心肌缺氧缺糖时对心肌细胞 LDH 释

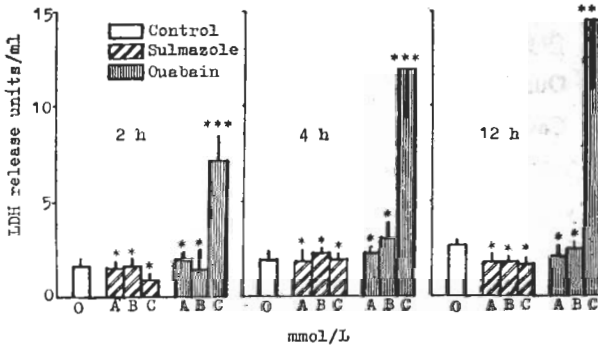


Fig 1. LDH release from primary cultures of rat myocardial cells after exposure to sulmazole and ouabain in the presence of $CaCl_2$ 2.7 mmol/L for 2, 4, and 12 h. A 0.01, B 0.1, C 1 mmol/L. $n = 5$, $\bar{x} \pm SD$, * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

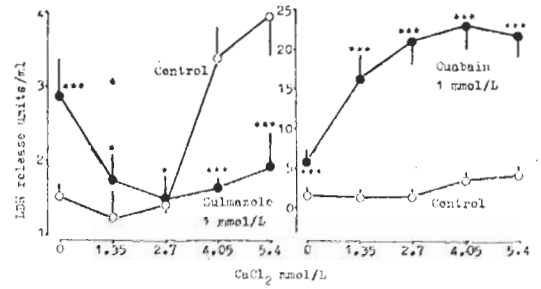


Fig 2. LDH release from primary cultures of myocardial cells after exposure to 1 mmol/L sulmazole and ouabain at concentrations of 0, 1.35, 2.7, 4.05 and 5.4 mmol/L $CaCl_2$ for 4 h. $n = 5$, $\bar{x} \pm SD$, * $p > 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

放的影响 给药 4 h 后,测得 LDH 单位/ml 分别为:正常对照组 1.47 ± 0.26 , 缺氧缺糖对照组 4.82 ± 0.51 , 缺氧缺糖给 Sul 0.01 mmol/L 组 3.57 ± 0.40 , 0.1 mmol/L 组 4.26 ± 0.34 , 1 mmol/L 组 4.57 ± 0.55 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SD$)。方差分析,缺氧缺糖对照组与缺氧缺糖各给药组无显著差异。

讨 论

从结果可看出, Oua 引起的细胞损伤与 Ca^{2+} 有关系, Ca^{2+} 浓度增加,损伤加大。Sul 在正常 Ca^{2+} 浓度时,不引起细胞损伤。而在无 Ca^{2+} 时却引起损伤。说明其损伤机理不是由于细胞外 Ca^{2+} 内流所致。Sul 的强心机理不是引起细胞外 Ca^{2+} 内流,而是使肌质网释放 Ca^{2+} 并抑制其重摄取⁽²⁾。心肌细胞损伤可能与磷脂酶 C 有关^(10,11)。正常时该酶无活性,而当细胞外无 Ca^{2+} 时,膜的流动性增加⁽¹²⁾,膜的蛋白成分重取向(reorientation),膜上的磷脂酶 C 也重取向。当 Sul 促使肌质网释放 Ca^{2+} 并抑制其从胞液重摄取入肌质网,细胞内 Ca^{2+} 就会增加,从而激活磷脂酶 C,后者导致膜损伤^(10,11)。结果还表明 Sul 可减少高 Ca^{2+} 引起的损伤,其机理可能是 Sul 降低了细胞外 Ca^{2+} 的内流⁽³⁾(降低了内向流的电荷梯度)。

缺氧缺糖时, Sul 不额外增加细胞损伤,也

可能是由于此药能降低 Ca^{2+} 的内流⁽³⁾。由于 Ca^{2+} 大量内流会耗竭细胞的能量贮存⁽¹³⁾。

由此看来, Sul 可能是低细胞毒性强心药。

致谢 本校药理学系孙常晟教授赠予硫马唑, 本教研室廖锡麟教授学术指导。

参 考 文 献

- 1 Sun CS, Zhang DH, Du DH, Jiang ZY, Liu ST. Synthesis of cardiotoxic agent imidazopyridine. *J Med Coll PLA* 1986; 1 : 285
- 2 Trube G, Trautwein W. Experiments with AR-L 115 BS on skinned cardiac fibers. *Arzneimittelforsch* 1981; 31 : 185
- 3 Achenbach C, Hauswirth O, Roskoth R, Ziskoven R. Effects of AR-L 115 BS on the electrophysiological and contractile properties of sheep cardiac fibres. *Ibid* 1981; 31 : 171
- 4 Diederer W, Kadatz R. Comparative cardiovascular effects of three benzimidazole derivatives, AR-L 57 BS, AR-L 100 BS, and AR-L 115 BS. *Ibid* 1981; 31 : 141
- 5 Zuo Z, Wang SN, Gu KM. Effect of imidazopyridine a new cardiotoxic agent on isolated guinea pig atria. *J Med Coll PLA* 1986; 1 : 291
- 6 Harary I, Farley B. *In vitro* studies of single

- isolated beating heart cells. *Science* 1960; 131 : 1674
- 7 Blondel B, Roijen I, Cheneval JP. Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 1971; 27 : 356
- 8 武汉医学院第二附属医院检验科. 血清乳酸脱氢酶测定. 李其英、徐勉忠、孔祥云主编. 实用临床医学检验. 第1版. 湖北: 湖北人民出版社, 1980 : 341-3
- 9 Acosta D, Puckett M, McMillin R. Ischemic myocardial injury in cultured heart cells: leakage of cytoplasmic enzymes from injured cells. *In Vitro* 1978; 14 : 728
- 10 Langer GA. Control of calcium movement in the myocardium. *Eur Heart J* 1983; 4 (suppl H) : 5
- 11 Hülsmann WC. On the mechanism of the calcium paradox: the release of hydrolytic enzymes. *Ibid* 1983; 4 (Suppl H) : 57
- 12 Livingstone CJ, Schachter D. Calcium modulates the lipid dynamics of rat hepatocyte plasma membranes by direct and indirect mechanism. *Biochemistry* 1980; 19 : 4823
- 13 Fleckenstein A. Calcium antagonism: history and prospects for a multifaceted pharmacodynamic principle. In: Opie LH, ed. *Calcium antagonists and cardiovascular disease*; vol 9. 1st ed. NY: Raven Press, 1984 : 9-28

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Mar, 9 (2) : 129-131

Comparison of cytotoxic effect of sulmazole with ouabain on cultured myocardial cells

LIU Jian-Jun, YANG You-Cai, GU Ke-Min, TAN Shi-Jie

(Department of Pharmacology, The Second Military Medical University, Shanghai 201903)

ABSTRACT Cytotoxic effects of sulmazole (Sul) and ouabain (Oua) were compared in primary cultures of myocardial cells. Lactate dehydrogenase (LDH) release was used as an indicator of cell injury. The results showed that Oua (1 mmol/L) caused severe injury of the cells, which was enhanced by the increased extracellular Ca^{2+} . Sul (0.01, 0.1, and 1 mmol/L) did not cause injury of the cells in the presence of CaCl_2 and rather protected the cells from the

injury caused by high extracellular CaCl_2 , but it caused injury of the cells in the absence of CaCl_2 . In addition, Sul did not cause extra injury in hypoxia and glucose deprivation. The results suggest that Sul is a low cytotoxic cardiotoxic drug.

KEY WORDS sulmazole; ouabain; lactate dehydrogenase; cultured myocardial cells; calcium chloride; anoxia