

# 羟苯氨酮强心作用的生化机理研究

叶益新<sup>\*</sup>, 范礼理<sup>1</sup>, 林 勇<sup>1</sup>, 杨晓然, 乔小英, 陈兰兰

(中国医学科学院, 中国协和医科大学基础医学研究所, 北京 100005;

<sup>1</sup> 药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 目的: 研究羟苯氨酮(oxyphenamone, Oxy)强心作用的生化机理。方法: 采用 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性和 cAMP-PDE 活性, 肌浆网 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性和 cAMP 含量以及心肌肌原纤维 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性等测定法, 研究 Oxy 对它们的影响, 并与 milrinone 和 MCl-154 作比较。结果: Oxy 对 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶和 PDE 无抑制作用, 也不影响心肌 cAMP 含量, 但能显著增强心肌肌原纤维对 Ca<sup>2+</sup>的敏感性, 高浓度时轻度抑制心肌肌浆网 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性。结论: Oxy 的强心作用方式不同于强心苷, β 受体激动剂和 PDE 抑制剂等强心药, 可能为一种新的钙增敏性强心药物。

**关键词** 羟苯氨酮; 钠, 钾-三磷酸腺苷酶; 磷酸二酯酶; 钙-三磷酸腺苷酶; 环-磷酸腺苷; 钙增敏剂

羟苯氨酮(oxyphenamone, Oxy)系中国医学科学院药物研究所合成的新化合物, 经离体、整体和分子水平的实验研究表明有显著的强心和扩血管作用<sup>[1,2]</sup>。为探讨 Oxy 强心作用的生化机理, 本文研究了 Oxy 对 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶、磷酸二酯酶(PDE)、cAMP 含量和肌浆网 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶以及去膜心肌肌原纤维钙敏感性的影响。

## 材 料 和 方 法

**材料** 羟苯氨酮由我院药物研究所合成室提供, 用蒸馏水稍加温制成母液。米利农(milrinone, Mil)由重庆医工所提供, 用少量 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 溶解后用碱液调至 pH 中性备用。毒毛旋花子甙 G(strophanthir G, Str)购自 Sigma 公司, 用 50% ~ 60% 乙醇溶解后用缓冲液稀释配成母液, 乙醇的终浓度不超过 1%。上述母液的浓度均为 10 mmol·L<sup>-1</sup>, 实验前用缓冲液稀释至所需浓度。<sup>3</sup>H-cAMP 购自中国原子能研究所, 比活性为 1028.6 GBq·mmol<sup>-1</sup>。

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶制备及其活性测定<sup>[3]</sup> 用经典方法从猫肾皮质提取纯化得到较纯的 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶制备, 制备的比活性为 30 ~ 40 u·mg<sup>-1</sup>

(蛋白), 占总酶的(90 ~ 95)%, 浓度为 1 mg(蛋白)·ml<sup>-1</sup>。测定酶活性的方法简述如下: 反应液成分(mmol·L<sup>-1</sup>): NaCl 100, MgCl<sub>2</sub> 5, KCl 15, EDTA 0.1 和 Tris-HCl 50, pH 7.4。酶制备约 0.1 mg·ml<sup>-1</sup>, 总体积 1 ml。空白管不加酶制备, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶管加 Str 1 mmol·L<sup>-1</sup>, 总酶管不加 Str, 药物管加不同浓度测试药物。37℃ 保温 10 min 后, 加入 Na<sub>2</sub>ATP 4 mmol·L<sup>-1</sup> 启动反应。10 min 后, 加 15% 三氯醋酸(TCA) 终止反应。各管置冰浴降温 10 min, 离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>, 常温) 10 min 取上清液 1 ml, 按 Bonting 法<sup>[4]</sup> 测释放的无机磷量。酶活性单位为 μmolPi·mg<sup>-1</sup>(蛋白)·h<sup>-1</sup>, 总酶和 Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶的差即为 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性。药物对酶活性的影响按下式计算: %对照值 = 加药管酶活性/无药管酶活性 × 100。

磷酸二酯酶(PDE)的制备及其活性测定 参考文献<sup>[5]</sup>法, 取豚鼠心室肌约 1 g 加 5 倍量缓冲液(mmol·L<sup>-1</sup>: MgCl<sub>2</sub> 5, Tris-HCl 50), 离心(8 000 × g, 4℃) 30 min, 上清液为酶制备, 置 -20℃ 冰箱保存, 用前加缓冲液稀释。

cAMP-PDE(cGMP-PDE)活性测定原理:



用 QAE-Sephadex 柱分离 [<sup>3</sup>H]cAMP(cGMP) 和 [<sup>3</sup>H]腺苷, 测定 [<sup>3</sup>H]腺苷的放射性, 以 [<sup>3</sup>H]cAMP 转化成 [<sup>3</sup>H]腺苷的转化率表示 PDE 活性。药物对

收稿日期: 1998-04-09

基金项目: 国家医药管理局新药研究基金(合同号 90-03); 国家自然科学基金(39170844)

\* Tel: (010) 65296402, Fax: (010) 65240529, E-mail: wanping@hns.cjfh.ac.cn

酶活性的影响的计算同  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶。测定 PDE 酶的方法简述如下: 反应液的成分 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{MgCl}_2$  5,  $\text{Tris-HCl}$  50,  $\text{pH}$  7.4, [ $^3\text{H}$ ] cAMP(cGMP)  $\text{cpm}$  为 80 000 ~ 100 000  $\text{min}^{-1}$ , 一定量酶制备和测试药物, 总体积 250  $\mu\text{l}$ 。空白管加入灭活酶制备或不加酶制备, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 15 min 后, 置沸水 75 s 终止反应。冷却后加入蛇毒 ( $10\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 15  $\mu\text{l}$ , 再温育 10 min (37  $^{\circ}\text{C}$ ), 加腺苷 ( $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 735  $\mu\text{l}$ , 然后将全部液体倒入色谱柱, 用 10 ml 小瓶收集。待液体全部流出后, 加甲酸铵 ( $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 4 ml 洗脱。收集洗脱液于同一小瓶中, 另取 [ $^3\text{H}$ ]cAMP(cGMP) 50  $\mu\text{l}$ , 加腺苷 950  $\mu\text{l}$  和甲酸胺 (浓度均同上) 4 ml, 作为放射活性参比管, 最后从上述小瓶中各取 1 ml 液体至闪烁杯中, 加甲苯 - Triton X100 闪烁液 7 ml, 混合后测放射计数。

心肌 cAMP 含量测定 豚鼠左心房固定于预先通 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  的 32  $^{\circ}\text{C}$  Krebs-Henseleit 液 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ :  $\text{NaCl}$  118,  $\text{KCl}$  4.8,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{MgCl}_2$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  1.4,  $\text{NaHCO}_3$  27.2, 葡萄糖 11.1,  $\text{pH}$  7.45) 的浴槽中, 给予 4 ms, 1 Hz 和 1.5 倍的阈电压场刺激以引发收缩, 前负荷为 1 g, 平衡 1 h 后, 加入  $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  普萘洛尔阻断内源性儿茶酚胺的作用, 待收缩力再度平衡后分别加入相应浓度和体积的  $\text{Oxy}$ ,  $\text{Mil}$  和等体积的蒸馏水, 待收缩力达到最大时, 将心肌标本迅速放入液氮中冷却并保存, 参考文献<sup>[6,7]</sup>提取并测定 cAMP 含量。

心肌肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶制备及其活性测定 参照 Jones 方法<sup>[8]</sup>从犬心室肌提取肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶制备。修改后测定  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性的方法简述如下: 测定  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性 (总酶) 管的反应液成分 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{KCl}$  100,  $\text{MgCl}_2$  5,  $\text{CaCl}_2$  0.05,  $\text{NaN}_3$  5,  $\text{Str}$  0.1 和  $\text{Tris-HCl}$  50,  $\text{pH}$  7.4,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶管反应液成分除无  $\text{Ca}^{2+}$  和加  $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGTA 外, 其他成分同总酶管。酶制备  $0.2\sim 0.4\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 药物管加测试药物, 温育 10 min 后, 加  $\text{Na}_2\text{ATP}$   $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  启动反应。以下步骤同  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶。  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性 =  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性 -  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性。

去膜心肌肌原纤维制备及其  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性测定 参考 Alous 和 Paggi 等<sup>[9,10]</sup>方法制备去膜心肌肌原纤维。给狗 iv 戊巴比妥钠麻醉, 肝素抗凝。开胸, 迅速取出心脏, 用冰冷的 Krebs-Henseleit 液洗 2 ~ 3 次, 取左室游离壁分成数份, 立

即提取或置 -40  $^{\circ}\text{C}$  ~ -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。每次测定取 1 份, 迅速剪成碎块, 加匀浆液 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : 咪唑 25.0,  $\text{KCl}$  60.0) 200 ml, 用高速匀浆器研磨 5 s  $\times$  10 次 ( $1\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ), 再用 Teflon 匀浆器以 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  匀浆 20 次。组织悬液过 120 目筛, 用 A 液 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : 咪唑 25.0,  $\text{KCl}$  60.0,  $\text{MgCl}_2$  2.0) 1:1 稀释,  $12\text{ }000\times\text{g}$  离心 10 min, 共 3 次, 弃去上清液, 沉淀部分置含有 1% Triton X-100 的 A 液 100 ml 中搅拌 20 min,  $3\text{ }000\times\text{g}$  离心 10 min, 用含  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EGTA 的 A 液 100 ml 洗 2 次。沉淀悬浮于 50 ml B 液 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ : 咪唑 25.0,  $\text{KCl}$  60.0,  $\text{MgCl}_2$  1.0), 先后以  $3\text{ }000\times\text{g}$  与  $12\text{ }000\times\text{g}$  各离心 15 min。最后, 用 B 液调节制备的蛋白量至  $4\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  左右。以上各步均在 0 ~ 4  $^{\circ}\text{C}$  下进行,  $\text{pH}$  为 7.0。

去膜心肌肌原纤维  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性测定<sup>[9,10]</sup> 取上述制备用反应液 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ :  $\text{KCl}$  60, 咪唑 30,  $\text{MgCl}_2$  7.5, EGTA 0 ~ 1.0,  $\text{CaCl}_2$  0 ~ 1.5。反应液中的游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度, 采用 Robertson 法的计算机程序<sup>[11]</sup> 配成一系列  $\text{pCa}$  8.00 ~ 5.00 各管 ( $\text{pCa} = -\log \text{Ca}^{2+}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。除空白管外, 各管都加制备约  $0.4\text{ mg(蛋白)}\cdot\text{ml}^{-1}$  和不同浓度测试药物, 总体积 1 ml,  $\text{pH}$  7.0, 30  $^{\circ}\text{C}$  温育 10 min 后, 加  $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{ATP}$  启动, 10 min 后加 1 ml 15% TCA 终止反应。测磷和计算方法同  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶。酶活性单位以  $\text{nmolPi}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{蛋白})\cdot\text{min}^{-1}$  表示。

为观察药物对收缩蛋白“ $\text{Ca}^{2+}$  敏感性”的影响, 比较药物和对照液对  $\text{pCa}$  和  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性间反应曲线的影响, 同时测定  $\text{pCa}$  为 7.0 时, 药物与去膜肌原纤维  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性间的量效和时效关系。

统计 上述实验均用双管测定, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用 t 检验。

## 结 果

### 1 对 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响

$\text{Str}$  对  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶的最低有效浓度为  $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 抑制率为 14.6%,  $\text{IC}_{50}$  为  $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。 $\text{Oxy}$  在正性肌力作用浓度范围 ( $0.1\sim 100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 内, 不抑制  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性, 最低有效浓度为  $300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 抑制率为 21.1%。与  $\text{Str}$  比较, 两者作用强度相差近千倍以上, 显示  $\text{Oxy}$

不影响 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性(图略)。

### 2 对心肌 PDE 的影响

Mil 10 μmol·L<sup>-1</sup> 已显示抑制 cAMP-PDE 的作用, IC<sub>50</sub> 为 85 μmol·L<sup>-1</sup>, 而 Oxy 的浓度高至 100 μmol·L<sup>-1</sup> 才有抑制作用, 抑制率为 21.8%, 300 μmol·L<sup>-1</sup> 的抑制率为 39.9%。两者比较, 作用强度相差近 10 倍。它们对 cGMP-PDE 活性的抑制作用都很弱, Mil 和 Oxy 100 μmol·L<sup>-1</sup> 的抑制率分别为 27.5% 和 26.5%, 300 μmol·L<sup>-1</sup> 的抑制率分别为 50.7% 和 41.0%。两者比较经统计学处理均无差别(图略)。表明 Mil 选择性抑制 cAMP-PDE, 不抑制 cGMP-PDE, 与文献报道一致<sup>[12,13]</sup>。Oxy 对上述两种 PDE 均无抑制作用。

### 3 对心肌细胞内 cAMP 水平的影响

对照组平均 cAMP 含量为 0.64 ± 0.11 pmol·mg<sup>-1</sup>, Mil 30 μmol·L<sup>-1</sup> 的 cAMP 含量为 1.11 ± 0.19 pmol·mg<sup>-1</sup>, 增加 73.3%, 与对照组比较差别非常显著, 表明 Mil 有增加胞内 cAMP 的作用。Oxy 30 和 100 μmol·L<sup>-1</sup> 的 cAMP 含量分别为 (0.68 ± 0.13) 和 (0.60 ± 0.13) pmol·mg<sup>-1</sup>, 与对照组比较差别均不显著, 两个浓度间比较差别也不显著, 表明 Oxy 不影响心肌细胞内 cAMP 含量。

### 4 对心肌肌浆网 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的影响

Oxy 100 μmol·L<sup>-1</sup> 时对心肌的肌浆网 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶的抑制率为 27.7%, IC<sub>50</sub> 为 200 μmol·L<sup>-1</sup>, 提示高浓度 Oxy 对心肌肌浆网 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶有一定的抑制作用。

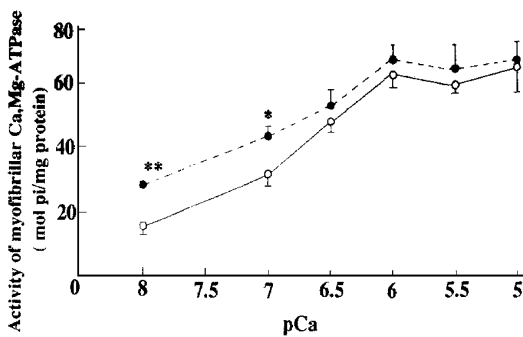


Fig 2 Concentration dependence of the effect of oxyphenamone on the activity of cardiac myofibrillar Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase at pCa 7. \*\* P < 0.01 compared with the control value (0 mol·L<sup>-1</sup>). x̄ ± s, n = 4.

### 5 对心肌肌原纤维 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶的影响

本研究得到的去膜心肌肌原纤维 pCa 和 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性关系曲线与文献<sup>[9,10]</sup>相似。

图 1 显示 Oxy 50 μmol·L<sup>-1</sup> 使肌原纤维 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性和 pCa 曲线明显向左上方移动, 而对最大酶活性的影响不显著。图 2 显示 pCa 为 7 时, Oxy 增强酶活性作用呈浓度依赖关系, EC<sub>50</sub> ≈ 10 μmol·L<sup>-1</sup>。图 3 显示反应液中加入不同浓度 Oxy 后, 温育时间与肌原纤维释放无机磷量 (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性) 的时效曲线, Oxy 3, 10 和 30 μmol·L<sup>-1</sup> 的时效曲线均显著高于对照曲线。以上 3 种实验结果均支持 Oxy 有增强收缩蛋白对 Ca<sup>2+</sup> 敏感性的作用。

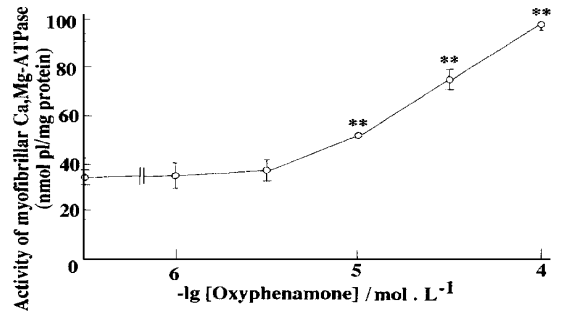


Fig 1 Effect of oxyphenamone at 50 μmol·L<sup>-1</sup> on the relationship between pCa and the cardiac myofibrillar Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity. ○—○ control; ●—● oxyphenamone. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 compared with the corresponding control value. x̄ ± s, n = 4.

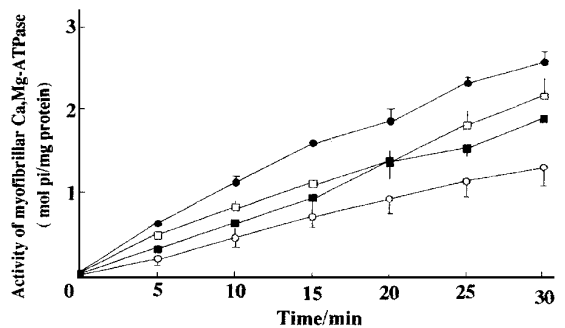


Fig 3 Time course of Pi (inorganic phosphate) liberation by cardiac myofibrils incubated with oxyphenamone 30 μmol·L<sup>-1</sup> (●—●), 10 μmol·L<sup>-1</sup> (□—□), 3 μmol·L<sup>-1</sup> (■—■) at pCa 7. Control (○—○). x̄ ± s, n = 4 ~ 7.

## 讨 论

从豚鼠离体心肌收缩肌力实验结果可见 Oxy 有明显的增强心肌收缩力的作用, 其最高效应为给

药前的 3 倍,有效浓度为  $1 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。当前常用的强心药物有强心苷、 $\beta$  受体激动剂和磷酸二酯酶(PDE)抑制剂等,它们的化学结构和强心作用途径各不相同,但最终都是通过提高心肌细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,增强肌原纤维收缩而加强肌力。 $\text{Oxy}$  系新化合物,它增强心肌收缩力,但不增加心率,其强心作用机理是否与上述药物不同?为此,我们系统研究了  $\text{Oxy}$  强心的生化药理作用并与 Str 和 Mil 等药物作了比较。

抑制  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶是强心苷正性肌力的主要机制。我们用经典方法从肾皮质提取得到的较纯的  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶制备,有酶比活性高、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶占总酶比例高,和一次提取收获量大等优点,而其性质与心肌  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶相同。所以,很多实验室用这种酶制备来研究强心药物。Str 是该酶的特异性抑制剂,为一种常用的研究该类药物的工具药。本文结果显示 Str 的  $\text{IC}_{50}$  为  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与文献报道相符。 $\text{Oxy}$  的浓度高至  $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的抑制率只有 21%,此浓度已超过其强心作用的浓度范围。因此,可认为  $\text{Oxy}$  的强心作用方式与 Str 等强心苷不同。

PDE 抑制剂的种类很多,心肌的 PDE 又可分为 3 型。多数 PDE 抑制剂如 Mil 等均选择性作用第 3 型即依赖 cAMP 型(简写 cAMP-PDE),对 cGMP-PDE 型无抑制作用。文献采用纯化 PDE 制备和粗制备。前者纯化方法复杂,作者采用后者,即以同位素 [ $^3\text{H}$ ]cAMP 和 [ $^3\text{H}$ ]cGMP 为底物分别测定 cAMP-PDE 和 cGMP-PDE 活性,此方法简便易行,结果显示 Mil 抑制 cAMP-PDE 的  $\text{IC}_{50} = 85 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,介于文献用粗酶 ( $\text{IC}_{50} = 114 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[12]</sup>和纯酶 ( $\text{IC}_{50} = 45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[13]</sup>之间,对 cGMP-PDE 无显著抑制作用,与文献报道相符。 $\text{Oxy}$  不抑制上述两种 PDE 的结果表明, $\text{Oxy}$  的强心方式不同于 PDE 抑制剂。

增强腺苷酸环化酶活性和抑制 PDE 活性的药物如  $\beta$  激动剂和 PDE 抑制剂均能增加 cAMP 含量。本研究结果显示  $\text{Oxy}$  不影响心肌 cAMP 含量,其强心作用似与 cAMP 的变化无关,再次表明  $\text{Oxy}$  既非  $\beta$  受体激动剂又不是 PDE 抑制剂。

高浓度  $\text{Oxy}$  对心肌肌浆网的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶有轻度抑制作用,我们也发现  $\text{Oxy}$  ( $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 使心肌收缩静息后增强效应提高近 15%(另文资料),可推理高浓度  $\text{Oxy}$  能轻度抑制心肌肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  再摄取和增加心肌肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  的释放。

钙增敏剂是近年来研究强心药的热点,肌原纤维去膜  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性测定是研究该类药物的“钙增敏性”的一种常用方法。Solaro 等证明,药物如能使肌原纤维  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性增高,使酶活性-pCa 曲线向左上方移动,便认为该药物有钙增敏性<sup>[14,15]</sup>。本文  $\text{Oxy}$  的结果与上述特性完全相符。作者同时比较了  $\text{Oxy}$  的几个衍生物, Mil 和已知的“钙增敏剂”MCF-154,发现有强心作用的  $\text{Oxy}$  化合物均有增敏作用而无强心作用的  $\text{Oxy}$  化合物均无钙增敏作用; $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  MCF-154 使曲线向左向上移动,结果与文献一致; $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Mil 不影响反应曲线甚至比对照组曲线还低(另文资料)。这些结果均支持  $\text{Oxy}$  的强心作用与“钙增敏”作用相关。

综上所述,可以认为  $\text{Oxy}$  是一种非强心苷、非  $\beta$  受体激动剂和非 PDE 抑制剂的强心药,其增强心肌收缩蛋白系统对钙离子的敏感性可能是其主要的强心作用机理。高浓度时,可能有抑制心肌肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  重吸收和增加心肌肌浆网  $\text{Ca}^{2+}$  释放的机理参与,值得进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 范礼理,孙丽红,李娟. 强心扩血管药羟苯氨酮对大鼠、猫和狗心脏血流动力学的影响. 药理学报, 1997, 32: 744
- 2 范礼理,孙丽红,林勇. 强心扩血管药羟苯氨酮对离体心肌与血管的作用. 药理学报, 1997, 32: 808
- 3 叶益新,汪钟. 钠、钾-三磷酸腺苷酶活性测定. 见:徐叔云,卞如镰,陈修,主编. 药理实验方法学. 第二版. 北京:人民卫生出版社, 1991, 499 ~ 451
- 4 Bonting SL, Simon KA, Hawkins NM. Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. 1. Quantitative distribution of several tissues of the cat. *Arch Biochem Biophys*, 1961, 95: 416
- 5 刘景生,吴亭,李越明. 黄芪对小鼠肝脾细胞环磷酸腺苷磷酸二酯酶活性的影响. 中国医学科学院学报. 1982, 4: 248
- 6 Stemen P, Akera T, Brody TM, et al. 13-Propylberberine reduces response of guinea pig myocardium to inotropic intervention including changes in extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . *Life Sci*, 1986, 39: 1
- 7 刘景生,王新京,曾湘萍,等. 环核苷酸测定法. 见:徐叔云,卞如镰,陈修,主编. 药理实验方法学. 第二版. 北京:人民卫生出版社, 1991, 415 ~ 420
- 8 Jones LR, Besch HR, Jr, Fleming JW, et al. Separation of vesicles of cardiac sarcoplasm from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum comparative biochemical analysis of component activities. *J Biol Chem*, 1979, 254: 530
- 9 Alous AA, Grant AM, Allen PD, et al. Effects of milrinone on  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of myofibrillar Mg-adenosine triphosphatase isolated from normal human and

- canine hearts. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988, **246**: 30
- 10 Pagani ED, Solaro RJ. Methods for measuring functional properties of sarcoplasmic reticulum and myofibrils in small samples of myocardium. In: Schwartz A, ed. *Methods in Pharmacology*. Vol 5. New York: Plenum Publishing Corp, 1984, 49 ~ 61
- 11 叶益新, 庚以津, 董碧莎, 等. 一种简便准确的计算反应液中游离钙离子浓度的计算机程序. 中国医学科学院学报, 1995, **17**: 145
- 12 Schoiz H, Meyer W. Phosphodiesterase inhibiting properties of newer inotropic agents. *Circulation*, 1986, **73**(Suppl III): 111
- 13 Ahn HS, Eardey D, Watkins R, et al. Effects of several newer cardiotonic drugs on cardiac cyclic AMP metabolism. *Biochem Pharmacol*, 1986, **35**: 1113
- 14 Solaro RJ, Ruegg JC. Stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  binding and ATPase activity of dog cardiac myofibrils by AL-L15BS, a novel cardiotonic agent. *Circ Res*, 1982, **51**: 290
- 15 Kitada Y, Kobayashi M, Narimatsu A, et al. Potent stimulation of myofilament force and adenosine triphosphatase activity of canine cardiac muscle through a direct enhancement of troponin C  $\text{Ca}^{2+}$  binding by MCF-154, a novel cardiotonic agent. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987, **250**: 272

## BIOCHEMICAL MECHANISM OF THE POSITIVE INOTROPIC EFFECT OF OXYPHENAMONE

Ye Yixin( Ye YX ), Fan Lili( Fan LL)<sup>1</sup>, Lin Yong( Lin Y)<sup>1</sup>, Yang Xiaoran( Yang XR ),  
Qiao Xiaoying( Qiao XY) and Chen Lanlan( Chen LL)

( Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005; <sup>1</sup>Institute of Materia Medica Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050)

**ABSTRACT** **AIM:** To investigate the biochemical mechanisms of the positive inotropic effect of oxyphenamone ( Oxy ). **METHODS:** The assays of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity, cAMP dependent phosphodiesterase (cAMP-PDE) activity and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity in sarcoplasmic reticulum (SR) isolated from cardiac muscle, cAMP level in cardiac muscle and the cardiac myofibrillar  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity were adopted and compared with those of strophanthin G (Str) and milrinone (Mil). **RESULTS:** Oxy at its effective concentration, showed no remarkable inhibition on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and cAMP dependent phosphodiesterase (cAMP-PDE) activities, while in parallel experiments  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and cAMP-PDE activities were significantly inhibited by Str and Mil. Their  $\text{IC}_{50}$  values were found to be  $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , and  $85 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. Oxy did not affect the cAMP level in cardiac muscle of guinea pig. However, Mil at  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  in control experiments increased the cAMP level by 73.6%. These results suggest that the mechanism of the positive inotropic effect of Oxy differs from that of glycosides, PDE inhibitors and  $\beta$ -adrenergic agonists. Oxy at  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  inhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity significantly in cardiac sarcoplasmic reticulum. Its  $\text{IC}_{50}$  value was  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . The result suggests that Oxy at high concentration exerts inhibitory effect on the  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by SR. This mechanism may be partly responsible for the positive inotropic effect of Oxy. Oxy at  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  shifted the relationship curve between  $\text{pCa}^{2+}$  and myofibrillar  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity to the left without affecting the maximum enzyme activity. When  $\text{pCa} 7$ , Oxy increased the myofibrillar  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in a concentration dependent manner and  $\text{EC}_{50}$  value was about  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . MCF-154 at  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and some new derivatives of Oxy with positive inotropic effect enhanced the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity. Mil at  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and some new derivatives of Oxy with no positive inotropic effect showed no effect at all. Solaro and Kitada found a positive correlation between the increase of myofibrillar  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity and the enhancement of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the contractile protein system. **CONCLUSION:** These results demonstrate that the biochemical mechanism of the positive inotropic effect of Oxy is different from these of the cardiac glycosides, PDE inhibitors and  $\beta$ -adrenergic agonists, therefore, it may be a novel cardiotonic agent, a calcium sensitizer.

**KEY WORDS** oxyphenamone;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase; phosphodiesterase;  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase; cAMP; calcium sensitizers