

前胡丙素对培养乳鼠心肌细胞自发性收缩及动作电位的影响

王洪新* 陶亮 饶曼人

(南京医科大学心血管药理研究室,南京 210029)

摘要 用倒置显微镜闭路电视系统及细胞内标准微电极法,记录培养心肌细胞的自发性收缩及动作电位,结果发现:应用 Pra-C 5 min 后,心肌细胞收缩频率及细胞边缘运动的速度同时下降。Pra-C 10, 30 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以剂量依赖性的方式抑制心肌细胞的收缩速度,分别抑制 24%, 43% 和 50%。Pra-C (10 和 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 显示了抑制心肌细胞收缩频率的作用,分别抑制 13% 和 19%。Nif 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别缩短 APD₅₀ 和 APD₉₀ 14% 及 17%, 但同样浓度的 verapamil 则抑制 APA 27%, 缩短 APD₅₀ 8%, 分别延长 APD₉₀ 及 SCL 10% 和 43%。Pra-C 10, 30 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缩短 APD₅₀ 7%, 14% 和 18%。Pra-C 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 有抑制 APA 及延长 SCL 的作用。结果提示, Pra-C 对心肌细胞收缩及动作电位的作用可能与其阻滞 Ca^{2+} 通道有关。

关键词 香豆素; 细胞培养; 心肌; 钙; 动作电位

前胡丙素 (praeruptorin C, Pra-C) 是从白花前胡中提取的一种化学成分^[1], 本室研究发现它能有效地抑制钙及钾诱导的离体家兔主动脉条的收缩; 对离体血管和心肌收缩力有抑制作用, 并认为与拮抗细胞外钙内流有关^[2]; 它能抑制离体豚鼠心房的自律性及 CaCl_2 诱导的正性频率作用, 改善肥厚心肌病患者的心肌顺应性^[3]; 它同 nifedipine (Nif) 一样对离体工作心脏的缺血再灌注损伤有保护作用^[4]。但有关 Pra-C 对心肌细胞的直接作用尚未见报道。由于整体器官构成较复杂, 如神经、体液、血管等的影响, 难以单独判定药物对心肌的真正作用机制。为了更精确地测定 Pra-C 对心肌细胞收缩力及电生理特性的影响, 本研究用培养乳鼠的心肌细胞作为模型, 同时以 Nif 及 verapamil (Ver) 为阳性对照药, 观察 Pra-C 对心肌细胞自发性收缩及动作电位的作用。

材 料 和 方 法

心肌细胞培养 无菌条件下, 取生后 2~4 d Sprague-Dawley (SD) 大鼠心室放于 Hank's 液中剪碎, 用 0.06% 的胰酶在磁力搅拌下分散细胞, 温度控制在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$, 每 10 min 收集一次细胞, 离心 2 次后将所得的全部细胞置于含 10% 胎牛血清及 90% 的 DMEM 培养基的 100 ml 培养瓶中, 置于 5% CO_2 孵箱中培养 60~90 min, 根据心肌细胞及非心肌细胞贴壁的速度不同, 加以区别^[5]。在上述放置时间内, 非心肌细胞贴壁的速度较快, 首先附在瓶底, 而心肌细胞仍存在细胞悬液中。将 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞悬液接种于 35 mm 内含一盖玻片培养皿中。盖玻片实验前用鼠尾胶原附盖, 使心肌细胞在盖玻片上生长, 以便灌流。培养基组成如下: 15% 胎牛血

本文于 1995 年 1 月 16 日收到。

* 现在锦州医学院药理教研室, 锦州 12100

清,75% DMEM 培养基,0.1%青霉素及0.1%链霉素,另加 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ bromodeoxyuridine防止余下的少量非心肌细胞的增殖^[6]。培养3~5 d后,心肌细胞自发性收缩良好,开始实验。

浴槽灌流的实验装置 小型实验浴槽用双层有机玻璃制成,夹层中通以恒温水,用501型超级恒流泵维持灌流;浴槽底部为透明塑料,置于倒置显微镜的平台上。浴槽内的灌流液采用以5% CO_2 -95%空气平衡并恒温至37℃的 HEPES 缓冲液,其组成如下($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): NaCl 135.7; KCl 5.4; KH_2PO_4 0.44; Na_2HPO_4 0.34; CaCl_2 1.3; MgSO_4 0.81; Glucose 5.6; HEPES 10; pH 7.3。用 HL-2型恒流泵控制流速。控制流速为 $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

心肌细胞自发性收缩测定 心肌细胞经倒置显微镜放大后,由摄相机(HD,9201C)摄相,图像监视仪(PANDA TV,南京)显示,用计算机 MICC 软件进行图像的检测及数据的储存。心肌细胞的收缩的强弱是通过测定细胞边缘位移的幅度及速度判断。由于摄相机能在每隔一定的时间(40 ms)摄相一次,计算机并能给以储存,这样我们能用计算机测出心肌细胞边缘移动的位置,进而可以计算出心肌细胞收缩的速度。具体操作如下:将各种浓度的 Pra-C 加入灌流液中,在给药前及给药后的指定时间,测定心肌细胞收缩的速度。同时在倒置显微镜下或在图像监测仪上选择搏动规则的细胞簇,在给药前后指定的时间记数心肌细胞收缩的频率。

心肌细胞自发性动作电位的测定 用细胞标准微电极方法记录细胞内动作电位。玻璃微电极用微电极拉制器(Narishige,日本)拉制,内充以 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl 溶液,其直流阻抗为15~50 M Ω 。微电极由三维液压微电极操纵器推进,所记录到的电位通过膜片钳放大器(CEZ-2200)放大后,输出至 SBR-1型示波器,动作电位图型用示波器照像机拍摄记录。通常在电位引出后灌流20 min 并采用累积给药的方法记录动作电位。本实验所选取的动作电位要求如下:1 有超射;2 动作电位幅度 $>55 \text{ mV}$;3 在20 min 内动作电位保持稳定。动作电位观测的指标有:1 动作电位幅度(APA);2 动作电位复极50%所需的时间(APD_{50});3 动作电位复极90%所需的时间(APD_{90});4 最大舒张电压(MDP);5 窦性周长(SCL)。

药品 Ver 及 Nif 为粉剂(Sigma),溶于二甲基亚砜(DMSO);Pra-C 由江苏中医药研究所提供,用聚乙二醇400溶解,溶剂对照实验,微量 DMSO 及聚乙二醇(小于2%)对细胞无明显作用。其它试剂均为分析纯。

结 果

Pra-C 对心肌细胞收缩速度的影响

图1显示了 Pra-C 对心肌细胞收缩速度的时间效应曲线和浓度效应曲线。由图1可知,Pra-C $30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 在给药后1 min,心肌细胞的收缩速度明显降低,与给药前相比,抑制了33%,在给药后5,10,15 min 分别抑制了45%,49%和49%,由此可见,在给药后5 min 作用已十分明显。Pra-C $10 \sim 100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 在给药后5 min 依浓度抑制心肌细胞的收缩,与对照组相比,Pra-C 10,30,100 $\text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制收缩速度分别为24%,43%和51%。Pra-C 对心肌细胞收缩的抑制作用,经正常 HEPES 缓冲液灌流冲洗15 min 后完全恢复。

Pra-C 对心肌细胞收缩频率的影响

图2显示了 Pra-C 对正常的心肌细胞搏动频率的浓度效应曲线,可以看出,Pra-C $10 \sim 100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 依浓度抑制心肌细胞的搏动频率。在给药后5 min,与对照组相比,Pra-C 30,100 $\text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制收缩频率分别为13%和19%。

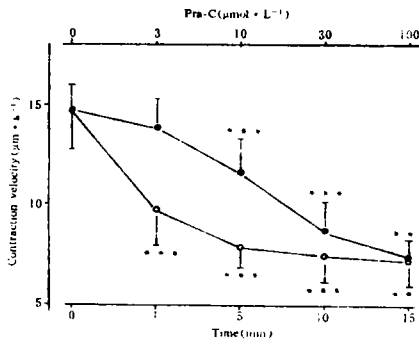


Fig 1 Effects of Pra-C ($3\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on spontaneous contraction velocity ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) in cultured neonatal rat heart cells. (○) Showing time course for effect of Pra-C ($30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on spontaneous contraction velocity; (●) showing Pra-C dose-response characteristics. $n=8$, $\bar{x}\pm s$, $***P<0.01$ vs control.

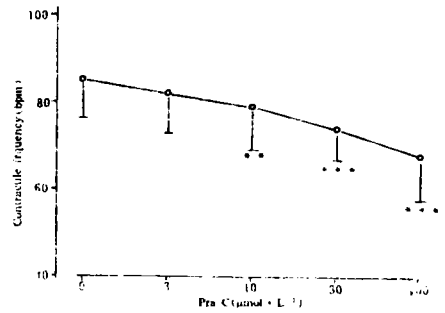


Fig 2 Effects of Pra-C ($3\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on spontaneous contractile frequency (bpm) in cultured neonatal rat heart cells. $n=8$, $\bar{x}\pm s$. $**P<0.05$, $***P<0.01$ vs control.

Nif 及 Ver 对心肌细胞自发性动作电位的影响

由表1可见,在给药后5 min, Nif $3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 APA 无明显影响,但同样浓度 Ver 则明显抑制 APA,与用药前相比,抑制了27%;Nif 及 Ver 同样浓度对 APD_{50} 均有明显的缩短的作用,分别缩短了14%和8%;但对 APD_{90} 而言,Nif 缩短 APD_{90} 17%,而同样浓度 Ver 则对 APD_{90} 有延长的作用,延长了43%。Nif 及 Ver 在所用的浓度下对 MDP 无明显影响。

Tab 1 Effects of verapamil and nifedipine on the action potentials of cultured myocardial cells of neonatal rats ($n=6$, $\bar{x}\pm s$), $**P<0.05$, $***P<0.01$ vs $0\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

	Verapamil ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)		Nifedipine ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	
	0	3	0	3
MDP (mV)	50.7 ± 1.2	51.2 ± 1.6	52.3 ± 1.8	51.8 ± 1.5
APA (mV)	68.2 ± 1.8	$49.8\pm 2.3^{***}$	67.6 ± 2.0	67.2 ± 1.4
APD_{50} (ms)	76.5 ± 2.5	$70.2\pm 4.0^{**}$	75.1 ± 3.7	$64.4\pm 3.4^{***}$
APD_{90} (ms)	162.0 ± 3.1	$177.5\pm 9.4^{***}$	154.7 ± 4.2	$128.8\pm 10.5^{***}$
SCL (ms)	561.9 ± 41.5	$803.9\pm 85.9^{***}$	570.3 ± 45.7	577.2 ± 38.5

Pra-C 对心肌细胞自发性动作电位的影响

由表2及图3可见,在给药后5 min, Pra-C $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 APA 无明显影响,但30, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可明显抑制 APA,与用药前相比,抑制了3%及6%;Pra-C $10\sim 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 APD_{50} 有明显的缩短的作用,分别缩短7%,14%和18%。Pra-C 10,30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 APD_{90} 也有缩短作用,与给药前相比,缩短16%和10%。Pra-C 30,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 SCL 有延长作用,与对照组相比,分别延长了16%和45%,Pra-C 在所用的浓度范围内对 MDP 无明显的影响。

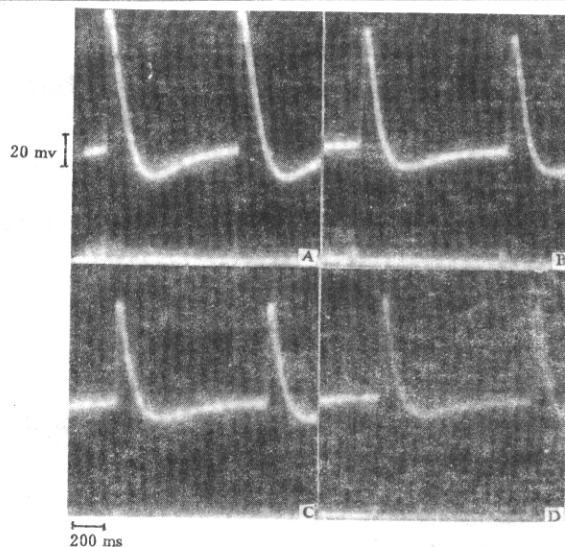


Fig 3 Effects of Pra-C on the action potentials of cultured myocardial cells of neonatal rats. A typical result from six different myocardial cells. A; 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B; 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; C; 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; D; 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tab 2 Effects of Pra-C on the action potentials of cultured myocardial cells of neonatal rats ($n=6$, $\bar{x}\pm s$), ** $P<0.05$, *** $P<0.01$ vs 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

	Pra-C ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)			
	0	10	30	100
MDP (mV)	51.0 \pm 1.5	50.6 \pm 1.8	50.2 \pm 1.7	50.1 \pm 1.8
APA (mV)	67.0 \pm 4.7	66.1 \pm 5.0	64.7 \pm 4.1***	62.8 \pm 4.2***
APD ₅₀ (ms)	74.0 \pm 3.7	69.1 \pm 3.2***	64.0 \pm 3.8	61.2 \pm 4.1***
APD ₉₀ (ms)	156.4 \pm 5.9	132.1 \pm 5.9***	140.1 \pm 10.1**	152.3 \pm 5.7
SCL (ms)	529.2 \pm 43.5	541.0 \pm 40.5	613.4 \pm 68.2**	767.5 \pm 70.1***

讨 论

Pra-C 能浓度依赖性抑制心肌细胞的收缩,同时在较高的浓度也能抑制心肌细胞的收缩频率。Pra-C 的这些作用与其在离体实验抑制心肌收缩力的作用相吻合。其作用机制推测可能与其拮抗 Ca^{2+} 内流有关,它对心肌细胞电生理特性的影响也支持这一点。

Ver 及 Nif 是两类不同的钙拮抗剂,它们都能抑制 Ca^{2+} 电流,但它们对心脏的作用具体表现却不同^[7,8];Ver 能减慢窦性频率和房室传导,而 Nif 却无此作用,这可能与在体的反射性调节有关,然而电压钳的研究也揭示了它们作用的区别^[9,10],例如二氢吡啶类钙拮抗剂较 Ver 有更强的钙阻滞作用。本实验也发现 Nif 和 Ver 对心肌细胞动作电位的作用不同,Nif 主要选择性减少动作电位的时程,而 Ver 的作用范围比较广,它延长 APD₉₀,同时对 APA 也有抑制作用。

Pra-C 能浓度依赖性地抑制 APD₅₀,增加浓度对 APA 也有抑制作用,延长 SCL,该作用类似于 Nif 及 Ver,但比它们弱。培养的心肌细胞,动作电位呈现为慢反应电位,动作电位的除极主要由慢 Na^{+} 及少量的慢 Ca^{2+} 内流所致^[11],高浓度的 Pra-C 对 APA 有抑制作用,说明 Pra-C 对慢 Na^{+} 或慢 Ca^{2+} 通道有阻断作用。在培养的心肌细胞,APD 长短反映了 Ca^{2+} , K^{+} 两种离子电

导的总和^[12]。Pra-C对APD的抑制说明其可能有阻Ca²⁺内流的作用。Ver对APD₉₀的延长作用可能与药物减慢心肌细胞的搏动频率有关,因为心肌细胞的搏动频率直接影响APD的长短,搏动频率越慢,APD越长^[13]。

心绞痛发生的一个重要原因是心肌细胞的供氧减少。Pra-C缩短动作电位时程,减少Ca²⁺内流,并有抑制心肌收缩力的作用,可以降低心脏对氧的需求,这可能是前胡在临床应用时有抗心绞痛作用的一个机制。

参 考 文 献

- 1 Chen ZX, Huang BS, She QL *et al.* The chemical constituents of BAI-HUA-QIAN-HU. The root of *Peucedanum praeruptorum*. *Acta Pharm Sin*, 1979, **14**:486
- 2 Rao MR, Shen XH, Zou X. Effects of praeruptorin C and E isolated from Qian-Hu on swine coronary artery and guinea-pig atria. *Eur J Pharmacol*, 1988, **155**:293
- 3 Wu X, Rao MR. Effects of Pra-C on isolated guinea pig atrium and myocardial compliance in patients. *Acta Pharmacol Sin*, 1990, **11**:23.
- 4 Yang JR, Li QP, Rao MR. Protective effects of praeruptorin C and nifedipine on ischemia-reperfused injury in working rat hearts. *Acta Pharm Sin*, 1992, **27**:729
- 5 Hyde A, Balondel B, Matter A *et al.* Homo- and heterocellular junctions in cell culture: An electrophysiological and morphological study. *Prog Brain Res*, 1969, **31**:283
- 6 Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. *Circ Res*, 1982, **50**:101
- 7 Antman EM, Stone PH, Muller JE. Calcium channel blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders. *Ann Int Med*, 1980, **93**:875
- 8 Barry WH, Horowitz JD, Smith TW. Comparison of negative inotropic potency and reversibility of effects of six calcium channel blocker drugs in cultured myocardial cells. *Br J Pharmacol*, 1985, **85**:51
- 9 Lee KS, Tsien RW. Mechanism of calcium channel block by verapamil, D-600, diltiazem and nifedipine in single dialyzed heart cells. *Nature*, 1983, **302**:790
- 10 Sanguinetti MC, Kass RS. Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circ Res*, 1984, **55**:336
- 11 Schanne OF, Bakaly G. Explanted cardiac cells: a model to study drug actions? *Can J Physiol Pharmacol*, 1981, **59**:443
- 12 Beeler GM, Reuter H. Reconstruction of action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol*, 1977, **268**:117
- 13 Schanne OF, Ruiz-Ceretti E, Rivard C *et al.* Determinants of electrical activity in clusters of cultured cardiac cells from neonatal rats. *J Mol Cell Cardiol*, 1977, **9**:269

EFFECTS OF PRAERUPTORIN C ON SPONTANEOUS CONTRACTION AND ACTION POTENTIAL IN CULTURED MYOCARDIAL CELLS OF NEONATAL RATS

Wang HX, Tao L and Rao MR

(Department of Cardiovascular Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029)

ABSTRACT Using a circuit TV system and method of intracellular standard microelectrode, the effects of praeruptorin C on spontaneous contractile behavior and action potential were observed in cultured myocardial cells of neonatal rats. There was a decline in both the contractile frequency and velocity of cell edge motion after exposure to Pra-C for 5 minutes. Pra-C (10, 30 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was shown to inhibit contraction velocity by 24%, 43% and 51%, respectively in a concentration dependent manner. Pra-C (30 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) inhibited the contractile frequency by 13% and 19%, respectively. Nifedipine 3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ shortened APD_{50} and APD_{90} by 14% and 17% but verapamil at the same concentration inhibited APA by 27%, shortened APD_{50} by 8% and prolonged APD_{90} and SCL by 10% and 43%, respectively. Pra-C 10, 30 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ shortened the APD_{50} by 7%, 14% and 18%, respectively. Pra-C 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ inhibited APA and prolonged SCL. The results suggest that the effects of Pra-C on contractile behavior and action potential were related to its Ca^{2+} channel blockade.

Key words Coumarins; Cell culture; Myocardium; Calcium; Action potentials