

• 实验研究 •

噻吗心安对离体培养心肌细胞的影响

苏州医学院药理教研室 王道生 李晓江

陈星织 李玲* 沈志蔚*

噻吗心安(Timolol)为新型 β 肾上腺素能受体阻滞剂,无膜的稳定性和内在拟交感活性,具有负性频率、负性肌力、降低血压、对抗儿茶酚胺等作用^[1],常用于高血压病、心律失常、心绞痛等患者^[2]。本室应用苏州第一制药厂研制的噻吗心安曾对麻醉家兔急性实验性心肌缺血、犬左室心功能与心肌缺血作了实验研究^[3],为进一步研究其作用机制,本文旨在探讨噻吗心安对离体培养心肌细胞的搏动功能、细胞内CAMP含量、腺苷环化酶(AC)及缺血性心肌细胞的影响。

方法与结果

一、对体外培养心肌细胞搏动功能的影响

按本室方法^[4]取生后1—4天的新生大鼠,在无菌条件下剖胸,剪取心室肌,剪碎、胰蛋白酶消化,离心。用Hepes Eagle培养液配制成 10^6 /ml细胞悬液,接种到培养瓶中,放置37℃培养箱培养。

将盛有心肌细胞的培养瓶置于自制恒温

有机玻璃罩中的倒置显微镜上,选择一搏动节律正常的细胞簇,使细胞搏动通过光电换能器显示在SJ-42型生理多道记录仪上,用微分器WF-1型处理出 dV/dt ,再经输入数字式医用信号自动分析仪自动打印 $\pm dV/dt$ 参数,生理记录仪同步记录收缩振幅与 dV/dt ^[5]。

结果:噻吗心安 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 对心肌细胞搏动频率、节律无明显影响,但对细胞收缩速度(dV/dt)有较强抑制作用,随着剂量增大作用更为明显。噻吗心安 $10^{-4}M$,对心肌细胞搏动频率有明显减慢、对 dV/dt 有明显抑制作用,继而发现这一浓度可使多数细胞呈不可逆抑制,并停止搏动,结果见表1、图1。

二、对抗异丙肾上腺素的作用

实验用两组细胞进行观察,一组为异丙肾上腺素对照组,亦即先给Eagle培养液,4分钟后加入异丙肾上腺素;另一组为给药组,亦即先给噻吗心安4分钟后再加入同量的异丙肾上腺素。结果发现异丙肾上腺素对

表1 不同剂量噻吗心安对心肌细胞搏动功能的影响

噻 吗 心 安	收 缩 频 率 (%)		+ dV/dt (%)		- dV/dt (%)	
	药 前	药 后	药 前	药 后	药 前	药 后
$5 \times 10^{-6}M$	100	102	100	85.7*	100	83.2*
$10^{-5}M$	100	94	100	75.4*	100	72.2*
$5 \times 10^{-5}M$	100	91.7	100	59.1**	100	60.4*
$10^{-4}M$	100	32.3**	100	15.8**	100	15.0**

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ $n = 3$

* 进修生

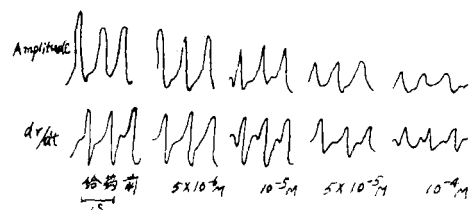


图1 不同剂量噻吗心安对离体培养心肌细胞搏动的影响

表2 噻吗心安对异丙肾上腺素的拮抗作用

药 物	频 率 (%)		+ dv/dt (%)		- dv/dt (%)	
	药 前	药 后	药 , 前	药 后	药 前	药 后
异丙肾上腺素 ($5 \times 10^{-7}M$)	100	129*	100	124*	100	114
噻吗心安 ($5 \times 10^{-6}M$) + 异丙肾上腺素 ($5 \times 10^{-7}M$)	100	99.3	100	101	100	101

• $P < 0.05$

实验结果表明：异丙肾上腺素 ($5 \times 10^{-6}M$) 组、噻吗心安 ($10^{-5}M$) 组的心肌细胞内CAMP含量与对照组细胞内的CAMP含量相比，异丙肾上腺素组增加CAMP含量非常显著 ($P < 0.01$)，噻吗心安无明显影响。噻吗心安 ($10^{-5}M$) 加异丙肾上腺素 ($5 \times 10^{-5}M$) 组心肌细胞内CAMP含量比异丙肾上腺素组为低 ($P < 0.05$)，说明噻吗心安有对抗异丙肾上腺素增加CAMP的作用，结果见表3。

表3 噻吗心安对心肌细胞内CAMP含量的影响

组 别	CAMP ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白 $\bar{x} \pm \text{SE}$)
对 照 组 (Eagle液)	7.29 ± 1.05 ($n=5$)
异丙肾上腺素组 ($5 \times 10^{-5}M$)	$23.22 \pm 2.65^{**}$ ($n=11$)
噻吗心安组 ($10^{-5}M$)	6.25 ± 0.77 ($n=4$)
噻吗心安组 ($10^{-5}M$) + 异丙肾上腺素组 ($5 \times 10^{-5}M$)	$14.26 \pm 2.40^*$ ($n=9$)

• • $P < 0.01$ (与对照组比较)

• $P < 0.05$ (与异丙肾上腺素组比较)

四、对心肌细胞腺苷环化酶的影响

根据腺苷环化酶在镁离子协同作用下能促使细胞内ATP生成CAMP的原理，将上述细胞培养瓶中加入一定量的ATP，测定

照组显著增加心肌细胞的频率和 dV/dt ；而给药组的心肌细胞搏动频率和 dV/dt 无明显变化，结果见表2。

三、对心肌细胞内CAMP含量的影响

按 Brodford 法^[7]将药物加入培养瓶中孵育一定时间，经酸化、Tris 处理，通过离心、抽滤，再按照蛋白激酶竞争结合法测定心肌细胞内CAMP含量。

CAMP生成量即可测得腺苷环化酶的活性。按中国医学科学院基础研究所的方法^[6]，将培养的心肌细胞置于匀浆器内，再加12.5mM 茶硷、2.5mM $MgSO_4$ 、Tris-HCl 缓冲液，低速匀浆半分钟，制成匀浆液。每管匀浆液加入20mM ATP 50 μ l 和药物(或Eagle)50 μ l。经30℃孵育10分钟，离心，取上清液，用蛋白激酶结合法测定CAMP含量，蛋白含量用 Brodford法测定。

结果：异丙肾上腺素组可明显激活腺苷环化酶的活性，它比对照组增高四倍多。当加用噻吗心安、心得安后，这种激活作用即大大降低。但是噻吗心安组、心得安组对正常心肌细胞腺苷环化酶的活性并无明显影响，结果见表4。

五、对缺氧缺糖性心肌细胞LDH的影响

心肌细胞在37℃恒温箱中静置培养2天，进行分组实验，分正常对照组、缺氧缺糖组、缺氧缺糖加药组。缺氧缺糖组用不含葡萄糖的Eagle培养瓶充以99.999%纯氮气。缺氧缺糖加药组用缺氧的Eagle培养基稀释药物，加入培养瓶后再充以氮气，静置6小

表 4 噻吗心安对心肌细胞腺苷环化酶活性的影响

组 别	腺苷环化酶活性 (pmol/mg蛋白/10')	
	$\bar{x} \pm SE$	n = 5
对 照 组 (Eagle液)	16.44 ± 1.02	
异丙肾上腺素组 ($5 \times 10^{-5}M$)	76.33 ± 4.70**	P < 0.01 (1)
噻吗心安组 ($10^{-5}M$)	21.80 ± 3.26	
心得安组 ($10^{-5}M$)	19.01 ± 2.50	
噻吗心安组 ($10^{-5}M$) 加异丙肾上腺素组 ($5 \times 10^{-5}M$)	23.05 ± 1.45**	P < 0.01 (2)
心得安组 ($10^{-5}M$) 加异丙肾上腺素组 ($5 \times 10^{-5}M$)	17.41 ± 1.42**	P < 0.01 (2)

注: (1) 与对照组比较, $P < 0.01$

(2) 与异丙肾上腺素组比较, $P < 0.01$

时, 再进行 LDH 的生化测定。

结果: 缺氧缺糖组心肌细胞 LDH 平均为 $103 \pm 35.08u/ml$, 比对照组 LDH $26.75 \pm 7.43u/ml$ 高 3.8 倍, 差异非常显著。给药组 LDH 平均为 $66.25 \pm 17.38u/ml$ 与缺氧缺糖组相比, 差异显著 ($P < 0.05$), 见表 5。

表 5 噻吗心安对心肌细胞缺氧缺糖性损伤的保护作用

组 别	LDH (u/ml) $\bar{x} \pm SE$
对 照 组	26.75 ± 7.43 (n = 9)
缺糖缺氧组	$103 \pm 35.08^{**}$ (n = 9)
缺糖缺氧 + 噻吗心安组	$66.25 \pm 17.38^{*}$ (n = 9)

• • 缺糖缺氧组与对照组比较, $P < 0.01$

• 缺糖缺氧 + 噻吗心安组与缺糖缺氧组比较, $P < 0.05$

讨 论

我室曾报道^[3]: 我室对鼠、兔、犬进行的噻吗心安耐缺氧、急性实验性心肌缺血、左室心功能和血液动力学的整体动物研究, 证明了噻吗心安具有减慢心率、减少心肌收缩力、降低心功能、保护缺血性心脏等作用。本文以离体心肌细胞为对象, 观察噻吗心安直接对心肌细胞的作用。实验结果表明, 本品 $5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-5}$ 有明显抑制心肌细胞收缩力的作用, 随着药物浓度增大, 可出现负性频率。这一结果与整体动物观察的相符。

心肌细胞 β 受体激动时, 可使心肌收缩力增强、心率加快, 已为大量实验研究所证实。我室观察了异丙肾上腺素对离体心肌细胞的正性频率和正性肌力作用, 当异丙肾上腺素浓度为 $5 \times 10^{-7}M$ 时, 可使心肌细胞搏动频率与收缩速度分别增加 28.66% 与 23.84%, 若预先使用噻吗心安 ($5 \times 10^{-6}M$), 再用同剂量异丙肾上腺素, 则后者的正性频率和正性肌力可被噻吗心安抵消, 证明噻吗心安具有对抗异丙肾上腺素的作用。

一般认为, 儿茶酚胺激动心肌 β 受体, 从而活化腺苷酸环化酶, 此酶再催化 ATP 形成 CAMP, 后者引起 β 效应, 在此过程中, CAMP 发挥第二信使的作用。我室测定培养心肌细胞内 CAMP 含量, 结果表明异丙肾上腺素能使腺苷环化酶活性增强, CAMP 含量明显升高, 虽然噻吗心安本身并不影响心肌细胞的腺苷环化酶活性和 CAMP 含量, 但当使用噻吗心安后可明显对抗异丙肾上腺素升高腺苷环化酶活性和 CAMP 含量。这与 Higgins 报道心得安能阻断异丙肾上腺素增加乳鼠心肌细胞内 CAMP 的含量相一致^[8], 说明噻吗心安也确具有阻断心肌细胞 β 受体的作用。

心肌细胞内 CAMP 浓度增加, 可加速 Ca^{++} 离子内流, 从而产生正性肌力和正性频

(下转第 20 页)

(上接第7页)

率,这可使缺血性心肌细胞的耗氧量增加,从而使心脏缺血区和非缺血区之间的代谢梯度增加,本实验对噻吗心安能否保护缺血性心肌细胞的结果证明,缺氧缺糖的心肌细胞,其LDH平均为 $103 \pm 35.08 \text{u/ml}$;而噻吗心安给药组LDH平均为 66.25 ± 17.38 ,两组相比差异显著, $P < 0.05$,表明噻吗心安对离体心肌细胞的缺氧缺糖性损伤有保护作用,其作用机制可能与噻吗心安的负性肌

力和负性频率使心肌耗氧量降低有关。

参 考 文 献

- [1] Brogden R. N. et al: Drugs 9:164 1975
- [2] Bowman W. C. et al: Textbook of pharmacology 2nd ed P. 23. 51, 1980
- [3] 王道生等:苏州医学院学报,待发表,1985
- [4] 王道生等,《江苏医药》(4):37,1985
- [5] 中国医学科学院基础研究所,《分子药理学新技术》P. 56, (内部资料)1984
- [6] Boder C. B.: Nature 231:531, 1971
- [7] Bradford M. M.: Annals Biochem. 72:248, 1976
- [8] Higgins TJC.: J. mol cell Cardiol. 11:101, 1979