

·基础研究·

MN9202 对心肌细胞的收缩和舒张功能的影响

朱肖星 梅其炳 刘莉 张峰 张海锋 胡玉珍 裴兆辉 郭海涛 陈定章

【摘要】 目的 研究 MN9202 对心肌细胞收缩舒张功能的影响。方法 采用 IonOptix 单细胞动缘检测系统 (IonOptix Co. USA), 测定心肌细胞收缩幅度和收缩/舒张速度等, 这些指标均由计算机自动实时采集并记录。结果 MN9202 降低心肌收缩幅度 (ph)、心肌细胞收缩幅度/单个心肌细胞的长度百分比 (peak height/baseline $\times 100\%$, ph/bl%), 最大收缩速率 ($+dL/dt$) 和最大舒张速率 ($-dL/dt$), ph 在对照组、MN9202 (3×10^{-6} mol/L) 组和拉西地平 (lacidipine, 3×10^{-6} mol/L) 组分别为 $(0.13 \pm 0.04) \mu\text{m}$ 、 $(0.08 \pm 0.05) \mu\text{m}$ 和 $(0.07 \pm 0.04) \mu\text{m}$, ph/bl% 分别为 $(8.6 \pm 2.8)\%$ 、 $(5.8 \pm 4.3)\%$ 和 $(5.6 \pm 3.3)\%$, $+dL/dt$ 分别为 $(1.6 \pm 0.5) \mu\text{m/s}$ 、 $(1.1 \pm 0.7) \mu\text{m/s}$ 和 $(1.0 \pm 0.6) \mu\text{m/s}$, $-dL/dt$ 分别为 $(1.2 \pm 0.4) \mu\text{m/s}$ 、 $(0.8 \pm 0.3) \mu\text{m/s}$ 和 $(0.7 \pm 0.3) \mu\text{m/s}$ 。异丙肾上腺素 (10^{-8} mol/L, isoproterenol, Iso) 增加 ph、ph/bl%、 $+dL/dt$ 和 $-dL/dt$ 均有统计学意义, 上述指标分别增加 45%、47%、54%、78%。 3×10^{-7} mol/L 的 MN9202 和拉西地平降低 Iso 引起 ph、ph/bl%、 $+dL/dt$ 和 $-dL/dt$ 的升高, 其中 MN9202 使 $+dL/dt$ 和 $-dL/dt$ 的降低较对照组有显著差异 ($P < 0.05$), 拉西地平使 ph/bl%、 $+dL/dt$ 和 $-dL/dt$ 的降低较对照组有统计学意义。结论 MN9202 使心肌细胞收缩和舒张功能均降低; Iso 所致心肌细胞收缩和舒张功能的增强, 3×10^{-7} mol/L MN9202 和拉西地平有抑制 Iso 的作用。

【关键词】 拉西地平; 钙通道阻断药; 心肌细胞

Effects of MN9202 on contraction and relaxation functions of cardiac myocytes

ZHU Xiaoxing, MEI Qibing, LIU Li, et al

Department of Pharmacology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of MN9202 on contraction and relaxation functions of cardiac myocytes. **Methods** The contraction amplitude was measured with video edge tracker method. The following indexes including contraction amplitude (ph), contraction amplitude/single cardiac myocyte length percent(ph/bl%), maximal velocity of contraction ($+dL/dt$) and maximal velocity of relaxation ($-dL/dt$) were recorded by the computer. **Results** MN9202 and lacidipine decreased electrically-induced contraction and ph, ph/bl%, $+dL/dt$ and $-dL/dt$. MN9202 and lacidipine at dose of 3×10^{-6} mol/L attenuated these indexes significantly. Compared with the control group, MN9202 (3×10^{-6} mol/L) decreased ph from $(0.13 \pm 0.04) \mu\text{m}$ to $(0.08 \pm 0.05) \mu\text{m}$, ph/bl% from $(8.6\% \pm 2.8\%)$ to $(5.8\% \pm 4.3\%)$, $+dL/dt$ from $(1.6 \pm 0.5) \mu\text{m/s}$ to $(1.1 \pm 0.7) \mu\text{m/s}$, $-dL/dt$ from $(1.2 \pm 0.4) \mu\text{m/s}$ to $(0.8 \pm 0.3) \mu\text{m/s}$. lacidipine at dose of 3×10^{-6} mol/L decreased ph from $(0.13 \pm 0.04) \mu\text{m}$ to $(0.07 \pm 0.04) \mu\text{m}$, ph/bl% from $(8.6\% \pm 2.8\%)$ to $(5.6\% \pm 3.3\%)$, $+dL/dt$ from $(1.6 \pm 0.5) \mu\text{m/s}$ to $(1.0 \pm 0.6) \mu\text{m/s}$, $-dL/dt$ from $(1.2 \pm 0.4) \mu\text{m/s}$ to $(0.7 \pm 0.3) \mu\text{m/s}$. Isoproterenol (Iso) at 10^{-8} mol/L augmented electrically-induced contraction and ph, ph/bl%, $+dL/dt$ and $-dL/dt$. These indexes increased by 45%, 47%, 54%, 78% respectively. The effect of Iso (10^{-8} mol/L) was reduced by MN9202 and lacidipine at dose of 3×10^{-7} mol/L. **Conclusion** MN9202 and LDH attenuated contraction and relaxation functions of cells, while Iso increased contraction and relaxation functions of cells. The effects of Iso (10^{-8} mol/L) were inhibited by MN9202 and lacidipine at dose of 3×10^{-7} mol/L.

【Key words】 lacidipine; calcium channel blockers; cardiac myocyte

收稿日期: 2004-07-12

作者单位: 710032 西安市, 第四军医大学药理学教研室(朱肖星、梅其炳、刘莉、张峰); 生理学教研室(张海锋、胡玉珍、裴兆辉、郭海涛); 西京医院超声科(陈定章)

作者简介: 朱肖星, 男, 1972年8月生, 浙江省杭州市人, 在读博士研究生; 主治医师。E-mail: zz_zhu2003@yahoo.com.cn

通讯作者: 梅其炳, Tel: 029-83374552

高血压是一种常见病,危害大;随着医药技术的发展,大规模临床试验已证明长效钙通道拮抗剂和血管紧张素转化酶抑制剂等可有效保护靶器官,经过积极合理的抗高血压治疗,可延长高血压患者的寿命,因为钙离子在兴奋-收缩耦联中起重要作用,参与心肌收缩的钙部分是来自经L-型钙通道的内流,更主要是来自内流的钙触发肌浆网(钙池)内释放的钙^[1]。应用钙通道拮抗剂是治疗高血压病的常用药之一。高血压合并高血脂、高血黏的患者较为常见。为此,我们必须研发新的钙通道拮抗剂,MN9202[2, 6-二甲基-4-(3-硝基苯基)-1,4-二氢-3,5-吡啶二羧酸-3-甲酯-5-戊酯]是第四军医大学药理教研室合成的一个新型二氢吡啶类钙拮抗剂,它的苯环上有硝基,已证明它具有非内皮依赖性舒血管作用^[2]、降低血脂^[3]、减轻缺血/再灌注损伤^[4]、抗心肌肥厚和抗脂质过氧化^[5]等作用。二氢吡啶类钙拮抗剂对血管作用强^[6],对心脏作用弱,由于降压引起反射兴奋交感神经而增强心肌收缩力,其对心脏的负性变力作用被减压反射的作用所掩盖。为排除对心脏的反射性变力作用,我们在细胞水平上,采用单细胞收缩技术观察了MN9202和拉西地平(lacidipine)对单个心室肌细胞收缩、舒张的影响,评定MN9202对心脏收缩、舒张功能的作用。同时用异丙肾上腺素(isoprenaline, Iso)兴奋 β -肾上腺素受体,观察其对心肌细胞收缩、舒张功能的影响,再用MN9202和拉西地平研究其对Iso的效应,以分析其对Iso的效应和MN9202、拉西地平的部分作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年SD大鼠,由本校实验动物中心提供,体重220~260 g,雌雄不拘,正常饮食。胶原酶II(美国Worthington Biochemical公司)。Iso(Sigma公司),MN9202和拉西地平均为第四军医大学药理学教研室合成,通过核磁共振氢谱确证其结构,高效液相色谱分析纯度>98%^[2],用乙醇、二甲基亚砜、聚乙二醇和水溶液溶解(1.5:1:2.5:5/V:V:V:V)。实验前用Tyrode液稀释为工作液。Tyrode液成分(mmol/L) NaCl 143, KCl 5.4, $MgCl_2$ 0.5, NaH_2PO_4 0.3, $CaCl_2$ 1.8, HEPES 5.0, 葡萄糖5.0, 充纯氧,用HCl和NaOH调pH至7.4。IonOptix单细胞检测系统由美国IonOptix公司生产。微量双道程控灌流泵

由美国World Precision Instruments公司生产。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌细胞分离 按参考文献[7]的方法用断头法处死大鼠,迅速开胸取出心脏并固定于Langendorff灌流系统。经含 O_2 无钙台氏液经主动脉灌流(37℃)。心脏停跳后,换以含0.3 g/L胶原酶II(299 U/mg)和0.8 g/L牛血清白蛋白(BSA)的无钙台氏液灌流约20 min。待心脏变松软、灌流液流出速度明显加快后,再以无钙台氏液灌流冲洗残留酶液约5 min。去除心房及主动脉,并将心室组织置于含20 g/L BSA的含氧KB液中,将心室组织剪碎,以粗头吸管轻轻反复吹打并经200目筛网过滤细胞悬液,室温静置10 min沉降分离的心室肌细胞,弃上清液并换入新鲜KB液+20 g/L BSA,静置40 min后换以无钙台氏液并逐步复钙至终浓度为1.8 mmol/L,得到分离的钙耐受(calcium tolerant)心室肌细胞,保存在含1.8 mmol/L $CaCl_2$ 的台氏液中。此法分离,常规可得到60%~80%呈杆状的成活心肌细胞。

1.2.2 单细胞收缩检测 心室肌细胞收缩采用Hintz等^[8]的方法,用IonOptix单细胞边缘检测系统检测心肌细胞收缩。将心肌细胞置于倒置显微镜(Olympus)载物台上的细胞灌流小室内,以含 O_2 台氏液灌流(1 ml/min, 25℃),给予0.5 Hz, 5 ms波宽的电场刺激,场刺激由灌流小室底部两侧镶嵌的铂电极产生,细胞收缩影像通过40×物镜传输到IonOptix的MyoCam照相系统并呈现在监视器上。心肌细胞收缩幅度和收缩/舒张速度等指标由计算机自动实时采集并记录,选取形态、功能良好的心室肌细胞进行实验观察。心室肌细胞选取标准:(1)细胞呈长杆状,长约为宽的5~7倍;(2)细胞边缘折光性好,横纹清晰,细胞膜上空无泡;(3)无自发收缩,能随电刺激而稳定地收缩;(4)给药前细胞收缩幅度恒定至少在5 min以上。

1.2.3 统计学处理 实验数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同一个指标用药前后比较用配对 t 检验,多组间比较用单因素方差分析(ANOVA),多重比较用 q 检验,率的比较用卡方检验,用Origin统计软件进行统计学检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著界限; $P < 0.01$ 为非常显著差异。

2 结果

2.1 MN9202和拉西地平对心肌细胞收缩、舒张功能的影响 台氏液灌流心肌细胞约5 min,待细胞收

缩幅度稳定后换以 MN9202 和拉西地平, MN9202 和拉西地平使电刺激引起的心肌收缩幅度 (peak height, ph)、心肌收缩幅度/单个心肌细胞的长度百分比 (peak height baseline $\times 100\%$, ph/bl%), 最大收缩速率 (+dL/dt)、最大舒张速率 (-dL/dt) 减小 (图 1~4)。其中 3×10^{-6} mol/L 的 MN9202 使上述指标分别降低 51%、47%、44% 和 40%。 3×10^{-6} mol/L 的拉西地平使上述指标分别降低 61%、51%、49% 和 48%。

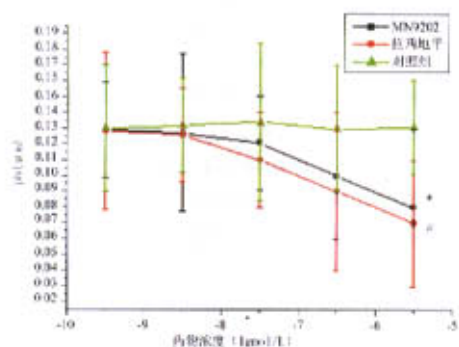


图 1 ph 对 MN9202 和拉西地平的浓度依赖关系
与对照组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, $n = 10$

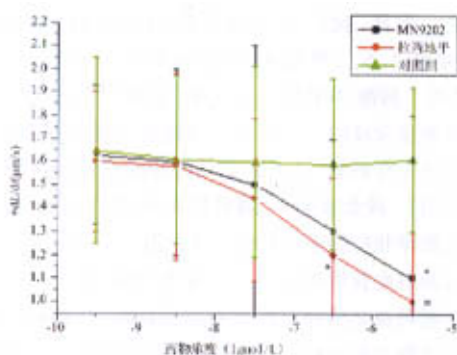


图 2 ph/bl% 对 MN9202 和拉西地平的浓度依赖作用
与对照组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, $n = 10$

2.2 MN9202 和拉西地平对 Iso 引起心肌细胞收缩、舒张功能的影响 对照组采用台氏液灌流心肌细胞约 5 min, 待细胞收缩稳定后换以含 1×10^{-8} mol/L Iso 的台氏液灌流。加药组采用台氏液灌流心肌细胞约 5 min, 待细胞收缩稳定后换以含 10^{-8} mol/L Iso 和 MN9202 或拉西地平的台氏液灌流。Iso 在使电刺激引起的 ph、ph/bl%、+dL/dt 和 -dL/dt 增加, 均有统

计学意义 ($P < 0.05$), 上述 4 个指标分别增加 45%、47%、54% 和 78%。 3×10^{-7} mol/L 的 MN9202 和拉西地平有抑制 Iso 的效应, MN9202 使 Iso 升高的 ph、ph/bl%、+dL/dt 和 -dL/dt 分别降低 12%、20%、46% 和 42%。其中 +dL/dt 和 -dL/dt 的降低有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。而拉西地平使 Iso 升高的 ph、ph/bl%、+dL/dt 和 -dL/dt 分别降低 14%、31%、56% 和 46%。其中 ph/bl%、+dL/dt 和 -dL/dt 的降低有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)

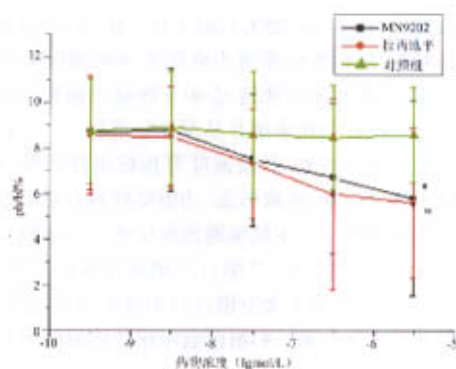


图 3 +dL/dt 对 MN9202 和拉西地平的浓度依赖作用
与对照组比较 * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, $n = 10$

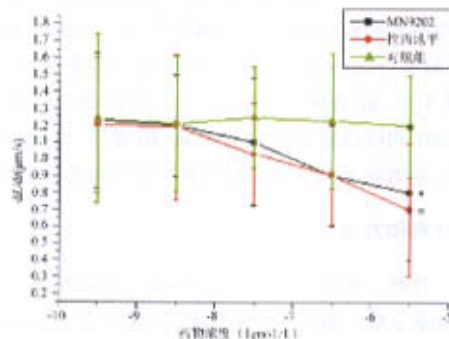


图 4 -dL/dt 对 MN9202 和拉西地平的浓度依赖作用
与对照组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$, $n = 10$

3 讨论

MN9202 是新型二氢吡啶类钙拮抗剂, 笔者应用单细胞动缘检测系统检测心肌细胞的收缩和舒张功能。实验表明 MN9202 (3×10^{-6} mol/L) 使 ph、ph/bl%、+dL/dt 和 -dL/dt 均降低, 在细胞水平证明 MN9202 有负性变力作用。ph 指心肌细胞最大收缩幅度, 因为细胞大小有差异, 收缩幅度也不同, 为排除细胞大

表 1 MN9202 和拉西地平抑制 Iso 引起心肌细胞收缩、舒张的作用

药 物	例数	ph	ph/bl%	+ dL/dt	-dL/dt
对照组	8	0.14 ± 0.06	9.17 ± 3.54	1.91 ± 0.74	1.62 ± 0.75
Iso	8	0.19 ± 0.07 [*]	12.26 ± 3.98 [*]	2.87 ± 1.10 [*]	2.30 ± 0.86 [*]
Iso + MN9202	8	0.18 ± 0.11	10.16 ± 4.65	1.59 ± 0.76 [*]	1.41 ± 0.80 [*]
Iso + 拉西地平	8	0.17 ± 0.09	9.56 ± 3.78 [*]	1.56 ± 0.81 [*]	1.38 ± 0.70 [*]

注:与 Iso 比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, [#] $P < 0.05$

小造成收缩力的差异,作者采取 ph/bl%, 这样可更好反映细胞的收缩能力。使用 Iso 后 ph、ph/bl%、+ dL/dt 和 -dL/dt 均增加, + dL/dt 的增加表示细胞增加同样收缩幅度所需的时间缩短,说明心肌收缩功能增强; -dL/dt 增加,细胞舒张同样幅度所需的时间缩短,表明舒张功能增强^[9]。Iso 是 β -肾上腺素受体激动剂,与用药前比较 + dL/dt、-dL/dt 均显著增加, Iso 可明显提高心肌内钙释放量,也促进反向 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换,均使肌浆网内的钙容量增加,引起心肌收缩力的增强^[10-12]。另外, Iso 通过兴奋型 G 蛋白激活腺苷酸环化酶,使胞内 cAMP 增多,进而激活蛋白激酶 A (PKA), PKA 可磷酸化多种与兴奋-收缩耦联有关的蛋白质,如 L-型钙通道、肌浆网 (sarcoplasmic reticulum, SR)、受磷蛋白 (phospholamban)、雷诺停受体 (Ryanodine receptor, RyR)、肌钙蛋白 I (troponin I) 和肌球蛋白轻链 (MLC) 等。L 型钙通道的 α 和 β 亚单位的磷酸化增加钙通道的开放概率, RyR 磷酸化增加 RyR 的开放,增加细胞内钙浓度和钙瞬变的幅度^[6], SR 内钙容量增加可提高 RyRs 触发钙信号的敏感性^[13],少量经 L-型钙通道内流的钙可使 SR 释放钙增加 (钙诱导钙释放),收缩时肌浆网内钙容量增加引起心肌收缩力增强。沈建新等^[10,11]证明 Iso 引起心肌细胞内钙释放和 SR 内钙容量明显增加,去磷酸化的受磷蛋白对钙泵有抑制作用,限制钙泵从胞浆中摄取钙^[12], PKA 又使肌钙蛋白 C 磷酸化,使其对 Ca^{2+} 的敏感性下降,受磷蛋白磷酸化解除对 SR 钙泵的抑制,即提高钙泵摄钙的速率,使胞浆内钙浓度降低,加速钙瞬变降支的速率和心肌的舒张^[6]。因此, Iso 既增强心肌细胞的收缩又促进心肌细胞的舒张, MN9202 和拉西地平都是二氢吡啶类钙拮抗剂,通过阻断 L-型钙通道,减少细胞内的钙含量,钙拮抗剂所致负性变力作用可减少心肌细胞的耗氧量,对缺血心肌有保护作用。在钙超载的情况下,可对抗 Iso 和强心苷等增加心肌细胞内钙浓度。作者的实验证实 Iso 引起 Ph、Ph/bl%、+ dL/dt 和 -dL/dt 的增强可被 MN9202 和拉西地平所减弱,

也就是说 MN9202 和拉西地平可拮抗异丙肾上腺素对心肌细胞收缩和舒张功能的影响。

MN9202 除有降压活性外,本实验证明它对心肌细胞收缩力有直接的作用,其减弱作用可排除窦弓反射的影响,结合以往的研究,它还有改善血液流变学特性和降低血脂等作用,因此,对高血压并发高血脂、高血黏度患者有一定的应用前景。

参考文献

- Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, 2002, 415:198-205.
- 朱肖星,梅其炳,张峰,等. MN9202 对离体大鼠胸主动脉的舒张作用及其机制. 心脏杂志, 2004, 16:421-422, 426.
- 姚秀娟,甘洪泉,贾敏,等. 钙拮抗剂 MN9202 对高血脂症大鼠的影响. 第四军医大学学报, 2000, 21:311-313.
- 甘戈,梅其炳,赵德化. 2,6-二甲基-4-(3-硝基苯基)-1,4-二氢-3,5-吡啶-2-羧酸-3-甲酯-5-正戊酯对兔小肠缺血再灌注损伤所致休克的保护作用. 中国药理学与毒理学杂志, 1997, 11:190-193.
- 王剑波,梅其炳,赵德化. MN9202 对 L-甲状腺素所致大鼠心肌肥厚的影响. 第四军医大学学报. 2000, 21:141-144.
- 朱妙章,袁文俊,吴博威,等. 心血管生理学与临床. 北京:高等教育出版社, 2004. 46-54, 178-183.
- Cui XL, Chen HZ, Wu DM, et al. Enhancement of Ca^{2+} transients and contraction of single ventricular myocytes of rats by 5-(N,N-dimethyl) amiloride. Acta Physiol Sin, 2002, 54:219-224.
- Hintz KK, Norby FL, Duan J, et al. Comparison of cardiac excitation-contraction coupling in isolated ventricular myocytes between rat and mouse. Comp Biochem Physiol, 2002, 133:191-198.
- Okayama H, Hamada M, Kawakami H, et al. Increased contraction of myocytes isolated from the young spontaneously hypertensive rat: relationship between systolic and diastolic function. Am J Hypertens, 1998, 11:349-356.
- 沈建新,程和平,韩太真. 异丙肾上腺素对心肌细胞内钙释放和肌浆网内钙容量的影响. 心脏杂志, 2004, 16:218-220.
- Shen JX, Wang SQ, Han TZ, et al. Polymorphism of calcium sparks evoked from in-focus calcium release units in cardiac myocytes. Biophys J, 2004, 86:182-190.
- Berne RM, Levy MN. Cardiovascular physiology. 8th ed. 北京:人民卫生出版社, 2002. 61-65.
- Cheng H, Wang SQ. Calcium signaling between sarcolemmal calcium channels and ryanodine receptors in heart cells. Front Biosci, 2002, 7:d1867-d1878.