论著

文章编号:1000-5404(2005)04-0356-03

吡那地尔预处理对过氧化氢损伤心肌细胞保护作用的研究

彭念寅[1],周 红[1],司良毅[2] (第三军医大学:[1]基础医学部药理学教研室,[2]西南医院老年病科,重庆 400038)

提 要:目的 观察不同浓度的 H_2O_2 对心肌细胞的损伤作用,以及吡那地尔对 H_2O_2 损伤的保护作用。**方法** 胰酶消化法分离和培养 KM 乳鼠心肌细胞,按照 1×10^5/ml 的密度接种于 96 孔培养板。分为正常对照组,H_2O_2 组,观察 400、600、800 μmol/L H_2O_2 对心肌细胞处理 1、3、6、12、24 h 后 MTT 比色 *A* 值影响;用 400 μmol/L H_2O_2 处理心肌细胞后 MTT A 值的改变,以及 1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6} mol/L 吡那地尔对心肌细胞保护作用的观察。**结果** H_2O_2 对心肌细胞的损伤作用,随 H_2O_2 浓度的增加和作用的时间的延长而加重。以 1×10^{-5}、1×10^{-6} mol/L 吡那地尔预处理可以提高经 H_2O_2 处理心肌细胞的 MTT *A* 值,其中以 1×10^{-6} mol/L 的浓度最佳。**结论** 心肌细胞对 H_2O_2 引起的损伤呈明显的剂量及时间依赖关系。小剂量的吡那地尔(1×10^{-6} mol/L)预处理可明显减轻 H_2O_2 对心肌细胞的损伤。表明吡那地尔预处理对心肌的过氧化损伤有保护作用。

关键词:吡那地尔;心肌细胞;过氧化氢;线粒体

中图法分类号:R322.11;R541.02;R972.4 **文献标识码**:A

Protective effect of pinacidil preconditioning on cardiomyocytes damaged by hydrogen peroxide in neonatal mice

PENG Nian-yin[1], ZHOU Hong[2], SI Liang-yi[1] ([1]Department of Geriatrics, Southwest Hospital, [2]Department of Pharmacology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of hydrogen peroxide (H_2O_2) on cardiomyocytes and the protective effect of pinacidil preconditioning on injured primary cultured cardiomyocytes. **Methods** We isolated and cultured cardiomyocytes in neonatal mice by trypsin digestion technique. The cells were inoculated in 96-well culture plate at the density of 1×10^5/ml. Cells were divided into control group and 400, 600, and 800 μmol/L H_2O_2 treatment groups. MTT assay was used to determine the cell vitality at 1, 3, 6, 12, and 24 h after H_2O_2 treatment. The effects of pinacidil preconditioning were also observed. **Results** The effect of H_2O_2 on the damages to cardiomyocytes was in dose- and time-dependent manners. Pretreatment with pinacidil at the concentrations of 1×10^{-4}, 1×10^{-5}, and 1×10^{-6} mol/L, particularly 1×10^{-6} mol/L, could increase the activity of cardiomyocytes treated with H_2O_2. **Conclusion** Pinacidil preconditioning at lower doses can protected cardiomyocytes from injuries induced by H_2O_2.

Key words: cardiomyocyte; hydrogen peroxide; pinacidil; mitochondrium

心肌缺血预适应对心肌产生了明显的保护作用[1,2],新近研究表明,线粒体 ATP 敏感的 K^+ [mitoK(ATP)]通道开放剂(KCO)可以模拟缺血预适应样效应,保护心肌收缩功能[2],显著缩小心肌梗死范围[3]。如同时给予特异性的 mitoK(ATP)通道阻断剂 5-羟基癸酸(5-hydroxydecanoic acid, 5-HD)时,这种保护作用消失。说明 mitoK(ATP) 通道的开放是心肌缺血预适应保护作用的靶点之一[4]。但其保护作用的确切机制仍未阐明。基于吡那地尔(pinacidil)是一种 K(ATP)开放剂,本研究采用体外培养的心肌细胞,用过氧化氢(H_2O_2)损伤心肌细胞前给予适量的 K(ATP)开放剂吡那地尔,使 mitoK(ATP)通道提前开放,观察其是否对心肌产生保护作用,为心肌损伤的预防和治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

2~3 d 龄 KM 乳鼠(第三军医大学实验动物中心);YJ-875 型超净工作台(苏州净化设备厂);MODEL-3111 CO_2 孵箱(德国 Heraeus 公司);XDS-113 倒置相差显微镜(日本 Olympus);3550 型酶联免疫标记分析仪(美国 Biorad 公司);普通离心机;标准

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054502) Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054502)

作者简介:彭念寅(1965-),女,湖北省武汉市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事心肌缺血再灌注方面的研究。电话:(023)65308942

通讯作者:周 红,电话:(023)68752266,E-mail:Zhouh64@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2004-03-05;**修回日期**:2004-05-17

胎牛血清(美国 Hyclone 公司)；胰蛋白酶(1∶250 华美进口分装)；Brdu、吡那地尔(美国 Sigma 公司)；DMEM 培养基(美国 Gibco 公司)；3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑蓝盐(MTT，国产)、过氧化氢(H_2O_2，国产)、二甲基亚砜(DMSO，国产)

1.2　主要试剂配制

DMEM 培养基：DMEM 干粉 10 g，去离子水 900 ml，碳酸氢钠 1.96 g，谷氨酰胺 292 mg，甘氨酸 7.5 mg，青霉素 10 万 U，链霉素 10 万 U；调 pH 值至 7.2～7.4，0.2 μm 滤膜抽滤除菌，－20 ℃保存备用，用前加 10% 胎牛血清和 Brdu(终浓度为 0.01 mmol/L)。0.125% 胰蛋白酶：胰蛋白酶 0.25 g，PBS 200 ml，充分溶解后 0.2 μm 滤膜抽滤除菌，－20 ℃保存备用。MTT 溶液：称取 250 mg MTT，放入小烧杯中，加 50 ml PBS(0.01 mol/L pH 7.4)在电磁搅拌机上搅拌 30 min，用 0.22 μm 的微型过滤器过滤除菌，分装，4 ℃保存(2 周内有效)。H_2O_2 母液配制：30% H_2O_2 原液用 PBS(0.01 mol/L pH7.4)稀释。吡那地尔的配制称取吡那地尔 5 mg，用 0.1 mol/L HCl 溶解。

1.3　乳鼠原代心肌细胞培养和纯化

心肌细胞分离采用组织胰酶消化法，纯化采用差速贴壁法和 Brdu 化学抑制法。具体如下：将 2～3 d 龄的 KM 乳鼠 26 只，全身 75% 酒精消毒后至无菌操作盘(以下步骤均为无菌操作)。移入超净台，固定，剪开胸腔，取出心脏，放入冷的 PBS(0.01 mol/L)缓冲液中洗去残留血，清洗 3 遍后，将心肌组织移入青霉素小瓶内，眼科剪剪碎至沙粒大小；加入 0.125% 胰蛋白酶，适当吹打，使细胞分散；37 ℃消化 7 min，收集上层液并及时用含 10% 胎牛血清的培养基灭活残留胰酶活性，上述消化、收集过程反复多次(7～8 次)至组织块消化完全；以 200 目不锈钢网过滤收集的上层液，迅速离心(1 300 r/min × 5 min)；PBS 洗细胞沉淀 1 次。细胞重悬于 DMEM 培养基中(含 10% FBS 和 0.01 mmol/L Brdu)，吸管适当吹打后，接种至 50 ml 培养瓶，37 ℃、5% CO_2 培养箱中孵育 90 min，使成纤维细胞贴壁。然后转移细胞悬液，记数、调整细胞密度至 1×10^5/ml，接种于 96 孔培养板内，置入细胞培养箱，隔日换液。备用。

1.4　实验分组

分别用 400、600、800 μmol/L 3 种浓度的 H_2O_2 作用于心肌细胞 1、3、6、12、24 h，观察 H_2O_2 对心肌细胞活力的影响。

实验分正常对照组、H_2O_2 组(终浓度 400 μmol/L H_2O_2)和 H_2O_2 + 吡那地尔 1 组(400 μmol/L H_2O_2 + 1×10^{-4} mol/L 吡那地尔)、H_2O_2 + 吡那地尔 2 组(400 μmol/L H_2O_2 + 1×10^{-5} mol/L 吡那地尔)、H_2O_2 + 吡那地尔 3 组(400 μmol/L H_2O_2 + 1×10^{-6} mol/L 吡那地尔)分别作用于密度为 1×10^5/m 的心肌细胞，1、3、6、12、24 h 后观察 MTT 吸光度值的改变。三复孔为 1 组。正常对照组不加药物处理；吡那地尔组在加 H_2O_2 前 30 min 投入。分别给予吡那地尔 1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6} mol/L 干预，再用 400 μmol/L H_2O_2 处理心肌细胞，观察 1、3、6、12、24 h 细胞活力变化。所加的药物总量不超过培养基总量的 5%。

1.5　心肌细胞活力测定

用 MTT 比色法测定心肌细胞活力：吸弃 96 孔培养板的待测心肌细胞孔内的培养上清，用 PBS 洗板 2 次后，每孔加入无血清的 DMEM 培养液 200 μl 后再加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl，37 ℃继续孵育 4 h，终止培养；弃去孔内培养液，每孔加入 150 μl 二甲基亚砜振荡 10 min，使结晶物充分溶解；选择 490 nm 波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度 D(490)值。

1.6　数据处理及统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Excel 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　H_2O_2 损伤心肌细胞的量效和时效关系

和正常对照组比较，在 1 h 时相点，400、600 μmol/L 的 H_2O_2 浓度没有显示差异($P > 0.05$)，而 800 μmol/L 的 H_2O_2 细胞活力显著降低($P < 0.01$)。在 3 h 点，400 μmol/L 的 H_2O_2 浓度没有差异，但 600、800 μmol/L 的 H_2O_2 显示明显差异($P < 0.01$)。而 6～24 h，3 种浓度的 H_2O_2 细胞活力均出现了显著的下降($P < 0.01$)。随着 H_2O_2 作用时间的延长和/或浓度的增加，细胞活力呈进行性下降。

表 1　H_2O_2 对心肌细胞 MTT A 值的影响

[$n = 3$，D(490)，($\bar{x} \pm s$)]

Tab 1　Effects of H_2O_2 on murine cardiomyocytes by MTT [$n = 3$，D(490)，($\bar{x} \pm s$)]

Group	400 μmol/L	600 μmol/L	800 μmol/L
Control	0.44 ± 0.049	0.44 ± 0.049	0.44 ± 0.049
1 h	0.397 ± 0.036	0.349 ± 0.044	0.272 ± 0.020**
3 h	0.311 ± 0.121	0.198 ± 0.034**	0.173 ± 0.019**
6 h	0.151 ± 0.041**	0.091 ± 0.008**	0.064 ± 0.004**
12 h	0.138 ± 0.064**	0.049 ± 0.008**	0.044 ± 0.006**
24 h	0.061 ± 0.010**	0.064 ± 0.009**	0.063 ± 0.007**

**：$P < 0.01$，*vs* control

2.2　吡那地尔预处理对 H_2O_2 损伤心肌细胞的影响

结果显示：和单纯的 H_2O_2 组比较，1×10^{-5} mol/L 吡那地尔组于 1、12 h 可明显减轻 H_2O_2 对心肌细胞的损伤($P < 0.05$)；1×10^{-6} mol/L 浓度的吡那地尔可显著减轻 H_2O_2 造成的心肌细胞的损伤($P < 0.05$ 至 $P < 0.01$)。1×10^{-4} mol/L 浓度的吡那地尔组和 H_2O_2 组比较则无明显差异($P > 0.05$)。

表 2　H_2O_2 损伤心肌细胞的活力检测和吡那地尔预处理的影响 [$n = 3$，D(490)，($\bar{x} \pm s$)]

Tab 2　Effects of pinacidil preconditionging on murine cardiomyocytes treated by H_2O_2 by MTT [$n = 3$，D(490)，($\bar{x} \pm s$)]

	Control	H_2O_2	H_2O_2 + Pinacidil 1	H_2O_2 + Pinacidil 2	H_2O_2 + Pinacidil 3
1 h	0.380 ± 0.028	0.251 ± 0.011**	0.266 ± 0.012**#	0.32 ± 0.028*	0.290 ± 0.015*
3 h	0.362 ± 0.028	0.126 ± 0.006**	0.146 ± 0.013**	0.128 ± 0.003**	0.145 ± 0.009**#
6 h	0.438 ± 0.049	0.085 ± 0.007**	0.077 ± 0.005**	0.080 ± 0.001**	0.110 ± 0.010**#
12 h	0.389 ± 0.015	0.062 ± 0.007**	0.062 ± 0.001**	0.07 ± 0.004**	0.087 ± 0.002**##
24 h	0.36 ± 0.048	0.074 ± 0.003**	0.071 ± 0.002**	0.080 ± 0.004*#	0.085 ± 0.004**##

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$，*vs* control；

#：$P < 0.05$，##：$P < 0.01$，*vs* H_2O_2

3　讨论

缺血预适应对心肌产生了明显的保护作用，如心功能明显改善[1,2]，心肌梗死范围明显缩小[3]。但产生这种保护作用的机制还不清楚。文献报道显示，在缺血预适应中，可能因为线粒体膜上 ATP 敏感的 K^+ 通

道 mitoK(ATP)的开放对心肌产生了保护作用。有人用特异性的 mitoK(ATP)通道阻断剂(5-HD)可以使缺血预适应的心肌保护作用消失。说明了 mitoK(ATP)通道的开放对缺血预适应的心肌产生了保护作用。

采用的甲基四唑蓝(MTT)比色实验可检测细胞线粒体将 MTT 还原成甲臜的能力。MTT 主要被电子传递过程中细胞色素氧化酶和泛醌还原,它可反应电子传递的完整性,是一个细胞死亡的间接早期指标。MTT 广泛用作检测细胞呼吸和活力的指标,反映线粒体的整体功能[5]。

心肌缺血时会造成抗氧化保护机制的改变,同时产生大量的自由基,H_2O_2 是体内氧化代谢的中间产物,H_2O_2 很容易穿透细胞膜到达胞内位点,本实验表明,H_2O_2 对心肌细胞的损伤呈明显的剂量和时间依赖关系。李建明等[6]用 400 μmol/L 过氧化氢处理肠上皮细胞 3 h,电镜观察可引起线粒体空化、嵴肿胀。并随其浓度的增加线粒体空化更加明显。H_2O_2 浓度过低如 50 μmol/L 对心肌细胞的损伤没有明显影响[7]。过高的 H_2O_2 浓度如 2 000~4 000 μmol/L 细胞迅速死亡,不利于观察细胞的损伤过程和药物保护机制的研究。我们经过反复对 H_2O_2 浓度的实验探索,发现 400 μmol/L 的 H_2O_2 用于对心肌细胞损伤的研究实验是合适的浓度。吡那地尔预处理可明显减轻 H_2O_2 引起的损伤。提高心肌细胞对 H_2O_2 损害的阈值。本研究用了 1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6} mol/L 3 种浓度的吡那地尔发现 1×10^{-6} mol/L 的浓度最佳。国外文献常用 1×10^{-4} mol/L 的吡那地尔浓度,发现线粒体 Ca^{2+} 浓度减少的同时,增加了凋亡和线粒体活性氧的产生[8]。可能吡那地尔浓度过高与增加线粒体通透性转换孔的开放和线粒体膜电位[DeltaPsi(m)]的过度消散有关[9]。

本研究证明了吡那地尔预处理可以对氧化应激性损伤的心肌产生保护作用。为临床防治多种因素的心肌损害提供了新的思路和理论指导。

参考文献:

[1] Bolli R. The late phase of preconditioning[J]. Circ Res, 2000, 87(11): 972-983.

[2] Feng J, Li H, Rosenkranz E R. Pinacidil pretreatment extends ischemia tolerance of neonatal rabbit hearts[J]. J Surg Res, 2000, 90(2): 131-137.

[3] McDonald M C, Zacharowski K, Bowes J, *et al*. Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion[J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27(5-6): 493-503.

[4] Lebuffe G, Schumacker P T, Shao Z H, *et al*. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial KATP channel[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(1): H299-308.

[5] 司徒镇强, 吴军正. 四唑盐比色法(MTT 法)[A]. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司西安公司, 2001. 56.

[6] 李建明, 蔡 黔, 周 红, 等. 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体的损伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 142-145.

[7] 曹纯章, 卜丽莎, 高 申, 等. 过氧化氢对培养心肌细胞损伤作用的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(6): 628-632.

[8] Akao M, Ohler A, O'Rourke B, *et al*. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells [J]. Circ Res, 2001, 88(12): 1267-1275.

[9] Hanley P J, Mickel M, Loffler M, *et al*. K(ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart[J]. J Physiol, 2002, 542(Pt 3): 735-741.

(编辑 汪勤俭)

(上接 352 页)

主干,基于此,出现肾实质因缺血而坏死的范围及可能性减少,从而保护了肾实质,也就保护了肾功能。

多用于不能通过肾窦切开取出的多发性或鹿角状等复杂性肾结石,小于 2.5 cm 肾结石,而常选择 ESWL 处理[2]。所谓复杂肾结石并无确切定义,一般把 > 2.5 cm 和结石、鹿角状结石、多发结石等列为复杂肾结石[1]。本组病例均为 > 2.5 cm 的多发性或鹿角状结石或盏内结石经 ESWL 处理无效 3 个月后选择该术式。

预先全层缝合切口两侧的肾实质,从而保证了几乎在不出血的情况下切开肾实质,减少了出血量,降低了因大出血而切肾的风险,该 28 例均未因出血而切肾,也未输血。也就降低了输血的可能性及并发症。本方法无需阻断肾蒂血管或分支,也无需局部低温处理,一方面减化了手术程序,另一方面减少了因阻断肾血流而造成的肾功能损害。

本组病例均为复杂性肾结石,结石取净率为 89%,术后无漏尿病例。选择肾后段下基底部与肾窦内肾盂联合切开的切口方式是基础,另外加以应用肾窦拉钩,这就充分暴露了肾窦内肾盂肾盏,达到了在直视下切开取石的目的,从而探查结石和取净结石更容易,取净率高,关闭肾盂切口清楚,漏尿率低。术中采用胆道镜经肾盂切口取出盏内小结石,虽是基层医院无肾镜情况下的变通,但应用起来方便有效,术后经肾造瘘窦道取石,则是治疗残余结石的一个补救措施。

本组有 2 例行 ESWL 处理残余结石。ESWL 是治疗残余结石的一个有效的补充手段。碎石时机可根据具体情况选择在拔"双 J 管"前后进行,具体经验是:如残石体积大,可选择先行 ESWL 处理后再择时拔"双 J 管",如残石体积小,则可选择在拔"双 J 管"或前或后行 ESWL 均可。

关键词: 肾后段下基底部;肾窦内肾盂;肾结石
中图法分类号: R692.405 文献标识码: B

参考文献:

[1] 胡叶成, 李宋荣, 邓景球, 等. 肾窦内肾盂加肾后下段联合切开治疗巨大鹿角形结石[J]. 广西医学杂志, 2003, 25(7): 1143.

[2] 吴阶平. 泌尿外科学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1993. 646-647.

(编辑 刘洪城)