文章编号:1000-5404(2006)09-0955-03

论著

附加二氮嗪与1,6-二磷酸果糖心麻痹液对冷保存大鼠心脏能量代谢的作用

陈建明,范士志,李 寒,李 坤,蒋耀光 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军胸外科中心,重庆 400042)

提 要:目的 观察附加二氮嗪(DZ)与1,6-二磷酸果糖(FDP)心麻痹液对冷保存大鼠心肌能量代谢的作用。**方法** 42只SD大鼠随机分为4组,正常对照组6只;其余各组每组12只,分别为STH组(单纯St. Thomas Ⅱ号液),DF组(St. Thomas Ⅱ号液+DZ 50 μmol/L+FDP 5 mmol/L),DF+5-HD组(St. Thomas Ⅱ号液+DZ50μmol/L+FDP5mmol/L+5-羟基葵酸盐100 μmol/L),在4 ℃条件下保存心脏6 h后,6只取左心室,测定心肌ATP、ADP、AMP含量,计算能荷;提取线粒体,测定线粒体内游离Ca^{2+}浓度($[Ca^{2+}]_m$)及线粒体呼吸功能;另外6只建立离体左心工作模型,再灌注30 min后,测量上述指标。**结果** 与正常对照组比较,冷保存后STH组心肌ATP含量及能荷显著下降,$[Ca^{2+}]_m$显著增高,线粒体Ⅲ态呼吸速率(ST_3)及呼吸控制比(RCR)明显降低($P<0.01$);再灌注后心肌ATP含量及能荷没有明显改善,$[Ca^{2+}]_m$进一步增高,RCR进一步降低($P<0.01$)。DF组各项指标显著优于STH组($P<0.01$);线粒体ATP敏感性钾通道阻断剂5-HD可部分降低附加DZ与FDP的保护效果。**结论** 附加DZ与FDP可显著改善St. Thomas液冷保存大鼠心脏的能量代谢。

关键词:二氮嗪;1,6-二磷酸果糖;心脏保存;能量代谢
中图法分类号:R322.11;R617;R96 **文献标识码**:A

Effect of cardioplegia solution supplemented with diazoxide and fructose-1, 6-diphosphate on myocardial energy metabolism in cold-preserved rat hearts

CHEN Jian-ming, FAN Shi-zhi, LI Han, LI Kun, JIANG Yao-guang (Department of Cardiothoracic Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of cardioplegia solution supplemented with diazoxide (DZ) and fructose-1,6-diphosphate (FDP) on myocardial energy metabolism in preserved rat hearts. **Methods** Forty-two SD rats were divided into 4 groups randomly including the control group, STH group (St. Thomas Ⅱ solution), DF group (St. Thomas Ⅱ solution with DZ 50 μmol/L + FDP 5.0 mmol/L) and DF + 5-HD group (St. Thomas Ⅱ solution with DZ 50 μmol/L + FDP 5.0 mmol/L + 5-hydroxydecanoate 100 μmol/L), with 6 rats in the control group, and 12 each in the other groups. Except the control group, 6 hearts were stored at 4 ℃ for 6 h, and another 6 hearts were reperfused for 30 min after stored at 4 ℃ for 6 h. The content of myocardial ATP, ADP, AMP were determined and energy charge (EC) were calculated. The mitochondrial Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_m$) and respiration function were also determined. **Results** As compared with normal controls, after stored at 4 ℃ for 6 h or reperfused for 30 min, the content of myocardial ATP, EC and mitochondrial respiratory control rate (RCR) decreased, and $[Ca^{2+}]_m$ increased significantly ($P<0.01$) in STH group. DF group had better results than STH group. Mitochondial ATP-sensitive potassium channel blocker 5-HD could partially decrease the effect of diazoxide and fructose-1,6-diphosphate on myocardial energy metabolism. **Conclusion** The results suggested that St. Thomas solution supplemented with diazoxide and fructose-1,6-diphosphate improve myocardial energy metabolism in hypothermic preserved rat hearts.

Key words: diazoxide; fructose-1,6-diphosphate; heart preservation; energy metabolism

心脏保存是关系到心脏移植成功与否的重要因素之一,而如何保证冷保存心肌的能量代谢是心脏保存中的一个关键环节。我们前期的初步研究显示附加二氮嗪(DZ)与1,6-二磷酸果糖(FDP)的心麻痹液,能明

作者简介:陈建明(1965-),男,云南省施甸县人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事心脏移植心脏保存方面的研究。电话:(023)68757241

收稿日期:2005-10-27;修回日期:2006-01-20

显改善大鼠心脏冷保存后心脏功能，减少冠脉流出液中乳酸脱氢酶（LDH）及磷酸肌酸激酶（CK）的含量[1]。但是DZ及FDP在延长心脏保存中的机制尚不明确，本实验重点观察附加DZ与FDP心脏麻痹液对冷保存大鼠心肌能量代谢的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器设备

DZ、FDP及5-羟基葵酸盐（5-HD）购于Sigma公司。离体心脏灌注系统及数据记录Powerlab系统由澳大利亚埃德公司提供。

1.2 实验动物及分组

健康成年大鼠42只，雌雄不限，体质量（250±30）g，由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。对大鼠编号查随机数字表，随机分为4组，正常对照组6只，取左室心肌；其余各组分别为STH组（单纯St. Thomas Ⅱ号液），DF组（St. Thomas Ⅱ号液+DZ 50 μmol/L+FDP 5 mmol/L），DF+5-HD组（St. Thomas Ⅱ号液+DZ 50 μmol/L+FDP 5 mmol/L+5-羟基葵酸盐100 μmol/L），每组12只分两个亚组，6只在4 ℃条件下保存心脏6 h后取左室心肌，另外6只在4 ℃条件下保存心脏6 h后，建立离体心脏工作模型[1]，再灌注30 min后取左室心肌。

1.3 方法

1.3.1 心肌ATP、ADP、AMP含量检测　采集心脏后，迅速切取部分心肌，用扭力天平准确称重后，-80℃低温保存。用高效液相色谱仪测ATP、ADP及AMP含量。以（ATP+0.5ADP）/（ATP+ADP+AMP）计算能荷（EC）。

1.3.2 线粒体的分离　按Faulk等[2]的方法进行。分离介质：250 mmol/L蔗糖，10 mmol/L Tris-HCl-1 mmol/L EGTA，pH 7.2（去离子水配制），4 ℃条件下分离心肌线粒体，1 h内完成。

1.3.3 线粒体内Ca^{2+}含量检测　按Faulk等[2]的方法略作改进。线粒体悬浮于体积分数1% HCl中，150 W×10 s超声3次后，30 000×g离心60 min，取上清，邻甲酚酞络合酮显色，575 nm波长比色。

1.3.4 线粒体呼吸功能测定　参照Poderoso等[3]的方法，以苹果酸钠和谷氨酸钠为底物，用Clark电极测定心肌线粒体ST_3，ST_4氧耗速率，并计算呼吸控制比（respiratory control rate，RCR）。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 冷保存6 h后及再灌注30 min后各组心肌ATP、ADP、AMP、TNA及能荷的变化

与正常对照组比较，各组心肌冷保存6 h后，心肌ATP含量及能荷显著下降（$P<0.01$），但DF组及DF+5-HD组显著高于STH组（$P<0.01$或$P<0.05$）。STH组再灌注30 min后心肌ATP含量及能荷没有明显改善；DF+5-HD组较STH组各项指标显著改善（$P<0.05$）；但显著低于DF组（$P<0.01$）。见表1。

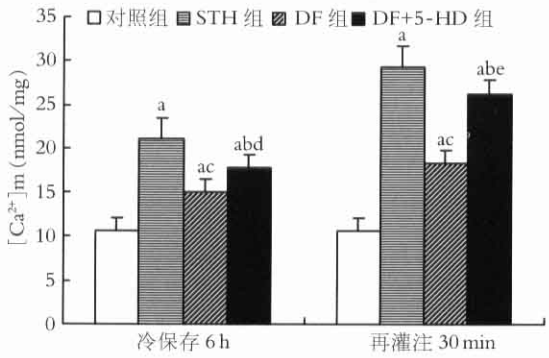
表1 各组心肌ATP、ADP、AMP的含量及能荷的变化（μmol/g，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	ATP	ADP	AMP	能荷
对照组	5.89±0.32	2.09±0.22	1.35±0.17	0.75±0.01
冷保存6 h				
STH组	1.19±0.15^{b}	1.15±0.13^{b}	1.67±0.14^{b}	0.44±0.03^{b}
DF组	2.64±0.20^{bd}	1.84±0.17^{d}	1.33±0.11^{d}	0.61±0.02^{bd}
DF+5-HD组	1.61±0.13^{bcf}	1.33±0.15^{bf}	1.38±0.15^{c}	0.53±0.02^{bdf}
再灌注30 min				
STH组	1.27±0.12^{b}	1.07±0.12^{b}	1.51±0.11	0.47±0.02^{b}
DF组	3.06±0.24^{bd}	1.58±0.15^{bd}	1.11±0.12^{ad}	0.66±0.04^{bd}
DF+5-HD组	1.71±0.17^{bcf}	1.31±0.10^{be}	1.53±0.11^{f}	0.52±0.02^{bcf}

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与STH组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与DF组比较

2.2 各组心肌线粒体内Ca^{2+}浓度的变化

心脏冷保存6 h后，各组心肌$[Ca^{2+}]_m$显著高于正常对照组（$P<0.01$），但DF组及DF+5-HD组$[Ca^{2+}]_m$显著低于STH组（$P<0.01$，$P<0.05$）。再灌注30 min后各组心肌$[Ca^{2+}]_m$进一步升高，DF组明显低于STH组及DF+5-HD组（$P<0.01$），见图1。



a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与STH组比较；d：$P<0.05$，e：$P<0.01$，与DF组比较

图1 心脏保存6 h后及再灌注30 min后$[Ca^{2+}]_m$的变化

2.3 各组心肌线粒体呼吸功能的变化

与正常对照组比较，各组心肌冷保存6 h后，ST_3及RCR明显降低（$P<0.01$），但DF组及DF+5-HD显著高于STH组（$P<0.01$或$P<0.05$），ST_4无明显变化。再灌注30 min后STH组和DF+5-HD组ST_3及RCR进一步降低，ST_4增高。DF组明显优于STH组及DF+5-HD组（$P<0.01$），见表2。

表 2　各组心肌线粒体呼吸功能的变化（$n=6$）

组别	ST3 氧耗速率 (nmol $O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)	ST4 氧耗速率 (nmol $O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$)	呼吸控制比 (RCR)
对照组	164.24 ± 14.53	34.89 ± 3.05	4.73 ± 0.48
冷保存 6 h			
STH 组	75.28 ± 8.20[b]	33.77 ± 3.40	2.24 ± 0.24[b]
DF 组	111.04 ± 9.97[bd]	35.37 ± 3.83	3.16 ± 0.30[bd]
DF + 5-HD 组	94.36 ± 8.53[bc]	33.95 ± 2.85	2.80 ± 0.40[b]
再灌注 30 min			
STH 组	69.02 ± 4.47[b]	44.90 ± 4.32[b]	1.54 ± 0.07[b]
DF 组	108.10 ± 8.86[bd]	38.07 ± 3.47[c]	2.85 ± 0.23[bd]
DF + 5-HD 组	86.66 ± 5.67[bcf]	42.27 ± 4.78[a]	2.07 ± 0.20[bcf]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与 STH 组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与 DF 组比较

3　讨论

心脏移植是治疗终末期心脏疾病的有效治疗手段，目前，移植心脏的冷保存时限仅为 4 ~ 6 h，远远低于肝、肾、胰腺等的保存时间。由于心脏含有大量的收缩蛋白，如肌动蛋白，肌球蛋白等，缺血期间心脏高能磷酸化合物的耗竭，使心肌钙离子超载，导致心脏缺血性挛缩，心脏移植后心功能不全仍是早期死亡的主要原因。因此，缺血及再灌注期间心肌三磷酸腺苷（ATP）水平与移植后心功能恢复密切相关，保持冷缺血期间心肌的能量储备是改善低温保存心脏的关键因素之一[4]。

线粒体损伤在心肌缺血再灌注损伤机制中起重要的作用，而 Ca^{2+} 超载在线粒体损伤中起关键作用。Ca^{2+} 超载导致线粒体肿胀，呼吸功能降低，ATP 产生受阻，从而通过不同途径引起细胞损伤，影响心脏功能的恢复[5]。线粒体内膜上 ATP 敏感的选择性 K^+ 通道（$MitoK_{ATP}$）开放可调节线粒体膜电位、膜通透性、Ca^{2+} 含量，还能改变线粒体基质含量及组成成分[6]，同时可调控线粒体的呼吸功能[7]。我们前期的研究显示附加 DZ 与 FDP 的心脏麻痹液，能明显改善冷保存后心脏功能，减少冠脉流出液中乳酸脱氢酶及磷酸肌酸激酶的含量[1]。但其机制需要进一步阐明。

本实验观察到，与正常对照组比较，STH 组冷保存后心肌 ATP 含量和 EC 显著下降，分别为正常对照组的 20.2% 和 58.7%；$[Ca^{2+}]_m$ 显著增高，RCR 明显降低（$P<0.01$）；再灌注后心肌 ATP 含量及能荷没有明显改善，$[Ca^{2+}]_m$ 进一步增高，RCR 进一步降低（$P<0.01$）。DF 组较 STH 组各项指标显著改善（$P<0.01$），冷保存后 ATP 及 EC 分别为正常对照组的 44.8% 和 81.3%；可能因线粒体 ATP 敏感性钾通道阻断剂 5-HD 的作用，DF + 5-HD 组再灌注后较 DF 组 $[Ca^{2+}]_m$ 显著增高，RCR 明显降低（$P<0.01$）。研究显示，给缺血心肌提供外源的 FDP 能通过细胞膜进入细胞，直接参与酵解过程，由于 FDP 为糖酵解中间产物，绕过了葡萄糖和 6-磷酸果糖磷酸化的耗能过程，1 mol FDP 酵解产生的 ATP 是 1 mol 葡萄糖酵解的 2 倍[8]。冷保存期间，心肌能量代谢以无氧酵解为主，因此给与 FDP 可显著增加心肌 ATP 含量和 EC。而 DZ 开放 $MitoK_{ATP}$ 可使线粒体膜去极化，并保持内膜完整，从而减轻再灌注时线粒体 Ca^{2+} 超载[9]。而 DF + 5-HD 组由于 5-HD 可能阻断了 DZ 的作用，再灌注后 $[Ca^{2+}]_m$ 增加，RCR 低于 DF 组，ATP 含量及能荷没有得到改善。由此可见 DZ 与 FDP 可能在不同时相，通过不同机制改善心肌能量代谢。

本实验结果表明，附加 DZ 与 FDP 的 St. Thomas 液可改善冷保存心脏的能量代谢，为心脏保存措施的改进提供了有益的探索。

参考文献：

[1] 陈建明，范士志，李　寒. 二氮嗪与 1,6 二磷酸果糖伍用对大鼠心脏保存作用的初步研究[J]. 重庆医学，2006，35(1)：46 - 48.

[2] FAULK E A, MCCULLY J D, TSUKUBE T, *et al.* Myocardial mitochondrial calcium accumulation modulates nuclear calcium accumulation and DNA fragmentation[J]. Ann Thorac Surg, 1995, 60(2): 338 - 344.

[3] PODEROSO J J, FERNANDEZ S, CARRERAS M C, *et al.* Liver oxygen uptake dependence and mitochondrial function in septic rats[J]. Circ Shock, 1994, 44 (4): 175 - 182.

[4] KU K, OKU H, ALAM M S, *et al.* Prolonged hypothermic cardiac storage with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution: comparison with glucose-insulin-potassium and University of Wisconsin solutions [J]. Transplantation, 1997, 64(7): 971 - 975.

[5] ROUSOU A J, ERICSSON M, FEDERMAN M, *et al.* Opening of mitochondrial K_{ATP} channels enhances cardioprotection through the modulation of mitochondrial matrix volume, calcium accumulation, and respiration[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(5): H1967 - H1976.

[6] HOLMUHAMEDOV E L, JOVANOVIC S, DZEJA P P, *et al.* Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels modulate cardiac mitochondrial function[J]. Am J Physiol, 1998, 275(5 Pt 2): H1567 - H1576.

[7] 梁晚益，黄跃生，杨宗城. 二氮嗪对严重烧伤大鼠心肌损害的保护作用及其机制[J]. 第三军医大学学报，2003，25(19)：1731 - 1733.

[8] HUA D, ZHUANG X, YE J, *et al.* Using fructose-1,6-diphosphate during hypothermic rabbit-heart preservation: a high-energy phosphate study[J]. J Heart Lung Transplant, 2003, 22(5): 574 - 582.

[9] DOS-SANTOS P, KOWALTOWSKI A J, LACLAU M N, *et al.* Mechanisms by which opening of the mitochondrial ATP- sensitive K + channel protects the ischemic heart[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(1): H284 - H295.

（编辑　陈聪连）