论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0786-03

二氮嗪与1,6-二磷酸果糖心麻痹液对大鼠心肌细胞的保护作用

陈建明,范士志,蒋耀光,王如文,何 勇,李 坤 (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 观察含二氮嗪(DZ)与1,6-二磷酸果糖(FDP)心麻痹液对冷保存大鼠心脏心肌细胞凋亡的影响。**方法** SD大鼠24只,分为3组($n=8$):对照组、STH组和DF组。离体心脏在4 ℃条件下保存6 h后,在Langendorff装置灌注20 min,转为离体左心脏工作模型10 min。实验终了取心肌组织,检测心肌细胞凋亡指数;心肌丙二醛(MDA)含量,心肌线粒体钙离子含量($[Ca^{2+}]_m$)、细胞质细胞色素C(Cyt c)含量、细胞质caspase-3活性;部分心肌液氮保存,采用RT-PCR检测心肌细胞caspase-3 mRNA含量。**结果** 与对照组比较,STH组与DF组再灌注后心肌细胞凋亡指数较明显升高($P<0.01$),但DF组明显低于STH组($P<0.01$)。STH组心肌MDA含量、$[Ca^{2+}]_m$、细胞质Cyt c含量显著增高,细胞质caspase-3 mRNA表达增加,caspase-3活性明显高于对照组($P<0.01$)。DF组较STH组各项指标显著改善($P<0.01$)。**结论** 含二氮嗪与1,6-二磷酸果糖心麻痹液能减少缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡。

关键词: 二氮嗪;1,6-二磷酸果糖;心脏保存;心肌细胞凋亡

中图法分类号: R322.11; R617; R96 **文献标识码:** A

Effects of cardioplegic solution supplemented with diazoxide and fructose-1,6-diphosphate on myocardial apoptosis of cryopreserved rat hearts

CHEN Jian-ming, FAN Shi-zhi, JIANG Yao-guang, WANG Ru-wen, HE Yong, LI Kun (Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of St. Thomas Ⅱ solution supplemented with diazoxide (DZ) and fructose-1,6-diphosphate (FDP) on myocardial apoptosis in cryopreserved rat hearts. **Methods** Twenty-four SD rats were randomly divided into 3 groups: control, STH and DF. The isolated hearts were stored at 4 ℃ for 6 h except control group, STH group in St. Thomas Ⅱ solution and DF group in St. Thomas Ⅱ solution supplemented with DZ and FDP. All hearts were perfused by Langendorff model for 20 min, then changed into isolated working heart model for 10 min. The myocardial cell apoptosis was determined with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling (TUNEL) method. The content of cytosolic malondialdehyde (MDA), the mitochondrial Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_m$) were detected and the content of cytosolic Cytochrome c (Cyt c) protein by Western blotting was evaluated. The expression of caspase-3 mRNA was evaluated by RT-PCR. The activity of cytosolic caspase-3 was determined with fluorescent assay. **Results** Compared with controls, the levels of apoptotic index, caspase-3 activity and its mRNA content, $[Ca^{2+}]_m$, the content of cytosolic MDA and Cyt c protein were significantly increased in STH group. These parameters of DF group were lower significantly than STH group ($P<0.01$). **Conclusion** Cardioplegic solution supplemented with DZ and FDP could restrain apoptosis of myocardial cells caused by ischemical reperfusion injury.

Key words: diazoxide; fructose-1,6-diphosphate; heart preservation; myocardial apoptosis

近年来研究表明,细胞凋亡在缺血再灌注损伤中起着重要的作用[1]。我们前期的实验观察到含二氮嗪(diazoxide, DZ)与1,6-二磷酸果糖(fructose-1,6-diphosphate, FDP)心麻痹液能促进冷保存大鼠心脏心功能的恢复[2],DZ及FDP在心脏保存中的作用机制需要进一步研究,本实验重点观察含二氮嗪与1,6-二磷酸果糖心麻痹液对冷保存大鼠心脏心肌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

DZ、FDP购于Sigma公司,兔抗大鼠Cyt-C、兔抗大鼠GAPDH购于Santa Cruz公司,生物素标记的羊抗兔二抗及Histostain™-Plus Kits购于北京中山生物技术有限公司,PCR试剂盒购于大连宝生物生物有限公司,MDA检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所。Thermo Hybaid PCR仪、Bio-Rad槽式电泳仪为美国Promega公司产品。

作者简介:陈建明(1965-),男,云南省保山市人,博士,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,发表论文20篇。电话:(023)68757241, E-mail:chenjm@mail.dph-fsi.com

通讯作者:范士志,电话:(023)68767289

收稿日期:2006-12-12;修回日期:2007-01-11

1.2　动物分组及动物模型

健康成年 SD 大鼠 24 只，雌雄不限，体质量 250 ~ 300 g，由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。随机数字表法分为 3 组（$n=8$）：对照组、STH 组和 DF 组，STH 组和 DF 组在 4 ℃条件下分别以 St. Thomas Ⅱ号液或 St. Thomas Ⅱ号液 + DZ 50 μmol/L + FDP 5 mmol/L 保存心脏 6 h，3 组均在 Langendorff 装置灌注 20 min 后，转为离体左心脏工作模型 10 min。

1.3　标本采集及指标检测

实验终了取心肌组织，TUNEL 法检测心肌细胞凋亡情况，在 10×40 倍的光镜下观察凋亡心肌细胞核呈深浅不一的棕褐色，细胞核膜、细胞膜完整。未凋亡的心肌细胞核呈蓝色。随机取 10 个视野，记数每个视野 TUNEL 阳性细胞数目和心肌细胞总数，以每视野计算的阳性细胞数所占的百分比作为凋亡细胞阳性指数，以 10 个视野的均值作为结果；部分心肌匀浆后差速离心法分离出心肌细胞线粒体及细胞质蛋白；按 Faulk 等[3]的方法测定心肌线粒体钙离子含量[Ca^{2+}]$_m$；硫代巴比妥酸（TBA）比色法测定心肌细胞内丙二醛（MDA）含量；Western blot 测定细胞质细胞色素 C（Cyt c）含量；荧光分光光度计细胞质 caspase-3 活性；部分心肌液氮保存，采用 RT-PCR 检测心肌细胞 caspase-3 mRNA 含量，从基因库（GenBank）中检索出 caspase-3 的序列，caspase-3 引物设计参照文献[4]进行，上游引物：5′-ATGGACAACAACGAAACCTCCGTG-3′，下游引物：5′-CCACTCCCAGTCATTCCTTTAGTG-3′；同时设 β-actin 阳性产物为 PCR 内参照，上游引物：5′-TAAAGACCTC TATGCCAACA-CAG-3′，下游引物：5′-CACGATGGAG GGGCCGGACTCATC-3′，所有引物由上海生物工程公司合成。

1.4　统计学处理

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

2　结果

2.1　各组心肌细胞凋亡指数变化

与对照组比较，STH 组与 DF 组冷保存 6 h，再灌注 30 min 后心肌细胞凋亡指数较明显升高（$P<0.01$）。但 DF 组心肌细胞凋亡指数明显低于 STH 组（$P<0.01$）。见表 1。

表 1　各组心肌细胞凋亡指数变化（%，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	心肌细胞凋亡指数
对照组	8	2.39 ± 0.67
STH 组	8	20.26 ± 2.07[a]
DF 组	8	8.50 ± 1.02[ab]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 STH 组比较

2.2　心肌组织丙二醛含量的变化

与对照组比较，STH 组与 DF 组冷保存 6 h，再灌注 30 min 后心肌组织丙二醛含量明显升高（$P<0.01$）。但 DF 组心肌组织丙二醛含量明显低于 STH 组（$P<0.01$）。见表 2。

表 2　心肌组织丙二醛含量的变化（nmol/mg，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	丙二醛含量
对照组	8	4.21 ± 0.70
STH 组	8	11.34 ± 1.48[a]
DF 组	8	7.15 ± 1.02[ab]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 STH 组比较

2.3　各组心肌线粒体钙离子含量变化

与对照组比较，STH 组与 DF 组冷保存 6 h，再灌注 30 min 后心肌细胞[Ca^{2+}]$_m$ 明显升高（$P<0.01$）。但 DF 组心肌细胞[Ca^{2+}]$_m$ 明显低于 STH 组（$P<0.01$）。见表 3。

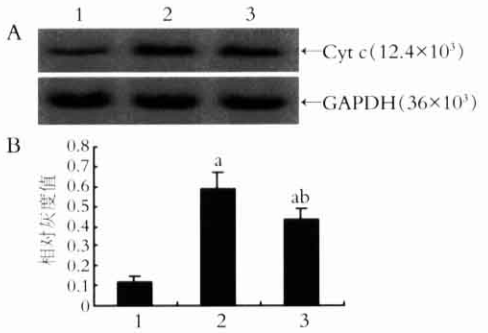
表 3　各组心肌线粒体钙离子含量变化（nmol/mg，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	线粒体钙离子浓度
对照组	8	10.34 ± 0.98
STH 组	8	35.83 ± 2.64[a]
DF 组	8	18.78 ± 1.61[ab]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 STH 组比较

2.4　细胞质 Cyt c 蛋白含量的变化

冷保存 6 h，再灌注 30 min 后，STH 组与 DF 组心肌细胞质 Cyt c 蛋白含量均较对照组增高（$P<0.01$）；但 DF 组细胞质 Cyt c蛋白含量侧低于 STH 组（$P<0.05$），见图 1。



A：Western blot 结果；B：相对灰度值变化

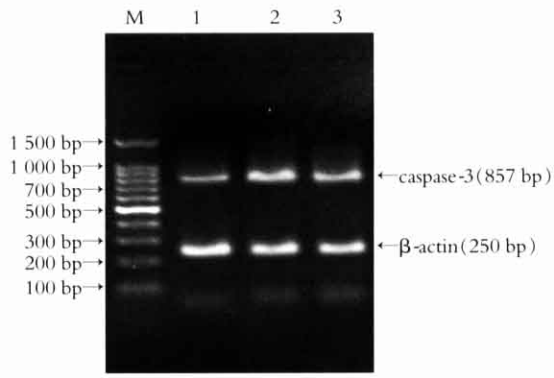
1：对照组；2：STH 组；3：DP 组

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 STH 组比较

图 1　心肌细胞细胞质 Cyt c 蛋白相对含量的变化

2.5　心肌细胞 caspase-3 mRNA 含量变化

如图 2 所示，可见 3 组皆可见明亮的 β-actin 内参照条带（250 bp），且无明显差别。3 组在 857 bp 处皆可见的特异性 caspase-3 基因条带，但强弱不等。对照组心肌细胞呈一弱阳性条带，冷保存 6 h，再灌注 30 min 后，STH 组与 DF 组心肌 caspase-3 mRNA 表达水平均高于对照组（$P<0.01$），但 DF 组 caspase-3 mRNA 表达水平低于 STH 组（$P<0.05$），见表 4。



M：标准；1：对照组；2：STH 组；3：DF 组

图 2　各组 caspase-3 mRNA 表达

表4 心肌细胞 caspase-3 mRNA 含量变化(相对吸光度值,$\bar{x} \pm s$)

组别	n	caspase-3 mRNA 含量
对照组	8	0.173 ± 0.047
STH 组	8	0.689 ± 0.078[a]
DF 组	8	0.434 ± 0.057[ab]

a: $P<0.01$, 与对照组比较; b: $P<0.01$, 与 STH 组比较

2.6 心肌组织 caspase-3 活性变化

STH 组与 DF 组心肌组织 caspase-3 活性明显高于对照组($P<0.01$)。但 DF 组心肌组织 caspase-3 活性低于 STH 组($P<0.01$),见表5。

表5 心肌组织 caspase-3 活性($\bar{x} \pm s$)

组别	n	相对荧光强度
对照组	8	1.000 ± 0.000
STH 组	8	4.668 ± 0.602[a]
DF 组	8	2.586 ± 0.176[ab]

a: $P<0.01$, 与对照组比较; b: $P<0.01$, 与 STH 组比较

2.7 主要指标间的相关性分析

心肌细胞凋亡指数与心肌 MDA 含量之间正相关($r=0.930, P<0.01$);与心肌$[Ca^{2+}]_m$含量之间正相关($r=0.985, P<0.01$);与细胞质 Cyt c 含量之间正相关($r=0.896, P<0.01$);细胞质 Cyt c 含量与 caspase-3 活性之间正相关($r=0.876, P<0.01$);心肌细胞凋亡指数与 caspase-3 活性之间正相关($r=0.946, P<0.01$)。

3 讨论

实验观察到,STH 组与 DF 再灌注后心肌细胞凋亡指数均较对照组明显升高($P<0.01$),证实凋亡在心肌缺血再灌注损伤中起着重要的作用。同时也观察到 DF 组心肌细胞凋亡指数明显低于 STH 组($P<0.01$)。结合前期的实验结果,说明细胞凋亡与心脏保存后心功能的恢复有关,如何减轻离体心脏缺血再灌注后心肌细胞发生凋亡的程度是评价心脏保存效果的重要指标。下面就含 DZ 与 FDP 心麻痹液对冷保存大鼠心脏心肌细胞凋亡影响的可能机制进行讨论。

实验中观察到冷保存心脏再灌注后,心肌 MDA 含量明显高于对照组,心肌 MDA 含量与心肌凋亡指数呈正相关关系,说明自由基损伤在缺血再灌注引起心肌细胞凋亡的过程中起着重要的作用,DF 组再灌注后心肌 MDA 含量明显低于 STH 组,表明含二氮嗪与1,6-二磷酸果糖心麻痹液能减少再灌注后心肌自由基的产生。FDP 可能通过以下方式抑制氧自由基的毒性作用[5]:①稳定细胞膜、溶酶体膜等膜性结构,防止白细胞黏附激活产生超氧化物。②改善能量代谢,提供更多的 ATP, ATP 在酶的作用下分解生成腺苷,后者则作用于中性粒细胞的 A2 受体抑制氧自由基产生。③抑制 Ca^{2+} 内流。④抑制黄嘌呤氧化酶转化为黄嘌呤脱氢酶。⑤直接的抗氧化作用。而 DZ 则通过开放线粒体 ATP 敏感的 K^+ 通道($MitoK_{ATP}$)调节活性氧的产生,减少再灌注时自由基的生成[6]。

研究表明,线粒体损伤在缺血再灌注引起心肌细胞凋亡中起着重要的作用[7]。目前认为,线粒体膜功能的破坏是许多外来刺激诱导细胞凋亡的共同通路,线粒体膜电位下降和通透性转换孔(permeability transition pore, PTP)的开放是心肌细胞凋亡早期的重要特征。实验结果显示, STH 组心脏再灌注后,线粒体内 Ca^{2+} 含量显著增高,细胞质 Cyt c 含量也显著上升,提示缺血再灌注导致线粒体钙超载和线粒体损伤,引起线粒体 Cyt c 大量释放至细胞质中。细胞质 Cyt c 含量的增高与 caspase-3 mRNA 含量及 caspase-3 活性的增加呈正相关, STH 组心肌细胞凋亡指数最高,表明线粒体损伤导致的 Cyt c 释放及 caspase-3 激活,在心肌缺血再灌注引起心肌细胞凋亡的过程中起着重要的作用。

DF 组再灌注后心肌细胞$[Ca^{2+}]_m$,细胞质 Cyt c 的含量,细胞质 caspase-3 mRNA 含量,caspase-3 活性及心肌细胞凋亡指数均显著低于 STH 组($P<0.01$),可能与 DZ 通过开放 $MitoK_{ATP}$使线粒体膜去极化,并保持内膜完整,减轻再灌注时线粒体 Ca^{2+} 超载以及 FDP 提供冷缺血期间维持细胞膜离子转运所需的部分能量有关[8,9]。表明附加 DZ 与 FDP 的心麻痹液能减少缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡。

参考文献:

[1] McCully J D, Wakiyama H, Hsieh Y J, *et al*. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(5): H1923 - H1935.

[2] 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): 40 - 42.

[3] 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.

[4] Sparagna G C, Hickson-Bick D L, Buja L M, *et al*. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(5): H2124 - H2132.

[5] Chu S J, Chang D M, Wang D, *et al*. Fructose-1,6-diphosphate attenuates acute lung injury induced by ischemia-reperfusion in rats[J]. Crit Care Med, 2002, 30(7): 1605 - 1609.

[6] Han J, Kim N, Park J, *et al*. Opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels evokes oxygen radical generation in rabbit heart slices[J]. J Biochem (Tokyo), 2002, 131(5): 721 - 727.

[7] Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, *et al*. Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes[J]. Circ Res, 2003, 92(2): 186 - 194.

[8] Rousou A J, Ericsson M, Federman M, *et al*. Opening of mitochondrial KATP 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.

[9] 陈建明,范士志,李 寒,等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 955 - 957.

(编辑 邓强庭)