文章编号:1000-5404(2007)09-0789-03

论著

二氮嗪预处理对缺血再灌注大鼠心肌 NF-κB 和 caspase-3 表达的影响

沈 诚,范士志,陈建明,李志平,李 寒 (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 研究二氮嗪(Diazoxide, DZ)开放线粒体 ATP 敏感性钾通道对缺血再灌注损伤所致大鼠心肌组织 NF-κB 和 caspase-3 表达的影响。**方法** 采用离体工作心脏灌注模型,大鼠随机分为正常对照组,缺血再灌注组,DZ 治疗组,DZ 抑制剂-格列苯脲组。采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡,Western 印迹法测定心肌 NF-κB 活性,酶标法测 caspase-3 活性。**结果** DZ 组大鼠心肌细胞凋亡指数明显低于 I/R 组,高于对照组。与正常对照组相比,心肌组织 NF-κB 和 caspase-3 活性在缺血再灌注后有显著性增加($P<0.01$)。DZ 处理后,NF-κB 和 caspase-3 活性与缺血再灌注组相比有明显下降($P<0.01$);格列苯脲组 NF-κB 和 caspase-3 活性明显高于 DZ 治疗组($P<0.01$)。**结论** 心肌缺血再灌注损伤使凋亡指数,NF-κB 和 caspase-3 活性明显升高,二氮嗪(DZ)开放线粒体 ATP 敏感性钾通道可下调心肌组织 NF-κB 和 caspase-3 的表达,这可能有助于减轻缺血再灌注所致心肌细胞凋亡的发生。

关键词: TP 敏感性钾通道;缺血再灌注; NF-κB; caspase-3
中图法分类号: R322.11; R329.26; R972.4 **文献标识码**: A

Role of Diazoxide in mediating NF-κB and caspase-3 during ischemia-reperfusion in rat cardiac muscles

SHEN Cheng, FAN Shi-zhi, CHEN Jian-ming, LI Zhi-ping, LI Han (Thoracic and Cardiovascular Surgery Research Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Diazoxide in mediating NF-κB and caspase-3 during ischemia-reperfusion in rat cardiac muscles. Methods Isolated rat heart model was used in our experiment. Forty male SD rats were randomly divided into normal control group, ischemia-reperfusion group, Diazoxide treatment group, Diazoxide inhibitor group ($n=10$ in each group). The apoptosis index of cardiac myocytes was detected by TUNEL. The expression NF-κB was measured by Western blotting. Caspase-3 levels in myocardium were measured by using fluorescent assay. Results The apoptosis index in DZ group was significantly lower than that in ischemia-reperfusion group, but higher than that in control group. NF-κB level in nucleus significantly increased after ischemia-reperfusion and caspase-3 activity had the same change. Treatment of Diazoxide significantly inhibited NF-κB level in nucleus, and concomitantly decreased the activity of caspase-3 in myocardium. The Diazoxide inhibitor could significantly increase the expression of NF-κB and the activity of caspase-3. Conclusion Myocardial ischemia-reperfusion can result in intensive activation of NF-κB and caspase-3. Early treatment with Diazoxide might attenuate myocardial injury induced by ischemia-reperfusion and relieve the apoptosis of cardiac myocytes.

Key words: $MitK_{ATP}$; ischemia-reperfusion; NF-κB; caspase-3

细胞凋亡是一种在基因控制下的细胞主动死亡,是近年来细胞生物学的研究热点之一。细胞凋亡被认为是许多常见心脏疾病病理机制的重要组成部分,包括慢性心力衰竭、心源性猝死、病毒性心肌炎和心肌缺血。心肌缺血再灌注损伤,可促进心肌细胞凋亡,从而导致和加重心脏功能的损害。NF-κB 及 caspase-3 均可介导心肌细胞凋亡。心肌 ATP 敏感钾离子通道(ATP-sensitive potassium channel, K_{ATP}通道)是心肌细胞内一种可被细胞内 ATP 和其他腺嘌呤核苷酸抑制

作者简介:沈 诚(1975-),男,湖南省湘潭市人,博士研究生,讲师,主要从事缺血再灌注心肌的保护方面的研究,发表论文 8 篇。电话:(023)60653590, E-mail:sc941@sina.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

的内向整流 K^+ 通道，可调节正常心肌细胞线粒体结构和功能。近来发现既往临床曾应用的降压药物二氮嗪（diazoxide，DZ）是一种选择性 $mitoK_{ATP}$ 通道开放剂[1]。缺血再灌注损伤中，线粒体 ATP 敏感性钾通道与 NF-κB 和 caspase-3 表达关系的研究目前尚为缺乏。本研究采用离体大鼠心脏灌注模型，通过研究二氮嗪对缺血再灌注损伤心肌 NF-κB 及 caspase-3 表达的影响，为二氮嗪防治和减轻心肌缺血再灌注损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组

40 只雄性清洁级 SD 大鼠由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供，体质量 200～250 g，按随机数字表法分为 4 组。①正常对照组（10 只）：麻醉后切开胸腔取正常心肌。②缺血再灌注组（10 只）：取心脏，建立离体灌注模型；Krebs-Henseleit 缓冲液预灌注 15 min，待心脏稳定搏动后，给予常规含钾停搏液灌注，33 ℃停灌 30 min，复灌 30 min。③二氮嗪治疗组（DZ 组，10 只）：取心脏，建立离体灌注模型；待心脏稳定搏动后，给予常规含钾停搏液 + DZ 灌注，33℃停灌 30 min，复灌 30 min。④二氮嗪抑制剂-格列苯脲组（格列苯脲组，10 只）：取心脏，建立离体灌注模型；待心脏稳定搏动后，给予格列苯脲（3 mg/kg），10 min 后给予停搏液 + DZ 灌注，33 ℃停灌 30 min，复灌 30 min。

1.2 离体工作心脏灌注模型

动物充分麻醉后，置于动物台上并固定。剪开腹部，暴露下腔静脉，按 3 mg/kg 经下腔静脉注射肝素生理盐水。1 min 后充分肝素化，剪开腹腔血管放血。迅速开胸，游离主动脉至无名动脉远端，并剪断，迅速将其余大血管一并结扎并剪断，取出心脏，置于 4 ℃ K-H 液中简单修剪。开启离体心脏灌注系统，流量约 15 ml/min。显微器械提起主动脉，将灌注管道插入，置于主动脉瓣及冠状动脉开口上方，打结固定，开始灌注，心脏迅速恢复搏动。在肺动脉圆锥处剪一小口，使冠脉流出液自然流出。剪开左心耳，将左心室测压管经切口、左心房、二尖瓣插入，并将另一连于灌输瓶的灌注管插入左心房，打结固定。连接各测压管道并调零，开始测压。调整离体心脏灌注系统转速及流量，使主动脉根部压力约 80 cmH_2O，而灌注瓶与左心房落差约 20 cm。心脏持续稳定搏动。待心脏稳定搏动 15 min 后，关闭灌注系统，心脏逐渐停搏。心肌缺血 30 min。重新开启关注系统，心脏迅速恢复搏动，起初心率较慢，搏动不稳定，2～3 min后逐渐恢复。实验终了取心肌，留取标本，进行指标检测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 心肌细胞凋亡检测　按常规病理组织学方法制备心肌石蜡标本。原位缺口末端标记法（TUNEL）检测，步骤按试剂盒（武汉博士德分装）推荐的方法进行。TUNEL 阳性反应为细胞核呈棕褐色或棕黄色颗粒，细胞核呈 TUNEL 阳性反应且具备细胞凋亡的形态学特征者被判定为凋亡细胞。每张切片随机取 5 个高倍镜（×400）视野，计数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数，两者比值×100% 为凋亡百分率，即凋亡指数（AI）。

1.3.2 蛋白质印迹（Western 印迹）检测 NF-κB 活性　核蛋白的提取方法如下，取液氮中保存的大鼠心肌组织标本，于 4 ℃ PBS 溶液中解冻后称重，每克组织加入 10 ml 细胞裂解缓冲液，冰上放置 15 min，玻璃匀浆器进行匀浆，4 ℃，3 000 × g 离心 10 min，去上清，所得沉淀即为细胞核。将收集的细胞核加入 4 倍体积核蛋白提取液，用玻璃匀浆器匀浆，于冰上轻柔搅拌破坏核膜 30 min，4 ℃，12 000 × g 离心 30 min 后收集上清（核蛋白液），经 Bradford 法蛋白定量后，保存于 -80 ℃ 备用。取核蛋白样品加等体积的 2 × 电泳样品缓冲液加热变性后，以 20 μg 蛋白/泳道上样，经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳后，电转移至硝酸纤维膜。丽春红 S 染色确定转膜情况并标记蛋白质标准参照物位置。用 5% 脱脂奶粉封闭后，先后加入一抗（核因子 κB p65 抗体）及辣根过氧化物酶标记的二抗 NF-κB 的平均灰度值。

1.3.3 心肌组织中 caspase-3 检测　在心尖部取心肌组织约 0.5 g，加入细胞质萃取液（Biovision）1 ml，匀浆后静置 5 min，700 × g 离心 10 min，取上清液，10 000 × g 再离心 30 min，所得上清液即为细胞的细胞质部分，以上操作均在 4 ℃ 下完成。取胞浆液 70 μl，孵育液 128 μl 和 AC-DEVD-AMC 2 μl（终浓度 100 μmol/L）加入 96 孔板，震荡混合后 37 ℃ 孵育。每 10 min 用酶标仪检测 AC-DEVD-AMC 的荧光强度，共 60 min，激发光 380 nm，发射光 460 nm。依据每个样本 AC-DEVD-AMC 不同时间点的荧光强度值进行一元线性回归分析，计算 r^2，求出每个样本荧光强度变化速率，再除以蛋白浓度和时间，所得数据表示 caspase-3 的活性，单位为 FU · μg^{-1} · min^{-1}。

1.4 统计学处理

各项均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行组间比较单因素方差分析。caspase-3 活性方程采用一元线性回归拟合。

2 结果

2.1 细胞凋亡检查

正常对照组未见明显凋亡，而缺血再灌注组可见到心肌细胞明显凋亡（$P<0.01$）。DZ 组给予 DZ 处理心肌 AI 较缺血再灌注组也有明显降低（$P<0.01$），但仍明显高于正常，格列苯脲组 AI 明显高于 DZ 组（$P<0.05$），但仍低于缺血再灌注组（$P<0.01$）。见表 1。

表 1 大鼠心肌细胞 AI 比较（%，$\bar{x} \pm s$）

组别	例数	AI
正常对照组	10	1.38 ± 0.35
缺血再灌注组	10	12.41 ± 3.16[a]
DZ 组	10	5.33 ± 1.64[ab]
格列苯脲组	10	8.16 ± 2.35[bc]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与缺血再灌注组比较；c：$P<0.01$，与 DZ 组比较

2.2　各组心肌 NF-κB 表达的变化

正常对照组心肌组织 NF-κB 的表达均较微弱；而缺血再灌注组可见到 NF-κB 表达较正常对照组显著增高（$P<0.01$）。DZ 组心肌 NF-κB 活性较缺血再灌注组也有明显降低（$P<0.01$），但仍明显高于正常。格列苯脲组 NF-κB 活性明显高于 DZ 组（$P<0.01$），但仍低于缺血再灌注组（$P<0.01$）。见表2。

表2　大鼠心肌细胞 NF-kB 及 caspase-3 的表达

组别	例数	NF-κB	caspase-3（FU·μg^{-1}·min^{-1}）
正常对照组	10	23.66±5.45	0.29±0.07
缺血再灌注组	10	87.47±14.57[a]	1.28±0.25[a]
DZ 组	10	39.53±11.99[ab]	0.49±0.13[ab]
格列苯脲组	10	61.05±9.76[bc]	1.25±0.21[c]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与缺血再灌注组比较；c：$P<0.01$，与 DZ 组比较

2.3　各组心肌 caspase-3 活性变化

正常对照组心肌 caspase-3 活性较低，缺血再灌注组 caspase-3 活性则明显增高，与正常对照组比较有显著性差异（$P<0.01$）。DZ 组心肌 caspase-3 活性虽然仍明显高于正常，但较缺血再灌注组也有明显降低（$P<0.01$），相反格列苯脲组 caspase-3 活性与缺血再灌注组无显著差异，明显高于 DZ 组（$P<0.01$）。见表2。

3　讨论

$MitK_{ATP}$通道是包括一个 55×10^3 内向 K^+ 通道和一个 63×10^3 磺脲类受体异源多聚体，当线粒体基质 ATP 不足时，此通道开放，线粒体产生内向 K^+ 电流，线粒体基质体积短时增大，呼吸链活性显著增强。二氮嗪是 $MitK_{ATP}$通道的特异性开放剂，对线粒体上的 ATP 敏感性钾通道作用强大而对细胞膜的 ATP 敏感性钾通道作用相对较弱。Beresewicz 等[2,3]研究证实，它可模拟缺血预处理效应产生心肌保护作用。有报道表明，缺血预处理早期减少缺血再灌注损伤的部分原因来自于缺血预处理降低缺血再灌注心肌细胞凋亡[4]。因此，我们推测二氮嗪预处理是否通过降低缺血再灌注心肌细胞凋亡从而产生心肌保护作用。本研究结果显示，与对照组相比，缺血再灌注组心肌细胞凋亡率明显的升高（$P<0.01$），而二氮嗪预处理组大鼠心肌细胞凋亡率明显低于缺血再灌注组（$P<0.01$）。可见二氮嗪预处理产生心肌保护作用有可能是由于降低了心肌再灌注损伤时心肌细胞凋亡的原因。

NF-κB 是一种具有基因转录多向调控作用的转录因子。有证据显示 NF-κB 参与心肌缺血再灌注导致的心肌的炎性反应、凋亡、坏死、心功能下降等心血管疾病的发生、发展。首先，心肌细胞凋亡过程中伴有 NF-κB 的活化[5]；其次，NF-κB 的靶基因包括 Fas、Fas 配体及 p53 等促凋亡基因。Maulik 等[6]观察心肌缺血再灌注大鼠模型发现，缺血后 NF-κB 活化持续增高，心肌再灌注则进一步放大缺血所致的 NF-κB 激活效应。本研究表明，正常大鼠心肌组织有较少量的 NF-κB 表达，缺血再灌注组大鼠心肌组织中 NF-κB 的表达显著上调（$P<0.01$），而二氮嗪预处理大鼠心肌组织中 NF-κB 表达则明显低于缺血再灌注组（$P<0.01$）。因而推测二氮嗪预处理具有减少心肌缺血再灌注后 NF-κB 的过度表达的作用，从而减轻心肌缺血再灌注后细胞凋亡的发生。

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶（caspase-3）处于细胞凋亡过程中的关键地位，它在各种生理和病理因素刺激下经过多因子复杂的相互作用后，被激活而降解其作用底物产生终末事件，引起细胞特征性的凋亡形态学上的改变，加重组织或器官的功能损害。本实验数据表明，缺血再灌注损伤模型中 caspase-3 表达明显增加。二氮嗪治疗组下调心肌组织中 caspase-3 水平，保护心肌。同时，应用格列苯脲可减少二氮嗪的这种保护作用。由此证明二氮嗪开放 $MitoK_{ATP}$通道可抑制心肌缺血再灌注时 caspase-3 过度表达，减轻心肌损伤。

总之，线粒体 ATP 敏感性钾通道开放可以预防心肌缺血再灌注后引起的伤害，其机制可能与抑制 NF-κB 、caspase-3 活性，减少心肌细胞凋亡的发生有关。

参考文献：

[1] Domoki F, Kis B, Nagy K, *et al*. Diazoxide preserves hypercapnia-induced arteriolar vasodilation after global cerebral ischemia in piglets [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289(1): H368-H373.

[2] Beresewicz A, Maczewski M, Duda M. Effect of classic preconditioning and diazoxide on endothelial function and O_2^- and NO generation in the post-ischemic guinea-pig heart [J]. Cardiovasc Res, 2004, 63(1): 118-129.

[3] Marina-Prendes M G, Rastelli A H, Astudilla C, *et al*. Influence of fasting on the effects of diazoxide in the ischemic-reperfused rat heart [J]. J Physiol Biochem, 2004, 60(1): 51-58.

[4] Nahibin V S, Dosenko VIe, Pyvovar S M, *et al*. Fluorine-containing analog of diazoxide prevented apoptosis in neonatal cardiomyocytes during anoxia-reoxygenation[J]. Fiziol Zh, 2004, 50(3): 3-8.

[5] Yeh C H, Chen T R, Wu Y C, *et al*. Inhibition of NFkappaB activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocytic apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion[J]. J Surg Res, 2005, 125(1): 109-116.

[6] Maulik N, Sasaki H, Addya S, *et al*. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors[J]. FEBS Lett, 2000, 485(1): 7-12.

（编辑　邓强庭）