文章编号:1000-5404(2008)09-0807-03

论著

二氮嗪预处理对大鼠缺血性损伤心肌线粒体功能的保护作用

黄 河[1],肖颖彬[1],杨天德[2],李 洪[2],李永旺[2] (第三军医大学新桥医院:[1]全军心血管外科中心,[2]麻醉科,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨线粒体 ATP 敏感性钾通道开放剂二氮嗪预处理对大鼠心肌细胞线粒体功能保护作用。**方法** 采用大鼠异丙肾上腺素心肌损伤模型,30 只大鼠分成对照组、异丙肾上腺素(ISO)损伤组、二氮嗪(DZ)预处理组;以氧电极法测线粒体呼吸,罗丹明 123 为荧光探针测定线粒体膜电位,采用定磷法检测 Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶活性。比较各组心肌细胞线粒体Ⅲ态呼吸速率、线粒体Ⅳ态呼吸速率、线粒体呼吸控制率和线粒体膜电位以及线粒体 ATP 酶的活性。**结果** ISO 组线粒体Ⅲ态呼吸速率呼吸控制率、线粒体膜电位以及 Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶活性与对照组比较显著下降($P<0.01$);DZ 预处理组Ⅲ态呼吸速率、呼吸控制率和线粒体膜电位($P<0.05$)以及 Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-ATP 酶活性较对照组低($P<0.01$),但与 ISO 组比较明显恢复。各组对Ⅳ态呼吸速率没有明显影响。**结论** 线粒体 ATP 敏感性钾通道开放剂二氮嗪能增强心肌细胞线粒体酶活性,产生预处理心肌细胞线粒体保护效应。

关键词:二氮嗪;线粒体;ATP 酶;呼吸控制率;膜电位
中图法分类号:R364.12;R654.202;R972 **文献标识码:**A

Preconditioning with mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener, diazoxide, protects the myocardial mitochondial functions after ischemic injury in rats

HUANG He[1], XIAO Ying-bin[1], YANG Tian-de[2], LI Hong[2], LI Yong-wang[2] ([1]Department of Cardiovascular Surgery, [2]Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of preconditioning with mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener on the mitochondrial functions. **Methods** Thirty SD rats were used. Isoproterenol was used to induce myocardial ischemic injury in 20 rats, ten of which were pretreated with diazoxide. Rhodamine123 (Rh123) was used as fluorescent prober to measure mitochondrial membrane potential. The activities of mitochondrial Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase were detected. The mitochondrial respiratory parameters were recorded with a Clark electrode. The effect of diazoxide on mitochondrial membrane potential and mitochondrial respiration was investigated. **Results** Compared with the controls, the levels of state 3 (ST3), respiratory control rate (RCR), mitochondrial membrane potential content and the activities of mitochondrial ATPase were decreased in the rats that received isoproterenol, while diazoxide pretreatment alleviated the changes of ST3, RCR, mitochondrial membrane potential and the activities of mitochondrial ATPase. **Conclusion** Preconditioning with diazoxide enhances the activities of mitochondrial ATPase and protects the myocardial mitochondrial function after isoproterenol induced myocardial ischemic injury.

Key words: diazoxide; mitochondrion; ATPase; respiration control rate; membrane potential

二氮嗪(diazoxide,DZ)是目前最常用的线粒体 ATP 敏感性钾通道($MitoK_{ATP}$)的特异性开放剂。近年研究显示,DZ 可激活内源性心肌保护机制,具有抗心肌缺血缺氧损伤作用,且无心律失常及负性肌力等副作用[1]。目前普遍认为 DZ 的作用靶点在线粒体,它对 $MitoK_{ATP}$ 的开放作用是细胞膜 ATP 敏感性钾通道($SarcK_{ATP}$)的 2 000 倍,但有关 DZ 预处理的研究多采用离体灌注心肌和培养心肌细胞模型,而在体实验很少,脱离了心脏原来的环境,其结果很难延伸到同样条件的在体心脏。本研究采用大鼠异丙肾上腺素心肌损伤模型,在体观察二氮嗪预处理对心肌细胞损伤后的线粒体功能与结构以及线粒体 ATP 酶活性的影响,以进一步探讨 DZ 的药理学特点。

基金项目:国家自然科学基金(30500211)
Supported by the National Nature Science Foundation of China (30500211)
作者简介:黄 河,男,贵州省贵阳市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事心肌缺血保护方面的研究。电话:(023)65227523,E-mail:deep5559@hotmail.com
通信作者:肖颖彬,电话:(023)68755607
收稿日期:2007-11-21;修回日期:2008-01-31

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

DZ、罗丹明123（Rh-123）购自Sigma公司，异丙肾上腺素（ISO）购自上海禾丰制药公司，Na^+-K^+-ATP酶试剂盒、Ca^{2+}-ATP酶试剂盒购自南京建成生物工程研究所，低温离心机购自德国Epeddof公司，Clark氧电极由解放军304医院提供。

1.2 动物及分组与给药

雄性健康清洁级SD大鼠共30只，6～8月龄，体质量180～220 g，由第三军医大学实验动物中心提供。将大鼠分为对照组、ISO组和DZ预处理组。对照组腹腔注射等体积相应溶媒（NaOH 0.04 mol/L）；ISO组：皮下注射ISO 5 mg/kg，24 h后重复注射1次，第2次注射后1 h处死动物；DZ预处理组：腹腔注射DZ 20 mg/kg，每日1次，共3 d，第3天开始皮下注射ISO，方法同ISO组。每组10只。

1.3 线粒体制备

根据李兵等[2]的方法制备。大鼠断头处死，迅速取出心脏，按1∶10（质量体积比）加入0～4 ℃的线粒体分离介质，组织剪碎后匀浆。1 500×g离心3 min，去掉上面白色脂质层，取上清12 000×g离心10 min。清洗1次（上清12 000×g离心10 min），最后将沉淀用适量分离介质悬浮，调整蛋白浓度在10～20 mg/ml。线粒体蛋白浓度测定用Lowry法，以牛血清白蛋白为标准蛋白。取新鲜的线粒体悬液测量呼吸活性和膜电位。以上操作均在0～4 ℃下完成。

1.4 线粒体呼吸功能测定

参照Essop等[3]的方法测定。反应总体积1.6 ml，温度28 ℃。将1.5 ml反应介质加入反应池中孵育2 min，以空气饱和，然后加入线粒体悬液0.1 ml，预温1～2 min后，依次加入反应底物（0.5 mol/L苹果酸钠和0.5 mol/L谷胺酸钠的混合物）10 μl、ADP（0.1 mol/L）5 μl，观察线粒体呼吸态的变化，记录氧耗曲线，计算在ADP加入后Ⅲ态呼吸（state 3，ST3）和ADP耗尽后Ⅳ态呼吸（state 4，ST4）的氧耗量。线粒体呼吸活性（R）以每毫克线粒体蛋白每分钟氧消耗量消耗表示（nmol·min^{-1}·mg^{-1}），呼吸控制率（RCR）以Ⅲ态、Ⅳ态耗氧之比（ST3/ST4）表示。

1.5 线粒体膜电位测定

参照Baracca等[4]的方法。吸取2 ml线粒体膜电位测定反应介质于试管中，加入1 μl罗丹明123（0.5 mmol/L），混匀，荧光分光光度计上设定激发波长500 nm、发射波长525 nm，检测基础荧光值F1，测定后将液体吸入原试管中，加入100 μl线粒体悬液，25 ℃孵育15 min，5 000×g离心10 min，取上清，测定荧光值F2，计算每毫克线粒体引起荧光值的变化（△F）=（F1－F2）/线粒体蛋白（mg），△F代表罗丹明123结合到线粒体基质的多少，反应了线粒体平均膜电位的高低。

1.6 线粒体ATP酶活性检测

将分离的线粒体用冰冷匀浆介质制成混悬液，用超声粉碎机使线粒体破碎，然后用超微量ATP酶试剂盒检测。BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白质定量。按照试剂盒（南京建成生物工程研究所）说明书测定Na^+-K^+-ATP酶和Ca^{2+}-ATP酶的活性，ATP酶的活性以每小时每毫克蛋白分解ATP产生1 μmol无机磷的量为一活力单位（μmol·mg^{-1}·h^{-1}）。

1.7 统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件，多组间比较采用方差分析，两两比较采用Dunnet t检验。

2 结果

2.1 DZ预处理对心肌线粒体呼吸功能的影响

ISO组以琥珀酸为底物的线粒体Ⅲ态呼吸速率明显降低，与对照组比较显著下降（$P<0.01$）。虽然DZ预处理组Ⅲ态呼吸速率较对照组低，但与ISO组比较明显恢复（$P<0.05$，$P<0.01$）。各组对Ⅳ态呼吸速率没有影响。DZ预处理组RCR虽与对照组比较明显下降（$P<0.05$），但比ISO组显著恢复（$P<0.01$，表1）。

表1 DZ对ISO损伤心肌线粒体呼吸功能的影响（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	ST3（nmol·min^{-1}·mg^{-1}）	ST4（nmol·min^{-1}·mg^{-1}）	RCR
对照组	14.66±3.39	1.46±0.74	12.01±3.10
ISO组	9.14±2.06[b]	1.61±0.75	8.21±2.55[b]
DZ预处理组	13.66±4.19[ac]	1.52±0.44	11.35±3.78[ac]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.01$，与ISO组比较

2.2 DZ预处理对心肌线粒体膜电位的影响

ISO组心肌线粒体膜电位与对照组相比显著下降[分别为（17.34±3.71）、（24.47±4.15），$P<0.01$]，DZ预处理组心肌线粒体膜电位（22.01±4.03）较ISO组显著恢复（$P<0.01$），但仍较对照组低（$P<0.05$）。

2.3 二氮嗪预处理对心肌细胞线粒体酶活性的影响

ISO损伤后心肌细胞的Na^+-K^+-ATP酶与Ca^{2+}-ATP酶活性显著降低（$P<0.01$），但DZ预处理组细胞Na^+-K^+-ATP酶与Ca^{2+}-ATP酶活性较高，与ISO组相比相差显著（$P<0.01$，表2）。

表2 DZ对ISO损伤心肌线粒体酶活性的影响（μmol·mg^{-1}·h^{-1}，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Na^+-K^+-ATP酶	Ca^{2+}-ATP酶
对照组	9.54±0.67	7.22±0.81
ISO组	5.13±0.78[a]	4.20±0.66[a]
DZ预处理组	7.33±0.50[ab]	6.33±0.49[ab]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与ISO组比较

3 讨论

ISO诱导心肌坏死的大鼠模型是一经典的用于评价药物心肌保护效应和研究缺血后心肌损伤的动物模型[5]。ISO是β-肾上腺素能激动药的一种，通过它的正性肌力作用可引起心肌缺血坏死，其损伤的改变与人心肌梗死非常相似。本实验采用了2次皮下注射5 mg/kg的ISO来建立大鼠心肌损伤模型，发现皮下注射ISO造成心肌细胞线粒体Ⅲ态呼吸速率、呼吸控制率和线粒体膜电位的下降，抑制线粒体ATP酶的活

性，损伤心肌线粒体的呼吸功能。结果表明，该模型能很好地反映 ISO 的心肌损伤作用和 DZ 预处理的心肌线粒体保护效应。

二氮嗪开放 $MitoK_{ATP}$ 保护作用的机制目前倾向于线粒体内 Ca^{2+} 水平的变化和 ATP 合成的变化等假说。20 世纪 90 年代 Holmuhamedov 等[6] 第 1 次提出 $MitoK_{ATP}$ 通道开放引起缺血预处理过程中 Ca^{2+} 蓄积的减弱，二氮嗪和吡那地尔可以减少 Ca^{2+} 的摄取，此作用可被 5-羟基葵酸盐(5-HD)阻断。Wang 等[7] 发现心脏的缺血过程中 $MitoK_{ATP}$ 开放引起线粒体 Ca^{2+} 蓄积的减弱。但是二氮嗪如何引起线粒体内 Ca^{2+} 水平的变化仍未定论。本研究表明，Ca^{2+}-ATP 酶和 Na^+-K^+-ATP 酶活性在 ISO 损伤后明显下降，二氮嗪预处理组 ATP 酶活性较 ISO 组明显升高，说明二氮嗪的预处理可以保护 Na^+-K^+-ATP 酶及 Ca^{2+}-ATP 酶的活性。Na^+-K^+-ATP 酶及 Ca^{2+}-ATP 酶的活性与能量代谢密切相关。心肌缺血后由于线粒体能量代谢障碍，引起 ATP 生成不足，水平下降，依赖 ATP 的 Na^+-K^+-ATP 酶及 Ca^{2+}-ATP 酶活性下降，一方面导致细胞内 Na^+ 增高，使线粒体发生肿胀[8]，另一方面，线粒体细胞质内 Ca^{2+} 的重摄取能力下降，导致线粒体内发生 Ca^{2+} 超载，触发了一系列病理反应包括自由基反应，引起线粒体呼吸功能障碍，加重损伤[9]。本研究表明：二氮嗪对线粒体的保护作用可能与通过增强线粒体 ATP 酶活性，从而防止线粒体内钙超载、维持基质体积稳定有关。

二氮嗪是否能增加心肌线粒体 ATP 的合成，目前有很大争议[10]。Cossarizza[11] 从心肌细胞中游离出线粒体进行观察，发现缺血再灌注能抑制 ATP 的合成，缺血预处理能逆转这一效应，二氮嗪虽有保护作用，但不能增加 ATP 的合成。另一研究从慢性缺氧的兔心肌细胞中游离出线粒体进行观察发现，二氮嗪增加 ATP 的基础合成率，5-HD 和格列本脲能逆转该效应[12]。本研究的在体观察表明，二氮嗪预处理能有效逆转 ISO 引起的心肌细胞线粒体Ⅲ态呼吸速率、呼吸控制率和线粒体膜电位的下降。线粒体Ⅲ态呼吸速率为加入 ADP 时氧耗速率，代表 ADP 对氧化磷酸化刺激效应，与电子传递链、线粒体基质的氧化底物、ATP 合成酶活性等有关；RCR 则反映氧化磷酸化偶联程度。线粒体膜电位的大小直接反映线粒体功能的变化，膜电位的维持可保证 ATP 的顺利合成，一旦膜完整性遭到破坏，将致使跨膜电位下降直至崩溃，线粒体氧化磷酸化失常，呼吸链解偶联，细胞无法得到正常能量供给，以致发生凋亡或者坏死。本研究表明，二氮嗪预处理逆转 ISO 引起的心肌细胞线粒体Ⅲ态呼吸速率、呼吸控制率和线粒体膜电位的下降，可以增加线粒体 ATP 的合成，从而起到保护心肌细胞线粒体功能的作用。

二氮嗪作为 $MitoK_{ATP}$ 开放剂，对心肌能起到良好的保护作用，但 $MitoK_{ATP}$ 的组成仍是未知，二氮嗪心肌保护的具体机制还有争论，因此对二氮嗪作用机制和 $MitoK_{ATP}$ 的研究具有重要的意义和良好的应用前景。

参考文献：

[1] Testai L, Rapposelli S, Calderone V. Cardiac ATP-sensitive potassium channels: a potential target for an anti-ischaemic pharmacological strategy[J]. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2007, 5(1): 79 – 90.

[2] 李　兵，柳君泽，陈丽芬. 缺氧对大鼠心肌线粒体能量代谢和腺苷酸转位酶活性的影响[J]. 中国病理生理杂志，2006，22(3)：460 – 463.

[3] Essop M F, Razeghi P, McLeod C, *et al*. Hypoxia-induced decrease of UCP3 gene expression in rat heart parallels metabolic gene switching but fails to affect mitochondrial respiratory coupling[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(2): 561 – 564.

[4] Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, *et al*. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis[J]. Biochim Biophya Acta, 2003, 1606(1 – 3): 137 – 146.

[5] Rajadurai M, Prince P S. Preventive effect of naringin on isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: an *in vivo* and *in vitro* study[J]. Toxicology, 2007, 232(3): 216 – 225.

[6] Holmuhamedov E L, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K^+ channel openers prevent Ca^{2+} overload in rat cardiac mitochondria[J]. J Physiol, 1999, 519(Pt 2): 347 – 360.

[7] Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, *et al*. Preconditioning limits mitochondrial Ca^{2+} during ischemia in rat hearts: role of K_{ATP} channels[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(5): H2321 – H2328.

[8] Diedrichs H, Frank K, Schneider C A, *et al*. Increased functional importance of the na, ca-exchanger in contracting failing human myocardium but unchanged activity in isolated vesicles[J]. Int Heart J, 2007, 48(6): 755 – 766.

[9] Mishra S, Sabbah H N, Rastogi S, *et al*. Reduced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake and increased Na^+-Ca^{2+} exchanger expression in left ventricle myocardium of dogs with progression of heart failure[J]. Heart Vessels, 2005, 20(1): 23 – 32.

[10] 杨云龙，徐建平，王　薇. 二氮嗪对心脏直视术中心肌的保护作用[J]. 郑州大学学报·医学版，2007，42(1)：133 – 135.

[11] Cossarizza A. Tests for mitochondrial function and DNA: potentials and pitfalls[J]. Curr Opin Infect Dis, 2003, 16(1): 5 – 10.

[12] Fryer R M, Eells J T, Hsu A K, *et al*. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K_{ATP} channel in preservation of mitochondrial function[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 278(1): H305 – H312.

（编辑　汪勤俭）