DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.024
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

文章编号:1000-5404(2001)11-1303-03

论著

ATP敏感性钾通道开放剂对培养乳鼠窦房结细胞模拟缺血时细胞活性的影响

仝识非,宋治远 (第三军医大学附属西南医院心血管内科,重庆 400038)

提 要:目的 观察ATP敏感性钾(K_{ATP})通道开放剂对模拟缺血窦房结细胞活性的影响,并探讨其作用机制。方法 取培养2 d的窦房结细胞,以低渗(85 mosmol/L)台盼蓝染色及四唑盐(MTT)比色观察窦房结细胞活性的变化。结果 模拟缺血4 h后,窦房结细胞脆性增加、活性降低;K_{ATP}通道开放剂Pinacidil和Diazoxide能显著降低模拟缺血窦房结细胞脆性,增加细胞的活性,但两组间无明显的统计学差异;K_{ATP}通道阻断剂5-HD能逆转Pinacidil及Diazoxide的上述作用。结论 K_{ATP}通道开放剂Pinacidil和Diazoxide对缺血窦房结细胞具有显著的保护作用,但这种效果能为K_{ATP}通道阻断剂5-HD阻断。本研究提示窦房结细胞线粒体内膜可能有K_{ATP}通道存在,它的开放可能是细胞获得保护的关键。

关键词:窦房结细胞;ATP敏感性钾通道;模拟缺血
中图法分类号:R329.27;R654.2;R977 文献标识码:A

Effects of ATP-sensitive potassium channel openers on cellular activity of cultured neonatal rat sinoatrial node cells during simulated ischemia

TONG Shi-fei, SONG Zhi-yuan (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel openers on the activity of primary cultured sinoatrial node cells during simulated ischemia and evaluate the mechanism of protection. Methods Postassium channel openers, Pinacidil and Diazoxide, and block 5-HD was used respectively or combined with ischemia condition in the culture mediums of 2-day-cultivation sinoatrial node cells. The hypotonic (85 mosmol/L) trypon blue staining method and MTT colorimetry were used to study the effects of different ATP-sensitive potassium channel activators. Results Osmotic fragility was significantly increased, and D_{490} values were decreased in ischemic cells. ATP-sensitive potassium channel openers, Pinacidil and Diazoxide, significantly delayed the progressive increase in the fragility and elevated the activity of ischemic sinoatrial node cells, but there were no significant difference between the cells cultured in Pinacidil+Ischemia and Diaxodie+Ischemia mediums. 5-HD completely reversed the protective effects of Pinacidil and Diazoxide. Conclusion ATP-sensitive potassium channel activators, Pinacidil and Diazoxide, can protect sinoatrial node cells during simulated ischemia, but the anti-ischemic efficacy is blocked by 5-HD. The findings suggest that K_{ATP} channels probably exist in the inner membrane of mitochondrium of sinoatrial node cells, whose opening may play an important role in protection of ischemic cells.

Key words: sinoatrial node cells; ATP-sensitive potassium channel; simulated ischemia

在正常生理状态下,窦房结是整个心脏的起搏中心,其病变直接表现为心脏电生理活动的异常,窦房结供血不足可能是主要致病因素之一。本实验室在成功培养乳鼠窦房结细胞的基础上发现模拟缺血可引起窦房结细胞的凋亡[1]。现已发现K_{ATP}通道开放剂对心肌细胞具有缺血保护作用,但其对窦房结细胞缺血时细胞活性的影响如何尚未见报道。本研究旨在探讨K_{ATP}通道开放剂对模拟缺血时窦房结细胞活性的影响,为临床防治窦房结缺血性病变提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生24 h内的Wistar乳鼠,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 仪器与试剂 Ⅱ型胶原酶、MTT、K_{ATP}通道开放剂Pinacidil和Diazoxide、K_{ATP}通道阻断剂5-HD均为Sigma公司产品。BIO-RAD公司550型酶联免疫检测仪。模拟缺血液(mmol/L):NaCl 98.5、KCl 10、$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.9、$NaHCO_3$ 6.0、$MgSO_4$ 1.2、HEPES 20、乳酸钠40、$CaCl_2$ 1.8,以NaOH调整至pH 6.8。

1.2 方法

1.2.1 窦房结细胞的培养 按本实验室建立的窦房结细胞纯化培养与鉴定方法[2]进行乳鼠窦房结细胞培养,并取培养2 d的窦房结细胞进行分组试验。

1.2.2 试验分组 将细胞随机分为:①对照(C)组:正常培养的窦房结细胞。②模拟缺血(I)组:先吸弃培养液,加入模拟缺血液。③Pinacidil+模拟缺血(P+I)组:将Pinacidil加入培养液,使其终浓度为50 μmol/L,15 min后吸弃培养液换为Pinacidil+模拟缺血液(Pinacidil终浓度为50 μmol/L)。④Diazoxide+模拟缺血(D+I)组:将Diazoxide加入培养液,使其终浓度为30 μmol/L,15 min后吸弃培养液换为Diazoxide+模拟缺血液(Diazoxide 30 μmol/L)。⑤5-HD+Pinacidil+模拟缺血(5-HD+P+I)组:将5-HD加入培养液,使其终浓度为100 μmol/L,5 min后加入Pinacidil(终浓度

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770324)
作者简介:仝识非(1973-),男,河南省洛阳市人,硕士,医师,主要从事心脏电生理研究。电话:(023)65387310
收稿日期:2001-03-12;修回日期:2001-06-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

为 50 μmol/L)，再过 15 min 后，吸弃培养液，换为 5-HD+Pinacidil+模拟缺血液(Pinacidil 50 μmol/L，5-HD 100 μmol/L)。⑥5-HD+Diazoxide+模拟缺血(5-HD+D+I)组：将 5-HD 加入培养液，使其终浓度为 100 μmol/L，5 min 后加入 Diazoxide(终浓度为 30 μmol/L)，再过 15 min 后，吸弃培养液，换为 5-HD+Diazoxide+模拟缺血液(Diazoxide 30 μmol/L，5-HD 100 μmol/L)。

1.2.3 窦房结细胞脆性检测 ①将细胞放入缺氧装置中，充入 95%N_2+5%CO_2 混合气，测得 O_2 浓度<1%后将细胞及装置放入孵箱，每组分 6 份，依次培养 30、60、90、120、150、180 min。②取出培养皿，吸弃其内液体后滴入低渗台盼蓝(85 mOsmol/L)。③将细胞放于倒置显微镜下，随机选取 150 个细胞作为观察对象，计数染色细胞。以染色细胞百分率表示细胞脆性，百分率越高则脆性越大。

1.2.4 窦房结细胞光密度值测定 ①将细胞培养于 96 孔板内，分组方法同上。②每孔中加入 MTT〔3-(4，5-二甲基噻唑-2)-2，5-二苯基四氮唑溴盐〕溶液，使其终浓度为 0.1 mg/ml。③将细胞放入缺氧装置中，充入 95%N_2+5%CO_2 混合气，测得 O_2 浓度<1%后将细胞及装置放入孵箱中培养 4 h。④取出培养板，小心吸干孔内液体后每孔加入 DMSO(二甲基亚砜)150 μl，37 ℃振荡 10 min。⑤用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定每孔光密度值。

1.3 统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用医用统计程序包 SPLM 软件做 t 检验。

2 结果

2.1 K_{ATP} 通道开放对缺血窦房结细胞渗透脆性影响

用低渗台盼蓝测得窦房结细胞染色百分率详见表 1。

表 1 K_{ATP} 通道开放剂对缺血窦房结细胞台盼蓝染色百分率的影响($n=4$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of ATP-sensitive potassium channel openers on the percentage of sinoatrial node cells stained by trypan blue during simulated ischemia($n=4$，$\bar{x}\pm s$)

Group	Time(min)					
	30	60	90	120	150	180
C	4.92±0.53	4.50±0.74	4.84±0.55	4.78±0.67	5.13±0.98	4.50±0.82
I	7.42±1.04 *	17.02±2.94 *	22.71±3.12 *	29.30±2.51 *	32.55±4.17 *	38.21±4.87 *
P+I	5.80±0.62 ◇	9.04±1.54 ◆	14.70±2.43 ◆	17.08±2.17 ◆	21.52±3.69 ◆	25.89±2.24 ◆
D+I	6.10±0.71 ◆	9.47±0.98 ◆	12.44±1.66 ◆	20.43±3.33 ◆	23.65±2.11 ◆	27.60±3.43 ◆
5-HD+P+I	8.33±0.91 ▲	18.67±1.78 ▲	24.40±3.02 ▲	28.25±4.37 ▲	34.09±3.25 ▲	38.20±4.38 ▲
5-HD+D+I	9.22±1.25 ▼	16.38±1.55 ▼	26.43±3.97 ▼	31.60±4.24 ▼	35.94±5.38 ▼	42.15±5.21 ▼

*：$P<0.01$ *vs* C；◇：$P<0.05$，◆：$P<0.01$ *vs* I；▲：$P<0.01$ *vs* P+I；▼：$P<0.01$ *vs* D+I

由表 1 可知，经过 3 h 的模拟缺血的动态观察，可见染色的窦房结细胞逐渐增多。模拟缺血后 30 min，K_{ATP} 通道开放剂 Pinacidil 和 Diazoxide 就可显著降低窦房结细胞染色的百分率，在各对应时间点均明显低于单纯模拟缺血组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，但这种效果可被选择性线粒体 K_{ATP} 通道阻断剂 5-HD 阻断，Pinacidil 和 Diazoxide 两组间无显著差异($P>0.05$)，见表 1。

2.2 K_{ATP} 通道开放对缺血窦房结细胞光密度值的影响

用酶联免疫检测仪测得各组窦房结细胞 MTT 比色 D_{490} 值详见表 2。

表 2 K_{ATP} 通道开放剂对缺血窦房结细胞 MTT 比色 D_{490} 值的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of ATP-sensitive potassium channel openers on D_{490} values of sinoatrial node cells with MTT colorimetry during simulated ischemia($\bar{x}\pm s$)

Group	n	D_{490}
C	8	0.197±0.020
I	8	0.106±0.011 *
P+I	8	0.141±0.010 ◆
D+I	8	0.142±0.015 ◆
5-HD+P+I	8	0.098±0.008 ▲
5-HD+D+I	8	0.099±0.007 ▼

*：$P<0.01$ *vs* C；◆：$P<0.01$ *vs* I；▲：$P<0.01$ *vs* P+I；▼：$P<0.01$ *vs* D+I

表 2 示，经过 4 h 模拟缺血，窦房结细胞 D_{490} 值较对照组明显降低($P<0.01$)；应用 K_{ATP} 通道开放剂 Pinacidil 和 Diazoxide 后，P+I 组和 D+I 组 D_{490} 值显著高于单纯模拟缺血组($P<0.01$)，但 P+I 组与 D+I 组间相差不显著($P>0.05$)；选择性线粒体 K_{ATP} 通道阻断剂 5-HD 可消除 Pinacidil 和 Diazoxide 的效用，使上述两组的 D_{490} 值下降到接近单纯模拟缺血组水平。

3 讨论

本实验室已研究证实单纯模拟缺血能使培养乳鼠窦房结细胞凋亡[1]，但 K_{ATP} 通道开放剂对窦房结细胞缺血时细胞活性的影响尚未见报道。窦房结细胞膜具有 K_{ATP} 通道[3]，其线粒体内膜有无 K_{ATP} 通道仍不确定。台盼蓝可穿透损伤或死亡细胞的细胞膜，着色解体的 DNA，而活细胞则能避免被染色，染色细胞百分比高表示脆性增加，细胞活性的下降；活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶可使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝色结晶物并沉积在细胞中，DMSO 能溶解该结晶物，在一定细胞数范围内，结晶物形成的量(即 D_{490} 值)与活细胞数成正比。上述两种方法相结合检测细胞活性具有较高的灵敏性及特异性。本研究发现模拟缺血 30 min 即使窦房结细胞台盼蓝染色比率增高，缺血 4 h MTT 比色 D_{490} 值下降，说明细胞脆性增加，活性下降；而 K_{ATP} 通道开放剂 Pinacidil 和 Diazoxide 能显著降低模拟缺血窦房结细胞的渗透脆性，增加细胞活性，表明其对模拟缺血窦房结细胞具有保护作用。但两种药物效果

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

并无显著差异。K_{ATP} 通道阻断剂 5-HD 能明显降低 Pinacidil 及 Diazoxide 的上述作用。

目前发现多种 K_{ATP} 通道开放剂对缺血心肌具有保护作用。有报道指出 K_{ATP} 通道开放剂可促进细胞复极时钾离子外流，缩短动作电位时程，减少缺血时细胞内的钙超载[4]；也有研究认为，线粒体作为细胞最重要的能源提供者，它状态的稳定对细胞有至关重要的意义，而 K_{ATP} 通道开放剂能使线粒体膜去极化，降低钙入线粒体的速度及幅度，且能激活线粒体释放其内钙，从而调控缺氧等条件下能量产生及线粒体内钙的动态平衡，故线粒体 K_{ATP} 通道在缺血心肌的保护作用中发挥着重要的作用[5~7]。窦房结细胞属特化的心肌细胞，其细胞结构与代谢均与普通心肌细胞相似，因此认为 K_{ATP} 通道开放剂对其缺血时的保护机制可能同保护心肌细胞的相同。

由于 Diazoxide 对线粒体 K_{ATP} 通道具有高选择性，而对肌浆网 K_{ATP} 通道不敏感，Pinacidil 则相对缺乏这种选择性，Diazoxide 产生的线粒体钾流及缺血性保护效应可被 5-HD 阻断，但 5-HD 却不能阻断 K_{ATP} 通道开放剂产生的肌浆网 K_{ATP} 电流，故 Diazoxide 和 5-HD 可分别被看作是选择性的线粒体 K_{ATP} 通道开放剂和阻断剂[7]。鉴于本实验中 Pinacidil 和 Diazoxide 两种药物效果并无显著差异，因此推测胞膜 K_{ATP} 通道的开放不是缺血窦房结细胞获得保护的关键；窦房结细胞线粒体内膜可能有 K_{ATP} 通道存在，且它很可能是上述药物共同的作用点。

参考文献：

[1] 钟 理，宋治远. 模拟缺血-再灌注诱导原代培养乳鼠窦房结细胞凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(1)：59－61.
[2] 钟 理，宋治远. 乳鼠窦房结取材与纯化培养方法的探讨[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2000，14(3)：188－190.
[3] Han X，Light P E，Giles W R，*et al*. Identification and properties of an ATP-sensitive K^+ current in rabbit sino-atrial node pacemaker cells[J]. J Physiol，1996，490(2)：337－350.
[4] Grover G J. Pharmacology of ATP-sensitive potassium channel openers in models of myocardial ischemia and reperfusion[J]. Can J Physiol Pharmacol，1997，75(4)：309－315.
[5] 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(44)：H1 567－H1 576.
[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] Baines C P，Liu G S，Birincioglu M，*et al*. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial K_{ATP} channels and actin cytoskeleton[J]. Am J Physiol，1999，276(4 Pt 2)：H1 361－H1 368.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2001)11-1305-01

个案与短篇

连圈状糠秕疹 1 例

Report a case of pityriasis circinata

周春丽，叶庆俏 （第三军医大学附属西南医院皮肤科，重庆 400038）

患者女，19 岁，因躯干皮疹 2 年于 2001 年 1 月就诊。患者于两年前无意中被人发现背部褐色斑，鸡蛋大小，因不伴痒痛而未予注意。类似皮疹渐渐波及胸、腹、腰、臀部，大小不等，呈圆形，有的融合成片，仍无痒痛，为明确诊治于我科就诊。患者平素身体健康，月经周期正常，否认家族中有类似患者。查体：系统检查无异常发现。皮肤科情况：胸、腹、腰、背、臀十余个直径约 4～6 cm 褐色斑片，大多呈圆形，个别为卵圆形，胸部皮疹融合呈环形或多圆形，边界清，边缘不高起，表面粗糙，有薄层鱼鳞状鳞屑，不易剥离。实验室检查：鳞屑直接镜检未找到真菌。给予口服芳香维甲酸乙酯 0.1 mg 每周 2 次，外用 0.1% 维甲酸霜后 1 月复诊疗效较好，原皮疹大多数表面较光滑，鳞屑减少，无新发疹。

作者简介：周春丽(1971－)，女，河南省郑州市人，硕士，医师，主要从事白癜风的临床和基础方面的研究。电话：(023)68755126
收稿日期：2001-03-14；修回日期：2001-06-28

讨论

连圈状糠秕疹又称远山连圈状糠秕疹、松浦正圆形糠秕疹，是一种少见的轻度角化性皮肤病。本病主要见于日本和中国，日本报道约占皮肤病的 0.2%，我国自 1959 年以来也有少量病例报道。本病病因不明，可能与遗传因素、系统性疾病如结核、营养不良、妊娠或月经紊乱有关[1]。好发于中年(25～45 岁之间)，男女无差别。诊断上应注意与花斑癣、鳞状毛囊角化和斑片状类银屑病鉴别。本例患者发病年龄偏小，皮疹范围广泛，根据其典型皮疹特点和实验室检查诊断连圈状糠秕疹明确。我们给予口服及外用维甲酸治疗效果较好。

关键词：连圈状糠秕疹；皮疹
中图法分类号：R758.53 文献标识码：B

参考文献：

[1] 杨国亮，王侠生 主编. 现代皮肤病学[M]. 上海：上海医科大学出版社，1998. 526－527.

（编辑 谢义霞）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net