DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.001

维拉帕米对放烧复合伤大鼠心肌线粒体功能的保护作用*

论著

熊 业 陈宗荣 程天民 (第三军医大学预防医学系复合伤研究室) 630038

提 要 用钙通道阻滞剂维拉帕米治疗和预防放烧复合伤(6 Gy放射损伤合并30%Ⅱ度烧伤)大鼠,观察其血压和心肌线粒体呼吸功能的变化及的作用。预防或治疗给药对伤后动脉血压有一定影响,显著保护伤后心肌线粒体呼吸功能。维拉帕米的保护作用可能与它减少了心肌线粒体钙浓度有关。

关键词 线粒体;辐射,电离;灼伤;维拉帕米;大鼠

中图法分类号 R644;R818

线粒体不仅是细胞的供能器,而且在细胞钙稳态的调节中起重要作用。近年一些实验表明离体心脏缺血再灌注过程中心肌线粒体结构和功能严重受损,钙通道阻滞剂可减轻线粒体和心肌损害[1]。这说明钙离子在缺血再灌注心肌损害中起一定作用。我室以前的工作证实放射损伤复合烧伤(简称放烧复合伤)后大鼠心肌功能下降[2],其机理仍不清楚。在本实验中用钙通道阻滞剂维拉帕米(Verapamil,Ver)预防或治疗放烧复合伤以按时伤后大鼠心肌线粒体功能变化,从能量代谢角度为保护或改善伤后心肌功能提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性Wistar大鼠,体重218±15 g,四川省中药研究所供给。

1.2 试剂

维拉帕米、谷氨酸钠、苹果酸钠为Sigma公司产品。二磷酸腺苷(ADP)为Fluka公司产品。依地酸(EDTA)、甘露醇、蔗糖等为国产试剂,分析纯。

1.3 动物分组

将动物随机分为4组。

(1)正常对照组(C):不致伤,其余处理同致伤组。

(2)放烧复合伤组(RB):动物背部剃毛,经^{60}Co γ射线一次全身照射,剂量为6 Gy,剂量率为0.35 Gy/min,照后经25%乌拉坦腹腔麻醉(4 ml/kg),再经5 kW溴钨灯光辐射,造成30%体表面积Ⅱ度烧伤(病理切片证实),伤后不作任何处理,分笼饲养,自由进食。

(3)预防给药组(P):给动物腹腔注射维拉帕米一日一次,剂量4 mg/kg,连续5 d,照射前1 h先行给药一次。致伤方法如前述。

(4)治疗给药组(T):动物致伤后立即腹腔注射维拉帕米1次,剂量4 mg/kg。

1.4 血压测定[3]

经颈动脉插管直接测定伤后1、12和48 h的血压变化。

1.5 心肌线粒体的制备和呼吸功能测定[4]

测完血压后,取动物心脏,放在冷的分离介质中(0.25 mol/L蔗糖、0.01 mol/L Tris-HCl,pH7.4),洗去血液,充分剪碎心脏,内切式浆器匀浆12 s(3×4 s),600×g离心6.5 min(2℃),上清经10 000×g离心11 min,弃上清,用分离介质悬浮沉淀,以同样高速离心1次,沉淀以分离介质悬浮,Lowry法测定线粒体蛋白含量。以上操作均在0~4℃进行。

线粒体呼吸功能测定:反应体积为2.20 ml。反应介质为0.25 mol/L蔗糖、3 mmol/L KH_2PO_4、0.4 mmol/L EDTA,pH7.4。反应底物为1.25 mol/L谷氨酸钠和苹果酸钠。反应介质在30℃恒温5 min后,加入352 nmoles ADP,用氧电极测定心肌线粒体3态(加入ADP时)和4态(ADP耗尽后)的耗氧,计算呼吸控制率(RCR),磷氧比值(ADP/O)和氧化磷酸化速率(OPR)。

1.6 外源性钙离子对正常大鼠心肌线粒体呼吸功能的影响

线粒体分离介质为225 mol/L甘露醇,75 mmol/L蔗糖,0.05 mmol/L EDTA,pH 7.4。分离过程同上述。反应介质为225 mmol/L甘露醇,75 mmol/L蔗糖,10 mmol/L KH_2PO_4,pH7.4。线粒体先与10或50 μmol/L钙离子($CaCl_2$)在0℃孵育10 min后,测定线粒体呼吸功能[5]。

1.7 统计分析

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,各组间差异经单因素方差分析检验。

* 国家自然科学基金资助项目,No.39370692
全军"八五"重点攻关课题

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

2 结果

2.1 放烧复合伤各组大鼠血压变化(见表1)

表1 放烧复合伤各组血压变化

Tab 1 Changes in blood pressure of rats in different groups following combined raidation-burn injury ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Blood pressure (kPa)
Control	9	14.81±0.92
Radiation—burn combined injury		
1 h	5	9.84±1.65※※
12 h	5	6.91±0.47※※
48 h	6	8.76±0.86※※
Pretreatment		
1 h	4	9.60±1.14※※
12 h	4	9.89±2.51※
48 h	4	10.33±0.64
Treatment		
1 h	4	10.27±1.26
12 h	5	5.41±1.80※※
48 h	4	13.17±0.79

※: $P<0.05$, ※※: $P<0.01$, *vs* control

2.2 维拉帕米对放烧复合伤组心肌线粒体功能的影响(见表2)

表2 维拉帕米对伤后线粒体功能的影响

Tab 2 Effect of verapamil on rat heart mitochondrial respiratory function following combined raiation-burn injury ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	RCR	ADP/O
Control	11	4.61±0.55	2.89±0.17
Radiation—burn combined injury			
1 h	5	2.89±0.38※※	1.98±0.23※※
12 h	5	2.85±0.34※※	2.01±0.13※
48 h	6	2.85±0.28※※	2.05±0.12※
Pretreatment			
1 h	4	3.43±0.18※	2.38±0.16
12 h	4	3.95±0.19	2.72±0.10
24 h	4	4.39±0.56	2.86±0.06
Treatment			
1 h	4	3.71±0.40	2.62±0.21
12 h	5	4.09±0.93	2.58±0.47
48 h	4	5.08±1.08	2.93±0.20

※: $P<0.05$, ※※: $P<0.01$, *vs* control

放烧复合伤后大鼠心肌线粒体 RCR、ADP/O 比值持续下降。维拉帕米预防或治疗给药均可显著提高伤后RCR和ADP/O比值。

2.3 外源性钙离子对心肌线粒体呼吸功能的影响(见表3)

表3 外源性钙离子对线粒体功能的影响

Tab 3 Effect of extramitochondrial calcium ions on rat cardiac mitochondrial respiratory function ($\bar{x}\pm s$)

Addition	n	RCR	ADP/O	OPR[a]
Mitochondria	7	3.41±0.23	2.39±0.25	646.08±137.96
10 μmol/L Ca^{2+}	7	4.18±0.45※	2.81±0.19※	888.77±178.20※
50 μmol/L Ca^{2+}	5	2.30±0.29※	1.76±0.23※	305.17± 71.61※

a: nmoles ATP · min^{-1} · mg^{-1};

※: $P<0.05$, *vs* Mitochondria

10 μmol/L 外源性钙离子对正常线粒体呼吸功能有刺激作用;而50 μmol/L 钙离子则显著抑制线粒体功能。

3 讨论

本实验结果表明放烧复合伤后大鼠心肌线粒体氧化磷酸化能力明显受抑制,从而影响心肌细胞能量的产生,可能会影响心肌功能。但线粒体呼吸功能下降的机理仍不十分清楚。现已证实,钙离子在离体心肌缺血再灌注线粒体损伤中起重要作用[1]。放烧复合伤时心肌线粒体功能损伤与钙离子的关系尚缺乏研究。本实验表明预防或治疗给予钙通道阻滞剂维拉帕米可非常显著地改善伤后心肌线粒体功能,说明钙离子可能参与了伤后心肌线粒体功能的损害。心肌细胞钙超负荷时,线粒体为了缓冲的细胞内多余钙,线粒体就摄钙,从而引起线粒体本身钙超负荷。线粒体钙超负荷可引起以下后果:(1)激活磷脂酶 A_2,溶解膜磷脂,破坏生物膜;(2)线粒体钙超负荷抑制氧化磷酸化作用;(3)激活 Ca^{2+} 依赖的 ATP 酶,消耗能量[6]。本实验结果表明外源性钙离子在低浓度可刺激线粒体呼吸功能,与它激活脱氢酶活力有关[7],高浓度钙离子则抑制线粒体功能,说明钙离子过多确有损害作用。

文献报道,维拉帕米对血压的影响较小[8]。我们的

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

实验表明,它对伤后动物的血压有一定影响,主要是提高血压。是否与它们保护线粒体功能,继而改善心功能有关,尚待探讨。对心力衰竭治疗传统方法是用强心剂,但有加重心肌氧耗和损害心肌舒张功能的危险。目前对心力衰竭治疗有新的认识,认为应该以保护心肌为主[8]。钙通道阻滞剂有降低心肌氧耗、改善心肌舒张功能[9]及减轻线粒体功能的作用,有希望在伤后心肌损害治疗中发挥作用。

参考文献

1 唐景荣.钙超载与心肌钙反常.中国药理学通报,1991,7:333

2 邹仲敏,陈宗荣.放射损伤、烧伤和放烧复合伤心功能的早期改变.第三军医大学学报,1993;15:58

3 施新猷,主编.医学动物实验方法.北京:人民卫生出版社,1983:146

4 Zydowo MM, Swierczynski J, Nagel G et al. The respiration and calcium content of heart mitochondria from rats with vitamin D induced cardionecrosis. Biochem J,1985;226(1):155

5 Johston JD, Brand MD. Stimulation of the respiration rate of rat liver mitochondria by sub-micromolar concentrations of extramitochondrial Ca^{2+}. Biochem J,1987;245:217

6 Parr DR, Wimhurst JM, Harris EJ. Calcium-induced damage of rat heart mitochondria. Cardiovasc Res,1975;9(1):366

7 McCormack JG, Dentor RM. Role of Ca^{2+} ions in the regulation of intramitochondrial metabolism in rat heart. Biochem J,1984;218(1):235

8 Alloati G, Montrucchio G, Mariano F et al. Protective effect of verapamil on the cardiac and circulatory alterations induced by platelet-activating factor. J Cardiovasc Pharmacol,1987;9(2):181

9 Nayler WG. Calcium antagonism and the ischemic myocardium. Int J Cardiol,1987;15:267

(收稿:1994-09-27;修回:1994-11-28)

Studies of protective effects of verapamil on myocardial mitochondrial respiratory function after combined radiation-burn injury in rats

Xiong Ye, Chen Zongrong, Cheng Tianmin (Department of Radiation Medicine, Third Military College, Chongqing, 630038)

Abstract The effects of verapamil, a calcium antagonist, on myocardial mitochondrial respiratory function and arterial blood pressure after combined radiationn-burn injury (6 Gy whole irradiation and 30% TBSA burns) were observed in rats. The prophylactic or therapeutic administration of verapamil exerted slight effect on blood pressure but significant effect to protect myocardial mitochondrial respiratory function and the protection might be exercised through the reductionn of mitochondrial calcium content by verapamil.

Key words mitochondrium; radiation, ionizingn; burns; verapamil; rat

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