

· 早期脏器损害 ·

吡那地尔对烫伤大鼠心肌线粒体结构及呼吸功能的影响

彭念寅 周红 司良毅

【摘要】 目的 观察吡那地尔预处理后对烫伤大鼠心肌线粒体结构及呼吸功能的影响。方法 将 75 只健康 Wistar 大鼠随机分为对照组(9 只,腹腔注射 50 μg/kg 等渗盐水)、单烫组(33 只,仅作烫伤)及预处理组(33 只,腹腔注射吡那地尔 50 μg/kg 后再作烫伤)。透射电镜观察 3 组大鼠心肌线粒体结构的变化,用生物氧特性微机测量分析系统检测大鼠线粒体的呼吸控制率,并检测大鼠心肌线粒体中丙二醛(MDA)和超氧阴离子的含量。结果 伤后 3 h 预处理组大鼠心肌线粒体病理损害程度较单烫组轻;伤后 1—6 h 其呼吸控制率显著高于单烫组($P < 0.05$ 或 0.01);MDA 和超氧阴离子含量分别于伤后 3、6 h 和伤后 1、3、6 h 低于单烫组($P < 0.05$ 或 0.01)。伤后 3 h 预处理组 MDA、超氧阴离子含量各为 $(0.60 \pm 0.09) \mu\text{mol/g}$ 、 0.127 ± 0.020 , 明显低于单烫组 $(0.83 \pm 0.07) \mu\text{mol/g}$ 、 0.169 ± 0.015 ($P < 0.01$)。结论 吡那地尔预处理对烫伤大鼠心肌产生了明显的保护作用,其机制可能与线粒体中对腺苷三磷酸敏感的钾离子通道提前开放有关。

【关键词】 烧伤; 心肌; 线粒体; 吡那地尔

Influence of pinacidil on the myocardial mitochondrial structure and the respiratory function in scalded rats

PENG Nian-yin*, ZHOU Hong, SI Liang-yi. *Department of Geriatrics, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, P. R. China

Corresponding author: ZHOU Hong, Department of Pharmacology, The Third Military Medical University, Email: Zhouh64@mail.tmmu.com.cn, Tel: 023-68752266

【Abstract】 Objective To investigate the influence of pinacidil preconditioning on the protection of the structure and respiratory function of injured myocardial mitochondria in scalded rats. Methods Seventy-five healthy Wistar rats, weighed 250 ~ 300 g, were randomly divided into three groups: i. e. control ($n = 9$, with intraperitoneal injection of 50 μg/kg isotonic saline), scald ($n = 33$, with 30% TBSA full thickness scald) and pre-conditioning ($n = 33$, with same extent of scald injury after intraperitoneal injection of 50 μg/kg pinacidil) groups. Mitochondrial ultrastructure was observed by transmission electron microscope. The mitochondrial respiratory function, the MDA content and the superoxide anion level were determined with corresponding methods. Results The degree of injury to rat myocardial mitochondria in pre-conditioning group was less intensive than that in scald group ($P < 0.05$ or 0.01). The respiratory control rate in pre-conditioning group was obviously higher than that in scald group ($P < 0.05$), and the contents of MDA and superoxide anion in pre-conditioning group were markedly lower than those in scald group ($P < 0.05$ or 0.01), as evidenced by their contents at 3 post scalding hours ($0.60 \pm 0.09 \mu\text{mol/g}$ and 0.127 ± 0.020) were obviously lower than those in scald group ($0.83 \pm 0.07 \mu\text{mol/g}$ and 0.169 ± 0.015) ($P < 0.01$).

Conclusion Pinacidil preconditioning was beneficial in the protection of myocardial mitochondria in scalded rats, and it might be related to the pre-opening of potassium channel which was sensitive to mitochondrial ATP.

【Key words】 Burns; Myocardium; Mitochondria; Pinacidil

线粒体中对腺苷三磷酸(ATP)敏感的钾离子 [mitoK(ATP)] 通道开放剂可以模拟缺血预适应样效应,保护心肌收缩功能^[1,2],使心肌梗死范围明显缩小^[3]。mitoK(ATP)通道的开放是预处理保护作用的靶点之一^[4,5],但其保护作用机制尚未阐明。

本研究在大鼠Ⅲ度烫伤前给予适量 mitoK(ATP) 开放剂吡那地尔,观察吡那地尔对烫伤大鼠心肌线粒体的结构、呼吸功能的影响并探讨其作用机制,为心肌损伤的预防和治疗提供实验依据。

材料与方 法

1. 主要材料和试剂:吡那地尔(美国 Sigma 公司),生物氧特性微机测量分析系统(北京明华鑫世纪科技发展有限公司),UV-751 紫外及可见光分光光度计(日本岛津公司),JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),透射电镜

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054502)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院老年病科(彭念寅、司良毅);第三军医大学药理学教研室(周红)

通信(讯)作者:周红,400038,重庆,第三军医大学药理学教研室,Email:Zhouh64@mail.tmmu.com.cn,电话:023-68752266

(荷兰飞利浦公司),超氧阴离子检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

2. 动物模型及分组:健康雄性 Wistar 大鼠(第三军医大学实验动物中心)75 只,体重 250~300 g。将大鼠随机分成对照组(9 只)、单烫组(33 只)和预处理组(33 只)。对照组大鼠不作烫伤,仅腹腔注射 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 等渗盐水,单烫组大鼠作 30% TBSA III 度烫伤^[6](病理切片证实),预处理组大鼠腹腔注射吡那地尔 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 后再作 30% TBSA III 度烫伤。

3. 心肌线粒体的提取:其过程在冰浴中进行,容器提前预冷。分别取对照组大鼠和两烫组大鼠伤后即时(0)、1、3、6 h 的心脏,每时相点 8 只大鼠。将大鼠心脏组织用等渗盐水洗涤,滤纸吸去表面的液体,称重。在冰浴条件下剪碎,用预冷的心肌匀浆介质(甘露醇 19.127 8 g、蔗糖 11.980 5 g、乙二胺四乙酸 0.146 1 g、Tris 0.302 7 g, pH 7.4, 加双蒸水定容至 500 ml)洗涤 3 次,加入 9 倍体积的心肌匀浆介质。将剪碎的心肌组织倒入匀浆管中,使匀浆器下端浸入盛有冰块的器皿中,将匀浆捣杆垂直插入管中上下转动研磨 3~5 次,用 200 目不锈钢网过滤匀浆于试管中以除去组织碎渣。将心肌匀浆液 1.5 ml 吸入塑料离心管中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 600 $\times g$ 离心 10 min,使细胞及细胞碎片沉降。取上清,8 000 $\times g$ 离心 10 min。去上清,沉淀中加入 1.5 ml 匀浆介质,用吸管吹打成悬液。重复 8 000 $\times g$ 离心 10 min,其沉淀即为纯化的心肌线粒体。用 Lorwy 法检测线粒体蛋白含量。

4. 检测指标:(1)透射电镜观察大鼠心肌线粒体结构:伤后 3 h 两烫组取 1 只大鼠,另取 1 只对照组大鼠,处死后将心脏放入 0 $^{\circ}\text{C}$ 等渗盐水中清洗,用体积分数 2.5% 戊二醛浸渍后,用双面刀切取心尖组织,修成 1~2 mm 颗粒并固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。按常规制作超薄切片后在透射电镜下进行观察。(2)生物氧特性微机测量分析系统检测大鼠线粒体呼吸功

能:线粒体采样周期为 500 ms,采样时间 >500 s。取反应介质(甘露醇 225 mmol/L、蔗糖 75 mmol/L、磷酸二氢钾 5 mmol/L、Tris 10 mmol/L、乙二胺四乙酸四钾 0.05 mmol/L、氯化钾 5 mmol/L, pH 7.4) 2 ml,加入线粒体至线粒体蛋白浓度为 1 g/L。待内源性底物耗尽,显示曲线基本平直时加入谷氨酸/苹果酸及琥珀酸,5 min 后再加入腺苷二磷酸(ADP),在 3 ml 反应容积的溶氧测定仪中(温度 25~30 $^{\circ}\text{C}$)测定密闭的连续搅拌的反应体系内(线粒体为 1.04 g/L,谷氨酸钠、苹果酸钠、琥珀酸钠的终浓度均为 4.2 mmol/L,ADP 终浓度为 0.1 mmol/L,30 $^{\circ}\text{C}$ 时空气饱和和蒸馏水走标测氧为 100%)线粒体耗氧活性,即呼吸控制率(RCR)。(3)心肌线粒体 MDA 和超氧阴离子含量的测定按试剂盒说明书进行。

5. 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。

结 果

1. 线粒体结构变化:对照组心肌线粒体结构清晰,嵴呈平行排列。伤后 3 h,单烫组线粒体明显肿胀,嵴间隙增宽,嵴排列紊乱、模糊,电子密度明显降低。伤后 3 h,预处理组大鼠虽然线粒体轻度肿胀,嵴间隙增宽,电子密度降低,但与单烫组比较,其病理形态改变明显减轻。见图 1。

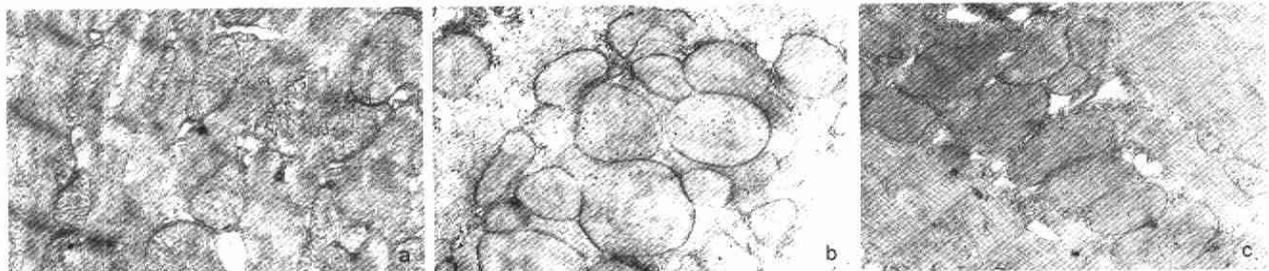
2. 线粒体呼吸功能的变化:预处理组大鼠伤后 1~6 h 心肌线粒体 RCR 显著高于单烫组($P < 0.05$ 或 0.01)。见表 1。

表 1 3 组大鼠心肌线粒体 RCR 的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the mitochondrial RCR of myocardia in the 3 groups(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间(h)			
		0	1	3	6
单烫组	32	2.670 $\pm 0.153^{\#}$	1.788 $\pm 0.286^{\#}$	2.149 $\pm 0.081^{\#}$	1.738 $\pm 0.261^{\#}$
预处理组	32	2.091 $\pm 0.065^{\#}$	2.674 $\pm 0.027^{*\#}$	2.773 $\pm 0.532^{*\Delta}$	3.118 $\pm 0.081^{*\#}$

注:对照组 8 只大鼠,其心肌线粒体 RCR 为(3.993 \pm 1.219)%;与对照组比较,* $P < 0.05$,# $P < 0.01$;与单烫组比较, $\Delta P < 0.05$, $\star P < 0.01$



注:a. 对照组心肌线粒体结构清晰,嵴排列整齐;b. 伤后 3 h 单烫组线粒体明显肿胀,嵴间隙增宽,嵴排列紊乱、模糊,电子密度明显减低;c. 伤后 3 h 预处理组大鼠嵴间隙增宽,线粒体轻度肿胀

图 1 3 组大鼠心肌线粒体结构变化 透射电镜 $\times 14\ 000$

Fig 1 The change in myocardial mitochondrial structure in 3 groups of rats TEM $\times 14\ 000$

3. 线粒体 MDA 和超氧阴离子含量的变化:与单烫组比较,预处理组大鼠伤后心肌线粒体 MDA 含量增加的幅度较小,且升高时间明显延后;伤后 3、6 h 明显低于单烫组 ($P < 0.05$ 或 0.01) (表 2)。预处理组超氧阴离子含量增加缓慢,较单烫组明显下降 ($P < 0.05$ 或 0.01) (表 3)。

表 2 3 组大鼠心肌线粒体 MDA 含量的比较 ($\mu\text{mol/g}$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of MDA contents in mitochondria of myocardia in the 3 groups ($\mu\text{mol/g}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间 (h)			
		0	1	3	6
单烫组	32	0.48	0.65	0.83	0.84
		± 0.09	$\pm 0.10^*$	$\pm 0.07^{\#}$	$\pm 0.06^{\Delta}$
预处理组	32	0.52	0.54	0.60	0.69
		± 0.07	± 0.09	$\pm 0.09^{\Delta}$	$\pm 0.09^{\Delta}$

注:对照组 8 只大鼠,其心肌线粒体 MDA 含量为 (0.44 ± 0.13) $\mu\text{mol/g}$;与对照组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$;与单烫组比较, $\Delta P < 0.05$, $\star P < 0.01$

表 3 3 组大鼠心肌线粒体超氧阴离子含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Comparison of the puperoxide anion contents in mitochondria of myocardia in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间 (h)			
		0	1	3	6
单烫组	32	0.109	0.126	0.169	0.189
		± 0.021	$\pm 0.010^*$	$\pm 0.015^*$	$\pm 0.016^*$
预处理组	32	0.086	0.093	0.127	0.135
		± 0.013	$\pm 0.016^{\#}$	$\pm 0.020^{\Delta}$	$\pm 0.015^{\Delta}$

注:对照组 8 只大鼠,其心肌线粒体超氧阴离子含量为 0.073 ± 0.012 ;与对照组比较, * $P < 0.01$;与单烫组比较, # $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$

讨 论

严重烧伤后早期即存在器质性心脏损害^[7]。烧伤性心功能障碍损害可能和缺血、缺氧、炎性因子以及活性氧(ROS)生成增加等致病因素有关^[8-10]。RCR 是体现线粒体结构完整性及功能状态的一个指标,其大小反映线粒体氧化磷酸化的偶联程度。本研究中单烫组大鼠心肌线粒体的能量产生和利用过程受到严重损害,线粒体膜结构的完整性受到影响;预处理组大鼠采用吡那地尔使 mitoK(ATP)通道提前开放后,大鼠心肌线粒体病理结构的损害减轻,RCR 下降幅度明显减轻,线粒体自由基的产生量明显减少。由此说明,吡那地尔对严重烫伤大鼠的心肌可产生明显的保护作用。

严重的应激性刺激如烧(创)伤后产生过量氧自由基,引起继发性 mitoK(ATP)通道开放,可以导致线粒体 ATP 生成减少;当自由基的产生量超出了

线粒体清除能力时,引起线粒体结构和功能障碍,心肌细胞发生不可逆的损伤^[11]。在缺血预适应中, mitoK(ATP)通道开放引起的少量 ROS 产生可能是细胞内的信号转导通路之一^[12],其作用可能与触发了机体的应激反应产生少量 ROS、刺激 mitoK(ATP)通道提前开放有关。

综上所述,吡那地尔对烫伤大鼠产生保护作用的机制可能和 mitoK(ATP)通道提前开放有关,其启动了线粒体内源性保护机制,增加了心肌线粒体对氧化应激损伤的耐受。mitoK(ATP)通道提前开放是预处理对心肌缺血产生保护效应的机制,可能也是预处理对烧(创)伤产生保护作用的机制,但仍需进一步研究证实。

参 考 文 献

- Feng J, Li H, Rosenkranz ER. Pinacidil pretreatment extends ischemia tolerance of neonatal rabbit hearts. J Surg Res, 2000, 90: 131 - 137.
- Mizumura T. Bimakailim an ATP-sensitive potassium channel opener mimics the effects of Ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release and neutrophil function in dogs. Circulation, 1995, 92: 1236.
- Mcdonald MC, Zacharowski K, Bowes J, et al. Tempol reduces infarct size in rodent models of regional myocardial ischemia and reperfusion. Free Radic Biol Med, 1999, 27: 493 - 503.
- Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, et al. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to mitochondrial K(ATP) channel. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284: 299 - 308.
- Kevelaitis E, Oubenaissa A, Mouas C, et al. Opening of mitochondrial potassium channels: a new target for graft preservation strategies? Transplantation, 2000, 70: 576 - 578.
- 黎鳌, 杨宗城, 主编. 烧伤治疗学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 652 - 653.
- White J, Maass DL, Giroir B, et al. Development of an acute burn model in adult mice for studies of cardiac function and cardiomyocyte cellular function. Shock, 2001, 16: 122 - 129.
- 张家平, 黄跃生, 周新, 等. 严重烫伤大鼠心肌细胞凋亡与心功能损害的关系. 中华烧伤杂志, 2002, 18: 272 - 275.
- Thomas JA, Haudek SB, Koroglu T, et al. IRAK1 deletion disrupts cardiac Toll/IL-1 signaling and protects against contractile dysfunction. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 285: 597 - 606.
- Borutaite V, Brown GC. Mitochondria in apoptosis of ischemic heart. FEBS Lett, 2003, 541: 1 - 5.
- Udina SH, Laclau MN, Tariosse L, et al. Alteration of mitochondrial function in a model of chronic ischemia in vivo in rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282: 821 - 831.
- Oldenburg O, Cohen MV, Yellon DM, et al. Mitochondrial K(ATP) channels: role in cardioprotection. Card Res, 2002, 55: 429 - 437.

(收稿日期: 2004 - 08 - 23)

(本文编辑: 苟学萍)