

尼可地尔对豚鼠心肌细胞膜及线粒体膜电位的影响

冯力¹, 刘伊丽², 刘杰³, 金春华³

(1. 广州军区总医院重症监护病房, 广东广州 510010; 2. 南方医院心内科, 广东广州 510515; 3. 第一军医大学病理生理学教研室, 广东广州 510515)

摘要 研究 K_{ATP} 通道开放剂尼可地尔(Nic)对豚鼠心肌细胞膜和线粒体膜电位的影响。用激光共聚焦显微镜和特异性荧光探针, 观察不同剂量的 Nic 及 K_{ATP} 通道阻滞剂格列本脲(Gli)引起急性分离的豚鼠心肌细胞膜电位, 线粒体膜电位荧光值的变化。Nic $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引起细胞膜电位在 1 min 内迅速超极化〔膜电位荧光值减少 $(75 \pm 12)\%$ 〕, Gli $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可阻断其变化。0.1 和 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Nic 可使线粒体膜电位去极化和膜电位荧光值在 1, 2, 5 min 分别增加 $(12 \pm 3)\%$ 和 $(32 \pm 8)\%$ 、 $(25 \pm 6)\%$ 和 $(39 \pm 9)\%$ 、 $(34 \pm 6)\%$ 和 $(45 \pm 12)\%$; $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Gli 可抑制其变化。结果说明低浓度 Nic 只引起线粒体膜电位去极化, 高浓度 Nic 还可使细胞膜电位发生超极化, 引起 K_{ATP} 通道开放。

关键词: 尼可地尔; 心肌; 线粒体; 细胞膜; 膜电位

中图分类号: R972

文献标识码: A

文章编号: 1000-300X(2001)01-0023-04

心肌细胞膜上 ATP 敏感的钾通道(K_{ATP} 通道)开放剂可以模拟心肌缺血预适应, 而 K_{ATP} 通道阻滞剂可以取消之^[1]。最近研究发现, 对心肌细胞膜 K_{ATP} 通道不敏感的 K_{ATP} 通道开放剂二氮嗪(diazoxide, 对胰岛 β 细胞膜 K_{ATP} 通道高度敏感)对缺血心肌也有保护作用, 进而发现二氮嗪可以激活心肌细胞线粒体膜上 K_{ATP} 通道^[2]。其他 K_{ATP} 通道开放剂对此处 K_{ATP} 通道的影响未见报道。既往我们已经报道了采用膜片钳单通道技术的内面向外记录模式研究不同浓度的 K_{ATP} 通道开放剂尼可地尔(nicorandil)

对心肌细胞膜 K_{ATP} 通道的影响^[3]。在此实验基础上, 我们应用激光共聚焦显微镜(ACAS 570 型, 美国 Meridian 公司)和特异性荧光探针, 分别观察不同浓度的尼可地尔对心肌细胞膜及线粒体膜电位的影响, 以间接反映尼可地尔对细胞膜和线粒体膜 K_{ATP} 通道的作用。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

DiBAC₄(3) bis-(1, 3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol, 罗丹明(rhodamine 123)购于 Molecular Probe 公司。链酶蛋白酶 E 和格列本脲(glibenclamide)购于 Sigma 公司, 尼可地尔购于美国 Tocris 公司。格列本脲用二甲亚砜(DMSO)配成浓度为 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液, 实验前用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释, 溶液中 DMSO 的终浓度小于 0.01%, 对 K_{ATP} 通道没有影响。

1.2 心室肌细胞的分离

健康豚鼠 250 ~ 350 g, ♀ ♂ 不拘(第一军医大学实验动物中心), 猛击枕部致昏, 迅速取出心脏, 置于 4°C 无钙台氏液($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: NaCl 116, KCl 5.4, NaH_2PO_4 1.4, NaHCO_3 15, MgSO_4 1, 葡萄糖 15, pH 7.3 ~ 7.4)中冲洗, 剪开心包, 主动脉插管后固定于 Langendorff 灌流架上, 用无钙台氏液经主动脉逆行灌注离体心脏 6 ~ 8 min 后, 改用在上述无钙台氏液中加入链酶蛋白酶 E $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, CaCl_2 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的液体灌流 2 ~ 3 min, 可见流出液逐渐变粘稠, 成拉丝状, 立即将心室肌切碎, 在上述酶液中温育 3 ~ 5 min, 用尼龙网过滤, 将上清液稀释 5 倍放入保育液(无钙台氏液加入 $1.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2)中, 室温下保存待用。

1.3 实验分组

将分离好的细胞悬液滴注在改良 Petri 培养皿(皿底部涂有 0.1% 多聚赖氨酸)中, 静置 15 min, 使

收稿日期 2000-01-31 接受日期 2000-10-17

作者简介: 冯力(1966 -), 女, 河北石家庄人, 主治医师, 博士, 现在广州中山大学药理学教研室从事博士后工作。

细胞紧密粘于培养皿底部。实验分 4 组,分别加入 0.1 或 1.0 mmol·L⁻¹尼可地尔 3 μmol·L⁻¹的格列本脲和 3 μmol·L⁻¹的格列本脲 + 1.0 mmol·L⁻¹尼可地尔。

1.4 细胞膜电位的测定^[4]

将特异性荧光染料 DiBAC₄(3)加入上述培养皿中 终浓度为 5 μmol·L⁻¹, 37℃ 闭光孵育 30 ~ 40 min, 用激光共聚焦显微镜检测反映心肌细胞膜电位的荧光强度动态变化。激发波长 488 nm, 荧光波长 530 nm, 每隔 20 s 扫描 1 次。当 DiBAC₄(3)进入细胞内增多, 荧光增强时, 表明细胞膜电位负值减小, 细胞膜发生去极化; 反之, 当 DiBAC₄(3)进入细胞内减少, 荧光减弱时, 表明细胞膜电位负值增加, 细胞膜发生超极化。

1.5 线粒体膜电位的测定^[5]

将特异性荧光染料罗丹明加入培养皿中, 终浓度 0.026 mmol·L⁻¹, 37℃ 孵育 10 ~ 20 min, 用激光共聚焦显微镜检测反映心肌细胞线粒体膜电位的荧光强度动态变化。激发波长 485 nm, 荧光波长 530 nm, 每隔 20 s 扫描 1 次。当罗丹明荧光强度增加时, 表明线粒体膜电位负值减小, 膜发生去极化; 反之, 当罗丹明荧光强度减少时, 表明线粒体膜电位负值增加, 膜发生超极化。

1.6 数据处理

数据经激光共聚焦显微镜微机系统对图形及时间进行实时测量而获得, 以未加处理因素前的荧光值为 100%, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异显著性检测用方差分析法, 同一组施加处理因素前后对比, 用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 尼可地尔对细胞膜电位的影响

图 1 结果可见, 给予 0.1 mmol·L⁻¹的尼可地尔后, 观察 10 min 未见细胞内荧光强度发生变化, 细胞膜电位与给药前相比没有变化。给予 1 mmol·L⁻¹的尼可地尔 1 min 内, 即可见细胞内荧光强度迅速减弱, 与给药前相比减弱 (75 ± 12)%, 即细胞膜电位在 1 min 内迅速发生超极化。给予 3 μmol·L⁻¹格列本脲, 观察 10 min 未见细胞内荧光强度发生变化, 说明 3 μmol·L⁻¹格列本脲本身不引起膜电位的变化。先加入格列本脲 3 μmol·L⁻¹ 5 min 后再加入 1 mmol·L⁻¹尼可地尔, 观察 10 min 未见荧

光强度发生变化, 说明 3 μmol·L⁻¹格列本脲能完全阻断 1 mmol·L⁻¹尼可地尔的作用。

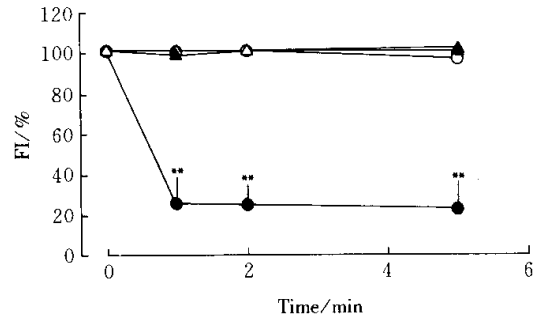


Fig 1. Change of fluorescence intensity(FI) of cardiac plasma membrane potential. (○, ●)nicorandi(Nic) 0.1, 1.0 mmol·L⁻¹, (△)glibenclamid(Gli) 3 μmol·L⁻¹, (▲) Nic 1.0 mmol·L⁻¹ 5 min after Gli 3 μmol·L⁻¹. $\bar{x} \pm s$, n = 6. ** P < 0.01, compared with other groups.

2.2 尼可地尔对线粒体膜电位的影响

给予 0.1 mmol·L⁻¹的尼可地尔 1, 2 及 5 min 后, 可见细胞内荧光强度逐渐增强, 与用药前相比, 荧光强度分别增强 (12 ± 3)% (25 ± 6)% 和 (34 ± 6)%, 说明 0.1 mmol·L⁻¹尼可地尔可使线粒体膜电位发生去极化。给予 1 mmol·L⁻¹的尼可地尔 1, 2 及 5 min, 可见细胞内荧光强度明显增强, 与用药前相比, 荧光强度增强 (32 ± 8)% (39 ± 9)% 和 (45 ± 12)%, 线粒体膜电位发生明显的去极化。给予 3 μmol·L⁻¹的格列本脲, 观察 10 min 未见细胞内荧光强度发生变化, 说明 3 μmol·L⁻¹的格列本脲本身不引起线粒体膜电位的变化。加入格列本脲 3 μmol·L⁻¹ 5 min 后, 再加入 1 mmol·L⁻¹的尼可地尔, 观察 10 min 未见荧光强度有变化, 说明 3 μmol·L⁻¹格列本脲能完全阻断 1 mmol·L⁻¹的尼可地尔对线粒体膜 K_{ATP}通道的作用(图 2)。

3 讨论

细胞膜上的钾离子通道是决定细胞膜电位变化的重要因素。在正常生理情况下, 心肌的 K_{ATP}通道不参与细胞膜电位的调节, 在心肌缺血, 缺氧及能量代谢异常情况下, K_{ATP}通道被激活。最新研究表

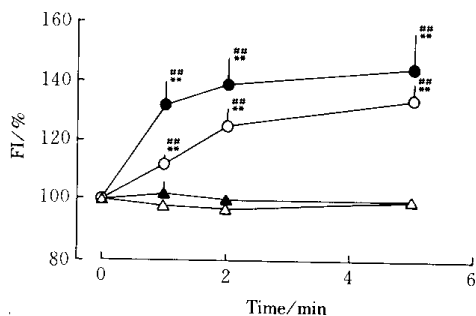


Fig 2. Change of fluorescence intensity of cardiac mitochondrial membrane potential. (○●)Nic 0.1, 1.0 mmol·L⁻¹, (△)Gli 3 μmol·L⁻¹, (▲)Nic 1.0 mmol·L⁻¹ 5 min after Gli 3 μmol·L⁻¹. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. ** $P < 0.01$, compared with basic value; ## $P < 0.01$, compared with Gli and Nic + Gli groups.

明, K_{ATP} 通道由两种蛋白组成:一种为磺酰脲类化合物受体(SUR);另一种为内向整流性钾通道蛋白(Kir)^[6,7]。 K_{ATP} 通道开放剂与SUR蛋白上相应位点结合后,可促使通道开放;而通道阻滞剂与SUR上其相应位点结合后,可阻断通道的开放^[7]。本实验结果表明,较高浓度的 K_{ATP} 通道开放剂尼可地尔(1 mmol·L⁻¹)能使细胞膜迅速发生超极化,而如果预先用此通道的阻断剂格列本脲处理,则再加入尼可地尔也不能使细胞膜膜电位发生变化。单独使用格列本脲组对膜电位没有影响;较低浓度的尼可地尔(0.1 mmol·L⁻¹)不能引起细胞膜电位的变化,与本实验室用膜片钳技术所得的结果一致^[3]。说明通过观察 K_{ATP} 通道开放剂及阻滞剂对细胞膜电位的影响,可以间接反映细胞膜 K_{ATP} 通道的激活情况。

不同的 K_{ATP} 通道开放剂对不同组织细胞膜上 K_{ATP} 通道存在着不同的敏感性,例如心肌细胞膜上的 K_{ATP} 通道可以被相似浓度的开放剂吡那地尔(pinacidil)和色满卡林(cromakalim)所激活,但同种浓度的二氮嗪却不能激活此通道^[8],非常有趣的是最近报道很低浓度的二氮嗪却可以激活心肌细胞线粒体膜上的 K_{ATP} 通道,其敏感性是细胞膜 K_{ATP} 通道的2000倍^[9]。这一实验结果促使我们研究其他 K_{ATP} 通道开放剂对线粒体膜上的 K_{ATP} 通道有无影响。本实验研究发现,0.1 mmol·L⁻¹的尼可地尔即可引起豚鼠心肌细胞线粒体膜电位去极化,并呈剂量依赖性,用格列本脲可以阻止这种膜电位变化,但格列本脲本身并不引起线粒体膜电位变化^[10],说明线粒体膜电位的去极化是 K_{ATP} 通道激活所致。此结果

间接证明低浓度的尼可地尔可以激活心肌细胞线粒体膜 K_{ATP} 通道,较高浓度的尼可地尔既可以激活心肌细胞线粒体膜 K_{ATP} 通道,又可激活细胞膜 K_{ATP} 通道,具有双重激活作用。线粒体膜 K_{ATP} 通道在心肌缺血中究竟怎样发挥其保护作用?其机理的探讨刚刚起步,将鼠肝细胞线粒体膜蛋白片段(其内膜包含有 K_{ATP} 通道蛋白)重组在脂质体中可引起 K_{ATP} 通道开放,钾离子内流^[11],与本实验中发现 K_{ATP} 通道开放剂可以使钾离子内流,引起线粒体膜电位去极化的结果一致。目前认为可能的机理是线粒体膜 K_{ATP} 通道激活,膜电位去极化,促进线粒体内钙离子的释放,减轻线粒体钙超载,ATP的合成速率降低,氧消耗降低,促进缺血心肌功能恢复^[12]。总之,线粒体 K_{ATP} 通道的发现,为探讨缺血心肌的保护作用机理开辟了新的研究领域。

4 参考文献:

- [1] Mizumura T, Nithipatikom K, Gross GJ. Bimakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release, and neutrophil function in dogs [J]. *Circulation*, 1995, **92**(5):1236-1245.
- [2] Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbeuzio RB, D'Alonzo AJ, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection [J]. *Circ Res*, 1997, **81**(6):1072-1082.
- [3] 冯力,刘伊丽,刘杰,邓英姿,袁勇,马立勤,等.不同浓度的尼可地尔对心肌细胞膜 K_{ATP} 通道的影响[J].第一军医大学学报,2000, **20**(1):32-35.
- [4] 刘杰,赵克森.重症休克大鼠细动脉平滑肌细胞膜电位变化在血管反应性减低中作用[J].中国病理生理学杂志,1998, **14**(1):39-42.
- [5] Grimm-smann T, Rustenbeck J. Direct effects of diazoxide on mitochondria in pancreatic B-cells and on isolated liver mitochondria [J]. *Br J Pharmacol*, 1998, **123**(5):781-788.
- [6] Gribble F, Ashfield R, Ammala C, Ashcroft FM. Properties of cloned ATP-sensitive K⁺ currents expressed in *Xenopus* oocytes [J]. *J Physiol (Lond)*, 1997, **498**(Pt 1):87-98.
- [7] Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, et al. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channel [J]. *Neuron*, 1996, **16**(5):1011-1017.
- [8] Nakayama K, Fan Z, Marumo F, Hiraoko M. Interrelation

- between pinacidil and intracellular ATP concentrations on activation of the ATP-sensitive K^+ current in guinea pig ventricular myocytes[J]. *Circ Res* , 1990 , **67**(5) :1124 – 1133.
- [9] Hamada K , Yamazaki J , Nagao T. Shortening of action potential duration is not prerequisite for cardiac protection by ischemic preconditioning or a K_{ATP} channel opener[J]. *J Mol Cell Cardiol* , 1998 , **30**(7) :1369 – 1379.
- [10] Garlid KD , Jaburek M , Yarov-Yarovsky V , Paucek P. Sulfonylurea receptor— K^+ channel coupling in the mitochondrial K_{ATP} channel[J]. *Biophys J* , 1997 , **72**(1) :A39.
- [11] Paucek P , Mironova G , Mahdi F , Beavis AD , Woldegiorgis G , Garlid KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive , ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria[J]. *J Biol Chem* , 1992 , **267**(36) 26062 – 26069.
- [12] Wang Y , Ashraf M. Role of protein kinase C in mitochondrial K_{ATP} channels-mediated protection against Ca^{2+} overload injury in rat myocardium[J]. *Circ Res* , 1999 , **84**(10) :1156 – 1165.

Effects of nicorandil on cardiac plasma membrane and cardiac mitochondrial membrane potential of guinea-pig

FENG Li¹ , LIU Yi-Li² , LIU Jie³ , JIN Chun-Hua³

- (1. Department of Intensive Care Unit , Guangzhou Military General Hospital , Guangzhou 510010 , China
2. Department of Cardiology , Nanfang Hospital , Guangzhou 510515 , China ; 3. Department of Pathophysiology , the First Military Medical University , Guangzhou 510010 , China)

Abstract : With digital imaging techniques of advanced laser confocal microscope , effects of K_{ATP} channel opener nicorandil (Nic) on cardiac plasma membrane (CPM) and cardiac mitochondrial membrane (CMM) potential of guinea-pig were studied. It was found that Nic $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ caused the potential of CPM more negative (hyperpolarization) , fluorescence intensity (FI) decreased by $(75 \pm 12)\%$ of baseline within 1 min , but no effect at $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. CMM was depolarized by $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Nic (FI increased by $(12 \pm 3)\%$, $(25 \pm 6)\%$, $(34 \pm 6)\%$ of baseline within 1 , 2 , 5 min) , and by $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Nic (FI remarkably

increased by $(32 \pm 8)\%$, $(39 \pm 9)\%$, $(45 \pm 12)\%$ of baseline). K_{ATP} channel blocker glibenclamide $3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ itself caused no effect on potential of CPM and CMM , but blocked the above effect on potential of CPM and CMM induced by Nic. The results suggest that K_{ATP} channel of CMM is activated by low dose of Nic , and the high dose of Nic activate both K_{ATP} channels of CPM and CMM.

Key words : nicorandil ; myocardium ; mitochondria ; cell membrane , membrane potentials

(本文编辑 董立春)