

• 短篇论著 •

去甲肾上腺素预处理早时相心肌细胞能量代谢变化

朱元州 冯义柏 常超 王裕勤

去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)在心肌缺血缺氧适应过程中的作用已经被公认^[1~4],但是其具体的作用机制,尤其对细胞的能量代谢变化的分子水平研究不足,而线粒体能量代谢是一个非常重要的环节^[5,6]。据此,特设计此实验用微量NA对培养心肌细胞进行预处理,研究NA预处理后早时相心肌细胞在缺血缺氧损伤中线粒体跨膜电位和培养液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)浓度的变化,为临床治疗提供新的思考和药物选择。

1 材料与与方法

经差速贴壁培养纯化心肌细胞混匀成 $5 \times 10^6/L$,接种于20个已放有18mm×18mm盖玻片的六孔板中,加入含20%新生牛血清的DMEM高糖培养液,在37℃ 5% CO₂培养箱中培养。24 h后行第1次换液,以后每2d换液1次,到第4天时分组准备实验。

实验分为3组,每次每个处理组随机抽取10个平行样本。CON组:预适应早时相空白对照组,事先不加入任何药物干预,培养40min后,检测培养液中LDH浓度,后随机抽取样本,用PBS洗3次,加入标记液Rhodamine 123于37℃温育10~15min,吸去标记液,PBS洗3次,制成细胞混悬液,用流式细胞仪测定荧光强度(每份样品计数>10000个细胞),进行荧光定量分析;缺氧(HP)处理组,随机抽取样本用氮气制造缺氧环境40min,检测培养液中LDH浓度,取出玻片后染色同前;NAPC组:用终浓度0.2mg/L NA孵育10min^[7,8],然后随机抽取样本用氮气制造缺氧环境40min,检测培养液中LDH浓度及玻片后染色同前。

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 12.0统计软件进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

三组细胞荧光强度和培养液LDH检测值如表1。加入微量NA的NAPC组与HP组细胞经过缺氧40min处理后,NAPC组心肌细胞线粒体的荧光强度较HP组细胞线粒体的荧光强度高(表2),培养液LDH低于HP组(表3),表明NAPC组心肌细胞线粒体的跨膜电位较HP组细胞线粒体高,细胞损伤较轻,加入微量NA可以刺激细胞迅速产生保护效应。

表1 3组细胞荧光强度和培养液LDH浓度

组别	荧光强度(%)	LDH(U/L)
CON组	8.32±0.19	155.7±4.3
HP组	6.24±0.13	351.2±9.3
NAPC组	6.55±0.17	318.7±8.6

3 讨论

在心肌细胞受到损伤不同的状态下,线粒体的能量代谢必然是变化的,表现为跨膜电位的变化^[9~11]和LDH的释放。本实验结果显示,在预适应保护效应早时相的研究中,当经过40min严重缺氧损伤处理后,NA预处理过的心肌细胞线粒体荧光强度较没有经过NA预处理过的心肌细胞线粒体高,且释放的LDH较低,说明NAPC组细胞能量较高,损伤较轻,小剂量NA有早期预适应保护效应。荧光强度的

表2 3组细胞线粒体内荧光强度的方差分析

变异来源	自由度	SS	MS	F值	P值
处理组间	2	25.18467	12.59233	461.3	<0.005
组内	27	0.7371	0.0273		
总变异	29	25.92177			

表3 3组细胞培养液LDH检测结果的方差分析

变异来源	自由度	SS	MS	F值	P值
处理组间	2	219352.5	109676.3	1839	<0.005
组内	27	1610.46	59.64667		
总变异	29	220963			

收稿日期:2007-11-26

作者单位:430064 武汉市,武汉科技大学附属天佑医院心内科(朱元州);430022 武汉协和医院心血管病研究所(冯义柏);056002 邯郸市第一医院心内科(常超);071000 保定市,中国人民解放军252医院心内科(王裕勤)

作者简介:朱元州,男,1977年10月生,湖北随州市人,医学硕士,主治医师。Tel:027-62691351

迅速变化反映了线粒体的跨膜电位变化很快。提示在预适应早时相反应中,主要可能是线粒体的跨膜离子的移动造成的,即 K_{ATP} 通道激活效应。在此时相过程中跨膜电位变化的一些具体参与组分与机制尚需进一步研究。

参考文献

[1] Kraut A, Barbiro-Michaely E, Mayevsky A. Differential effects of norepinephrine on brain and other less vital organs detected by a multisite multiparametric monitoring system. *Med Sci Monit*, 2004, 10:215-220.

[2] Taggart P, Yellon DM. Preconditioning and arrhythmias. *Circulation*, 2002, 106:2999-3001.

[3] Riksen NP, Smits P, Rongen GA. Ischaemic preconditioning: from molecular characterisation to clinical application—part I. *Neth J Med*, 2004, 62:353-363.

[4] Fedalen PA, Piacentino V 3rd, Jeevanandam V, et al. Pharmacologic pre-conditioning and controlled reperfusion prevent ischemia-reperfusion injury after 30 minutes of hypoxia/ischemia in porcine hearts. *J Heart Lung Transplant*, 2003, 22: 1234-1244.

[5] Lai N, Camesasca M, Saidel GM, et al. Linking pulmonary oxygen uptake, muscle oxygen utilization and cellular metabolism during exercise. *Ann Biomed Eng*,

2007, 35:956-969.

[6] Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8:405-413.

[7] De Zeeuw S, Lameris TW, Duncker DJ, et al. Cardio-protection in pigs by exogenous norepinephrine but not by cerebral ischemia-induced release of endogenous norepinephrine. *Stroke*, 2001, 32:767-774.

[8] Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, et al. Effects of brief ischaemia on myocardial acetylcholine and noradrenaline levels in anaesthetized cats. *Auton Neurosci*, 2002, 95:37-42.

[9] Marktanner R, Nacke P, Feindt P, et al. Norepinephrine-induced delayed cardioprotection against stunning is at the expense of a higher postischemic arrhythmia rate. *Cardiovasc Surg*, 2003, 11:475-482.

[10] Barbosa V, Sievers RE, Zaugg CE, et al. Preconditioning ischemia time determines the degree of glyco-gen depletion and infarct size reduction in rat hearts. *Am Heart J*, 1996, 131:224-230.

[11] Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, et al. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts *in vivo*. *Circulation*, 1997, 96:1598-1604.

(上接第 172 页)

Logistic 回归分析提示,年龄、高血压病、吸烟史是动脉硬化的危险因素,贝特类药物可能是动脉硬化的保护因素(表 3)。

表 3 动脉硬化相关因素的 logistic 回归分析

变量	β	SE(β)	OR
年龄	0.083*	0.009	1.087
高血压病	1.162*	0.204	3.196
吸烟史	0.467*	0.212	1.596
贝特类药物	-1.796*	0.717	0.166
常数项	-8.172*	1.206	

注: * $P < 0.05$

3 讨论

baPWV 能够很好地反映大动脉僵硬度,是动脉硬度的指示器^[2]。有研究提示,动脉僵硬度和动脉粥样硬化存在强相关性^[3]。Yamashina 等^[4]研究显示,baPWV 有相当高的有效性和可重复性。可以将 baPWV 用于筛查人群中血管损伤情况^[5]。

年龄、血压、吸烟均是 baPWV 的影响因素^[6]。本研究显示动脉硬化组平均年龄较正常组年龄大 10 岁,且是动脉硬化的危险因素之一;血压不仅是动脉硬化的主要影响因素,更是其强危险因素;本研究中吸烟人数有 367 例,占总数的 41.47%,其对动脉硬化的影响仅次于高血压;动脉硬化组合并糖尿病、冠心病或脑卒中的情况显著高于正常组。本研究还提示动脉硬化组抗动脉硬化药物和抗动脉硬化危险因素药物的使用率较正常组高,且贝特类药物可能是其保护

因素,故药物的使用对患者来说无疑是有益的。

参考文献

[1] Boutouyrie P, Tropeano AI, Asmar R, et al. Aortic stiffness is an independent predictor of primary coronary events in hypertensive patients: a longitudinal study. *Hypertension*, 2002, 39: 10-15.

[2] Asmar R, Benetos A, Topouchian J, et al. Assessment of arterial distensibility by automatic pulse wave velocity measurement: validation and clinical application studies. *Hypertension*, 1995, 26: 485-490.

[3] Van Popele NM, Grobbee DE, Bots ML, et al. Association between arterial stiffness and atherosclerosis: the Rotterdam study. *Stroke*, 2001, 32: 454-460.

[4] Yamashina A, Tomiyama H, Takeda K, et al. Validity, reproducibility, and clinical significance of noninvasive brachial-ankle pulse wave velocity measurement. *Hypertens Res*, 2002, 25: 359-364.

[5] Asmar R, Topouchian J, Pannier B, et al. Pulse wave velocity as endpoint in large-scale intervention trial: the Complior study. *J Hypertens*, 2001, 19: 813-818.

[6] Tomiyama H, Yamashina A, Arai T, et al. Influences of age and gender on results of noninvasive brachial-ankle pulse wave velocity measurement: a survey of 12 517 subjects. *Atherosclerosis*, 2003, 166:303-309.