

· 实验研究 ·

线粒体 ATP 敏感性钾通道在降钙素基因相关肽减轻新生大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤中的作用

王鑫 张文颖 田首元

【摘要】 目的 评价线粒体 ATP 敏感性钾通道(mitoK_{ATP}通道)在降钙素基因相关肽(CGRP)减轻新生大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤中的作用。**方法** 取原代培养的新生 1~3 d SD 大鼠心肌细胞,在含有 10%胎牛血清培养基中培养,细胞接种于 6 孔细胞培养板,采用随机数字表法分为 5 组($n=10$):正常对照组(C组)、缺氧复氧组(AR组)、CGRP+缺氧复氧组(CGRP组)、CGRP+mitoK_{ATP}通道阻滞剂(5-HD)+缺氧复氧组(5-HD组)、CGRP+CGRP受体阻滞剂CGRP₈₋₃₇+缺氧复氧组(CGRP₈₋₃₇组)。除C组,其余4组均缺氧3 h,复氧2 h;CGRP组缺氧前2 h加入终浓度为0.1 nmol/L CGRP;5-HD组于缺氧前2.5 h加入终浓度为500 μ mol/L 5-HD,30 min后加入终浓度为0.1 nmol/L CGRP;CGRP₈₋₃₇组于缺氧前2.5 h加入终浓度为1 nmol/L CGRP₈₋₃₇,30 min后加入终浓度为0.1 nmol/L CGRP。于缺氧复氧后检测心肌细胞凋亡情况,计算凋亡指数(AI)、乳酸脱氢酶(LDH)活性,JC-1 荧光法测定线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)的变化,即 JC-1 多聚体/单聚体的比值。**结果** AR组 AI 明显高于C组($P<0.01$)LDH活性明显强于C组($P<0.01$),JC-1多聚体/单聚体的比值明显低于C组($P<0.01$)。CGRP组和5-HD组 AI明显低于AR组($P<0.05$),LDH活性明显弱于AR组($P<0.01$),JC-1多聚体/单聚体的比值明显高于AR组($P<0.01$)。5-HD组和CGRP₈₋₃₇组 AI明显高于CGRP组($P<0.01$),LDH活性明显强于CGRP组($P<0.01$),JC-1多聚体/单聚体的比值明显低于CGRP组($P<0.01$)。**结论** CGRP可以激活新生大鼠心肌细胞膜 CGRP受体,通过激活 mitoK_{ATP}通道,减少心肌细胞缺氧复氧损伤。

【关键词】 降钙素基因相关肽;细胞低氧;肌细胞;心脏;线粒体膜;离子通道;钾

Role of mitochondrial K_{ATP} channel in CGRP-induced reduction of cardiomyocyte anoxia-reoxygenation injury in rats WANG Xin, ZHANG Wenjie, TIAN Shouyuan. Department of Anesthesiology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: ZHANG Wenjie, Email: 1047479730@qq.com

【Abstract】 Objective To evaluate the role of mitochondrial K_{ATP} channel (mitoK_{ATP}) in CGRP-induced reduction of cardiomyocyte anoxia-reoxygenation injury in rats. **Methods** Cardiomyocytes were obtained from 1-3 day old Sprague-Dawley rats and cultured in the culture medium containing 10% bovine calf serum and then seeded onto 6-well plates at a density of 10×10^5 /ml (3 ml/well). The cells were randomly divided into 5 groups ($n=10$ each): control group (group C), anoxia-reoxygenation group (group AR); CGRP+AR group (group CGRP); CGRP+mitoK_{ATP} channel blocker (5-HD)+AR group (group 5-HD); CGRP+CGRP receptor blocker (CGRP₈₋₃₇)+AR group (group CGRP₈₋₃₇). Except group C, the other groups were anoxia for 3 hours and reoxygenated for 2 hours. In group CGRP, CGRP (final concentration 0.1 nmol/L) was added to the culture medium before 2 h anoxia. In group 5-HD, 5-HD (final concentration 500 μ mol/L) was added to the culture medium 2.5 h before anoxia, and CGRP (final concentration 0.1 nmol/L) was added after 30 min. In group CGRP₈₋₃₇, CGRP₈₋₃₇ (final concentration 1 nmol/L) was added to the culture medium 2.5 h before anoxia, and CGRP (final concentration 0.1 nmol/L) was added after 30 min. At the end of reoxygenation, the level of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant was detected, the changes in mitochondrial membrane potential were assessed by JC-1 fluorescence assay, the cell apoptosis was detected by Tunnel. **Results** Compared with group C, the amount of LDH released and AI were significantly increased, JC-1 monomer/aggregate ratio were significantly decreased in group AR ($P<0.01$). Compared with group AR, the amount of LDH released and AI were significantly decreased, JC-1 monomer/aggregate ratio were significantly increased in group CGRP ($P<$

DOI:10.12089/jca.2020.01.017

基金项目:山西医科大学第一医院青年基金(YQ161705)

作者单位:030001 太原市,山西医科大学第一医院麻醉科

通信作者:张文颖,Email:1047479730@qq.com

0.01)。Compared with group CGRP, the amount of LDH released and AI were significantly increased, JC-1 monomer/aggregate ratio were significantly decreased in group 5-HD and CGRP₈₋₃₇ ($P < 0.01$).

Conclusion CGRP can reduce A/R-induced injury to neonatal rat cardiomyocytes through activating mitoK_{ATP} channel via combining with CGRP receptor.

【Key words】 Calcitonin gene-related peptide; Cell hypoxia; Myocytes; Cardiac; Mitochondrial membranes; Ion Channels; Potassium

降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)是一种感觉神经释放的神经肽,广泛存在于心血管系统^[1],可减轻急性糖尿病大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤^[2],但其机制尚不清楚。研究表明,激活心肌细胞线粒体膜 ATP 敏感性钾通道(mitoK_{ATP}通道)可改善心肌细胞缺氧复氧损伤^[3],但 CGRP 减轻心肌细胞缺氧复氧损伤是否通过 mitoK_{ATP}通道实现的,相关报道较少。前期研究发现, CGRP 可以激活心肌细胞膜 ATP 敏感性钾通道(sarcK_{ATP}通道)^[4]。本研究拟探讨 CGRP 对新生大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤的影响和 mitoK_{ATP}通道在其中的作用。

材料与方法

实验动物与分组 清洁级健康新生 SD 大鼠,日龄 1~3 d,体重 5~6g,雌雄不拘,由山西医科大学动物实验中心提供。采用随机数字表法,将培养的心肌细胞分为 5 组:正常对照组(C 组)、缺氧复氧组(AR 组)、CGRP+缺氧复氧组(CGRP 组)、CGRP+mitoK_{ATP}通道阻滞剂(5-HD)+缺氧复氧组(5-HD 组)、CGRP+CGRP 受体阻滞剂 CGRP₈₋₃₇+缺氧复氧组(CGRP₈₋₃₇组)。

原代乳鼠心肌细胞的培养 参照文献^[5]原代培养乳鼠心肌细胞,将乳鼠麻醉后,75%酒精消毒皮肤,于无菌条件下快速开胸取心脏,置入 4℃预冷的 PBS 中,修剪掉周围血管组织及心房组织,排出心腔内残余血, PBS 中漂洗 3 遍后将心脏剪碎约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小,采用终浓度为 0.1%的胶原酶 II 于 37℃水浴中反复消化,第 1 次弃掉上清,其余各次上清收集到含有 10%胎牛血清中的培养基中终止消化,离心 5 min,沉淀制成细胞悬液,200 目滤网过滤;以差速贴壁法(60~70 min)去除非心肌细胞,以 10×10⁵/ml 细胞密度接种于 6 孔细胞培养板,每孔 3 ml。将细胞置于 DMEM 培养基,放入孵箱中培养(37℃, 5% CO₂),于培养基中加入终浓度为 0.1 mol/L 的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷抑制非心肌细胞的生长,24 h 后更换为不含 5-BrdU 的培养基,培养 72 h,呈亚融合状态的心肌细胞用于建立缺氧复氧损伤

模型。

缺氧复氧模型建立与分组处理 参照文献^[2],将细胞吸掉培养液放入缺氧盒内,预先用高纯度氮气饱和 2 h 的缺氧液(成分:NaHCO₃ 6.0 mmol/L、NaCl 98.5 mmol/L、KCl 10.0 mmol/L、CaCl₂ 1.0 mmol/L、Sodium lactate 40.0 mmol/L、MgSO₄ 1.2 mmol/L、HEPES 20.0 mmol/L,调 pH 值至 6.8),氧分压小于 10 mmHg,放入 37℃孵箱孵育 3 h 模拟缺氧,期间持续通入高纯度氮气 1 L/min,出气口用水封,缺氧结束后更换正常培养基(氧分压大于 100 mmHg)培养 2 h 模拟复氧。C 组不予缺氧复氧处理。AR 组、CGRP 组、5-HD 组和 CGRP₈₋₃₇组均缺氧 3 h,复氧 2 h。CGRP 组于缺氧前 2 h 加入 CGRP(终浓度为 0.1 nmol/L,批号:SLBC7951V)。5-HD 组于缺氧前 2.5 h 加入 5-HD(终浓度为 500 μmol/L),30 min 后加入 CGRP(终浓度为 0.1 nmol/L)。CGRP₈₋₃₇组于缺氧前 2.5 h 加入 CGRP₈₋₃₇(终浓度为 1 nmol/L,批号:098K4812),30 min 后加入 CGRP(终浓度为 0.1 nmol/L)。

细胞凋亡的测定 缺氧复氧结束后,参照 TUNEL 一步法细胞凋亡检测试剂盒(批号:C1056)说明书, PBS 洗涤细胞,4%多聚甲醛固定 60 min, PBS 洗涤细胞 5 min × 3 次,每张切片加入 50 μl TUNEL 检测液,37℃避光孵育 1 h。PBS 洗涤细胞 5 min × 3 次,采用 DAPI(每张切片加入 50 μl)染细胞核,抗荧光封片液封片后在荧光显微镜下观察。随机选取 10 个视野,计数 TUNEL 阳性细胞和细胞总数,即凋亡细胞。计算凋亡指数(AI), AI=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

乳酸脱氢酶(LDH)活性的测定 于缺氧复氧后收集细胞培养液,4℃离心后收集上清,采用 LDH 检测试剂盒(批号:8078)检测上清液 LDH 活性,并按照试剂盒说明,制作标准品浓度梯度,绘制标准曲线。

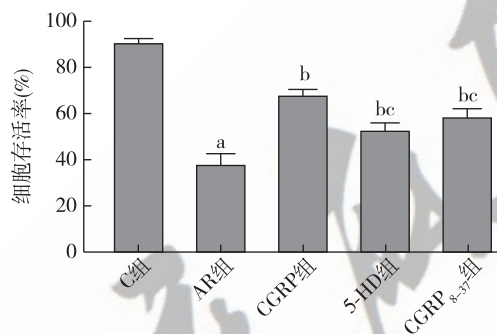
线粒体膜电位(Δψ_m)的测定 采用 JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位,缺氧复氧后,吸除培养液, PBS 液洗涤细胞一次,加入 1 ml 细胞培养液,并加入 1 ml JC-1 染色工作液,充分混匀,细胞培养箱中 37℃孵育 20 min,结束后吸除上清,用 JC-1 染色缓冲液

(1X)洗涤 2 次,加入 2 ml 细胞培养液,采用激光共聚焦显微镜下观察。检测 JC-1 单聚体(绿荧光)时设置激发光波长为 490 nm,发射光波长为 530 nm,检测 JC-1 多聚体(红荧光)时,激发光波长为 525 nm,发射光波长为 590 nm。将获得的线粒体膜电位免疫荧光图用 FV10-ASW Viewer 软件进行分析,每张片子取 100 个区域进行多聚体/单聚体(红荧光/绿荧光)计数,计算其平均值。以多聚体/单聚体的相对比值衡量 $\Delta\psi_m$ 状态,比值降低,提示 $\Delta\psi_m$ 下降,比值升高,提示 $\Delta\psi_m$ 上升。记录五组大鼠 JC-1 多聚体/单聚体的比值。

统计分析 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

AR 组心肌细胞存活率明显低于 C 组($P < 0.01$)。CGRP 组和 5-HD 组和 CGRP₈₋₃₇ 组心肌细胞存活率明显高于 AR 组($P < 0.01$)。5-HD 组和 CGRP₈₋₃₇ 组心肌细胞存活率明显低于 CGRP 组($P < 0.01$) (图 1)。

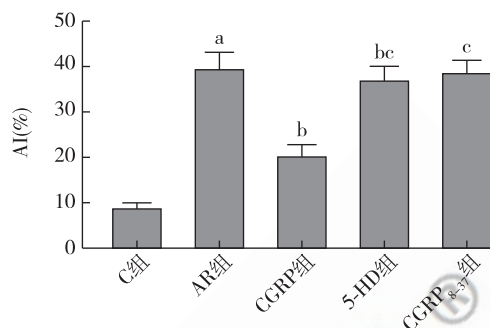


注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$;与 AR 组比较,^b $P < 0.01$;与 CGRP 组比较,^c $P < 0.01$

图 1 五组大鼠心肌细胞存活率

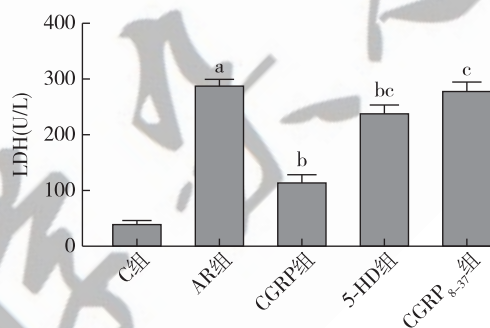
AR 组 AI 明显高于 C 组($P < 0.01$);CGRP 组和 5-HD 组 AI 明显低于 AR 组($P < 0.05$);5-HD 组和 CGRP₈₋₃₇ 组 AI 明显高于 CGRP 组($P < 0.01$);CGRP₈₋₃₇ 组和 AR 组 AI 差异无统计学意义(图 2)。

AR 组 LDH 活性明显强于 C 组($P < 0.01$);CGRP 组和 5-HD 组 LDH 活性明显弱于 AR 组($P < 0.01$);5-HD 组和 CGRP₈₋₃₇ 组 LDH 活性明显强于 CGRP 组($P < 0.01$);CGRP₈₋₃₇ 组和 AR 组 LDH 活性差异无统计学意义(图 3)。



注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$;与 AR 组比较,^b $P < 0.05$;与 CGRP 组比较,^c $P < 0.01$

图 2 五组大鼠心肌细胞 AI 的比较



注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$;与 AR 组比较,^b $P < 0.01$;与 CGRP 组比较,^c $P < 0.01$

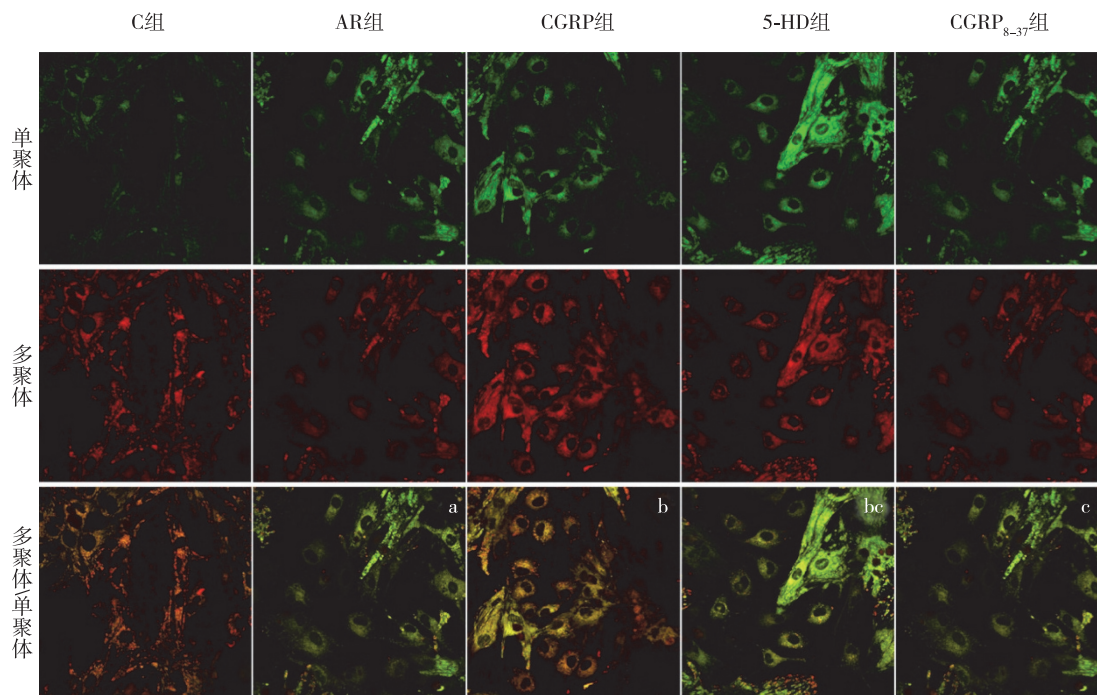
图 3 五组大鼠心肌细胞 LDH 的比较

AR 组 JC-1 多聚体/单聚体的比值明显低于 C 组($P < 0.01$)。CGRP 组和 5-HD 组 JC-1 多聚体/单聚体的比值明显高于 AR 组($P < 0.01$)。5-HD 组和 CGRP₈₋₃₇ 组 JC-1 多聚体/单聚体的比值明显低于 CGRP 组($P < 0.01$)。CGRP₈₋₃₇ 组和 AR 组 JC-1 多聚体/单聚体的比值差异无统计学意义(图 4—5)。

讨 论

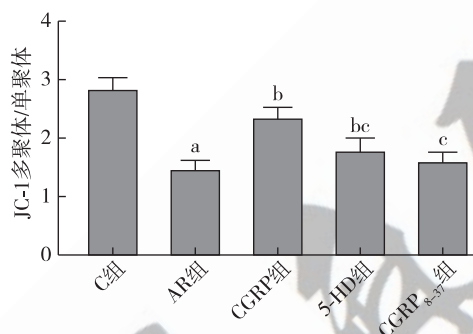
参照文献[2]方法原代培养新生大鼠心肌细胞,并且进行细胞鉴定及细胞状态评价,结果显示,采用上述方法,可以重复培养出形态良好、数量稳定、存活率高的心肌细胞。参照文献[6]确定缺氧复氧时间,制备心肌细胞缺氧复氧模型,结果显示,缺氧复氧后心肌细胞存活率降低、凋亡率和培养液 LDH 活性增加,提示心肌细胞缺氧复氧模型建立成功。

预实验选取 3 种浓度 CGRP: 10, 0.1, 0.001 nmol/L,结果提示,0.1 nmol/L CGRP 抗凋亡作用明



注:多聚体(红荧光)提示线粒体膜电位超极化,单聚体(绿荧光)提示线粒体膜电位去极化

图4 五组大鼠心肌细胞 JC-1 荧光图($\times 400$ 倍)



注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$;与 AR 组比较,^b $P < 0.01$;与 CGRP 组比较,^c $P < 0.01$

图5 五组大鼠心肌细胞 JC-1 多聚体/单聚体的比值

显,此浓度与前期研究一致^[4]。因此,本研究选取 0.1 nmol/L CGRP 为干预浓度。

本研究将细胞用 JC-1 染色 20 min,采用激光共聚焦显微镜观察线粒体膜电位。单聚体(绿色荧光)代表线粒体膜电位去极化,多聚体(红色荧光)代表线粒体膜电位超极化。以多聚体/单聚体的相对比值衡量线粒体膜电位的状态,比值降低,提示线粒体膜电位下降,比值升高,提示线粒体膜电位增加。结果发现,心肌细胞缺氧复氧后,许多心肌细胞线粒体膜电位显示出高度极化状态,培养液 LDH 活性增强,心肌细胞凋亡率增加。这种线粒体

膜电位高度极化可能是线粒体内驱动 Ca^{2+} 的动力,导致线粒体内 Ca^{2+} 超载,触发细胞凋亡。Scarlett 等^[7]研究发现,线粒体膜电位增加发生在细胞色素 C 释放之前,而细胞色素 C 的释放发生在线粒体膜电位缺失和线粒体肿胀之后。以上结果提示心肌细胞遭受缺氧复氧损伤后,可导致线粒体膜电位高度极化,促进 Ca^{2+} 内流增加,导致线粒体钙超载^[8],诱发心肌细胞凋亡。本研究进一步采用 CGRP 进行干预,结果发现,CGRP 可明显减少新生大鼠心肌细胞凋亡,提示 CGRP 心肌保护作用可能主要通过抑制心肌细胞的凋亡来实现的,同时 CGRP 可使培养液 LDH 浓度明显降低,JC-1 多聚体/单聚体比值增加,提示 CGRP 减轻新生大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤可能与线粒体膜电位有关。研究发现,CGRP 可以通过多种信号通路产生心肌保护作用:CGRP 可以通过 PI3k-Akt 通路减轻大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤^[9]; CGRP 还可抑制 NF- κ B 和 TNF- α 的活性,降低氧自由基和钙超载,保护线粒体功能,从而保护受损心肌^[10-11]。本研究给予特异性 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道阻滞剂 5-HD,发现其可部分逆转 CGRP 的心肌保护作用。本研究进一步给予 CGRP 受体特异性阻断剂 CGRP₈₋₃₇,发现 CGRP 的心肌保护作用完全消失。以上结果提示,CGRP 保护缺氧复氧心肌细胞的作用,部分是通过 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道实现的。

CGRP 激活心肌细胞膜特异性 CGRP 受体,对缺氧复氧心肌细胞产生保护作用,其细胞内存在多种信号通路,本研究主要探索了 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道在其中的作用,未来还将继续探索 CGRP 的其他保护机制及信号通路。

综上所述,CGRP 可以激活新生大鼠心肌细胞膜特异性 CGRP 受体,通过激活线粒体 ATP 敏感性钾通道,稳定线粒体膜电位,降低线粒体钙超载,从而对缺氧复氧心肌细胞产生保护作用。

参 考 文 献

- [1] Zhang R, Guo Z, Wang L, et al. Degeneration of capsaicin sensitive sensory nerves enhances myocardial injury in acute myocardial infarction in rats. *Int J Cardiol*, 2012, 160(1): 41-47.
- [2] 陈璐, 赵鑫, 郭政. 降钙素基因相关肽对高糖下新生大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤的影响. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(10): 1185-1188.
- [3] Bruchez P, Sarre A, Kappenberger L, et al. The L-Type Ca^{2+} and KATP channels may contribute to pacing-induced protection against anoxia-reoxygenation in the embryonic heart model. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2010, 19(11): 1196-1202.
- [4] 王鑫, 原大江, 郭政. 降钙素基因相关肽对大鼠心室肌细胞膜 ATP 敏感性钾离子通道的影响. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(4): 396-399.
- [5] Zhao FP, Guo Z, Wang PF. Calcitonin gene related peptide (CGRP) inhibits norepinephrine induced apoptosis in cultured rat cardiomyocytes not via PKA or PKC pathways. *Neurosci Lett*, 2010, 482(2): 163-166.
- [6] Xu M, Wang Y, Ayub A, et al. Mitochondrial $\text{K}(\text{ATP})$ channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 281(3): H1295-1303.
- [7] Scarlett JL, Sheard PW, Hughes G, et al. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett*, 2000, 475(3): 267-272.
- [8] Wang C, Qi S, Liu C, et al. Mitochondrial Dysfunction and Ca^{2+} Overload in Injured Sertoli Cells Exposed to Bisphenol A. *Environ Toxicol*, 2017, 32(3): 823-831.
- [9] Teng X, Song J, Zhang G, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress by intermedin(1-53) protects against myocardial injury through a PI3 kinase-Akt signaling pathway. *J Mol Med (Berl)*, 2011, 89(12): 1195-1205.
- [10] Okajima K, Harada N. Regulation of inflammatory responses by sensory neurons: molecular mechanism(s) and possible therapeutic applications. *Curr Med Chem*, 2006, 13(19): 2241-2251.
- [11] Bowers MC, Katki KA, Rao A, et al. Role of calcitonin gene-related peptide in hypertension-induced renal damage. *Hypertension*, 2005, 46(1): 51-57.

(收稿日期:2019-01-10)

《临床麻醉学杂志》第一届青年编委名单

陈立建 方 芳 高 伟 龚亚红 桂 波 华福洲 纪木火 金文杰 李佩盈 李 偲 李正迁
林 云 刘晓宇 刘艳红 刘 洋 陆 菡 罗 洁 马璐璐 彭文平 彭宇明 任 瑜 宋宗斌
孙玉娥 唐 君 田 婕 田学馥 王 彬 王春艳 王建设 王婷婷 王艳萍 王 莹 肖 锋
徐志鹏 杨丽芳 杨万超 袁开明 张冯江 张 涛 张 伟 张 雪 张 益 张 媛 赵 磊
郑跃英 朱 娟 庄 蕾