

研究论文

二氮嗪对长时程低温保存大鼠心脏 Fas/FasL 蛋白表达的影响

范莹¹, 郑鸣之², 郭炜³, 蒋建平², 朱立¹, 沈岳良¹, 陈莹莹^{1,*}

¹浙江大学医学院生理系, 杭州 310058; ²浙江医学高等专科学校药理教研室, 杭州 310053; ³上海中医药大学病理教研室, 上海 201203

摘要: 本文旨在研究线粒体ATP敏感性钾(mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$)通道开放剂二氮嗪(diazoxide, DE)对离体长时程低温保存的大鼠心脏促凋亡蛋白 Fas 和 FasL 表达的影响。利用 Langendorff 离体大鼠心脏灌注法, 观察心脏在 4 °C 含或不含(对照组) DE 的 Celsior 保存液保存 8 h 后, 复灌期心脏作功量(rate-pressure product, RPP)变化情况, 采用原位末端标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)染色法检测心肌细胞凋亡和免疫组织化学方法检测 Fas 和 FasL 蛋白表达情况。结果显示, 在 Celsior 保存液中加入 DE (30 $\mu\text{mol/L}$), 复灌期 RPP 的恢复率在多个复灌时间点上优于对照组; 同时可降低长时程低温保存心脏心肌细胞凋亡指数, 减少 Fas 和 FasL 蛋白的表达。DE 的上述作用可被 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道特异性阻断剂 5-羟基癸酸盐(5-hydroxydecanoate, 5-HD)所取消。以上结果提示, DE 可能通过激活 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道来减少 Fas 和 FasL 蛋白表达, 从而减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤后的心肌细胞凋亡。

关键词: 二氮嗪; Fas/FasL; 线粒体 ATP 敏感性钾通道; 心脏保存; 心肌保护

中图分类号: R331

Effects of diazoxide on Fas/FasL protein expressions in rat myocardium suffered from long-term hypothermic preservation

FAN Ying¹, ZHENG Ming-Zhi², GUO Wei³, JIANG Jian-Ping², ZHU Li¹, SHEN Yue-Liang¹, CHEN Ying-Ying^{1,*}

¹Department of Physiology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; ²Department of Pharmacology, Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China; ³Department of Pathology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effect of a mitochondrial ATP-sensitive potassium channel ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}$) opener, diazoxide (DE), on Fas/FasL protein expressions in rat heart suffered from long-term hypothermic preservation. The Langendorff isolated rat heart model was used. The hearts were stored in 4 °C Celsior solution with or without (control) DE for 8 h followed by 60 min of reperfusion. The recovery of rate-pressure product (RPP) was observed. Apoptotic cardiomyocytes were detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique. The expressions of Fas/FasL proteins were also analyzed by immunohistochemical method. The results showed that compared with the control group, DE (30 mmol/L) increased the recovery of RPP during reperfusion, reduced the percentage of apoptotic cells and the expressions of Fas and FasL proteins in rat hearts suffered from 8 h of hypothermic preservation. The above effects of DE were attenuated by a $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ channel inhibitor 5-hydroxydecanoate (5-HD). These results indicate that DE could alleviate rat myocardial injury induced by ischemia-reperfusion through reducing the expressions of Fas and FasL proteins via opening of $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ channel.

Key words: diazoxide; Fas/FasL; mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; heart preservation; cardioprotection

Received 2007-07-30 Accepted 2007-08-21

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30470635) and the Science Foundation of Zhejiang Medical College (No. 2006XZ04).

*Corresponding author. Tel: +86-571-88208250; Fax: +86-571-88208250; E-mail: bchenyy@zju.edu.cn

作为终末期心脏疾病的有效治疗方法, 心脏移植已被广泛接受。尽管有报导认为低温保存 6 h 后的心脏在移植术后有较好的预后, 但临床统计证实随保存时间延长, 移植后死亡率仍有从低温保存 2 h 的 9.8% 上升到 4 h 的 17.6% 的趋势^[1]。研究发现, 心肌缺血/再灌注损伤是造成移植术后高并发症及高死亡率的主要原因之一, 改善心脏保存质量, 对抗移植后缺血/再灌注损伤的发生成为亟待解决的问题。

近年来研究显示, 心肌缺血/再灌注所致的心肌细胞死亡除了细胞坏死外, 尚有凋亡。细胞凋亡的发生受多种基因表达的调控, 其中 Fas 基因表达变化与凋亡的关系倍受关注^[2]。ATP 敏感性钾通道特别是线粒体 ATP 敏感性钾(mitochondrial ATP-sensitive potassium, $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$)通道的开放可减少心肌细胞坏死和凋亡的发生^[3-5], 是减轻离体心脏长时程低温保存时缺血/再灌注损伤的关键环节^[6]。二氮嗪(diazoxide, DE)作为 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道选择性开放剂, 能通过选择性开放 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道来改善离体大鼠心脏长时程低温保存后的效果。本研究采用大鼠离体心脏缺血/再灌注和低温保存模型, 观察 DE 对离体大鼠心肌长时程低温保存后 Fas 和 FasL 蛋白表达的影响, 并探讨其在减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤所致心肌细胞凋亡中的作用。

1 材料与方 法

1.1 药品与溶液的配制 5-羟基癸酸盐(5-hydroxydecanoate, 5-HD)、DE、二甲基亚砷(DMSO)为美国 Sigma 公司产品, Fas/FasL 免疫组织化学试剂盒、DAB 显色试剂盒为武汉博士德公司产品。其余试剂均为市售分析纯级。DE 使用前用 DMSO 溶解, DMSO 的终浓度小于 0.1%。Celsior 液用于心脏的停搏与保存, 其成分及含量为(mmol/L): NaOH 100、KCl 15、 MgCl_2 13、 CaCl_2 0.25、mannitor 60、lactobionate 80、histidine 30、glutamate 20, pH 7.4, 渗透压 320 mOsm/L。

1.2 实验动物与分组 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(230~250 g)由浙江大学医学院实验动物中心提供。根据保存液成分的不同, 随机分为 3 组 ($n=8$)。 (1)对照组: 离体心脏在 Celsior 液(4 °C)中保存 8 h。 (2) DE 组: 离体心脏在含 30 $\mu\text{mol/L}$ DE 的 Celsior 液(4 °C)中保存 8 h。 (3) DE + 5-HD 组: Celsior 液中含 30 $\mu\text{mol/L}$ DE 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 5-HD, 其余同第二组。

1.3 离体大鼠心脏灌流和低温保存 具体方法

参考文献^[5]。

1.4 观察指标

1.4.1 心功能测定指标 观察复灌过程中的心脏作功量(rate-pressure product, RPP, 即心率与左室发展压乘积)的变化^[7]。每隔 10 min 测定一次, 连续测定 5 次。

1.4.2 心肌细胞 Fas/FasL 蛋白阳性染色指数

实验结束后, 切取左心室心尖部全层心肌, 10% 甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片。根据 Fas/FasL 免疫组织化学试剂盒说明书, 采用 SABC 法检测心肌细胞中 Fas 和 FasL 蛋白表达情况。在高倍镜下(20 \times 20)检测, 每张切片随机选择 10 个视野, 总计数 1 000 个细胞左右, 细胞膜及细胞质呈棕黄色为 Fas 或 FasL 蛋白阳性表达的细胞, 细胞膜及细胞质透明不着色为蛋白阴性表达的细胞, 计算阳性细胞占总细胞数的百分比即为 Fas/FasL 蛋白阳性染色指数。

1.4.3 心肌细胞凋亡指数 采用原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)测定心肌细胞凋亡情况。切取左心室心尖部全层心肌, 10% 甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片。将组织切片用二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 37 °C 下用蛋白酶 K 处理 30 min 后再用 PBS 冲洗; 0.3% H_2O_2 -甲醇溶液室温下孵育 30 min, PBS 冲洗后加入荧光标记的核苷酸和脱氧核苷酸末端转移酶(TdT)的混和液, 37 °C 水浴箱中反应 60 min, PBS 冲洗; 加辣根过氧化物酶孵育 30 min (37 °C), PBS 冲洗; DAB 显色(避光), 苏木素复染后脱水, 透明, 封片。在高倍镜下(10 \times 40)检测, 心肌凋亡阳性细胞核呈棕黄色, 凋亡阴性细胞核呈蓝色。以凋亡阳性细胞数目占总心肌细胞数目的百分比作为心肌细胞凋亡指数。

1.5 统计学处理 各组数据以 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示, 并用 SigmaStat 软件包处理。组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Student-Newman-Keuls (SNK)检验。统计学检验水准为 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 低温保存后心功能恢复情况

各实验组心脏低温保存前各项血流动力学指标均无显著性差异。与对照组相比, 保存液中加入 30 $\mu\text{mol/L}$ DE, 可提高心脏低温保存 8 h 后在复灌期间 RPP 的恢复率(以 K-H 液平衡灌流 30 min 时的指标为 100%, $P<0.01$)。5-HD 取消 DE 的上述作用

($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 各组心肌细胞凋亡指数的变化

低温保存 8 h 后，各组心肌均有细胞凋亡发生；与对照组相比，DE 处理明显降低低温保存 8

表 1. 大鼠离体心脏低温保存 8 h 后作功量的恢复情况
Table 1. Recovery of RPP after 8 h of hypothermic preservation

Group	Baseline RPP	RPP during reperfusion (% of baseline)				
		20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
Control	20 458.21±237.67	27.11±14.76	25.47±15.13	25.32±13.60	22.62±14.34	21.67±14.15
DE	20 282.36±281.69	58.75±14.61**	54.74±13.22**	52.09±14.81**	49.49±13.17**	50.84±13.21**
DE + 5-HD	20 317.86±234.23	36.78±10.58 [#]	30.06±16.86 [#]	32.88±11.36 [#]	33.05±17.01	27.78±18.89 [#]

mean±SD, n=8. ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs DE group.

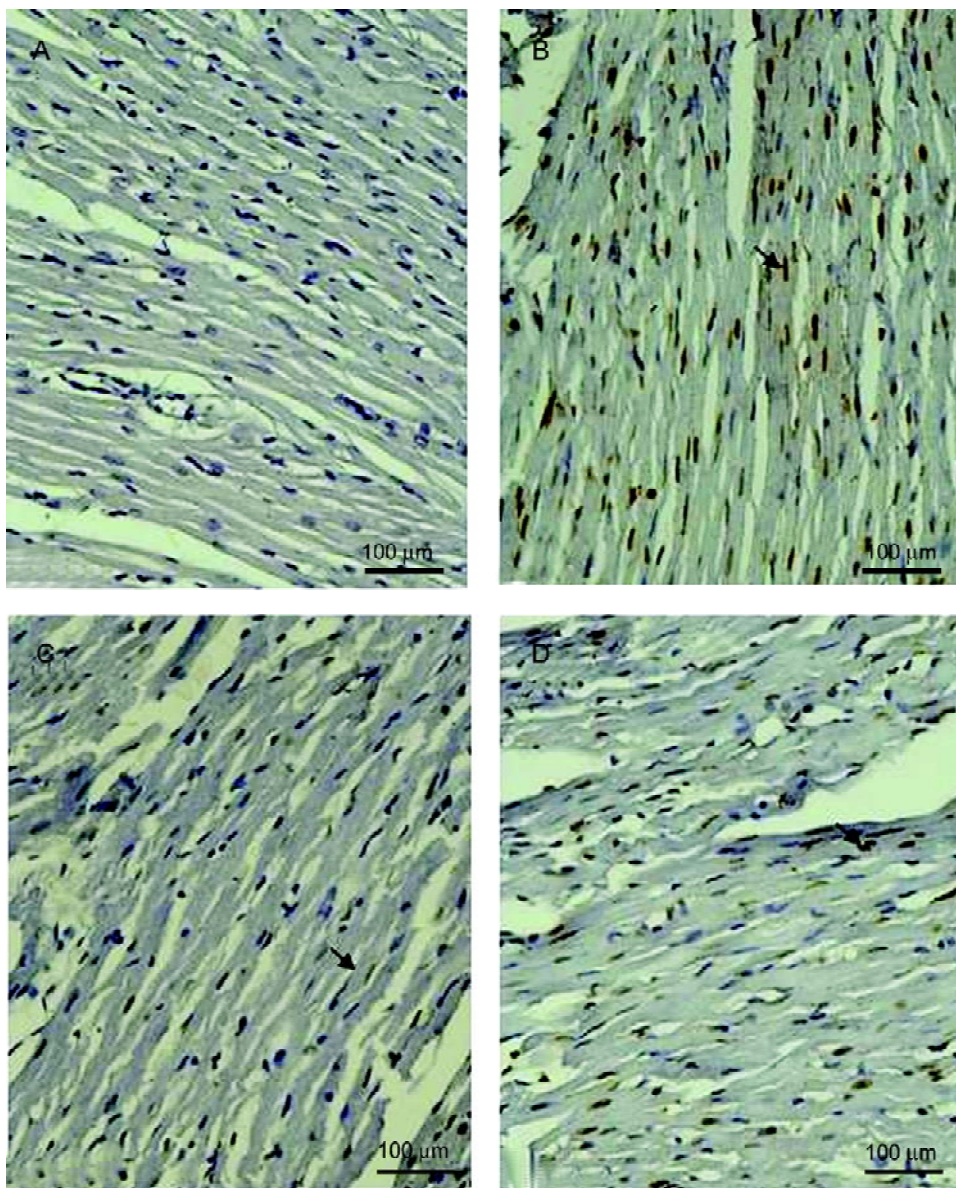


图 1. 低温保存 8 h 后各组心肌细胞凋亡情况

Fig. 1. Cardiomyocyte apoptosis detected by TUNEL after 8 h of hypothermic preservation. Brown staining (TUNEL-positive, arrow) indicates apoptotic cardiomyocytes. A: Normal group: the freshly isolated hearts were simply perfused with K-H solution for 30 min. B: Control group. C: DE group; D: 5-HD + DE group. Scale bar, 100 μm.

h 后心肌细胞的凋亡指数[(34.77±8.34)% vs (45.22±7.89)%, $P<0.05$]; 而 5-HD + DE 组与对照组的细胞凋亡指数并无显著性差异[(43.14±7.89)% vs (45.22±7.89)%]

(图 1)。

2.3 各组心肌细胞 Fas 和 FasL 表达情况

低温保存 8 h 后, 各组心肌细胞 Fas 和 FasL 蛋

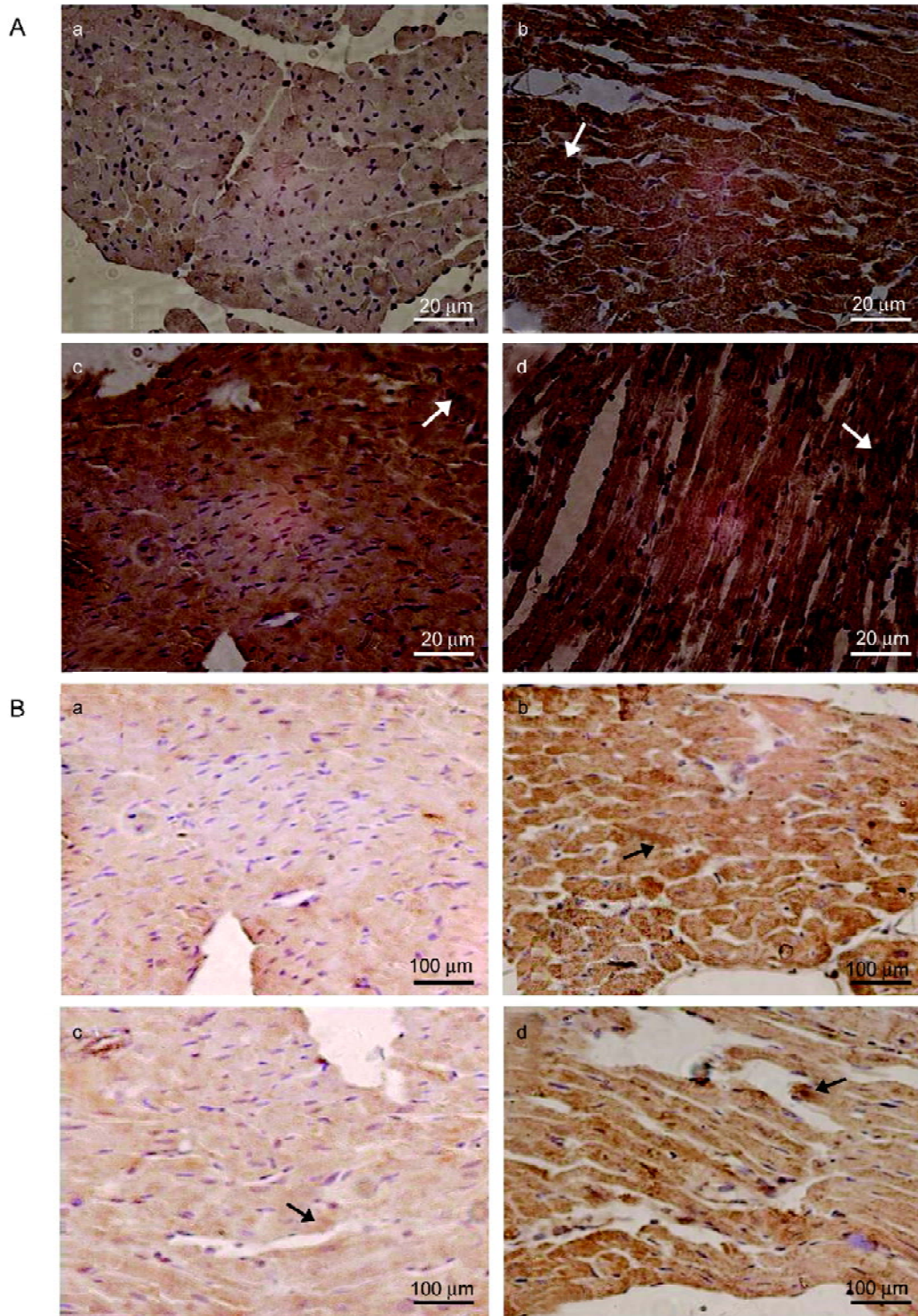


图 2. 低温保存 8 h 后心肌细胞 Fas/FasL 蛋白表达的情况

Fig. 2. Expressions of Fas/FasL proteins detected by immunohistochemical method after 8 h of hypothermic preservation. A: Expression of Fas protein. Scale bar, 20 μm . B: Expression of FasL protein. Scale bar, 100 μm . Brown staining (arrow) indicates the expression of Fas or FasL protein. a: Normal myocardium from rat heart perfused with K-H solution for 30 min. b: Myocardium in control group. c: Myocardium in DE group. d: Myocardium in DE + 5-HD group.

表2. 大鼠离体心脏低温保存8 h后心肌细胞 Fas/FasL 蛋白阳性染色指数

Table 2. Positive index of Fas and FasL proteins in rat hearts after 8 h of hypothermic preservation

Group	Positive index (%)	
	Fas	FasL
Control	43.65±7.09	42.66±7.20
DE	30.23±4.50**	22.74±8.73**
DE + 5-HD	39.30±6.77##	36.90±9.64##

mean±SD, n=8. **P<0.01 vs control group; ##P<0.01 vs DE group.

白均有表达; 与对照组比较, DE 组心肌细胞 Fas 和 FasL 蛋白阳性染色指数明显降低($P<0.01$); 而 5-HD 取消 DE 的上述作用($P<0.01$)(图2, 表2)。

3 讨论

改善长时程缺血后心功能的恢复、减轻再灌注损伤是心脏移植成功的关键。本研究观察到, 在心脏保存液中直接添加 30 $\mu\text{mol/L}$ DE, 可明显改善低温保存 8 h 后大鼠心脏的收缩功能, 而 DE 的作用可被 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道的特异性阻断剂 5-HD 所取消。上述结果与以往研究报道一致^[6]。

有资料表明, 长时间缺血后在再灌注期心肌损伤的主要原因是: (1)再灌注早期氧化应激刺激使肌浆网和肌纤维膜上的一些离子转运蛋白的活性发生改变, 肌浆网波动性释放 Ca^{2+} 和细胞膜电位发生致心律失常性波动^[8]; (2)氧化应激引发的细胞凋亡是心肌缺血/再灌注损伤及心脏功能衰退的重要机制^[9], 氧化应激时, 大量的氧自由基攻击生物膜磷脂中的多聚不饱和脂肪酸, 引起膜脂质过氧化, 最终导致心肌细胞损伤、坏死、凋亡; 氧化应激时, 胞浆内钙离子超载, 亦可导致心肌细胞凋亡^[10]; (3)通过使线粒体钙超载、活性氧大量生成、腺苷酸耗竭和无机磷酸盐堆积等, 引起线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放^[11], 从而导致心肌细胞凋亡; (4)线粒体电位破坏和功能障碍, 使能量代谢发生障碍, 引起心肌细胞死亡^[12]。

目前推测, $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道开放通过以下机制参与缺血心肌的保护: (1)增加 K^+ 内流入线粒体, 降低跨膜电位差, 抑制 Ca^{2+} 内流, 激活环孢素 A 敏感性的 Ca^{2+} 释放, 有效阻止线粒体的钙超载^[8,13], 对抗心律失常的发生和心脏收缩功能受损; (2)调节线

粒体基质容积、提高氧化代谢率和促进线粒体呼吸^[14]; (3)抑制氧化应激引起的细胞凋亡^[15]。

本研究观察到, 在心脏保存液中添加 DE, 可明显抑制促凋亡蛋白 Fas/FasL 的表达和心肌细胞凋亡的发生。Fas (APO-1 或 CD95)属于肿瘤坏死因子受体/神经生长因子受体(TNFR/NGFR)超家族, 它是一种 I 型跨膜蛋白。FasL 是肿瘤坏死因子超家族成员中的一种三聚体的 II 型膜蛋白, FasL 胞浆区为 N 末端, 缺乏信号转导区, 而胞外区与 Fas 表达阳性细胞结合, 可诱导细胞凋亡。其主要途径为: 当 Fas 与 FasL 结合后, 通过相互作用, 形成 Fas 受体分子间交联, 细胞内的死亡效应域(death domain, DD)聚集成簇, 通过接头蛋白(Fas-associating DD, FADD)形成 Fas-FADD-caspase-8 联合体(death-inducing signaling complex, DISC), 使 caspase-8 被激活。DISC 形成和 caspase-8 活化后, 可通过脂质途径激活酸性鞘磷脂酶, 诱导 CD3 的合成, CD3 随后进入线粒体膜内使 mPTP 开放, 导致细胞色素 C 和凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)释放^[16]。激活的 caspase-8 能切割 Bcl-2 家族成员 Bid 为 tBid, 然后 tBid 转到线粒体内, 改变线粒体的膜电位, mPTP 打开, 线粒体内细胞色素 C 释放, 导致细胞凋亡^[17]。已有研究证实^[18-20], 当 Fas/FasL 结合后通过激活酸性鞘磷脂酶, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 并生成大量活性氧, 最终引起细胞凋亡。

以上结果提示, DE 可减轻缺血/再灌注损伤, 减少心肌细胞凋亡的发生, 其机制可能是通过激活 $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ 通道来降低促凋亡蛋白 Fas/FasL 的表达。

参考文献

- 1 Wheeldon D. Thoracic organ preservation. *Perfusion* 1991; 6 (3): 191-202.
- 2 Xu M (徐曼), Li QF, Zhang WH, Zhang HQ, Xu CQ, Wang XM. Effect of Dan Shen Pill on expression of Fas/FasL proteins in cultured neonatal rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2003; 19(4): 499-502. (Chinese, English abstract)
- 3 Akao M, Ohler A, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. *Circ Res* 2001; 88(12): 1267-1275.
- 4 Wakiyama H, Cowan DB, Toyoda Y, Federman M, Levitsky S, MaCully JD. Selective opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels during surgically induced myocardial ischemia decreases necrosis and apoptosis. *Eur J*

- Cardiothorac Surg 2002; 21(3): 424-433.
- 5 Guo W (郭炜), Shen YL, Chen YY, Hu ZB, Yan ZK, Xia Q. The protective effect of diazoxide on long-term heart preservation. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2004; 56(5): 632-638 (Chinese, English abstract).
 - 6 Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, ParK YB, Hille B. Mitochondrial participation in the intracellular Ca^{2+} network. *J Cell Biol* 1997; 136(4): 833-844.
 - 7 Chen YY (陈莹莹), Shen YL, Cao CM, Xu WH, Qian ZM, Xia Q. Hydrogen peroxide augments the injury effect of iron on the isolated rat heart and cardiomyocytes. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2001; 53(3): 175-182 (Chinese, English abstract).
 - 8 Das DK, Maulik N. Conversion of death signal into survival signal by redox signaling. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69(1): 10-17.
 - 9 Han H, Long H, Wang H, Wang J, Zhang Y, Wang Z. Progressive apoptotic cell death triggered by transient oxidative insult in H9c2 rat ventricular cells: a novel pattern of apoptosis and the mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286(6): 2169-2182.
 - 10 Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995; 307(Pt 1): 93-98.
 - 11 Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002; 55(3): 534-543.
 - 12 Ozcan C, Bienenqraeber M, Dzeja PP, Terzic A. Potassium channel openers protect cardiac mitochondria by attenuating oxidant stress at reoxygenation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282(2): 531-539.
 - 13 Akao M, O'Rourke B, Kusuoka H, Teshima Y, Jones SP, Marban E. Differential actions of cardioprotective agents on the mitochondrial death pathway. *Circ Res* 2003; 92(2): 195-202.
 - 14 Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256(1): 42-49.
 - 15 Condo I, Testi R. Intracellular mediators of programmed cell death initiated at the cell surface receptor Fas. *Transpl Int* 2000; 13(Suppl 1): S3-S6.
 - 16 Oshimi Y, Miyazaki S. Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated cytosolic Ca^{2+} level. *J Immunol* 1995; 154(2): 599-609.
 - 17 Oh SH, Lim SC. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through *N*-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212(3): 212-223.
 - 18 Provinciali M, Donnini A, Arqentati K, Di Stasio G, Bartozzi B, Bernardini G. Reactive oxygen species modulate Zn^{2+} -induced apoptosis in cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(5): 431-445.
 - 19 Tirosh O, Aronis A, Melendez JA. Mitochondrial state 3 to 4 respiration transition during Fas-mediated apoptosis controls cellular redox balance and rate of cell death. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(8): 1331-1334.
 - 20 Sutuki Y, Ono Y, Hirabayashi Y. Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 1998; 425(2): 209-212.