

核磁共振研究羟苯氨酮对离体灌流心脏 能量代谢的影响

闫永彬¹⁾ 罗雪春¹⁾ 张日清^{1)*} 王小寅²⁾ 范礼理³⁾

(¹⁾清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084;

²⁾中日友好临床医学研究所生物物理室, 北京 100029; ³⁾中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

摘要 羟苯氨酮是一种新型强心扩血管剂, 在以往的研究中发现, 羟苯氨酮对实验性心衰和心肌缺血再灌注损伤有保护作用. 利用³¹P 核磁共振表面线圈技术, 对羟苯氨酮在 Langendorff 模型的离体灌流心脏 60 min 缺血-60 min 再灌注中的作用机制进行了探讨. 实验结果显示给药组胞内 pH 值比对照组恢复得更快, 但是胞内高能磷酸化合物的含量却低于对照组. 羟苯氨酮对缺血-再灌注损伤的保护作用表现在提高心肌细胞的能量代谢水平, 从而增强心肌细胞对离子调节恢复的能力.

关键词 能量代谢, 缺血, 离体 Langendorff 灌流大鼠心脏, 羟苯氨酮, ³¹P 核磁共振

学科分类号 Q6-33

心肌缺血损伤是缺血性心脏病的重要病因, 对心肌缺血损伤的机制已经进行了广泛的研究^[1]. 心肌缺血时, 心肌的有氧代谢严重受阻, 无氧代谢代偿性增加, 导致细胞内 $[H^+]$ 上升, 激活 Na^+-H^+ 交换, 使胞内钠超载; 由此进一步激活 Na^+-Ca^{2+} 交换, 从而造成胞内钙超载, 导致细胞内代谢产物与细胞功能的失调. 及时地恢复血供能够缓和心肌损伤^[2], 对研究减轻心肌缺血损伤的药物和处理方式都将具有重要的意义.

羟苯氨酮 (oxyphenamone, Oxy) 是由中国医学科学院药物所邵国贤、朱莉亚等合成的一种新型强心扩血管剂. 在以往的研究中发现, 羟苯氨酮对实验性心衰和心肌缺血再灌注损伤有保护作用. 它能够增加心肌收缩力, 却不增加心肌细胞内 $[Ca^{2+}]$. 在离体大鼠心脏灌流-复灌制备上观察到, 停灌前及复灌时给心脏全程灌流含有羟苯氨酮的营养液, 能剂量依赖性地减轻损伤所致的心肌超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化酶 (GSH-px) 活性降低. 试管内研究表明羟苯氨酮能明显抑制羟自由基和超氧阴离子的产生. 对于氧自由基所致的心肌线粒体损伤, 羟苯氨酮也有保护作用, 表现在降低线粒体 MDA 含量, 增加 ATPase 活性、GSH 含量和线粒体膜流动性^[3]. 以往的研究表明羟苯氨酮能够减轻在缺血过程中 $[H^+]$ 对心肌的损伤^[4]. 本文将对羟苯氨酮在缺血-复血过程中心肌

能量代谢的影响进行研究, 从而研究羟苯氨酮对心肌的保护作用机制.

在心肌缺血所导致的细胞各种代谢产物和形态功能变化中, 以含磷代谢产物表示的能量代谢的变化有重要意义. 利用核磁共振 (NMR) 表面线圈技术, 能够在正常或预设的生理条件下, 从分子水平上对灌流心脏的各个阶段 (特别是停灌阶段) 进行连续、动态、无损伤的定量研究^[5, 6].

1 材料和方法

1.1 离体灌流心脏准备

实验动物雄性 Wistar 大鼠由卫生部药品鉴定所实验动物中心提供, 体重 270~330 g, 用 20% 乌拉坦 (5 ml/kg) 腹腔注射麻醉后于舌下注射 1% 肝素 (625 U/kg), 开胸快速取出心脏, 置于 4℃ 灌流液中, 主动脉插管行非循环的 Langendorff 灌流^[5], 并迅速连接到为 NMR 实验设计的灌流系统中. 灌流液为游离磷酸 Krebs-Henseleit (K-H) 碳酸缓冲液 (NaCl 118 mmol/L; KCl 4.7 mmol/L; $CaCl_2$ 2.5 mmol/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2 mmol/L; $NaHCO_3$ 24.88 mmol/L; KH_2PO_4 1.2 mmol/L; 葡萄糖 11 mmol/L). 灌流液用 95% O_2 -5% CO_2 混合气体

* 通讯联系人.

Tel: 010-62783477, E-mail: zhangrq@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2000-10-08, 接受日期: 2000-11-03

饱和以维持 pH 值在 7.4 (36.5 °C 时). 灌流液通过蠕动泵以 $4 \sim 5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 的流速供给心脏, 在蛇形冷凝管中通过恒温水浴的循环水加热到 $(36.5 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, 并通过冷凝管上端的三通与心脏之间的高度差来维持 680 kPa 的灌流压. 灌流稳定后心脏置于 20 mm 自制探头内, 心脏的流出液从 20 mm 的 NMR 管下端导出.

实验大鼠随机分成两组: 对照组 (5 只, K-H 液有氧平衡 40 min 停灌 60 min 有氧灌流 60 min) 和给药组 (7 只, 停灌前 10 min 和再灌期 60 min 内的 K-H 灌流液中含有 $10 \mu\text{mol/L}$ 羟苯基酮).

1.2 磷酸肌酸激酶和乳酸脱氢酶的测定

磷酸肌酸激酶 (CK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 用 HITACHI 7150 型自动生化仪测定. 测量用的心脏流出液分别取自 40 min 平衡的最后 1 min 及再灌 3 min、10 min 和 30 min.

1.3 ^{31}P NMR 谱的测定

在整个实验过程中 ^{31}P 谱的测定均在 BRUKER AM 500 超导核磁共振波谱仪上进行, 立式磁体, 磁场强度为 11.7 T. 探头为自制平面圆形表面线圈探头, 实验中采用单脉冲序列非去耦方式采样, 不锁场, 用标准 ^{31}P 缓冲液匀场, ^{31}P 的中心频率为 202.458 MHz, 测量谱宽为 8064.516 MHz, 脉冲宽度为 16 μs (90° 脉冲), 两次脉冲之间的延迟为 0.246 s (每 0.5 s 采样一次), 扫描次数为 2 400 次 (每 20 分钟一个数据点), 数据点为 4K. 在傅立叶变换前的时域数据所加窗函数为指数函数, 线增宽因子 (LB) 采用 20 Hz 以提高信噪比.

1.4 数据处理

在缺血/复血预处理和药物研究中, 以各含磷代谢物 ^{31}P 谱峰积分面积的变化, 作为心肌细胞内各种不同含磷代谢产物相对量的变化指示 (以平衡时磷酸肌酸 PCr 峰积分面积值为 100% 来进行归一化处理). 同时, 在不同的灌流阶段, 以平衡时的磷酸肌酸的化学位移 (δ) 值来标定各 ^{31}P 谱峰的化学位移; 通过在不同灌流阶段胞内无机磷峰的化学位移, 按式 $[\text{pH} = 6.72 + \lg [(\delta - 3.72) / (5.69 - \delta)]]$ 来计算出胞内的 pH 值 $\text{pH}_i^{[5]}$. 由于在 ATP (α) 峰旁有不易分开的 NAD/NADH、ADP (α)、AMP (α) 峰, 在 ATP (γ) 峰旁有 ADP (β) 峰; 此外, 在心肌中磷酸肌酸激酶 (CK) 会催化磷酸基团在 PCr、 $[\gamma\text{-P}]$ -ATP 以及 P_i 之间转移^[5], 因此实验数据中 ATP 含量用 ATP (β) 峰表示^[6].

实验结果采用统计学方法进行处理, 在置信度

水平为 95% 的 Student 双边 t 检验下, $P < 0.05$ 表明有显著性差异.

2 结 果

2.1 含磷代谢物

不管对于对照组还是对于给药组, 在整个缺血/再灌注过程中含磷代谢产物都有着基本相同的变化趋势 (图 1). 在停灌期细胞内的 PCr 峰 (图 1a) 极显著地迅速减少, 在整个停灌期, 对照组和给药组的 PCr 峰与平衡时相比都有极显著降低 ($P < 0.001$), 而且是在停灌开始即降低到相当的水平, 在缺血 20 min 时即降低到平衡期水平的 30% 左右. 当恢复灌流以后, 细胞内的 PCr 峰又上升到一定水平. 对于对照组来说, 在再灌 20 min 时, PCr 已经基本恢复到平衡期的水平, 再灌期各点的值与平衡 20 min 时相比均无显著性差别 ($P > 0.05$); 而对于给药组, 可以看到在 60 min 的再灌期, PCr 值无法恢复到平衡期的水平, 仅维持在平衡期约 50% 左右的水平. 在再灌 20 min 以后, 给药组与对照组相比, PCr 峰有显著地降低 ($P < 0.05$), 在再灌注 20 min 时给药组与对照组相比有接近显著性的降低 ($P = 0.053$).

细胞内的 ATP 停灌期开始以后持续降低 (图 1b). 在停灌 20 min 时, 对照组与平衡 20 min 时相比已经有了很显著降低 ($86\% \pm 10\%$, $P < 0.01$); 但给药组没有显著降低 ($98\% \pm 16\%$, $P > 0.05$). 在再灌 60 min 时, 对照组的 ATP 平均值并未持续降低, 而是有所升高并接近平衡期的水平 ($90\% \pm 8\%$, $P < 0.05$); 对于给药组来说, 从停灌开始 ATP 的量就持续减少, 直到再灌 60 min ($58\% \pm 7\%$, $P < 0.001$). 只有在再灌 60 min 时给药组才与对照组相比有显著降低.

在缺血后 P_i 大量增加 (图 1c), 但在停灌期给药组远比对照组的增加为多 (在整个停灌期给药组与对照组相比均有显著性增加); 在停灌 60 min 时, 给药组的 P_i 上升到平衡时的 $418\% \pm 175\%$, 而对照组只上升到平衡时的 $263\% \pm 61\%$. 在再灌期恢复灌流以后, 给药组与对照组的 P_i 均迅速降低, 对照组在再灌期时已经基本恢复到平衡期的水平 (在再灌 60 min 时为 $107\% \pm 8\%$, $P > 0.05$), 而给药组在整个再灌期依然相对平衡期有显著升高 (在再灌 60 min 时为 $175\% \pm 87\%$, $P < 0.05$). PCr/ P_i 值的变化与 PCr 的变化基本一致, 如图 1d 所示.

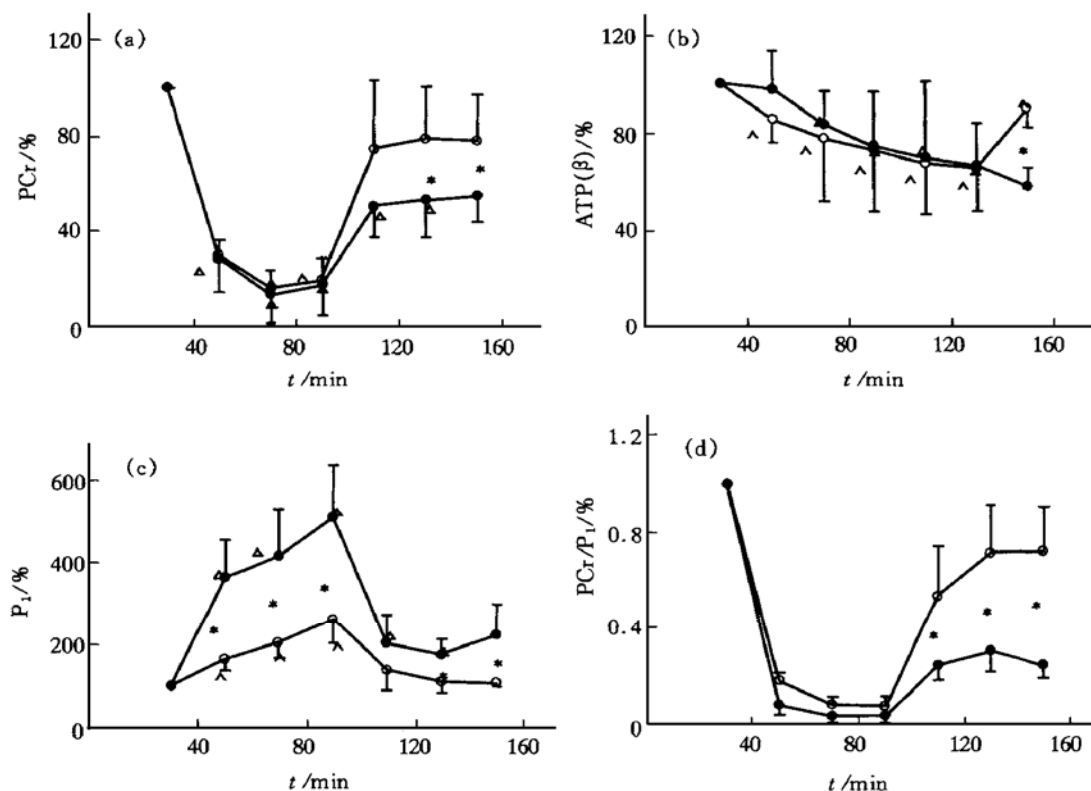


Fig. 1 Effects of oxyphenamone (Oxy) on energy metabolism during 60 min ischemia and 60 min reperfusion

(a) phosphocreatine (PCr); (b) adenosine triphosphate (ATP); (c) inorganic phosphate (P_i); (d) PCr/P_i ratio. ○—○: data of the control group; ●—●: data of the Oxy group; *: significant difference between the control and Oxy groups; Δ: significant difference relative to the equilibrium of the control group. Δ: significant difference relative to the equilibrium of the Oxy group.

2.2 胞内 pH 值 pH_i

在整个灌流过程中, 给药组与对照组 pH_i 值的变化趋势基本是一致的 (图 2)。在平衡期基本维持在 7.3 左右; 在停灌期与平衡时相比持续降低, 但给药组的平均值要略大于对照组; 在再灌期很快上升并恢复到平衡期的水平, 给药组在再灌 20 min 时与平衡期相比已经没有显著差别, 而对照组在再

灌 40 min 时才恢复。在再灌期给药组的平均值也均略大于对照组, 而且在再灌 20 min 时给药组与对照组比较有显著增高, 显示给药组与对照组相比胞内 pH 值有更快的恢复。

2.3 生化指标

心脏灌流流出液分别在实验的平衡末期和再灌注的第 1、10、30 分钟收集。图 3 示磷酸肌酸激酶

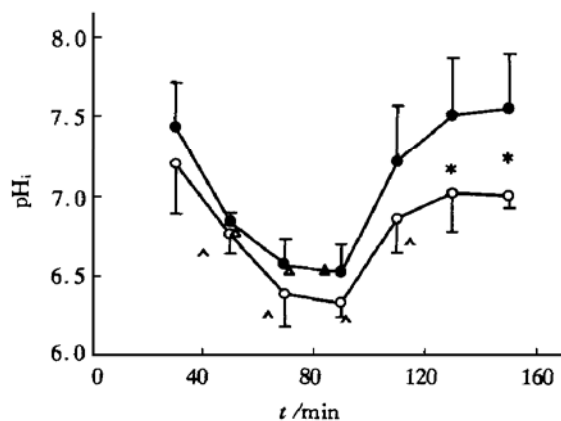


Fig. 2 Effect of oxyphenamone on intracellular pH

Symbols shown are the same as in Fig. 1.

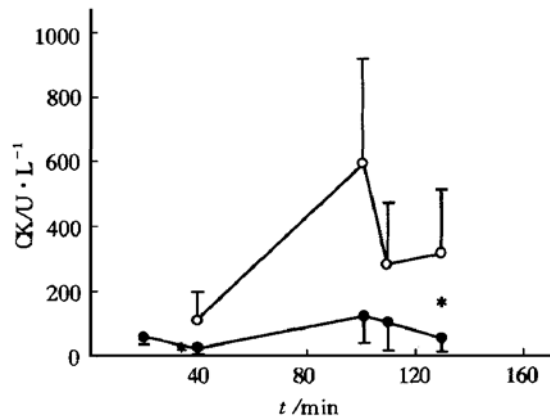


Fig. 3 Effect of oxyphenamone on creatine phosphate kinase (CK)

Symbols shown are the same as in Fig. 1.

的活性变化. 实验的误差可能是由于手工收集操作所引起的. 从磷酸肌酸激酶活性的平均值来看, 在整个实验过程中, 给药组的活性要明显低于对照组. 在平衡末期和再灌注 30 min 都观察到了显著性差异. 乳酸脱氢酶的活性在整个实验过程中没有观察到显著性差异 (数据未给出). 因此羟苯氨酮极大地影响磷酸肌酸的活性但是对乳酸脱氢酶的活性没有影响.

3 讨 论

3.1 羟苯氨酮对能量代谢的影响

从上面的分析可以看到, 在灌流液中加入羟苯氨酮以后, 在这种缺血损伤中, 给药组与对照组相比停灌期的 PCr 值、PCr/Pi 值、ATP 值、pH_i 值、LDH 值并无显著差异, 而 Pi 值有很显著的增高. 因此在停灌期给药组的高能磷酸化化合物的产生要比对照组强烈的多, 显示出给药组心脏相对于对照组有着更高的能量代谢水平, 表现在产生更多的 ATP 和 PCr 用于消耗并产生了更多的 Pi, 同时给药组在增加心肌能量消耗时并不降低 ATP 的合成效率, 也未加重心肌细胞内 pH 值的过于降低.

在再灌期, 给药组与对照组相比, ATP、Pi 含量变化不大, 而 PCr (PCr/Pi) 含量却远低于对照组. 在再灌 40 min 时给药组的 ATP (γ)/ATP (β) 值要显著低于对照组 (数据未给出); 在再灌 60 min 时 ATP 含量要显著低于对照组; 在整个再灌期给药组的 Pi 未如对照组一样恢复到平衡期的水平. 同时, 在再灌 20 min 时给药组的 pH_i 值比对照组显著恢复到平衡期的水平. 这说明在再灌期给药组心脏相对于对照组仍然保持相当高的能量代谢水平, 表现在更多的 ADP 转化为 ATP, 产生了更多的 PCr 用于心肌收缩.

对给药组和对照组来说, 在再灌期 PCr 值都没有“反弹” (overshoot) 的现象^[7], 这可能是由于 60 min 的缺血所造成的长时间损伤. 在再灌期, 对照组和给药组的 PCr 值分别恢复到平衡期的 77% $\pm$ 18%、54% $\pm$ 11%, PCr/Pi 分别恢复到平衡期的 73% $\pm$ 18%、24% $\pm$ 5%. 对于心肌细胞来说, PCr 不仅是一种高能磷酸化合物, 而且是线粒体与心肌纤维复合体之间能量的运输化合物^[5]. 在缺血期, PCr 无法快速转化成 ATP (PCr/ATP 约为 20%), 在再灌期, 两组的 PCr/ATP 比值都恢复到近似平衡期的水平 (对照组 86% $\pm$ 20%, 给药组 95% $\pm$ 19%). 因此, 给药组中所观察到的

显著减少的 PCr 和 PCr/Pi 值可能是由于给药组心肌有着更加活跃的能量代谢. 进一步说, 这种减少可能是给药组利用 PCr 的效率提高的结果.

3.2 羟苯氨酮的作用机制

由前面的分析可以看到, 羟苯氨酮对灌流心脏的缺血保护作用与缺血期心肌内高能磷酸化合物 (PCr 和 ATP) 的保持水平没有直接关系, 与再灌期心肌内高能磷酸化化合物的恢复水平也没有直接关系. 以往的研究发现, 在缺血损伤中, 羟苯氨酮能够保护心肌线粒体膜的流动性和结构, 由此保护心肌线粒体的功能, 也维持了心肌细胞利用能量 (ATP 和 PCr) 的能力. 这与在再灌期, 给药组的 CK 值显著低于对照组是一致的.

在再灌期内, pH_i 值的快速恢复可能是羟苯氨酮保护作用的重要方面. 胞内的 H⁺ 浓度对于细胞功能起着极为重要的作用^[8]. 在缺血期, 虽然给药组与对照组的 pH_i 值没有显著差异, 但给药组的 pH_i 平均值比对照组要高 0.2 左右, 再灌 20 min 后, 给药组的 pH_i 值已经完全恢复到平衡期的水平, 而对照组直到再灌 60 min 才恢复到平衡期的水平. 曾经有报道指出 pH_i 值的降低和 Pi 值的增加是心肌收缩力降低的显著分子因素^[1]. 考虑到羟苯氨酮的作用, 给药组的 pH_i 迅速恢复且保持着相对高的 Pi 值, 与这种理论并不相符合. 因此对于羟苯氨酮的作用来说, Pi 值与心肌收缩力并没有直接的关联.

因此, 羟苯氨酮对心肌缺血/再灌注的保护作用体现在, 在停灌期和再灌期保持较高的能量代谢水平, 即表现为增强心肌收缩力; 同时在停灌期保持稍高的 pH_i 值, 在再灌期比对照组更迅速地恢复到平衡期的水平, 即表现为心肌胞内环境的迅速恢复. 羟苯氨酮能够刺激心肌细胞的能量代谢过程, 但是并未由此加重无氧呼吸所造成的胞内 [H⁺] 的严重增加, 以及由此产生的胞内 [Ca²⁺] 等金属离子的浓度的严重变化. 因此, 羟苯氨酮既能够增强心肌功能, 又可以减轻心肌因缺血造成的损伤. 这与从心肌收缩力、心肌坏死面积、心血管、磷酸肌酸激酶等方面的研究结果^[3]是一致的. 同时, 在本研究中并没有观察到心肌功能与心肌细胞内高能磷酸化化合物的水平有直接联系, 心肌细胞内离子的调节 (包括 H⁺ 的调节) 反而可能是心肌缺血保护中最主要的因素.

参 考 文 献

- 1 Ferrari R. The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J Cardiovascular Pharmacology*, 1996, **28** (Suppl. 1): S1~ S10
- 2 Tarri M, Neely J R. Role of intracellular Na^+ in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. *Circulation Research*, 1989, **65** (4): 1045~ 1056
- 3 范明杰. 羟苯氨酮保护心肌停灌-复灌损伤的作用: [硕士论文]. 北京: 中国协和医科大学 中国医学科学院, 1997
Fan M J. The protection of oxyphenamone against myocardial reperfusion injury induced by cardiac arrest in isolated rat hearts: [Master thesis]. Beijing: Institute of Material Medical, Chinese Academy of Medical Sciences, 1997
- 4 Zhang R Q, Yan Y B, Luo X C, *et al.* Study of the isolated perfused rat heart exposed to ischemia using ^{31}P NMR surface coil. *Annals of the New York Academy of Science*, 2000, **904**: 42~ 44
- 5 Sharoni R, Olivson A, Chandra M, *et al.* A ^{31}P NMR study of preconditioned isolated perfused rat heart exposed to intermittent ischemia. *Magn Reson Med*, 1996, **36**: 66~ 71
- 6 Buser P T, Wikman-Coffelt J, Wu S T, *et al.* Postischemic recovery of mechanical performance and energy metabolism in the presence of left ventricular hypertrophy. *Circulation Research*, 1990, **66** (3): 735~ 746
- 7 Osbakken M D, Wroblewski K, Zhang D, *et al.* ^{31}P relaxation rates to evaluate physiological events in the heart. *Magn Reson Med*, 1993, **30**: 498~ 502
- 8 Takeo S, Nasa Y. Role of energy metabolism in the preconditioned heart - a possible contribution of mitochondria. *Cavdivas Res*, 1999, **43** (1): 32~ 43

Effects of Oxyphenamone on Energy Metabolism of Perfused Rat Hearts Exposed to Ischemia Characterized by ^{31}P NMR

YAN Yong-Bin¹⁾, LUO Xue-Chun¹⁾, ZHANG Rì-Qing^{1)*}, WANG Xiao-Yin²⁾, FAN Lì-Lì³⁾

¹⁾Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

²⁾Institute of China-Japan Clinical Medicine, Beijing 100029, China;

³⁾Institute of Material Medical, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract The effect of oxyphenamone (Oxy, a new inodilator) on high energy phosphate metabolism of isolated Langendorff perfused rat hearts exposed to 60 minutes of ischemia and 60 minutes of reperfusion injury was determined using phosphorus nuclear magnetic resonance (^{31}P NMR) spectroscopy. The results led to a paradox of rapid intracellular pH recovery and a low level of high energy phosphate pools reserve during reperfusion compared to the control. It can be stated that Oxy improves energy consumption and, in turn, improves pH recovery, but also causes a deletion of high energy phosphate pools during reperfusion. The relationship between ions regulation, including H^+ regulation, and myocardial functions recovery may display a key factor for cell survival during postischemic reperfusion.

Key words energy metabolism, ischemia, isolated Langendorff perfused rat heart, oxyphenamone, ^{31}P NMR

* Corresponding author. Tel: 86-10-62783477, E-mail: zhangrq@mail.tsinghua.edu.cn

Received: October 8, 2000 Accepted: November 3, 2000