

· 基础研究 ·

## 线粒体 ATP 敏感性钾离子通道开放剂改善冠心病大鼠模型心肌氧化应激损伤的分子机制

孙朝阳<sup>1</sup>, 周坤<sup>1\*</sup>, 马翔<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 陕西省安康市中心医院心血管内科, 安康 725000; <sup>2</sup> 新疆医科大学第一附属医院心脏中心, 乌鲁木齐 830054)

**【摘要】** **目的** 探索线粒体 ATP 敏感性钾离子通道(mitoKATP)开放剂改善冠心病大鼠模型心肌氧化应激损伤的分子机制。**方法** 选取 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组:正常对照组(不造模且不予二氮嗪药物干预)、假手术组(仅切皮不进行造模手术)、模型组(制作冠心病大鼠模型,但不给予二氮嗪药物干预)和药物组(制作冠心病大鼠模型,给予二氮嗪药物 3 mg/kg 干预),每组 10 只。利用实时荧光定量聚合酶链式反应及 Western blotting 实验测定各组血管生成因子[成纤维细胞生长因子 2(FGF-2)和血管内皮生长因子(VEGF)]mRNA 及相关蛋白的表达量,同时比较各组大鼠细胞内的乳酸脱氢酶、线粒体膜电位(MMP)和细胞死亡率。采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。组间比较采用方差分析或者 *t* 检验。**结果** 与模型组相比,药物组大鼠 FGF-2[(100.21±12.33)×10<sup>3</sup> vs (120.43±10.33)×10<sup>3</sup> IU]与 VEGF [(163.31±9.33)×10<sup>3</sup> vs (181.33±11.13)×10<sup>3</sup> IU] mRNA 转录水平、FGF-2 [(0.69±0.33) vs (1.32±0.33)]与 VEGF [(0.68±0.33) vs (1.20±0.13)]表达水平、乳酸脱氢酶 [(49.32±3.51) vs (156.12±10.18) U/L]表达均显著降低(*P*<0.05)。与模型组相比,药物组细胞死亡率显著降低 [(30.32±3.48)% vs (66.12±3.23)%],而荧光强度显著增加[(780.12±9.20) vs (220.24±6.15),*P*<0.05]。**结论** mitoKATP 通道开放剂可通过促进冠心病大鼠血管 FGF-2 和 VEGF 增加,增强乳酸脱氢酶活性,降低 MMP、细胞死亡率和冠心病大鼠心肌氧化应激损伤。

**【关键词】** 冠心病;心肌氧化应激损伤;线粒体 ATP 敏感性钾离子通道

**【中图分类号】** R657.4<sup>+</sup>4

**【文献标志码】** A

**【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2019.02.026

## Molecular mechanism of mitochondrial mitoKATP channel openers in improving the cardiac oxidative stress/injury in rat models of coronary heart disease

SUN Zhao-Yang<sup>1</sup>, ZHOU Kun<sup>1\*</sup>, MA Xiang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, Ankang Central Hospital, Ankang 725000, China; <sup>2</sup>Heart Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the molecular mechanism of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels (mitoKATP) opener in improving myocardial oxidative stress/injury in rates with coronary heart disease (CHD). **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into 4 groups with 10 in each: control group (without modeling and intervention of diazoxide drug), sham operation group (with skin cutting but without modeling), and model group (modeling of coronary heart disease but without intervention of diazoxide) and drug group (with modeling of coronary heart disease and intervention of diazoxide at 3 mg/kg). mRNA expression of angiogenic factors[ fibroblast growth factor 2 (FGF-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF)] and related proteins for each group were measured using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction and Western blotting. The groups were compared in lactate dehydrogenase, mitochondrial membrane potential (MMP) and cell death rate. SPSS statistics 22.0 was used of data processing, and analysis of variance (ANOVA) or *t* test for comparison between groups. **Results** Compared with the model group, drug group had significantly lower mRNA transcription of FGF-2 [(100.21±12.33)×10<sup>3</sup> vs (120.43±10.33)×10<sup>3</sup> IU] and VEGF [(163.31±9.33)×10<sup>3</sup> vs (181.33±11.13)×10<sup>3</sup> IU] and expression of FGF-2 [(0.69±0.33) vs (1.32±0.33)], VEGF [(0.68±0.33) vs (1.20±0.13)], and lactate dehydrogenase [(49.32±3.51) vs (156.12±10.18) U/L]. Compared with the model group, the cell death rate in the drug group decreased [(30.32±3.48)% vs (66.12±3.23)%], but the fluorescence intensity

收稿日期: 2018-05-21; 接受日期: 2018-07-03

基金项目: 国家自然科学基金(81000089)

通信作者: 周坤, E-mail: xuesn00@163.com

increased [ (780.12±9.20) vs (220.24±6.15) ] ( $P<0.05$ ). **Conclusion** mitoKATP channel opener can decrease MMP, cell death rate and myocardial oxidative stress/injury in rats with coronary heart disease by increasing vascular FGF-2 and VEGF and enhancing activity of lactate dehydrogenase.

**【Key words】** coronary heart disease; cardiac oxidative stress/injury; mitochondrial ATP-sensitive potassium channels

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (81000089).

Corresponding author: ZHOU Kun, E-mail: xuesn00@163.com

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是由冠状动脉粥样硬化造成的冠状动脉供血相对不足, 进而造成心肌缺氧、缺血, 导致的心脏疾病<sup>[1]</sup>。有报道指出, 药物可通过降低心肌耗氧抑制钙超载、清除氧自由基、抑制细胞凋亡、促血管生成等不同途径起到抗心肌缺血的作用。氧化应激在心力衰竭与心肌缺血/再灌注损伤等心脏病变中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。脑和心脏等器官易受缺氧缺血损伤, 最终通过影响线粒体功能造成心肌细胞死亡或凋亡<sup>[3]</sup>, 线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放是缺血/再灌注损伤导致线粒体损伤并最终致细胞死亡的关键。线粒体 ATP 敏感性钾离子通道 (mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, mitoKATP) 与 MPTP 间存在关联。目前, 抑制 MPTP 开放被认为是治疗缺血/再灌注损伤的关键点<sup>[4]</sup>。有报道指出, 二氮嗪作为 mitoKATP 的开放剂, 可通过激活内源性心肌保护机制, 起到抗心肌缺血缺氧损伤的作用<sup>[5-7]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

清洁级健康 SD 大鼠共 40 只, 雌雄各 20 只, 体重 (220±20) g。由军事医学科学院动物中心提供。将 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 正常对照组 (不造模且不予二氮嗪药物干预)、假手术组 (仅切口不进行造模手术)、模型组 (制作冠心病大鼠模型, 但不给予二氮嗪药物干预) 和药物组 (制作冠心病大鼠模型, 给予二氮嗪 3 mg/kg 干预), 每组 10 只。

### 1.2 方法

1.2.1 模型建立及干预方法 大鼠麻醉后固定, 气管插管, 连接人工动物呼吸机支持呼吸, 从胸骨左侧第 3、4 肋间正中旁开 5 mm 行纵向切口, 于心脏左心耳根部下方 2~3 mm 处穿线, 结扎冠状动脉左前降支, 建立心肌缺血模型。结扎后迅速将心脏还纳, 关闭胸腔, 恢复自主呼吸。以术后 II 导联心电图 ST 段弓背向上抬高为造模成功的标志。造模 1 周后开始灌胃给药, 药物组给予二氮嗪 3 mg/kg, 正常对照组、假手术组和模型组灌胃同体积的生理

盐水, 1 次/d, 共 4 周。给药结束后禁食 12 h, 不禁水。利用多导生理检测仪对心功能和冠状动脉血流量进行测定, 以颈椎脱臼的方式处死大鼠, 取心脏, 去掉心房和右心室, 将左心室保存于-80℃下。

1.2.2 心功能测定 (1) 由房室瓣插入球囊, 接压力换能器, 连接 Power-Lab 血流动力学信号采集与分析系统, 记录左心室收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室内压最大变化速率 (最大上升速率: + dp/dt<sub>max</sub>; 最大下降速率: - dp/dt<sub>max</sub>)。(2) 分离冠状动脉左旋支根部, 放置微型电磁流量计探头, 检测冠状动脉血流量 (coronary flow, CF)。

1.2.3 成纤维细胞生长因子 2 和血管内皮生长因子 mRNA 的检测 采用总 RNA 提取试剂盒 (Takara 公司) 对各组中的总 RNA 进行提取, 具体操作如下。取新鲜血液, 加红细胞裂解液 (1:3, v/v), 充分混匀, 静置 10 min, 10 000 转/min 离心 1 min。弃上清, 收集白细胞沉淀。加入 1 ml TRIzol, 充分混匀后, 室温放置 5 min, 使样品充分裂解, 4℃ 12 000 转/min 离心 10~15 min。收集上清, 加入冰冷的异丙醇 (1:1, v/v), 混匀, 静置 10~20 min, 4℃ 12 000 转/min 离心 10 min, 收集水相层 (约 550 μl), 转移到新的无酶离心管中, 离心弃上清, 向沉淀中加入 50~100 μl RNase-free 水, 轻弹管壁, 以充分溶解 RNA。分别对各 mRNA 引物进行设计, 详见表 1。实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 分析反应体系为 20 μl。反复混匀点甩后, 置于荧光实时定量 PCR 仪中进行扩增, 反应参数为 95℃ 预变性 10~15 min, 95℃ 变性 5~20 s, 55℃~60℃ 退火, 30~40 s, 40 个循环。将得到的 Ct 值, 带入  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 计算成纤维细胞生长因子 2 (fibroblast growth factor 2, FGF-2) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA 转录水平。

1.2.4 细胞总蛋白的提取 按照凯基全蛋白提取试剂盒操作说明进行。每 1 ml 裂解液中加入 5 μl 磷酸酶抑制剂、1 μl 蛋白酶抑制剂和 5 μl 苯甲基磺酰氟 (100 mmol/L), 混匀冰上保存。弃去细胞培养液, 预冷磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤细胞 2 次, 加入裂解液, 冰上孵育 15 min, 将细胞刮下, 转移至 1.5 ml EP 管中, 4℃ 10 000 转/min

表1 RT-PCR引物序列设计结果

Table 1 Design of RT-PCR primer sequence

Cytokine	Primer sequence	Base pair
FGF-2	F 5'-CAGTGACTGCCGACCCGCTC-3'	180
	R 5'-GCCGGAAGACAGCCAGTCCG-3'	
VEGF	F 5'-ACATCTTCAAGCCGCTCTGT-3'	326
	R 5'-AGGTTTGATCCGATGATCT-3'	
β-actin	F 5'-GATCGATGCCGTGCTAAGA-3'	137
	R 5'-TCCTATGGGAGAACGGCAGA-3'	

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction; FGF-2: fibroblast growth factor-2; VEGF: vascular endothelial growth factor.

离心 5 min, 取上清液转移至新的 EP 管中, 置于 -80℃ 保存。

1.2.5 Western blotting 按照碧云天 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒操作说明配置凝胶。根据目的蛋白分子量大小选用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。加入一抗 (小鼠抗大鼠 FGF-2 单克隆抗体; 兔抗小鼠 VEGF 多克隆抗体; 兔抗小鼠乳酸脱氢酶多克隆抗体), 稀释度均为 1 : 400, 孵育时间为 2 h。将制备好的凝胶放入电泳槽中, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 之后分别进行转膜与杂交。

1.2.6 心肌细胞培养及氧化应激损伤模型建立 在无菌条件下, 开胸取出心脏, 剪心室肌, 用预冷的 D-Hank's 冲洗 3 次, 剪碎至糊状, 加含 0. 125% 胰蛋白酶消化液 4~5 ml, 37℃ 消化 3 min, 静置 1 min, 弃上清, 加入 5 ml 消化液, 消化 7 min, 于室温静置 1 min。收集上清, 加入同体积含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化。1 000 转/min 离心 4 min, 以 DMEM 培养液 (含 15% 胎牛血清) 重悬, 重复 3~5 次后转移至 100 ml 培养瓶中, 在培养前 2 天加阿糖胞苷抑制非心肌细胞贴壁生长。待细胞长满瓶底后传代, 调节细胞数为  $4 \times 10^5$  个/孔。将模型组与药物组的心肌细胞通过 500 μmol/L 过氧化氢 (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 进行处理, 37℃ 孵育 2 h。应用 100 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 培养 16 h 以复制心肌细胞氧化应激损伤模型。

1.2.7 乳酸脱氢酶、线粒体膜电位和细胞死亡率的

测定 各组细胞经处理后, 根据试剂盒步骤, 通过生化自动分析仪检测乳酸脱氢酶活性。细胞经处理后, 向培养皿中加入 1 ml PBS, 充分混匀, 加入终浓度为 5 μmol/L 的 Rh-123, 37℃ 避光 10 min, EDTA-胰酶消化, 1 000 转/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 冲洗 1 次, 加 10 ng/ml PI, 充分混匀, 流式细胞仪测各孔的荧光强度 (各份样品计数大于 10 000 个细胞)。Rh-123 的发射波长为 525 nm, 激发波长为 488 nm; PI 的发射波长为 675 nm, 激发波长为 488 nm。计算各区域细胞的平均荧光强度以及百分比, 评价细胞的线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 及其死亡情况。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用方差分析或者 t 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能变化比较

与正常组及假手术组比较, 模型组大鼠的 LVSP、+dp/dt<sub>max</sub>、-dp/dt<sub>max</sub> 和 CF 显著下降 (P<0.05)。与模型组比较, 药物组的 LVSP、+dp/dt<sub>max</sub>、-dp/dt<sub>max</sub> 和 CF 显著增加 (P<0.05; 表 2)。

2.2 各组大鼠心脏中细胞因子 mRNA 转录水平的比较

通过测定血清中免疫细胞因子 FGF-2 和 VEGF mRNA 转录水平, 判断各组血管生长因子的生长情况。由结果可以看出, 与正常组和假手术组相比, 模型组大鼠 FGF-2 与 VEGF mRNA 转录水平显著增加 (P<0.05), 而与模型组相比, 药物组大鼠 FGF-2 mRNA 与 VEGF mRNA 转录水平显著降低 (P<0.05; 表 3)。

2.3 各组大鼠生长因子蛋白表达量和心肌细胞乳酸脱氢酶的变化

通过 Western blotting 实验对各组大鼠心脏 FGF-2 及 VEGF 蛋白表达量进行测定, 结果见图 1。

表2 各组大鼠心功能变化比较

Table 2 Comparison of cardiac function in rats among groups

(n = 10,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	LVSP (mmHg)	+dp/dt <sub>max</sub> (kPa/s)	-dp/dt <sub>max</sub> (kPa/s)	CF (%)
Control	103. 1±9. 1	2 810. 2±10. 2	2 239. 1±12. 2	100. 3±3. 5
Sham operation	100. 2±8. 5	2 803. 3±9. 1	2 182. 0±11. 2	98. 3±4. 3
Model	72. 5±3. 9 <sup>*#</sup>	1 582. 9±4. 6 <sup>*#</sup>	1 293. 4±9. 4 <sup>*#</sup>	80. 1±3. 8 <sup>*#</sup>
Drug	97. 9±2. 9 <sup>△</sup>	2 569. 5±3. 6 <sup>△</sup>	2 098. 9±4. 8 <sup>△</sup>	99. 5±2. 1 <sup>△</sup>

LVSP: left ventricular systolic pressure; +dp/dt<sub>max</sub>: maximum rate of left ventricular pressure rise; -dp/dt<sub>max</sub>: maximum rate of left ventricular pressure decline; CF: coronary flow. Compared with control group, <sup>\*</sup>P<0.05; compared with sham operation group, <sup>#</sup>P<0.05; compared with model group, <sup>△</sup>P<0.05. 1 mmHg=0. 133 kPa.

将各条带的灰度值进行计算,结果表明,与正常组和假手术组相比,模型组大鼠 FGF-2 与 VEGF 蛋白表达水平增加 ( $P < 0.05$ );与模型组相比,药物组大鼠 FGF-2 与 VEGF 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作用于心肌细胞 2 h 后,结果表明,与正常组和假手术组相比,模型组中乳酸脱氢酶表达增加 ( $P < 0.05$ ),表明膜通透性增加,而与模型组相比,预先用二氮嗪处理的药物组的乳酸脱氢酶表达降低 ( $P < 0.05$ ;表 4),由此推测,二氮嗪对抗  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的乳酸脱氢酶增加可能与激活的 mitoKATP 有关。

表 3 各组大鼠心脏中 FGF-2 与 VEGF mRNA 转录水平的比较

Table 3 Comparison of the mRNA expression of FGF-2 and VEGF among groups ( $n = 10, \times 10^3 \text{ IU}, \bar{x} \pm s$ )

Group	FGF-2	VEGF
Control	100.33 ± 10.13	167.31 ± 14.21
Sham operation	100.38 ± 9.23	166.91 ± 13.21
Model	120.43 ± 10.33 <sup>*#</sup>	181.33 ± 11.13 <sup>*#</sup>
Drug	100.21 ± 12.33 <sup>△</sup>	163.31 ± 9.33 <sup>△</sup>

FGF-2: fibroblast growth factor 2; VEGF: vascular endothelial growth factor. Compared with control group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; compared with sham operation group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; compared with model group, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

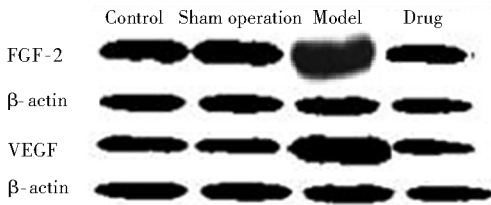


图 1 各组大鼠心脏 FGF-2 及 VEGF 蛋白表达量

Figure 1 Expression of FGF-2 and VEGF among groups

FGF-2: fibroblast growth factor 2; VEGF: vascular endothelial growth factor.

表 4 各组大鼠生长因子蛋白和心肌细胞 LDH 表达量

Table 4 Comparison of expression of FGF-2, VEGF and LDH among groups ( $n = 10$ )

Group	FGF-2	VEGF	LDH(U/L)
Control	0.72 ± 0.13	0.81 ± 0.21	40.13 ± 1.14
Sham operation	0.80 ± 0.23	0.75 ± 0.21	39.20 ± 2.22
Model	1.32 ± 0.33 <sup>*#</sup>	1.20 ± 0.13 <sup>*#</sup>	156.12 ± 10.18 <sup>*#</sup>
Drug	0.69 ± 0.33 <sup>△</sup>	0.68 ± 0.33 <sup>△</sup>	49.32 ± 3.51 <sup>△</sup>

FGF-2: fibroblast growth factor 2; VEGF: vascular endothelial growth factor; LDH: lactate dehydrogenase. Compared with control group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; compared with sham operation group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; compared with model group, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

## 2.4 心肌细胞 MMP 和死亡率与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的氧化应激损伤的关联

与正常组和假手术组相比,模型组细胞 MMP

和死亡率增加 ( $P < 0.05$ ),而 Rh-123 荧光强度降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比,药物组细胞 MMP 和死亡率降低 ( $P < 0.05$ ),而 Rh-123 荧光强度增加 ( $P < 0.05$ ;图 2,表 5)。

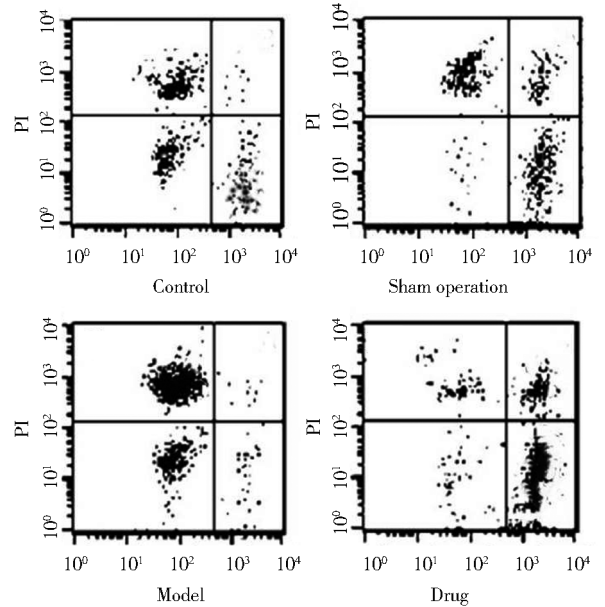


图 2 过氧化应激损伤对心肌细胞 MMP 的影响

Figure 2 Effects of peroxide stress on MMP of myocardial cells  
MMP: mitochondrial membrane potential.

表 5 氧化应激损伤对心肌细胞 MMP 与死亡率的影响

Table 5 Effects of oxidative stress on MMP and mortality in cardiomyocytes ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Group	Cell death rate (%)	Fluorescence intensity
Control	28.33 ± 2.20	820.10 ± 5.15
Sham operation	29.20 ± 2.23	816.25 ± 4.17
Model	66.12 ± 3.23 <sup>*#</sup>	220.24 ± 6.15 <sup>*#</sup>
Drug	30.32 ± 3.48 <sup>△</sup>	780.12 ± 9.20 <sup>△</sup>

MMP: mitochondrial membrane potential. Compared with control group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; compared with sham operation group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; compared with model group, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

## 3 讨论

二氮嗪又名氯甲苯噻,英文名 diazoxide,分子式  $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ ,是由 5-氯-2-乙酰胺基-N-乙酰基苯磺酰胺经高温环合而得。该药物可从清除氧自由基、降低心肌耗氧、促血管生成、抑制钙超载、抑制细胞凋亡等多种途径起到抗心肌缺血的效果。mitoKATP 通道分布于血管、骨骼肌、胰腺、神经元等组织,在细胞缺氧损伤的保护机制中可能具有重要作用,在缺血预适应及缺血后适应心肌保护机制中起到关键作用<sup>[8]</sup>。研究表明,二氮嗪作为 mitoKATP 开放剂,具有抗心肌缺血缺氧损伤作用。本实验表

明,二氮嗪可促进 LVSP、 $+dp/dt_{max}$ 、 $-dp/dt_{max}$  的绝对值、CF 增加,且 FGF-2 和 VEGF mRNA 转录水平降低。有研究表明,在新血管形成的过程中,有诸多血管生长因子参与调节,FGF-2 和 VEGF 是最强有力的 2 种血管生成因子。FGF-2 可刺激蛋白酶原活化因子与内皮细胞分泌蛋白酶,从而导致血管基底膜降解,使细胞侵入周围基质,从而形成新的、具有空腔的血管<sup>[9,10]</sup>。VEGF 能够特异性地促进血管内皮细胞分裂及增殖,促进血管生成,增强血管通透性,使血管内成分渗漏,为血管形成与内皮迁移提供基质<sup>[11,12]</sup>。

有关报道指出,缺血心肌组织可释放大量自由基,而活性氧自由基在缺血再灌注的心肌损伤中具有十分重要的作用。 $H_2O_2$  是体内氧化代谢的中间产物,当其大量积聚时,会导致细胞产生毒性。本研究采用  $H_2O_2$  诱导心肌细胞产生氧化应激性损伤,建立实验模型。Rh-123 是一种阳离子亲脂性荧光染料,可使膜产生通透性,活细胞线粒体内外膜存在跨膜电位,故能特异地聚集在线粒体,Rh-123 荧光强度降低表明线粒体数量降低或 MMP 降低和丧失。PI 是分子量较大的一种化合物,不能进入细胞膜,细胞膜遭到破坏或细胞死亡时,PI 可较快地进入细胞,与 DNA 和 RNA 在核着染,因此可根据 PI 的着染情况,评价细胞的死亡情况<sup>[13]</sup>。本研究利用流式细胞仪结合 Rh-123 和 PI 双标记法准确检测 MMP,从而反映细胞存活状态。本实验结果表明,500  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  作用 2 h 后,大鼠心肌细胞培养液乳酸脱氢酶活性增强,MMP 下降,细胞存活率降低,由此表明, $H_2O_2$  导致了心肌细胞受损;二氮嗪干预后,乳酸脱氢酶活性降低,MMP 和细胞存活率增高。研究表明,二氮嗪可通过激活线粒体 KATP 通道介导的信号通路,对  $H_2O_2$  造成的心肌细胞氧化应激损伤起到保护作用。

综上所述,mitoKATP 通道开放剂可缓解冠心病大鼠心肌氧化应激损伤,其机制与缓解 FGF-2 和 VEGF 过度上调有关。

## 【参考文献】

[1] 胡文超,曹丰. 无创血流储备分数测定对冠心病患者心肌缺血功能评估的临床进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2018, 17(2): 145-149. DOI: 10. 11915/j. issn. 1671-5403. 2018. 02. 032.  
Hu WC, Cao F. Clinical application of noninvasive fractional flow reserve in assessment of myocardial ischemic function in patients with coronary artery disease[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly,

2018, 17(2): 145-149. DOI: 10. 11915/j. issn. 1671-5403. 2018. 02. 032.  
[2] 张琳,严松彪,陈晖,等.  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI SPECT 负荷心肌灌注显像对怀疑心肌缺血糖尿病患者的预后价值[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2017, 16(9): 672-676. DOI: 10. 119155/j. issn. 1671-5403. 2017. 09. 158.  
Zhang L, Yan SB, Chen H, et al. Prognostic value of stress myocardial perfusion imaging with  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI SPECT for diabetic patients with suspected myocardial ischemia [J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2017, 16(9): 672-676. DOI: 10. 119155/j. issn. 1671-5403. 2017. 09. 158.  
[3] Liu G, Wang ZK, Wang ZY, et al. Mitochondrial permeability transition and its regulatory components are implicated in apoptosis of primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to lead[J]. Arch Toxicol, 2016, 90(5): 1193-1209. DOI: 10. 1007/s00204-015-1547-0.  
[4] Zhou W, Marinelli F, Nief C, et al. Atomistic simulations indicate the c-subunit ring of the  $F_1F_0$  ATP synthase is not the mitochondrial permeability transition pore[J]. Elife, 2017, 6(2): 1-10. DOI: 10. 7554/eLife. 23781.  
[5] Arabian M, Aboutaleb N, Soleimani M, et al. Activation of mitochondrial KATP channels mediates neuroprotection induced by chronic morphine preconditioning in hippocampal CA-1 neurons following cerebral ischemia[J]. Adv Med Sci, 2018, 63(2): 213-219. DOI: 10. 1016/j. advms. 2017. 11. 003.  
[6] Onukwufor JO, Stevens D, Kamunde C. Bioenergetic and volume regulatory effects of mitoKATP channel modulators protect against hypoxia-reoxygenation induced mitochondrial dysfunction [J]. J Exp Biol, 2016, 219(17): 2743-2751. DOI: 10. 1242/jeb. 140186.  
[7] Pecoraro M, Ciccarelili M, Fiordelisi A, et al. Diazoxide improves mitochondrial connexin 43 expression in a mouse model of doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3). pii: E757. DOI: 10. 3390/ijms19030757.  
[8] Pohjoismäki JL, Goffart S. The role of mitochondria in cardiac development and protection[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 106(5): 345-354. DOI: 10. 1016/j. freeradbiomed. 2017. 02. 032.  
[9] Best B, Moran P, Ren B. VEGF/PKD-1 signaling mediates arteriogenic gene expression and angiogenic responses in reversible human microvascular endothelial cells with extended lifespan [J]. Mol Cell Biochem, 2018, 446(1-2): 199-207. DOI: 10. 1007/s11010-018-3286-z.  
[10] Jiang Z, Wang W, Guo C. Tetrahydroxy stilbene glucoside ameliorates  $H_2O_2$ -induced human brain microvascular endothelial cell dysfunction *in vitro* by inhibiting oxidative stress and inflammatory responses[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(4): 5219-5224. DOI: 10. 3892/mmr. 2017. 7225.  
[11] Filippi I, Carrarelli P, Luisi S, et al. Different expression of hypoxic and angiogenic factors in human endometriotic lesions[J]. Reprod Sci, 2016, 23(4): 492-497. DOI: 10. 1177/19337191-15607978.  
[12] Szubert S, Moszynski R, Michalak S, et al. The associations between serum VEGF, bFGF and endoglin levels with microvessel density and expression of proangiogenic factors in malignant and benign ovarian tumors[J]. Microvasc Res, 2016, 107(9): 91-96. DOI: 10. 1016/j. mvr. 2016. 06. 002.  
[13] Telford W, Tamul K, Bradford J. Measurement and characterization of apoptosis by flow cytometry[J]. 2016, 77(1): 9. 49. 1-9. 49. 28. DOI: 10. 1002/epcy. 1.