·基础研究·

纳他卡林对鼠脑线粒体 ATP 敏感性钾通道的开放作用

赵 刚[1], 龙超良[1], 汪 海[1,2]

([1]中国人民解放军军事医学科学院 卫生学环境医学研究所, 北京 100850; [2]北京赛德维康医药研究院, 北京 100039)

【摘 要】 目的 探讨纳他卡林对脑线粒体 ATP 敏感性钾通道的影响。方法 急性分离大鼠脑线粒体, 采用 Clark 氧电极法测定纳他卡林对线粒体耗氧速率的影响; 采用紫外分光光度法测定纳他卡林对线粒体悬液在 540 nm 处的吸光值的影响, 用以监测线粒体基质容积的变化。结果 纳他卡林可使脑线粒体的耗氧速率增加（7.58±2.76）%（P＜0.05）, 此作用可被线粒体 ATP 敏感性钾通道阻断剂 5-羟基癸酸（5-HD） 拮抗; 与空白对照组比较, 纳他卡林可使脑线粒体悬液在 540 nm 处的吸光值显著减小（P＜0.01）, 即增大线粒体基质容积, 此作用也可被 5-HD 拮抗（P＜0.01）。结论 纳他卡林可开放脑线粒体 ATP 敏感性钾通道。

【关键词】 脑线粒体; 纳他卡林; 线粒体 ATP 敏感性钾通道

【中图分类号】 R338 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-5403(2011)03-0256-05

Effects of natakalim on mitochondrial ATP-sensitive potassium channel in rat brain

ZHAO Gang[1], LONG Chaoliang[1], WANG Hai[1,2]

([1]Institute of Health and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; [2]Thadweik Academy of Medicine, Beijing 100039, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects of natakalim on mitochondrial ATP-sensitive potassium channel(mitoK$_{ATP}$) in rat brain. **Methods** The Clark-type electrode was used to detect the oxygen consumption rate of brain mitochondria isolated from Wistar rats. Absorbance of the mitochondrial suspension at 540 nm was monitored by spectrophotometric method to assess the mitochondrial matrix volume change. **Results** Natakalim accelerated the mitochondrial oxygen consumption rate by (7.58±2.76) % (P＜0.05), which was abolished by 5-hydroxydecanoate(5-HD), a specific mitoK$_{ATP}$ channel blocker. In addition, absorbance of mitochondrial suspension at 540 nm was decreased by natakalim, suggesting enlargement of mitochondrial matrix volume(P＜0.01). This effect was also abolished by 5-HD(P＜0.01). **Conclusion** Natakalim can activate the brain mitochondrial ATP-sensitive potassium channel in rat.

【**Key words**】 brain mitochondria; natakalim; mitochondrial ATP-sensitive potassium channel

This work was supported by grants from National New Drug Research and Development Key Project (2009ZX09301-002)

脑血管病, 特别是缺血性脑血管疾病严重危害人类健康, 具有发病率、死亡率和致残率高的特点。缺血及再灌注损伤的机制可能涉及能量代谢障碍、自由基损伤、细胞内及线粒体内钙离子超载、兴奋性氨基酸毒性、炎症反应、线粒体损伤及细胞凋亡等。研究表明, 线粒体是缺血及再灌注损伤的亚细胞目标, 对线粒体功能变化的研究已成为当前心脑缺血性疾病研究领域的热点。自1991年Inoue等[1]首次证实在线粒体内膜存在ATP-敏感性钾通道（mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, mitoK$_{ATP}$） 以来, mitoK$_{ATP}$通道在缺血及再灌注损伤中的作用备受关注。已经证实, mitoK$_{ATP}$通道开放后可通过多种机制保护缺血组织, 减轻缺血缺氧及再灌注损伤[2-4]。纳他卡林是新结构类型K$_{ATP}$通道开放剂, 具有较强的降血压作用[5], 选择性激活Kir6.1/SUR2B通道亚型[6]。研究发现, 很多细胞膜ATP-敏感性钾通道（plasma membrane K$_{ATP}$ channel, sarcK$_{ATP}$） 开放剂亦能开放mitoK$_{ATP}$[7]。本研究探讨了纳他卡林对mitoK$_{ATP}$ 通道的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

纳他卡林、二氮嗪由北京赛德维康医药研究院合成; 二磷酸腺苷（ADP）、牛血清白蛋白（BSA）、抗霉素A及5-羟基癸酸（5-HD） 购于Sigma公司; 琥珀酸、谷氨酸、苹果酸为国产分析纯试剂; Bradford法蛋白定量试剂盒购自北京博迈德科技发展有限公

收稿日期: 2011-02-12; 修回日期: 2011-03-02

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项（2009ZX09301-002）

通讯作者: 汪 海, Tel: 010-66932651, E-mail: wh9588@yahoo.com.cn

司；主要仪器为Oxygraph氧电极（英国Hansatech公司）、Stratos高速冷冻离心机（德国）、JEM1230透射电镜（日本Olympus公司）、DY89-I型电动玻璃匀浆机（宁波新芝科器研究所）、TU-1900双光束紫外可见分光光度计（北京普析通用仪器有限责任公司）。

1.2 大鼠脑线粒体的提取

差速离心法[2]提取大鼠脑皮层线粒体。体重 180～220 g 的雄性 Wistar 大鼠, 10%水合氯醛（350 mg/kg）腹腔注射麻醉, 迅速断头取脑, 立即置入冰冷的生理盐水中, 洗净血污, 除去小脑、白质, 嗅球等。脑皮层在 2 ml分离介质（150 mmol/L蔗糖、10 mmol/L HEPES、1g/L BSA、0.5 mmol/L EDTA; pH 7.4）中剪碎, 转移入玻璃匀浆管中（1min 之内完成）, 总体积约 5 ml, 电动匀浆, 下上七次。所得匀浆液用分离介质稀释到 10 ml。4℃离心: 2000 × *g* 离心 8 min, 小心地吸取上清液, 12 000×*g* 离心 12 min, 沉淀用分离介质重悬浮, 体积 10 ml, 12 000 × *g* 离心 12 min, 沉淀用分离介质悬浮, 制成 1 ml 混悬液。装在塑料离心管中, 插入碎冰中保存。全程冰上操作, 提取完成后立即测定。用 Bradford 法进行蛋白含量测定。

1.3 脑线粒体超微结构观察

将分离得到的脑线粒体沉淀用 3%戊二醛固定液固定。经磷酸缓冲液冲洗, 1%锇酸固定, 丙酮脱水, 环氧树脂 618 包埋, 制超薄切片后用 JEM1230 透射电镜扫描观察线粒体的形态, 判断线粒体分离质量及纯度，照像。

1.4 脑线粒体呼吸功能的测定

采用 Clark 氧电极法[8]。所提线粒体悬液经过蛋白定量确定浓度, 以控制加样的体积。按照 Clark 氧电极法的操作说明安装好电极, 做好加样前工作（清洁仪器, 校正, 测试灵敏度）。外接恒温水浴（30℃）。取 0.5 mg 线粒体加入 1 ml 反应体系（225 mmol/L 甘露醇, 75 mmol/L 蔗糖, 0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH7.4）中, 孵育 2 min, 再加入 20 μl 底物（NADH 呼吸链为 5 mmol/L 苹果酸+5 mmol/L 谷氨酸, FAD 呼吸链为 5 mmol/L 琥珀酸）, 连续描记呼吸曲线, 1 min 后加入 5 μl ADP（50 mmol/L）, 待 ADP 消耗完, 曲线斜率平稳后在固定时间点加入纳他卡林（终浓度为 10 μmol/L）, 连续描记呼吸曲线。加入 ADP 之前曲线的斜率称为 4 态（R_4）呼吸, 加入 ADP 后的快速耗氧阶段称为 3 态（R_3）呼吸, R_3 和 R_4 的比值称为呼吸控制率（respiratory control rate, RCR）。

1.5 脑线粒体基质容积的测定[2]

采用分光光度法。比色皿中线粒体蛋白浓度控制在0.5 mg/ml, 测定用缓冲介质为: 225 mmol/L甘露醇, 75 mmol/L蔗糖, 0.1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L磷酸钾缓冲液（pH7.4）, 反应体系温度25℃。于540 nm波长处作时间扫描, 记录3min内吸光值变化。

1.6 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组内比较采用配对*t*检验, P＜0.05表示差异有统计学意义。应用SPSS 13.0统计软件进行数据统计分析。

2 结 果

2.1 脑线粒体超微结构观察

由图 1 可见, 分离得到的脑皮层线粒体膜完整, 嵴致密, 基质清楚。

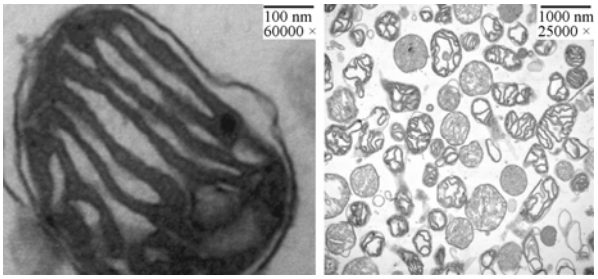


图 1 脑线粒体超微结构（**TEM**）

2.2 脑线粒体活性检测

用 Clark 氧电极法检测脑线粒体氧化磷酸化功能。图 2A 代表典型的氧化磷酸化曲线, 可见线粒体氧化磷酸化偶联程度较好, 呼吸控制率为 4.50±0.25（n =

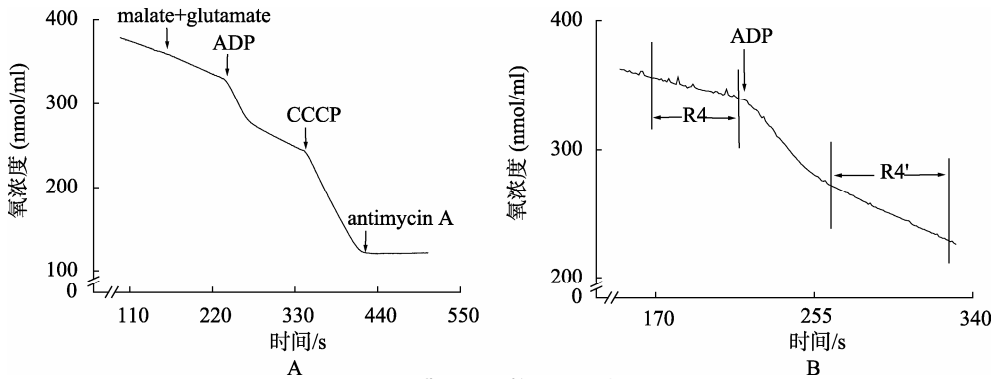


图 2 典型的线粒体呼吸曲线

A: 脑线粒体氧化磷酸化偶联程度较好, 对解偶联剂和呼吸链抑制反应敏感; B: R4′明显大于 R4(P＜0.05, n=6), 呼吸链补偿线粒体内膜两侧 H^+电化学梯度降低的能力较好

6），线粒体对解偶联剂 CCCP 和呼吸链抑制剂 antimycin A 反应敏感。图 2B 中，R_4 为加入 ADP 前线粒体的耗氧速率，R_4' 为 ADP 完全消耗以后的耗氧速率，可见 R_4'[（31.44±4.33）nmol/（ml • min）]明显大于 R_4[（25.56±3.38）nmol/（ml • min）]，($P<0.05$, $n=6$)，表明呼吸链可通过加速电子传递，补偿由于 ADP 磷酸化生成 ATP 而消耗的线粒体内膜两侧 H^+ 电化学梯度。可见，我们所提的脑组织线粒体功能良好。

2.3　纳他卡林对脑线粒体耗氧速率的影响

纳他卡林（10 μmol/L）可使线粒体耗氧速率显著加快（7.58±2.76%）（$P<0.05$; 图3A）。我们以加入纳他卡林后耗氧曲线的斜率和加入之前曲线斜率比值 R 作为检测指标，检测 5-HD（100 μmol/L）对纳他卡林的拮抗作用，结果显示 5-HD（100 μmol/L）可拮抗纳他卡林加速线粒体耗氧速率的作用（$P<0.05$; 图 3B）。

2.4　纳他卡林对脑线粒体基质容积的影响

二氮嗪为高选择性 $mitoK_{ATP}$ 通道开放剂，本实验以二氮嗪为对照，观察纳他卡林对脑线粒体基质容积的影响。结果显示，二氮嗪（10 μmol/L）和纳他卡林（10 μmol/L）均可增大脑线粒体基质容积，表现为脑线粒体悬液在 540 nm 处的吸光值（A_{540}）减小，此作用均可被 5-HD（100 μmol/L）拮抗（图 4，图 5）。

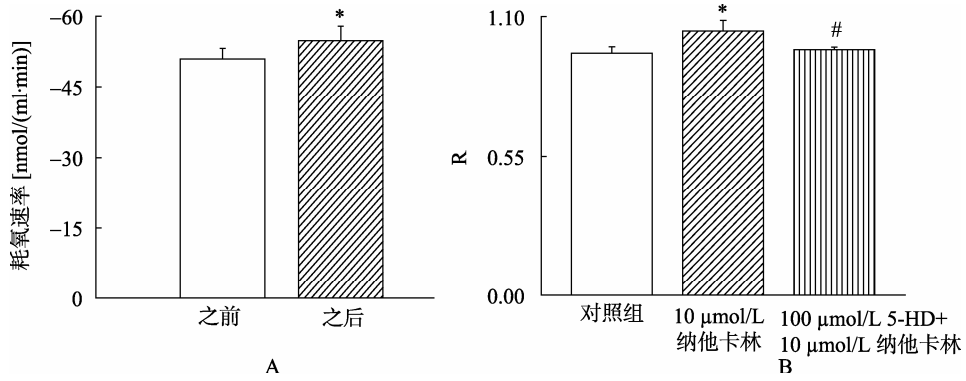


图 3　纳他卡林对脑线粒体耗氧速率的影响

A: 加入纳他卡林前后耗氧曲线的斜率；与加入纳他卡林前比较，$^*P<0.05$; B: R，加入纳他卡林后前耗氧曲线斜率的比值。与对照组比较，$^*P<0.05$；与纳他卡林处理组比较，$^{\#}P<0.05$

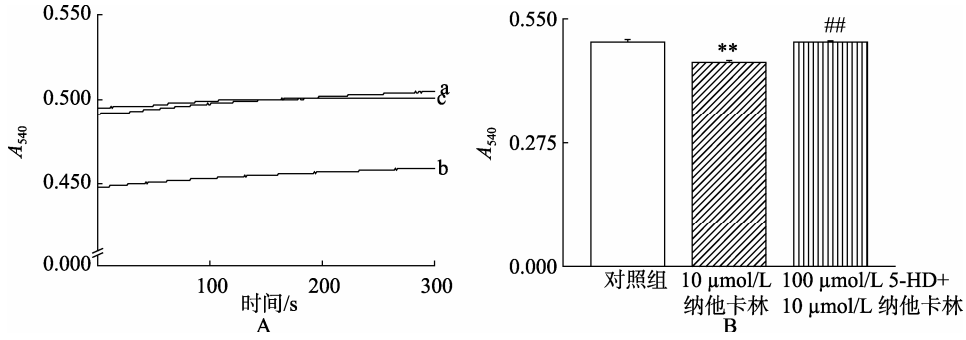


图4　纳他卡林对脑线粒体悬液 A_{540} 的影响

A: 纳他卡林对脑线粒体悬液 A_{540} 的影响；a: 对照组；b: 纳他卡林组；c: 5-HD+纳他卡林组；B: 300 s 时纳他卡林对脑线粒体悬液 A_{540} 的影响；与对照组比较，$^{**}P<0.01$；与纳他卡林组比较，$^{\#\#}P<0.01$

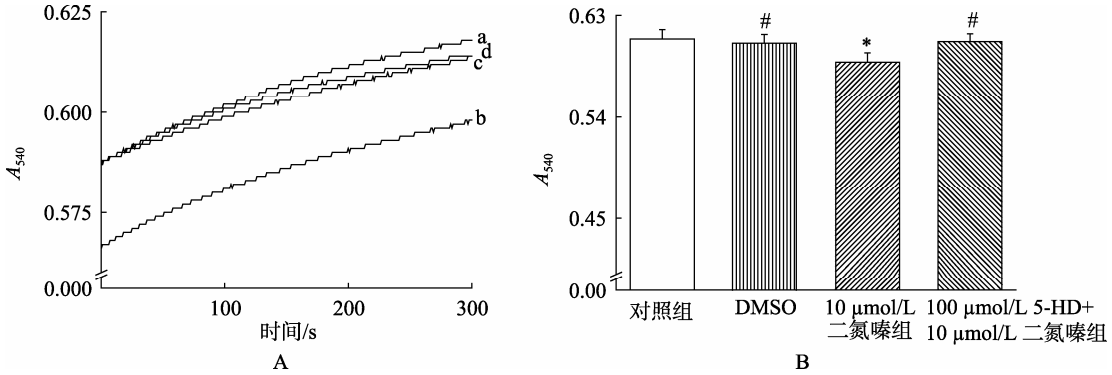


图 5　二氮嗪对脑线粒体悬液 A_{540} 的影响

A: 二氮嗪对脑线粒体悬液 A_{540} 的影响；a: 对照组；b: 二氮嗪组；c: DMSO 组；d: 5-HD+二氮嗪组；B: 300 s 时二氮嗪对脑线粒体悬液 A_{540} 的影响；与对照组比较，$^*P<0.05$；与二氮嗪组比较，$^{\#}P<0.05$

3 讨 论

线粒体是一种结构和功能复杂而敏感的细胞器，拥有独立于细胞核的基因组，是细胞能量产生的主要部位，许多疾病的病理生理过程与线粒体损伤密切相关[9]，如帕金森病、阿尔茨海默病、缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、脊髓损伤及衰老。

研究表明，线粒体膜上存在多种通常表达于细胞膜的离子通道，如ATP-敏感性钾通道、Ca^{2+}激活钾通道等。目前人们对这些离子通道的三维分子结构尚不完全清楚，但已经认识到其在调节线粒体功能、沟通线粒体内和细胞内信号转导及维持细胞正常生理功能等方面发挥着重要作用。其中，对mitoK$_{ATP}$通道在缺血性疾病及神经退行性疾病的发生发展中的作用已有广泛深入的研究。mitoK$_{ATP}$通道在缺血预适应过程中可能扮演启动子和效应子的双重角色[10]。mitoK$_{ATP}$通道已成为神经保护和心脏保护的新靶标[11]。mitoK$_{ATP}$通道开放后可调节N-甲基-D-天门冬氨酸受体活性[4]、调节氧化磷酸化功能、抑制钙超载、抑制线粒体通透性转运、抑制细胞凋亡。但这些保护作用都继发于mitoK$_{ATP}$通道开放后的直接效应[12]，即线粒体基质容积增大、线粒体耗氧加速（轻度解偶联）和线粒体基质碱化。

有研究表明，脑mitoK$_{ATP}$通道的分布比心脏和肝线粒体高七倍[14]，内向整流钾通道Kir亚型Kir6.1和磺酰脲类受体SUR亚型SUR2参与了mitoK$_{ATP}$通道的组成[13-15]，而且，Kir6.1和SUR2在脑线粒体的表达比其他脑组织更高[14]，这提示了mitoK$_{ATP}$通道对脑线粒体功能调控的重要性。纳他卡林是新结构类型K$_{ATP}$通道开放剂，选择性激动Kir6.1/SUR2B亚型[6]，为小分子脂肪胺类化合物，可通过血脑屏障。由此，我们设想纳他卡林对mitoK$_{ATP}$通道可能具有开放作用，并有发展成脑保护剂的潜力。

MitoK$_{ATP}$开放后[12]，钾离子内流入线粒体基质，细胞液流入引起线粒体基质容积增大，表现为线粒体悬液在540 nm波长处吸光值（A_{540}）降低。组织缺血时，由于线粒体膜电位降低，导致线粒体基质皱缩，膜间隙增大，嵌于内外膜之间的重要蛋白功能受损，导致线粒体功能障碍，最终导致组织损伤。因此，钾离子内流对组织缺血时基质容积和膜间隙的维持至关重要。钾离子通过mitoK$_{ATP}$等钾离子通道及钾离子转运体进入线粒体基质，而位于线粒体内膜上的H^+/K^+交换体则使钾离子离开基质，而使氢离子进入基质，即发生解偶联效应，这会导致线粒体耗氧加速。

本实验表明，纳他卡林可加速脑线粒体耗氧。由于 5-HD 可迅速被线粒体脂酰辅酶 A 合成酶催化生成 5-HD-CoA，5-HD-CoA 可能作为呼吸链底物被氧化[16]而加速耗氧（$P<0.01$；图 6），如果设立 5-HD 拮抗组，会发现 5-HD 不但不能拮抗纳他卡林加速耗氧的作用，反而使之增强。为了克服这一问题，我们以加入纳他卡林后耗氧曲线的斜率和加入之前曲线斜率的比值作为检测指标，观察到了 5-HD 对纳他卡林的拮抗作用（图 3B）。纳他卡林可增大脑线粒体基质容积，这一作用可被 mitoK$_{ATP}$ 通道阻断剂 5-HD 拮抗。由此证明纳他卡林可开放脑通道，这为将纳他卡林开发为新型心脑保护药和神经保护剂提供了实验依据。

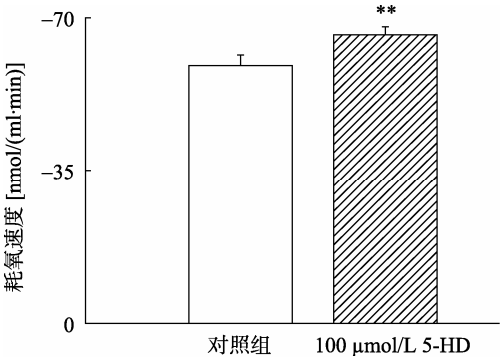


图6 5-HD加速线粒体耗氧速率
与对照组比较，$^{**}P<0.01$

【参考文献】

[1] Inoue I, Nagase H, Kishi K, *et al*. ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane[J]. Nature, 1991, 352(6332): 244-247.

[2] Kobayashi T, Kuroda S, Tada M, *et al*. Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome c release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury[J]. Brain Res, 2003, 960(1-2): 62-70.

[3] Teshima Y, Akao M, Li RA, *et al*. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel activation protects cerebellar granule neurons from apoptosis induced by oxidative stress[J]. Stroke, 2003, 34(7): 1796-1802.

[4] Pamenter ME, Shin DS, Cooray M, *et al*. Mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels regulate NMDAR activity in the cortex of the anoxic western painted turtle[J]. J Physiol, 2008, 586(4): 1043-1058.

[5] 邱财荣，龙超良，汪 海. 脂肪胺类新结构钾通道开放剂对大鼠血流动力学的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2003, 8(5): 526-529.

[6] Tang Y, Long CL, Wang RH, *et al.* Activation of

SUR2B/Kir6.1 subtype of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel improves pressure overload-induced cardiac remodeling *via* protecting endothelial function[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 56(4): 345-353.

[7] Costa AD. Iptakalim: a new or just another KCO[J]? Cardiovasc Res, 2009, 83(3): 417-418

[8] 曾 源, 龙超良, 汪 海, 等. 二氮嗪对大鼠心肌线粒体膜电位及呼吸功能的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(5): 490-493.

[9] Mattson MP, Kroemer G. Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection[J]. Trends Mol Med, 2003, 9(5): 196-205.

[10] Fryer RM, Hsu AK, Gross GJ. Mitochondrial K(ATP) channel opening is important during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic preconditioned rat hearts[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(4): 831-834.

[11] Yamauchi T, Kashii S, Yasuyoshi H, *et al*. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel: a novel site for neuroprotection[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(6): 2750-2756.

[12] Costa AD, Quinlan CL, Andrukhiv A, *et al*. The direct physiological effects of mitoK$_{ATP}$ opening on heart mitochondria[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 290(1): H406-415.

[13] Bajgar R, Seetharaman S, Kowaltowski AJ, *et al*. Identification and properties of a novel intracellular (mitochondrial) ATP-sensitive potassium channel in brain[J]. J Biol Chem, 2001, 276(36): 33369-33374.

[14] Lacza Z, Snipes JA, Kis B, *et al*. Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K^+ channel in the brain[J]. Brain Research, 2003, 994(1): 27-36.

[15] Shimizu K, Lacza Z, Rajapakse N, *et al*. MitoK$_{ATP}$ opener, diazoxide, reduces neuronal damage after middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(3): H1005-1011.

[16] Lim KH, Javadov SA, Das M, *et al*. The effects of ischaemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondrial volume and respiration[J]. J Physiol, 2002, 545(3): 961-974.

(编辑: 任开环)

(上接 255 页)

而开颅手术治疗多需在全麻下进行, 且开颅时间长, 清除血肿的过程中又增加了脑损伤, 术后并发症及病死率增加。而老年患者多合并慢性心肺疾病且体质弱, 内科保守及外科手术治疗疗效差, 死亡率更高。微创颅内血肿清除术创伤小, 无年龄限制, 尤其适合难以耐受开颅的高龄患者。本组病例平均年龄 72.6 岁, 最高 85 岁, 颅内血肿总清除率 91%。病死率 12% , 低于国内立体定向治疗病死率 20.86%[2]。

对适宜微创颅内血肿清除术、患者状态不能耐受手术或患者家属不同意外科开颅手术者微创术时机越早越好[3]。由于手术清除血肿降低颅内压, 尤其是降低血肿腔压力, 使闭塞的血管再出血[4]。因此, 手术时间一般选择发病 6～12 h 较为合适。

有研究显示[5], 人体 30～40 岁后, 肾脏的重量开始逐渐减轻, 肾小球滤过率进行性下降。老年人高血压、糖尿病等疾病多发, 加快了肾小球硬化的进程, 在应激或一些药物作用下, 老年人极易发生肾功能不全。微创颅内血肿清除术清除血肿并可持续引流减轻脑水肿降低颅内压, 术后一般不使用甘露醇等脱水剂, 如出现脑水肿可适量使用, 因此, 可减少老年患者肾功能不全的发生。

总之, 微创颅内血肿清除术疗效高、创伤小、并发症少且操作简便, 在治疗上突破了对患者年龄及身体状况的限制, 是老年高血压脑出血的一种较有效的治疗方法。

【参考文献】

[1] 阎洪法. 高血压脑出血的内科治疗效果对比研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 1996, 4(3): 153-154.

[2] 林岩崇, 诸葛启钊, 陈伟建. 立体定向超早期和早期血肿抽吸术治疗高血压脑出血的研究[J]. 中国危重病急救医学, 1997, 9(6): 17-19, 64

[3] 李铁山, 韩仲岩. 脑出血继续出血及其影响因素[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 1999, 7(2): 95.

[4] Basali A, Masclae, J, Kalfas I, *et al*. Relation between perioperative hypertension and intracranial hemorrhage after craniotomy[J]. Anesthesiology, 2000, 93(1): 48-54.

[5] Hoang K, Tan JC, Derby G, *et al*. Determinants of glomerular hypofiltration in aging humans[J]. Kidney Int, 2003, 64(4): 1417-1424.

(编辑: 周宇红)