

· 论 著 ·

低温时钾离子通道开放剂对猪冠状动脉的影响

李文涛¹, 林道明¹, 杨九光², 龙 村², 史世勇², 温福兴¹
(阜外心血管病医院¹麻醉体外循环实验室, ²体外循环科, 北京 100037)

摘要: 目的 广泛应用于临床的心脏停跳液及移植器官保护液均为含高钾溶液。其在常温或低温条件下均损害冠状动脉内皮源性超极化因子(EDHF)的释放。钾离子通道开放剂在常温条件下抑制此种损害作用,在低温条件下是否存在这种抑制作用尚无实验证实。本实验目的旨在研究钾离子通道开放剂是否存在这种抑制作用。方法 将猪冠状动脉分别在高钾溶液(20 mmol/L)或添加 Nicorandil(10 μmol/L)的高钾溶液 4℃的条件下保存 6 h 后,将其血管环(3 mm)悬挂于浴槽中测定其张力变化。应用一氧化氮合成酶阻断剂 L-NNA(300 μmol/L)和环加氧酶阻断剂 Indomethacin (7 μmol/L)分别阻断 NO 和 PGI₂ 对血管的舒张作用而独立 EDHF 的作用,用 U₄₆₆₁₉(30 nmol/L)预收缩血管, A₂₃₁₈₇(-10 logmol/L ~ -6 logmol/L)以一定的浓度梯度舒张血管。检验对 EDHF 的影响。结果 冠状动脉在深低温保存后, A₂₃₁₈₇引起的内皮依赖性舒张的最大百分比在高钾组、Nicorandil 加高钾组分别为 32.75% ± 9.14%, 72.65% ± 16.92%。结论 钾离子通道开放剂(Nicorandil)在低温贮存后对猪冠状动脉 EDHF 的释放有保护作用。

关键词: 冠状动脉; 血管张力; 高钾; 低温; 钾通道开放剂

中图分类号: R654.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-1403(2003)01-0024-04

The Protective Effect of Potassium-Channel Opener on the Release of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor of Porcine Coronary Artery after Cold Storage

LI Wen-tao, LIN Dao-ming, YANG Jiu-guang, LONG Cun, SHI Shi-yong, WEN Fu-xing
(Anesthesiology and Cardiopulmonary Bypass Laboratory, Fuwai Heart Hospital, Beijing 100037, China)

Abstract: **OBJECTIVE** Hyperkalemic solution is widely used to protect myocardium during open heart surgery and preserve donor heart. Its inhibitory effect on the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) of coronary after deep hypothermia storage has been studied. However, whether existing a protective effect if potassium channel opener is added after cold storage has not been identified. This study was especially designed to examine this effect. **METHODS** Porcine coronary artery rings were studied in organ chambers. Relaxation in response to the EDHFs stimuli A₂₃₁₈₇ in U₄₆₆₁₉ (30 nmol/L)-induced precontraction after incubation with hyperkalemic solution (20 mmol/L) with nicorandil (10 μmol/L) (at 4℃ in a refrigerator for 1 hour or 4 hours) was compared with the control. **RESULTS** After hyperkalemic solution or hyperkalemic solution with nicorandil exposure, the A₂₃₁₈₇-induced relaxation was 32.8% ± 9.1% and 72.6% ± 16.9% under hypothermia, respectively. (n=8 each group, P<0.01, unpaired t test). **CONCLUSIONS** After cold storage, potassium channel opener can attenuate inhibitory effect of hyperkalemic solution on the release of EDHF.

Key words: Coronary; Vascular tension; Hyperkalemia; Hypothermia; Potassium channel opener

在心血管外科和心脏移植领域;通常使用以含高钾离子为主的去极化液保护心肌^[1],但去极化中的高钾成份可损伤冠状动脉血管内膜功能^[2]。实验表明^[3]高钾损伤冠状动脉内皮源性超极化因子(EDHF)介导的舒血管作用。EDHF引起血管平滑

肌细胞超极化而舒张血管^[4],这个过程涉及到钾离子通道,尤其是钙依赖性钾通道的开放^[5]。而 NO 和 PGI₂ 则分别通过提高血管平滑肌细胞的 cGMP 和 cAMP 的水平而舒张血管^[6]。然而,所有的内皮源性舒张因子(EDRF)引起的舒张反应都是通过增加内皮细胞内的自由钙浓度而起作用的^[7]。要解决钙超载与血管收缩中的钙矛盾,过分地降低停跳液中的钙离子浓度在理论上是不可取的。K_{ATP}通道开放剂

收稿日期: 2002-11-02; 修订日期: 2002-12-31

作者简介: 李文涛(1968-2),男,主治医师,硕士

(PCOs)的应用为这一领域的研究开辟了一个新途径。我们设计本实验旨在检验冠状动脉经深低温贮存后,在传统的高钾液中加入 PCOs 是否可以保护 EDHF 介导的血管舒张功能。寻求一种既有心肌保护功能又有冠状动脉血管保护功能的心肌保存液。

1 材料与方 法

1.1 动物实验材料 冠状动脉取自当地屠宰场刚宰杀生猪的心脏。当生猪(雌雄不限)被宰杀后,立刻将心脏取出并迅速放入盛有 4℃Kreb's 液的容器中,然后将其置入冷藏箱并迅速(约 20 min)带回实验室。在常温、持续充氧 Kreb's 液中游离离心表左冠状动脉前降支。取其中、下 2/3 段并截取几段长度为 3 mm 的血管环。用器官槽法测定猪冠状动脉环张力的变化。

1.2 主要实验仪器 超级恒温器(WC/09-05 型,

重庆试验设备厂);肌张力换能器(新航 JZ101 型,新航机电设备有限公司);微调千分尺(定作,北京量具量刃厂);Powerlab 八通道主机/后置、Powerlab 八通道桥式放大器/前置(Powerlab/8s ADInstruments, ADInstruments Pty Ltd. Australia);血管张力计算机软件(Powerlab Chart v3. 4. 3 & Scope v3. 6 for Windows, ADInstruments Pty Ltd, Australia);SCSI 卡(由 ADInstruments Pty Ltd, Australia 提供);PC 计算机。

1.3 主要实验辅助装置 恒温预充玻璃大浴槽、玻璃小浴槽(军事医学科学院实验仪器厂玻璃仪器室定做,北京);器官保存箱(Coleman, Made by The Coleman co. Inc, Wichita, Kansas, U. S. A);混合气:95%O₂+5%CO₂(北京氧气厂);冰箱。

1.4 药品的来源和使用 见表 1。

表 1 实验药品一览表

药品名称	性质	作用	来源
U ₄₆₆₁₉	前列腺素 F _{2α}	预收缩血管	sigma
A ₂₃₁₈₇	非受体介导钙离子载体	介导内皮依赖性血管舒张	sigma
LNNA	N-硝基-L-精氨酸	一氧化氮合成酶阻断剂	sigma
Indomethacin	消炎痛	环加氧酶阻断剂	sigma
Nicorandil	尼可地尔	K _{ATP} 通道开放剂	日本

1.5 实验分组及实验流程 ①低温高钾液组(K4组, n=8):将血管环在 4℃、无氧高钾液(20 mmol/L)中浸泡并置于冰箱 6 h 后,悬挂在小浴槽中用 Krebs 液在 37℃条件下反复冲洗并持续用 95%氧气与 5%二氧化碳的混合气充气,平衡 1 h 后,加入 Indomethacin (7 μmol/L), L-NNA (300 μmol/L), 30 min 后,加入 U₄₆₆₁₉ (30 nmol/L)直至达到稳定的收缩平台期(通常为 10 min 左右)再以 -10~-6 log mol/L 的浓度梯度依次加入 A₂₃₁₈₇。②低温高钾液加 Nicorandil 组(K4+N 组, n=8):除了在高钾液中加入 Nicorandil (10 μmol/L)外,余者同上。

1.6 统计学处理 所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 9.0 统计软件进行处理,相同血管环常温下前后比较时,使用配对 *t* 检验;组间比较,使用非配对 *t* 检验。以 *P* < 0.05 具有统计学意义, *P* < 0.01 具有极显著差异。

2 结 果

2.1 低温时,冠状动脉在冰箱内保存处于静息状态,无法测得高钾组和高钾加 Nicorandil 组两组血管张力。

2.2 U₄₆₆₁₉ 预收缩的幅度:血管环在低温条件下浸泡于高钾溶液和高钾加 Nicorandil 6 小时后, U₄₆₆₁₉ 预收缩的幅度分别为 1.57±0.65 g, 1.55±0.72 g。没有统计学差异。(每组 n=8, *P* > 0.05 见表 2)。

表 2 U₄₆₆₁₉ 预收缩的平均幅度(g)

组 别	样本含量(n)	收缩幅度
K4 组	8	1.57±0.65
K4+N 组	8	1.55±0.72

2.3 高钾溶液和高钾加 Nicorandil 液对 A₂₃₁₈₇ 的舒张作用的影响:低温高钾组和低温高钾加 Nicorandil 组, A₂₃₁₈₇ 引起的舒张分别为 32.8%±9.1% 和 72.6%±16.9%, (每组 n=8, *P* < 0.01, 非配对 *t* 检验)有极显著差异。(见表 3, 图 1)。

3 讨 论

本研究首次证实①在冷高钾溶液(20 mmol/L)中加入 PCOs(Nicorandil),对 EDHF 介导的舒张有保护作用;②在低温下,PCOs(Nicorandil)对 U₄₆₆₁₉ 引起的冠状动脉收缩无影响。而冠脉平滑肌的收缩

性因低温而受到保护。本实验的一些发现,可以初步揭示使用高钾溶液(20 mmol/L)后内皮系统功能紊乱的机制,而对临床心脏手术和器官移植有所提示。冠脉的内皮功能:内皮细胞产生多种具有舒张或收缩活性的物质^[8]。内皮源性的舒张是由内皮释放的多种因子共同作用的结果,其中包括了一氧化氮(EDNO),前列环素(PGI₂)和 EDHF。与 EDNO 和 PGI₂ 不同,EDHF 的性质尚不清楚,近来认为,EDHF 是花生四烯酸经过细胞色素 P₄₅₀ 单氧化酶代谢产生^[9,10],EDHF 可以通过使平滑肌细胞超极化而使之舒张^[11],其中可能涉及钾离子通道,尤其是钙依赖性钾通道(Kca)的开放^[12]。与之不同,EDNO 是通过

提高环磷酸鸟苷水平来舒张血管^[6]。然而,所有这些内皮源性舒张因子(EDRFs)都是因内皮细胞胞内钙离子浓度升高而释放的^[7]。

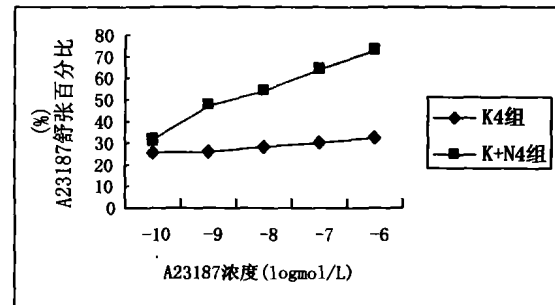


图1 各浓度梯度 A₂₃₁₈₇舒张百分比趋势图

表3 两组间各浓度梯度 A₂₃₁₈₇舒张百分比(%)

组别	10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M
K4组	25.71±11.09	26.13±10.77	28.26±11.10	30.46±11.49	32.75±9.14
K4+N组	31.38±14.74	47.08±21.87	54.15±17.24	63.99±16.99	72.65±16.92

尽管 EDHF 在调节血管张力和血管疾患中的作用并不明确,但已有证据表明 EDHF 和 EDNO 是内皮依赖性舒张机制中两个重要方面^[13]。在本实验中,EDHF 刺激 A₂₃₁₈₇ 引起 84.7% 的舒张。它至少可以说明当 PGI₂-和 EDNO-机制受阻时,EDHF 处于激活状态。研究还表明 EDHF 可以支持或增益 EDNO 的舒张作用,特别是 EDNO-介导的舒张功能受损时^[14],例如部分高胆固醇患者,高血压患者,糖尿病患者^[14]。在冠脉循环缺血再灌注期,当时 EDNO 机制受损,EDHF 在调节冠脉循环和引发血管疾患中可能起着重要作用^[15]。

高钾加 Nicorandil 液和高钾溶液下冠脉的张力变化:K⁺是去极化剂和强烈的血管收缩剂^[16]。我们很关注高钾液引起的血管收缩。本次研究也提供了这方面的一些证据,表明它们在浸泡时,高钾溶液与高钾加 Nicorandil 液对冠状动脉有明显的收缩效果。

在低温条件下,高钾溶液或高钾加 Nicorandil 液对 EDHF 相关性舒张的影响:使用高钾溶液 6 min 后会使得 A₂₃₁₈₇ 引发的舒张减弱,这可视为高钾溶液对 EDHF 介导的内皮功能的影响。在常温实验中,A₂₃₁₈₇ 引发的舒张分别降至 34.2% (P<0.001,高钾溶液组),66.9% (P<0.05,高钾加 Nicorandil 液组)。而低温对 EDHF 介导的舒张有何影响呢?临床上,高钾溶液是作为器官的冷保护液使用。已经有人证实用 UW 液保护大鼠心脏时,低温是一个重要的因素^[17]。有关 EDHF 介导的舒张是否会在低温缺氧

保存时出现,以及同样情况下,冷藏后加入 PCOs 有无保护作用等研究并非令人满意,本实验主要针对这个问题而设计。为了和临床移植类似,我们将冠状动脉在低温(4℃)高钾液中保存 6 min 后进行张力测定。结果显示,EDHF 介导的舒张受到损伤,而加入 Nicorandil 可使 EDHF 介导的舒张受到保护。因此,临床用高钾停跳液或用冷 UW 液保存供体心脏时,确实存在对冠状动脉 EDHF 介导的舒张抑制作用。

对舒张损伤及 PCOs 保护机制的探讨:对于高钾液对 EDHF 介导的舒张损伤方面,一些研究发现有两个机制^[18]。一是与平滑肌细胞膜超极化延迟有关,其二与受高钾液影响的 K⁺通道,特别是钙激活的 K⁺通道有关。

临床意义:本研究证实冠状动脉在心脏灌注停跳液期间,由于高钾的影响而使冠状动脉处于收缩状态,因此可以直接导致停跳液在心脏的分布不均,从而影响心脏的停搏。此外,冠状动脉经过低温、高钾贮存后,其舒张功能受到损伤,从而间接影响心脏术后的心肌灌注功能。再者,完整的血管内皮在抗血小板聚集、防止动脉粥样硬化等方面扮演着重要的角色^[16],实验中所观察的内皮功能的损害可能会对心脏和其他器官的移植产生长远的影响。实验证明在高钾溶液中加入钾离子通道开放剂后,可以降低前两者的负面作用,但是可以降低血小板聚集、防止动脉粥样硬化有待于进一步的研究。

本实验研究证明:低温条件下,高钾溶液对冠状

动脉内皮功能可造成损伤,而钾离子通道开放剂可以抑制此种损伤作用。其作用机制有待于进一步的研究。

4 结 论

低温条件下,高钾对冠状动脉内皮功能有损伤作用,而钾离子通道开放剂可抑制此种损伤作用。但其机制尚待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Hearse DJ, Braimbridge MV, Jynge P. Protection of the ischemic myocardium: Cardioplegia [M]. New York: Raven, 1981.
- [2] Saldanha C, Hearse DJ. Coronary vascular responsiveness to 5-hydroxytryptamine before and after infusion of hyperkalemic crystalloid cardioplegic solution in the rat heart. Possible evidence of endothelial damage[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1989, 8: 783-787.
- [3] Guo-wei He. Hyperkalemia exposure impairs EDHF-mediated endothelial function in the human coronary artery[J]. Ann Thorac Surg, 1997, 63: 84-87.
- [4] Holzmann S, Kukovetz WR, Windischhofer W, et al. Pharmacologic differentiation between endothelium-dependent relaxations sensitive and resistant to nitro-L-arginine in coronary arteries[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1994, 23: 747-756.
- [5] Yasunobu H, Yutaka N, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor activates Ca^{2+} -activated channels in porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1998, 32: 642-649.
- [6] 郑旭, 潘孝仁, Muelsch A, 等. 缓激肽引起的内皮源性超极化因子在调节冠状动脉阻力血管张力中的作用[J]. 中华心血管病杂志, 1997, 25(6): 453-456.
- [7] He GW, Yang CQ. Hyperkalemia alters EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in coronary arteries[J]. Am J Physiol, 1996, 271 (Heart Circ Physiol 40): H760-767.
- [8] Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor [M]. Edited Netherlands, Harwood academic publishers, 1996, ISBN 3-7186-5929-8.
- [9] Hecker M, Bara AT, Bauersch J, et al. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals[J]. J Physiol(Lond) 1994, 481: 407-414.
- [10] Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, et al. Identification of epoxyeicosatrienoic acid as endothelium-derived hyperpolarizing factors[J]. Circ Res, 1996, 78: 415-423.
- [11] Holzmann S, Kukovetz WR, Windischhofer W, et al. Pharmacologic differentiation between endothelium-dependent relaxations sensitive and resistant to nitro-L-arginine in coronary arteries[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1994, 23: 747-756.
- [12] Yasunobu hayabuchi, Yutaka Nakaya, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor activates Ca^{2+} -activated channels in porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1998, 32: 642-649.
- [13] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京:中国中医药出版社, 1997. 6 ISBN 7-80089-629-3.
- [14] Cohen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization: beyond nitric oxide and cyclic GMP[J]. Circulation, 1995, 92: 3337-3349.
- [15] Pear JM, et al. Loss of endothelium-dependent vasodilatation and nitric oxide release after myocardial protection with University of Wisconsin solution[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1994, 107: 257-264.
- [16] 陈修等. 心血管药理学[M]. 第二版, 北京:人民卫生出版社, 1996. ISBN 7-117-02497-6.
- [17] Mankad PS, et al. Endothelial dysfunction caused by University of Wisconsin preservation solution in the rat heart: the importance of temperature[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1992, 104: 1618-1624.
- [18] He GW, Yang CQ. Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in coronary arteries by cold storage with University of Wisconsin solution[J]. The J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(1): 122-130.

全军心脏外科研究所在解放军总医院成立

2002 年岁末,总后勤部组织专家组对解放军总医院心血管外科的临床技术特色、人才技术力量、科研实验水平和硬件设备等进行了全面评估,给予了高度评价,并一致认为,总医院心血管外科在保健、临床、科研和教学等方面取得了显著成绩,特别在老年冠心病的外科治疗方面处于全国领先地位,达到国际先进水平,已完全具备建立心脏外科研究所的条件。经报请总后勤部批准建立全军心脏外科研究所!可喜可贺!

解放军总医院心脏外科研究所
肖苍松