

· 论 著 ·

ATP 敏感性钾离子通道开放剂二氮嗪对布比卡因致大鼠心肌细胞毒性作用的影响

李军¹, 黄翠影², 张淑娟¹, 席文娟¹, 李永敏¹, 孟令群¹, 刘海¹, 郭平选¹

1. 华北理工大学附属开滦总医院麻醉科, 河北 唐山 063000;

2. 华北理工大学附属开滦总医院儿科, 河北 唐山 063000

摘要: **目的** 评估二氮嗪对布比卡因心肌抑制的影响, 观察布比卡因对心肌细胞的直接毒性作用, 以及使用二氮嗪是否可以减轻或消除此毒性作用。**方法** 选择成年 SD 大鼠 50 只, 通过主动脉逆行灌流酶解法行急性心肌细胞分离, 待细胞分离成功后, 每只大鼠分别选取杆状、条纹清晰、边缘整齐的心肌细胞, 采用随机数字表法分为两组: 布比卡因组 (Bup 组) 和二氮嗪 + 布比卡因组 (Bup + D 组); 各组中按布比卡因浓度不同又分为 5 个亚组, 分别为 Bup1、Bup2、Bup3、Bup4、Bup5 组和 Bup + D1、Bup + D2、Bup + D3、Bup + D4、Bup + D5 组, 对应布比卡因浓度分别为 20.0、30.0、45.0、67.5、101.5 $\mu\text{mol/L}$ 。记录给予各组中不同浓度布比卡因灌流前后细胞有无停止自发性搏动, 并记录再次更换有钙台氏液后细胞有无恢复自发性搏动。**结果** 除 20 $\mu\text{mol/L}$ 外, 给予二氮嗪和不同浓度布比卡因灌流后, 各组心肌细胞衰竭率显著低于给予单纯布比卡因灌流 ($P < 0.05$)。二氮嗪 + 布比卡因所致大鼠心肌细胞衰竭的半数最大效应浓度 (EC_{50}) 及其 95% *CI* 为 64.6 (47.4 ~ 84.3) $\mu\text{mol/L}$, 明显高于单纯布比卡因所致 [44.9 (33.9 ~ 55.4) $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$]; 衰竭的细胞停止灌流布比卡因和二氮嗪后, 细胞均可恢复正常收缩状态。**结论** 布比卡因的心脏毒性与其线粒体 ATP 敏感性钾离子通道 (mitoKATP) 抑制作用有关, 开放 ATP 敏感性 K 离子通道可显著提高大鼠心肌耐受布比卡因心肌毒性的能力。

关键词: ATP 敏感性钾通道; 二氮嗪; 布比卡因, 麻醉药, 局部; 药物毒性; 剂量效应关系

中图分类号: R 541 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 8182(2020)05 - 0603 - 04

Effect of ATP-sensitive potassium channel opener diazoxide on bupivacaine-induced cardiotoxicity in rats

LI Jun*, HUANG Cui-ying, ZHANG Shu-juan, XI Wen-juan, LI Yong-min, MENG Ling-qun, LIU Hai, GUO Ping-xuan

* Department of Anesthesiology, Kailuan General Hospital, North China University of Science and Technology,

Tangshan, Hebei 063000, China

Corresponding author: HUANG Cui-ying, E-mail: 345952268@qq.com

Abstract: Objective In order to evaluate the effect of diazoxide on myocardial inhibition of bupivacaine, observe the direct toxic effect of bupivacaine on myocardial cells, and whether the use of diazoxide can reduce or eliminate this toxic effect. **Methods** Fifty adult SD rats were selected and subjected to aortic retrograde perfusion enzymolysis for acute cardiomyocyte isolation. After the cells were successfully isolated, the cardiomyocytes with rod-shaped, clear stripes and regular edges were selected and divided into two groups by random number table method: bupivacaine group (Bup group) and diazoxide + bupivacaine group (Bup + D group). Both group were divided into 5 subgroups according to different bupivacaine concentrations (20.0, 30.0, 45.0, 67.5, and 101.5 $\mu\text{mol/L}$), respectively. Whether the cells stopped spontaneous beating before and after perfusion with different concentrations of bupivacaine, and whether the cells resumed spontaneous beating after changing the calcium Tyrode's solution again were recorded. **Results** Except for 20.0 $\mu\text{mol/L}$, after perfusion with diazoxide and bupivacaine at different concentrations, the rate of myocardial cell failure in each group was significantly lower than that given with bupivacaine perfusion alone ($P < 0.05$). The EC_{50} and 95% *CI* diazoxide + bupivacaine - induced myocardial cell failure in rats was 64.6 (47.4 - 84.3) $\mu\text{mol/L}$, which was significantly higher than that induced by bupivacaine alone [44.9 (33.9 - 55.4) $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$]. After the failed cells stopped perfusion of bupivacaine and diazoxide, the cells could return to normal contraction. **Conclusions** The cardiotoxicity of bupivacaine is

related to its inhibition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel (mitoKATP), opening ATP-sensitive K channels can significantly improve the ability of rat myocardium to tolerate myocardial toxicity of bupivacaine.

Key words: ATP-sensitive potassium channel; Diazoxide; Bupivacaine, Anesthetics, Local; Drug toxicity; Dose-response relationship

由于局部麻醉药通过阻断神经细胞快钠离子通道,抑制动作电位的产生而发挥麻醉作用,所以过去的研究认为局部麻醉药所产生的心脏毒性也源于其对心脏钠离子通道的阻断。近期研究发现,布比卡因等不但可以阻断钠离子通道,同时能够阻断钾离子通道,尤其心肌细胞 K_{ATP} 敏感性钾离子通道而影响心肌细胞兴奋、传导或收缩功能。 K_{ATP} 敏感性钾离子通道分为膜 K_{ATP} 通道和线粒体 K_{ATP} 通道两种,分别表达在细胞膜与线粒体膜上。前者主要生理功能可能包括调节糖稳态和细胞电活动,而后者在心肌缺血缺氧过程中可能发挥着重要的作用,在急性心肌损伤时起到心肌保护作用。Yu 等^[1]报道线粒体 K_{ATP} 通道增强是心肌缺血保护的主要机制。为考察线粒体 K_{ATP} 通道对布比卡因心肌毒性的保护作用,本研究采用可视化动缘探测系统观察检测 ATP 敏感性钾通道激动剂二氮嗪 (diazoxide, D) 对布比卡因抑制心肌收缩的作用。

1 材料与方法

1.1 主要药品、试剂及仪器 盐酸布比卡因注射液(批号:H31022839,上海禾丰公司),盐酸异丙肾上腺素注射液(批号:H31021344,上海禾丰公司),牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, Sigma 公司,美国),II 型胶原酶(Collagenase Type 2, Sigma 公司,美国),可视化动缘探测系统(IonOptix 公司,美国),倒置显微镜(NIKON 公司,日本)。

1.2 溶液配制 有钙台氏液(Tyrode's 缓冲液): NaCl 135.0 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, MgCl₂ 1.0 mmol/L, HEPES 5.0 mmol/L, NaH₂PO₄ 0.33 mmol/L, Glucose 5.0 mmol/L, 用 NaOH 调整 pH 值至 7.36~7.40, 4℃ 保存备用。无钙台氏液: NaCl 135.0 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, MgCl₂ 1.0 mmol/L, HEPES 5.0 mmol/L, NaH₂PO₄ 0.33 mmol/L, Glucose 5.0 mmol/L, 用 NaOH 调整 pH 值至 7.36~7.40, 4℃ 保存备用。KB 液: KCl 40 mmol/L, KOH 80 mmol/L, KH₂PO₄ 25 mmol/L, Glutamic acid 50 mmol/L, Taurine 20 mmol/L, Glucose 10 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, MgSO₄ 3 mmol/L, 用 KOH 调整 pH 值至 7.36~7.40。并以 0.22 μm 滤膜过滤、分装, 4℃ 保存备用。酶液: II 型胶原酶

0.024 g, 牛血清白蛋白 0.02 g, 牛磺酸 0.02 g, 溶解到 40 ml 无钙台氏液中, 滴加 13.6 μl 100 mM CaCl₂, 充 100% O₂ 30 min, 使用前 30 min 配制。

1.3 心肌细胞的急性分离 选择成年 SD 大鼠 50 只, 体重 280~350 g, 肝素抗凝(腹腔注射, 1 000 U/kg) 30 min 后, 用 25% 乌拉坦(腹腔注射, 0.4 ml/100 g) 麻醉成功后, 快速开胸, 在距离主动脉根部约 3 mm 处离断取出心脏置于冷无钙台氏液(预先置于 4℃ 冰箱)中, 快速行主动脉插管, 连接于 Langendorff 灌注装置上, 进行恒温恒压逆行灌注。灌注液保持 37℃, 速度为 6 ml/min, 先用无钙台氏液灌注 2~5 min, 冲净其内部血液。心脏停止跳动后, 再以同样的灌注速度用酶液反复循环灌注 16~25 min, 待灌注压与酶消化前相等或略降低时, 停止灌注。摘下心脏, 用约 20 ml 无钙台氏液冲洗, 去除心脏中残留的胶原酶, 终止消化。消化完毕后将心脏投入 KB 液中, 剪取左心室, 于 KB 液中拉扯吹打。静置 10 min 后, 更换 KB 液以充分清除 KB 液中所含 II 型胶原酶, 于室温下静置 1 h 待用。选择细胞膜光滑、横纹清晰、贴壁较好、稳定无收缩的细胞用于实验。细胞在 8 h 内使用, 以保证实验数据稳定、重复性好。

1.4 心肌细胞收缩检测 通过主动脉逆行灌注酶解法行急性心肌细胞分离, 待细胞分离成功后, 每只大鼠分别选取杆状、条纹清晰、边缘整齐的心肌细胞, 采用随机数字表法分为两组: 布比卡因组(Bup 组)和二氮嗪+布比卡因组(Bup+D 组); 各组中按布比卡因浓度不同又分为 5 个亚组, 分别为 Bup1、Bup2、Bup3、Bup4、Bup5 组和 Bup+D1、Bup+D2、Bup+D3、Bup+D4、Bup+D5 组, 对应布比卡因浓度分别为 20.0、30.0、45.0、67.5、101.5 μmol/L。每组观察 5 只 SD 大鼠, 共观察 50 只 SD 大鼠的样本。

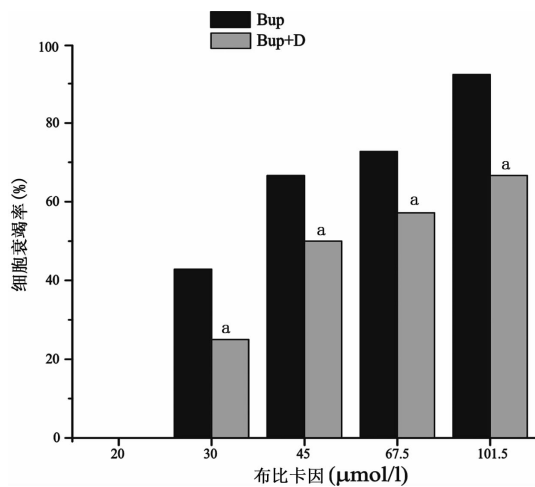
取细胞悬液 1 滴, 滴入倒置显微镜载物台上的细胞灌注小槽内, 通过电刺激观察, 并通过信号采集系统准确记录心肌细胞收缩幅度。首先以有钙台式液恒速灌注, 待细胞收缩稳定后, 分别使用含不同浓度的布比卡因, 100 μmol/L 二氮嗪+上述浓度的布比卡因以相同的灌注速度取代有钙台式液灌注, 并记录开始时间, 持续灌注至细胞收缩稳定, 再次更换为有钙台式液灌注至细胞收缩稳定。停止并记录给予二氮嗪和不同浓度布比卡因灌注前后细胞有无停止自

发性搏动和再次换为有钙台氏液灌流后细胞有无恢复自发性搏动。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。采用 Probit 法计算布比卡因致大鼠心肌细胞衰竭的半数最大效应浓度 (concentration for 50% of maximal effect, EC_{50}) 及其 95% CI 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

二氮嗪可缓解布比卡因对心肌细胞的抑制作用,降低布比卡因的心肌毒性。除 20 $\mu\text{mol/L}$ 外,给予二氮嗪和不同浓度布比卡因灌流后,各组心肌细胞衰竭率显著低于给予单纯布比卡因灌流 ($P < 0.05$)。见图 1。二氮嗪 + 布比卡因所致大鼠心肌细胞衰竭的 EC_{50} 及其 95% CI 为 64.6 (47.4 ~ 84.3) $\mu\text{mol/L}$, 单纯布比卡因所致 EC_{50} 及其 95% CI 为 44.9 (33.9 ~ 55.4) $\mu\text{mol/L}$, 二氮嗪 + 布比卡因组明显高于单纯布比卡因组 ($P < 0.05$)。衰竭的细胞停止灌流布比卡因和二氮嗪后,细胞均可恢复正常收缩状态。



注:与同剂量 Bup 组比较, ^a $P < 0.05$ 。

图 1 Bup 组与 Bup + D 组不同布比卡因浓度下心肌细胞衰竭率比较

3 讨论

本研究显示布比卡因对心肌细胞收缩具有显著的可逆性抑制作用,而运用线粒体三磷酸腺苷敏感性钾通道开放剂二氮嗪可明显提高布比卡因的致大鼠心肌细胞衰竭的 EC_{50} ,降低布比卡因的心肌毒性。

局部麻醉药中毒是临床麻醉较常见且严重的并发症,其发生机制及预防处理等一直是麻醉领域关注的焦点。Lee 等^[2]曾报道布比卡因可延长房室传导

时间、减慢心率、降低左心室压,而运用 ATP 敏感性钾离子通道激动剂能有效改善上述情况,从而降低布比卡因的心肌毒性。在本实验中,二氮嗪明显提高了布比卡因的致大鼠心肌细胞衰竭的 EC_{50} ,提示线粒体 ATP 敏感性钾通道开放剂对缓解布比卡因的直接心肌抑制作用有一定帮助,且通过抑制 ATP 敏感性钾通道电流很可能是酯类麻醉药布比卡因所引起心肌毒性引起心跳骤停的重要分子机制之一。

ATP 敏感性钾通道是受细胞内 ATP 浓度等多因素调节的钾通道,可以分为细胞膜 ATP 敏感性钾通道和线粒体 K_{ATP} 。研究发现线粒体 K_{ATP} 开放剂可通过开放线粒体 K_{ATP} 通道,抑制线粒体内钙内流^[3],减轻基质肿胀,保护线粒体膜完整性,增加 ATP 的生成,发挥心肌细胞的保护作用^[4]。二氮嗪作为一种线粒体 K_{ATP} 特异性开放剂,具有抗心肌损伤的心脏保护作用^[5-6]。本实验中,100 $\mu\text{mol/L}$ 二氮嗪能够有效提高布比卡因的致大鼠心肌细胞衰竭的 EC_{50} ,提示二氮嗪可试验性的用于治疗局麻药不慎入血或过量所引起的心脏毒性作用。

二氮嗪不仅能够高选择性开放线粒体 K_{ATP} 通道,而且能够通过激活过氧化物酶 PGC-1 受体 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1-1 α) 产生心肌保护作用^[7]。研究表明,二氮嗪还可对细胞内一些酶活性有影响,如抑制琥珀酸脱氢酶减少核苷的降解^[8],降低氧化酶活性减少琥珀酸盐的氧化等^[9],进而直接或间接的影响二氮嗪的心肌保护效应。本实验并没有直接观察到二氮嗪开放心肌细胞线粒体 K_{ATP} 通道的资料,尚不能直接确定其增强心肌收缩功能的机制,但是本研究中数据显示二氮嗪能够有效提高布比卡因的致大鼠心肌细胞衰竭的 EC_{50} ,至少说明二氮嗪具有明确的心肌保护作用。

二氮嗪通过开放线粒体 K_{ATP} 通道,松弛血管平滑肌,降低血管阻力,临床上适用于高血压危象的急救^[10-11];也可通过抑制胰腺 β 细胞分泌胰岛素^[12-13],作为一种升血糖药用于幼儿特发性低血糖症。所以临床上应用二氮嗪救治局麻药中毒并不需要进行二氮嗪药效、药理、毒理等规定项目的研究,也避免了经过临床实验等漫长过程。

综上所述,二氮嗪可以提高布比卡因的致心肌细胞衰竭的 EC_{50} 。提示布比卡因对心肌的毒性作用可能与布比卡因抑制线粒体 ATP 敏感性钾通道电流有关。

(下转第 610 页)

- 宽度性别差异的研究[J]. 心肺血管病杂志, 2017, 36(8): 642-644.
- [11] Balbaloglu O, Korkmaz M, Yolcu S, et al. Evaluation of mean platelet volume (MPV) levels in patients with synovitis associated with knee osteoarthritis[J]. Platelets, 2014, 25(2): 81-85.
- [12] Ay S, Eryilmaz MA, Aksoy N, et al. Is early detection of colon cancer possible with red blood cell distribution width? [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(2): 753-756.
- [13] Baicus C, Caraiola S, Rimbas M, et al. Utility of routine hematological and inflammation parameters for the diagnosis of cancer in involuntary weight loss[J]. J Investig Med, 2011, 59(6): 951-955.
- [14] Föhréc Z, Gombos T, Borgulya G, et al. Red cell distribution width in heart failure: prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state[J]. Am Heart J, 2009, 158(4): 659-666.
- [15] Hunziker S, Celi LA, Lee J, et al. Red cell distribution width improves the simplified acute physiology score for risk prediction in unselected critically ill patients[J]. Crit Care, 2012, 16(3): R89.
- [16] Lippi G, Targher G, Montagnana M, et al. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients[J]. Arch Pathol Lab Med, 2009, 133(4): 628-632.
- [17] Sulzbacher I, Birner P, Träxler M, et al. Expression of platelet-derived growth factor-alpha alpha receptor is associated with tumor progression in clear cell renal cell carcinoma[J]. Am J Clin Pathol, 2003, 120(1): 107-112.
- [18] Mizutani Y, Wada H, Yoshida O, et al. The significance of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor activity in renal cell carcinoma[J]. Cancer, 2003, 98(4): 730-736.
- [19] Xu L, Tong R, Cochran DM, et al. Blocking platelet-derived growth factor-D/platelet-derived growth factor receptor beta signaling inhibits human renal cell carcinoma progression in an orthotopic mouse model[J]. Cancer Res, 2005, 65(13): 5711-5719.
- [20] Sharma D, Brummel-Ziedins KE, Bouchard BA, et al. Platelets in tumor progression: a host factor that offers multiple potential targets in the treatment of cancer[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(8): 1005-1015.
- [21] Tesfamariam B. Involvement of platelets in tumor cell metastasis[J]. Pharmacol Ther, 2016, 157: 112-119.
- [22] 任丽, 柳雅慧, 夏文超, 等. 乳腺癌细胞缺氧微环境中癌胚抗原的表达及其对预后的判断意义[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(9): 710-714.

收稿日期: 2019-10-30 修回日期: 2019-11-29 编辑: 石嘉莹

(上接第 605 页)

参考文献

- [1] Yu T, Fu XY, Liu XK, et al. Protective effects of pinacidil hyperpolarizing cardioplegia on myocardial ischemia reperfusion injury by mitochondrial K_{ATP} channels[J]. Chin Med J, 2011, 124(24): 4205-4210.
- [2] Lee SH, Kang D, Ok SH, et al. Linoleic acid attenuates the toxic dose of bupivacaine-mediated reduction of vasodilation evoked by the activation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7): E1876.
- [3] Akopova OV. The influence of ATP-dependent K^+ -channel diazoxide opener on the opening of mitochondrial permeability transition pore in rat liver mitochondria[J]. Ukr Biokhim Zh, 2011, 83(3): 37-47.
- [4] Brennan JP, Southworth R, Medina RA, et al. Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation[J]. Cardiovasc Res, 2006, 72(2): 313-321.
- [5] Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, et al. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels. Possible mechanism of cardioprotection [J]. Circ Res, 1997, 81(6): 1072-1082.
- [6] Liu Y, Sato T, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? [J]. Circulation, 1998, 97(24): 2463-2469.
- [7] Han JS, Wang HS, Yan DM, et al. Myocardial ischaemic and diazoxide preconditioning both increase PGC-1alpha and reduce mitochondrial damage[J]. Acta Cardiol, 2010, 65(6): 639-644.
- [8] Dzeja PP, Bast P, Ozcan C, et al. Targeting nucleotide-requiring enzymes: implications for diazoxide-induced cardioprotection[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284(4): H1048-H1056.
- [9] Hanley PJ, Mickel M, Löffler M, et al. K^+ (ATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart [J]. J Physiol (Lond), 2002, 542(Pt 3): 735-741.
- [10] Timlin MR, Black AB, Delaney HM, et al. Development of pulmonary hypertension during treatment with diazoxide: a case series and literature review[J]. Pediatr Cardiol, 2017, 38(6): 1247-1250.
- [11] Guzmán DC, Herrera MO, Brizuela NO, et al. Trace elements cause oxidative damage in the brain of rats with induced hypotension[J]. Auton Neurosci, 2017, 208: 113-116.
- [12] Komatsu Y, Nakamura A, Takihata M, et al. Safety and tolerability of diazoxide in Japanese patients with hyperinsulinemic hypoglycemia [J]. Endocr J, 2016, 63(3): 311-314.
- [13] Herrera A, Vajravelu ME, Givler S, et al. Prevalence of adverse events in children with congenital hyperinsulinism treated with diazoxide[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2018, 103(12): 4365-4372.

收稿日期: 2019-09-03 修回日期: 2019-10-20 编辑: 王娜娜