

脂联素对体外循环心肌胰岛素抵抗模型犬心肌腺苷酸活化蛋白激酶表达的影响[△]

张登沈*, 梁贵友#, 刘达兴, 王 峰, 潘斯斯, 张长江(遵义医学院附属医院心血管外科, 贵州 遵义 563000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)07-0878-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.07.04

摘要 目的:探讨脂联素(APN)对体外循环(CPB)心肌胰岛素抵抗(IR)模型犬心肌腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)表达的影响。方法:将24只犬随机分为对照组、模型组、APN组(36 μg/kg)、AMPK抑制剂组(APN 36 μg/kg+AMPK抑制剂复合制剂C 0.5 mg/kg),每组6只。所有犬行CPB术,除对照组不给药外,其余各组犬建立CPB心肌IR模型,并于主动脉夹闭后灌注不含药或含相应药物的St.Thomas心脏停搏液。分别在CPB转流前和心缺血60 min后再灌注15、90 min收集冠状静脉窦血、颈动脉血,取左心室心尖部组织,测定并计算心肌葡萄糖摄取率和胰岛素抵抗指数(IRI),监测心肌损伤指标[肌钙蛋白T(cTnT)浓度]和心功能指标[左室收缩压(LVSP)、左室内压最大上升速率(+dp/dt_{max})]变化,检测磷酸化AMPK(p-AMPK)水平。结果:转流前各组犬之间上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,模型组犬再灌注15、90 min的心肌葡萄糖摄取率、LVSP、+dp/dt_{max}和p-AMPK水平均明显降低($P<0.05$),IRI和cTnT浓度均明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,APN组和AMPK抑制剂组犬再灌注15、90 min的心肌葡萄糖摄取率、LVSP、+dp/dt_{max}和p-AMPK水平均明显升高($P<0.05$),IRI和cTnT浓度均明显降低($P<0.05$),且APN组效果强于AMPK抑制剂组($P<0.05$)。结论:APN可促进心肌对葡萄糖的摄取及代谢以助心功能恢复,其可能是通过增强AMPK活性来发挥效应的。

关键词 脂联素;体外循环;心肌胰岛素抵抗;犬;腺苷酸活化蛋白激酶

Effects of Adiponectin on the Expression of Myocardial AMPK in Myocardial Insulin Resistance Model Dogs during Cardiopulmonary Bypass

ZHANG Dengshen, LIANG Guiyou, LIU Daxing, WANG Feng, PAN Sisi, ZHANG Changjiang (Dept. of Cardiovascular Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of adiponectin (APN) on the expression of myocardial AMPK in myocardial insulin resistance (IR) model dogs during cardiopulmonary bypass (CPB). METHODS: Totally 24 dogs were randomly divided into control group, model group, APN group (36 μg/kg), AMPK inhibition group (APN 36 μg/kg+AMPK inhibitor compound C 0.5 mg/kg), with 6 dogs in each group. All dogs underwent CPB; except for control group without medicine, CPB myocardial IR model were established in other groups, and perfused with St.Thomas cardiac cardioplegia lipid no medicine or containing relevant drugs after main artery block. Coronary sinus blood and carotid artery blood samples were collected before bypass and after 15, 90 min reperfusion following 60 min myocardial ischemia. Left ventricular apical tissue was taken, and the uptake rate of myocardial glucose and insulin resistance index (IRI) were determined and calculated; the changes of myocardial injury indexes (cTnT concentration) and cardiac function indexes (LVSP, +dp/dt_{max}) were monitored. The level of p-AMPK was detected. RESULTS: There was no statistical significance in above indexes of dogs before bypass ($P>0.05$). Compared with control group, the rate of myocardial glucose uptake, the levels of LVSP, +dp/dt_{max} and p-AMPK in model group were decreased significantly after 15, 90 min reperfusion ($P<0.05$), and the concentrations of IRI and cTnT were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the rate of myocardial glucose uptake, LVSP, +dp/dt_{max} and p-AMPK were increased significantly in APN group and AMPK inhibitor group ($P<0.05$), while the concentrations of IRI and cTnT were decreased significantly ($P<0.05$); moreover, the effect of APN group was better than that of AMPK inhibitor group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: APN can promote myocardial glucose uptake and metabolism, and contribute the recovery of cardiac function, the mechanism of which may be associated with increasing the activity of AMPK.

KEYWORDS Adiponectin; Cardiopulmonary bypass; Myocardial insulin resistance; Dog; AMPK

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81560058);贵州省科技合作计划项目(No.黔科合LH字[2015]7507号);贵州省科技计划项目(No.黔科合基础[2018]1194)

* 主治医师,硕士。研究方向:心血管疾病基础与临床。E-mail: 540229523@qq.com

通信作者:教授,博士生导师,博士。研究方向:心肌缺血再灌注损伤。E-mail:guiyou515@163.com

笔者前期研究发现,心肌胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)是体外循环(Cardiopulmonary bypass, CPB, 又名心肺转流术)心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的另一个重要机制^[1-3]。心肌也是胰岛素的靶组织,在CPB缺血再灌注过程中,不仅存在明显的机体IR,同时也存在严重的

心肌IR,因心肌IR的产生导致缺血再灌注心肌代谢紊乱,这可能是心功能障碍的病理生理基础^[4],因此探寻心肌IR的干预靶点可为临床防治MIRI提供新的途径。

脂联素(Adiponectin, APN)是脂肪组织分泌的一种活性多肽因子,具有与胰岛素相似的作用,其结构类似于补体因子C1q,故也被称为30 kDa的脂肪细胞补体相关蛋白。近年来研究发现,APN也可以由脂肪细胞外的其他细胞产生及表达,如心肌、骨骼肌细胞及肝脏^[5-6]。目前大量研究提示,内源性刺激APN生成,或外源性补充APN,均可产生多种生物学效应,如胰岛素增敏、免疫调节、抗炎、抗心肌细胞凋亡等作用,APN有望成为一种具有心肌保护作用的新型药物^[7-9]。APN可增加靶细胞对胰岛素的敏感性,提高细胞对葡萄糖的利用而发挥降血糖的疗效,其发挥上述药效可能是通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)而实现^[10-11]。故本研究建立了犬CPB心肌IR模型^[12],予以心脏停搏液中加入APN,检测了心肌AMPK活性变化,并通过特异性抑制AMPK活性,观察了AMPK活性对心肌胰岛素敏感性、心肌细胞葡萄糖摄取与心脏功能的影响,探讨APN在CPB心肌保护作用中的可能机制。

1 材料

1.1 仪器

WEL1000型人工心肺机(天津江康医用设备有限公司);RY-II型呼吸机(江苏凯泰设备有限公司);MD3000型生物信号系统(北京鼠多宝生物科技有限公司);TXT31型热交换水箱(江苏凯泰医疗设备有限公司);AU2700型及5400型全自动生化分析仪(日本Olympus公司);GC-2010型 γ 型放射免疫计数器(中国中供光电科大创新公司)。

1.2 药品与试剂

人源重组APN(南京金瑞丝生物公司,批号:Q15848,纯度:95%);AMPK抑制剂复合制剂C(美国Selleck公司,批号:S784001,纯度:99.8%);戊巴比妥钠对照品(美国Sigma公司,批号:69020100,纯度:99.3%);兔源苏氨酸(Thr)172位点磷酸化AMPK(p-AMPK)多克隆抗体(一抗,武汉博士德工程有限公司,批号:BM2103);鼠源GTVsion™ III抗鼠/兔通用型试剂盒(二抗,上海基因科技有限公司,批号:GK500705);碘^[125]胰岛素放射免疫分析药盒(北方生物技术研究所,批号:121020)。

1.3 动物

24只实验犬,8~12月龄,♀♂不限,体质量(10.12±1.07) kg,体表面积(0.58±0.06) m²,由遵义医学院动物实验中心提供,使用许可证号为SYXK(黔)2011-003。实验所涉及操作及动物处理符合动物实验伦理审核标准,通过遵义医学院动物伦理委员会允许。

2 方法

2.1 建模

按课题组前期研究方法气管插管机械通气(潮气量12~15 mL/kg,频率12~16次/min),左股静脉切开建立

输液通道,左颈总动脉、静脉插管建立CPB,通过心脏灌注St.Thomas心脏停搏液,阻断主动脉60 min及开放主动脉恢复心脏血流灌注,复制CPB心肌IR模型^[12],术中持续监测平均动脉压(Map)(60~80 mmHg,1 mmHg=133.322 Pa)、肛温、出入量,维持电解质及酸碱平衡,左心室经能量转换器连接MD3000型生物信号系统。

2.2 分组与给药

24只犬通过随机数字法分为对照组、模型组、APN组和AMPK抑制剂组,每组6只。4组犬体质量及体表面积等资料差异均无统计学意义($P>0.05$)。所有犬行CPB术,除对照组不建IR模型和不给药外,其余各组犬复制CPB心肌IR模型,于主动脉阻断时即刻灌注1次St.Thomas停搏液150 mL,模型组犬直接灌注St.Thomas停搏液,APN组的St.Thomas停搏液中按犬体质量加入36 μ g/kg的APN^[12],AMPK抑制剂组的St.Thomas停搏液中按犬体质量加入36 μ g/kg的APN和0.5 mg/kg的复合制剂C^[13-14]。

2.3 标本采集

均于CPB转流前和开放主动脉后15、90 min这3个时间点,取冠状静脉窦血4 mL(“U”型插管采集^[15]),3 000 r/min离心5 min,分离血清,用于检测葡萄糖浓度和胰岛素浓度;上述每个时间点另取颈动脉血2 mL,3 000 r/min离心5 min,分离血清,用于检测葡萄糖浓度;上述每个时间点用空心细针穿刺采集左心室心尖部心肌组织,采集的心肌予以生理盐水冲洗2次,10%甲醛固定,72 h内石蜡固定,4℃保存,用于免疫组化检测p-AMPK水平。

2.4 心肌葡萄糖摄取率的检测

使用全自动生化分析仪,采用氧化酶法检测每个时间点冠状静脉窦血清和动脉血清中葡萄糖浓度,计算心肌葡萄糖摄取率[心肌葡萄糖摄取率(%)=(动脉血葡萄糖浓度-冠状静脉窦血葡萄糖浓度)/动脉血葡萄糖浓度×100%]^[16]。

2.5 胰岛素抵抗指数的检测

按碘^[125]胰岛素放射免疫分析药盒说明书操作,采用放射免疫分析法,使用自动放射免疫计数器检测冠状静脉窦血清中胰岛素浓度,计算胰岛素抵抗指数(Insulin resistance index, IRI), $IRI = FIns / (22.5e - \ln FBG)$,式中FIns为冠状静脉窦血清胰岛素浓度,FBG为冠状静脉窦血清葡萄糖浓度,常数 $e \approx 2.718$ ^[17]。

2.6 心肌损伤指标和心功能指标的监测

使用AU5400全自动生化分析仪采用比色法检测每个时间点的冠状静脉窦血清中肌钙蛋白T(cTnT)浓度,用于评价心肌损伤情况。通过犬左心室接能量转换器连接MD3000型生物信号系统予左室内压波形自动分析,测定每个时间点心脏左室收缩压(LVSP)、左室内压最大上升速率(+dp/dt_{max}),用于监测心功能。

2.7 心肌p-AMPK水平的检测

取心尖部心肌组织,用10%甲醛固定,72 h内常规制作石蜡切片,石蜡切片4℃保存。常规脱蜡:60℃恒温箱烘烤20 min,放入二甲苯I 15 min,二甲苯II 15 min。常规梯度乙醇水化,抗原6 min×2次修复,6%血清封闭60 min;滴加一抗(1:100)50 μL,4℃下保存18 h;滴加二抗50 μL,37℃保存1 h;加入二氨基联苯胺(DAB,1:100)显色,光镜下观察细胞核及胞浆为黄色、黄褐色为阳性显色,在显微镜下控制染色时间和程度;水洗,苏木精染色,再水洗,脱水,透明,封固,37℃烘烤30 min,Leica QWin V3图像系统拍片,应用IPP 6.0图像分析系统分析p-AMPK蛋白的积分光密度(IOD),取平均值作统计,IOD值越高,说明AMPK磷酸化程度越高。

2.8 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计处理采用SPSS 19.0软件进行。采用单因素方差分析不同时间点的数据并比较,方差齐时,采用LSD方法检验;方差不齐时,采用Games-Howell方法检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌葡萄糖摄取率及IRI的变化

转流前各组犬之间心肌葡萄糖摄取率和IRI差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在心脏再灌注后,与对照组比较,其他3组犬心肌葡萄糖摄取率明显降低($P < 0.05$)、IRI明显升高($P < 0.05$),其中再灌注15 min时效果更明显。与模型组比较,APN组犬再灌注15、90 min时的心肌葡萄糖摄取率均明显增加($P < 0.05$),IRI明显降低($P < 0.05$),表明APN可促进心肌葡萄糖摄取,减低心肌IR。与APN组比较,AMPK抑制剂组犬再灌注15、90 min时的心肌葡萄糖摄取率均有降低($P < 0.05$),IRI明显升高($P < 0.05$)。各组犬心肌葡萄糖摄取率和IRI的测定结果见表1。

表1 各组犬心肌葡萄糖摄取率和IRI的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 The rate of myocardial glucose uptake and IRI of dogs in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

指标	组别	转流前	再灌注15 min	再灌注90 min
葡萄糖摄取率, %	对照组	16.21 ± 2.28	17.22 ± 1.89	16.95 ± 1.75
	模型组	17.64 ± 2.31	0.66 ± 0.13*	2.91 ± 0.56*
	APN组	16.80 ± 2.07	4.26 ± 0.95**	7.68 ± 0.64**
	AMPK抑制剂组	16.69 ± 3.02	2.38 ± 0.70**▲	4.35 ± 0.61**▲
IRI	对照组	1.87 ± 0.29	1.91 ± 0.42	2.04 ± 0.39
	模型组	1.89 ± 0.36	16.12 ± 1.54*	10.57 ± 0.15*
	APN组	2.01 ± 0.38	10.25 ± 1.68**	4.32 ± 0.98**
	AMPK抑制剂组	1.92 ± 0.41	13.53 ± 1.02**▲	7.32 ± 1.08**▲

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与APN组比较,▲ $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$; vs. APN group, ▲ $P < 0.05$

3.2 cTnT、LVSP、+dp/dt_{max}的变化

转流前各组犬之间cTnT浓度、LVSP、+dp/dt_{max}差异

均无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,其他3组犬再灌注15、90 min时静脉窦血清中cTnT浓度明显升高($P < 0.05$),LVSP、+dp/dt_{max}明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,APN组犬再灌注15、90 min时静脉窦血清中cTnT明显降低($P < 0.05$),LVSP、+dp/dt_{max}明显升高($P < 0.05$)。与APN组比较,AMPK抑制剂组犬再灌注后静脉窦血清中cTnT浓度明显升高($P < 0.05$),LVSP、+dp/dt_{max}明显降低($P < 0.05$)。各组犬静脉窦血浆中cTnT浓度、LVSP、+dp/dt_{max}的测定结果见表2。

表2 各组犬静脉窦血浆中cTnT浓度和LVSP、+dp/dt_{max}的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Plasma concentration of cTnT, the levels of LVSP and +dp/dt_{max} in sinus venosus of dogs in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

指标	组别	转流前	再灌注15 min	再灌注90 min
cTnT, nmol/L	对照组	32.25 ± 6.62	40.12 ± 5.64	42.38 ± 5.58
	模型组	36.21 ± 5.67	148.32 ± 10.01*	425.21 ± 52.13*
	APN组	39.32 ± 3.39	107.43 ± 9.54**	201.48 ± 29.64**
	AMPK抑制剂组	35.47 ± 4.59	121.35 ± 13.62**▲	292.36 ± 32.45**▲
LVSP, mmHg	对照组	145.22 ± 12.31	139.24 ± 9.52	139.67 ± 12.33
	模型组	140.25 ± 10.39	56.37 ± 6.54*	68.32 ± 7.06*
	APN组	138.65 ± 8.63	92.61 ± 10.24**	116.29 ± 12.37**
	AMPK抑制剂组	139.52 ± 11.27	71.24 ± 8.65**▲	85.36 ± 10.38**▲
+dp/dt _{max} , mmHg	对照组	3.32 ± 0.51	3.57 ± 0.60	3.21 ± 0.57
	模型组	3.49 ± 0.50	1.02 ± 0.15*	1.21 ± 0.19*
	APN组	3.29 ± 0.59	2.24 ± 0.28**	2.67 ± 0.31**
	AMPK抑制剂组	3.35 ± 0.46	1.56 ± 0.21**▲	1.75 ± 0.22**▲

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$;与APN组比较,▲ $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$; vs. APN group, ▲ $P < 0.05$

3.3 心肌p-AMPK蛋白表达水平变化

转流前各组犬之间p-AMPK蛋白表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组比较,其他3组犬再灌注15、90 min时心肌p-AMPK蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,APN组犬再灌注15、90 min时心肌p-AMPK蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$)。与APN组比较,AMPK抑制剂组犬再灌注15、90 min时心肌p-AMPK蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。各组犬心肌p-AMPK蛋白表达水平的测定结果见表3。

4 讨论

IR是细胞、组织与机体的一种病理状态,因其靶组织对胰岛素介导作用的抵抗而成为多种疾病(如高血压、糖尿病、冠心病及肥胖等)发病的共同基础。在CPB心脏手术过程中,手术创伤、低温低压、异物材料接触等刺激因素可导致应激激素和介质大量释放入血,机体与心肌细胞对胰岛素敏感性降低,伴随机体IR的同时,也存在严重的心肌IR,以心肌代谢障碍为主要表现,心肌对能量底物葡萄糖利用减少,而循环中血浆胰岛素、葡萄糖明显升高,其升高水平与心脏缺血时间呈正相关^[1-4]。

表3 各组犬心肌p-AMPK蛋白表达水平的测定结果
($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Determination of p-AMPK protein expression in myocardium of dogs in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	转流前	再灌注15 min	再灌注90 min
对照组	258.62 ± 18.02	256.37 ± 15.64	254.62 ± 15.58
模型组	260.37 ± 15.67	48.62 ± 10.01*	62.39 ± 12.13*
APN组	249.62 ± 13.39	142.37 ± 19.54**	168.63 ± 18.64**
AMPK抑制剂组	252.74 ± 14.59	112.64 ± 13.62** [▲]	126.38 ± 16.45** [▲]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,** $P < 0.05$;与APN组比较,[▲] $P < 0.05$

Note: vs. control group,* $P < 0.05$; vs. model group,** $P < 0.05$; vs. APN group,[▲] $P < 0.05$

有研究表明,AMPK是一种非常敏感的蛋白激酶,其 α 亚基的Thr172位点的AMPK α 磷酸化是AMPK活化所必备的条件^[18]。AMPK激酶在调节肝脏、骨骼肌、脂肪细胞等胰岛素靶组织的葡萄糖转运蛋白(Glut-4)表达及转位有着重要的作用,AMPK的活化可以增加骨骼肌、肝脏及脂肪细胞膜Glut-4表达水平而促进葡萄糖摄取及转运^[19]。笔者在前期实验中发现,通过增加AMPK表达及磷酸化,可促进心肌葡萄糖转运及摄取,改善心肌IR,减轻MIRI^[20]。已有临床研究表明,APN水平降低与心血管疾病密切相关,冠心病、糖尿病等患者血浆中APN水平明显低于健康人群^[21]。心肌主要通过脂肪酸 β 氧化与葡萄糖有氧代谢两条途径获取能量,而在缺血再灌注早期,促进心肌葡萄糖摄取及氧化可缓解损伤,因为脂肪酸氧化的氧耗明显高于葡萄糖代谢^[22]。心肌损伤后溶酶体破裂溶解细胞膜,心肌酶渗漏至外周血,可作为心肌损害标志物,其中cTnT敏感性及特异性均较高。由本实验结果表明,心脏缺血再灌注后15 min,伴随心肌对葡萄糖摄取的减少,冠状静脉窦cTnT持续升高,因为cTnT半衰期长,累积至再灌注90 min仍未减少,与此相对应,心脏LVSP、+dp/dt_{max}显著下降,提示CPB心肌及心功能损害严重,通过补充APN,AMPK表达及磷酸化增加,心肌葡萄糖摄取率增加,缓解了心肌损伤;而特异性抑制AMPK活性,APN的上述功能也受到了抑制。本实验结果提示,APN可增加AMPK活性,增加CPB心肌胰岛素敏感性,促进心肌对葡萄糖的摄取,减轻MIRI。

参考文献

[1] LIANG GY, WU HS, LI J, et al. Role of insulin receptors in myocardial ischemia-reperfusion injury during cardiopulmonary bypass[J]. *Acta Cardiol*, 2011, 66(3):323-331.

[2] WANG F, LIANG GY, LIU DX, et al. Effect of Si-RNA-silenced HIF-1 α gene on myocardial ischemia-reperfusion-induced insulin resistance[J]. *In J Clin Exp Med*, 2015, 8(9):15514-15520.

[3] 梁贵友, 宋宣统, 蔡庆勇, 等. BQ123对体外循环缺血再灌注心肌胰岛素抵抗干预作用的实验研究[J]. *中国药房*, 2008, 19(28):2179-2181.

[4] LIU B, LIANG GY, XU G, et al. Intervention of rosiglitazone on myocardium Glut-4 mRNA expression during ischemia-reperfusion injury in cardiopulmonary bypass in dogs[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 373(1):279-284.

[5] FANG H, JUDD RL. Adiponectin regulation and function[J]. *Compr Physiol*, 2018, 8(3):1031-1063.

[6] BOURSERAU R, ABOU-SAMRA M, LECOMPTE S, et al. New targets to alleviate skeletal muscle inflammation: role of microRNAs regulated by adiponectin[J]. *Sci Rep*, 2017. DOI:10.1038/srep43437.

[7] XU W, TIAN M, ZHOU Y. The relationship between insulin resistance, adiponectin and C-reactive protein and vascular endothelial injury in diabetic patients with coronary heart disease[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3):2022-2026.

[8] LECOMPTE S, ABOU-SAMRA M, BOURSERAU R, et al. Skeletal muscle secretome in duchenne muscular dystrophy: a pivotal anti-inflammatory role of adiponectin[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(13):2487-2501.

[9] FANTUZZI G. Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases[J]. *Cytokine*, 2013, 64(1):1-10.

[10] SAYEED M, GAUTAM S, VERMA DP, et al. A collagen domain-derived short adiponectin peptide activates AP-PL1 and AMPK signaling pathways and improves glucose and fatty acid metabolisms[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(35):13509-13523.

[11] CHANG E, CHOI JM, PARK SE, et al. Adiponectin deletion impairs insulin signaling in insulin-sensitive but not insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes[J]. *Life Sci*, 2015, 132(1):93-100.

[12] 汪俊, 邵名亮, 曹衢, 等. 脂联素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2010, 38(3):252-258.

[13] LAWRENCE H, VLAD G. AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart[J]. *Circ Res*, 2012, 111(6):800-814.

[14] PAIVA MA. Transitory activation of AMPK at reperfusion protects the ischaemic-reperfused rat myocardium against infarction[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010, 24(1):25-32.

[15] 王峰, 梁贵友, 刘达兴, 等. 盲视插管测定犬冠状静脉窦血流量的方法[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(5):1065.

[16] FERRANNINI E, SANTORO D, BONADONNA R, et al. Metabolic and hemodynamic effects of insulin on human hearts[J]. *Am J Physiol*, 1993, 264(2):E308-E315.

[17] KATZ A, NAMBI SS, MATHER K, et al. Quantitative insulin sensitivity check index: a simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85(7):2402-2410.

[18] FRYER LG, CARLING D. AMP-activated protein kinase and the metabolic syndrome[J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(2):362-366.

[19] MISRA P, CHAKRABARTI R. The role of AMP kinase in diabetes[J]. *Indian J Med Res*, 2007, 125(3):389-398.

[20] 张登沈, 梁贵友, 刘达兴, 等. 阿卡地新对体外循环心肌缺血

大鼠体内米托蒽醌的血药浓度测定及药动学研究^Δ

荀桂洲^{1*}, 傅慧敏², 胡敏¹, 张全¹, 叶静¹, 张绍兰³ (1. 成都医学院药学院, 成都 610500; 2. 成都市妇女儿童中心医院药学部, 成都 610091; 3. 成都医学院基础医学院, 成都 610500)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)07-0882-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.07.05

摘要 目的: 建立测定大鼠体内米托蒽醌血药浓度的方法, 研究米托蒽醌在大鼠体内的药动学。方法: 取SD大鼠6只, 尾静脉注射米托蒽醌5 mg/kg, 分别于给药前和给药后5、10、20、40、60、120、240、480、720 min取尾静脉血0.3 mL, 置于肝素化EP管中, 离心分离血浆, 加入硅胶充分研磨混匀后, 再加入含0.5 mol/L盐酸的甲醇溶液沉淀蛋白, 研磨混匀, 离心取上清液, 氮气吹干后加流动相复溶。采用高效液相色谱法测定米托蒽醌的血药浓度, 色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈, 流动相为20 mmol/L乙酸铵水溶液(用稀盐酸调pH至2.0)-甲醇(65:35, V/V), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为244 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为20 μL, 应用DAS 3.0软件计算药动学参数。结果: 米托蒽醌检测质量浓度的线性范围为200~10 000 μg/L ($r=0.999\ 6, n=6$), 定量下限为200 μg/L, 检测限为150 μg/L; 日内、日间精密度和稳定性试验的RSD均<8.0% (n 分别为5、3、6); 提取回收率为(85.64±3.93)%~(92.31±1.68)% ($n=3$); 准确度试验中的回收率为(93.58±1.42)%~(113.92±2.74)% ($n=6$)。米托蒽醌在大鼠体内的药动学参数AUC_{0-720 min}为(5 247.1±474.6) μg·h/L, $t_{1/2}$ 为(24.88±6.94) h, CL_L为(0.46±0.09) L/(h·kg), V_z 为(11.07±2.64) L/kg。结论: 该方法提取回收率高、重复性好, 适用于米托蒽醌血药浓度的测定和药动学研究。

关键词 米托蒽醌; 血药浓度测定; 药动学; 大鼠

Blood Concentration Determination and Pharmacokinetic Study of Mitoxantrone in Rats

XUN Guizhou¹, FU Huimin², HU Min¹, ZHANG Quan¹, YE Jing¹, ZHANG Shaolan³ (1. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2. Dept. of Pharmacy, Chengdu Women's & Children's Central Hospital, Chengdu 610091, China; 3. School of Basic Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for blood concentration determination of mitoxantrone in rats, and to study the pharmacokinetics of mitoxantrone in rats. METHODS: Totally 6 SD rats were collected and given mitoxantrone 5 mg/kg via tail vein. The blood samples 0.3 mL were collected before medication and 5, 10, 20, 40, 60, 120, 240, 480, 720 min after medication. Blood samples were placed in heparinized EP tube, and the plasma was centrifuged and separated. After adding silica gel, the plasma were ground and mixed well, then added into methanol solution containing 0.5 mol/L hydrochloric acid to precipitate protein. After grinding and mixing, the supernatant was centrifuged and dried with nitrogen and then dissolved with mobile phase. HPLC method was adopted to determine the plasma concentration of mitoxantrone. The determination was performed on ZORBAX SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of 20 mmol/L ammonium acetate (pH adjusted to 2.0 with hydrochloric acid)-methanol (65:35, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 244 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μL. Pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 3.0 software. RESULTS: The linear range of mitoxantrone were 200-10 000 μg/L ($r=0.999\ 6, n=6$). The lower limit of quantitation was 200 μg/L, and the limit of detection was 150 μg/L, respectively. RSDs of intra-day and inter-day precision and stability were all lower than 8.0% ($n=5, 3, 6$, respectively). The extraction recoveries were (85.64±3.93)%-(92.31±1.68)% ($n=3$). The recoveries of accuracy test were (93.58±1.42)%-(113.92±2.74)% ($n=3$). The pharmacokinetic parameters of mitoxantrone were as follows

血再灌注损伤模型犬心肌能量代谢的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(28): 3918-3923.

[21] MIRMIRAN P, HOSSEINI S, HOSSEINPOUR-NAZI S, et al. Legume consumption increase adiponectin concen-

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81603045)

* 学士。研究方向: 药物新剂型与新技术。E-mail: 1561960763@qq.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 中药的免疫安全性。电话: 028-62739562。E-mail: zhes11022@126.com

trations among type 2 diabetic patients: a randomized crossover clinical trial[J]. *Endocrinol Diabetes Nutr*, 2019, 66(1): 49-55.

[22] WICKS SE, VANDANMAGSAR B, HAYNIE KR, et al. Mitochondrial fat oxidation induces adaptive remodeling of muscle metabolism[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(25): E3300-E3309.

(收稿日期: 2018-10-12 修回日期: 2019-01-14)

(编辑: 邹丽娟)