

• 基础研究 •

经胃肠道给予氯化血红素对压力负荷性心衰大鼠
氧化应激状态的影响

司晓云,程友琴,李小鹰,韩丽娜,谭国娟,吴伦宽

【摘要】 目的 探讨经胃肠道给予氯化血红素后体内血红素氧合酶-1(HO-1)-CO-胆红素的反应和对大鼠慢性压力负荷性心力衰竭进程中氧化应激的影响。**方法** 成年雄性SD大鼠63只,随机分为血红素组、心衰组和对照组,每组21只,各组再分为4、8、12周三个小组,每组7只。心衰组、氯化血红素组行腹主动脉缩窄术,对照组行假手术。从术后3周开始血红素组以60 mg/(kg·d)氯化血红素灌胃,对照组和心衰组同时灌以同体积生理盐水。各小组在相应的时间点检测血清HO-1、碳氧血红蛋白(COHb)、丙二醛(MDA)、氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)的含量,检测血清超氧化物歧化酶(SOD)的活性。**结果** (1)氯化血红素组在给药后4、8、12周血清HO-1含量明显高于心衰组,分别是(6.80±0.92) μg/L vs (2.50±0.22) μg/L; (10.70±0.69) μg/L vs (4.50±0.28) μg/L; (13.30±0.99) μg/L vs (6.07±0.71) μg/L ($P<0.01$); COHb含量均明显高于心衰组,分别为(4.34±0.31)% vs (1.68±0.11)%; (6.32±0.44)% vs (2.46±0.20)%; (7.80±0.39)% vs (3.01±0.42)% ($P<0.01$)。 (2)氯化血红素组在给药4、8、12周血清MDA含量均低于心衰组,分别为(8.3±1.3) μmol/L vs (14.2±2.3) μmol/L ($P<0.05$); (9.6±0.5) μmol/L vs (20.2±3.2) μmol/L ($P<0.01$); (11.8±1.1) μmol/L vs (26.1±3.7) μmol/L ($P<0.01$)。 (3)氯化血红素组SOD活性在4、8、12周均高于心衰组,分别是(125±6) kU/L vs (95±10) kU/L ($P<0.01$); (109±9) kU/L vs (67±5) kU/L ($P<0.01$); (72±10) kU/L vs (40±6) kU/L ($P<0.01$)。 (4)氯化血红素组ox-LDL含量在4、8、12周均低于心衰组,分别为(1.14±0.16) μmol/L vs (1.80±0.22) μmol/L; (1.38±0.14) μmol/L vs (2.34±0.25) μmol/L; (1.83±0.16) μmol/L vs (3.17±0.31) μmol/L (均 $P<0.01$)。**结论** 经胃肠道给予氯化血红素可以对体内的HO-1产生诱导作用;HO/CO-胆红素系统的诱导可改善压力负荷性心衰大鼠的体内氧化/抗氧化失衡状态。

【关键词】 心力衰竭;氯化血红素;大鼠**【中图分类号】** R363**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1671-5403(2010)03-04Effect of gastrointestinal administration of hemin on oxidative
stress in rat model of heart failure induced
by pressure-overload

SI Xiaoyun, CHENG Youqin, LI Xiaoying, et al

Department of Cardiology No. 1, Clinical Division at South Building, Chinese PLA
General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of gastrointestinal administration of hemin on oxidative stress in rat model of heart failure induced by pressure-overload. **Methods** Sixty-three adult male Sprague-Dawley rats were divided into control group (group C), heart failure group (HF group) and hemin group (Hm group) randomly, with 21 in each group. Each group was further divided into three subgroups ($n=7$) for the time of 4 weeks, 8 weeks and 12 weeks after heart failure established. The rats in HF and Hm groups were subjected to surgical abdominal aorta constriction, while rats in control group to sham operation. At 3 weeks after surgery, rats in Hm group received daily gastric administration of hemin (60 mg/kg), while rats in HF and control groups received equal volume of normal saline. At each time points, the plasma levels of heme oxygenase-1 (HO-1), carboxyhemoglobin(COHb), malondialdehyde (MDA), oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), and the activity of superoxide dismutase(SOD) were detected. **Results** (1) Compared with HF group, the plasma levels of HO-1 and COHb in Hm group were obviously increased at each time points (HO-1: (6.80±0.92) μg/L vs (2.50±0.22) μg/L; (10.70±0.69) μg/L vs (4.50±0.28) μg/L; and (13.30±0.99) μg/L vs (6.07±0.71) μg/L, $P<0.01$; COHb: (4.34±0.31)% vs (1.68±

作者单位:100853 北京市,解放军总医院南楼心血管科(司晓云、程友琴、李小鹰、韩丽娜),超声科(谭国娟);550004 贵阳市,贵阳医学院(吴伦宽)

通讯作者:程友琴, Tel:010-66876273, E-mail:chengyouqin@yahoo.com.cn

0.11)%;(6.32±0.44)% vs (2.46±0.20)%;and (7.80±0.39)% vs (3.01±0.42)%, $P<0.01$]. (2) Compared with HF group, the MDA levels were obviously decreased in Hm group at each time points [(8.3±1.3) $\mu\text{mol/L}$ vs (14.2±2.3) $\mu\text{mol/L}$, $P<0.05$; (9.6±0.5) $\mu\text{mol/L}$ vs (20.2±3.2) $\mu\text{mol/L}$, $P<0.01$;and (11.8±1.1) $\mu\text{mol/L}$ vs (26.0±3.7) $\mu\text{mol/L}$, $P<0.01$]. (3) SOD activity was higher in Hm group than in HF group at each time points [(125±6) kU/L vs (95±10) kU/L, $P<0.01$; (109±9) kU/L vs (67±5) kU/L, $P<0.01$;and (72±10) kU/L vs (40±6) kU/L, $P<0.01$]. (4) The content of ox-LDL was lower in Hm group than in HF group at each time points [(1.14±0.16) $\mu\text{mol/L}$ vs (1.80±0.22) $\mu\text{mol/L}$, (1.38±0.14) $\mu\text{mol/L}$ vs (2.34±0.25) $\mu\text{mol/L}$, and (1.83±0.16) $\mu\text{mol/L}$ vs (3.17±0.31) $\mu\text{mol/L}$, $P<0.01$]. **Conclusion** Production of HO-1 can be induced by gastrointestinal administration of hemin. The induction of HO-1/CO-bilirubin system may correct the *in vivo* unbalance of oxidation/antioxidation in HF rat induced by pressure-overload.

【Key words】 heart failure; hemin; rats

高血压是引起心力衰竭的常见病因之一。近年研究揭示在心力衰竭的形成过程中,体内氧化/抗氧化失衡是一重要机制。体内血红素氧合酶-1/一氧化碳-胆红素(HO-1/CO-胆红素)系统是近年新发现的内源性抗氧化体系^[1,2]。笔者假设外源性给予HO-1的作用底物氯化血红素(hemin, Hm),通过诱导体内HO-1/CO-胆红素系统,有可能改变体内的氧化应激状态,减缓心力衰竭的发展进程,为临床心力衰竭的预防和治疗提供新的治疗靶点和手段。

1 材料与方法

1.1 药品试剂及主要仪器 Hm 购于和田龙生物科技有限公司、大鼠HO-1试剂盒(武汉中美)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒购于南京建成生物有限公司,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)试剂盒购于尚柏生物医学技术(北京)有限公司。主要仪器有RM6240C多道生理信号采集处理系统、尾动脉压测量仪(成都仪器厂)、ALOKA SSD-5500SV彩色超声诊断仪(日本Aloka公司)。

1.2 实验分组及心衰模型建立 健康雄性5周龄SD大鼠63只,体重(250±30)g[北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号:SCXK(京)2007-0001]随机分为对照组、心衰组、氯化血红素组,每组各21只,心衰组和血红素组参照文献方法加以改进制备压力负荷性心衰模型^[3]。3周后氯化血红素组开始以Hm 60 mg/(kg·d)灌胃,连续给药12周;对照组、心衰组分别同时予以同等体积生理盐水灌胃。各组分别在给药后4、8、12周时取7只进行血液及血流动力学检测并处死。

1.3 超声心动图检测 大鼠用10%水合氯醛腹腔麻醉,仰卧固定于固定架上,左胸前部剃毛,使大鼠成左倾30度体位,采用日本ALOKA SSD-5500SV型超声诊断仪,SI2探头,频率7.5MHz,由二维超声图像引导M形曲线进行测量,心动周期重复3

次,取平均值,记录或计算舒张末室间隔(interventricular septum, IVS)厚度、舒张末左室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness, LVPWT)、左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD)、左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic dimension, LVESD)、左室质量[LVM=1.04×(LVEDD+LVPWT+IVS)³-LVEDD³]、左室射血分数[LVEF(%)=(LVEDD³-LVESD³)/LVEDD³×100%]、左室短轴缩短率[LVFS(%)=(LVEDD-LVESD)/LVEDD×100%]。

1.4 血标本采集 经颈动脉插管取血9ml,迅速注入放在冰水浴中冷却的抗凝管中摇匀,在试管内静止5min,经高速冷冻离心机分离血清,以3000 r/min,离心10min,分离上清,于-20℃保存,待测生化指标。

1.5 血液HO-1及碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, COHb)测定 HO-1测定采用双抗体夹心酶标免疫分析法,按武汉中美科技有限公司试剂盒说明书进行。采用双波长法测定血液COHb:新鲜血加入Na₂S₂O₄,使样品中多组分的血红蛋白转化为Hb和COHb两个组分,在752型分光光度计上,用420nm和432nm两个波长测定吸光度,依比尔定律建立综合方程式,求出全血COHb的含量百分比。

1.6 血清MDA、SOD、ox-LDL测定 SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法,MDA含量测定采用硫代巴比妥酸比色法,均严格按照南京建成生物研究所提供的试剂盒说明书进行,ox-LDL采用双抗体夹心酶标免疫分析法,按尚柏生物医学技术(北京)有限公司试剂盒说明书进行。

1.7 统计学处理 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用SPSS 13.0软件分析,组间差异采用单因素方差分析进行统计学处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后3周超声心动图参数 心衰组、氯化血红

素组大鼠术后3周时(尚未给予氯化血红素)超声心动图证实心脏结构已有改变,但心脏功能尚未受到明显影响(表1)。

表1 术后3周超声心动图参数($\bar{x} \pm s, n=21$)

组别	IVS (mm)	LVPWT (mm)	LVM (mg)	LVEF (%)	LVFS (%)
对照组	1.44±0.11	1.41±0.15	487±137	77±11	41±11
心衰组	1.96±0.14*	1.89±0.19*	836±135*	74±10	38±9
Hm组	1.96±0.18*	1.9±0.31*	769±126*	74±11	38±8

注:Hm:氯化血红素;IVS:舒张末室间隔厚度;LVPWT:舒张末左室后壁厚度;LVM:左室质量;LVEF:左室射血分数;LVFS:左室短轴缩短率。与对照组比较,* $P<0.01$

2.2 血清中 HO-1 含量及 COHb 比值 心衰组 HO-1 含量与对照组相比在 8 周、12 周时明显增高,分别为(4.50±0.29) $\mu\text{g/L}$ vs (1.60±0.64) $\mu\text{g/L}$; (6.07±0.71) $\mu\text{g/L}$ vs (1.92±0.56) $\mu\text{g/L}$ (均 $P<0.01$)。氯化血红素组与心衰组相比 HO-1 含量 4、8、12 周时均明显升高,分别为(6.80±0.92) $\mu\text{g/L}$ vs (2.50±0.22) $\mu\text{g/L}$; (10.70±0.69) $\mu\text{g/L}$ vs (4.50±0.28) $\mu\text{g/L}$; (13.30±0.99) $\mu\text{g/L}$ vs (6.07±0.71) $\mu\text{g/L}$ (均 $P<0.01$;图1)。

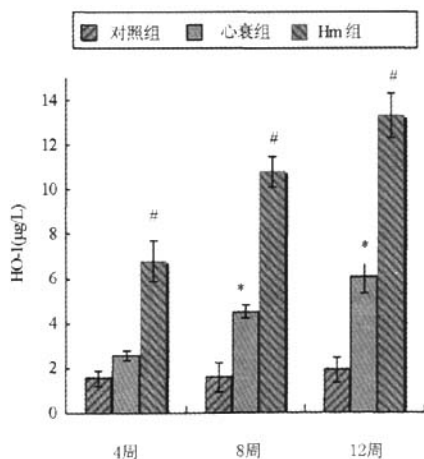


图1 各组大鼠不同时期血清中 HO-1 含量

注:缩写见表1注。与对照组比较,* $P<0.01$;与心衰组比较,* $P<0.01$

心衰组与对照组相比 COHb 比值在 8、12 周时明显升高,分别为(2.46±0.20)% vs (1.57±0.12)%; (3.01±0.42)% vs (1.40±0.18)%($P<0.01$)。氯化血红素组与心衰组相比 4、8、12 周时 COHb 比值明显升高,分别为(4.34±0.31)% vs (1.68±0.11)%; (6.32±0.44)% vs 2.46±0.2)%; (7.80±0.39)% vs (3.01±0.42)%($P<0.01$;图2)。

2.3 血清中 MDA 含量 心衰组 MDA 含量与对照组相比在 4、8、12 周时分别升高 133%、224%、122%

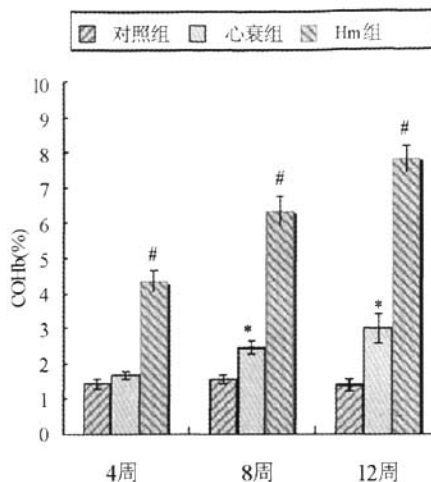


图2 各组大鼠不同时期血清中 COHb 含量

注:COHb:碳氧血红蛋白,其他缩写见表1注。与对照组比较,* $P<0.01$;与心衰组比较,* $P<0.01$

(均 $P<0.01$)。氯化血红素组 MDA 含量与心衰组相比在 4、8、12 周时分别降低 41%($P<0.05$)、52%($P<0.01$)、55%($P<0.01$;表2)。

表2 各组大鼠不同时期血清中 MDA 含量($\mu\text{mol/L}, n=7, \bar{x} \pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周
对照组	6.1±0.7	6.2±0.8	6.5±1.2
心衰组	14.2±2.3*	20.2±3.2*	26.1±3.7*
Hm 组	8.3±1.3 [△]	9.6±0.5*	11.8±1.1* [△]

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与心衰组比较,[△] $P<0.05$,* $P<0.01$

2.4 血清中 SOD 活性 心衰组 SOD 活性与对照组相比 4、8、12 周时分别降低 40%、56%、75%(均 $P<0.01$)。氯化血红素组 SOD 活性与心衰组相比 4、8、12 周时分别升高 31%、62%、81%(均 $P<0.01$;表3)。

表3 各组大鼠不同时期血清中 SOD 活性(kU/L, $n=7, \bar{x} \pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周
对照组	159±8	153±11	155±11
心衰组	95±10*	67±5*	40±6*
Hm 组	125±6*	109±9*	72±10*

注:SOD:超氧化物歧化酶,其他缩写见表1注。与对照组比较,* $P<0.01$;与心衰组比较,* $P<0.01$

2.5 各组大鼠血清中 ox-LDL 含量 心衰组 ox-LDL 含量与对照组相比 4、8、12 周时分别升高 112%、207%、382%(均 $P<0.01$)。氯化血红素组 ox-LDL 含量与心衰组相比 4、8、12 周时分别降低 37%、40%、42%(均 $P<0.01$;表4)。

表 4 各组大鼠不同时期血清中 ox-LDL 含量($\mu\text{mol/L}$, $n=7, \bar{x} \pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周
对照组	0.85 $\pm$ 0.16	0.76 $\pm$ 0.16	0.65 $\pm$ 0.14
心衰组	1.80 $\pm$ 0.22*	2.34 $\pm$ 0.25*	3.17 $\pm$ 0.31*
Hm 组	1.14 $\pm$ 0.16#	1.38 $\pm$ 0.14*	1.83 $\pm$ 0.16#

注:与对照组比较, * $P<0.01$;与心衰组比较, # $P<0.01$

3 讨论

经胃肠道给予 Hm 能对体内 HO/CO-胆红素系统起到诱导作用。本实验观察到在压力负荷性心力衰竭的形成过程中体内 HO/CO-胆红素系统活性较正常情况下增强,经胃肠道给予血红素后,血液中 HO-1、COHb 含量在 4 周、8 周、12 周时均明显增高,说明胃肠道可以成为对 HO/CO-胆红素系统进行外源性干预的有效途径。Hm 作为 HO 的底物和诱导剂,在许多离体和在体的动物实验中已广泛应用,但以往的在体实验均经腹腔注射,本实验选用的 Hm 是从牛血中提取的,在胃肠道吸收率高,目前临床上用于防治缺铁性贫血,被认为是效果好的生物铁源,无铁腥味,不刺激胃,本实验采用灌胃方法,未观察到不良反应,并对体内的 HO/CO-胆红素系统起到了持续有效的诱导作用,这种诱导作用至少可以持续 12 周,为临床上长期应用 Hm 诱导 HO-1/CO-胆红素系统的临床需要提供了实验依据。

大量研究资料表明,心衰发生发展过程中机体内产生严重的氧化应激^[4,5]。MDA 是脂质过氧化的一种终末物,可以反映机体自由基水平。SOD 是体内酶类自由基清除剂,其血清活性高低可以反映机体自由基清除能力。ox-LDL 是 LDL 中不饱和脂肪酸双键在氧自由基作用下形成的过氧化物,也可以反映体内的氧化应激状态。HO/CO-胆红素系统代谢过程中,胆红素、胆绿素、铁离子均是体内重要的抗氧化物质,其中尤以胆红素抗氧化能力最强,其抗氧化能力甚至比谷胱甘肽强一万倍,作为保护细胞免遭氧化胁迫的一条极佳途径,胆红素可能是进化的重要产物^[1]。胆红素分子具有特殊卷曲结构和不对称性,在血浆中与白蛋白结合后,促使胆红素 C-10 上的氢转化为活性氢原子,极易与超氧阴离子等自由基反应,从而具有清除自由基的功能,体外实验证实胆红素能阻止 LDL 被 2,2'-偶氮(2-丙基脒)的双盐酸盐在 37℃ 产生的氧自由基氧化修饰,从而抑制 ox-LDL 的形成;在体内也证实胆红素由于含有延伸的共轭双键系统和活性氢原子,从而能够阻止氧化作用,抵抗 LDL 被氧化,从而抑制 ox-LDL 的形成。此外有研究结果提示,ox-LDL 的氧化修饰并不完全取决于 LDL 胆固醇的含量,而

是主要取决于内源性抗氧化剂胆红素的含量^[6]。本实验中心衰组血浆 MDA 含量随术后时间的延长不断增高,SOD 活性则不断下降,证实了在心衰形成过程中,机体氧化与抗氧化处于失衡状态,自由基清除不足,体内产生了持续的氧化应激,这与 Nain 等^[6]的研究结果一致。与此同时,ox-LDL 含量进行性上升,可在一定程度上反映机体内氧化应激状态。给予 Hm 后,血清 SOD 不同程度升高,MDA、ox-LDL 不同程度地降低,提示 HO/CO-胆红素系统诱导成功,对机体起到了抗氧化的保护作用,在一定程度上改变了体内的氧化应激状态。Turkseven 等^[7]在实验性糖尿病大鼠探讨 HO-1 的抗氧化机制中发现,HO-1 被诱导后内皮细胞 SOD 水平增加,认为 HO-1 抗氧化应激的血管内皮细胞保护作用需要内皮细胞 SOD 的参加。但 SOD 增高的机制尚需进一步探讨。

本实验证实,经胃肠道给予 Hm 可以对体内的 HO-1 产生诱导作用;Hm-HO-1/CO-胆红素系统的诱导可改善压力负荷心衰大鼠的体内氧化/抗氧化失衡状态。

【参考文献】

- [1] Baranano DE, Mahil R, Ferris CD, *et al.* Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (25): 16093-16098.
- [2] Tomaro ML, Batlle AM. Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34(3): 216-220.
- [3] 倪 量,王硕仁. 腹主动脉部分缩窄大鼠模型体外心脏的电生理特点[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(8): 1469-1476.
- [4] Nojiri H, Shimizu T, Funakoshi M, *et al.* Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (44): 33789-33801.
- [5] Tsutsui H, Ide T, Kinugawa S, *et al.* Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9-10): 1737-1744.
- [6] Nain S, Ling B, Bandy B, *et al.* The role of oxidative stress in the development of congestive heart failure in a chicken genotype selected for rapid growth[J]. *Avian Pathol*, 2008, 37(4): 367-373.
- [7] Turkseven S, Kruger A, Mingone CJ, *et al.* Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(2): H701-H707.

(收稿日期:2009-01-19;修回日期:2009-11-23)