

过氧化氢加重铁对心肌的损伤作用及其机制

陈莹莹^{1,2}, 沈岳良¹, 曹春梅¹, 徐万红¹, 钱忠明², 夏强^{1,*}

(¹ 浙江大学医学院生理教研室, 杭州 310006;

² 香港理工大学应用生物与化学技术系, 香港九龙)

摘要: 采用 Langendorff 灌流心脏和酶解分离的心肌细胞为实验模型, 研究铁对心肌的损伤作用, 以及过氧化氢对铁的心肌作用的影响及其可能机制。结果显示: (1) 羟基喹啉铁复合物(Fe-HQ)引起分离心肌细胞舒张期缩短, 心肌细胞的收缩幅度和速度降低, 离体灌流心脏左室发展压(LVDP)、 $\pm dp/dt_{max}$ 、心率、冠脉流量呈现双相变化; 冠脉流出液中乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)释放量和心肌丙二醛(MDA)增高。(2) H₂O₂可加重 Fe-HQ 对心脏的损伤, 冠脉流出液中 LDH、CK 释放量和心肌 MDA 增高, 而 LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 和心率明显降低。(3) 还原型谷胱甘肽可对抗 Fe-HQ + H₂O₂ 对心肌的损伤作用, DMSO 对 Fe-HQ + H₂O₂ 致离体心脏损伤无明显作用。结果提示, 心肌细胞内铁增加可引起心肌功能受损, H₂O₂ 可加重铁对心肌的损伤作用, 其主要机制可能与·OH 无关, 而主要与含巯基的蛋白质受损有关。

关键词: 铁; 心脏; 过氧化氢

学科分类号: Q463

Hydrogen peroxide augments the injury effect of iron on the isolated rat heart and cardiomyocytes

CHEN Ying-Ying^{1,2}, SHEN Yue-Liang¹, CAO Chun-Mei¹,

XU Wan-Hong¹, QIAN Zhong-Ming², XIA Qiang^{1,*}

(¹ Department of Physiology, Zhejiang University School of Medicine, 310006;

² Department of Applied Biology and Chemical Technology, The Hong Kong Polytechnic University, Kowloon, Hong Kong)

Abstract: By using Langendorff perfused rat heart and enzymatically isolated cardiomyocytes, we investigated the augmented injury effect of iron on the myocardium by hydrogen peroxide and the underlying mechanisms. Cell-permeable iron (Fe-HQ) decreased the contractile amplitude, velocity and end-diastolic cell length of the cardiomyocyte but increased the contents of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) in the coronary effluent and the myocardial malondialdehyde (MDA) while the left ventricular developed pressure (LVDP), $\pm dp/dt_{max}$, heart rate and coronary flow showed biphasic alterations. Hydrogen peroxide augmented the injury effect of iron accompanied by increases of coronary LDH, CK release and myocardial MDA content and decreases of LVDP, $\pm dp/dt_{max}$, and heart rate. Reduced glutathione could antagonize the injury effect of iron and hydrogen peroxide on the myocardium while dimethyl sulfoxide had no injury effect on the isolated heart. It is suggested that the functional injury of sulfhydryl group containing proteins may be involved in the augmentation of myocardial injury due to the increase of intracellular iron by hydrogen peroxide, but hydroxyl radicals may not.

Key words: iron; heart; hydrogen peroxide

Received 2000-07-26 Accepted 2001-02-01

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang for the Outstanding Young Scientists (No. RC9803).

* Corresponding author. Tel: 0571-7217146; Fax: 0571-7217147; E-mail: xiaqiang@cmm.zju.edu.cn

铁是人体代谢所必需的微量元素,它不仅在细胞生成中具有重要作用,还通过催化氧化-还原反应参与机体所有组织的能量代谢、解毒等生理过程。然而,铁在心肌缺血-复灌、血色病、 β -地中海贫血和冠脉粥样硬化等状态下的心肌损伤中起重要作用^[1]。流行病学研究表明,人群中普遍存在缺铁。近年来,由于铁剂的应用,缺铁性贫血病人的生命质量有了很大改善。然而高铁膳食、高铁滋补品、临床上长期输血或使用治疗性含铁制剂,均可使心肌细胞铁超载,所引发的心肌疾病威胁着病人的生命。

一般认为,在正常生理条件下,具有生物活性的游离铁在心肌细胞中含量极少,而铁蛋白作为心肌细胞内铁的主要储存形式,可防止铁离子逸出,避免对组织和细胞的损伤。在病理条件下如缺血时,某些还原剂可动员铁蛋白使之释放有活性的 Fe^{2+} ,通过参与催化 Haber-Weiss 反应,产生氧自由基,对心肌产生毒性作用^[2]。动物实验亦发现,高铁饮食可以加重心肌缺血复灌性损伤,减慢心室发展压的恢复,使脂质过氧化水平增加^[3]。Grill 等报道,在复灌时离体灌流兔心中氧自由基从 $1.8 \mu\text{mol}$ 增加到 $13 \mu\text{mol}$ ^[4]。在心脏病理过程中,氧化应激可导致心肌损伤。而 Ytrehus 等在研究心脏缺血复灌损伤中,在复灌期加入低浓度的 H_2O_2 ,这可以促进心脏收缩功能的恢复、缩小心肌梗死面积、促进组织 ATP 和 CPK 的恢复^[5,6]。目前,关于低浓度的 H_2O_2 对铁的心肌损伤作用的影响尚不明了。本文主要研究透膜的脂溶性 Fe^{3+} 复合物对心肌功能的影响,以及外源性低浓度 H_2O_2 对铁的心肌作用的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 心室肌细胞酶解分离 雄性 Sprague-Dawley 大鼠,用木锤击昏后,迅速取出心脏,置于 4°C 的台氏液中洗净血液,然后迅速转移、固定于 Langendorff 灌流装置上,进行恒流灌流(流速 12 ml/min , 37°C)。溶液均以 $95\% O_2 + 5\% CO_2$ 饱和。先以无钙台氏液灌流 5 min ,无钙台氏液成分如下(mmol/L): 100 NaCl , 10 KCl , $1.2 \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 5.0 MgSO_4 , 20.0 葡萄糖 , 10.0 MOPS ($\text{pH } 7.4$)。再以含 I 型胶原酶 0.3 mg/ml 的无钙台氏液灌流 10 min 。然后将心室肌取下、剪碎、吹打,于含 0.1% BSA 的无钙台氏液中孵育 10 min 。逐步复钙, Ca^{2+} 终浓度为 1.25 mmol/L 。

1.2 单个心室肌细胞收缩的测定 将 $50 \sim 100 \mu\text{l}$ 细胞悬液滴于玻璃底灌流槽中,细胞贴壁后,以改

良 Krebs-Henseleit 溶液(K-H 液)按 2 ml/min 持续灌流,溶液以 $95\% O_2 + 5\% CO_2$ 饱和,温度维持于 32°C 。并施加频率为 0.4 Hz 、强度为两倍阈强度的电场刺激。选择横纹清晰、胞膜光整的杆状细胞,用 MedEase 视频跟踪计算机图像分析系统记录并分析心室肌细胞的收缩幅度、 $\pm dL/dt_{\text{max}}$ 和舒张期心肌细胞的长度。

1.3 离体心脏 Langendorff 灌流 雄性 Sprague-Dawley 大鼠,用木锤击昏后,迅速取出心脏,置于 4°C 改良 K-H 液中除去血液;然后迅速转移、固定于 Langendorff 灌流装置,以改良 K-H 液行常规恒压灌流(76 mmHg)。改良 K-H 液成分如下(mmol/L): 118.0 NaCl , 4.7 KCl , $1.2 \text{ K}_2\text{PO}_4$, 1.2 MgSO_4 , 25.0 NaHCO_3 , 1.25 CaCl_2 , 10.0 葡萄糖 , $\text{pH } 7.4$,以 $95\% O_2 + 5\% CO_2$ 饱和,维持灌流液温度于 37°C ^[7]。

1.4 左心室功能评价 切开左心耳,将充满水的乳胶囊从左心房插入左心室,乳胶囊与压力传感器相连,将水注入乳胶囊使左心室舒张末压维持于 $5 \sim 10 \text{ mmHg}$ 。同时将两根心电记录电极分别置于肺动脉圆锥及心尖部引出心电图,通过 PcLab 生物信号采集处理系统记录心电图(ECG)和左室收缩曲线,并计算左室舒张末压(LVEDP)、左室收缩峰压(LVSP)、左室发展压(LVDP)、心率、 $\pm dp/dt_{\text{max}}$ 。

1.5 心肌损伤和脂质过氧化指标的分析 在各时点记录冠脉流量,同时收集冠脉流出液,用全自动生化分析仪分析其中乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)的释放量(美国 Beckman 公司, CX-4 型)。实验结束后取下心脏称重,置于 -20°C 冰箱保存,备测丙二醛(MDA)。测定时取心室肌组织加 $1:10 \text{ Tris-HCl}$ 缓冲液,用组织匀浆机制成匀浆。以硫代巴比妥酸法测定 MDA,蛋白质用考马斯亮蓝法定量。

1.6 实验分组 A 大组为酶解分离心肌细胞组, B 大组为离体灌流心脏组。

A1 组(对照组): 稳定 15 min 后,继续灌流 30 min 。A2 组(Fe-HQ 组): 稳定 15 min 后,用 Fe-HQ ($5 \mu\text{mol/L}$)灌流 10 min ,再用 K-H 液灌流 20 min 。A3 组(H_2O_2 组): 稳定 25 min 后,用 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$)灌流 10 min ,再用 K-H 液灌流 10 min 。A4 组(Fe-HQ + H_2O_2 组): 稳定 15 min 后,用 Fe-HQ ($5 \mu\text{mol/L}$)灌流 10 min ,再用 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$)灌流 10 min ,然后用 K-H 液灌流 10 min 。A5 组(DMSO 组): 稳定 15 min 后,用 Fe-HQ ($5 \mu\text{mol/L}$)灌流 10 min ,再用 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$)与 DMSO (56 mmol/L)合并灌流 10 min ,然后用 K-H 液灌流 10 min 。A6 组(还原型谷胱甘肽组): 稳定 15 min 后,用 Fe-HQ ($5 \mu\text{mol/L}$)灌流 10 min ,再

用 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$) 与还原型谷胱甘肽 (1 mmol/L) 合并灌注 10 min , 然后用 K-H 液灌注 10 min 。

B1 组 (对照组): 稳定 15 min 后, 继续灌注 40 min 。B2 组 (Fe-HQ 组): 稳定 15 min 后, 用 Fe-HQ ($5 \mu\text{mol/L}$) 灌注 10 min , 再用 K-H 液灌注 30 min 。B3 组 (H_2O_2 组): 稳定 25 min 后, 用 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$) 灌注 10 min , 再用 K-H 液灌注 20 min 。B4 组 (Fe-HQ + H_2O_2 组): 稳定 15 min 后, 用 Fe-HQ ($5 \mu\text{mol/L}$) 灌注 10 min , 再用 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$) 灌注 10 min , 然后用 K-H 液灌注 20 min 。B5 组 (DMSO 组): 稳定 15 min 后, 用 Fe-HQ ($5 \mu\text{mol/L}$) 灌注 10 min , 再用 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$) 与 DMSO (56 mmol/L) 合并灌注 10 min , 然后用 K-H 液灌注 20 min 。B6 组 (还原型谷胱甘肽组): 稳定 15 min 后, 用 Fe-HQ ($5 \mu\text{mol/L}$) 灌注 10 min , 再用 H_2O_2 ($50 \mu\text{mol/L}$) 与还原型谷胱甘肽 (10 mmol/L) 合并灌注 10 min , 然后用 K-H 液灌注 20 min 。

1.7 材料 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 ($220 \sim 270 \text{ g}$) 由浙江大学医学院实验动物中心提供。FeCl₃·6H₂O, 上海金山化工厂生产。8-羟基喹啉 (8-hydroxyquino-

line, 8-HQ), Sigma 公司产品, 用二甲基亚砷溶解。30% 过氧化氢, 浙江省临安化工二厂生产。二甲基亚砷 (dimethylsulphoxide, DMSO), 江苏洪声化工厂生产。还原型谷胱甘肽, 上海酵母厂生产。临用前, 将 FeCl₃·6H₂O 与 8-羟基喹啉按 1:2 的比例混合, 形成透膜的脂溶性复合物 Fe-HQ^[8]。

1.8 统计处理 各组数据以 $\text{mean} \pm \text{SE}$ 表示, 采用 Student's *t* 检验和方差分析做统计学分析。

2 结果

2.1 Fe-HQ 对酶解分离心室肌细胞和离体灌注心脏的作用

Fe-HQ 引起心肌细胞舒张期长度缩短、心肌细胞的收缩幅度降低、 $\pm dL/dt_{\text{max}}$ 减小 ($P < 0.01$) (图 1 ~ 4)。Fe-HQ 灌注心脏后, LVEDP 明显增高, 心率、冠脉流量、LVDP、 $\pm dp/dt_{\text{max}}$ 呈现双相变化, 先增加, 随后逐渐降低 (图 5 ~ 8, 表 1、2)。冠脉流出液中 LDH、CK 的量增加, 心肌 MDA 增高 (表 3)。

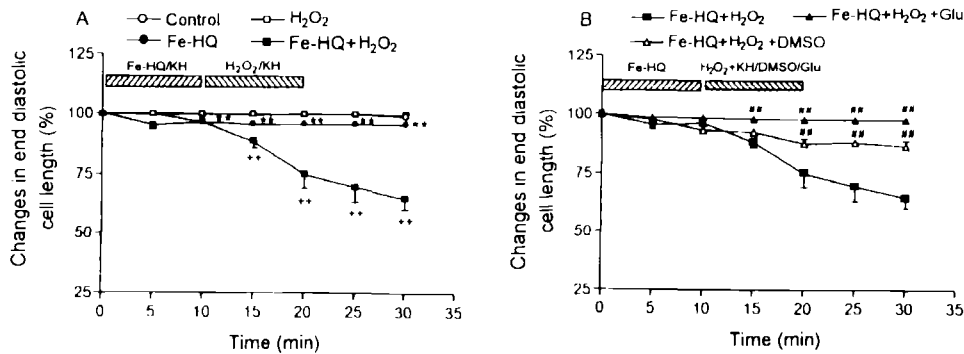


图 1. Fe-HQ、 H_2O_2 、DMSO 和还原型谷胱甘肽对舒张期心室肌细胞长度的影响

Fig. 1. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on the diastolic length of isolated ventricular myocytes. ** $P < 0.01$, compared with control group; + $P < 0.01$, compared with Fe-HQ group; *** $P < 0.01$, compared with Fe-HQ + H_2O_2 group.

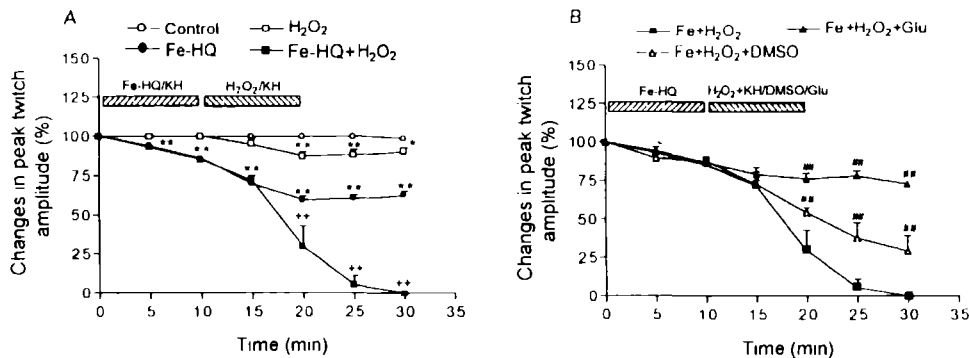


图 2. Fe-HQ、 H_2O_2 、DMSO 和还原型谷胱甘肽对心室肌细胞收缩幅度的影响

Fig. 2. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on the peak twitch amplitude in isolated ventricular myocytes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group; + $P < 0.01$, compared with Fe-HQ group; *** $P < 0.01$, compared with Fe-HQ + H_2O_2 group.

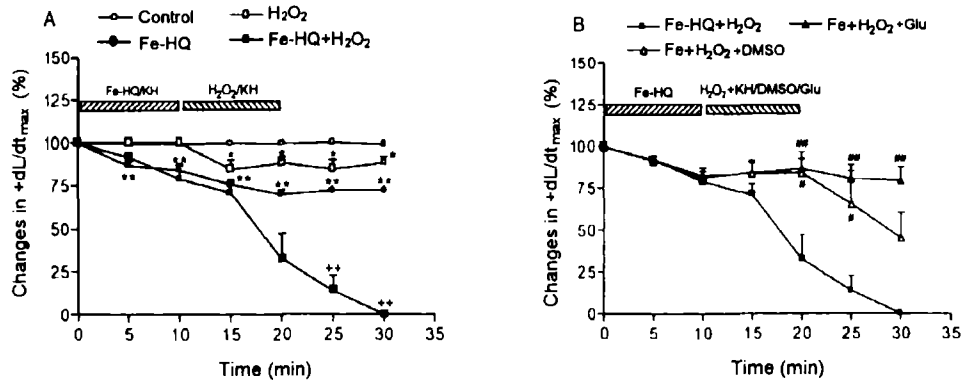


图 3. Fe-HQ、H₂O₂、DMSO 和还原型谷胱甘肽对心室肌细胞 +dL/dt_{max} 的影响
 Fig. 3. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on the maximal velocity of shortening (+dL/dt_{max}) in isolated ventricular myocytes. *P < 0.05, **P < 0.01, compared with control group; **P < 0.01, compared with Fe-HQ group; #P < 0.05, ##P < 0.01, compared with Fe-HQ + H₂O₂ group.

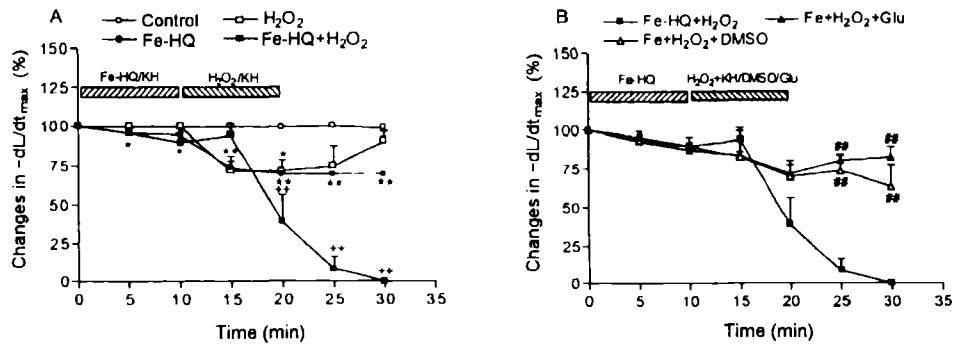


图 4. Fe-HQ、H₂O₂、DMSO 和还原型谷胱甘肽对心室肌细胞 -dL/dt_{max} 的影响
 Fig. 4. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on the maximal velocities of relaxation (-dL/dt_{max}) of isolated ventricular myocytes. **P < 0.01, compared with control group; **P < 0.01, compared with Fe-HQ group; ##P < 0.01, compared with Fe-HQ + H₂O₂ group.

表 1. Fe-HQ、H₂O₂、DMSO 和还原型谷胱甘肽对离体灌流心脏 LVEDP(mmHg) 的影响

Table 1. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) (mmHg) of isolated perfused rat hearts

	0 min	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min
Control	8.71 ± 0.41	8.54 ± 0.39	8.58 ± 0.38	8.47 ± 0.36	8.42 ± 0.40	8.34 ± 0.39	8.37 ± 0.41	8.34 ± 0.42
Fe-HQ (5.0 μmol/L)	8.47 ± 0.50	9.34 ± 0.73	12.81 ± 0.70**	16.04 ± 1.50**	16.07 ± 1.62**	14.34 ± 1.45**	13.95 ± 1.30**	14.20 ± 1.22
H ₂ O ₂ (50 μmol/L)	8.03 ± 0.23	8.42 ± 0.32	8.05 ± 0.50	8.05 ± 0.50	13.57 ± 0.40**	12.48 ± 0.67**	8.18 ± 0.42	8.53 ± 0.39
Fe-HQ + H ₂ O ₂	7.97 ± 0.45	10.40 ± 1.91	13.68 ± 0.95	15.13 ± 0.88	17.7 ± 2.47	19.21 ± 1.45	18.48 ± 1.06 ⁺	17.83 ± 1.21 ⁺
Fe-HQ + H ₂ O ₂ + DMSO	7.89 ± 0.43	8.50 ± 0.75	12.02 ± 2.05	14.31 ± 1.92	19.01 ± 0.97	18.78 ± 2.38	18.06 ± 2.90	18.14 ± 2.83
Fe-HQ + H ₂ O ₂ + Glu	8.52 ± 0.16	10.06 ± 1.15	11.71 ± 0.69	13.16 ± 0.44	19.00 ± 0.79	19.21 ± 0.65	19.08 ± 0.86	18.21 ± 1.27

**P < 0.01, compared with control group; ⁺P < 0.05, compared with Fe-HQ group.

2.2 H₂O₂ 对酶解分离心室肌细胞和离体灌流心脏的作用

H₂O₂ 使酶解分离的心肌细胞收缩幅度降低、 $\pm dL/dt_{max}$ 减小(图 1~4)。H₂O₂ 灌流心脏后, LVEDP、LVDP、HR × LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 和冠脉流量增高(图 5~8, 表 1、2)。H₂O₂ 对心率和冠脉流出液中 LDH、CK 释放量和 MDA 无明显影响(表 3)。

2.3 H₂O₂ 对铁的肝脏毒性作用的影响

在酶解分离细胞中, H₂O₂ + Fe-HQ 组与单纯 Fe-HQ 组相比, 心肌细胞舒张期长度缩短、心肌细胞的收缩幅度降低、 $\pm dL/dt_{max}$ 减小(图 1~4)。Fe-HQ 灌流 10 min 后, 再用 H₂O₂ 灌流心脏, 与单纯 Fe-HQ 组

相比, 可见 LVEDP 明显增高(表 1), 而冠脉流量、LVDP、HR × LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 和心率明显降低($P < 0.01$) (图 5~8, 表 2)。冠脉流出液中 LDH、CK 释放量增高($P < 0.01$), 心肌的 MDA 增加($P < 0.01$) (表 3)

2.4 DMSO 对 H₂O₂ 加重铁的肝脏毒性作用的影响

DMSO 组与 Fe-HQ + H₂O₂ 组相比, 心室肌细胞舒张期长度增加、心肌细胞的收缩幅度、 $\pm dL/dt_{max}$ 增高(图 1~4)。在离体灌流心脏, Fe-HQ (5 mmol/L) 灌流 10 min 后, 再用 H₂O₂ (50 mmol/L) 和 DMSO 同时灌流心脏, 与 Fe-HQ + H₂O₂ 组相比较, 除心肌 MDA 降低外(表 3), 各指标无明显差异。

表 2. Fe-HQ、H₂O₂、DMSO 和还原型谷胱甘肽对离体灌流心脏冠脉流量(ml/min)的影响

Table 2. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on coronary flow (ml/min) of isolated perfused rat hearts

	0 min	1 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min
Control	9.6 ± 0.15	9.0 ± 0.33	8.81 ± 0.23	8.83 ± 0.25	8.45 ± 0.23	7.99 ± 0.30	7.95 ± 0.48	7.68 ± 0.35
Fe-HQ (5.0 μmol/L)	9.06 ± 0.39	11.05 ± 0.54**	7.86 ± 0.25*	5.93 ± 0.18**	6.69 ± 0.21**	6.44 ± 0.19**	6.54 ± 0.24*	6.50 ± 0.25*
H ₂ O ₂ (50 μmol/L)	8.49 ± 0.45	8.12 ± 0.88	8.40 ± 0.32	8.45 ± 0.41	9.48 ± 0.52*	9.18 ± 0.56*	7.74 ± 0.29	7.28 ± 0.35
Fe-HQ + H ₂ O ₂	9.10 ± 0.37	10.20 ± 0.52	5.05 ± 0.48	2.60 ± 0.29	3.55 ± 0.27*	3.3 ± 0.27**	3.00 ± 0.20**	2.95 ± 0.18**
Fe-HQ + H ₂ O ₂ + DMSO	8.90 ± 0.39	9.50 ± 0.42	5.95 ± 0.34	3.85 ± 0.53	3.30 ± 0.42	2.88 ± 0.16	2.73 ± 0.37	2.63 ± 0.31
Fe-HQ + H ₂ O ₂ + Glu	8.60 ± 0.69	10.18 ± 0.65	6.40 ± 0.47	4.05 ± 0.33	6.39 ± 0.46**	6.61 ± 0.40**	6.71 ± 0.27**	6.14 ± 0.23**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with Fe-HQ group; *** $P < 0.01$, compared with Fe-HQ + H₂O₂ group.

表 3. Fe-HQ、H₂O₂、DMSO 和还原型谷胱甘肽对离体灌流心脏 LDH 和 CK 释放量以及心肌 MDA 的影响

Table 3. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on LDH, CK release and MDA content of isolated perfused hearts

	LDH (IU/L)	CK (IU/L)	MDA (nmol/g protein)
Control	21.13 ± 0.67	14.13 ± 0.72	1.06 ± 0.04
Fe-HQ (5.0 μmol/L)	26.63 ± 0.80**	33.00 ± 1.28**	1.53 ± 0.05**
H ₂ O ₂ (50 μmol/L)	22.75 ± 0.49	15.3 ± 0.56	1.17 ± 0.02
Fe-HQ + H ₂ O ₂	45.38 ± 1.54**	115.50 ± 6.08**	3.01 ± 0.08**
Fe-HQ + H ₂ O ₂ + DMSO	42.88 ± 2.36	103.88 ± 3.76	1.89 ± 0.03**
Fe-HQ + H ₂ O ₂ + Glu	30.3 ± 1.00**	59.50 ± 3.46**	1.92 ± 0.13**

The LDH and CK were measured in coronary effluent after the hearts were perfused with Fe-HQ for 10 min and then with hydrogen peroxide for 10 min. The lipid peroxide products were measured after the hearts were perfused with Fe-HQ for 10 min followed by a 10-min perfusion with hydrogen peroxide and then a 20-min perfusion with KH solution. ** $P < 0.01$, compared with control group; ** $P < 0.01$, compared with Fe-HQ group; *** $P < 0.01$, compared with Fe-HQ + H₂O₂ group.

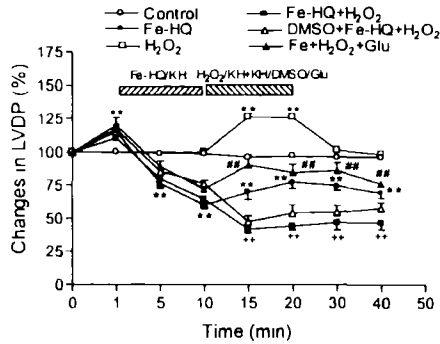


图 5. Fe-HQ、H₂O₂、DMSO 和还原型谷胱甘肽对离体灌流心脏 LVDP 的影响

Fig. 5. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on the left ventricular developed pressure (LVDP). ***P* < 0.01 vs control group; +*P* < 0.01 vs Fe-HQ group; ##*P* < 0.01 vs Fe-HQ + H₂O₂ group.

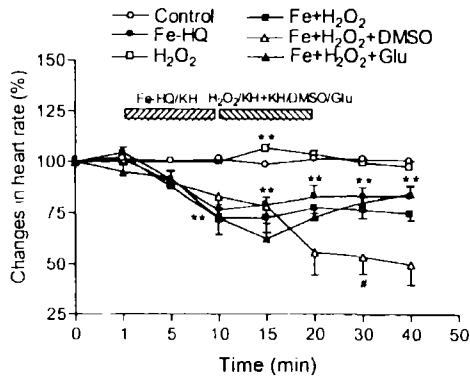


图 6. Fe-HQ、H₂O₂、DMSO 和还原型谷胱甘肽对离体灌流心脏心率的影响

Fig. 6. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on the heart rate. ***P* < 0.01 vs control group; #*P* < 0.05 vs Fe-HQ + H₂O₂ group.

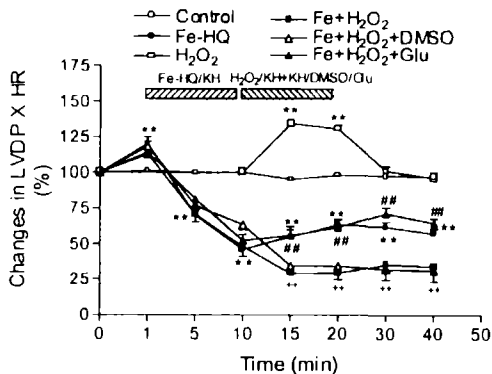


图 7. Fe-HQ、H₂O₂、DMSO 和还原型谷胱甘肽对离体灌流心脏 LVDP × HR 的影响

Fig. 7. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on LVDP × HR in isolated perfused rat hearts. ***P* < 0.01 vs control group; +*P* < 0.01 vs Fe-HQ group; ##*P* < 0.01 vs Fe-HQ + H₂O₂ group.

2.5 还原型谷胱甘肽对 H₂O₂ 加重铁对离体灌流心脏损伤作用的影响

巯基保护剂还原型谷胱甘肽组与 Fe-HQ + H₂O₂ 组相比, 心室肌细胞舒张期长度增加、心肌细胞的收缩幅度、±dL/dt_{max} 增高(图 1~4)。在离体灌流心脏, Fe-HQ (5 mmol/L) 灌流后, 还原型谷胱甘肽 (10 mmol/L) 与 H₂O₂ 合并灌流, 与 Fe-HQ + H₂O₂ 组相比较, 冠脉流量、LVDP、HR × LVDP 和 ±dp/dt_{max} 增加(图 5~8, 表 2), 冠脉流出液中 LDH、CK 释放量和心肌 MDA 降低(*P* < 0.01)(表 3)。

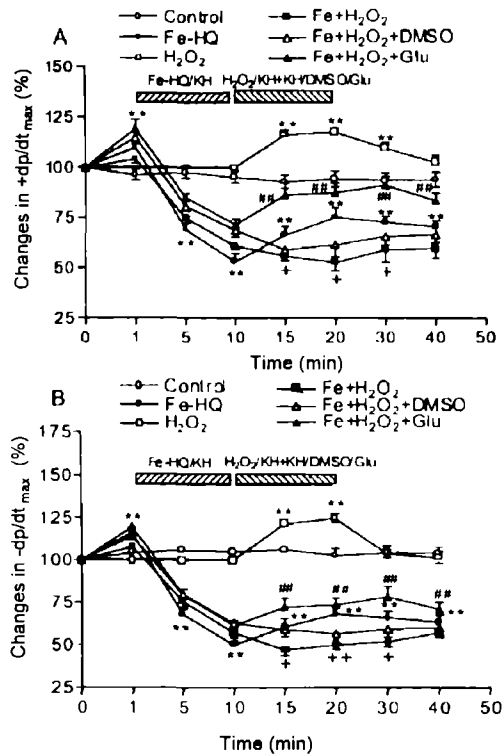


图 8. Fe-HQ、H₂O₂、DMSO 和还原型谷胱甘肽对离体灌流心脏 ±dp/dt_{max} 的影响

Fig. 8. Effects of Fe-HQ, hydrogen peroxide, DMSO and reduced glutathione on the maximal rate of rise/fall of ventricular pressure (±dp/dt_{max}) in isolated perfused rat hearts. ***P* < 0.01, compared with control group; +*P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared with Fe-HQ group; ##*P* < 0.01, compared with Fe-HQ + H₂O₂ group.

3 讨论

本实验观察到, 增加心肌细胞内铁可导致心肌细胞损伤, 这与国外报道一致^[2]。Oubidar 等已证明, 心肌细胞外高铁对心肌细胞无损伤作用, 细胞外的铁必须进入细胞内, 使细胞内的铁浓度增高, 才能对心肌造成损伤^[8]。体外实验证明, 铁主要攻击的靶部位是心肌肌膜和溶酶体膜, 增加膜脂质过

氧化。急性铁超负荷时以心肌肌膜受损为主。同时,富含巯基的蛋白质对铁亦非常敏感,往往造成细胞内与收缩有关的酶失活,致使心肌细胞电生理及收缩功能异常,即心机的收缩力下降,动作电位的超射值减小,发生心律失常^[9]。

有文献报道,腹腔注射乳酸铁的小鼠心肌细胞对⁴⁵Ca²⁺摄取增加^[10]。Stoyanovsky等人的研究亦发现抗坏血酸盐/铁可引起心肌肌质网钙通道开放,但只维持2 min^[11]。本文观察到,Fe³⁺-HQ引起LVDP和+dp/dt等短暂的增高可能与铁引起的肌质网钙通道短暂开放有关。然而近来研究发现,细胞外的铁离子可通过电压依从性钙通道进入细胞内^[12],铁离子可与钙离子竞争电压依从性钙通道,从而减少钙内流。而细胞内铁离子的增加可降低肌质网上ryanodine受体对钙离子的敏感性,抑制钙诱发的钙释放^[13]。故Fe³⁺-HQ的双向效应可能是由于铁离子先引起心肌细胞短暂的钙内流增加,肌质网钙通道开放,胞浆内钙离子浓度一过性增高,继而铁离子竞争性地抑制钙内流,降低肌质网内钙释放,使胞浆内钙离子浓度降低所致。

本实验发现,在酶解分离的心室肌细胞,H₂O₂(50 μmol/L)可损伤心肌细胞;在离体灌流心脏,H₂O₂(50 μmol/L)除了可增高LVEDP外,对离体心脏的其它功能没有明显的负性作用。Byler等发现,H₂O₂对培养的鸡胚心肌细胞可产生直接损伤,使LDH、⁵¹Cr释放增加,用铁的螯合剂去铁敏,或·OH的清除剂二甲基亚砷可以减轻H₂O₂对心机的损伤。说明H₂O₂对培养心机的毒性作用是由铁离子催化产生的·OH所介导^[14]。较多的证据表明,高浓度的H₂O₂可严重损伤心脏功能,这种损伤可被过氧化氢酶抑制^[15],但低浓度H₂O₂对心机的损伤作用不大。Valen等发现,低浓度H₂O₂可增加冠脉流量,此作用与NO依赖性冠脉扩张有关。NO合成和信号转导通路的抑制剂L-NAME、亚甲蓝等均加重低浓度H₂O₂的心肌损伤作用^[16]。因此,本实验观察到的H₂O₂(50 μmol/L)对离体灌流心脏的影响较小,可能与冠脉参与有关。

本实验还发现,低浓度的H₂O₂可加重铁的损伤作用。一般认为,H₂O₂可与Fe²⁺和Cu²⁺等二价金属离子发生Fenton反应:Fe²⁺+H₂O₂→Fe³⁺+OH⁻+·OH,产生大量的更有活性的羟自由基(·OH),诱发脂质过氧化。从实验结果看,在酶解分离细胞,用·OH的清除剂DMSO可阻断低浓度H₂O₂对铁的损伤作用。而在离体灌流心脏中,DMSO

虽然可降低心机的脂质过氧化,但并不改善低浓度H₂O₂加重铁对心脏的毒性作用。本实验发现,在使用H₂O₂同时加入巯基保护剂还原型谷胱甘肽,可以完全抵抗低浓度H₂O₂对铁的损伤作用的加强。提示低浓度的H₂O₂加重铁的损伤作用,可能是通过加重对含巯基的蛋白质的损伤起作用的。巯基是心肌许多酶和蛋白质维持活性所必需的结构基团,如丙酮酸激酶、钙离子泵及肌酸激酶等。铁引起的钙离子摄取、丙酮酸激酶、肌酸激酶活性降低,可被还原型谷胱甘肽、二巯苏糖醇逆转^[17]。可见铁可通过对巯基的氧化修饰改变心肌酶的活性,铁螯合剂也可通过改变Fe²⁺/Fe³⁺的比值来减少心肌酶的活性改变。磷脂酶C(PLC)亦是一种含巯基的酶,H₂O₂可通过氧化巯基,影响PLC活性;而·O₂和·OH对PLC活性无影响^[18]。有文献报道,含巯基的蛋白质对铁的损伤比膜脂质更为敏感。故认为H₂O₂加重铁对心脏的损伤作用,主要是通过含巯基的蛋白质起作用。

从本实验得出结论,心肌细胞内铁增加可造成心脏的功能和代谢受损,而低浓度的H₂O₂可加重铁对心脏的损伤作用,在离体灌流的心脏中,其主要机制可能与·OH无关,而主要与含巯基的蛋白质有关。

参 考 文 献

- [1] Horwitz LD, Rosenthal EA. Iron-mediated cardiovascular injury. *Vasc Med*, 1999, 4(2):93~99.
- [2] Ambrosio G, Zweier JL, Jacobus WE *et al*. Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation*, 1987, 76(4):906~915.
- [3] Lesnfsky EJ, Ye J. Exogenous intracellular, but not extracellular, iron augments myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol*, 1994, 266(2 Pt 2):H384~H392.
- [4] Grill HP, Zweier P, Kuppusamy ML *et al*. Direct measurement of myocardial free radical generation in an *in vivo* model: effects of postischemic reperfusion and treatment with human recombinant superoxide dismutase. *J Am Coll Cardiol*, 1992, 20(7):1604~1611.
- [5] Hegstad AC, Antonsen OH, Ytrehus K. Low concentrations of hydrogen peroxide improve post-ischaemic metabolic and functional recovery in isolated perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(10):2779~2787.
- [6] Ytrehus K, Walsh RS, Richards-SC *et al*. Hydrogen peroxide as a protective agent during reperfusion. A study in the isolated perfused rabbit heart subjected to regional ischemia. *Cardiovasc Res*, 1995, 30(6):1033~1037.
- [7] Fu LL (傅李莉), Xia Q (夏强), Shen YL (沈岳良). Involvement of endogenous opioids in cardioprotective effects of ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Acta Phy-*

- siol Sin* (生理学报), 1998, **50**(6): 603 ~ 610 (Chinese, English abstract).
- [8] Oubidar M, Marie C, Mossiat C *et al.* Effects of increasing intracellular reactive iron level on cardiac function and oxidative injury in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28**(8): 1769 ~ 1776.
- [9] Link G, Hershko C. Rat heart cells in culture: a model of iron toxicity and chelation. *J Lab Clin Med*, 1993, **122**(1): 14 ~ 15.
- [10] Anghileri LJ, Maincent P, Thouvenot P. Cardiotoxicity of parenterally administered iron complexes. *Arzneimittelforschung*, 1995, **45**(6): 679 ~ 681.
- [11] Stoyanovsky DA, Salama G, Kagan VE. Ascorbate/iron activates Ca^{2+} -release channels of skeletal sarcoplasmic reticulum vesicles reconstituted in lipid bilayers. *Arch Biochem Biophys*, 1994, **308**(1): 214 ~ 221.
- [12] Sushima RC, Wickenden AD, Bouchard RA *et al.* Modulation of iron uptake in heart by L-type Ca^{2+} channel modifiers: possible implications in iron overload. *Circ Res*, 1999, **84**(11): 1302 ~ 1309.
- [13] Kim E, Giri SN, Pessah IN. Iron (II) is a modulator of ryanodine-sensitive calcium of cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, **130**(1): 57 ~ 66.
- [14] Byler RM, Sherman NA, Wallner JS *et al.* Hydrogen peroxide cytotoxicity in cultured cardiac myocytes is iron dependent. *Am J Physiol*, 1994, **266**(1 Pt 2): H121 ~ H127.
- [15] Valen G, Kaszaki J, Szabo I *et al.* Toxic oxygen metabolites and ischemia-reperfusion increase histamine synthesis and release in the isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, **25**(1): 31 ~ 40.
- [16] Valen G, Skjelbakken T, Vaage J. The role of nitric oxide in the cardiac effects of hydrogen peroxide. *Mol Cell Biochem*, 1996, **159**(1): 7 ~ 14.
- [17] Korge P, Campbell KB. Iron effects on myocardial enzymes depend on redox state. *J Mol Cell Cardiol*, 1994, **26**(2): 151 ~ 162.
- [18] Meij JT, Suzuki S, Panagia V *et al.* Oxidative stress modifies the activity of cardiac sarcolemmal phospholipase C. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1199**(1): 6 ~ 12.