

硫化氢预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

李 辉¹, 冉 珂¹, 唐正国², 李双凤¹, 常业恬¹

(1. 中南大学湘雅二医院麻醉科, 湖南 长沙 410011;

2. 长沙市第三医院麻醉科, 湖南 长沙 410015)

[摘要] **目的:**探讨硫化氢预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。**方法:**健康成年SD雄性大鼠40只,随机分成4组,每组10只。假手术组(S组)仅开胸并分离冠状动脉左前降支,不阻断血流150 min;缺血再灌注组(IR组)行冠状动脉左前降支阻断30 min,再灌注120 min;硫化氢预处理组(H组)予以静脉注射硫化氢钠0.05 mg/kg,给药后24 h同IR组处理;硫化氢预处理+线粒体KATP通道阻断剂(5-羟羧酸,5-HD)组(D组)缺血前15 min静脉注射5-HD 5 mg/kg,其它同H组处理。再灌注结束后抽血测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量,测心梗面积,免疫印迹法测心肌S-腺苷蛋氨酸合成酶(S-adenosylmethionine synthetase, SAM-s)的表达。**结果:**心肌梗死面积与IR组($38.27\% \pm 5.64\%$)比, H组($25.40\% \pm 3.54\%$)减小($P < 0.05$), D组($40.53\% \pm 5.24\%$)无明显差异($P > 0.05$)。心肌SAM-s表达与S组比, IR组、H组和D组均升高($P < 0.05$);与IR组比, H组降低($P < 0.05$), D组无明显差异($P > 0.05$)。与IR组比, H组血清SOD的活性含量增高、MDA的降低($P < 0.05$), D组无明显差异($P > 0.05$)。**结论:**硫化氢预处理对大鼠心肌具有保护作用,其机制可能是通过抑制心肌SAM-s表达,减少氧自由基的生成,增强心肌抗氧化能力有关。

[关键词] 硫化氢/药理学; 甲硫氨酸腺苷转移酶; 心肌再灌注损伤/药物治疗法; 心肌再灌注损伤/病理学; 肌细胞, 心脏/药物作用; 肌细胞, 心脏/病理学

[中图分类号] R 331 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2012)05-0559-05

Effects of hydrogen sulfide preconditioning on myocardial ischemia reperfusion injury in rats

LI Hui¹, RAN Ke¹, TANG Zheng-guo², LI Shuang-feng¹, CHANG Ye-tian¹ (1. Department of Anesthesiology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China; 2. Department of Anesthesiology, the Third Changsha Municipal Hospital, Changsha 410015, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of hydrogen sulfide preconditioning on myocardial ischemia reperfusion injury in rats. **Methods:** Sprague-Dawley male rats were divided into 4 groups with 10 in each group: in S group rats received sham operation; in IR group rats were given with NS(1.0 ml/kg iv) 24 h before ischemia; in H group rats were treated with NaHS(0.05 mg/kg iv) 24 h before

收稿日期:2011-10-25 修回日期:2012-07-09

基金项目:湖南省科技厅资助项目(2012TT2028).

作者简介:李 辉(1975-),男,主治医师.

通讯作者:冉 珂(1975-),男,博士,主治医师,主要从事心肌保护研究;E-mail:rankerk@126.com

ischemia; and in D group, NaHS-treated rats received 5-hydroxydecanoate (5-HD) 15 min before ischemia. Rats in IR group, H group and D group were subjected to ischemia by occlusion of coronary artery for 30 min followed by 2 h of reperfusion. At the end of the reperfusion, myocardial infarct size was measured. SAM-s was measured by Western blotting. Plasma SOD activity and MDA were determined at the end of reperfusion. **Results:** The infarct size was significantly lesser in H group ($25.40\% \pm 3.54\%$) than that in IR group ($38.27\% \pm 5.64\%$, $P < 0.05$). The SAM-s protein expression in myocardium was significantly lower in H group than that in IR group. The plasma MDA content was significantly lower and SOD activity was higher in H group than those in IR group, but there was no difference between IR group and D group. **Conclusion:** The hydrogen sulfide preconditioning attenuates myocardial IR injury possibly through down-regulating SAM-s expression, reducing the production of oxygen free radicals and enhancing anti-oxidize effect in rats.

[**Key words**] Hydrogen sulfide/pharmacology; Methionine adenosyltransferase; Myocardial reperfusion injury/drug therapy; Myocardial reperfusion injury/pathology; Myocytes, cardiac/drug effects; Myocytes, cardiac/pathology

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2012,41(5):559-563.]

硫化氢(H_2S)是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后发现的第三个内源性气体信号分子,其参与机体许多生理和病理过程的调节。有研究表明, H_2S 预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤有保护作用^[1],但是其保护机制目前尚未完全阐明。S-腺苷蛋氨酸合成酶(SAM-s)是一种促进高半胱氨酸合成的重要酶,而高半胱氨酸在体内经过氧化后可产生大量氧自由基,导致细胞损伤^[2]。 H_2S 预处理对心肌缺血再灌注损伤的保护作用是否与SAM-s有关目前未见报道。为此,本研究拟通过研究 H_2S 预处理对大鼠心肌SAM-s表达的影响,以探讨其对心肌缺血再灌注损伤的保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物 健康成年SD雄性大鼠40只,体重300~350 g,由湖南斯莱景达实验动物有限公司提供。

1.2 仪器设备 H150呼吸机、MD100-2电子分析天平、内切式匀浆机、721分光光度仪、恒温水浴箱、恒温振荡器等系国产仪器;H-7500透射电子显微镜、CH30光学显微镜、摄影系统、全自动生化分析仪、5415R型高速低温台式离心机、压力换能器、电转印装置、计算机图像

分析系统系美国等国外公司产品。

1.3 试剂 硫氢化钠(NaHS)、5-羟葵酸(5-HD)、伊文思蓝、氯化硝基四氮唑蓝、戊巴比妥钠均为美国Sigma公司产品,丙烯酰胺、无水乙醇、异丙醇、氯仿、二甲苯等均为国产试剂,超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒均为南京建成生物工程研究所。

1.4 方法

1.4.1 缺血再灌注模型的制备 参考文献^[3,4]

方法制备大鼠缺血再灌注模型,大鼠经腹腔推注3%戊巴比妥钠30 mg/kg麻醉,多导联心电图监测。气管插管,动物呼吸机控制呼吸,潮气量8~10 ml/kg,频率70次/min。在心尖搏动最明显处之上一肋间隙开胸,切开心包,确认左冠圆锥支,在圆锥支之后用7-0丝线结扎左冠前降支,立即可见左室前壁紫绀充血,心率减慢,血压一过性下降,心电图监测S-T段明显抬高,确认阻断成功。

1.4.2 动物分组 将40只健康成年S-D雄性大鼠随机分成4组:假手术组(S组)、缺血再灌注组(IR组)、硫化氢组(H组)和硫化氢预处理+线粒体KATP通道阻断剂(5-羟葵酸,5-HD)组(D组),每组10只。S组仅开胸并分离冠状动脉左前降支,不阻断血流150 min;IR组

行冠状动脉左前降支阻断 30 min,再灌注 120 min;H 组静脉注射 NaHS 0.05 mg/kg,给药后 24 h 同 IR 组处理,D 组缺血前 15 min 静脉注射 5-HD 5 mg/kg,其它同 H 组处理。

1.5 心肌梗死面积的测量 实验结束立刻重新阻断左冠前降支并从尾静脉注入 1% 伊文思蓝 2 ml,充分染色后取出心脏。分离左心室(包括室间隔),滤纸吸干后将心脏放在 -20℃ 冰箱 10 min 后取出,切片,每片厚约 1~2 mm。血供正常心肌呈蓝染,缺血区心肌呈紫红或苍白,缺血心肌与正常心肌比值即为缺血危险区。将心肌置于 37℃ 10% TTC 中水浴 15 min,氧化还原反应后存活心肌呈蓝色,梗死心肌呈灰色,危险区心肌呈红色。4% 甲醛固定 24 h 后,每个心脏切片进行数码照相,留取左心室称重。左心室,缺血区(非蓝色区)和心肌梗死区(灰色区)面积用 Image-Pro Plus 5.0 软件计算。心肌缺血区范围用心肌缺血区重量占左心室重量百分比表示。心肌梗死范围用心肌梗死区重量占心肌缺血区重量百分比表示。

1.6 心肌 SAM-s 的测定 采用免疫印迹分析,在再灌注 120 min 结束即刻,取左心室前壁心肌组织提取蛋白,并于 -70℃ 储存备用。取 100 μg 心肌蛋白于 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,分离的心肌蛋白随后通过电转印装置转印至 PVDF 膜,室温下在封闭液中作用 3 h,再加入 SAM-s 抗体,4℃ 孵育过夜,用 TTBS 缓冲液冲洗 15 min × 4 次后,加入二抗羊抗鼠 IgG,室温摇动孵育 1h,再用 TTBS 缓冲液充分冲洗,最后进行增强化学发光反应。结果用 GIS-700D 型凝胶图像系统进行扫描分析,记录

平均光密度值表示心肌 SAM-s 表达。

1.7 生化指标测定 于再灌注结束即刻抽取动脉血 2 ml,以 4 500 r/min 分离血清, -20℃ 保存待测。采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸盐法分别测定血清丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)。

1.8 统计学处理 将各组测得的值进行统计学处理,采用 SPSS 13.0 软件分析。所有数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行完全随机设计的方差分析,多组均数的比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

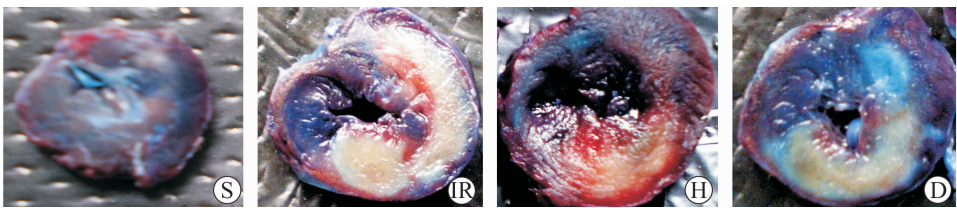
2 结 果

2.1 心肌梗死面积变化 除 S 组外,各组心肌缺血面积无明显差异($P > 0.05$);与 IR 组比,H 组心梗面积降低($P < 0.05$),D 组无明显差异($P > 0.05$,表 1 和图 1)。

表 1 各组大鼠心肌缺血面积及心梗面积的比较

Table 1 The changes of infarct area and area at risk in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)		
组别	缺血面积/%	心梗面积/%
S 组	0	0
IR 组	44.16 ± 6.88	38.27 ± 5.64
H 组	45.03 ± 6.04	25.40 ± 3.54 *
D 组	43.25 ± 6.69	40.53 ± 5.24
	$F = 0.41$	$F = 18.34$
	$P > 0.05$	$P < 0.01$

与 IR 组比, * $P < 0.05$.



S:假手术组;IR:缺血再灌注组;H:硫化氢组;D:硫化氢预处理+线粒体 KATP 通道阻断剂(5-HD)组(蓝色为非缺血区心肌,红色为缺血区有活性心肌,灰色为梗死心肌)。

图 1 大鼠左室心肌Evan's Blue 与 TTC 染色后切片

Fig.1 The slice of myocardium of the rat ventriculus sinister under staining of Evan's Blueand TTC

2.2 各组 MDA 含量和 SOD 活性的变化 与 IR 组比较,H 组的 SOD 活性升高,MDA 含量降低($P < 0.05$),而 D 组上述指标与 IR 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2)。与 IR 组比较,D 组的 SOD 活性和 MDA 含量变化不大,差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2)。

表 2 各组大鼠血浆 MDA 含量及 SOD 活性的变化

Table 2 Changes of plasma levels of MDA and SOD of each groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MDA/(mmol · L ⁻¹)	SOD/(kU · L ⁻¹)
S 组	3.62 ± 0.72	172.64 ± 12.17
IR 组	11.61 ± 1.17	78.75 ± 10.86
H 组	7.58 ± 0.87 *	126.34 ± 13.55 *
D 组	10.27 ± 0.95	85.21 ± 11.28
	$F = 16.58$	$F = 15.73$
	$P < 0.01$	$P < 0.01$

与 IR 组比较, * $P < 0.05$.

2.3 各组大鼠心肌 SAM-s 表达 心肌 SAM-s 光密度值 S 组为(49.1 ± 7.3),表达水平较低;与 S 组比较,IR 组(179.6 ± 10.4)表达上升($P < 0.05$);H 组为(108.6 ± 14.1),表达低于 IR 组($P < 0.05$),D 组为(188.5 ± 12.8),表达与 IR 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2)。

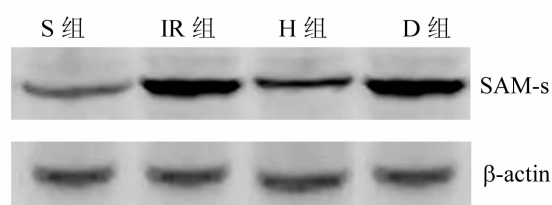


图 2 各组大鼠心肌 SAM-s 蛋白表达

Fig. 2 Western blot products of SAM-s expression of each group

3 讨论

硫化氢(H_2S)作为一种内源性气体信号分子,在体内有两种存在形式:1/3 以气体形式,

2/3 可能以硫化钠($NaHS$)形式存在。 $NaHS$ 在体内可解离成钠离子和硫氢根离子,后者与体内氢离子结合生成 H_2S , H_2S 与 $NaHS$ 形成一种动态平衡。 $NaHS$ 溶液与内源性 H_2S 的体内的存在方式相似,而且 $NaHS$ 的浓度便于精确定量 H_2S 含量,而 H_2S 气体饱和的液体则不便于精确定量 H_2S 的浓度,因此 $NaHS$ 溶液是较理想的外源性 H_2S 供体。Elrod 等^[5] 在研究 H_2S 预处理对心肌损伤的保护机制中,发现从 5 ~ 50 $\mu g/kg$ 不同剂量的 $NaHS$ 之中,50 $\mu g/kg$ 的保护作用最强,因此,本研究采用 IR 前 24 h 给予 $NaHS$ 50 $\mu g/kg$ 预处理的方案。

心肌梗塞面积是国际公认的评价心肌缺血损伤的金指标,TTC 染色法是公认的检测早期心肌细胞不可逆损伤的最可靠而灵敏的方法^[6-7]。在本研究中,IR 组和 H 组的缺血面积无显著性差异,表明 LAD 阻断效果肯定,而且各组 LAD 阻断部位基本一致。与 IR 组比,H 组心肌梗面积明显降低,提示 H_2S 预处理能减轻心肌损伤程度。

SAM-s 合成酶是促进高半胱氨酸合成的重要酶,SAM-s 在甲基转移酶的作用下生成 S-腺苷高半胱氨酸,后者进一步脱去腺苷,生成高半胱氨酸。文献报道,高半胱氨酸是糖尿病微血管病变的独立危险因素^[2],在糖尿病性心肌病大鼠心肌组织中的高表达是诱发加重糖尿病性心肌病发病的重要因素,这与细胞内高半胱氨酸经氧化产生大量氧自由基,引起血管内皮损伤和功能障碍有关。本研究结果显示,各个实验组心肌 SAM-s 表达增高,提示缺血再灌注作为一种病理生理刺激因素,导致心肌细胞的蛋白质表达发生变化。另一方面,心肌缺血再灌注期间产生大量氧自由基是引起缺血再灌注损伤的主要因素,其对心肌的损伤主要表现为脂质过氧化作用,导致心肌细胞的损伤^[8-9]。Yang 等^[10] 证实,心肌缺血再灌注期间有大量氧自由基产生,而体内最重要的脂质过氧化作用的代谢产物是 MDA,故测定 MDA 能较好地反映组织脂质过氧化程度,间接反映出细胞损伤程度^[11],SOD 是体内清除自由基的一种特异酶,如果其活性降低,可导致氧自由基堆积,因此其活性变化可反映体内抗氧化功能情况。本

研究结果显示, H_2S 预处理组 SAM-s 表达和 MDA 含量降低, SOD 活性升高, 提示 H_2S 预处理对心肌的保护作用可能是通过抑制 S-腺苷蛋氨酸合成酶的表达, 进一步抑制高半胱氨酸在心肌内的高表达, 从而减少氧自由基的产生以及对心肌造成的脂质过氧化反应。此外, 本研究发现, H_2S 预处理 + 线粒体 KATP 通道阻断剂组的心梗死面积、MDA 含量、SOD 活性以及心肌 SAM-s 表达等指标均无明显变化, 提示线粒体 K_{ATP} 通道介导了 H_2S 预处理对缺血再灌注心肌的保护作用。

总之, 本研究表明, H_2S 预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用, 其机制可能是通过抑制心肌 SAM-s 表达, 减少氧自由基的生成, 增强心肌抗氧化能力有关。

References:

- [1] HU L F, PAN T T, NEO K L, et al. Cyclooxygenase-2 mediates the delayed cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning in isolated rat cardiomyocytes [J]. *Pflugers Arch*, 2008, 455 (6): 971-978.
- [2] CHEN Gang, LIN Li-xiang, ZHUANG Wei-te, et al (陈刚, 林丽香, 庄维特, 等). Expression of S-adenosylmethionine synthetase gene in myocardial tissue of diabetic cardiomyopathy rats and its significance [J]. *Journal of Fujian Medical University* (福建医科大学学报), 2002, 36 (2): 144-146. (in Chinese)
- [3] RAN Ke, DUAN Kai-ming, ZOU Ding-quan, et al (冉珂, 段开明, 邹定全, 等). Effects of Isoflurane delayed preconditioning on nuclear factor- κ B during myocardial ischemia reperfusion injury in rabbit [J]. *Chin J Emerg Med* (中华急诊医学杂志), 2008, 17 (8): 834-837. (in Chinese)
- [4] RAN Ke, TANG Zheng-guo, DING Li-ping, et al (冉珂, 唐正国, 丁丽萍, 等). Effect of hydrogen sulfide induced delayed preconditioning on glutathione S-transferase (GST) expression during myocardial ischemia-reperfusion in rats [J]. *Journal of Zhejiang University: Medical Science* (浙江大学学报医学版), 2011, 40 (5): 535-539. (in Chinese)
- [5] ELROD J W, CALVERT J W, MORRISON J, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104 (39): 15560-15565.
- [6] PRZYLENK K, LI G, WHITTAKER P. No loss in the *in vivo* efficacy of ischemic preconditioning in middle-aged and old rabbits [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38 (6): 1741-1747.
- [7] COHEN M V. Efficacy of preconditioning should be gauged by reduction of infarction [J]. *Br J Pharmacol*, 2004, 141 (2): 197-198.
- [8] TOSSIOS P, BLOCH W, HUEBN ER A, et al. N-acetylcysteine prevents reactive oxygen species mediated myocardial stress in patients undergoing cardiac surgery: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 126 (5): 1513-1520.
- [9] MEHLHORN U, KRAHWIN KEL A, GEISSLER H J, et al. Nitrotyrosine and 8-isoprostane formation indicate free radical mediated injury in hearts of patients subjected to cardioplegia [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 125 (1): 178-183.
- [10] YANG X M, PROCTOR J B, CUI L, et al. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44 (5): 1103-1110.
- [11] LIU J X, LI X Z, MA X B, et al. Cardio-protective effects of corocalm on acute myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Integr Med*, 2006, 12 (3): 199-202.

[责任编辑 黄晓花]