

• 基础论著 •

血红素氧合酶-1 保护心力衰竭大鼠肠道结构屏障

干卓坤 张丽萍 白洁 李晓霞 徐雅萍 张丽

【摘要】 目的 研究血红素氧合酶-1(HO-1)对心力衰竭大鼠肠道结构屏障的保护作用及其作用途径。方法 通过冠状动脉结扎术造成心肌梗死建立心力衰竭大鼠模型(雄性, Wistar 大鼠), 分为 MI+Copp(钴-原卟啉)组、MI(心肌梗死)模型组、MI+SnMP(锡中卟啉)组, 相同数量($n=10$)正常大鼠作为对照组(Control), 分别腹腔注射 Copp 溶液、生理盐水、SnMP 溶液、生理盐水。8 周后在无菌术操作下取材肝、脾、肠系膜淋巴结, 并匀浆细菌培养, 计算细菌移位率; 取小肠做 HE 染色观察病理。通过实时定量荧光 PCR(Real-time PCR)测定小肠血红素氧合酶-1 RNA 的表达, 比色法测定小肠一氧化碳(CO)水平。结果 同 MI 比较, MI+Copp 明显升高小肠血红素氧合酶-1 RNA 表达($P<0.01$)及 CO 浓度($P<0.05$), 减轻小肠病理改变($P<0.05$), 并减少细菌移位率($P<0.01$)、血浆内毒素含量[门静脉(61.790 ± 21.038) pg/ml, 下腔静脉(49.310 ± 25.273) pg/ml, $P<0.05$]。而 MI+SnMP 对血红素氧合酶-1 RNA 表达无明显影响($P>0.05$), 但明显降低小肠 CO 浓度($P<0.05$), 加重小肠病理改变($P<0.01$), 并升高细菌移位率($P<0.05$)、血浆内毒素含量[门静脉(165.016 ± 40.751) pg/ml, 下腔静脉(141.249 ± 40.772) pg/ml, $P<0.01$]。结论 血红素氧合酶-1 可明显减少心力衰竭大鼠细菌移位率及血浆内毒素含量, 该作用可能与 CO 保护肠道屏障结构有关。

【关键词】 血红素加氧酶-1; 小肠; 心力衰竭; 大鼠, Wistar

Heme oxygenase-1 protects intestine structural barrier in heart failure rats Gan Zhuokun*, Zhang Liping, Bai Jie, Li Xiaoxia, Xu Yaping, Zhang Li. *Second Geriatric Cardiology Department, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Zhang Li, Email: zhangli9509@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect of heme oxygenase-1(HO-1) on intestine structural barrier in heart failure rats. **Methods** Heart failure rats model was built by myocardial infarction with coronary ligation method. These rats were randomized into 3 experimental groups (10 rats per group): MI, MI+Copp, and MI+SnMP group receiving injection of saline, Cobalt protoporphyrin solution, Tin mesoporphyrin IX dichloride solution respectively, 10 normal rats were set Control. 8 weeks later, bacterial translocation incidence, endotoxine level in portal vein and inferior vena cava, expression of HO-1(heme oxygenase-1) and CO in intestine were determined. **Results** Compared with MI, MI+Copp significantly reduced bacterial translocation incidence, endotoxine level with lower degree of morphology change and elevated concentration of HO-1 and CO, and this was abolished by SnMP. **Conclusion** MI+Copp can reduce bacterial translocation incidence and portal endotoxine level, which may be benefit to the protection of CO on intestine barrier.

【Key words】 Heme oxygenase-1; Intestine, small; Heart failure; Rats, Wistar

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.03.026

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院南楼临床部老年心血管二科(干卓坤、张丽萍), 检验科(白洁、李晓霞、徐雅萍), 老年心血管一科(张丽)

通讯作者: 张丽, Email: zhangli9509@hotmail.com

最近 50 年来心力衰竭发病率并无明显升高^[1], 但心力衰竭总体病死率及住院率仍然较高, 这可能与由于冠心病治疗的发展使心肌梗死病死率下降有关^[2], 即由心肌梗死导致的心力衰竭所占比例越来越大。心力衰竭时, 为保证心脑肾等重要器官供血, 内脏血液供应会减少^[3], 而肠绒毛血供结构决定了绒毛顶端最易受缺血影响。而且, 心力衰竭时, 在出现心率和血压改变之前胃肠道已受损^[4]。研究表明, 诱导血红素氧合酶-1 (HO-1) 可以出现对相应激等的保护作用^[5-6]。因此该研究试图探讨诱导 HO-1 对心力衰竭肠道的作用。

材料和方法

1. 实验动物及心力衰竭大鼠模型的建立: 采用解放军第 302 医院实验动物中心提供的清洁级雄性 Wistar 大鼠, 体重 160~180 g, 经适应性喂养 2 周后体重 240~260 g, 用于实验。冠状动脉结扎造成心肌梗死后, 经胸短轴超声检查挑选心脏射血分数低于 50% 的大鼠作为心力衰竭大鼠, 心脏射血分数高于 50% 的大鼠立即处死。

2. 分组及治疗: 心力衰竭大鼠随机分至 MI(心肌梗死)组、MI+SnMP(锡中卞啉)组、MI+Copp(钴-原卞啉)组, 每组 10 只, 10 只正常大鼠作为对照组(Control)。MI+SnMP 治疗组 SnMP 0.2 mg/100 g 体重腹腔注射 SnMP, 2 次/周; MI+Copp 治疗组 0.5 mg/100 g 体重腹腔注射 Copp, 2 次/周; 其余各组腹腔注射大致等量生理盐水。冠状动脉结扎术后第 1 天开始药物干预。Copp 试剂购自 Aldrich (UT, USA), SnMP 试剂购自 Frontier Scientific Inc. (Logan, UT, USA)。

3. 取材方法: 术后第 8 周, 戊巴比妥钠 40 mg/kg 体重腹腔注射麻醉。严格无菌操作下 V 形切口暴露腹膜, 进入腹腔前以拭子擦拭腹膜表面并细菌培养, 出现阳性结果者排除。依次取门静脉及腔静脉血 3 ml 待测血浆内毒素(抽取下腔静脉血时于穿刺点近心端、肾静脉汇入处远心端夹闭腔静脉, 防止血液回流)。取引流回盲部的肠系膜根部淋巴结(MLN)、肝左叶、脾分别匀浆并细菌培养。距回盲部 5 cm 向上依次取 3~5 cm 回肠, PBS 清洗后

4% 甲醛溶液固定待做病理; 3 cm 回肠 PBS 清洗, 纱布擦干后立即液氮冷冻并转移至 -70 °C 保存。

4. 血浆内毒素测定: 门静脉血及下腔静脉血均 3 000 r/min 离心 1 min, 通过 ELISA 法测定血浆内毒素含量。试剂盒购自武汉华美生物工程公司。

5. 细菌移位率测定: 所取肝、脾、淋巴结按 wt/vol=1:10 匀浆, 吸取匀浆接种到血平板及厌氧平板, 分别在有氧及厌氧条件下 37 °C 孵育 48 h, 根据稀释度及组织重量计算组织含菌量(CFU/g); 当组织含菌量 > 100 CFU/g 时即认为该组织细菌培养阳性。平板购自 oxoid 公司。

6. Real-time PCR: 利用 Trizol 试剂(Invitrogen)提取组织标本的总 RNA, 并用 RevertAid 首链 cDNA 合成试剂盒(1622, Fermentas)反转录合成单链 cDNA。用 2×Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (600882, Agilent Technologies)在副链进行 Real-time PCR 反应。通过分析相对 Ct 的方法得到数据, 并使用 GAPDH 基因在各样本的表达作内参照基因修正数据后得到最终结果(PCR 反应引物见表 1)。

7. CO 的测定: 所取小肠组织按 w/v=1:9 在溶血剂里匀浆, 将 10 μl 10% 上清液加至 2.5 ml 用于血红蛋白(Hb)测定的稀释液, 据 540 nm 处吸光度计算血红蛋白浓度。20 μl 上清加至 2.5 ml 双缩脲试剂并在 540 nm 处吸光度, 将其与标准液、空白液的吸光度比较得到组织蛋白浓度。将 0.2 ml 上清加至 2.3 ml 用于 HbCO 测定的稀释液, 并分别在 568 nm 及 581 nm 处测定吸光度, 将其与饱和 HbCO 上清稀释液样本及饱和 HbO₂ 上清稀释液样本吸光度比较得到 HbCO 浓度。CO 含量根据公式 $CO(\mu\text{mol/g}) = \text{HbCO}\% \times \text{Hb}(\text{g/L}) \times 106 \times 4 / [64\ 456 \times \text{组织蛋白浓度}(\text{g/L})]$ 计算。试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

8. HE 染色病理评分: 所取 3~5 cm 回肠以 10% 甲醛固定, 石蜡包裹, 切成 4 μm 厚度薄片用 HE 染色光镜下观察。每个小肠切片观察 20 个连续的视野, 并对观察结果评分: 第 1 级(0 分), 正常; 第 2 级(1 分)绒毛上皮水肿或与黏膜下层分离; 第 3 级(2 分), 局限于绒毛顶端的上皮细胞坏死;

表 1 PCR 反应引物

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(3'→5')
HO-1	GAAACAAGCAGAACCCAGTC	AGAGGTCACCCAGGTAGCG
GAPDH	GCAAGTCAACGGCACAG	GCCAGTAGACTCCACGACAT

表 2 细菌移位率 (阳性大鼠数量/单组大鼠数量)

组别	肝	脾	肠系膜淋巴结	总体细菌移位率	出现细菌移位大鼠数量
Control	0/10	0/10	0/10	0/30	0/10
MI+Copp	1/10 ^b	1/10 ^b	2/10	3/30 ^c	2/10
MI	6/10 ^a	6/10 ^a	6/10 ^a	18/30 ^a	6/10 ^a
MI+SnMP	8/10 ^a	8/10 ^a	10/10 ^{ab}	26/30 ^{ab}	10/10 ^{ab}

注: 总体细菌移位率=肝、脾、肠系膜淋巴结细菌移位率之和, 组间细菌移位率比较采用卡方检验。与 Control 比较, ^a $P<0.05$, <0.01 ; 与 MI 比较, ^b $P<0.05$, ^c $P<0.01$

第 4 级 (3 分) 绒毛完全坏死; 第 5 级 (4 分) 透壁性坏死。取算数平均值为每个切片的评分。

9. 统计学分析: 多组间比较采用方差分析 (F 检验)、Kruskal-Wallis 检验和卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。统计软件采用 SPSS 13.0。

结 果

1. 血浆内毒素测定: MI 组门静脉 (vs. Control, $P<0.01$) 及下腔静脉 (vs. Control, $P<0.05$) 血浆内毒素浓度较对照组明显升高, MI+SnMP 组内毒素浓度进一步升高 (vs. MI, $P<0.01$; vs. Control, $P<0.01$), 而 MI+Copp 组显著降低内毒素浓度 (vs. MI, $P<0.05$) 至正常对照水平 (vs. Control, $P>0.05$) (图 1, 2)。

2. 细菌移位率测定: 肝、脾肠系膜淋巴结细菌移位率及发生移位的大鼠数量均明显高于对照组 (vs. Control, $P<0.01$), 而 MI+Copp 与正常组相比无明显差异 (vs. Control, $P>0.05$), 并显著减少肝脾及总体细菌移位率 (vs. MI, $P<0.05$)。MI+SnMP 增加肠系膜淋巴结细菌移位率、总体细菌移位率及细菌移位大鼠数量 (vs. MI, $P<0.05$)。实验中发现在所有 18 只发生细菌移位的大鼠中 3 只大鼠 (MI+Copp 1 只, MI+SnMP 2 只) 仅出现肠系膜淋巴结细菌培养阳性而肝脾细菌培养阴性, 其余肝脾细菌培养阳性的大鼠均出现肠系膜淋巴结细菌培养阳性 (表 2)。

3. 小肠 HO-1 RNA 表达: MI 组 HO-1 表达较 Control 相比明显增加 ($P<0.01$), MI+SnMP 也明显增加 HO-1 表达 ($P<0.01$), 和 MI 相比无明显差异 ($P>0.05$)。而 MI+Copp HO-1 表达则明显高于其他 3 组 ($P<0.01$) (图 3)。

4. CO: MI 中 CO 浓度较 Control 相比明显增加 ($P<0.05$), MI+Copp CO 浓度明显高于 Control ($P<0.01$) 和 MI ($P<0.05$), 而 MI+SnMP CO

浓度较 MI 明显降低 ($P<0.05$), 与 Control 水平相同 ($P>0.05$) (图 4)。

5. HE 染色病理评分: MI 评分较 Control 相比明显增加 ($P<0.01$)。MI+Copp 虽然均数仍高于 Control ($P>0.05$), 但同 MI 比较已显著降低评分, 而 MI+SnMP 显著增加评分 (vs. Control, $P<0.01$; vs. MI, $P<0.01$) (图 5)。

讨 论

释放于血红蛋白的游离血红素会在多种病理状态下增加, 并显示出炎症前因子的特性^[5]。HO-1, 是血红素氧合酶的诱导型, 将血红素分解为胆绿素、CO 和亚铁离子。多个研究证实, 特别在炎症时, HO-1 介导细胞保护作用, 并且诱导 HO-1 可能展现出额外的抗应激机制^[5-6]。

该研究结果发现, 心力衰竭模型组 (MI) 同对照组比较, HO-1 表达明显增加, 提示成功诱导心力衰竭条件下肠道损伤应激, 病理评分从形态学上也提供了肠道受损的证据, 并导致了细菌移位率和血浆内毒素浓度增加。Niebauer 等^[7]发现出现水肿的心力衰竭患者血浆内毒素浓度明显高于无水肿的患者, 而内毒素被认为是最强的炎症前物质诱导物之一^[8], 即使很小剂量即可导致肿瘤坏死因子 (TNF)- α 释放^[9-10]。TNF- α 不仅是心力衰竭严重程度的标志物, 又是心力衰竭的诱导物, 加重肠道缺血^[11-12]。利用腹腔注射 Copp 诱导 HO-1 高表达, 明显减少心力衰竭大鼠肠道病理评分, 其评分与正常对照 (Control) 并无明显差异, 达到保护肠道结构屏障完整的目的, 并观察到细菌移位率和血浆内毒素浓度减少的获益。SnMP 是一种 HO-1 活性抑制剂, 抑制 HO-1 将血红素分解的过程。腹腔注射 SnMP (MI+SnMP) 并未影响心力衰竭大鼠 HO-1 表达, 但明显减少 CO 并增加细菌移位和血浆内毒素。提示 HO-1 的保护作用获益于 CO 途径。

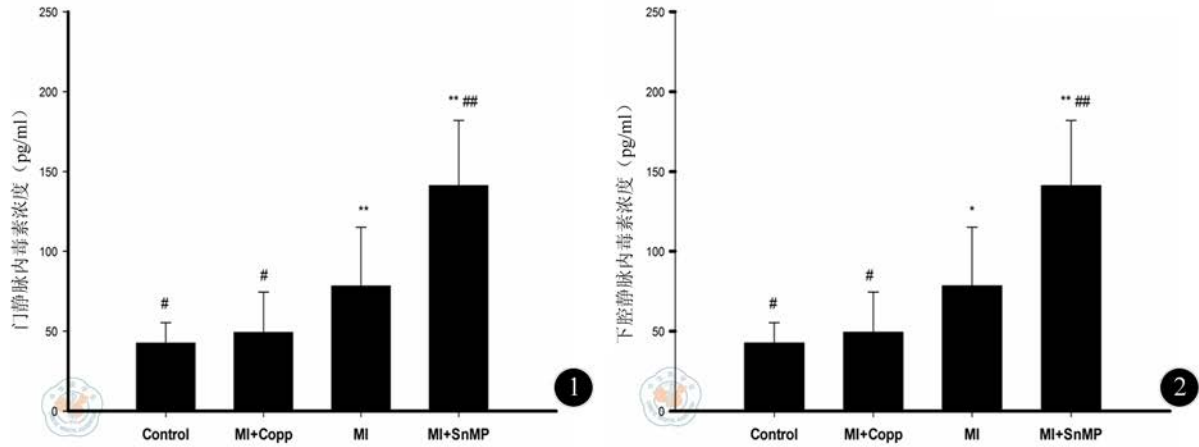


图1 门静脉血浆内毒素浓度。Control (53.571±21.710) pg/ml, MI+Copp (61.790±21.038) pg/ml, MI (107.126±65.673) pg/ml, MI+SnMP (165.016±40.751) pg/ml。vs. Control, ***P*<0.01, vs. MI, #*P*<0.05, ##*P*<0.01 图2 下腔静脉血浆内毒素浓度。Control (42.609±12.662) pg/ml, MI+Copp (49.310±25.273) pg/ml, MI (78.383±36.740) pg/ml, MI+SnMP (141.249±40.772) pg/ml。vs. Control, **P*<0.05, ***P*<0.01, vs. MI, #*P*<0.05, ##*P*<0.01

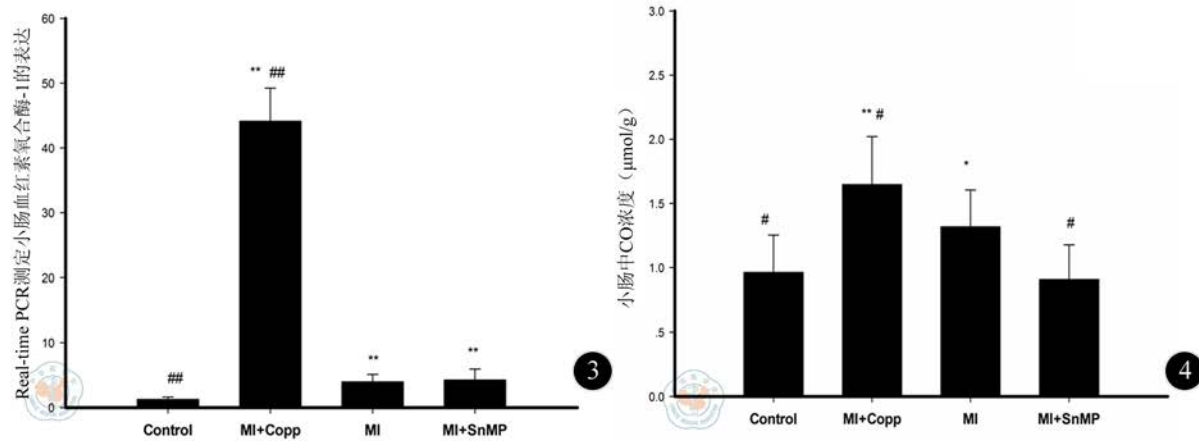


图3 Real-time PCR测定HO-1 RNA在小肠的表达 (Kruskal-Wallis检验)。Control 1.242±0.383, MI+Copp 44.120±5.115, MI 3.968±1.152, MI+SnMP 4.236±1.696。vs. Control, ***P*<0.01, vs. MI, #*P*<0.05, ##*P*<0.01 图4 小肠CO浓度, Control (0.962±0.291) μmol/g, MI+Copp (1.647±0.373) μmol/g, MI (1.317±0.287) μmol/g, MI+SnMP (0.906±0.269) μmol/g。vs. Control, **P*<0.05, ***P*<0.01, vs. MI, #*P*<0.05

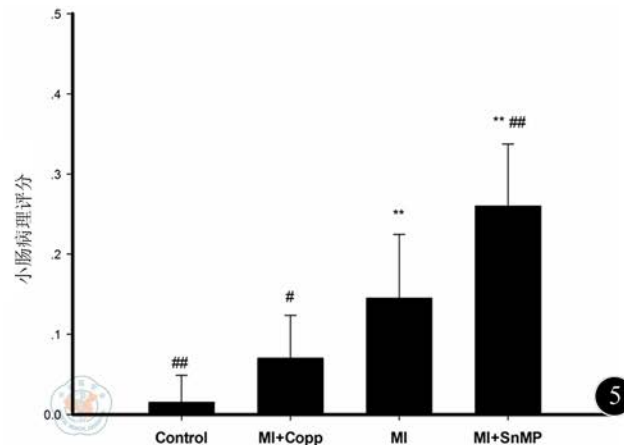


图5 小肠病理评分。Control 0.015±0.034, MI+Copp 0.070±0.054, MI 0.145±0.080, MI+SnMP 0.260±0.077。vs. Control, ***P*<0.01, vs. MI, #*P*<0.05, ##*P*<0.01

HO-1 可明显减少心力衰竭大鼠细菌移位率及血浆内毒素含量, 该作用可能与 CO 保护肠道屏障结构有关。

参 考 文 献

[1] Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure[J]. N Engl J Med, 2002, 347(18): 1397-1402.

[2] Chen J, Normand SL, Wang Y, et al. National and regional trends in heart failure hospitalization and mortality rates for Medicare beneficiaries, 1998-2008[J]. JAMA, 2011, 306(15): 1669-1678.

[3] Fiore G, Brienza N, Cicala P, et al. Superior mesenteric artery blood flow modifications during off-pump coronary surgery[J]. Ann Thorac Surg, 2006, 82(1): 62-67.

[4] Krack A, Sharma R, Figulla HR, et al. The importance of the gastrointestinal system in the pathogenesis of heart failure[J]. Eur Heart J, 2005, 26(22): 2368-2374.

[5] Lundvig DM, Immenschuh S, Wagener FA. Heme oxygenase, inflammation, and fibrosis: the good, the bad, and the ugly?[J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 81.

[6] Alcaraz MJ, Fernandez P, Guillen MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway[J]. Curr Pharm Des, 2003, 9(30): 2541-2551.

[7] Niebauer J, Volk HD, Kemp M, et al. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study[J]. Lancet, 1999, 353(9167): 1838-1842.

[8] Anker SD, Egerer KR, Volk HD, et al. Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure[J]. Am J Cardiol, 1997, 79(10): 1426-1430.

[9] Sharma R, Bolger AP, Rauchhaus M, et al. Cellular endotoxin desensitization in patients with severe chronic heart failure[J]. Eur J Heart Fail, 2005, 7(5): 865-868.

[10] Genth-Zotz S, von Haehling S, Bolger AP, et al. Pathophysiologic quantities of endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha release in whole blood from patients with chronic heart failure[J]. Am J Cardiol, 2002, 90(11): 1226-1230.

[11] Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ Jr., et al. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor-alpha promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats[J]. Circulation, 1998, 97(14): 1382-1391.

[12] Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor[J]. Circulation, 2001, 104(7): 826-831.

(收稿日期: 2014-01-13)
(本文编辑: 戚红丹)

千卓坤, 张丽萍, 白洁, 等. 血红素氧合酶-1 保护心力衰竭大鼠肠道结构屏障 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8 (3): 476-480.

