

· 基础研究 ·

血红素氧合酶-1对心力衰竭大鼠肠道炎症的保护机制

干卓坤¹, 张 丽², 刘秀华³, 李瑞生⁴, 龚美亮⁵, 周 玉⁵, 张丽萍^{1*}

(解放军总医院: ¹老年心血管二科, ²老年心血管一科, ³病理生理研究室, ⁵南楼临床部检验科, 北京100853; ⁴解放军第302医院动物实验中心, 北京 100039)

【摘要】目的 研究血红素氧合酶-1 (HO-1) 对心力衰竭 (心衰) 大鼠肠道炎症的保护机制。**方法** 通过冠状动脉结扎术造成心肌梗死建立心衰大鼠模型 (雄性, Wistar大鼠), 每组10只, 分为心肌梗死 (MI) 模型组、MI + 钴-原卟啉 (MI + Copp) 组、MI + 锡-卟啉 (MI + SnMP) 组, 以正常大鼠作为对照组, 分别腹腔注射生理盐水、Copp溶液、SnMP溶液。8周后取门静脉及下腔静脉血检测血浆内毒素含量, 通过Western印迹测定小肠HO-1的表达, 比色法测定小肠一氧化碳 (CO) 浓度, 酶联免疫吸附法测定小肠肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-10水平。**结果** 与MI组比较, MI + Copp组HO-1和CO水平明显升高, 血浆内毒素含量减少, 肠道炎症减轻, 而MI + SnMP组HO-1无明显变化, CO明显降低, 血浆内毒素浓度升高, 小肠炎症加重。**结论** HO-1可抑制心衰大鼠肠道炎症, 该作用可能与CO有关。

【关键词】 血红素氧合酶-1; 心力衰竭; 炎症

【中图分类号】 R541.6

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2014.00087

Protective mechanism of heme oxygenase-1 on intestine in heart failure rats by suppression of intestinal inflammation

GAN Zhuo-Kun¹, ZHANG Li², LIU Xiu-Hua³, LI Rui-Sheng⁴, GONG Mei-Liang⁵, ZHOU Yu⁵, ZHANG Li-Ping^{1*}

(¹Department No.2 of Geriatric Cardiology, ²Department No.1 of Geriatric Cardiology, ³Department of Pathophysiology, ⁵Department of Geriatric Clinical Laboratory, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ⁴Experimental Animal Center, Chinese PLA Hospital No. 302, Beijing 100039, China)

【Abstract】Objective To investigate the underlying mechanism through which heme oxygenase-1 (HO-1) protects intestine against inflammation in rats with heart failure. **Methods** Heart failure model was established in male Wistar rats by myocardial infarction (MI) with coronary ligation. These model rats were randomized into 3 experimental groups (10 rats in each group): Myocardial infarction (MI), MI + cobalt protoporphyrin (Copp), and MI + stannum + mesoporphyrin IX dichloride (SnMP; a HO-1 inhibitor) groups, receiving intra-peritoneal injection of saline, cobalt protoporphyrin solution, and stannum mesoporphyrin IX dichloride solution, respectively. Another 10 rats served as normal controls and received intraperitoneal injection of normal saline. After 8 weeks, the endotoxin level in portal vein and inferior vena cava, the expression of HO-1, and the contents of carbon monoxide (CO), tumor necrosis factor (TNF)- α , and interleukin-10 in the intestine were determined by Western blotting, colorimetry, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with MI group, MI+Copp group had significantly elevated HO-1 and CO expression, reduced endotoxin, milder inflammation in the intestine, and these benefits were abolished by SnMP, with obviously decreased CO, elevated endotoxin and severer intestinal inflammation. **Conclusion** HO-1 suppresses intestinal inflammation, which may be associated with CO.

【Key words】 heme oxygenase-1; heart failure; inflammation

This work was supported by the Special Foundation of Academician LI Jie-Shou for Gut Barrier (LJS_201110).

Corresponding author: ZHANG Li-Ping, E-mail: zhanglp301@163.com

近50年来, 心力衰竭 (心衰) 发病率并无明显升高^[1], 但心衰总体病死率及住院率仍然较高, 这可能与冠心病治疗技术的发展使心肌梗死

(myocardial infarction, MI) 病死率下降有关^[2], 即由MI导致的心衰所占比例越来越大。发生心衰时, 为保证心脑肾等重要器官供血, 内脏血液供

收稿日期: 2014-01-13; 修回日期: 2014-03-10

基金项目: 黎介寿院士肠道屏障专项基金 (LJS_201110)

通信作者: 张丽萍, E-mail: zhanglp301@163.com

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,心衰时,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(heme oxygenase-1, HO-1)在炎症和应激等情况下具有保护作用^[5]。因此,本研究试图探讨诱导HO-1对心衰大鼠肠道炎症的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及心衰大鼠模型的建立

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64只,体质量160~180g,经适应性喂养2周后体质量240~260g,进行实验。冠状动脉结扎造成MI后,经胸短轴超声检查挑选心脏射血分数<50%的大鼠作为心衰大鼠,心脏射血分数≥50%的大鼠立即处死。

1.2 分组及治疗

心衰大鼠随机分为MI组、MI+锡中卟啉(stannum mesoporphyrin IX dichloride, SnMP; MI+SnMP)组、MI+钴-原卟啉(cobalt protoporphyrin, Copp; MI+Copp)组,每组10只;另外10只正常大鼠作为对照组。MI+SnMP组按0.2mg/100g体质量腹腔注射SnMP,2次/周;MI+Copp组按0.5mg/100g体质量腹腔注射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Sigma-Aldrich公司(UT, USA),SnMP试剂购自Frontier Scientific公司(Logan, UT, USA)。

1.3 取材方法

术后第8周,戊巴比妥钠40mg/kg体质量腹腔注射麻醉。严格无菌操作下V形切口暴露腹膜,依次取门静脉及下腔静脉血各3ml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)。距回盲部5cm向上依次取3~5cm回肠,PBS清洗后4%甲醛溶液固定待做病理检查;取3cm回肠用PBS清洗,纱布擦干立即液氮冷冻并转移至-70℃条件下保存。

1.4 血浆内毒素测定

门静脉血及下腔静脉血均3000r/min离心1min,通过酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血浆内毒素含量。试剂盒购自武汉华美生物工程公司。

1.5 Western印迹测定小肠HO-1表达

将大鼠小肠样本在裂解液[50mmol/L Tris缓冲液(pH 7.4), 150mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.5%

去氧胆酸, 0.1%十二烷基硫酸钠]中匀浆,用考马斯亮蓝法测定样本蛋白浓度(试剂盒购自南京建成生物工程研究所)。以10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离裂解蛋白(30μg/泳道),并通过电泳转印至PVDF膜(Millipore, USA)。以5%脱脂奶粉在PBST中封闭PVDF膜,放入抗HO-1抗体和抗β-肌动蛋白(actin)抗体(北京博奥森生物科技公司;1:1000)中4℃过夜。用TBST洗膜,在抗-兔IgG抗体(北京中杉金桥生物科技公司;1:3000)中孵育1h。曝光并洗片(Kodak, USA),采用紫外线光测定法(ultraviolet photometry, UVP)分析仪器(Thermo, USA)对胶片进行扫描,系统自动生成灰度值,以HO-1/β-actin灰度值比值表示蛋白表达水平。

1.6 比色法测定小肠一氧化碳(carbon monoxide, CO)浓度

所取小肠组织按质量/体积(w/v)=1:9在溶血剂里匀浆,将10μl 10%上清液加至2.5ml用于血红蛋白(hemoglobin, Hb)测定的稀释液,据540nm处吸光度值计算Hb浓度。20μl上清液加至2.5ml双缩脲试剂并在540nm处测定吸光度,将其与标准液、空白液的吸光度比较得到组织蛋白浓度。将0.2ml上清液加至2.3ml用于碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, HbCO)测定的稀释液,并分别在568nm及581nm处测定吸光度,将其与饱和HbCO上清稀释液样本及饱和氧合血红蛋白上清稀释液样本吸光度比较得到HbCO浓度。CO含量根据试剂盒推荐公式计算。试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.7 ELISA测定小肠肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α和白细胞介素(interleukin, IL)-10的含量

通过ELISA测定回肠组织中TNF-α和IL-10的浓度,试剂盒均购自武汉华美生物工程公司。

1.8 统计学处理

采用SPSS13.0统计软件进行统计分析。计量资料以均数±标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较采用post hoc test检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小肠HO-1的表达

如图1所示,与对照组比较,MI+Copp组($P < 0.01$)、MI组($P < 0.05$)和MI+SnMP组($P < 0.05$)HO-1表达均明显增高。与MI组比较,MI+Copp组HO-1表达明显增高($P < 0.01$),而MI+SnMP组差异无

统计学意义 ($P > 0.05$, 图2)。

2.2 血浆内毒素测定结果

由图3, 图4可见, 与对照组比较, MI组门静脉 ($P < 0.01$) 及下腔静脉 ($P < 0.05$) 血浆内毒素浓度明显升高; 与MI组比较, MI + SnMP组内毒素浓度进一步升高 ($P < 0.01$), 而MI + Copp组内毒素浓度显著降低 ($P < 0.05$)。

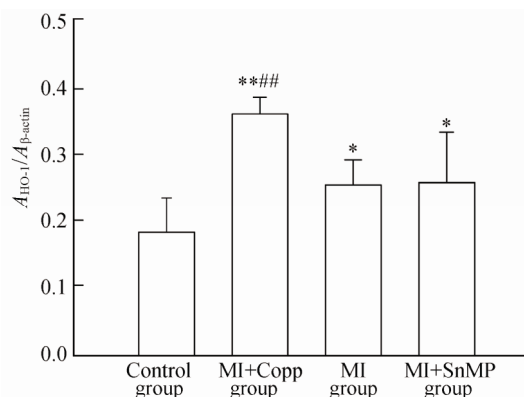


图1 Western印迹测定HO-1在小肠的表达

Figure 1 HO-1 expression in ileum determined by Western blot
HO-1: heme oxygenase-1; MI: myocardial infarction; Copp: cobalt protoporphyrin; SnMP: tin mesoporphyrin IX dichloride. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with MI group, ## $P < 0.01$

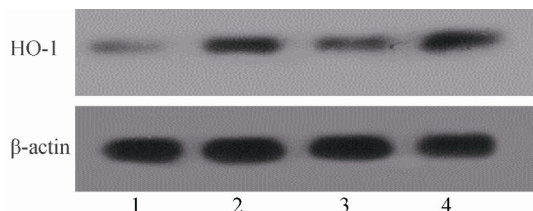


图2 Western blot测定各组HO-1和β-actin浓度

Figure 2 HO-1 and β -actin concentrations in all groups determined by Western blot

1: control group; 2: MI+Copp group; 3: MI group; 4: MI+SnMP group; HO-1: heme oxygenase-1; MI: myocardial infarction; Copp: cobalt protoporphyrin; SnMP: stannum mesoporphyrin IX dichloride

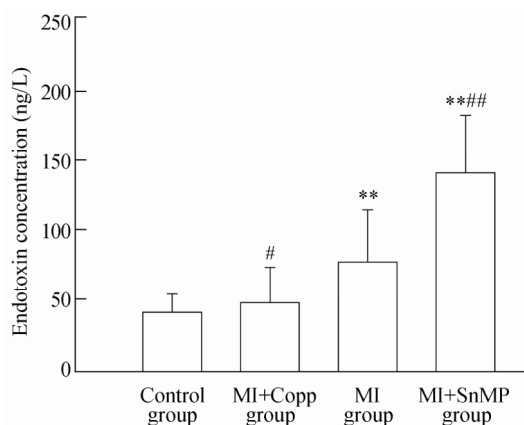


图3 门静脉血浆内毒素浓度

Figure 3 Endotoxin concentration in portal vein

MI: myocardial infarction; Copp: cobalt protoporphyrin; SnMP: stannum mesoporphyrin IX dichloride. Compared with control group, ** $P < 0.01$; compared with MI group, # $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

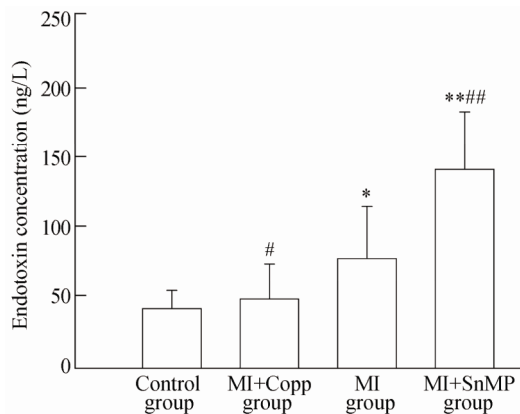


图4 下腔静脉血浆内毒素浓度

Figure 4 Endotoxin concentration in inferior vena cava

MI: myocardial infarction; Copp: cobalt protoporphyrin; SnMP: stannum mesoporphyrin IX dichloride. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with MI group, # $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

2.3 小肠TNF- α , IL-10和CO浓度

与对照组 (156.739 ± 40.699 ng/L) 比较, MI组回肠TNF- α 浓度明显升高 (272.877 ± 81.945 ng/L, $P < 0.05$)。与MI组比较, MI + Copp组回肠TNF- α 浓度明显降低 (196.034 ± 84.048 ng/L, $P < 0.05$), 且与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与MI组比较, MI + SnMP组回肠TNF- α 浓度明显升高 (313.591 ± 77.674 , $P < 0.05$)。

与对照组 (25.991 ± 11.753 ng/L) 比较, MI组回肠IL-10浓度 (39.039 ± 13.633 ng/L) 呈明显升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); MI + Copp组回肠IL-10浓度 (56.724 ± 16.413 ng/L) 显著升高, 与对照组和MI组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 而MI + SnMP组回肠IL-10浓度 (22.341 ± 9.607 ng/L) 明显降低, 与MI组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

如图5所示, 与对照组比较, MI组CO浓度明显升高 ($P < 0.05$), MI + Copp组CO浓度明显高于对照组 ($P < 0.01$) 和MI组 ($P < 0.05$), 而MI + SnMP组CO浓度明显低于MI组 ($P < 0.05$), 与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 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HO的诱导型, 将血红素分解为胆绿素、CO和亚铁离子。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可能表现出额外的抗应激机制^[5]。

肠道上皮屏障完整对防止肠道内细菌和内毒素进入体内发挥了重要作用。本研究采用急性MI后经

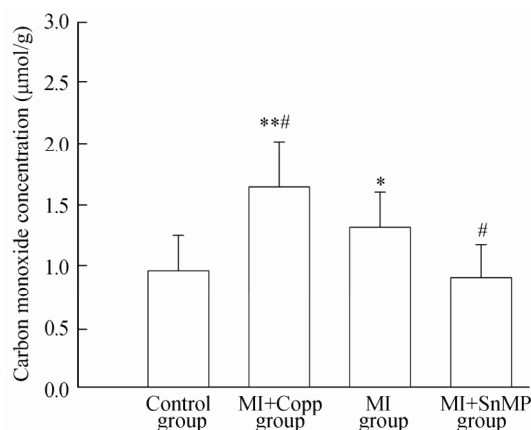


图5 小肠CO浓度

Figure 5 Carbon monoxide concentration in intestine
MI: myocardial infarction; Copp: cobalt protoporphyrin; SnMP: stannum mesoporphyrin IX dichloride. Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with MI group, # $P < 0.05$

胸短轴超声检查筛选心脏射血分数 $< 50\%$ 的大鼠作为心衰大鼠模型 (MI组), 并于术后饲养2个月以排除由于MI急性期造成的干扰。实验发现, 与对照组比较, MI组HO-1表达明显增加, 提示成功诱导心衰条件下肠道损伤应激, 并观察到肠道炎症和血浆内毒素浓度增加。

内毒素是革兰阴性菌细胞壁的组成部分, 通过心衰时水肿、低灌注的肠壁进入循环。Niebauer等^[6]发现出现水肿的心衰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^[7], 很小剂量即可导致TNF- α 释放^[8]。而TNF- α 既是反映心衰严重程度的标志物, 又是心衰的诱导物, 可加重肠道缺血、心室重塑和心室功能恶化^[9]。此外, 高浓度TNF- α 也可以诱发肠道上皮屏障改变, 从而形成恶性循环。

利用腹腔注射Copp诱导HO-1高表达, 可明显减少心衰大鼠肠道炎症因子 (TNF- α)、增加抗炎因子 (IL-10) 并降低血浆内毒素浓度。该获益提示HO-1对肠道有炎症抑制作用。SnMP是一种HO-1活性抑制剂, 抑制HO-1分解血红素产生CO的过程。腹腔注射SnMP并未影响心衰大鼠HO-1表达 ($P > 0.05$), 但明显抑制HO-1活性、降低CO浓度并抑制由诱导HO-1过度表达带来的获益, 提示HO-1的保护作用获益于CO途径。最近的一项研究^[10]表明, HO-1和CO对于突破肠道屏障的细菌具有清除作用, 而这一作

用并非继发于肠道上皮完整性的增加。

综上所述, 通过腹腔注射Copp可诱导心衰大鼠肠道HO-1过度表达, 增加肠道CO浓度并减少血浆内毒素含量、抑制心衰大鼠肠道炎症。腹腔注射SnMP在不影响心衰大鼠肠道HO-1表达的同时, 抑制HO-1活性从而减少CO生成, 并升高血浆内毒素含量、造成炎症恶化。提示HO-1通过减少炎症等机制对心衰大鼠肠道起保护作用, 该保护作用可能与CO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] 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.
- [7] Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances[J]. Inflamm Res, 2013, 62(7): 641-651.
- [8] 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.
- [9] Javed Q, Murtaza I. Therapeutic potential of tumour necrosis factor-alpha antagonists in patients with chronic heart failure[J]. Heart Lung Circ, 2013, 22(5): 323-327.
- [10] Onyiah JC, Sheikh SZ, Maharshak N, *et al.* Carbon monoxide and heme oxygenase-1 prevent intestinal inflammation in mice by promoting bacterial clearance[J]. Gastroenterology, 2013, 144(4): 789-798.

(编辑: 张青山)