

体外循环对机体铁稳态的影响及与心肌损伤的关系

桑永华¹,徐忠恒¹,徐中华¹,柏林²,朱锦富^{3*}

(¹苏州大学附属第二医院心胸外科,²风湿免疫科,江苏 苏州 215000;³南京医科大学第一附属医院心脏外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨体外循环(cardio pulmonary bypass,CPB)对机体铁稳态的影响及与心肌损伤的关系。方法:选取6例因心脏手术进行CPB的患者,对其CPB前(T0)、CPB 30 min(T1)、CPB结束时(T2)和结束后1 h(T3)的红细胞数(red blood cell, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、铁蛋白(ferritin, Fer)等指标进行检测;构建大鼠心肌缺血再灌注模型,取假手术组以及缺血30 min分别再灌注2 h、3 h、4 h后各组大鼠的心肌组织,real-time PCR法检测心肌组织中铁稳态调节激素(Hepcidin)、膜铁转运蛋白1(ferroportin1, Fpn1)和转铁蛋白受体1(transferrin receptor 1, Tfr1)的mRNA水平变化。Western blot方法检测上述3种基因的蛋白水平变化。HE染色方法检测心肌组织的炎症状态。结果:随着CPB进行,RBC、Hb逐渐下降,Fer逐步升高。在模拟体外循环过程的大鼠心肌缺血再灌注模型中,与假手术组相比,缺血30 min再灌注2 h、3 h、4 h组心肌中Hepcidin的mRNA和蛋白水平明显降低,但Fpn1和Tfr1的mRNA和蛋白水平均有不同程度的增加。并且随着再灌注时间的推移,增加幅度逐渐减小。并且,与假手术组相比,缺血再灌注对大鼠的心肌组织造成了一定程度的炎症损伤。结论:心肌缺血再灌注通过影响心肌组织中铁代谢相关基因Hepcidin、Fpn1和Tfr1的mRNA和蛋白表达水平从而影响血清铁状态,对心肌造成炎症损伤。

[关键词] 体外循环;心肌损伤;铁蛋白;铁稳态调节激素

[中图分类号] R654.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)06-728-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170615

铁是人体必需的微量元素之一,具有重要的生理功能,广泛参与氧运输、电子转运、DNA合成,细胞增殖、分化,基因表达调控等生命过程^[1-2]。随着对铁代谢研究的深入,研究者发现,大部分铁过载都会对机体造成严重损害。在铁过载状态下,过量的游离铁在细胞内可催化具有高反应破坏性的活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成,激活氧化应激反应,损伤细胞膜结构、蛋白质及DNA,进而导致细胞凋亡、组织损伤^[3],最终引起包括血色病、肝脏疾病、阿尔茨海默症、帕金森病、2型糖尿病、心血管疾病等多种疾病的发生^[4-7]。

大量研究发现多种铁代谢相关蛋白在机体内扮演了重要作用,如肝脏合成分泌的铁稳态调节激素(Hepcidin)具有抑制细胞铁吸收的功能,转铁蛋白受体1(transferrin receptor 1, Tfr1)介导了多种细胞的铁摄取,膜铁转运蛋白1(ferroportin 1, Fpn1)具有将铁从细胞内转运出细胞外的作用。这些蛋白通过协同合作的方式保持了体内铁含量的相对稳定^[8]。

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)应用于

心脏直视手术已经有数十年的历史。心脏手术操作和CPB都可导致心肌损伤,CPB造成心肌损伤的机制主要与体外循环后炎症反应及缺血再灌注损伤有关。但是含有高浓度铁的血液流经心脏,是否会对心肌造成损伤,影响心肌细胞代谢,这些方面目前尚无研究证明。鉴于此,本研究通过收集CPB患者血样,检测血常规以及血清铁等指标;并构建模拟CPB过程的大鼠心肌缺血再灌注模型,检测铁相关基因Hepcidin、Fpn1、Tfr1的mRNA和蛋白水平表达和心肌损伤情况,以期探索CPB对机体铁稳态的影响及与心肌损伤的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

选取苏州大学附属第二医院2014年1月—2015年6月行CPB下瓣膜置换手术的风湿性心脏病患者6例(男3例,女3例),所选患者均无肝、肾、肺功能异常,无血液系统疾病及铁代谢异常相关疾病,术前1周均未使用影响铁代谢的药物,所

[基金项目] 苏州市科技局应用基础研究计划项目(SYS201341);苏州大学青年教师自然科学基金项目(SDY2013A34);苏大附二院青年职工预研基金项目(SDFEYQN1307)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zjf73cool@163.com

有患者实验过程采血期间均未输注红细胞及全血。患者均由同一组医师完成手术。分别于 CPB 前(T0)、CPB 30 min(T1)、CPB 结束时(T2)和结束后 1 h(T3)4 个时间点于桡动脉置管处取血。分别测定 T0、T1、T2、T3 时间点的红细胞数 (red blood cell, RBC)、血红蛋白(hemoglobin, Hb)水平。用生化测定仪测定血清铁蛋白(ferritin, Fer)水平。此部分由苏州大学附属第二医院中心实验室完成。

雄性大鼠,体重约 200~250 g,由苏州大学实验动物中心提供。大鼠分为 4 组,分别为假手术组(Sham)、缺血 30 min 再灌注 2 h 组(IR-2 h)、缺血 30 min 再灌注 3 h 组(IR-3 h)、缺血 30 min 再灌注 4 h 组(IR-4 h)。

Hepcidin、Fpn1 和 Tfr1 抗体 (Abcam 公司,英国);山羊抗大鼠 β -actin 抗体、山羊抗大鼠二抗、羊抗兔二抗(北京康为世纪);逆转录试剂盒(Invitrogen 公司,美国)、TRIzol、SYBR Green Master Mix (TaKaRa 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的建立方法

5%戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠(每 100 g 体重 1.5 mg);固定大鼠四肢及头部;沿大鼠颈部剪开一横行切口,钝性分离,沿右侧斜行切开,钝性分离大鼠右侧颈内静脉,进行静脉插管,固定。然后沿颈部正中分离大鼠气管,同时预插入细线,血管钳轻微牵拉气管向左侧,钝性分离右侧颈动脉,行动脉插管,再固定。随后进行气管插管,固定,连接小动物呼吸机,开放氧气及二氧化碳。接下来沿大鼠剑突左侧约 1 cm 剪一横行切口,钝性分离至腋下,沿右侧斜行切开,沿原切口部位剪开肋间外肌,钝性分离至腋下,固定皮肤及肋间外肌。沿大鼠左侧腋下第三肋间开胸,开胸器撑开,以血管钳撕开大鼠心包膜,持针器持针结扎大鼠心脏左前降支,稳定 30 min。血管钳压迫大鼠心脏左前降支,造成缺血 30 min。松开血管钳,再灌注 2、3、4 h 后,立即取下大鼠心脏,剪去大鼠右心室、主动脉及左心耳,保留左心室,-80℃冰箱冻存。

1.2.2 Western blot

取大鼠心肌组织 35 mg,用细胞裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂按 100:1:1 配置的混合液裂解细胞,冰浴 20 min 后收集裂解上清;测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳,并转至 PVDF 膜;TBST 洗涤,室温封闭 1 h;一抗孵育 4℃过夜, TBST 洗涤 4 次;二抗孵育 2 h, TBST 洗涤 4 次后;ECL 化学发光及显影,每个实验均重复 3 次。

1.2.3 real-time PCR

取大鼠心肌组织 35 mg,加入 TRIzol 静置 10 min,加入氯仿分层,12 000 r/min 4℃离心 15 min,取上清加入等量异丙醇,混匀静置,12 000 r/min 4℃离心 15 min,可见管底 RNA,用 DEPC 配置的 75%乙醇纯化 RNA,离心 2 次并干燥后,用 DEPC 水溶解 RNA,测 RNA 浓度。

按照美国 Invitrogen 公司反转录试剂盒说明书,将 1 μ L RNA、1 μ L 引物、1 μ L 10 mmol/L dNTP 和 9 μ L DEPC 水混合物于 65℃加热 5 min 后置于冰上迅速冷却离心;加入 4 μ L 5 \times 缓冲液、2 μ L DTT 和 1 μ L DEPC 水,混匀离心,室温下加入 MLV 逆转录酶混匀离心 2 min;25℃孵育 10 min,37℃50 min,70℃15 min 后终止反应,测 cDNA 浓度。将 20 μ L 体系(2.0 μ L cDNA,9.0 μ L SYBR Green,0.2 μ L 上游引物,0.2 μ L 下游引物 R,8.6 μ L 无菌水)加入 96 孔板进行 real-time PCR 反应,来检测 Hepcidin、Fpn1 和 Tfr1 基因的表达。基因引物序列如下:Hepcidin 上游引物 5'-CAACAGACGAGACAGACTACGG-3',下游引物 5'-TATGCAACAGAGACCACAGGAG-3'; Fpn1 上游引物 5'-TCAT-TGGCTGTGGTTTCATT-3',下游引物 5'-ATTCAAGTTCACGGATGTTAGAG-3'; Tfr1 上游引物 5'-TCTCATTTCAGGGCA-3',下游引物 5'-TTACCCTCAAACACCATT-3'; β -actin 上游引物 5'-GAAATCGTGCCTGACATTAAG-3',下游引物 5'-ACTCATCGTACTCCTGCTTGGCT-3'。95℃预变性 10 min;95℃15 s,60℃1 min 进行 35 个循环;72℃延伸 10 min。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (C_t 为循环阈值)方法进行相对定量分析,3 种基因均以 β -actin 为内参,每个实验均重复 3 次。

1.2.4 HE 染色

存放在福尔马林溶液中的心肌组织,经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、摊片等步骤得到心肌组织病理切片,苏木素-伊红(HE)染色。观察心肌缺血再灌注前后心肌组织受损情况。

1.3 统计学方法

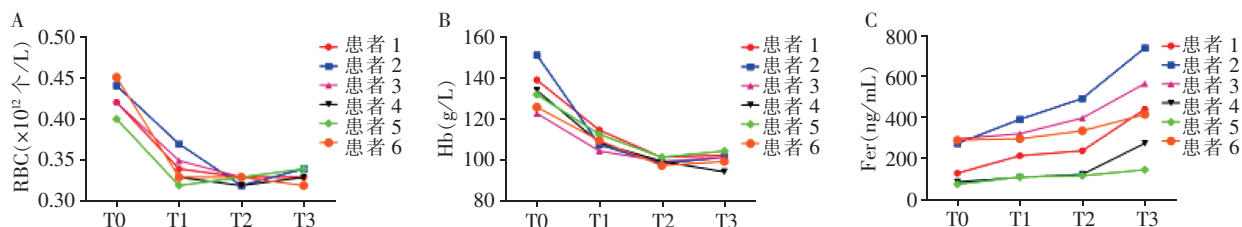
采用 GraphPad Prism 5.02 统计软件,各组计量资料以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者 CPB 过程中血常规和血清铁的变化

6 例患者 CPB 过程的 T0、T1、T2、T3 4 个时间段的血样中,检测 RBC、Hb 和 Fer 变化,结果显示,随

着 CPB 进行,RBC、Hb 呈现逐渐下降的趋势,Fer 呈 现逐步升高趋势(图 1)。



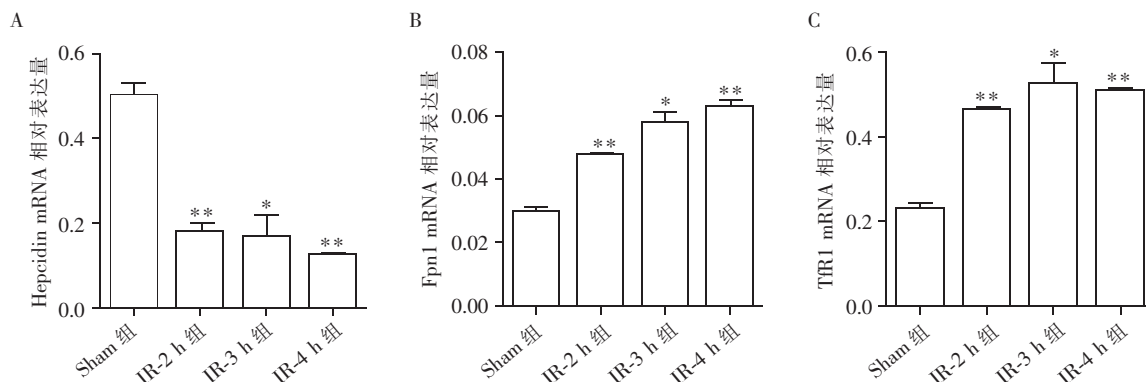
A:CPB 手术患者血 RBC 变化;B:CPB 手术患者血 Hb 变化;C:CPB 手术患者血 Fer 变化。

图 1 体外循环手术患者血清中血常规和血清铁变化

2.2 大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织中 Hpcidin、Fpn1 和 Tfr1 mRNA 水平的变化

检测 Sham、IR-2 h、IR-3 h、IR-4 h 组心肌组织中 Hpcidin、Fpn1 和 Tfr1 的 mRNA 水平。结果发现,和 Sham 组比较,心肌缺血 30 min 再灌注

2、3、4 h 后心肌组织中 Hpcidin mRNA 表达水平明显降低,并且随着再灌注时间延长,降低幅度逐渐减小;Fpn1 和 Tfr1 mRNA 表达水平明显升高,并且随着再灌注时间延长,升高趋势逐渐减小(图 2)。



A:大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织中 Hpcidin mRNA 水平的变化;B:大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织中 Fpn1 mRNA 水平的变化;C:大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织中 Tfr1 mRNA 水平的变化。与 Sham 组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.01$ 。

图 2 大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织中 Hpcidin、Fpn1、Tfr1 mRNA 水平的变化

2.3 大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌组织中 Hpcidin、Fpn1 和 Tfr1 蛋白水平的变化

为了进一步研究 Hpcidin、Fpn1 和 Tfr1 3 种铁代谢相关基因的表达与功能,检测了 Sham、IR-2 h、IR-3 h、IR-4 h 组心肌组织中 Hpcidin、Fpn1 和 Tfr1 的蛋白表达水平。结果发现,和 Sham 组比较,心肌缺血 30 min 再灌注 2 h、3 h、4 h 组心肌组织中 Hpcidin 蛋白表达水平明显降低,而 Fpn1 和 Tfr1 蛋白表达水平呈升高趋势(图 3)。

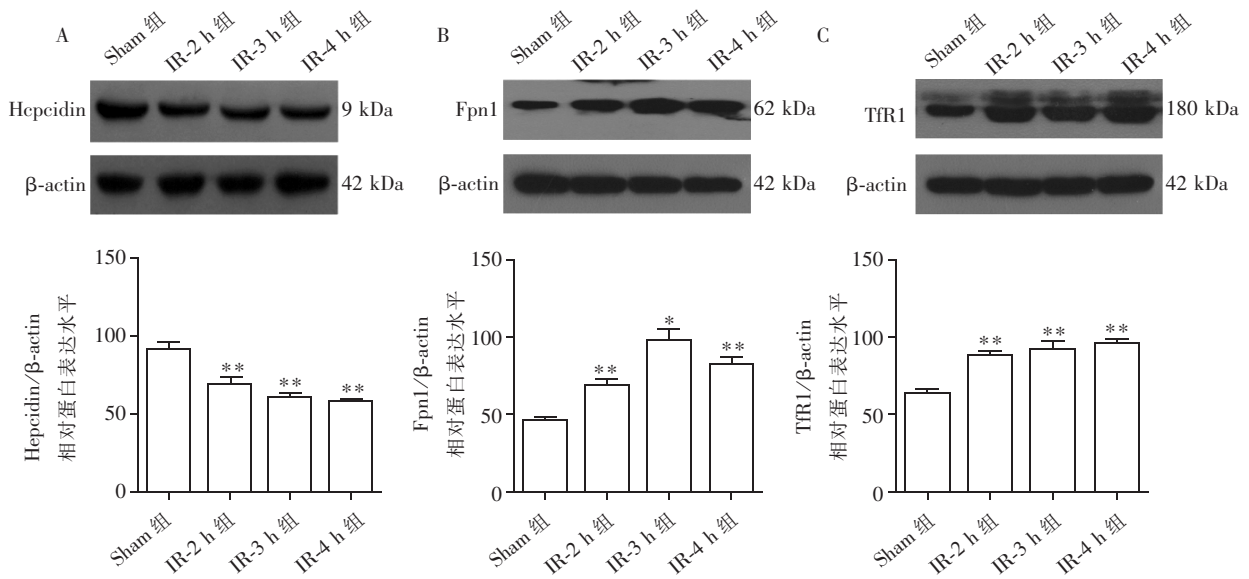
2.4 大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌组织炎症损伤程度的变化

为了检验模拟 CPB 过程的心肌缺血再灌注是否对心肌组织造成了炎症损伤,通过 HE 染色的方法发现,在 Sham 组血管壁附近有很少的中性粒细胞,心肌纤维完整,排列整齐,着色均匀且条纹清晰,无变性坏死,间质未见炎症细胞浸润(图 4A)。缺血再

灌注组血管壁可见大量中性粒细胞聚集,心肌纤维着色不均匀,条纹排列紊乱,大面积坏死,间质有大量炎症细胞浸润(图 4B、C、D)。

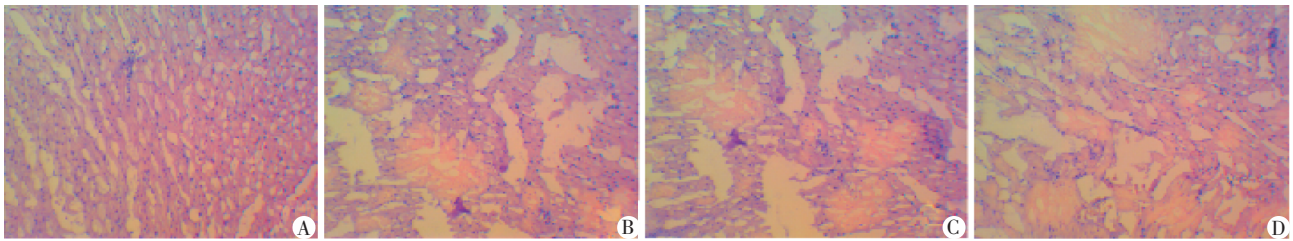
3 讨论

Hpcidin 是肝脏分泌的一种小分子肽,属防卫素蛋白家族。铁元素以二价铁离子的形式在十二指肠和空肠上段被吸收,进入肠上皮细胞,细胞中的铁需要运铁素才能转运出细胞,与转铁蛋白结合成为功能状态铁。Hpcidin 可以结合运铁素,使其内陷分解,进而负性调节十二指肠上皮细胞中铁的吸收^[11]。一旦出现 Hpcidin 表达的下降,就会造成机体对铁的吸收增加,从而引起铁超载。也有研究发现 Hpcidin 的表达增加可造成贫血的发生^[12]。Hpcidin 具有抑制某些细菌和真菌生长繁殖的作用,是机体“天然免疫”重要的效应分子,同时可抑制肠道铁吸收和单核



A:大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织中 Hepcidin 蛋白水平的变化;B:大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织中 Fpn1 蛋白水平的变化;C:大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织中 Tfr1 蛋白水平的变化。与 Sham 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 3 大鼠心肌缺血再灌注后心肌组织中 Hepcidin、Fpn1、Tfr1 蛋白水平的变化



A:Sham 组;B:IR-2 h 组;C:IR-3 h 组;D:IR-4 h 组。

图 4 心肌组织 HE 染色($\times 100$)

巨噬细胞系统铁释放,是一种重要的负性铁调节激素,在遗传性血色病、慢性贫血等铁代谢相关性疾病发病机制中发挥着重要作用。本研究表明,心肌缺血再灌注后,Hepcidin 表达降低,而且随着再灌注时间延长,表达降低幅度逐渐减小至持平。因此,心肌缺血再灌注诱导的 Hepcidin 表达降低可能是造成血清铁过载的重要原因。

Fpn1 是哺乳动物细胞内参与铁代谢的一种铁调节跨膜蛋白。位于小肠上皮吸收细胞基底侧的 Fpn1 具有使铁从吸收细胞内释放到血液循环的功能^[13],主要在肝细胞、巨噬细胞等细胞中表达。也有报道指出,Hepcidin 的表达对 Fpn1 有着一定的负调节作用^[14]。本研究发现,心肌缺血再灌注后,Fpn1 的表达上升。可能是由于 Hepcidin 表达降低可诱导 Fpn1 表达增加,膜 Fpn1 蛋白表达上升,因而造成心肌细胞铁释放增加,血清铁含量升高,造成铁过载现象。

Tfr1 是一种大约含有 760 个氨基酸的 II 型跨

膜糖蛋白,其由两个相同亚基经二硫键交联形成二聚体,分子量约 180 kDa^[15]。Tfr1 几乎在所有哺乳动物组织和细胞中都有或多或少的表达,总体来说,对铁功能需求多的组织或细胞对 Tfr1 表达有更高要求,比如红细胞分化过程中就需要大量铁元素参与,所以红细胞表达较多 Tfr1^[16]。当缺铁时,Tfr1 的表达水平增高,当铁负荷过多时,Tfr1 的表达水平则降低^[17]。本研究中心肌缺血再灌注后 Tfr1 表达水平升高,可能是因为心肌 Fpn1 含量升高造成心肌细胞铁释放增加,导致心肌细胞内短期缺铁,从而诱导了 Tfr1 表达水平的升高。

虽然 CPB 技术在不断进步和发展,但是由 CPB 引起的许多并发症还在影响着心脏手术的成功率。其中 CPB 对血液系统的影响越来越受到关注。CPB 过程中对血细胞的机械性损伤,缺氧、酸中毒、氧自由基所造成的化学性损伤,还有补体激活所致的免疫性损伤均可以严重破坏红细胞、血小板等,从而导致术后贫血、凝血功能异常,心肺损伤等并发症^[18],所引

起的后果不容忽视。

本研究通过采集临床患者行CPB后的血样,对部分血常规和血清铁含量等指标进行检测。由于获得行CPB手术的心肌组织有一定困难,因此本研究构建了模拟CPB过程的大鼠心肌缺血再灌注模型,检测了Hepcidin、Fpn1和TfR1 3种铁相关基因的表达水平。初步结果表明,经过CPB(缺血再灌注)后,红细胞遭到破坏,红细胞中的铁释放到血液中,致使血清中铁过载,造成Hepcidin表达减少,同时Fpn1表达升高,心肌细胞内TfR1表达水平升高。并且铁过载产生的炎症造成了心肌细胞损伤。鉴于此,本研究为降低心肌损伤和临床心肌保护等方面提供了理论依据,为进一步降低心脏手术并发症提供了可行的防治措施。

[参考文献]

- [1] Zhang Z, Zhang F, An P, et al. Ferroportin1 deficiency in mouse macrophages impairs iron homeostasis and inflammatory responses[J]. *Blood*, 2011, 118(7):1912-1922
- [2] Ba Q, Hao M, Huang H, et al. Iron deprivation suppresses hepatocellular carcinoma growth in experimental studies [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(24):7625-7633
- [3] Li GF, Pan YZ, Sirois P, et al. Iron homeostasis in osteoporosis and its clinical implications[J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23(10):2403-2408
- [4] Sipe JC, Lee P, Beutler E. Brain iron metabolism and neurodegenerative disorders[J]. *Dev Neurosci*, 2002, 24(2/3):188-196
- [5] Merono T, Sorroche P, Brites FD. Increased iron store and its relationship with cardiovascular disease [J]. *Medicina (B Aires)*, 2011, 71(6):566-572
- [6] Aamodt AH, Stovner LJ, Thorstensen K, et al. Prevalence of haemochromatosis gene mutations in Parkinson's disease [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2007, 78(3):315-317
- [7] Mills E, Dong XP, Wang F, et al. Mechanisms of brain iron transport: insight into neurodegeneration and CNS disorders[J]. *Future Med Chem*, 2010, 2(1):51-64
- [8] Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism [J]. *Cell*, 2004, 117(3):285-297
- [9] Liu B, Liang G, Xu G, et al. Intervention of rosiglitazone on myocardium Glut-4 mRNA expression during ischemia-reperfusion injury in cardio-pulmonary bypass in dogs [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 373(1/2):279-284
- [10] Collins JF, Wessling-Resnick M, Knutson MD. Hepcidin regulation of iron transport [J]. *J Nutr*, 2008, 138(11):2284-2288
- [11] De Domenico I, McVey Ward D, Kaplan J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1):72-81
- [12] Roy CN, Mak HH, Akpan I, et al. Hepcidin antimicrobial peptide transgenic mice exhibit features of the anemia of inflammation [J]. *Blood*, 2007, 109(9):4038-4044
- [13] Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter [J]. *Nature*, 2000, 403(6771):776-781
- [14] Yeh KY, Yeh M, Glass J. Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286(3):G385-394
- [15] Yang WM, Jung KJ, Lee MO, et al. Transient expression of iron transport proteins in the capillary of the developing rat brain [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(1):93-99
- [16] Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of iron absorption [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2002, 29(3):336-355
- [17] Eisenstein RS. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism [J]. *Annu Rev Nutr*, 2000, 20:627-662
- [18] Poelaert J, Roosens C. Prevention of pulmonary dysfunction after cardiac surgery by a vital capacity maneuver: is it so simple [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(2):762-763

[收稿日期] 2016-05-03

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnm.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
 审理情况。