

硫化氢对异丙肾上腺素诱导小鼠急性心肌损伤的保护作用及机制研究

王红霞¹, 孟国梁², 谢佳彤², 张婧瑶², 于锦^{1,2*}

¹盐城市第一人民医院药学部, 江苏 盐城 224001; ²南通大学药学院药理学系, 江苏 南通 226001

[摘要] 目的: 观察硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)对异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导小鼠急性心肌损伤的保护作用及可能机制。方法: 12周龄C57BL/6小鼠, 腹腔注射H₂S供体硫氢化钠(NaHS)10 μmol/(kg·d)2周, 然后再联合给予大剂量ISO[150 mg/(kg·d)]皮下注射2 d, 观察心肌组织病理结构, 检测血浆肌酸激酶(creatin kinase, CK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性, 评估心肌组织活性氧、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性与表达。结果: NaHS预处理改善大剂量ISO诱导的小鼠心肌组织病理结构紊乱, 降低血浆CK和LDH活性, 降低心肌活性氧和MDA水平, 提高心肌T-AOC, 增强心肌SOD活性和表达。结论: H₂S减轻ISO诱导小鼠急性心肌损伤, 机制可能与提高SOD表达与活力、减轻氧化应激有关。

[关键词] 硫化氢; 异丙肾上腺素; 氧化应激; 超氧化物歧化酶

[中图分类号] R972

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)03-305-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180305

Protective effects and mechanisms of hydrogen sulfide on isoproterenol induced acute myocardial injury in mice

Wang Hongxia¹, Meng Guoliang², Xie Jiatong², Zhang Jingyao², Yu Jin^{1,2*}

¹Department of Pharmacy, Yancheng City No.1 People's Hospital, Yancheng 224001; ²Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Nantong University, Nantong 226001, China

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effects and mechanisms of hydrogen sulfide (H₂S) on isoproterenol (ISO) induced acute myocardial injury in mice. **Methods:** C57BL/6 mice of 12-week-old were subcutaneously injected with H₂S donor NaHS[10 μmol/(kg·d)] for 2 weeks, and then large dosage of ISO[150 mg/(kg·d)] was jointly given by subcutaneous injection for 2 days. Pathological structures of myocardium were assessed. Activities of creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase (LDH) in plasma were measured. Levels of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC), activity and expression of superoxide dismutase (SOD) in myocardium were detected. **Results:** NaHS pretreatment improved ISO induced pathological disorder in the myocardium, reduced CK and LDH activity in the plasma, decreased the level of myocardial ROS and MDA, improved myocardial T-AOC, enhanced myocardial SOD activity and expression. **Conclusion:** H₂S alleviated ISO induced acute myocardial injury in mice, which might be associated with the improvement of SOD expression and activity, and the reduction of oxidative stress.

[Key words] hydrogen sulfide; isoproterenol; oxidative stress; superoxide dismutase

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(03):305-309]

急性心肌损伤是指由于冠状动脉血供不足、心

[基金项目] 国家自然科学基金(81400203);南通市自然科学基金(MS12015015)

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

肌炎症等多种因素造成的心肌局部严重而持续地缺血缺氧导致的心肌坏死,主要表现为心绞痛或急性心肌梗死,极易引发心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭,乃至诱发心源性猝死,是心血管疾病不良事件的重要原因之一^[1]。急性心肌损伤的病理生理学

机制尚未完全阐明,可能与代谢产物堆积、细胞凋亡增多、能量循环障碍及氧化应激增强等因素有关,其中短时间内包括大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)在内的氧化应激剧增是重要机制之一^[2]。

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是目前广受关注的气体信号分子,具有抑制心肌肥大、减轻心肌纤维化、保护心肌缺血再灌注损伤、拮抗动脉粥样硬化等心血管保护作用^[3],但H₂S对急性心肌损伤保护作用的机制尚不明确。本研究拟利用H₂S供体硫氢化钠(NaHS),观察其对大剂量异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导小鼠急性心肌损伤的保护作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料

12周龄健康雄性C57BL/6小鼠(南通大学实验动物中心),ISO、NaHS(Sigma-aldrich公司,美国),TRIzol Reagent、逆转录试剂盒、SYBR Green Premix (TaKara公司,日本),血浆肌酸激酶(creatine kinase, CK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(上海碧云天生物技术研究所)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

将24只C57BL/6小鼠随机分为4组(每组6只):生理盐水空白对照组(NS组)、异丙肾上腺素组(ISO组)、异丙肾上腺素+硫氢化钠组(ISO+NaHS组)和硫氢化钠组(NaHS组)。NS组和ISO组分别腹腔注射生理盐水(normal saline, NS)2周,ISO+NaHS组和NaHS组腹腔注射NaHS 10 μmol/(kg·d)持续2周。2周后,NS组继续注射生理盐水,ISO组持续皮下注射ISO 150 mg/(kg·d)^[4],ISO+NaHS组联合注射ISO 150 mg/(kg·d)和NaHS 10 μmol/(kg·d),NaHS组继续单独注射NaHS 10 μmol/(kg·d),2 d后取血液和心脏样本,进行各项指标的检测。4组小鼠分笼饲养,温度控制在20℃,照明符合12 h昼夜循环,保持自由进食饮水,每日定时给药1次。

1.2.2 心肌组织HE染色

给药结束后,取小鼠心脏左室,4%多聚甲醛固定24 h,常规石蜡切片并进行HE染色,观察心肌组织的病理学结构。

1.2.3 血浆LDH和CK测定

取自颈总动脉的血液样本与乙二胺四乙酸钠(15 mg/mL)轻轻混合后离心(1 000 g, 4℃, 15 min),按照试剂盒操作说明测定血浆CK、LDH活力,每次测量2次取平均值,单位用U/L表示。

1.2.4 心肌组织ROS检测

通过荧光探针二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)染色,检测心肌组织中ROS产生情况,具体操作按如下步骤进行:心肌组织冰冻切片(5 μm)用含DHE(2 μmol/L)的HEPES缓冲液(NaCl 99.0 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, KH₂PO₄ 1.0 mmol/L, CaCl₂ 1.9 mmol/L, NaHCO₃ 25.0 mmol/L, 葡萄糖 11.1 mmol/L, NaHEPES 20.0 mmol/L; pH7.4)37℃下避光孵育30 min,在激发波长和发射波长分别为480 nm和610 nm下用荧光显微镜(Nikon公司,日本)检测荧光强度。

1.2.5 心肌组织MDA、T-AOC和SOD活力测定

心肌MDA水平按试剂盒所述硫代巴比妥酸法操作说明进行,单位用为nmol/mg蛋白表示;心肌T-AOC按试剂盒所述快速2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸法[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS)]法的操作说明进行,单位用μmol/mg蛋白表示;心肌SOD活性按试剂盒所述2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐[[2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt, WST-8]法的操作说明进行,单位用U/mg蛋白表示。

1.2.6 实时荧光定量PCR

用TRIzol试剂提取心肌组织总RNA,逆转录成DNA后,加入SYBR Green Premix进行实时定量PCR(ABI 7500型PCR系统)。18S作为看家基因,每个cDNA重复3次,以NS组为参照,计算各组样本相对mRNA的表达。引物序列如下:Cu/Zn-SOD-F:5'-GAAGAGAGGCATGTTGGAGA-3',Cu/Zn-SOD-R:5'-CCAATTACACCACGAGCCAA-3';Mn-SOD-F:5'-TTCAATAAGGAGCAGGGAC-3',Mn-SOD-R:5'-CAGTGTAAGGCTGACGGTTT-3';18S-F:5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACACA-3',18S-R:5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3'。

1.3 统计学方法

采用Stata13.0软件进行统计学分析。以上结果均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用SNK检验, $P \leq 0.05$

为差异有统计学意义。

2 结果

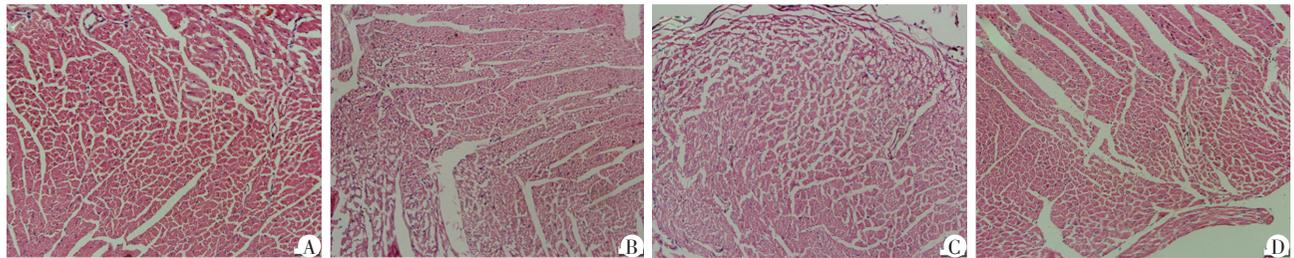
2.1 NaHS改善ISO诱导小鼠心肌损伤后的心肌组织病理结构

NS组小鼠心肌细胞排列规整,形状相对规则;大剂量ISO注射2 d后心肌细胞排列变得紊乱,可见大量空泡、严重扭曲及变形;NaHS预处理小鼠心肌细胞损伤程度及范围明显减轻,而单独给予NaHS对心肌组织病理结构无明显影响,提示NaHS可以

减轻大剂量ISO导致的急性心肌损伤(图1)。

2.2 NaHS降低ISO诱导小鼠心肌损伤后血浆CK和LDH活性

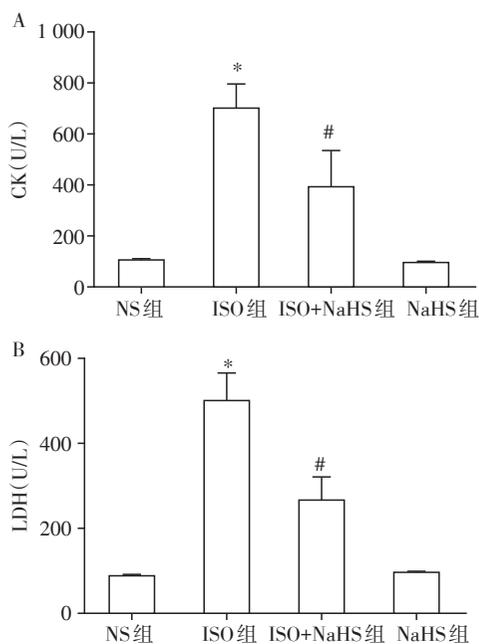
心肌受损后释放大量的CK和LDH,迅速增加循环中CK和LDH水平,因此测定血浆中CK和LDH水平可以间接评估心肌损伤程度^[5]。研究发现:小鼠注射大剂量ISO 2 d后,血浆CK和LDH水平较NS组明显增强($P < 0.01$),表明大量心肌坏死;NaHS预处理明显降低血浆中CK和LDH水平($P < 0.01$),表明ISO诱导的心肌损伤得到明显抑制(图2)。



A: NS组; B: ISO组; C: ISO+NaHS组; D: NaHS组。

图1 NaHS对ISO诱导小鼠心肌损伤后心肌组织病理结构的影响(HE, ×200)

Figure 1 Effects of NaHS on pathological structure of myocardium in ISO-induced myocardial injury of mice(HE, ×200)



与NS组相比, * $P < 0.01$; 与ISO组相比, # $P < 0.01$ ($n=6$)。

图2 NaHS对ISO诱导小鼠心肌损伤后血浆CK(A)和LDH(B)活性的影响

Figure 2 Effects of NaHS on plasma CK(A) and LDH(B) activity in ISO-induced myocardial injury of mice

2.3 NaHS减轻ISO诱导小鼠心肌损伤后心肌组织氧化应激水平

大剂量ISO注射2 d后小鼠心肌组织DHE染色

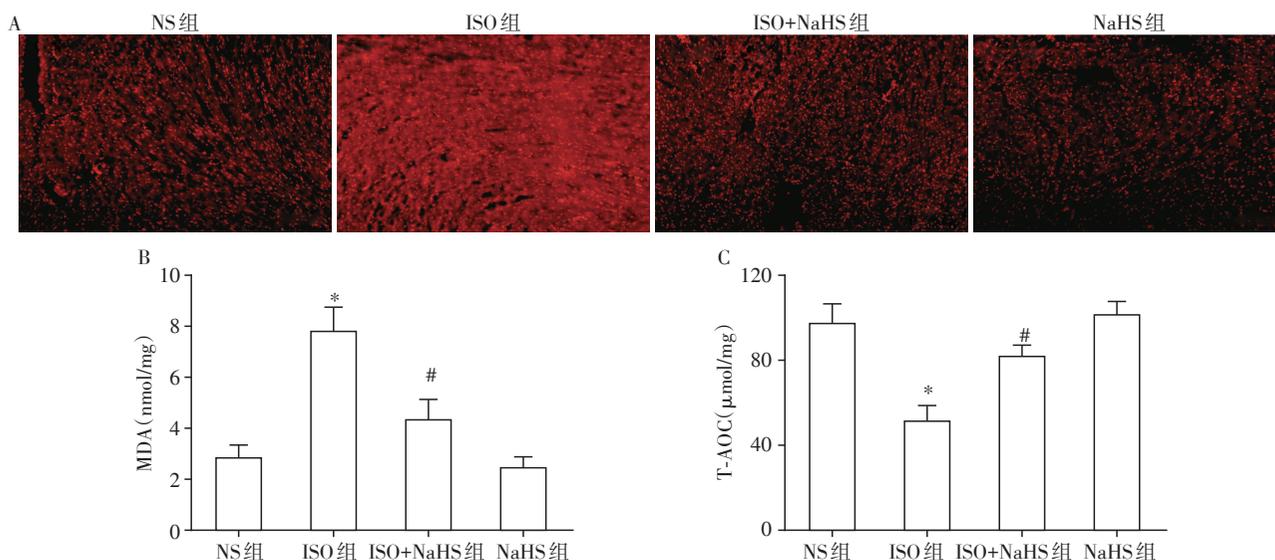
荧光强度明显增强,MDA水平增加,T-AOC下降($P < 0.01$),表明ISO诱导心肌损伤中氧化应激程度明显增加;NaHS预处理明显抑制DHE荧光强度,降低MDA水平,增强总抗氧化能力($P < 0.05$),减轻氧化应激的程度(图3)。

2.4 NaHS增强ISO诱导小鼠心肌损伤后心肌组织SOD活力和表达

大剂量ISO注射2 d后小鼠心肌组织总的SOD(主要为线粒体Mn-SOD)活力下降,Mn-SOD基因表达亦明显减少($P < 0.01$);NaHS预处理明显增强心肌组织总SOD和线粒体Mn-SOD活力($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),增加线粒体Mn-SOD基因表达($P < 0.01$),但对主要分布于胞浆的Cu/Zn-SOD活力和表达无明显影响。单独给予NaHS对SOD活力和表达均无明显影响(图4)。

3 讨论

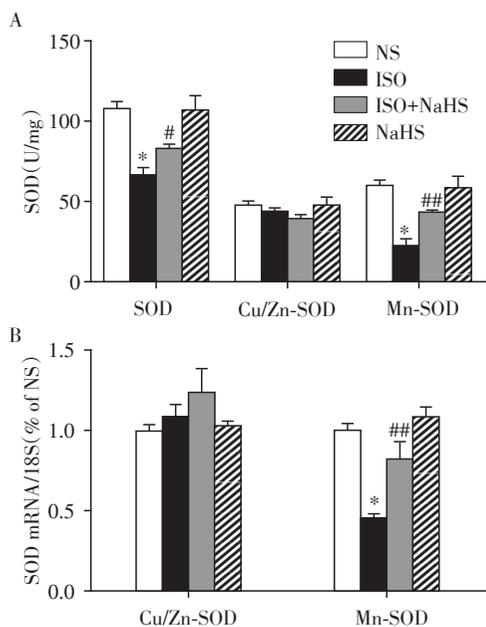
ISO作为一个 β 受体激动药,激动心肌 β_1 受体后,会使得心率加速,心肌收缩力增强,心输出量增大;但剂量过大时,会造成心耗氧量过高,超过冠状动脉供血供氧能力,造成心肌急性缺血缺氧,线粒体功能受损,大量氧自由基产生,诱发心肌损伤^[6]。本研究中,大剂量ISO连续注射2 d后,小鼠心肌组织病理结构紊乱,氧化应激水平加重,心肌损伤严重。



A: 心肌组织DHE染色结果($\times 200$); B: 心肌组织MDA水平比较; C: 心肌组织T-AOC比较, 与NS组相比, $P < 0.01$; 与ISO组相比, $P < 0.05$ ($n=6$)。

图3 NaHS对ISO诱导小鼠心肌损伤后心肌组织氧化应激水平的影响

Figure 3 Effects of NaHS on myocardial oxidative stress in ISO-induced myocardial injury of mice



与NS组相比, $P < 0.01$; 与ISO组相比, $^*P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ ($n=6$)。

图4 NaHS对ISO诱导小鼠心肌损伤后心肌组织SOD活力与表达的影响

Figure 4 Effects of NaHS on activity and expression of SOD in ISO-induced myocardial injury of mice

氧化应激指机体自由基、ROS或活性氮总量较大,合并或仅消除能力受损,机体氧化与还原平衡被打破,产生氧化损伤。既往研究发现H₂S对多种组织细胞具有抗氧化应激能力。在Ang II诱导的人脐静脉内皮细胞中,NaHS可减轻氧化应激,改善内质网应激^[7];NaHS减轻同型半胱氨酸诱导下Lan-

gendorff离体灌流心脏的多项氧化应激指标,降低硫代巴比妥酸类物质、亚硝酸盐、超氧阴离子自由基和过氧化氢(H₂O₂)等浓度^[8];H₂S缓释剂GY4137抑制脂多糖诱导下肺脏氧化应激,减轻急性肺损伤^[9];抑制自发性高血压大鼠胸主动脉氧化应激水平,改善内皮依赖性舒张功能^[10]。本研究发现NaHS可明显改善大剂量ISO诱导的小鼠心肌病理结构,抑制活性氧水平,减轻血浆CK和LDH水平,改善心肌损伤。

但到目前为止,H₂S抗氧化应激的机制尚未完全阐明。研究发现H₂S可明显下调四氢吡啶诱导引起的小鼠脑胶质细胞氧化应激,但对解偶联蛋白2(uncoupling protein 2,UCP2)敲除小鼠的保护作用消失,提示H₂S依赖UCP2在脑胶质细胞中发挥抗氧化应激作用^[11];Na₂S通过增加蛋白酶体功能减轻缺血诱导的心力衰竭,提高心功能,改善心肌重构,但对NF-E2相关因子2(NF-E related factor 2,Nrf2)敲除小鼠的保护作用消失^[12];H₂S可促进血管内皮细胞Nrf2和Keap1分离,增加Nrf2核转录,抑制超氧阴离子生成;下调Nrf2表达后,上述改善作用明显减弱;H₂S抑制链脲菌素诱导后LDL^{-/-}小鼠动脉粥样斑块面积,降低氧化应激;但对于LDL^{-/-}Nrf^{-/-}小鼠,上述保护作用明显减弱^[13],提示H₂S依赖Nrf2减轻氧化应激从而发挥对糖尿病动脉粥样硬化的保护作用。H₂S亦可依赖去乙酰化酶3抑制H₂O₂诱导下血管内皮细胞氧化应激和凋亡,改善胸主动脉和肠系膜动脉内皮依赖性舒张功能^[14]。值得关注的是,心脏内存在SOD,在清除ROS、保护心脏中作用突出。

研究已经证实:与正常对照相比,心肌重构患者SOD表达下降,心肌氧化应激相应增强^[15];如果骨骼肌特异性过表达SOD,这种小鼠诱导糖尿病心肌病后心肌纤维化程度和心功能不全的症状显著改善^[16]。另外,适度运动增强老年心脏SOD的表达,改善心功能;过表达SOD则可显著降低氧化应激,抑制心肌的胶原增生或交联^[17]。这些研究均提示SOD在对抗心肌氧化应激、保护心脏方面发挥着重要作用。SOD按照其所含金属辅基的差别有3种:含铜锌金属辅基的Cu/Zn-SOD,主要存在于胞浆中;含锰金属辅基的Mn-SOD,主要存在于线粒体中;还有一种含铁基辅基的Fe-SOD,主要存在于原核细胞中。本研究发现,H₂S明显增强ISO诱导心肌损伤后Mn-SOD活力与表达,增强清除氧自由基的能力,这可能是H₂S抑制ISO诱导下心肌氧化应激,减轻心肌损伤的主要机制之一。但是,本研究发现单独补充外源性H₂S对氧化应激没有明显影响,可能与生理状态下机体氧化损伤较轻有关,提示H₂S在生理和病理的不同情况下对氧化应激的作用可能存在差异。

综上所述,H₂S减轻大剂量ISO诱导的小鼠急性心肌损伤,机制可能与提高SOD表达与活力、减轻氧化应激有关,为临床防治心肌损伤提供了新的策略和思路。

[参考文献]

- [1] Chapman AR, Adamson PD, Mills NL. Assessment and classification of patients with myocardial injury and infarction in clinical practice[J]. *Heart*, 2017, 103(1): 10-18
- [2] Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, et al. Oxidative stress in severe acute illness[J]. *Redox Biol*, 2015, 4(1): 340-345
- [3] Meng G, Ma Y, Xie L, et al. Emerging role of hydrogen sulfide in hypertension and related cardiovascular diseases[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(23): 5501-5511
- [4] Gupta P, Kanwal A, Putchu UK, et al. Cardioprotective effect of ritonavir, an antiviral drug, in isoproterenol induced myocardial necrosis: a new therapeutic implication[J]. *J Transl Med*, 2013, 11(3): 80
- [5] 秦 军,初晓倩,李庆平. TG-6对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(8): 912-916
- [6] Nichtova Z, Novotova M, Kralova E, et al. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2012, 31(2): 141-151
- [7] Hu HJ, Jiang ZS, Qiu J, et al. Protective effects of hydrogen sulfide against angiotensin II -induced endoplasmic reticulum stress in HUVECs[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 2213-2222
- [8] Stojanovic M, Zivkovic V, Srejovic I, et al. The role of hydrogen sulfide in homocysteine-induced cardiodynamic effects and oxidative stress markers in the isolated rat heart[J]. *Physiol Int*, 2016, 103(4): 428-438
- [9] Zhang HX, Liu SJ, Tang XL, et al. H₂S attenuates LPS-induced acute lung injury by reducing oxidative/nitrative stress and inflammation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(6): 1603-1612
- [10] 马 妍,谢利平,季 勇. 硫化氢缓释剂 GYY4137 对自发性高血压大鼠胸主动脉舒张功能的影响及机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(5): 549-553
- [11] Lu M, Zhao FF, Tang JJ, et al. The neuroprotection of hydrogen sulfide against MPTP-induced dopaminergic neuron degeneration involves uncoupling protein 2 rather than ATP-sensitive potassium channels[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(6): 849-859
- [12] Shimizu Y, Nicholson CK, Lambert JP, et al. Sodium sulfide attenuates ischemic-induced heart failure by enhancing proteasomal function in an Nrf2 -dependent manner[J]. *Circ Heart Fail*, 2016, 9(4): e002368
- [13] Xie L, Gu Y, Wen M, et al. Hydrogen sulfide induces Keap1 S-sulfhydration and suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via Nrf2 activation[J]. *Diabetes*, 2016, 65(10): 3171-3184
- [14] Xie L, Feng H, Li S, et al. SIRT3 mediates the antioxidant effect of hydrogen sulfide in endothelial cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 24(6): 329-343
- [15] Frustaci A, Russo MA, Morgante E, et al. Oxidative myocardial damage in human cocaine-related cardiomyopathy[J]. *Eur J Heart Fail*, 2015, 17(3): 283-290
- [16] Call JA, Chain KH, Martin KS, et al. Enhanced skeletal muscle expression of extracellular superoxide dismutase mitigates streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy by reducing oxidative stress and aberrant cell signaling[J]. *Circ Heart Fail*, 2015, 8(1): 188-197
- [17] Kwak HB, Lee Y, Kim JH, et al. MnSOD overexpression reduces fibrosis and pro-apoptotic signaling in the aging mouse heart[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2015, 70(5): 533-544

[收稿日期] 2017-03-23