

· 基础研究 ·

ω -3 脂肪酸后处理对大鼠缺血再灌注心肌抗氧化作用的影响*

张福伟¹, 王颖博¹, 赵小萍², 童健^{1△}

(1. 南方医科大学珠江医院胸外科, 广州 510282; 2. 解放军第 421 医院病理科, 广州 510310)

摘要:目的 探讨 ω -3 脂肪酸后处理对离体大鼠缺血再灌注心肌抗氧化作用的影响。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 持续灌注组(A 组)、缺血再灌注组(B 组)、缺血后处理组(C 组)以及 ω -3 脂肪酸后处理组(D 组)。建立 Langendorff 离体大鼠心脏缺血再灌注模型, A 组持续灌注 150 min, 其余各组均平衡灌注 30 min, 全心缺血 30 min, 再灌注 90 min, C 组在再灌注开始前进行 4 个循环的复灌 20 s/缺血 20 s, D 组在再灌注开始前用 ω -3 脂肪酸灌注 15 min。灌流结束后取左心室心肌测定超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)水平; 透射电镜下观察心肌线粒体形态结构的改变, TTC 染色计算心肌梗死面积。结果 与 B 组相比, C、D 组 LDH、MDA 水平显著降低($P < 0.05$), D 组 SOD 水平显著升高($P < 0.05$); C、D 组的大鼠心肌线粒体损伤程度明显减轻, 心肌梗死面积明显缩小($P < 0.01$)。结论 ω -3 脂肪酸后处理可提高离体大鼠心脏缺血再灌注后心肌组织 SOD 的水平, 改善心肌抗氧化能力, 减轻心肌细胞线粒体损伤。

关键词: 脂肪酸类, ω 3; 再灌注损伤; 后处理; 心肌保护

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.01.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)01-0058-03

Effect of omega-3 fatty acids postconditioning on antioxidation of rats myocardium during ischemia reperfusion injury*

Zhang Fuwei¹, Wang Yingbo¹, Zhao Xiaoping², Tong Jian^{1△}

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China; 2. Department of Pathology, No. 421 Hospital of PLA, Guangzhou, Guangdong 510310, China)

Abstract: **Objective** To explore the antioxidative effect of omega-3 fatty acids postconditioning on myocardial ischemia reperfusion injury in isolated working hearts of rats. **Methods** Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups. Langendorff model of isolated rat heart was constructed and group A was perfused for 150 minutes without cardioplegia ischemia, the other three groups (B, C and D) were subjected to 30 minutes of ischemia and 90 minutes of reperfusion after perfused for 30 minutes. At the onset of reperfusion, the process of 20 seconds reperfusion followed by a 20 seconds ischemia was repeated 4 times in group C. Group D was treated by 15 minutes of omega-3 fatty acids at the onset of reperfusion. The lever of SOD, MDA and LDH were measured after reperfusion. Finally, morphologic changes of mitochondria were observed by the method of transmission electron microscope and infarcted sizes in heart were determined by staining with TTC. **Results** The level of MDA and LDH were decreased significantly in group C and D as compared with group B ($P < 0.05$), and the level of SOD was increased significantly in group D ($P < 0.05$). The percentages of myocardial infarct sizes was less in group C and D than in group B ($P < 0.05$). Myocardial mitochondrial impairment was reduced significantly in group C and D as compared with group B. **Conclusion** Omega-3 fatty acids postconditioning can enhance the level of antioxidants and reduce myocardial mitochondrial impairment, which functions to protect myocardium against ischemia reperfusion injury in isolated rat heart.

Key words: fatty acids, omega-3; reactive oxygen species; reperfusion injury; postconditioning; myocardial protection

随着心脏外科体外循环手术及冠脉介入治疗的广泛开展, 心肌缺血再灌注损伤的防治也受到越来越多的重视。2003 年 Zhao 等^[1]发现心肌缺血后再灌注前进行短暂的心肌缺血再灌注能减轻随后的心肌缺血再灌注损伤, 提出了缺血后处理的概念, 为缺血再灌注损伤的防治提供了一个新的思路及方向。研究发现对已缺血的心肌于再灌注开始时给予适量药物, 可产生类似于后处理的心肌保护作用, 即药物模拟后处理^[2-4]。药物模拟后处理的可操作性明显强于常规意义上的缺血后处理。 ω -3 脂肪酸属于多不饱和脂肪酸, 主要包括 α -亚麻酸、二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸等^[5]。近年来的研究表明 ω -3 脂肪酸有抗炎、调节免疫及脏器保护的作用, 具有较好的临床应用前景。 ω -3 脂肪酸预处理已经被证实在新西兰兔缺血再灌注损伤的过程中可以起到抗氧化及心肌保护作用^[6], 但 ω -3 脂肪

酸后处理是否也能起到相应的作用尚缺乏相关研究。本实验旨在利用离体大鼠心脏缺血再灌注损伤模型观察 ω -3 脂肪酸后处理是否也可以减轻心肌缺血再灌注损伤导致的氧化损伤, 从而起到理想的心肌保护作用, 并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 ω -3 鱼油脂肪乳注射液(华瑞制药有限公司); CS501-sp 恒温水浴锅(重庆四达实验仪器厂); LGF-HL538 心脏 Langendorff 灌流装置(成都仪器厂); BS124S 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); PB-10PH 测试仪(赛多利斯科学仪器有限公司); 尼康高倍光学显微镜(日本 Nikon Eclipse, E400); 电子显微镜等; 超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、考马斯亮兰蛋白定量试剂盒均购自南京建成生物医学工程研

表 1 各组再灌注末期酶学指标的比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	LDH(U/gprot)	MDA(nmol/mgprot)	SOD(U/mgprot)
持续灌注组	4 647.77±1 633.84	1.64±0.14	374.98±37.62
缺血再灌注组	16 602.72±1 852.67*	3.14±0.74*	267.09±23.01*
缺血后处理组	11 997.29±1 394.37*△	2.40±1.14*△	302.32±42.35*
ω-3 脂肪酸后处理组	10 089.32±519.72*△#	2.38±0.54*△#	318.72±46.13*△#

*: $P<0.05$, 与持续灌注组比较; △: $P<0.05$, 与缺血再灌注组比较; #: $P<0.05$, 与缺血后处理组比较。

究所, K-H 液成分均为国产分析纯试剂。

1.2 实验动物及分组 SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只[广东省广州中医药大学实验动物中心, 合格证号: SCXK(粤)2008-0020], 体质量 200~300 g。随机分为持续灌注组(A组)、缺血再灌注组(B组)、缺血后处理组(C组)及 ω-3 脂肪酸后处理组(D组), 每组 15 只。

1.3 方法

1.3.1 大鼠心脏 Langendorff 模型建立 SD 大鼠经腹部注射肝素 1 000 U/kg 抗凝, 30 min 后经腹部注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉。将大鼠仰卧固定于动物手术台上, 开胸后迅速取下心脏置于 Langendorff 灌注装置上, 用 95%O₂、5%CO₂ 饱和的 37℃ Krebs-Henseleit 液(K-H 液)灌注主动脉根部, 流量为 15 mL/min, 维持主动脉根部压力为 80 mm Hg, 灌注压维持在 100 cm H₂O, 灌注液及心脏周围温度用恒温水浴循环器维持在 37℃ 左右, 灌注液 pH 值保持在 7.4。A 组持续灌注 150 min, 其余各组均平衡灌注 30 min, 全心缺血 30 min, 再灌注 90 min, C 组在再灌注开始前进行 4 个循环的复灌 20 s/缺血 20 s, D 组在再灌注开始前用含 ω-3 脂肪酸的灌注液灌注 15 min。ω-3 脂肪酸的终浓度为 1:400(v/V)。

1.3.2 心肌细胞氧化损伤和抗氧化指标的检测 每组各取 5 只大鼠, 取左心室游离壁心肌组织约 100 mg, 精确称质量后用剪刀剪碎移入匀浆管内按 W/V=1:9 的比例加入 4℃ 生理盐水, 在冰浴中进行匀浆, 制备成 100 mg/L 的心肌组织匀浆液, 以 4℃ 低温离心机 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于液氮速冻后置于 -80℃ 冰箱中保存待用。用考马斯亮兰法测蛋白含量, SOD 采用黄嘌呤氧化酶法测定, MDA 采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定, LDH 采用可见分光光度计测定, 具体操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 心肌细胞线粒体超微结构的制作与观察 每组各取 5 只大鼠, 取心尖部用双刀片法迅速制成体积约 0.1 mm³ 大小的组织块 2~3 块, 置入 2.5% 戊二醛溶液中固定(在 1 min 内完成上述制作过程), 固定后用 0.1 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 30 min, 1% 锇酸固定 2 h 后再 PBS 漂洗, 乙醇、丙醇逐级脱水, 树脂包埋、聚合, 最后将标本作超薄切片, 黏附于铜网, 以醋酸铀与柠檬酸铅双重染色, 通过透射电子显微镜 11 500 倍放大下进行随机拍照, 观察心肌细胞线粒体超微结构的变化。

1.3.4 心肌梗死面积的测定 每组各取 5 只大鼠, 灌注结束后迅速将心脏取下, -80℃ 冻存备用。制作标本时将心肌由心尖部向心底部横向切成 1 mm 厚的薄片, 置于 pH7.4 的氯化三苯四氮唑(TTC)磷酸盐缓冲液中, 37℃ 水浴孵育 30 min, 染色过程中不时振荡染色液使之与心肌充分接触, 存活心肌呈砖红色, 梗死区呈灰白色, 置于玻片上, 用尼康高倍光学显微镜拍照, 以 Image J 1.37 软件计算心肌梗死面积百分比(梗死心

肌面积/总心肌面积×100%)。

1.3.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组之间比较应用单因素方差分析, 差异显著再用 SNK 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌细胞氧化损伤和抗氧化指标的变化 与 A 组比较, 心肌缺血再灌注后 B、C、D 组大鼠心肌细胞 LDH 及 MDA 明显升高($P<0.05$), SOD 明显降低($P<0.05$)。与 B 组比较, C 组 SOD 虽然有所升高, 但差异无统计学意义($P>0.05$); 而 D 组 SOD 明显升高($P<0.05$), LDH 及 MDA 明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见表 1。

2.2 心肌线粒体超微结构的变化 将各组的大鼠心肌组织置于透射电镜下放大 11 500 倍观察, 可见 A 组大鼠心肌线粒体体积基本正常, 包膜完整, 嵴排列整齐、连续, 基质密度正常, 肌纤维无明显水肿、断裂; B 组心肌细胞线粒体大量肿胀变形, 嵴数量明显减少, 断裂、溶解成空泡状, 线粒体基质电子密度降低, 部分线粒体基质浓缩, 电子密度加深而线粒体体积变小, 肌纤维断裂、溶解; C 组线粒体结构与 B 组相比病变有所改善, 但仍有部分线粒体肿胀变形, 嵴断裂, 部分线粒体内有空泡形成; D 组损伤进一步减轻, 大部分线粒体正常, 仅见个别线粒体轻度肿胀, 嵴数量减少, 无明显断裂、溶解(彩插 II 图 1)。

2.3 心肌梗死面积 与 A 组相比, B、C、D 组的心肌梗死面积均显著增加($P<0.05$)。与 B 组相比, C、D 组心肌梗死面积均显著减少($P<0.01$), C 组与 D 组比较差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 2。

表 2 各组再灌注末期心肌梗死面积的比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	心肌梗死面积
持续灌注组	11.14±3.09
缺血再灌注组	34.15±3.06△
缺血后处理组	26.94±2.73*△
ω-3 脂肪酸后处理组	23.28±2.60*△

*: $P<0.01$, 与缺血再灌注组比较; △: $P<0.05$, 与持续灌注组比较。

3 讨论

导致心肌缺血再灌注损伤的一个最重要的作用机制就是氧自由基反应。心肌缺血时处于无氧代谢状态, 丙酮酸经 LDH 催化生成大量乳酸, 导致细胞酸中毒。同时组织中磷酸肌酸和 ATP 迅速消耗, 次黄嘌呤、黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶代谢增强。当再灌注心肌恢复供氧后, 立即产生大量氧自由基, 致使体内抗氧化酶(主要为 SOD)活性迅速降低, 不能及时清除再灌注后大量产生的氧自由基, 造成细胞膜及亚细胞器膜上脂质过氧化, 进而破坏其结构和功能, 导致再灌注损伤^[7-8]。

MDA 即为脂质过氧化反应的产物。

本研究表明, ω -3 脂肪酸后处理对离体大鼠心脏缺血再灌注损伤具有良好的保护作用。与缺血再灌注组比较, 缺血后处理组的 SOD 虽然有所升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 ω -3 脂肪酸后处理组的 LDH 及 MDA 明显降低 ($P < 0.05$), SOD 明显升高 ($P < 0.05$)。说明 ω -3 脂肪酸后处理可通过减少 LDH 来减轻细胞酸中毒, 并起到有效的抗氧化作用, 阻止 SOD 的消耗, 从而明显提高心肌组织 SOD 的水平, 清除再灌注后大量产生的氧自由基, 降低机体的脂质过氧化反应, 从而减轻心肌缺血再灌注损伤。而 ω -3 脂肪酸后处理具体是通过何种途径减少 LDH 尚有待进一步研究。此外, 由于 ω -3 脂肪酸是一种多不饱和脂肪酸, 而氧自由基正是与细胞膜上的不饱和脂肪酸发生过氧化进而导致细胞膜结构和功能的损害, 所以, ω -3 脂肪酸也可能作为一种氧自由基清除剂直接与再灌注后产生的氧自由基发生反应, 保护了细胞膜及亚细胞器膜的结构和功能。

近几年的研究表明, 线粒体的损伤与线粒体通透性转换孔 (MPTP) 的开放有密切的关系。在应激情况下, MPTP 开放, 引起线粒体基质蛋白的渗透压升高, 导致基质水肿, 线粒体外膜损伤, 细胞色素 C 与促细胞凋亡因子等释放, 线粒体膜电位被破坏也加速了能量耗竭, 稳定的细胞代谢内环境被破坏, 最终导致细胞凋亡或坏死。随着对心肌缺血再灌注损伤的机制研究逐渐深入, 抑制 MPTP 的开放被认为是心肌保护中最有前途的靶位之一^[9]。氧自由基和钙离子在诱导 MPTP 开放中发挥重要作用^[10]。心肌在发生缺血再灌注损伤后可导致氧自由基大量生成及细胞内钙超载, 造成心肌细胞膜及细胞器损伤。Philipson 和 Ward^[11] 研究证实 ω -3 脂肪酸可以直接作用于 Na^+ - Ca^{2+} 交换体, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度降低而防止细胞内钙超载。本研究结果显示, ω -3 脂肪酸后处理组大鼠的心肌线粒体肿胀、空泡化、嵴断裂、肌丝排列紊乱等表现均较缺血再灌注组明显减轻, 提示 ω -3 脂肪酸后处理亦可通过保护心肌细胞线粒体功能而起到减轻缺血再灌注损伤的作用, 其保护线粒体功能的机制可能是通过减少氧自由基及减轻钙超载来抑制 MPTP 的开放。

Mcguinness 等^[6] 在新西兰白兔心肌缺血再灌注模型中发现, ω -3 脂肪酸预处理可以诱导心肌细胞热休克蛋白 (HSP) 的大量表达, 降低心肌梗死面积。而 Yamashita 和 Hoshida^[12] 的研究显示 HSP 与 SOD 之间是协同或链式关系, SOD 有可能是 HSP 的下游环节。本研究结果显示, ω -3 脂肪酸后处理也可以显著减少离体大鼠心脏缺血再灌注后的梗死面积, 伴随的是 SOD 水平的明显升高, 所以, 作者猜想 ω -3 脂肪酸后处理也是通过诱导心肌细胞 HSP 的大量表达, 保护心肌细胞, 减少了离体大鼠心脏缺血再灌注后的梗死面积。

综上所述, ω -3 脂肪酸后处理可提高离体大鼠心脏缺血再灌注后心肌组织 SOD 的水平, 改善心肌抗氧化能力, 减轻心肌细胞线粒体损伤, 降低心肌梗死面积, 从而起到减轻心肌缺血再灌注损伤的作用, 其效果与缺血预处理相似。作者认为, ω -3 脂肪酸后处理有希望在心肌缺血发生后作为一种有效的治疗

方案应用于临床以减轻心肌缺血再灌注损伤导致的心功能损害。

参考文献:

- [1] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(2): 579-588.
- [2] Jin ZX, Zhou JJ, Xin M, et al. Postconditioning the human heart with adenosine in heart valve replacement surgery [J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, 83(6): 2066-2072.
- [3] 薛庆华, 方能新, 李立环, 等. 七氟烷缺血后处理对离体大鼠心肌细胞的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(5): 597-600.
- [4] 彭书峻, 王志, 赵惠娟, 等. 吗啡后处理抑制缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞凋亡及其抗氧化机制[J]. *中山大学学报: 医学版*, 2009, 30(5): 532-536.
- [5] Marc E. The science behind dietary omega-3 fatty acids [J]. *Can Med Asso*, 2008, 178(2): 177-180.
- [6] Mcguinness J, Neilan TG, Sharkasi A, et al. Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: quantification and mechanism of action[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006, 132(1): 72-79.
- [7] Beauchamp P, Richard V, Tamion F, et al. Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation[J]. *Circulation*, 1999, 100(9): 541-546.
- [8] Lefer DJ, Flynn DM, Phillips ML, et al. A novel sialyl-lewisx analog attenuates neutrophil accumulation and myocardial necrosis after ischemia and reperfusion[J]. *Circulation*, 1994, 90(5): 2390-2401.
- [9] Marin-Garcia J, Goldenthal MJ. Mitochondria play a critical role in cardioprotection[J]. *J Card Fail*, 2004, 10(1): 55-66.
- [10] Vieira HL, Belzacq AS, Haouzi D, et al. The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal[J]. *Oncogene*, 2001, 20(32): 4305-4316.
- [11] Philipson KD, Ward R. Modulation of Na^+ - Ca^{2+} exchange and Ca^{2+} permeability in cardiac sarcolemmal vesicles by doxylstearic acids[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1987, 897(1): 152-158.
- [12] Yamashita N, Hoshida S. Heat shock-induced manganese superoxide dismutase enhances the tolerance of cardiac myocytes to hypoxia-reoxygenation injury[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(7): 1805-1813.

(收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-08-15)