

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.32.001

20-HETE 在心肌缺血再灌注损伤中的作用及机制研究*

韩 勇¹, 郭立荣², 孔德营¹, 蒋 慧¹, 田 虹¹

(遵义医学院:1. 生理学教研室;2. 形态学实验室, 贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 探讨 20-羟二十烷花生四烯酸(20-HETE)在离体心肌缺血再灌注损伤中的影响及机制。**方法** 大鼠离体心脏通过 Langendorff 装置建立缺血再灌注模型, 心脏缺血 35 min 再灌注 40 min。缺血前 10 min 开始分别灌注 HET0016(1 μmol/L)及不同浓度的 20-HETE(10、30、50 nmol/L), 直至整个缺血再灌注结束。通过 Powerlab/8P 系统实时记录离体心脏血流动力学指标; 心肌梗死面积采用 TTC 染色法测定; 活性氧簇(ROS)及蛋白质羰基化水平分别使用 DHE 荧光探针法和 DNPH 法检测。**结果** 灌流液中使用 HET0016 显著改善了缺血诱导的心肌收缩力的下降, 抑制 20-HETE 的生成后, 减少了心肌梗死面积的发生($P<0.05$); 而灌流液中外源性加入 20-HETE 后加重了心肌再灌注后损伤($P<0.05$)。同时, HET0016 明显降低了再灌注后 ROS 的生成及蛋白质过氧化, 而加入 20-HETE 后显著促进了 ROS 生成和蛋白质过氧化($P<0.05$)。**结论** 20-HETE 通过增加 ROS 生成导致蛋白质过氧化加重心肌缺血再灌注损伤。

[关键词] 花生四烯酸类; 再灌注损伤; 活性氧; 蛋白质羰基化**[中图分类号]** R542.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)32-4465-04

The effect and mechanisms of 20-HETE on myocardial ischemia reperfusion injury*

Han Yong¹, Guo Lirong², Kong Deying¹, Jiang Hui¹, Tian Hong¹

(1. Department of Physiology; 2. Morphological Laboratory, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of 20-HETE on the isolated myocardial ischemia reperfusion injury and to explore its underlying mechanisms. **Methods** Experiments were performed in isolated rat hearts subjected to 35 min of ischemia followed by 40 min of reperfusion in Langendorff preparations. HET0016 (1 μmol/L) and various concentrations (10, 30 or 50 nmol/L) of 20-HETE were infused 10 min before the onset of ischemia and throughout the reperfusion period. Cardiac hemodynamic changes and myocardial contractility were continuously recorded with the Powerlab/8P system. Myocardial infarct size was measured by TTC staining. The level of ROS and the protein carbonyl content were determined by DHE fluorescence and DNPH method, respectively. **Results** Perfusion with HET0016 significantly improved myocardial ischemia reperfusion injury reduction in cardiac contractility, after inhibited the production of 20-HETE significantly reduced the occurrence of myocardial infarction area ($P<0.05$), but exogenous join 20-HETE aggravated I/R-induced myocardial injury ($P<0.05$). Myocardial ischemia reperfusion injury significantly increased production of ROS and oxidative stress, both of which were significantly inhibited by HET0016 and enhanced by 20-HETE administration ($P<0.05$). **Conclusion** 20-HETE stimulates ROS production and enhance protein carbonylation, which aggravates myocardial ischemia reperfusion injury.

[Key words] arachidonic acids; reperfusion injury; reactive oxygen species; protein carbonylation

20-羟二十烷花生四烯酸(20-HETE)是 Capdevila 等^[1]学者首先发现在肝脏组织中由细胞色素 P-450 催化花生四烯酸(AA)生成的内源性活性物质, 被发现以来得到了心血管领域学者的关注, 目前研究认为 20-HETE 是调节肾、脑等小动脉血管紧张度的重要因子^[2-4]。但其对心脏功能的影响研究甚少, 有学者^[5-6]在心肌缺血再灌注损伤的研究中, 发现冠状血管内细胞色素 P-450 催化 AA 的代谢产物 20-HETE 生成明显增加, 表明 20-HETE 参与心肌缺血再灌注进程中, 但其作用机制尚未完全阐明。大量的研究表明活性氧簇(ROS)是引起心肌缺血再灌注的主要启动因子^[7-8], 但在心肌缺血再灌注中 ROS 被激活及生成的分子机制尚待深入研究。因此, 本研究的目的是在大鼠离体心脏上探究心肌缺血再灌注中 20-HETE 对心肌功能及 ROS 生成的影响, 探究 20-HETE 加重心肌缺血

再灌注的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物分组及试剂 雄性 Wistar 大鼠(220±20) g 60 只, 缺血再灌注对照组为 A 组, 缺血再灌注+HET0016(20-HETE 合成酶抑制剂)组为 B 组、缺血再灌注+20-HETE(10、30、50 nmol/L)组为 C、D、E 组, 每组 12 只。20-HETE 购于美国 Sigma-Aldrich 公司, HET0016 购于美国 Cayman 公司; ROS 检测试剂盒及蛋白质过氧化检测试剂盒购于南京建成生物制品公司; 全蛋白提取试剂盒购于上海生工生物工程有限公司; BCA 蛋白浓度检测试剂盒购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 肌酸激酶(CK)检测试剂盒购于四川迈克科技有限公司。

1.2 方法

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81460040); 贵州省科学技术基金项目(黔科合 LH 字[2014]7544 号)。 作者简介: 韩勇(1974—), 副教授, 博士, 主要从事心肌缺血及心肌梗死的基础机制研究。

1.2.1 建立模型 大鼠麻醉后,开胸取出心脏置于 4 °C KH 液中修剪,迅速将主动脉套管后置于 Langendorff 心肌灌注系统上,37 °C 下使用 KH 液(NaCl 118.0 mmol/L,NaHCO₃ 25.0 mmol/L,KCl 4.7 mmol/L,KH₂PO₄ 1.2 mmol/L,MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mmol/L,CaCl₂ 2.0 mmol/L,葡萄糖 11.0 mmol/L)进行主动脉逆行灌注。大鼠左心室插入一个充水小球囊,另一端连接到压力传感器监测心室内压变化。使用 Powerlab/8P 系统连续记录左心室发展压(LVDP),左心室舒张末期压(LVEDP),左心室最大收缩速率、最大舒张速率(±dp/dtmax)。定时收集灌流液测定冠状动脉流量(CF),并使用日立 HITACHI 7060 全自动化分析仪(DGKC 法)检测 CK 水平。

1.2.2 心肌缺血再灌注实施方案 37 °C 条件下,离体心脏缺血前灌注 20 min 平衡,然后全心缺血 35 min,再灌注 15 min 后检测 ROS 水平,或再灌注 40 min 后用于检测生化指标,或再灌注 120 min 用以检测心肌梗死面积。测定缺血前及再灌注后的左心室功能及血流动力学变化。

1.2.3 心肌梗死面积测定 心脏再灌注后,-20 °C 下冷冻 1 h,切片(2~3 mm)放入含有 1% TTC 的磷酸盐缓冲液中,37 °C 条件下孵育 15 min 染色,10% 甲醛固定。梗死区通过测定染色区域(红色,存活组织)和非染色区域(白色,坏死组织)面积占全部左心室面积比值后进行比较。

1.2.4 心肌 ROS 水平测定 ROS 的生成使用对氧敏感的荧光探针 DHE 法测定,离体心脏再灌注 15 min 后,剪成小块(100 mm³)置入组织包埋剂中,液氮冷冻,冰冻切片(10 μm)后置于载玻片上,然后将切片在 PBS 缓冲液中使用 DHE (1.6 μmol/L) 37 °C 避光孵育 30 min,激光共聚焦显微镜下在 488 nm 激发光,560~660 nm 滤波接收,获取荧光照片。

1.2.5 蛋白质过氧化水平检测 蛋白质羰基的产生是蛋白质分子被自由基氧化修饰的重要标记,羰基的水平基于羰基与 2,4-二硝基苯肼(DNPH)反应生成二硝基苯腙进行测定,心脏再灌注后,提取心肌组织蛋白(1 mg/mL),100 μL 加入 500 μL DNPH(10 mmol/L)室温孵育 60 min,20% 三氯乙酸沉淀蛋白,蛋白沉淀物使用 1:1 乙醇和乙酸乙酯洗脱 3 次后,使用 6 mol 的盐酸胍重悬浮蛋白,370 nm 下检测吸光度。

1.3 统计学处理 使用 SPSS15.0 软件分析数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及 *t* 检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

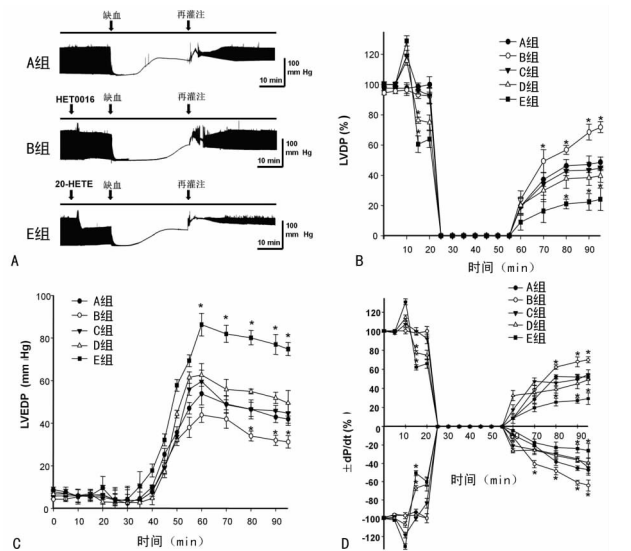
2.1 20-HETE 对缺血再灌注后心肌力学的影响 离体心脏灌注平衡 20 min,全心缺血 35 min,再灌注 40 min,应用 Powerlab/8P 系统连续实时记录各组心脏血流动力学功能改变,再灌注末期各组心脏心肌收缩力均明显下降,如图 1A 所示。在心肌缺血再灌注进程中,当使用 HET0016 减少内源性 20-HETE 生成后,显著改善了再灌注后心脏血流动力学指标的恢复,其中 LVDP 由 A 组(48.6 ± 3.4)% 升高至(71.6 ± 3.5)%,LVEDP 由(41.8 ± 3.3)% 降低至(32.1 ± 4.5)%,而 ±dp/dtmax 分别由(51.9 ± 2.1)% 恢复至(69.0 ± 3.2)% 及(47.1 ± 3.6)% 升至(64.1 ± 3.7)%。而外源性加入 20-HETE 后,剂量依赖性地加重了缺血再灌注诱导的心肌血流动力学指标的下降,其中 E 组心肌血流动力学指标显著下降($P < 0.05$);LVDP 由 A 组(48.6 ± 3.4)% 下降至(24.1 ± 7.4)%,LVEDP 由(41.8 ± 3.3)% 升至(76.0 ± 4.7)%,±dp/dtmax 分

别由(51.9 ± 2.1)% 降至(29.2 ± 6.3)% 及(47.1 ± 3.6)% 降至(26.2 ± 7.9)%,见图 1B~D。

2.2 20-HETE 对缺血再灌注后 CF 及 CK 释放的影响 再灌注末期与 A 组比较,B 组心脏的 CF 由(6.0 ± 1.1) mL/min 升至(8.2 ± 1.3) mL/min,CK 由(331.0 ± 12.0) U/L 降低至(198.7 ± 11.2) U/L,差异有统计学意义($P < 0.05$)。E 组 CF 由(6.0 ± 1.1) mL/min 降低至(4.5 ± 0.7) mL/min,CK 由(331.0 ± 12.0) U/L 升至(660.0 ± 21.0) U/L,见图 2。

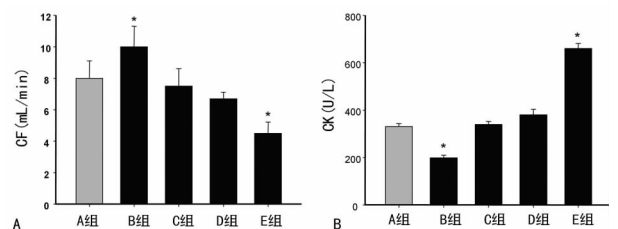
2.3 20-HETE 对缺血再灌注后心肌梗死面积的影响 离体心脏灌注 20 min,然后全心缺血 35 min,再灌注 120 min 后,通过 TTC 染色法检测心肌梗死面积。与 A 组比较,B 组心脏的梗死面积显著减少($P < 0.05$),由(39.8 ± 2.3)% 降低至(29.6 ± 2.4)%。而外源性加入 20-HETE 各组,剂量依赖性地增加了再灌注后心肌梗死面积($P < 0.05$),其中 E 组心肌梗死面积达到了(58.1 ± 4.1)%,见图 3。

2.4 20-HETE 对缺血再灌注后心肌组织 ROS 生成的影响 B 组荧光强度为 72.0 ± 5.1 明显低于 A 组的 105.0 ± 3.5,而 E 组的荧光强度为 145.0 ± 7.3 显著高于 A 组($P < 0.05$),见图 4。



A: 心脏灌注时间内典型的实时心肌功能记录; B: 各组 LVDP 比较; C: 各组 LVEDP 比较; D: 各组 ±dp/dtmax 比较; * : $P < 0.05$ 。

图 1 20-HETE 对心肌缺血再灌注后心肌力学的影响



A: 各组心脏再灌注后 CF 变化; B: 各组心脏 CK 释放检测; * : $P < 0.05$ 。

图 2 20-HETE 对缺血再灌注后 CF 及 CK 释放的影响

2.5 20-HETE 对缺血再灌注后心肌组织蛋白质过氧化的影响 与 A 组相比,使用 HET0016 处理后降低了蛋白质的羰基

化作用($P < 0.05$), E 组则显著增强了蛋白质的羰基化作用($P < 0.05$), 见图 5。

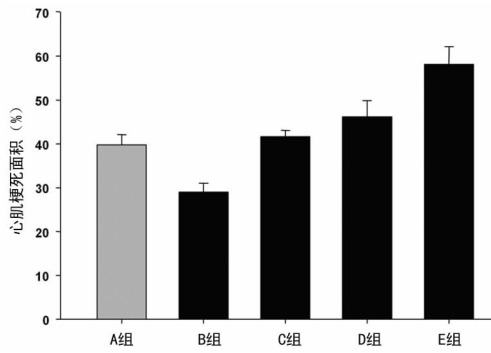
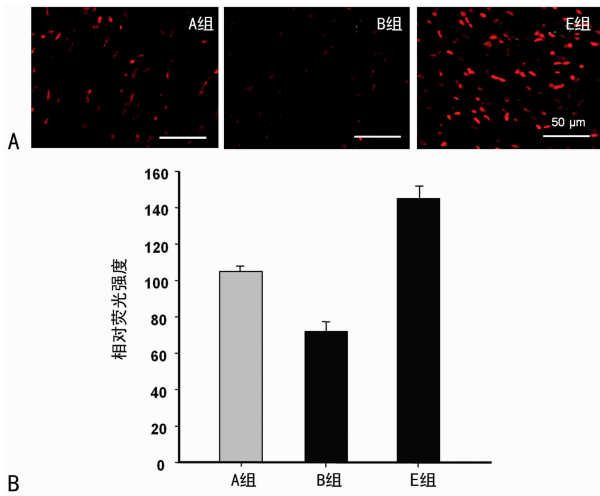


图 3 20-HETE 对再灌注后心肌梗死面积的影响



A: 各組心脏组织中 ROS 荧光照片; B: 各組心脏组织 ROS 荧光强度比较。

图 4 20-HETE 对再灌注后心肌组织 ROS 生成的影响

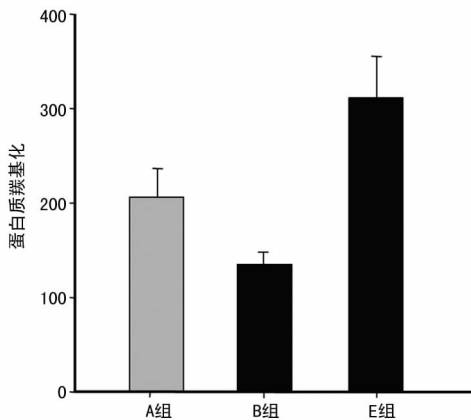


图 5 20-HETE 对再灌注后心肌组织蛋白质羰基化作用

3 讨论

经皮冠状动脉腔内成形术和冠状动脉内支架是临床治疗急性心肌梗死常用的治疗手段^[9], 但是缺血一定时间的心肌组织在恢复血液灌注后, 却伴发严重心律失常和心肌功能紊乱, 甚至导致致命性的并发症, 即缺血再灌注损伤^[10-11], 如何减轻

缺血再灌注导致的心肌损伤是临床治疗缺血性心肌病的重要问题。

有研究报道发现 20-HETE 参与了肾和脑缺血导致的损伤^[12-13], 在心肌缺血再灌注损伤中也有研究发现 20-HETE 水平明显增加, 心肌组织中 CYP450 ω -羟化酶表达和活性显著增强^[5-6], 表明 20-HETE 参与到了心肌缺血再灌注损伤当中, 但机制尚不清楚。本研究发现, 在心肌缺血再灌注损伤进程中, 应用 HET0016 来减少内源性 20-HETE 生成后, 改善了由于缺血再灌注导致的心肌功能下降, 再灌注结束时与 A 组相比, LVDP、+dP/dt、-dP/dt 分别升高了 47.3%、32.9% 和 36.0%, CF 增加了 36.7%, LVEDP 降低了 23.2%, 同时减少了 CK 释放 40.0%, 并降低了心肌梗死面积 34.5%。而外源性 20-HETE(50 nmol/L)显著降低了缺血后心肌功能的恢复, 与 A 组相比, LVDP、+dP/dt、-dP/dt 分别降低了 50.4%、43.7% 和 44.4%, CF 减少了 25.0%, LVEDP 升高了 81.8%, 同时增加了 CK 释放 99.4%, 并导致心肌梗死面积增加了 46.0%。这些数据明确表明 20-HETE 具有加重心肌缺血再灌注损伤的作用, 这与之前的学者研究一致。然而, 20-HETE 加重心肌缺血再灌注损伤、降低心肌功能的机制尚需进一步探究。

ROS 在心肌缺血再灌注损伤的发病机理中起到至关重要的作用, 减少 ROS 的生成可显著改善缺血再灌注后心肌功能的恢复, 减少心肌梗死面积^[14], 被认为是引起缺血再灌注损伤的主要启动因子^[7-8], 而由于心脏中缺乏抗氧化酶, 对于 ROS 的敏感性要高于其他组织器官。另外, 有研究表明在肝细胞中 CYP450 可促进 ROS 生成, 参与多种疾病的发生, 如帕金森疾病、糖尿病等^[15]。因此, 作者首先检测了在心肌缺血再灌注损伤进程中 CYP450 酶代谢产物 20-HETE 对 ROS 生成的影响, 发现当应用 HET0016 选择性抑制 CYP450 酶家族中 CYP4A 和 4F 的 ω 羟化作用^[16], 减少内源性 20-HETE 的合成后, 与 A 组相比, B 组心脏再灌注后 ROS 的生成减少了 31.4%, 而外源性加入 20-HETE(50 nmol/L)心脏中 ROS 生成增加了 38.0%, 表明在心肌缺血再灌注损伤中 20-HETE 有明显的促进 ROS 过量生成的作用。

心肌细胞内过量的 ROS 可以损伤亚细胞组分, 并造成蛋白质过氧化损伤。有研究发现心肌缺血后与心肌收缩相关的肌钙蛋白^[17]及肌动蛋白^[18]均发生过氧化损伤, 影响缺血后的心肌的功能。其他相关研究也支持该结论, 在不同的生理病理条件下, 过量生成的 ROS 可导致心肌收缩功能的紊乱。ROS 可使蛋白质赖氨酸、精氨酸、脯氨酸等残基氧化生成羰基化蛋白产物^[19], 而蛋白羰基化水平是反应 ROS 介导的蛋白氧化损伤的主要检测指标^[20]。所以本研究接下来检测了再灌注后心肌细胞内蛋白质羰基化水平的改变, 研究发现与 A 组心脏相比, 再灌注后 B 组心脏中蛋白质羰基化水平降低了 34.7%, 而外源性加入 20-HETE(50 nmol/L)中蛋白质羰基化水平显著升高 51.1%。如上研究结果表明在心肌缺血再灌注损伤进程中, 20-HETE 通过促进 ROS 的生成增多, 导致蛋白质过氧化损伤, 最终加重心肌再灌注后的功能损伤。

综上所述, 作者发现在心肌缺血再灌注损伤进程中, 抑制内源性 20-HETE 的生成可明显改善心肌功能的恢复和减少梗死面积的发生, 而外源性加入 20-HETE 则显著加重再灌注后的心肌损伤, 其机制是在该进程中 20-HETE 诱导过量 ROS

的生成,导致收缩相关蛋白氧化损伤,为临床治疗缺血性心脏病提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Capdevila J, Chacos N, Werringloer J, et al. Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981, 78(9):5362-5366.
- [2] Wu CC, Gupta T, Garcia V, et al. 20-HETE and blood pressure regulation: clinical implications [J]. *Cardiol Rev*, 2014, 22(1):1-12.
- [3] Ding Y, Wu CC, Garcia V, et al. 20-HETE induces remodeling of renal resistance arteries independent of blood pressure elevation in hypertension [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(5):F753-763.
- [4] Harder DR, Narayanan J, Gebremedhin D. Pressure-induced myogenic tone and role of 20-HETE in mediating autoregulation of cerebral blood flow [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(5):H1557-1565.
- [5] Nithipatikom K, Endsley MP, Moore JM, et al. Effects of selective inhibition of cytochrome P-450 omega-hydroxylases and ischemic preconditioning in myocardial protection [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(2):H500-505.
- [6] Granville DJ, Tashakkor B, Takeuchi C, et al. Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(5):1321-1326.
- [7] Schriewer JM, Peek CB, Bass J, et al. ROS-mediated PARP activity undermines mitochondrial function after permeability transition pore opening during myocardial ischemia-reperfusion [J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(2):e000159.
- [8] Seligmann C, Prechtel G, Kusus-Seligmann M, et al. A myocardial ischemia-and reperfusion-induced injury is mediated by reactive oxygen species released from blood platelets [J]. *Platelets*, 2013, 24(1):37-43.
- [9] Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials [J]. *Lancet*, 2003, 361(9351):13-20.
- [10] Garcia-Dorado D, Rodriguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, et al. Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in clinical practice [J]. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2014, 67(5):394-404.
- [11] Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1):92-100.
- [12] Hoff U, Lukitsch I, Chaykovska L, et al. Inhibition of 20-HETE synthesis and action protects the kidney from ischemia/reperfusion injury [J]. *Kidney Int*, 2011, 79(1):57-65.
- [13] Marumo T, Eto K, Wake H, et al. The inhibitor of 20-HETE synthesis, TS-011, improves cerebral microcirculatory autoregulation impaired by middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(6):1391-1402.
- [14] Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species [J]. *World J Cardiol*, 2011, 3(6):186-200.
- [15] Shahabi HN, Andersson DR, Nissbrandt H. Cytochrome P450 2E1 in the substantia nigra: relevance for dopaminergic neurotransmission and free radical production [J]. *Synapse*, 2008, 62(5):379-388.
- [16] Miyata N, Taniguchi K, Seki T, et al. HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 133(3):325-329.
- [17] Murphy AM, Kogler H, Georgakopoulos D, et al. Transgenic mouse model of stunned myocardium [J]. *Science*, 2000, 287(5452):488-491.
- [18] Powell SR, Gurzenda EM, Wahezi SE. Actin is oxidized during myocardial ischemia [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 30(10):1171-1176.
- [19] Al Ghoulh I, Khoo NK, Knaus UG, et al. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(7):1271-1288.
- [20] Pradeep AR, Ramchandraprasad MV, Bajaj P, et al. Protein carbonyl: An oxidative stress marker in gingival crevicular fluid in healthy, gingivitis, and chronic periodontitis subjects [J]. *Contemp Clin Dent*, 2013, 4(1):27-31.

(收稿日期:2015-06-08 修回日期:2015-08-26)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号:ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。