

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00942

## 含氢保存液降低大鼠供心保存过程中氧化应激和炎性损伤

孙向东<sup>1</sup>, 陆方林<sup>1</sup>, 崔 勇<sup>1</sup>, 孙学军<sup>2</sup>, 徐志云<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院胸心外科, 解放军胸心外科研究所, 上海 200433
2. 第二军医大学海军医学系潜水医学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 观察含氢保存液对大鼠供心保存过程中氧化应激和炎性损伤的影响。**方法** 32只SD大鼠随机分4组( $n=8$ ):对照组(保存液为HTK液), H1组(保存液为含氢浓度约0.2 mmol/L的HTK液), H2组(保存液为含氢浓度约0.4 mmol/L的HTK液), H3组(保存液为含氢浓度约0.8 mmol/L的HTK液)。采用Langendorff离体大鼠心脏灌注法, 心脏分别在各组保存液中冷存(4℃) 6 h, 复灌后硫代巴比妥酸法检测心肌组织中MDA含量, 黄嘌呤氧化酶法检测心肌组织中SOD活力, ELISA法检测心肌组织中8-羟基脱氧鸟苷、TNF- $\alpha$ 、IL-6含量。**结果** 供心冷保存(4℃) 6 h后, H1、H2、H3组MDA含量低于对照组( $P<0.01, P<0.05$ )。H2、H3组SOD活力高于对照组( $P<0.01, P<0.05$ ); 对照组8-羟基脱氧鸟苷水平高于H1、H2、H3组( $P<0.01$ ), 对照组TNF- $\alpha$ 、IL-6含量也高于H1、H2、H3组( $P<0.01, P<0.05$ )。**结论** 含氢保存液能降低供心保存过程中的心肌氧化损伤, 减少炎性细胞因子的产生。

**[关键词]** 氢; 心脏移植; 器官保存液; 再灌注损伤; 氧化性应激; 炎性损伤

**[中图分类号]** R 654.28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)09-0942-04

## Hydrogen-containing preservation solution relieves oxidative stress and inflammatory damage of rat donor heart

SUN Xiang-dong<sup>1</sup>, LU Fang-lin<sup>1</sup>, CUI Yong<sup>1</sup>, SUN Xue-jun<sup>2</sup>, XU Zhi-yun<sup>1\*</sup>

1. Department of Cardiothoracic Surgery, Institute of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Diving Medicine, Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of hydrogen-containing preservation solution against oxidative stress and inflammatory damage of rat donor heart. **Methods** Thirty-two SD rats were evenly randomized into four groups( $n=8$ ): control group (the hearts were protected by HTK solution), H1 group (hydrogen concentration was about 0.2 mmol/L in the HTK solution), H2 group (hydrogen concentration was about 0.4 mmol/L in the HTK solution) and H3 group (hydrogen concentration was about 0.8 mmol/L in the HTK solution). The rat hearts were harvested in all groups and were mounted on the Langendorff apparatus to estimate baseline hemodynamic values. All the hearts underwent hypothermic (4℃) storage for 6 h in the corresponding cardioprotective solutions. Then, superoxide dismutase (SOD) activities and malondialdehyde (MDA) contents in myocardium tissues were measured after reperfusion by xanthine oxidase method and TBA method, respectively. The levels of 8-hydroxydeoxyguanosine, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in the myocardium tissues were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The MDA levels in H1, H2, and H3 groups were lower than that in the control group 6 h after preservation ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ), and the SOD activities in H2, H3 groups were higher than that in the control group ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). The levels of 8-hydroxydeoxyguanosine, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in the control group were higher than those in H1, H2, and H3 groups ( $P<0.01$  or  $P<0.05$ ). **Conclusion** Hydrogen-containing preservation solution can relieve the oxidative damage and reduce production of inflammation factors during preservation of rat donor heart.

**[Key words]** hydrogen; heart transplantation; organ preservation solutions; reperfusion injury; oxidative stress; inflammatory damage

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(9):942-945]

供心保存质量是影响移植成功的重要因素<sup>[1]</sup>。再灌注损伤, 氧化应激和炎性反应是导致缺血再灌注心脏保存后功能丧失或降低的主要原因之一[2-3]。因此, 改进及完善心脏再灌注损伤的重要机制之一[2-3]。因此, 改进及完善心脏

**[收稿日期]** 2010-04-28 **[接受日期]** 2010-06-07

**[作者简介]** 孙向东, 博士生. E-mail: sun4stone@gmail.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873417, E-mail: zhiyunx@hotmail.com

保存液,从而减轻移植过程中供体心脏的缺血再灌注损伤,成为临床上的迫切要求。氢具有抗氧化作用,可以选择性中和自由基中毒性最强的羟自由基和过氧亚硝基阴离子,减轻缺血再灌注损伤<sup>[4]</sup>。Hayashida等<sup>[5]</sup>研究发现,呼吸氢气可以减少大鼠缺血再灌注后心肌梗死面积,抑制病理性左室重塑。Zheng等<sup>[6]</sup>证实氢可以减轻小肠缺血再灌注的炎性损伤,降低炎性因子TNF- $\alpha$ 和IL-6水平。本研究应用含不同浓度氢及不含氢的HTK(histidine-ketoglutarate-tryptophan)液作为供心保存液,采用离体大鼠心脏灌注模型,观察氢对大鼠供心保存过程中氧化应激和炎性反应的影响,为改善供体心脏保存的效果提供一个新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂及实验动物

超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒为南京建成生物工程研究所产品,大鼠TNF- $\alpha$ 酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒、大鼠IL-6 ELISA试剂盒为美国RapidBio Lab公司产品,大鼠8-羟基脱氧鸟苷ELISA试剂盒为美国Cell Biolabs公司产品。SPF级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(250~350 g)32只,由第二军医大学实验动物中心提供,动物许可证号为SCXK(沪)2007-0003。适应性饲养7 d,喂养在大鼠实验饲养室,温度(25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,湿度40%~60%,光照12 h明暗交替,普通鼠粮喂养,自由饮水。

### 1.2 含氢HTK保存液的制备

HTK液是一种低钾型细胞内液型保存液,是目前欧洲应用最广泛的器官保存液<sup>[7]</sup>。本研究参照文献<sup>[6]</sup>方法制备含氢至饱和的HTK液:500 ml HTK液灌注30 ml氢气,在高压(0.4 MPa)6 h条件下,使氢气溶解于HTK液中。制备后置4 $^{\circ}$ C常压保存,于2 d内使用。采用气相色谱仪检测其氢的含量,含氢浓度约为0.8 mmol/L,平均(0.811 $\pm$ 0.037) mmol/L。含氢饱和的HTK液作为H3组HTK液。H1组HTK液:使用前将H3组HTK液在密闭条件下与不含氢的HTK液按1:3混合,经气相色谱仪检测,含氢浓度约为0.2 mmol/L,平均(0.198 $\pm$ 0.007) mmol/L。H2组HTK液:使用前将H3组HTK液在密闭条件下与不含氢的HTK液按1:1混合,经气相色谱仪检测,含氢浓度约为0.4 mmol/L,平均为(0.403 $\pm$ 0.010) mmol/L。

### 1.3 实验分组及模型制备

32只SD大鼠随机分为4组,每组8只。对照组:应用HTK液作为供心保存液。H1组:含氢量约0.2 mmol/L的HTK液

作为供心保存液。H2组:含氢量约0.4 mmol/L的HTK液作为供心保存液。H3组:含氢量约0.8 mmol/L的HTK液作为供心保存液。大鼠称重后,经腹腔注射戊巴比妥钠65 mg/kg麻醉,仰卧固定于实验台上。经尾静脉肝素3 mg/kg抗凝后,迅速开胸,在主动脉和右锁骨下动脉交界处切断肺动、静脉,取出心脏,立即放入0~4 $^{\circ}$ C K-H缓冲液中,冲洗掉残留在主动脉内的血液。迅速将离体鼠心移至Langendorff灌注模型的灌注针上,经主动脉用K-H缓冲液灌注,灌注压维持在75 cmH<sub>2</sub>O(1 cmH<sub>2</sub>O=0.098 kPa),95% O<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>混合气体平衡,温度维持在37 $^{\circ}$ C。肺动脉根部切开,使冠状动脉回流液充分引流。从开胸取心至灌注开始要在50~70 s内完成,超过70 s应放弃实验。灌注3 min后,切开左心耳,经左心房、二尖瓣,将连接有测压导管的心室球囊送入左心室,另一端连接多导生理记录仪。往心室球囊内缓慢注射适量生理盐水(40~60  $\mu$ l),使左心室舒张末压为10 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。约15 min后,心脏搏动可达到稳定状态,逐渐降低灌注温度至30 $^{\circ}$ C以下,经主动脉根部分别灌注4 $^{\circ}$ C的各组心脏保存液使心脏停跳,每只心脏分别各自心脏保存液中密闭低温浸泡保存6 h。6 h后,重新开始心脏灌注,逐渐恢复灌注温度至37 $^{\circ}$ C,心脏搏动达到稳定状态后,切取心肌组织进行各项指标检测。

## 1.4 各项指标的观察

### 1.4.1 心肌组织中MDA含量、SOD活力的检测

取左心室心尖部分心肌组织0.5 g,4 $^{\circ}$ C条件下用生理盐水制成10%组织匀浆,12 000 $\times$ g离心10 min,取上清液于-80 $^{\circ}$ C冻存。采用考马斯亮蓝法测定上清液蛋白含量,然后严格按MDA试剂盒、SOD试剂盒说明书操作,硫代巴比妥酸法测定心肌组织MDA含量,用黄嘌呤氧化酶法测定心肌组织SOD活性。

### 1.4.2 心肌组织中8-羟基脱氧鸟苷、TNF- $\alpha$ 、IL-6含量检测

取左心室部心肌组织0.05 g,用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)在4 $^{\circ}$ C条件下匀浆,12 000 $\times$ g离心10 min,取上清液于-80 $^{\circ}$ C冻存。严格按试剂盒说明书步骤操作,采用ELISA法检测8-羟基脱氧鸟苷、TNF- $\alpha$ 、IL-6含量。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行分析,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

### 2.1 氢对心肌组织中8-羟基脱氧鸟苷、MDA含量

和 SOD 活力的影响 结果(表 1)表明;H1、H2、H3 组 MDA 含量低于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ),H3 组和 H1 组相比降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。H2、H3 组 SOD 活力高于对照组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01, P < 0.05$ ),但 H1 组和对照组相比差异无统计学意

义;H3 组与 H1、H2 组相比增高,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。对照组 8-羟基脱氧鸟苷水平高于 H1、H2、H3 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),H3 组和 H1 组相比降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠心肌组织 8-羟基脱氧鸟苷、MDA 含量和 SOD 活力的比较

Tab 1 Comparison of 8-OHdG and MDA levels and SOD activities in myocardium tissues between different groups

( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

| Group   | 8-OHdG<br>$\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$ | MDA<br>$m_B / (\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1})$ | SOD<br>$z_B / (\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ |
|---------|---|---|--|
| Control | 24.13 ± 6.34  | 11.41 ± 2.09                                      | 91.85 ± 30.51                                  |
| H1      | 17.28 ± 5.13 * * $\Delta$                             | 9.51 ± 1.81 * $\Delta$                            | 114.69 ± 36.46 $\Delta \Delta$                 |
| H2      | 15.25 ± 3.97 * *                                      | 8.42 ± 1.70 * *                                   | 143.95 ± 33.03 * $\Delta \Delta$               |
| H3      | 12.14 ± 3.44 * *                                      | 7.63 ± 2.26 * *                                   | 223.36 ± 76.11 * *                             |

H1: HTK solution containing about 0.2 mmol/L hydrogen; H2: HTK solution containing about 0.4 mmol/L hydrogen; H3: HTK solution containing about 0.8 mmol/L hydrogen; 8-OHdG: 8-hydroxydeoxyguanosine; MDA: Malondialdehyde; SOD: Superoxide dismutase. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta \Delta P < 0.01$  vs H3 group

2.2 氢对心肌组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量的影响 结果(表 2)表明;对照组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量高于 H1、H2、H3 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.01, P < 0.05$ );H3 组和 H1 组相比降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 2 各组大鼠心肌组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 含量的比较

Tab 2 Comparison of TNF- $\alpha$  and IL-6

levels in myocardium tissues among different groups

( $n = 8, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$ )

| Group   | TNF- $\alpha$            | IL-6                       |
|---------|--------------------------|----------------------------|
| Control | 66.21 ± 18.90            | 75.34 ± 14.15              |
| H1      | 49.68 ± 11.50 * $\Delta$ | 57.25 ± 12.51 * * $\Delta$ |
| H2      | 41.81 ± 8.86 * *         | 52.39 ± 9.78 * *           |
| H3      | 35.67 ± 6.62 * *         | 43.22 ± 8.79 * *           |

H1: HTK solution containing about 0.2 mmol/L hydrogen; H2: HTK solution containing about 0.4 mmol/L hydrogen; H3: HTK solution containing about 0.8 mmol/L hydrogen. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05$  vs H3 group

### 3 讨论

供心保护不完善所造成的心肌缺血再灌注损伤是导致心脏移植早期功能衰竭的主要原因<sup>[8]</sup>。因此,减少供心保存过程中的心肌缺血再灌注损伤是提高心脏移植成功率的主要策略之一<sup>[9]</sup>。自由基损伤是缺血再灌注损伤的病理基础之一<sup>[2]</sup>。正常情况下,机体内存在着自由基清除系统,如  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  可以被超氧化物歧化酶、过氧化物酶等有效降解;缺血

再灌注时,由于组织缺氧、呼吸链抑制等原因,自由基无法及时清除,大量自由基攻击核酸、蛋白质和各种生物膜,导致心肌细胞功能障碍。羟自由基和过氧亚硝基阴离子的毒性最强,是导致细胞氧化损伤的重要介质<sup>[10]</sup>,却又缺乏有效地针对性的抗氧化酶进行降解<sup>[11]</sup>。目前氢被证实可以选择性中和自由基中毒性最强的羟自由基和过氧亚硝基阴离子,具有抗氧化作用,能够减轻缺血再灌注损伤<sup>[4]</sup>。并且因为氢是脂溶性小分子,很容易穿透各种生物膜,进入细胞核与线粒体。在脑<sup>[12-13]</sup>、心肌<sup>[5,14]</sup>和肝<sup>[15]</sup>的缺血再灌注损伤动物模型中,均具有良好的保护作用。8-羟基脱氧鸟苷是羟自由基氧化 DNA 中脱氧鸟苷的产物,可作为细胞核内氧化应激的敏感标志物<sup>[16]</sup>。本研究显示,氢减少了心肌组织中 8-羟基脱氧鸟苷的水平,降低了 MDA 含量,并且提高 SOD 的活性。结果表明,氢能够减少细胞核内 DNA 氧化损伤,降低生物膜的脂质过氧化水平,提高内源性抗氧化酶活性,这可能是氢减轻供心保存过程中心肌氧化应激损伤的机制。

缺血再灌注损伤本质上也是一种强烈的炎性损伤过程<sup>[3]</sup>,炎性细胞因子在其中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。供心保存过程中,由于发生缺血再灌注,导致 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎性介质释放,介导炎症反应和炎症细胞的浸润,造成心肌的损伤,影响其功能<sup>[18]</sup>。自由基一方面可以直接损伤机体,另一方面可以通过分子间相互作用影响炎症的发生发展<sup>[19]</sup>,抑制这些自由基可减少炎症的严重程度。已有研究证实吸入

氢可以抑制小肠移植发生的炎症反应<sup>[20]</sup>,并且氢生理盐水可以显著减轻小肠缺血再灌注炎性损伤,降低 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平<sup>[6]</sup>。本研究结果也表明,在供心保存过程中,含氢 HTK 液可以明显减少 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的生成,从而减轻炎性损伤,对心肌起到保护作用。氢的抗炎作用可能是选择性中和自由基中毒性最强的羟自由基和过氧亚硝基阴离子造成的。在实验过程中我们还发现一个现象,各组含氢 HTK 液的抗氧化应激和抗炎效应基本上是随着浓度的增加而增加,联系到氢可以选择性中和毒性最强的自由基的特性,我们认为,氢的抗氧化应激和抗炎效应可能具有剂量效应。

本研究通过大鼠离体心脏灌注模型,研究氢在供心保存过程中的保护作用,证实含氢 HTK 液可能通过减少氧化应激和炎性反应,减轻缺血再灌注损伤,从而对低温保存期间的离体大鼠心脏起到保护作用,为临床器官移植的保护提供了一个新思路。然而,更加详尽的机制以及有哪些信号通路参与了保护作用,仍需要进一步研究。

## [参考文献]

- [1] Hunt S A, Haddad F. The changing face of heart transplantation[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 52: 587-598.
- [2] Makazan Z, Saini H K, Dhalla N S. Role of oxidative stress in alterations of mitochondrial function in ischemic-reperfused hearts[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292: H1986-H1994.
- [3] Vinten-Johansen J, Jiang R, Reeves J G, Mykytenko J, Deneve J, Jobe L J. Inflammation, proinflammatory mediators and myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2007, 21: 123-145.
- [4] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13: 688-694.
- [5] Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373: 30-35.
- [6] Zheng X, Mao Y, Cai J, Li Y, Liu W, Sun P, et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Free Radic Res*, 2009, 43: 478-484.
- [7] Hicks M, Hing A, Gao L, Ryan J, Macdonald P S. Organ preservation[J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 333: 331-374.
- [8] Bretschneider H J. Myocardial protection[J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1980, 28: 295-302.
- [9] Nelson S K, Bose S, Rizeq M, McCord J M. Oxidative stress in organ preservation: a multifaceted approach to cardioplegia[J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59: 149-157.
- [10] Nanetti L, Taffi R, Vignini A, Moroni C, Raffaelli F, Bacchetti T, et al. Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 303(1-2): 19-25.
- [11] Sheu S S, Nauduri D, Anders M W. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1762: 256-265.
- [12] Sato Y, Kajiyama S, Amano A, Kondo Y, Sasaki T, Handa S, et al. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375: 346-350.
- [13] Cai J, Kang Z, Liu K, Liu W, Li R, Zhang J H, et al. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model[J]. *Brain Res*, 2009, 1256: 129-137.
- [14] Sun Q, Kang Z, Cai J, Liu W, Liu Y, Zhang J H, et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2009, 234: 1212-1219.
- [15] Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361: 670-674.
- [16] Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis[J]. *Mutat Res*, 1997, 387: 147-163.
- [17] Frangogiannis N G, Smith C W, Entman M L. The inflammatory response in myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 53: 31-47.
- [18] Niemann J T, Garner D, Lewis R J. Tumor necrosis factor-alpha is associated with early postresuscitation myocardial dysfunction[J]. *Crit Care Med*, 2004, 32: 1753-1758.
- [19] Steffens S, Montecucco F, Mach F. The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury[J]. *Thromb Haemost*, 2009, 102: 240-247.
- [20] Buchholz B M, Kaczorowski D J, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Billiar T R, et al. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury[J]. *Am J Transplant*, 2008, 8: 2015-2024.

[本文编辑] 贾泽军