

氧自由基清除剂对供心的保护作用

谢建将, 黄达德, 陈伟民

(广州医学院附属广州市第一人民医院心胸外科, 广东省广州市 510180)

[关键词] 氧自由基清除剂; 供心, 缺血再灌注损伤; 心脏移植

[摘要] 氧自由基损伤是心脏移植中供心缺血再灌注损伤的重要机制, 研究表明合理的应用氧自由基清除剂能够减轻这种损伤。对内源性氧自由基清除剂辅酶 Q10、别嘌醇等及外源性氧自由基清除剂依达拉奉和 L-抗坏血酸 2-[3,4-二氢-2,5,7,8-四甲基-2-(4,8,12-三甲基十三烷基)-2H-1-苯并吡喃-6-磷酸酯]钾盐等的实验研究显示氧自由基清除剂能够对供心(包括无心跳供体心)起到保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

心脏移植已确立为治疗终末期心脏病的有效手术方法, 并广泛应用于临床。供心在移植过程中经历热缺血期、冷缺血期、保存期以及再灌注期, 在此过程中供心处于缺血、缺氧的状态, 对供心的保护直接关系到移植的成败。目前认为供心缺血及再灌注损伤的主要原因有: ①氧自由基损伤; ②钙超载; ③补体系统的激活; ④中性粒细胞的激活; ⑤细胞因子的作用。其中氧自由基损伤是其重要机制之一^[1]。Fräović^[2]提出氧自由基学说后, 针对氧自由基在心脏移植过程中对供心的损伤, 研究者对氧自由基清除剂做了大量的研究。本文就氧自由基清除剂对供心的保护作用做一综述。

1 氧自由基的产生及其作用机制

氧自由基主要包括超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)及单线态氧, 过氧化氢虽不是自由基, 但是一种氧化作用极强的活性氧。生理情况下体内约有 5% 氧原子通过“单价还原路径”获得电子而生成氧自由基, 其参与病原体的吞噬, 帮助凝血酶原、前列腺素和部分胶原蛋白等在体内的合成; 调节机体免疫以及细胞增殖; 同时在胚胎发育和生殖的过程中也发挥重要作用。正常人体的氧自由基清除系统包括: ①细胞色素氧化酶: 使氧原子减少而不产生氧自由基; ②超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD): 通过催化超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)而清除氧自由基; ③过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽(glutathione, GSH): 前者催化过氧化氢(H_2O_2)转化为 H_2O 和 O_2 , 后者可直接清除氧自由基; ④维生素 C 和维生素 E 通过中和氧自由基达到清除作用。生理情况下氧自由基与其清除系统处于动态平衡, 而缺血、缺氧时这种平衡被打乱, 其产生增多而清除系统的活性降低, 甚至丧失。目前认为缺血、缺氧时氧自由基在体内的

大量生成主要是通过^[3]: ①黄嘌呤氧化酶途径: 缺血、缺氧时体内次黄嘌呤大量堆积, 其在黄嘌呤氧化酶的作用下形成鸟苷酸和大量超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$); ②线粒体呼吸链途径: 缺氧时呼吸链受抑制, 辅酶 Q 被还原为半泛醌, 半泛醌与氧分子反应产生氧自由基; ③中性粒细胞系统: 在缺血再灌注期间, 中性粒细胞活化后释放细胞因子并向心肌内移动, 在靶器官内被还原型辅酶 II 氧化酶催化, 使之活化并产生氧爆发, 释放大量的氧自由基。

氧自由基具有很强的氧化性, 其致供心损伤主要是通过攻击生物膜上的不饱和脂肪酸致脂质过氧化及通过氧化氨基酸、氧化巯基团使多肽链断裂与膜蛋白反应。其氧化作用导致^[4]: ①使脂质膜流动性降低, 通透性增加; ②破坏线粒体膜上的离子泵(钠钾泵、钙泵等), 加剧细胞内离子失调, 使细胞内 Na^+ 、 Ca^{2+} 超载; ③改变呼吸链中 ATP 酶、腺苷转移酶、复合物 I 及复合物 III 的结构使呼吸链的活性受损。

2 氧自由基清除剂

内源性氧自由基清除剂可分为非酶类和酶类两大类, 前者主要有维生素 C、维生素 E、β-胡萝卜素、还原型谷胱甘肽、黄酮类和多糖类等活性肽类, 酶类主要有谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等几种; 外源性氧自由基清除剂主要是一些人工合成物, 如: 伊洛前列素、4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶和依达拉奉等。大量的研究发现通过给予供心适量的氧自由基清除剂能够清除因缺血缺氧而产生的过多的氧自由基, 减轻其对心肌的损伤。

3 氧自由基清除剂对供心的保护作用

针对氧自由基对供心的损伤, 合理应用氧自由基清除剂、加快氧自由基的清除能对供心的保护起到关键的作用, 但目前这种应用仅限于动物研究。

3.1 辅酶 Q10

辅酶 Q10 是线粒体氧化磷酸化中关键的递电子体, 其具有很强的氧自由基清除及抗氧化作用, 可防止心肌缺血再灌注损伤, 稳定膜结构, 其作用机制为^[5]: ①其能非特异性

[收稿日期] 2008-11-17 [修回日期] 2009-02-05

[作者简介] 谢建将, 硕士研究生, 研究方向为心胸外科临床, 联系电话为 020-81048278 E-mail 为 xiejianjiang105@126.com 通讯作者黄达德, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心胸外科临床, 联系电话为 020-81048278 陈伟民, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心肌保护, 联系电话为 020-81048278

的与心肌细胞的各个部位结合,使细胞色素 C 还原酶的活性增强,辅酶 Q10 提供电子给超氧阴离子 ($\cdot\text{O}_2^-$),使其还原为氧原子,自由基被清除;②外源性辅酶 Q10 的补充有助于呼吸链功能的恢复;Belardjelli 等^[6] 研究显示辅酶 Q10 能够阻止低密度脂蛋白氧化,改善血管内皮,从而减轻心肌损伤。修宗谊等^[7] 在取大鼠供心前给予供体静脉注射辅酶 Q10 复跳 4 h 后检测供心的超氧化物歧化酶、过氧化脂质、还原型谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶含量,结果显示实验组的氧自由基产生明显减少、超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性增强;实验组心肌细胞电镜下见线粒体轻度肿胀,偶见嵴减少,未见核膜、核仁消失;对照组线粒体排列紊乱,形态不规则,嵴排列紊乱或消失,部分线粒体呈空泡状,说明实验组心肌线粒体得到保护。Masushina 等^[8] 在犬实验中实验组在取供心前 1 h 给予供体静脉注射辅酶 Q10 对照组无此步骤。取下供心后用 4℃ 的 EC 保存液保存,6 h 及 24 h 后测得实验组供心心肌的 ATP 含量下降不明显,甚至在用心脏植入后复灌 3 h 测得心肌的 ATP 含量与缺血前相近,而对照组则明显下降。通过对供心中脂质过氧化降解产物丙二醛的检测也发现实验组较对照组明显减少;且左心室功能实验组较对照组亦有明显改善。

3.2 一氧化氮

一氧化氮 (nitrogen monoxide, NO) 是一种强有力的血管扩张剂,可以改善再灌注期间的血流,其拮抗氧自由基的作用是通过直接与氧自由基中和,消除其对心肌的损伤^[9-10]。钱伟民等^[11] 在供心保存液中加入左旋精氨酸——NO 的合成底物,增加体内 NO 的含量,以提高供心的保存效果。SD 大鼠供心保存,对照组用 4℃ St Thomas 液,实验组添加入左旋精氨酸,6 h 后行颈部异位心脏移植术,对照组心脏自动复跳率明显低于实验组,且心肌 ATP 和 SOD 的含量也明显低于实验组,心肌超微结构损伤则较实验组明显。Dedeoğlu 等^[12] 在 St Thomas 液中加入 NO 的前体伊洛前列素保存大鼠供心,移植成功后通过对心功能参数、心肌组织损伤程度及氧化应激标志物的评估显示:实验组供心的保存得到明显改善,表明伊洛前列素能够提高供心保存效果。Kobayashi 等^[13] 对兔的心脏移植过程中在心脏停跳液加入 RHO 激酶,保存 24 h 后通过对冠状动脉的血流动力学及左心室功能的检测发现,实验组较对照组的损伤明显降低,进一步研究表明其原理正是激活 NO 依赖的内皮保护系统。

3.3 别嘌呤醇

别嘌呤醇为黄嘌呤氧化酶抑制剂,Zhao 等^[14] 认为其对心肌缺血再灌注损伤保护的机制为:①抑制黄嘌呤氧化酶,使氧自由基产生减少;②降低心肌 ATP 消耗,通过补救途径合成 ATP;③直接清除氧自由基;④增加心肌的抗氧化能力。Belhou 等^[15] 通过对心肌酶及丙二醛的检测,发现在保存液中加入别嘌呤醇能明显减轻供心的缺血再灌注损伤。Kinnugasa 等^[16] 通过电子自旋共振谱直接测定自由基在缺血及再灌注过程中的产生情况,发现氧自由基在再灌注期大量产生,而在给予别嘌呤醇的供心中氧自由基的产生则明显减少,同时发现别嘌呤醇降低供心缺血再灌注损伤主要是通过

抑制氧化,而对 ATP 的挽救没有明显作用。Gao 等^[17] 在对离体心脏冠状动脉的研究中发现,在冠状动脉灌注液中加入别嘌呤醇可降低冠状动脉血管内皮的氧自由基损伤,有利于心肌功能的恢复。Duda 等^[18] 对离体猪心的研究同样发现内皮素 1 介导缺血后的冠状动脉内皮损伤,而缺血前在灌注液中加入别嘌呤醇能够减少再灌注时期冠状动脉内皮氧自由基的产生,降低这种损伤,从而达到心肌保护。

3.4 维生素 C 与维生素 E

维生素 C 是在谷胱甘肽还原酶的作用下,促使氧化型谷胱甘肽还原为还原型,使 -SH 维持在还原状态而达到抗氧化作用;维生素 E 的氧自由基清除作用是通过捕捉自由基形成生育酚自由基,后者又可进一步与另一自由基反应生成非自由基产物——生育醌。Schulte 等^[19] 在心脏移植前分别对供体和受体大鼠静脉给予维生素 E 结果显示移植后心肌肌动蛋白表达增加而致病因子 beta-MHC 与 VCAM-1 的表达被抑制。L 抗坏血酸 2-[3,4-二氢-2,5,7,8-四甲基-2-(4,8,12-三甲基十三烷基)-2H-1 苯并吡喃-6 磷酸酯] 钾盐 (EPC-K1) 是合成的维生素 C 和维生素 E 的衍生物,是一种良好的氧自由基清除剂。Tanemoto 等^[20] 在取供心前静脉给予供体 EPC-K1 12 mg/kg 术后 7 d 大鼠的成活率实验组较对照组明显提高。Tsoulos 等^[21] 在心肌缺血前静脉给予实验兔的维生素 C 在再灌注 3 h 后检测冠状动脉漏出液中丙二醛的含量,维生素 C 组较对照组丙二醛的含量明显降低,维生素 C 能够降低心肌在缺血再灌注期间的氧自由基损伤。

3.5 超氧化物歧化酶

SOD 通过催化超氧阴离子 ($\cdot\text{O}_2^-$) 清除氧自由基,Abunasa 等^[22] 在大鼠供心保存液中加入锰超氧化物歧化酶,在移植成功后 4 d 再次取下供心,做离体心脏灌注并对供心的左心室功能恢复情况进行评估,通过对心脏左心室发展压检测显示 Mn 超氧化物歧化酶组心功能较对照组明显改善。夏经钢等^[23] 的研究也同样显示 SOD 对心肌的氧自由基损伤有保护作用。Song 等^[24] 在肝移植过程中外源性的在保存液中加入 SOD 结果发现供体肝的缺氧再灌注损伤明显降低。供心和供肝在移植过程中损伤有很多相似之处,Song 的研究也为 SOD 在供心保护中的研究提供了借鉴。

3.6 谷胱甘肽

GSH 可以直接清除氧自由基,其与白细胞生成的髓过氧化物酶衍生氧化物反应,并抑制细胞色素 P450 还原酶和 NADPH 的活性,减少氧自由基的产生,另一方面提高心肌的抗氧化能力,减轻心肌缺血再灌注损伤,从多个环节阻断氧自由基对心肌的损伤^[25]。研究显示 GSH 含量的增加能够明显降低心肌的氧自由基损伤^[26]。Shama 等^[27] 在切取供心前 30 min 静脉给予大鼠 GSH 在再灌注后通过对心肌磷酸果糖激酶、顺乌头酸酶、葡萄糖-6 磷酸脱氢酶的测定结果说明了 GSH 能够抑制这些代谢关键酶的氧化应激损伤而达到心肌保护。

3.7 外源性氧自由基清除剂

多以内源性氧自由基清除剂前体或是合成物出现,而通过内源性氧自由基清除剂发挥作用,主要有亚丁酰基抗氧

剂、4-羟基 2,2,6,6-四甲基哌啶和依达拉奉,这类氧自由基清除剂在对供心的保存中的研究目前还较少。

4 氧自由基清除剂对无心跳供体供心的保护作用

供体的短缺是限制器官移植研究进一步深入的重要原因,无心跳供体研究的出现扩大了移植的供体池,现有的研究也表明氧自由基清除剂在无心跳供体器官移植中亦有积极的作用。依达拉奉是一种羟自由基清除剂,其同时具有抗羟基依赖和铁依赖的脂质过氧化作用^[28]。Kotani等^[29]在猪心无心跳供体心脏移植中,通过缺氧诱导供体猪死亡。热缺血 30 min 后切取供心,立即用 St Thomas 混入含氧血 ($PO_2 = 100$ mmHg) 液经主动脉根部灌注 20 min,随后用 St Thomas 液混入高氧血 ($PO_2 = 300$ mmHg) 保存。实验组在切取供心后前 30 min 灌注液中加入依达拉奉 (3 mg/kg),对照组则不添加。通过对复跳心脏输出量、左心室收缩末压力与容积比及左心室发展压的测定发现实验组较对照组心功能有明显改善。表明依达拉奉作为一种强效的氧自由基清除剂在无心跳供心保存初期中的应用,对供心移植后的恢复有重要意义。Hjisman 等^[30]同样通过缺氧诱导供体犬死亡,通过体外循环使供心降温至 15℃ 后进行标准心脏移植。移植过程中实验组在心肌灌注液中加入 EPC (一种氧自由基清除剂),对照组则用常规心肌灌注液。在 60 min 的并体循环后实验组在不需要药物心功能支持的情况下成功的脱离了体外循环,而对照组则需要多巴胺支持。移植成功后 1 h 通过对心脏指数的测定,表明实验组心功能较对照组有明显改善, EPC 能降低无心跳供体心移植后心肌的再灌注损伤。

氧自由基清除剂对供心保护作用的研究表明了其具有的积极作用,而无心跳供体的开发和利用又为供心池的扩大开辟了另一路径。氧自由基清除剂在无心跳供体心脏移植中的作用的进一步深入,将为心脏移植做出更多的贡献。

【参考文献】

- [1] James K, Kirk L, James BY, et al. 心脏移植 (英文原版). 北京: 人民卫生出版社, 2002 318-322.
- [2] Fräovich J. Hypoxia and oxygen oxidiz[J]. *Adv Neurol* 1979 **26**: 255-259.
- [3] 周凤鑫. 组织血液灌注与微循环的病理生理 (7)——缺血再灌注损伤 [J]. *外科理论与实践*, 2008 **13** (3): 38-42.
- [4] Heusch G, Boengler K, Schuler R. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria [J]. *Circulation* 2008 **118** (19): 1915-919.
- [5] Lekli J, Das S, Mukherjee S. Coenzyme Q₁₀ provides cardioprotection after converting into coenzyme Q₁₀ [J]. *J Agric Food Chem* 2008 **56** (13): 5331-337.
- [6] Belardielli R, Tiano L, Litarru GP. Oxidative stress, endothelial function and coenzyme Q₁₀ [J]. *BioFactors* 2008 **32** (14): 129-133.
- [7] 修宗谊, 谷春久. 辅酶 Q₁₀ 对移植心脏再灌注损伤保护的实验研究 [J]. *中国心血管杂志*, 1998 **3** (3): 145-147.
- [8] Matsushima T, Sueda T, Matsui Y, et al. Protection by coenzyme Q₁₀ of canine myocardial reperfusion injury after preservation [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992 **103** (5): 945-951.
- [9] 张梅, 黄体钢, 周丽娟. 一氧化氮在乳鼠心肌细胞缺氧复氧预处理延迟保护效应中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004 **12** (5): 545-548.

- [10] West MB, Rokosh G, Obal D, et al. Cardiac myocyte specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemic reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition [J]. *Circulation* 2008 **118** (19): 1970-978.
- [11] 钱伟民, 张中明, 张伟, 等. 磷酸肌酸、左旋精氨酸对移植供心保护作用的研究 [J]. *徐州医学院学报*, 2006 **26** (2): 112-115.
- [12] Dedering BD, Ayat G, Sizer Q, et al. Donor heart preservation with iloprost supplemented St. Thomas Hospital cardioplegic solution in isolated rat hearts [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2008 **78** (6): 415-421.
- [13] Kobayashi M, Tanoue Y, Eto M, et al. A Rho kinase inhibitor improves cardiac function after 24-hour heart preservation [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008 **136** (6): 1586-592.
- [14] Zhao L, Roche JM, Wessale JL, et al. Chronic xanthine oxidase inhibition following myocardial infarction in rabbits: effects of early versus delayed treatment [J]. *Life Sci* 2008 **82** (9-10): 495-502.
- [15] Beljour A, Roberts D, Björsson R, et al. Oxygen free radical generation in healthy blood donors and cardiac patients: the protective effect of allopurinol [J]. *Perfusion* 2001 **16** (1): 59-65.
- [16] Kinugasa Y, Ogino K, Furuse Y, et al. Allopurinol improves cardiac dysfunction after ischemic reperfusion via reduction of oxidative stress in isolated perfused rat hearts [J]. *Circ J* 2003 **67** (9): 781-787.
- [17] Gao X, Zhang H, Behrman S, et al. Role of TNF- α induced reactive oxygen species in endothelial dysfunction during reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 **295** (6): H2242-249.
- [18] Duda M, Konjor A, Klemenšek E, et al. Preconditioning protects endothelium by preventing ET-1-induced activation of NADPH oxidase and xanthine oxidase in post ischemic heart [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2007 **42** (2): 400-410.
- [19] Schulte J, Bektaş H, Kempnauer J, et al. Vitamin E in heart transplantation: effects on cardiac gene expression [J]. *Transplantation* 2006 **81** (5): 736-45.
- [20] Tanemoto K, Sakagami K, Orii K, et al. Beneficial effect of EPC-K₁ on the survival of warm ischemic damaged graft in rat cardiac transplantation [J]. *Acta Med Okayama* 1993 **47** (2): 121-127.
- [21] Tsovilas K, Ilidiotis EK, Andreadou I, et al. A acute administration of vitamin C abrogates protection from ischemic preconditioning in rabbits [J]. *Pharmacol Res* 2008 **57** (4): 283-289.
- [22] Abunasa HJ, Snolenski RT, Yap J, et al. Comparison of two gene transfer models for the attenuation of myocardial ischemic reperfusion injury following preservation for cardiac transplantation [J]. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006 **29** (5): 772-778.
- [23] 夏经钢, 胡健, 曾定尹. 左旋卡尼汀对兔心肌缺血再灌注损伤的保护 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006 **14** (4): 333-335.
- [24] Song SW, Tollba RH, Yonezawa K, et al. Exogenous superoxide dismutase prevents peroxynitrite-induced apoptosis in non heart beating donor livers [J]. *Eur Surg Res* 2008 **41** (4): 353-361.
- [25] Leichweis S, Leeuwenburgh C, Bejina J, et al. Aged rat hearts are not more susceptible to ischemic reperfusion injury in vivo: role of glutathione [J]. *Med Ageing Dev* 2001 **122** (6): 503-518.
- [26] 赵艳芬, 秦永文, 王学敏, 等. 曲美他嗪对大鼠缺血再灌注心肌线粒体的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005 **13** (2): 171-174.
- [27] Sharma AB, Sun J, Howard LL, et al. Oxidative stress reversibly inactivates myocardial enzymes during cardiac arrest [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 **292** (1): H198-206.
- [28] Yagi H, Horinaka S, Masuoka H, et al. Edaravone prevented deteriorated cardiac function after myocardial ischemic reperfusion via inhibition lipid peroxidation in rat [J]. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005 **46** (1): 46-51.
- [29] Koini Y, Ishino K, Osaki S, et al. Efficacy of MCI-186, a free radical scavenger and antioxidant, for resuscitation of nonbeating donor hearts [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007 **133** (6): 1626-632.
- [30] Hismochi K, Morimoto T, Bando K, et al. A new hydroxyl radical scavenger "EPC" on cadaver heart transplantation in a canine model [J]. *Surg Today* 1997 **27** (10): 930-935.

(此文编辑 李小玲)