

铁负荷对离体大鼠心脏和分离心室肌细胞的作用<sup>\*</sup>陈莹莹<sup>1,2</sup>, 曹春梅<sup>1</sup>, 徐万红<sup>1</sup>, 沈岳良<sup>1</sup>, 钱忠明<sup>2</sup>, 夏强<sup>1,△</sup><sup>(1)</sup> 浙江大学医学院生理教研室, 浙江 杭州 310031; <sup>(2)</sup> 香港理工大学应用生物与化学技术系, 香港 九龙

[摘要] 目的: 研究水溶性  $\text{Fe}^{3+}$  和透膜的脂溶性  $\text{Fe}^{3+}$  复合物对心肌功能和心肌脂质过氧化水平的影响。方法: 采用离体灌流心脏和酶解分离心室肌细胞模型, 检测心肌力学指标、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、丙二醛(MDA)及冠脉流量等指标。结果:  $\text{FeCl}_3$  缩短舒张期心室肌细胞长度, 5、15  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  增加细胞收缩幅度和速度;  $\text{FeCl}_3$  使灌流心脏 LVDP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 、心率、冠脉流量增大, 对心肌 LDH、CK 释放量和 MDA 无明显影响。Fe-HQ 使心室肌细胞舒张期长度、收缩幅度和  $\pm dL/dt_{\max}$  减小, 引起灌流心脏 LVDP、 $\pm dp/dt_{\max}$ 、心率、冠脉流量先增加后降低的双相变化, 高浓度时可使冠脉流出液 LDH 和 CPK 量明显增高, 心肌 MDA 增高, 心律失常加重。结论: 心肌细胞内铁增加可引起心功能受损和脂质过氧化程度增高, 水溶性  $\text{Fe}^{3+}$  对心肌细胞功能的影响较脂溶性  $\text{Fe}^{3+}$  小。

[关键词] 铁; 心脏; 心肌损伤; 脂质过氧化

[KEY WORDS] Iron; Heart; Myocardial injuries; Lipid peroxidation

[中图分类号] R331.3<sup>+</sup>1 [文献标识码] A

铁是人体代谢所必需的微量元素。随着人们生活条件的改善, 高铁膳食、高铁滋补品被广泛接受, 铁的负面效应也越来越受到医学界的关注。实验发现, 高铁饮食的大鼠与低铁饮食的大鼠相比, 缺血心肌的脂质过氧化程度增高<sup>[1]</sup>。对离体兔心进行 30 min 缺血和 30 min 复灌, 在缺血末 3 min 及再灌前 4 min 加入草酞酮-铁, 使铁进入细胞内, 可使心室发展压恢复能力降低, 脂质过氧化水平增加<sup>[2]</sup>。可见高铁可加重心肌缺血再灌性损伤。临床上, 患有需要长期输血疾病(如地中海贫血等)的病人, 往往因输血性高铁血症引起心肌细胞功能受损。但是, 外源性铁对正常心肌的作用尚未完全明了, 特别是在细胞外铁过负荷条件下心肌功能的改变及其机制有待阐明。本文主要研究水溶性  $\text{Fe}^{3+}$  和透膜的脂溶性  $\text{Fe}^{3+}$  复合物对心肌功能和心肌脂质过氧化水平的影响。

## 材 料 和 方 法

## 1 实验动物和材料

雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 由浙江大学医学院实验动物中心提供。  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 上海金山化工厂生产。8-羟基喹啉、I 型胶原酶、牛血清白蛋白、MOPS 均购自 Sigma 公司。

## 2 单个心室肌细胞酶解分离和收缩的测定

雄性 SD 大鼠(200-250 g)离体心脏行恒流灌流(流速 12 mL/min, 37  $^{\circ}\text{C}$ )。以含 I 型胶原酶 0.3 g/L 的无钙台氏液分离单个心室肌细胞。

心肌细胞贴壁后, 肌槽以 K-H 液(95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  饱和)灌流, 温度 32  $^{\circ}\text{C}$ 。电场刺激频率 0.4 Hz, 强度为两倍阈强度。用 MedEase 视频跟踪计算机图像分析系统记录并分析心室肌细胞的收缩幅度、 $\pm dL/dt_{\max}$  和舒张期心室肌细胞的长度。

## 3 离体心脏左室功能评价和心律失常评分

雄性 SD 大鼠(250-300 g)离体心脏行常规恒压灌流(76 mmHg), 灌流液温度 37  $^{\circ}\text{C}$ 。

采用左室内水囊传递压力测定心室内压; 心电电极分别置于肺动脉圆锥及心尖部。通过 PcLab 生物信号采集处理系统记录 ECG 和左室收缩曲线, 测定左室收缩峰压(LVSP)、左室发展压(LVDP)、心率、 $\pm dp/dt_{\max}$ 。

采用 Curtis 和 Walker 心律失常评分法对心律失常严重程度进行定量分析<sup>[3]</sup>。

## 4 心肌损伤和脂质过氧化指标测定

在相应时点记录冠脉流量, 同时收集冠脉流出液, 用全自动生化分析仪(CX-4 型)分析其中乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)的释放量。实验结束时心脏称重后置于一 20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存, 备测丙二醛(MDA)。以硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量。

## 5 实验分组

A 大组为酶解分离心室肌细胞组, B 大组为离体灌流心脏组。

A1 组(对照组,  $n=7$ ): 稳定 15 min 后, 继续灌流 40 min。A2 组( $\text{FeCl}_3$  组,  $n=7$ ): 稳定后, 每隔 5 min 累计加药使  $\text{FeCl}_3$  浓度为 1、2.5、5、10、15、20 和 25  $\mu\text{mol/L}$ 。A3 组(Fe-HQ 组,  $n=7$ ): 稳定后, 每隔 5 min 累计加药使 Fe-HQ 浓度为 1、2.5、5、10、15、20 和 25  $\mu\text{mol/L}$ 。

B1 组(对照组,  $n=8$ ): 稳定 15 min 后, 继续灌流 40 min。B2 组( $\text{FeCl}_3$  组,  $n=8$ ): 稳定后,  $\text{FeCl}_3$ (1、2.5 或 5  $\mu\text{mol/L}$ )灌流 10 min 后, 再用 K-H 液灌流 30 min。B3 组(Fe-HQ 组,  $n=8$ ): 稳定后, Fe-HQ(1、2.5 或 5  $\mu\text{mol/L}$ )灌流 10 min 后, 再用 K-H 液灌流 30 min。

## 6 统计学处理

各组数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用 Student's  $t$  检验和 ANOVA 做统计学分析。

## 结 果

1  $\text{FeCl}_3$  对酶解分离心室肌细胞的作用

1 和 2.5  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{FeCl}_3$  对心室肌细胞各指标无明显影响, 而  $\text{FeCl}_3$  浓度  $\geq 5 \mu\text{mol/L}$  时, 舒张末细胞长度明显缩短, 25  $\mu\text{mol/L}$  时达对照的 90% ( $P < 0.01$ )。5 和 15  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  引起收缩幅度和  $\pm dL/dt_{\max}$  增加分别达对照的 137%、142% (均

[收稿日期] 2001-03-07 [修回日期] 2001-05-11

\* [基金项目] 浙江省自然科学基金青年人才专项基金资助项目(RC99038)

 $\Delta$  Tel: 0571-87217146, E-mail: xiaqiang@cmm.zju.edu.cn

$P < 0.01$ ) 和 149%、151% ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ ), 但  $25 \mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  并不引起收缩幅度和  $+dL/dt_{\text{max}}$  的增加。各浓度的  $\text{FeCl}_3$  对  $-dL/dt_{\text{max}}$  无明显影响。

### 2 Fe-HQ 对酶解分离心肌细胞的作用

$\text{Fe-HQ}$  浓度  $\geq 5 \mu\text{mol/L}$  时, 心肌细胞舒张末长度缩短、收缩幅度降低、 $\pm dL/dt_{\text{max}}$  减小 ( $P < 0.01$ ),  $25 \mu\text{mol/L}$  时上述各指标分别达对照的 86%、37.5%、46% 和 58%。 $2.5 \mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe-HQ}$  可降低收缩幅度达对照的 88% ( $P < 0.05$ ), 但对其它指标无明显影响。

### 3 $\text{FeCl}_3$ 对离体灌流心脏的作用

1 和  $2.5 \mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  灌流后使 LVDP、 $\pm dp/dt_{\text{max}}$  增高,  $5 \mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  灌流后使 LVDP、 $\pm dp/dt_{\text{max}}$  先增高后降低,  $\text{FeCl}_3$  可加快心率(图 1)。  $\text{FeCl}_3$  灌流可使心律失常略增多, 但无显著差异 ( $P > 0.05$ )。  $\text{FeCl}_3$  灌流后可增加冠脉流量, 恢复 K-H 液灌流后  $5 \mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  处理组冠脉流量逐渐降低并低于正常, 其余组基本恢复(表 1)。不同浓度的  $\text{FeCl}_3$  对心肌 LDH、CK 释放量和 MDA 无明显影响。

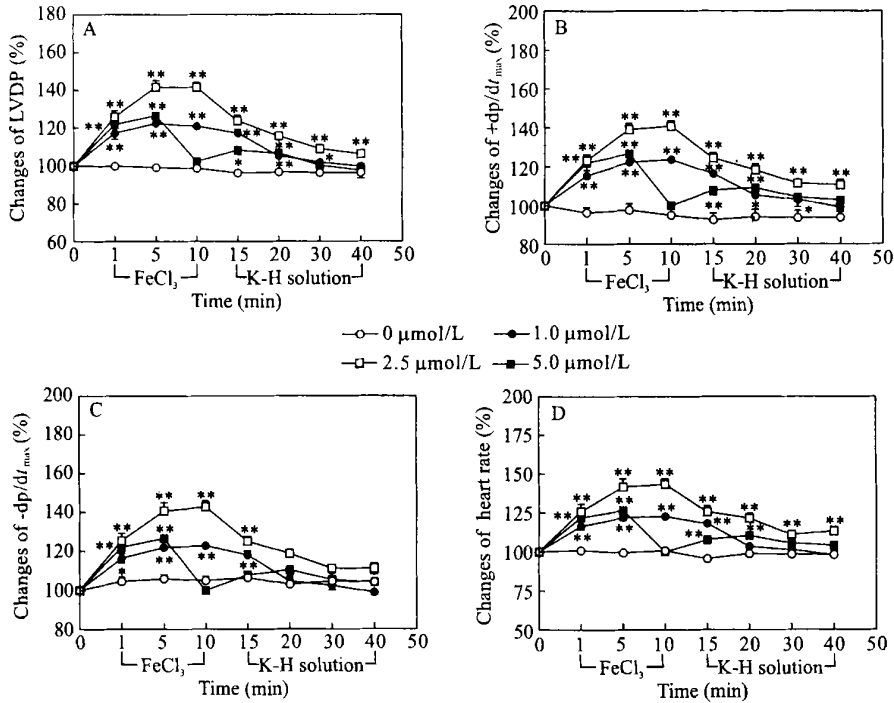


Fig 1 Effects of  $\text{FeCl}_3$  on left ventricular developed pressure (LVDP) (A), maximal rate of rise/fall of ventricular pressure ( $\pm dp/dt_{\text{max}}$ ) (B and C), heart rate (D) in isolated perfused hearts.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 7$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group ( $0 \mu\text{mol/L}$ ).

图 1  $\text{FeCl}_3$  对离体灌流心脏 LVDP(A)、 $\pm dp/dt_{\text{max}}$ (B、C)、心率(D)的影响

表 1  $\text{Fe-HQ}$  和  $\text{FeCl}_3$  对灌流心脏冠脉流量 ( $\text{mL/min}$ ) 的影响

Tab 1 Effects of  $\text{Fe-HQ}$  and  $\text{FeCl}_3$  on coronary flow ( $\text{mL/min}$ ) in isolated perfused hearts ( $\bar{x} \pm s$ .  $n = 7-8$ )

	Pre-drug	Drug			Post-drug			
		1 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	40 min
Control	$9.60 \pm 0.15$	$9.00 \pm 0.33$	$8.81 \pm 0.23$	$8.83 \pm 0.25$	$8.45 \pm 0.23$	$7.99 \pm 0.30$	$7.95 \pm 0.48$	$7.68 \pm 0.35$
$\text{FeCl}_3$								
1.0 $\mu\text{mol/L}$	$9.03 \pm 0.31$	$10.99 \pm 0.23^{**}$	$10.80 \pm 0.22^{**}$	$10.19 \pm 0.34^{**}$	$9.00 \pm 0.26$	$8.44 \pm 0.24$	$8.08 \pm 0.23$	$8.03 \pm 0.25$
2.5 $\mu\text{mol/L}$	$9.14 \pm 0.26$	$11.11 \pm 0.26^{**}$	$10.01 \pm 0.17^{**}$	$8.83 \pm 0.24$	$8.72 \pm 0.25$	$8.56 \pm 0.26$	$8.25 \pm 0.24$	$8.26 \pm 0.25$
5.0 $\mu\text{mol/L}$	$9.06 \pm 0.39$	$11.05 \pm 0.54^{**}$	$7.86 \pm 0.25^*$	$5.93 \pm 0.18^{**}$	$6.69 \pm 0.21^{**}$	$6.44 \pm 0.19^{**}$	$6.54 \pm 0.24^*$	$6.50 \pm 0.25^*$
$\text{Fe-HQ}$								
1.0 $\mu\text{mol/L}$	$8.91 \pm 0.23$	$11.11 \pm 0.37^{**}$	$9.88 \pm 0.26^{**}$	$7.95 \pm 0.48$	$8.28 \pm 0.36$	$7.65 \pm 0.36$	$6.95 \pm 0.35$	$6.48 \pm 0.32^*$
2.5 $\mu\text{mol/L}$	$8.99 \pm 0.31$	$11.25 \pm 0.49^{**}$	$7.14 \pm 0.22^{**}$	$3.94 \pm 0.25^{**}$	$5.30 \pm 0.11^{**}$	$5.06 \pm 0.16^{**}$	$4.60 \pm 0.17^{**}$	$4.14 \pm 0.15^{**}$
5.0 $\mu\text{mol/L}$	$8.61 \pm 0.38$	$10.48 \pm 0.40^*$	$5.13 \pm 0.45^{**}$	$3.30 \pm 0.41^{**}$	$4.55 \pm 0.33^{**}$	$4.69 \pm 0.32^{**}$	$4.21 \pm 0.30^{**}$	$3.96 \pm 0.20^{**}$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs control group.

### 4 $\text{Fe-HQ}$ 对离体灌流心脏的作用

$\text{Fe-HQ}$  使 LVDP、 $\pm dp/dt_{\text{max}}$  先明显增高, 随后逐渐降低, 换用 K-H 液灌流后, 低浓度组可恢复正常, 而  $5 \mu\text{mol/L}$   $\text{Fe-HQ}$  组上述各参数仍低于正常(图 2)。  $5.0 \mu\text{mol/L}$  的  $\text{Fe-HQ}$  灌流可使心律失常明显增多(从用药前的  $0.25 \pm 0.16$  增加到用药后 0-10 min 和 10-40 min 的  $1.88 \pm 0.13$  和  $2.50 \pm 0.33$ 。

$P < 0.01$ )。 心率、冠脉流量呈现双相变化, 先增加, 随后逐渐降低(图 2, 表 1)。 低浓度组冠脉流出液中 LDH、CK 的量和心肌 MDA 与对照组无差异,  $5 \mu\text{mol/L}$   $\text{Fe-HQ}$  灌流后使冠脉流出液中 LDH 和 CK 的量增加达对照的 126% 和 234%, 心肌 MDA 含量增加达对照的 144% ( $P$  均  $< 0.01$ )。

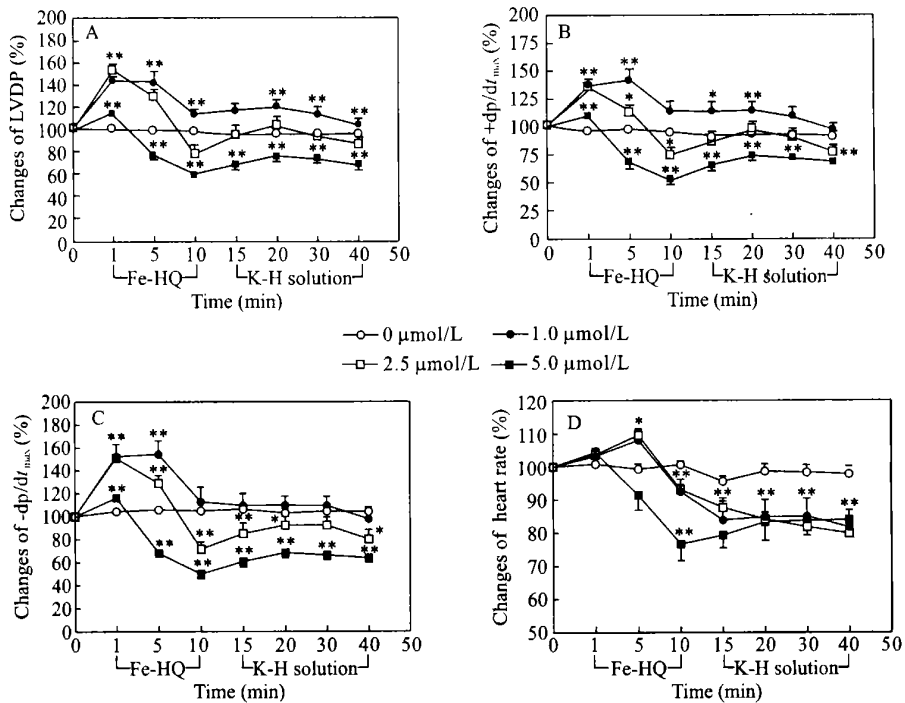


Fig 2 Effect of Fe-HQ on left ventricular developed pressure (LVDP)(A), maximal rate of rise/ fall of ventricular pressure ( $\pm dp/dt_{max}$ ) (B and C), heart rate (D) in isolated perfused hearts.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 8$ . \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ , vs control group ( $0 \mu\text{mol/L}$ ).

图2 Fe-HQ对离体灌流心脏 LVDP(A)、 $\pm dp/dt_{max}$ (B、C)、心率(D)的影响

### 讨 论

有报道, 心肌缺血时, 铁从铁蛋白中释放后, 氧化态( $\text{Fe}^{3+}$ )还原为有活性的还原态( $\text{Fe}^{2+}$ ), 能催化产生氧自由基, 诱发心肌损伤。如加入外源性铁使心肌细胞内铁(主要是 $\text{Fe}^{3+}$ 形式)过荷, 并不能催化产生氧自由基<sup>[4]</sup>。本实验在离体灌流心脏和心室肌细胞水平, 发现三价铁同样可对心肌功能产生损伤, 并增加脂质过氧化程度。用脂溶性的透膜三价铁复合物, 不同程度地增加心肌细胞内铁, 发现心脏的收缩功能先加强后减弱, 心肌细胞发生不同程度的损伤, 心肌LDH和CK释放增加, 心率减慢, 左室发展压降低, 脂质过氧化水平增高, 冠脉流量亦呈双相性改变。有报道, 高浓度的 $\text{Fe}^{3+}$ -HQ能使灌流液中 $\cdot\text{OH}$ 含量增高<sup>[5]</sup>。故认为, 铁通过参与催化Haber-Weiss反应, 产生氧自由基, 对心肌产生毒性作用。体外实验证明, 铁主要攻击的靶部位是心肌肌膜和溶酶体膜, 增加膜脂质过氧化。急性铁超负荷时以心肌肌膜受损为主。同时, 富含巯基的蛋白质对铁亦非常敏感<sup>[6]</sup>, 往往造成细胞内与收缩有关的酶失活, 致使心肌细胞电生理及收缩功能异常, 即心肌的收缩力下降, 动作电位的超射值减小, 发生心律失常。

本实验证明, 水溶性三价铁离子可加强离体心肌的收缩和加快心率, 对冠脉流量亦有明显作用。水溶性三价铁离子对心脏正性作用的机制尚不清楚。在细胞水平, 水溶性三价铁离子对心室肌细胞的作用与离体心脏相似, 说明水溶性三价铁离子对心脏的正性作用与心脏交感神经无关。外源性水溶性三价铁如何转运进入心室肌细胞内的机制不明。体

外实验证明, 心肌细胞外的铁转运至心肌细胞内并非主要依赖载铁蛋白途径, 但其确切的心肌铁代谢和转运目前还不明了, 有待于进一步研究。

### [参 考 文 献]

- [1] van Jaarsveld H, Schulenburg DH. Dietary iron alters liver, erythrocyte and plasma antioxidant and nitrite levels and also sensitizes the heart to ischemia/reperfusion[J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997, 97(3): 347-360.
- [2] Lesnfsky E.J, Ye J. Exogenous intracellular, but not extracellular iron augments myocardial reperfusion injury[J]. Am J Physiol, 1994, 266(2 Pt 2): H384-H392.
- [3] Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an *in vivo* model of regional myocardial ischaemia[J]. Cardiovasc Res, 1988, 22(9): 656-665.
- [4] Voogl A, Sluiter W, van Eijk HG, et al. Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts[J]. J Clin Invest, 1992, 90(5): 2050-2055.
- [5] Oubidar M, Marie C, Mossiat C, et al. Effects of increasing intracellular reactive iron level on cardiac function and oxidative injury in the isolated rat heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 1996, 28(8): 1769-1776.
- [6] Korge P, Campbell KB. Iron effects on myocardial enzymes depend on redox state[J]. J Mol Cell Cardiol, 1994, 26(2): 151-162.