

辣椒素降低线粒体氧化应激水平拮抗心脏缺血再灌注损伤的研究*

朱娟霞¹, 孔令恒¹, 张超锋², 孙娜^{1△}, 常晋瑞¹, 徐燕¹

1. 西安医学院基础医学部 生理教研室 (西安 710021); 2. 西电集团医院 心内科 (西安 710077)

【摘要】 目的 探讨辣椒素(CAP)对心脏缺血再灌注损伤的保护作用及可能机制。方法 24只SD雄性大鼠随机分为4组($n=6$):①对照组,②缺血再灌注组(IR组),③CAP干预缺血再灌注组(CAP+IR组),④辣椒素受体拮抗剂辣椒平(CAPZ)预处理后加CAP干预缺血再灌注组(CAPZ+CAP+IR组)。采用大鼠离体心脏Langendorff灌注方法,再灌注30min末以左室发展压(LVDP)和左室舒张末压(LVEDP)评价心脏功能。测定再灌注开始后前5min冠脉流出液中乳酸脱氢酶(LDH)的含量。再灌注120min后取心脏,采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法评价心肌梗死面积的变化;HE染色观察心肌纤维形态学变化;线粒体氧化应激检测试剂盒检测超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)。再灌注10min取心脏组织,Western blot检测细胞色素c和caspase-3蛋白表达。结果 与对照组相比,IR组LVEDP升高、LVDP降低($P<0.01$),心肌梗死面积增大($P<0.01$),心肌纤维排列紊乱,线粒体SOD活性降低、MDA质量摩尔浓度增加($P<0.01$),冠脉流出液中LDH含量增多($P<0.01$),caspase-3、细胞色素c蛋白的表达量增加($P<0.01$);与IR组比较,CAP+IR组LVEDP降低、LVDP部分恢复($P<0.01$),心肌梗死面积减小($P<0.01$),心肌纤维断裂减少,线粒体SOD活性增加,MDA质量摩尔浓度减少($P<0.01$),冠脉流出液中LDH含量减少($P<0.01$),caspase-3和细胞色素c蛋白表达量降低($P<0.01$);但CAPZ可阻断CAP的上述保护作用。结论 CAP可通过降低线粒体氧化应激减少缺血再灌注引起的细胞坏死和凋亡,改善心脏功能,减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤。

【关键词】 辣椒素 线粒体氧化应激 心脏缺血再灌注损伤

Capsaicin Alleviate Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Through Attenuating Mitochondrial Oxidative Stress

ZHU Juan-xia¹, KONG Ling-heng¹, ZHANG Chao-feng², SUN Na^{1△}, CHANG Jin-rui¹, XU Yan¹. 1. Department of Physiology, School of Basic Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Department of Cardiology, Xi'an XD Group Hospital, Xi'an 710077, China

△ Corresponding author, E-mail: suna1935@139.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of capsaicin (CAP) in myocardial ischemia reperfusion injury and its underlying mechanisms. **Methods** Twenty-four adult male SD rats were randomized into 4 groups, namely the control group, ischemia reperfusion group, ischemia reperfusion with CAP group, and ischemia reperfusion with CAPZ and CAP group. Isolated rat hearts underwent Langendorff perfusion. Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and left ventricular developed pressure (LVDP) was calculated to evaluate myocardial performance at 30 min of reperfusion. Triphenyltetrazolium chloride staining was used to measure the infarct size of myocardium at 120 min reperfusion. The morphological changes in myocardial fiber was analyzed by HE staining at the end of reperfusion. Lactate dehydrogenase (LDH) content in the coronary flow was determined during the first 5 min reperfusion. The myocardial mitochondria was isolated and extracted for measuring a series of indicators of mitochondrial oxidative stress, including superoxide dismutase (SOD), methane dicarboxylic aldehyde (MDA) at the end of reperfusion. Western blot was used to determine the expression of caspase-3 and cytochrome c at 10 min reperfusion. **Results** Compared with the control group, IR group significantly decreased in cardiac function, the level of LVDP and SOD activity and induced an enlarged infarct size ($P<0.01$), accompanied by the disordered arrangement of myocardial cells, the content of MDA was increased ($P<0.01$), the content of caspase-3 and cytochrome c were also up-regulated ($P<0.01$). 10 $\mu\text{mol/L}$ CAP significantly attenuated these effects induced by ischemia reperfusion injury, levels of LVDP and infarct size at the end of reperfusion were significantly improved

* 陕西省教育厅科研基金(No. 15JK1639)、陕西省科技厅科研基金(No. 2014JM2-8164)和西安医学院博士科研启动基金项目(No. 2015DOC02)资助

△ 通信作者, E-mail: suna1935@139.com

($P < 0.01$), nevertheless levels of LVEDP and MDA at the end of reperfusion and LDH were down-regulated markedly ($P < 0.01$), the content of caspase-3 and cytochrome c were also decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** These results demonstrate that CAP can suppresses cell apoptosis and necrosis, and alleviate heart function and cell survival from ischemia reperfusion injury through attenuating mitochondrial oxidative stress.

【Key words】 Capsaicin Mitochondria oxidative stress Heart ischemia reperfusion injury

心肌缺血再灌注损伤是急性心肌梗死溶栓治疗、冠状动脉成形术、心脏停跳手术过程中不可避免的伴随事件,可导致心肌顿抑、心肌梗死、心律失常,甚至因心衰而死^[1]。缺血再灌注损伤是影响愈后效果的主要因素,如何防治和改善缺血再灌注损伤一直是研究的热点。数十年来,有很多基础研究报道了缺血再灌注损伤的机制,这些研究主要集中在钙超载、氧自由基、炎症反应、内质网应激等方面^[2-4]。尽管基础研究取得了很大进展,但临床转化效率不高、治疗效果不理想、可选择药物较少等问题仍亟待解决。

近年来,离体或在体实验研究均发现,位于心脏初级传入感觉神经纤维上的辣椒素受体(transient receptor potential vanilloid, TRPV1)在心脏缺血再灌注损伤中具有保护作用^[5-6]。TRPV1是一种非选择性的配体门控阳离子通道,主要表达于支配心脏和血管的感觉神经纤维神经元上^[7]。以往的研究主要集中于TRPV1可感受热、疼痛等伤害性刺激,并与炎症、咳嗽等多种病理过程相关^[8-9],目前,TRPV1在心血管系统中的作用受到越来越多的研究者的关注,但其对心肌缺血再灌注损伤具有保护作用的机制尚不清楚。本研究拟采用离体心脏缺血再灌注模型,探讨辣椒素在缺血再灌注心脏中的保护作用及可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与试剂

成年雄性SD大鼠24只,购于西安交通大学医学院实验动物中心,体质量250~300 g。辣椒素(CAP,作用浓度10 $\mu\text{mol/L}$)、辣椒平(CAPZ,作用浓度10 $\mu\text{mol/L}$)和2、3、5-氯化三苯基四氮唑(TTC)购于Sigma公司。乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒均购自南京建成公司。caspase-3、细胞色素c和GAPDH一抗均购自CST公司。Krebs-Henseleit(KH)灌流液的成分及含量(mmol/L):NaCl 120, KCl 4.7, MgSO_4 1.2, CaCl_2 1.25, KH_2PO_4 1.2, Glucose 11, NaHCO_3 25。灌流

前50 min用体积分数为950 mL/L O_2 和50 mL/L CO_2 混合气体持续向KH液中通气至实验结束,实验过程中KH液温度始终保持在37 $^\circ\text{C}$, pH维持在7.35~7.45。

1.2 制备离体心脏灌流模型和实验分组

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(30 g/L, 40 mg/kg)和肝素(500 U/kg),麻醉后立刻开胸取心脏置于预冷的KH液中。将主动脉根部固定于Langendorff灌流管口, KH液由主动脉口逆行灌注,实验过程中灌注压始终维持在80 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)。于左心耳处剪一小口,用乳胶球囊刺破二尖瓣并将其插入左心室。调节球囊内的液体量使各组平衡期左室舒张末压(LVEDP)维持在0~5 mmHg,心脏平衡灌流15 min,待其稳定后标记为灌注开始。24只大鼠随机分成4组($n=6$):对照组、缺血再灌注组(IR组)、CAP干预缺血再灌注组(CAP+IR组)和CAPZ预处理后加干预缺血再灌注组(CAPZ+CAP+IR组)。对照组心脏用正常灌流液持续灌注175 min;IR组心脏稳定10 min,缺血45 min再灌注120 min;CAP+IR组心脏稳定7 min,用含CAP的灌流液灌注3 min,缺血45 min,再灌注开始后用含CAP的灌流液灌注5 min,正常灌流液灌注115 min;CAPZ+CAP+IR组稳定4 min,用含CAPZ的灌流液灌注3 min,然后用含CAP的灌流液灌注3 min,缺血45 min,再灌注开始后用含CAPZ的灌流液灌注5 min,再换为CAP的灌流液灌注5 min,正常灌流液灌注110 min。

1.3 心脏功能的测定

实验全程记录LVEDP和左室收缩峰压(LVPSP)。LVPSP和LVEDP的差值作为左室发展压(LVDP)。以再灌注30 min末的LVDP和LVEDP评价心脏功能。

1.4 心肌梗死面积测定

实验结束后,立即取心脏于-20 $^\circ\text{C}$ 冻存1 h;沿纵轴将心脏切成厚度为1 mm的均匀切片,共6片,置于10 g/L TTC溶液中,37 $^\circ\text{C}$ 水浴避光染色20 min;体积分数为4%多聚甲醛固定过夜;第二天用数码相机拍照,使用Image J Pro软件双盲法测

量心肌梗死面积。红色区为正常心肌,白色区为梗死心肌,梗死面积比例为白色区面积占总面积(红色区面积+白色区面积)的比例。

1.5 LDH 检测

收集各组再灌注开始后前 5 min 冠脉流出液,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,LDH 的相对活性以各组吸光值/对照组吸光值的比例表示。

1.6 HE 染色

灌注结束以后,每组取相同部位左室心肌组织,体积分数为 4%多聚甲醛固定 48 h,常规石蜡包埋、切片,HE 染色观察心肌纤维的排列和心肌细胞膜结构。

1.7 线粒体 MDA 和 SOD 的检测

灌注结束以后,分别提取各组心肌线粒体,方法如下:快速称取 50 mg 心肌组织,放入盛有 500 μ L PBS 的 1.5 mL 离心管中,置于冰上并剪碎,600 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 20 s,弃上清,加入 400 μ L 含苯甲基磺酰氟(PMSF)的线粒体分离试剂,冰上匀浆,1 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,上清转移至另一离心管中,11 000 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,所得沉淀即为线粒体。按照线粒体 MDA 和 SOD 检测试剂盒说明书操作,检测 MDA 质量摩尔浓度和 SOD 活性。

1.8 Western blot 法检测 caspase-3 和细胞色素 c 蛋白的表达

再灌注 10 min 时,取各组大鼠左室相同部位心肌组织,称质量,提蛋白,并用 BCA 法进行蛋白定量,蛋白样品在沸水中煮 7 min;配置 120 g/L SDS-PAGE 分离胶,每孔 35 μ g 细胞蛋白样品上样,置于电泳缓冲液中电泳,恒压 90 V 转膜 60 min,将蛋白

转至 PVDF 膜。将目的条带切下,用 TBST 配制的 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h,封闭后用 caspase-3 和细胞色素 c 以及 GAPDH 一抗(稀释度均为 1:1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;第二天, TBST 洗膜,用 HRP 标记的羊抗兔和鼠二抗(稀释度为 1:5 000)室温孵育 2 h, TBST 洗膜, ECL 显色,曝光后扫描,用 Image J 图像分析软件进行光密度分析。以 GAPDH 作为内参。以目的蛋白与内参蛋白光密度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.9 统计学方法

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏功能的变化

结果见表 1。平衡稳定期,各组大鼠心脏 LVEDP 和 LVDP 差异无统计学意义;对照组大鼠心脏正常 KH 液持续灌注至实验结束,心功能基本保持不变;IR 组大鼠心脏再灌注 30 min 末,与对照组相比, LVEDP 升高, LVDP 降低 ($P < 0.01$);与 IR 组比较, CAP+IR 组大鼠心脏再灌注 30 min 后 LVEDP 降低, LVDP 得到改善 ($P < 0.01$),但与对照组比较差异仍有统计学意义 ($P < 0.05$);而 CAPZ 可阻断 CAP 对心脏功能的改善作用。

2.2 各组大鼠心肌梗死面积和冠脉流出液中 LDH 的变化

TTC 染色结果(图 1,表 2)可见,对照组大鼠心脏灌注末,未出现心肌梗死;IR 组大鼠心肌梗死面

表 1 再灌注 30 min 末各组大鼠 LVDP 和 LVEDP 水平/mmHg

Table 1 The level of LVDP and LVEDP at 30 min of reperfusion/mmHg

Index	Control group (n=6)	IR group (n=6)	CAP+IR group (n=6)	CAP+CAPZ+IR group (n=6)
LVDP	98.31 \pm 3.57	9.64 \pm 2.25*	35.28 \pm 8.64*·#	10.32 \pm 3.12*· Δ
LVEDP	3.50 \pm 0.17	70.83 \pm 4.35*	25.67 \pm 3.76*·#	67.17 \pm 3.52*· Δ

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. IR group; $\Delta P < 0.05$, vs. CAP+IR group

积增加 ($P < 0.01$);与 IR 组比较, CAP+IR 组大鼠心肌梗死面积减少 ($P < 0.01$);CAPZ 可阻断 CAP 减小心肌梗死面积的作用。LDH 检测结果(表 2)显示,与对照组相比, IR 组大鼠冠脉流出液中 LDH 含量升高 ($P < 0.01$);与 IR 组相比, CAP+IR 组大鼠冠脉流出液中 LDH 含量降低 ($P < 0.01$),但与对照组比较差异仍有统计学意义 ($P < 0.05$);CAPZ 同样可阻断 CAP 减少 LDH 释放的作用。

2.3 各组大鼠心肌纤维结构的变化

HE 染色结果(图 2)可见,对照组心肌纤维排列整齐,细胞膜结构完整,界限清晰;IR 组心肌纤维断裂明显,心肌细胞排列紊乱,细胞膜破损;CAP 可明显改善 IR 心肌纤维的断裂并减少细胞膜的破损;而 CAPZ+CAP+IR 组心肌纤维断裂及细胞膜破损明显。

2.4 各组大鼠心脏线粒体氧化应激程度的变化

结果见表 3。与对照组相比, IR 组线粒体中 MDA 增加, SOD 活性降低 ($P < 0.01$);CAP 可减少

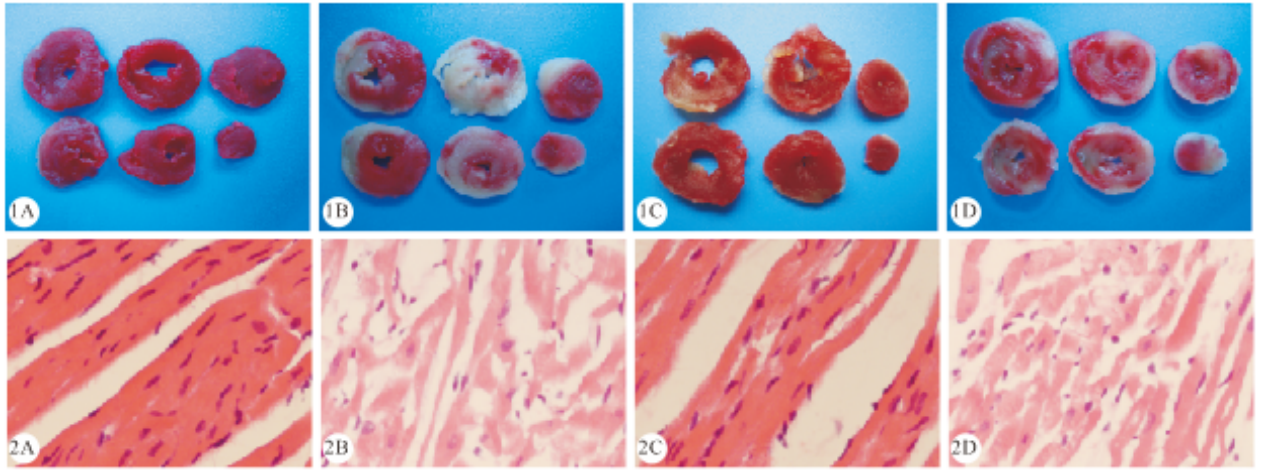


图 1 TTC 染色图 图 2 各组大鼠心肌 HE 染色。×200

Fig 1 TTC staining of heart slices Fig 2 Myocardial HE staining for each group. ×200

A: Control group; B: IR group; C: CAP+IR group; D: CAPZ+CAP+IR group

表 2 各组心肌梗死面积比例和 LDH 的释放

Table 2 The percentage of infarct size and LDH release in each group

Index	Control group (n=6)	IR group (n=6)	CAP+IR group (n=6)	CAP+CAPZ+IR group (n=6)
Infarct size/%	0.30±0.06	47.50±5.20*	11.60±3.70*·#	45.10±4.50*·△
LDH/(mU/mL)	0.40±0.05	12.25±2.28*	1.23±0.42*·#	11.37±1.73*·△

* P<0.05, vs. control group; # P<0.05, vs. IR group; △P<0.05, vs. CAP+IR group

表 3 各组大鼠心肌 MDA 质量摩尔浓度和 SOD 活性的变化

Table 3 Mitochondrial MDA content and SOD activity in each group

Index	Control group (n=6)	IR group (n=6)	CAP+IR group (n=6)	CAP+CAPZ+IR group (n=6)
MDA/(nmol/mg)	0.85±0.17	2.20±0.31*	1.28±0.15*·#	2.07±0.23*·△
SOD/(U/mg)	30.50±3.13	12.30±2.87*	23.60±4.06*·#	13.50±2.52*·△

* P<0.05, vs. control group; # P<0.05, vs. IR group; △P<0.05, vs. CAP+IR group

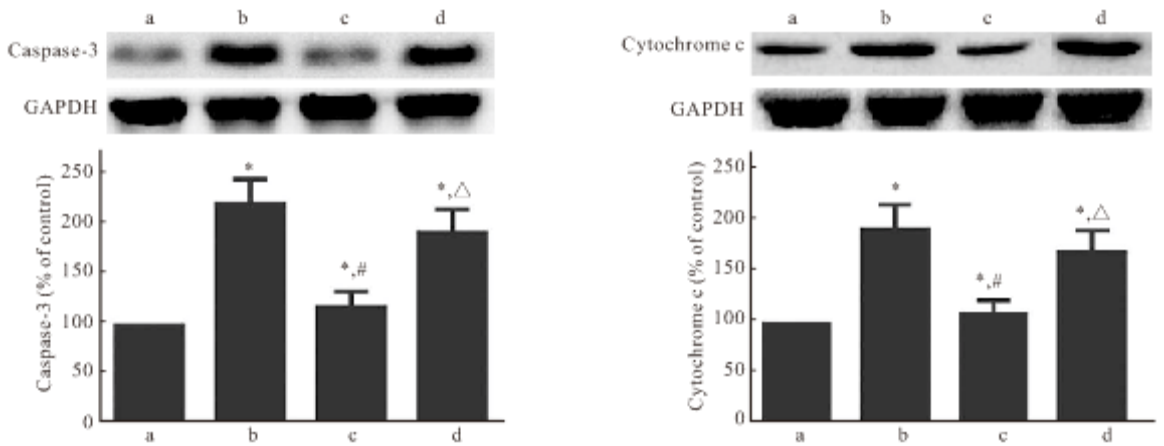


图 3 各组大鼠心肌组织中 caspase-3 和细胞色素 c 蛋白的表达

Fig 3 The expression of caspase-3 and cytochrome c in each group

a: Control group; b: IR group; c: CAP+IR group; d: CAPZ+CAP+IR group. * P<0.05, vs. control group; # P<0.05, vs. IR group; △P<0.05, vs. CAP+IR group

IR 处理引起的线粒体 MDA 增多 ($P<0.05$), 并增加线粒体 SOD 活性 ($P<0.05$), 但与对照组比较差异仍有统计学意义 ($P<0.05$); CAPZ 可阻断 CAP

降低氧化应激的作用。

2.5 各组大鼠心肌中 caspase-3 和细胞色素 c 表达的变化

结果见图 3。与对照组相比,IR 组大鼠心肌组织中的 caspase-3 和细胞色素 c 蛋白表达升高($P < 0.01$);与 IR 组相比,CAP + IR 组大鼠心肌 caspase-3 和细胞色素 c 蛋白表达减少($P < 0.01$),但与对照组比较差异仍有统计学意义($P < 0.05$);CAPZ 可阻断 CAP 对 caspase-3 和细胞色素 c 蛋白表达的抑制作用。

3 讨论

心肌细胞缺血一定时间后会产生不同程度的损伤,及时恢复缺血心肌的血液供应可得到改善,然而,恢复血液供应后,缺血心肌的损伤不但没有减轻,反而进一步加重,最终形成不可逆损伤,即心肌缺血再灌注损伤^[4]。缺血再灌注损伤已经成为临床上限制急性心肌梗死溶栓疗法、冠脉血管成形术等治疗手段术后效果的重要因素。目前,对心脏的神经生物学调节与缺血再灌注损伤的关系研究较少。

CAP 是辣椒中所含的主要成分,其可特异性激活 TRPV1 受体,具有预防心血管疾病、治疗支气管炎、止痛、抗癌等多种药理学作用。TRPV1 受体广泛分布于哺乳动物的感觉神经纤维,尤其是无髓鞘的 C 类和部分少髓鞘的 A δ 类纤维^[10],在心血管系统,TRPV1 受体主要分布在初级感觉神经纤维和心肌细胞中^[11-12],有研究证明,使用 CAP 激活 TRPV1 受体可对缺血再灌注损伤起到保护作用^[6],而药理方法阻断或者基因敲除 TRPV1 受体会加重缺血再灌注损伤^[5]。TRPV1 受体在心血管疾病中的作用逐渐得到关注,然而,其具体机制仍不清楚。

本实验采用大鼠离体心脏灌注流方法,建立缺血再灌注损伤模型,结果发现,给予 CAP 干预的 IR 组大鼠心脏,再灌注末心脏功能得到明显改善,心肌梗死面积显著减小,细胞凋亡相关蛋白表达量显著减少;而用 CAPZ 阻断 TRPV1 受体后,可抑制 CAP 的保护作用,说明 CAP 可通过激活 TRPV1 受体起保护作用,本实验结果支持了以往的研究结论。同时,本研究还发现,CAP 干预 IR 组大鼠心脏线粒体氧化应激程度比 IR 组明显降低,同样,CAPZ 可消除 CAP 的这一作用。这些结果提示,CAP 对心脏缺血再灌注损伤的保护作用可能是通过降低线粒体内的氧化应激水平,改善线粒体功能,减少细胞凋亡实现的。

总之,本研究证实 CAP 可以明显降低缺血再灌

注引起的线粒体氧化应激损伤,减少细胞凋亡,改善心脏功能,减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤,是一种潜在的治疗缺血再灌注心肌损伤的保护药物。然而,如何有效的将作用机制已知的 CAP 转化成为临床治疗药物,需要更进一步的研究,这也将为临床治疗和防治心肌缺血再灌注损伤提供新的策略。

参 考 文 献

- [1] 孔令恒,刘哲,张建英,等. 心肌缺血-再灌注-钙超载损伤的基础与临床研究. 中国体外循环杂志, 2015, 13(4): 253-256.
- [2] ZHANG JY, TONG W, WU F, *et al.* Different roles for contracture and calpain in calcium paradox-induced heart injury. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52270 [2016-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23284963/>. doi: 10.1371/journal.pone.0052270.
- [3] LING H, GRAY CB, ZAMBON AC, *et al.* CaMKII δ mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through NF- κ B. *Circ Res*, 2013, 112(6): 935-944.
- [4] PRASAD A, STONE GW, HOLMES DR, *et al.* Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the "dark side" of reperfusion. *Circulation*, 2009, 120(21): 2105-2112.
- [5] WANG LH, WANG DH. TRPV1 gene knockout impairs postischemic recovery in isolated perfused heart in mice. *Circulation*, 2005, 112(23): 3617-3623.
- [6] PEI ZH, ZHUANG ZQ, SANG HF, *et al.* α , β -unsaturated aldehyde crotonaldehyde triggers cardiomyocyte contractile dysfunction: role of TRPV1 and mitochondrial function. *Pharmacol Res*, 2014, 82: 40-50 [2016-08-18]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661814000395>. doi: 10.1016/j.phrs.2014.03.010.
- [7] BOLLI R, ABDEL-LATIF A. No pain, no gain: the useful function of angina. *Circulation*, 2005, 112(23): 3541-3543.
- [8] CATERINA MJ, JULIUS D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci*, 2001, 24: 487-517.
- [9] BROOKS SM. Perspective on the human cough reflex. *Cough*, 2011, 7: 10. doi: 10.1186/1745-9974-8-10.
- [10] ALAWI K, KEEBLE J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. *Pharmacol Ther*, 2010, 125(2): 181-195.
- [11] RANDHAWA PK, JAQQI AS. TRPV1 channels in cardiovascular system: a double edged sword? *Int J Cardiol*, 2016, 228: 103-113 [2016-08-18]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167-5273\(16\)33636-1](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167-5273(16)33636-1). doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.205.
- [12] WU Z, HE EY, SCOTT GI, *et al.* α , β -Unsaturated aldehyde pollutant acrolein suppresses cardiomyocyte contractile function: role of TRPV1 and oxidative stress. *Environ Toxicol*, 2015, 30(6): 638-647.

(2016-12-23 收稿, 2017-03-21 修回)

编辑 余琳