

左旋卡尼汀对兔心肌缺血再灌注损伤的保护

夏经钢¹, 胡 健², 曾定尹, 曲 杨³

(中国医科大学第一临床学院循环内科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 内科学; 左旋卡尼汀对心肌缺血再灌注损伤的保护作用; Western blot; 心肌缺血再灌注; 左旋卡尼汀; 热休克蛋白 70; 兔

[摘要] 目的 探讨左旋卡尼汀在心肌缺血再灌注损伤状态下对心肌的保护作用。方法 制备兔缺血再灌注模型, 实验分为空白对照组、盐水对照组和左旋卡尼汀组, 左旋卡尼汀组心肌缺血 30 min 后给予左旋卡尼汀。观察各组缺血再灌注过程中心电图的动态改变, 以及再灌注结束后动脉血清游离脂肪酸、超氧化物歧化酶、丙二醛、肌酸激酶的含量和组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性; 用 Western blot 法检测结扎点以下 5 mm 处左心室全层心肌热休克蛋白 70 的含量。结果 盐水对照组和左旋卡尼汀组均造成明显的心电图动态改变, 与盐水对照组比较, 左旋卡尼汀组心电图 ST 段出现有效改善; 左旋卡尼汀组分别与盐水对照组和空白对照组相比, 游离脂肪酸和丙二醛含量均显著减少 ($P < 0.05$); $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性及超氧化物歧化酶的含量显著增多 ($P < 0.05$), 肌酸激酶含量有下降趋势 ($P > 0.05$); 心肌热休克蛋白 70 含量显著增多 ($P < 0.05$)。结论 左旋卡尼汀可能诱导产生热休克蛋白 70, 并对心肌缺血再灌注损伤有保护作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of L-Carnitine on Ischemic-Reperfusion Injury in Vivo Rabbits Cardiomyocyte

XIA Jing-Gang, HU Jian, ZENG Ding-Yin, and QU Yang

(Department of Cardiovascular Medicine, the First Clinical College, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Myocardial Ischemic/Reperfusion; Western Blot; L-Carnitine; Heart Shork Protein 70; Rabbits; Vivo; Coronary Artery

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of L-carnitine against ischemic/reperfusion injury in vivo rabbits cardiomyocyte and its possible mechanism. **Methods** Myocardial ischemic/reperfusion models were built in healthy new Zealand rabbits.

Rabbits were subjected to 30 min myocardial ischemia followed by reperfusion for 3 h. Anesthetized rabbits were randomly divided into 3 groups: blank control group ($n = 5$) in which left anterior descending coronary artery was exposed and a piece of silk thread was placed around the artery but not tied; saline control group ($n = 10$) in which normal saline was injected into sublingual vein after MI 30 min; L-carnitine group ($n = 10$) received intravenous L-carnitine 3.0 g and saline 250 mL after MI 30 min.

ECG throught the experiment, free fatty acid (FFA), superoxide (SOD), malonaldehyde (MDA), creatine kinase (CK), $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ were all observed after reperfusion. The content of Heart shork protein 70 obtained below ischemia/reperfusion region 5 mm through myocardial layment was determined by western blot.

Results Compared with blank control group or saline control group, L-carnitine group showed protection against MI/R injury as evidenced by more effective improvement in ST of ECG, marked increase of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$, SOD; and marked decrease of FFA and MDA. The content of CK has tendency of decline. The content of HSP 70 was dramatically increased ($P < 0.05$).

Conclusions L-carnitine can protect cardiomyocyte from ischemic/reperfusion injury through many aspects by inducing HSP70.

冠状动脉粥样硬化所致心肌缺血病变是一种“代谢疾病”, 再灌注损伤与心肌细胞能量的产生和利用障碍密切相关, 晚近, 缺血心肌代谢的治疗引起了人们的重视。本研究对在体兔心肌缺血再灌注损伤模型予左旋卡尼汀(L-carnitine)干预, 探讨其对心肌细胞的保护作用及其可能机制。

[收稿日期] 2005-05-06

[修回日期] 2005-12-10

[作者简介] 夏经钢, 硕士研究生, 研究方向为高血压发病机制, 联系电话为 13709847494, E-mail 为 xiajinggang790321@yahoo.com.cn。通讯作者胡健, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为高血压发病机制, 联系电话为 13352492579。曲 杨, 硕士研究生, 研究方向为高血压发病机制, 联系电话为 13664149280, E-mail 为 qy834@yahoo.com.cn。

1 材料和方法

1.1 实验材料及仪器

左旋卡尼汀注射液(1 g/支, 5 mL; 批号 0404011, 由常州三维工业技术研究所提供); 热休克蛋白 70 (heart shork protein 70, HSP70) 抗体(购于博世德公司), LMS-2B 二道生理记录仪(中国医科大学机能实验室提供, 购于成都仪器厂); 游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)测定试剂盒、ATP 酶测定试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide, SOD)测定试剂盒、丙二醛(malonaldehyde, MDA)测定试剂盒和肌酸激酶(creatine kinase, CK)测定试剂盒均购于南京建成生物工程研

究所。

1.2 动物及分组

健康新西兰大白兔 25 只,雌雄不限,体重 2.5~3.0 kg,由中国医科大学实验动物中心提供,随机分成 3 组。空白对照组($n=5$):丝线穿过冠状动脉左心室支但不结扎;盐水对照组($n=10$):心肌缺血(myocardial ischemia, MI) 30 min 后静脉滴注 3 h 生理盐水至实验结束;左旋卡尼汀组($n=10$):MI 30 min 后,给予左旋卡尼汀 3.0 g 加入生理盐水 250 mL 静脉滴注 3 h 至实验结束。

1.3 心肌缺血再灌注模型的制备

选择健康新西兰大白兔,20% 乌拉坦按 5 mL/kg 耳缘静脉麻醉,开胸,暴露心肌,于冠状动脉左心室支中 1/2 处穿线结扎,造成急性心肌缺血,30 min 后剪开穿线使冠状动脉再通形成再灌注。入选标准:结扎后 ①导联 ST 段出现弓背向上抬高,T 波高耸等表现为缺血成功。剪线后,抬高的 ST 段出现下降 1/2 以上为再灌注成功。

1.4 心电图动态变化记录

全程记录心电图变化,心电图显效标准为缺血导致抬高的 ST 段在再灌注 3 h 内恢复正常。

1.5 热休克蛋白 70 和 ATP 酶含量的测定

实验结束后即刻取结扎点以下 5 mm 左心室全层心肌组织 1.0 g,低温状态下用生理盐水冲洗干净,制成心肌匀浆液,离心后取上清液,用 Western blot 方法测定 HSP70 含量,用 Chemi Imager 5500 型电泳凝胶成像分析系统(购于 Alpha Innotech 美国)进行成像,而后用 Fluorchon 2.0 软件对 HSP70 进行半定量分析;按 ATP 酶试剂盒说明书操作测定组织中 ATP 酶含量。

1.6 游离脂肪酸、超氧化物歧化酶、丙二醛和肌酸激酶含量的测定

实验结束后即刻抽取动脉血 3 mL,离心后取上清液按试剂盒说明书操作测定 FFA、SOD、丙二醛和 CK 含量。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析,两两比较用多重比较 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 盐水对照组和左旋卡尼汀组心电图的比较

盐水对照组和左旋卡尼汀组再灌注 3 h,以心电图 ST 段恢复正常为显效,则盐水对照组中有 4 例显

效,左旋卡尼汀组中有 9 例显效。

2.2 各组热休克蛋白 70 含量的比较

从图 1 可见,左旋卡尼汀组较盐水对照组 HSP70 含量显著增多。空白对照组、盐水对照组和左旋卡尼汀组左心室 HSP70 含量半定量密度值分别为 0.585、1.199 和 23.039($P < 0.01$)。

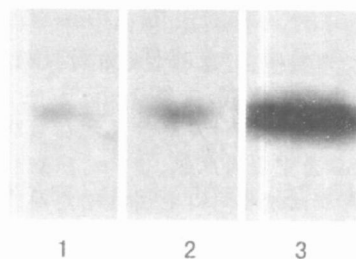


图 1. Western blot 法检测各组热休克蛋白 70 的含量 1 为空白对照组,2 为盐水对照组,3 为左旋卡尼汀组。

2.3 各组生物化学指标的比较

左旋卡尼汀组分别与盐水对照组和空白对照组相比,FFA 和丙二醛含量均显著减少($P < 0.05$); $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶}$ 、 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP 酶}$ 活性及 SOD 含量显著增多($P < 0.05$),CK 含量有下降趋势($P > 0.05$)。

表 1. 各组生物化学指标的比较($\bar{x} \pm s$)

指 标	空白对照组	盐水对照组	左旋卡尼汀组
游离脂肪酸($\mu\text{mol/L}$)	268 \pm 18	0.357 \pm 0.048	0.387 \pm 0.032
$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP 酶}$ (mmol/g)	475 \pm 17	0.311 \pm 0.064	0.332 \pm 0.041
$\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP 酶}$ (mmol/g)	126 \pm 21 ^a	0.417 \pm 0.035 ^a	0.487 \pm 0.026 ^a
SOD(ku/L)	35.3 \pm 4.0	7.19 \pm 0.63	60.4 \pm 8.2
丙二醛($\mu\text{mol/L}$)	32.3 \pm 3.7	7.09 \pm 0.79	73.4 \pm 8.3
肌酸激酶(ku/L)	41.4 \pm 4.7 ^a	6.67 \pm 0.75 ^a	70.4 \pm 8.1

a 为 $P < 0.05$,与空白对照组或盐水对照组比较。

3 讨论

缺血性心脏病是严重威胁人类健康的疾病,心肌缺血再灌注损伤不仅是缺血性心脏病最为常见的并发症,也是经皮冠状动脉腔内成形术和溶栓后的常见问题。目前认为引起再灌注损伤的重要因素,与 Ca^{2+} 超载^[1]、氧自由基和中性粒细胞^[2]浸润、心肌细胞能量产生及利用障碍紧密相关。故冠状动脉粥样硬化所致心肌缺血病变也可认为是一种“代谢性疾病”,近年来对缺血心肌的代谢治疗已引起人们的

广泛重视,纠正心肌细胞的脂肪酸代谢障碍有益于恢复心肌缺血的能量代谢失衡^[3]。

以往国内相关实验以离体鼠研究较多,本实验采取模拟临床现场的方式制作在体兔缺血再灌注/损伤模型,研究发现应用左旋卡尼汀能使心肌缺血较快得到恢复再灌(ST 段回降较快),FFA 明显下降, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性明显升高,表明左旋卡尼汀能更有效地利用游离脂肪酸进行 β -氧化,优化能量代谢; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性升高可纠正细胞内酸中毒, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性升高可纠正 Ca^{2+} 超载,从而稳定心肌细胞膜电位,保护心肌细胞。SOD 是机体清除氧自由基的重要酶系统,对机体的氧化与过氧化平衡起着至关重要的作用,此酶通过清除氧自由基后保护心肌细胞免受损伤;丙二醛是目前公认的判别脂质过氧化的参数指标,是脂质过氧化产物之一,SOD 的含量显著升高,丙二醛的含量显著降低,表明左旋卡尼汀可能具有抗脂质过氧化作用。CK 是反应急性心肌梗死的较好指标,其催化三磷酸腺苷和肌酸,生成磷酸肌酸,对心肌细胞能量代谢起到直接催化作用,本研究发现动脉血 CK 水平也有下降趋势,表明左旋卡尼汀能够保护心肌细胞免受损伤,促进细胞能量代谢。

热休克蛋白是一组具有重要生理功能高度保守的蛋白质分子家族,左旋卡尼汀诱导产生了大量的热休克蛋白 70。文献[4]报道,HSP70 可通过修复离子通道,恢复氧化还原的平衡,抑制炎症前细胞质的变动,阻止细胞凋亡通路的激活来实现细胞保护作用,大量的热休克蛋白 70 促进缺血导致的受损细胞结构蛋白的修复,以维持细胞结构的稳定性;通过结合到因缺血而产生的变性或不正常的蛋白质分子上,从而减轻对这些蛋白的破坏,实现对心肌细胞的保护;参与新合成蛋白质多肽的折叠以稳定损伤后心肌的新陈代谢,尽可能保持能量代谢的平衡;保护线粒体免于被氧自由基和细胞因子如肿瘤坏死因子的损伤;热休克蛋白具有很好的膜稳定性,通过稳定

线粒体膜实现对线粒体的保护作用,从而保障了细胞能量代谢以及细胞呼吸链的稳定进行以及减少自由基的产生。这些无疑对左旋卡尼汀的优化能量代谢作用产生辅助放大效应,使其发挥更大的生物学作用,会更全方位的保护心肌。

实验结果发现,与盐水对照组相比,左旋卡尼汀诱导热休克蛋白 70 含量显著增多;同时 SOD 含量显著增多,丙二醛含量显著降低, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶含量显著增多,CK 水平也有下降趋势,由此推测左旋卡尼汀组抗脂质过氧化指标的改变可能是通过诱导大量的热休克蛋白 70 而发挥的,从而保护心肌细胞免受缺血再灌注损伤。

大规模临床试验提示左旋卡尼汀明显改善心肌梗死后患者的心功能,减少心绞痛发作及心律失常的发生率,降低死亡率,减少梗死面积^[5,6]。早期,长期大剂量给予左旋卡尼汀可降低心力衰竭的发生率和死亡率。朱光旭等^[7]就左旋卡尼汀对心肌细胞保护作用的机制进行研究,认为左旋卡尼汀的心肌保护作用是通过减少 DNA 断片率、NRF1 和减少 mt-TFA mRNA 表达下调来实现的。可见左旋卡尼汀可通过多种途径实现对缺血再灌注心肌细胞的保护作用,临床应用前景十分广阔。

[参考文献]

- [1] 刘秀华. 钠钙交换体与心肌缺血再灌注[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (2): 233-235
- [2] 范林, 吴黎明. 基质金属蛋白酶与心肌缺血再灌注[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (3): 357-359
- [3] Charles Hoppel MD. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism[J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41 (4): suppl 4-12
- [4] Delogu G, Signore M, Mechelli A. Heat shock proteins and their role in heart injury[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2002, 8 (5): 411-416
- [5] Kumaran S, Subathra M, Balu M, Panneerselvam C. Age-associated decreased activities of mitochondrial electron transport chain complexes in heart and skeletal muscle: role of L-Carnitine[J]. *Chem Bio Interact*, 2004, 148 (1-2): 11-18
- [6] Mengi SA, Dhalla MS. Carnitine palmitoyltransferase I, a new target for the treatment of heart failure perspectives on a shift in myocardial metabolism as a therapeutic intervention[J]. *Am J Cardiovas Drugs*, 2004, 4 (4): 201-209
- [7] 朱光旭, 余争平, 谢燕. L-carnitine 拮抗培养心肌细胞缺氧/复氧损伤[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23 (12): 1 410-413
(此文编辑 朱雯霞)