DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.017

论著

文章编号:1000-5404(2003)04-0316-03

附加N-乙酰半胱氨酸心麻痹液对低温缺血再灌注大鼠心脏高能磷酸化合物代谢的保护作用

肖颖彬[1],杨素娟[2],任建平[2],程增江[2],杜泽涵[2],韩本立[3],汤仲明[2] ([1]第三军医大学附属新桥医院心血管外科,重庆 400037;[2]军事医学科学院,北京 100850;[3]第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 应用^{31}P-核磁共振(^{31}P-NMR)技术探讨附加N-乙酰半胱氨酸(NAC)心麻痹液对离体低温缺血再灌注鼠心高能磷酸化合物代谢的保护作用。方法 建立^{31}P-NMR条件下的Langendorff离体心脏逆灌模型,动态测定离体大鼠心脏低温缺血90 min再灌注30 min过程中的心肌高能磷酸化合物代谢状况,评价附加NAC心麻痹液的作用。结果 附加NAC心麻痹液灌注明显改善再灌注中心肌PCr、ATP和Pi的恢复,显著优于St Thomas液灌注者。结论 附加NAC可显著改善低温缺血再灌注心脏高能磷酸化合物代谢的保护作用。

关键词:心肌保护;N-乙酰半胱氨酸;^{31}P-核磁共振;能量代谢
中图法分类号:R654.2 文献标识码:A

^{31}P-NMR study of metabolic protective effects of cardioplegia enhanced with N-acetyl-L-cysteine on isolated hypothermic ischemia-reperfused rat hearts

XIAO Ying-bin, YANG Su-juan, REN Jian-ping, CHENG Zeng-jiang, DU Ze-han, HAN Ben-li, TANG Zhong-ming (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To evaluate the protective effects of cardioplegia enhanced with N-acetyl-L-cysteine (NAC) on high-energy phosphate metabolism of hypothermic ischemia-reperfused rat hearts on an isolated NMR-supported Langendorff model. Method The changes of myocardial high energy phosphates (PCr, ATP) and intramyocardial Pi and PH were measured dynamically with ^{31}P-NMR during 90 min ischemia and subsequent reperfusion for 30 min. The effects of cardioplegia enhanced with NAC were compared with that of St. Thomas solution. Results The recovery rates of myocardial PCr and ATP during reperfusion after 90 min arrest perfused with NAC enriched cardioplegia were much superior to that of St. Thomas solution. Conclusion Our results suggest that cardioplegia enhanced with NAC can significantly improve the high-energy phosphate metabolism of hypothermic ischemia-reperfused hearts.

Key words: myocardial protection; N-acetyl-L-cysteine; ^{31}P-NMR; energy metabolism

我们以往的研究表明[1],附加N-乙酰半胱氨酸(NAC)心麻痹液可显著增强St. Thomas液的心肌保护作用。本研究利用^{31}P-核磁共振(NMR)技术,进一步探讨附加N-乙酰半胱氨酸心麻痹液对低温缺血再灌注大鼠心脏高能磷酸化合物代谢的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验过程及分组

Wistar大鼠12只,体重200~240 g,雌雄不拘。依Kopp等[2]方法建立核磁共振条件下的Langendorff离体心脏逆灌装置,采用无磷K-H液[配方(mmol/L):氯化钠121.0,氯化钾5.9,氯化钙2.4,硫酸镁1.2,碳酸氢钠25.0,葡萄糖11.1,EDTA0.5]灌注,逆灌压力11 kPa。将逆灌心脏放入直径为25 mm的NMR磷探头内,37℃下平衡灌流20 min,用4℃ St Thomas液[(配方mmol/L):氯化钠110.0,氯化钾16.0,氯化钙1.2,氯化镁16.0,碳酸氢钠10.0]或附加NAC液(用前按2mmol/L加入NAC)灌注,使心脏在20℃条件下停搏90 min。之后,用无磷K-H液37℃下逆灌30 min。液对照组(CON组)和附加NAC液组(NAC组),每组6只心脏。

1.2 NMR条件和检测

日本JEO-400型低温超导核磁质谱仪,场强9.4Tesla,^{31}P-核磁共振频率161.70 MHz,取样时间0.205 s,脉冲间隔0.495 s,闪角45°。分别在停搏前、停搏中和再灌注中动态记录心脏含磷化合物NMR波谱,包括无机磷(Pi)、磷酸肌酸(PCr)和ATP的三个波峰(α、β、γ),以β波代表ATP。以波谱中峰高反映各化合物的相对含量。波谱中以磷酸肌酸波峰为零位移,无机磷和磷酸肌酸的相对位移为α,按下列公式计算心肌细胞内pH值(pHi):

作者简介:肖颖彬(1964-),男,河南省洛阳市人,博士,主任医师,教授,主要从事心血管外科临床和相关基础方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68755607

收稿日期:2002-05-09;修回日期:2002-10-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

pHi = 6.789+lg[(α-3.501)/(5.699-α)]。

1.3 观察指标

心肌 PCr、ATP 相对含量以各自缺血前值的百分比表示; Pi 缺血前多数为零, 以其与缺血前的 PCr 值(iPCr)的百分比(Pi/iPCr)表示; pHi 为 pH 单位。

1.4 统计学分析

计量数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用双因素方差分析比较组间差异。

2 结果

2.1 两组心肌 PCr 和 ATP 相对含量的动态变化

从表 1 中可以看出, 心肌 PCr 在缺血后迅速下降, 至缺血 60 min 时接近耗竭, 两组缺血期间心肌 PCr 变化无显著性差异($P>0.05$)。再灌注后两组有不同程度恢复, 附加 NAC 组的恢复明显优于对照组($P<0.01$)。NAC 组中有两例在再灌注后 PCr 峰高超过缺血前值。心肌 ATP 的变化与心肌 PCr 趋势相仿, 缺血后两组渐趋下降, 至 90 min 时, 两组心肌 ATP 约为缺血前的 35%~40%, 两组差异不显著($P>0.05$)。再灌注后, 附加 NAC 的恢复明显优于对照组($P<0.01$)。

表 1　心肌 PCr 和 ATP 相对含量的动态变化　(%, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The dynamic changes of relative contents of myocardial PCr and ATP　(%, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Time	PCr Content		ATP Content	
(min)	CON	NAC	CON	NAC
Pre-ischemia	100±0	100±0	100±0	100±0
Ischemia				
5	67.01±12.21	65.54±13.02	71.05±8.62	72.92±8.12
10	43.48±7.95	41.97±12.24	67.82±12.09	77.82±19.28
15	33.99±8.89	27.61±5.87	68.57±10.22	73.99±14.69
20	22.63±4.32	22.23±5.91	62.49±7.59	73.63±14.08
25	17.57±4.09	17.88±4.32	65.79±8.65	76.38±20.22
30	15.89±3.55	16.04±4.28	63.72±9.47	68.25±14.11
40	14.33±4.49	11.86±2.92	60.99±8.51	67.31±17.08
50	9.61±5.76	8.76±5.40	55.18±7.86	63.04±16.30
60	7.77±4.29	7.21±3.98	52.35±11.31	56.65±14.82
70	8.27±4.78	5.54±4.25	44.33±7.64	48.84±12.04
80	2.43±3.90	4.75±5.46	43.63±9.92	40.71±7.86
90	4.60±5.26	1.09±2.66	38.98±13.21	39.91±12.14
Reperfusion				
5	41.77±22.78	90.38±36.91*	42.82±13.89	62.64±19.41*
10	41.47±19.78	85.65±18.29*	37.99±14.10	65.04±18.83*
15	42.41±19.27	80.79±27.17*	36.05±13.39	65.06±27.44*
20	43.70±16.66	80.68±28.37*	33.17±12.51	59.61±15.66*
25	45.44±17.87	82.50±32.10*	36.61±13.90	60.40±20.92*
30	42.67±25.07	81.79±24.61*	36.70±17.72	53.83±11.33*

*: $P<0.01$ *vs* CON

2.2 两组心肌细胞内无机磷(Pi/iPCr)和心肌细胞内 pH(pHi)的动态变化

见表 2, 缺血期两组的心肌细胞内无机磷渐趋升高, 组间比较无显著差异($P>0.05$)。再灌注后, 两组心肌细胞内无机磷迅速下降, 附加 NAC 组的下降率明显快于对照组($P<0.01$), 但仍高于缺血前值($P<0.01$)。

缺血后心肌细胞内 pH 起初有一较小的上升, 继而渐趋下降, 组间比较无显著差异($P>0.05$)。再灌注后, 两组心肌细胞内 pH 迅速恢复到缺血前水平, 附加 NAC 组的恢复似略好于对照组, 但无统计学差异($P>0.05$)。

表 2　心肌细胞内无机磷含量(Pi/iPCr, %, $\bar{x}\pm s$)和 pH 的动态变化($n=6$)

Tab 2　The dynamic changes of intramyocardial Pi (Pi/iPCr, %, $\bar{x}\pm s$) and pHi ($n=6$)

Time	Pi/iPCr		pHi	
(min)	CON	NAC	CON	NAC
Pre-ischemia	3.36±8.45	2.80±4.89	7.056±0.178	7.100±0.107
Ischemia				
5	27.05±8.39	26.06±4.15	7.209±0.101	7.146±0.105
10	41.36±11.72	43.48±7.23	6.979±0.309	7.087±0.032
15	48.12±11.49	49.73±7.74	7.031±0.047	7.018±0.060
20	51.39±11.88	50.86±7.54	6.951±0.046	6.922±0.044
25	49.99±11.32	53.64±7.78	6.821±0.047	6.822±0.087
30	50.52±13.65	53.07±9.04	6.754±0.045	6.746±0.066
40	52.16±15.08	52.63±9.05	6.637±0.039	6.628±0.091
50	50.95±13.86	51.39±8.58	6.335±0.110	6.390±0.207
70	53.73±15.64	51.76±10.51	6.297±0.189	6.230±0.219
80	47.67±28.04	55.25±8.38	6.116±0.371	6.101±0.352
90	63.42±17.07	60.31±9.03	5.954±0.368	5.995±0.388
Reperfusion				
5	29.11±3.51	16.72±9.60*	6.961±0.104	7.166±0.104
10	28.74±3.29	22.84±8.35*	7.014±0.072	7.006±0.269
15	27.05±2.88	22.23±7.15*	7.019±0.077	7.082±0.192
20	27.07±5.47	18.25±4.25*	6.951±0.185	7.027±0.222
25	24.10±5.19	19.26±3.05*	6.964±0.072	7.043±0.087
30	22.48±5.83	19.62±5.25*	7.031±0.175	7.050±0.147

*: $P<0.01$ *vs* CON

3 讨论

我们以往研究表明, 附加巯基供体可显著增强 St Thomas 液的心肌保护作用, 其机制可能与改善心肌缺血再灌注过程中能量代谢有关[1,3]。^{31}P-NMR 技术可对在体和离体器官和组织高能磷酸化合物的代谢状况进行连续、无损伤的动态测定, 本研究利用^{31}P-NMR 技术, 着重探讨附加 N-乙酰半胱氨酸心麻痹液对低温缺血再灌注大鼠心脏高能磷酸化合物代谢的保护作用。

高能磷酸化合物代谢障碍可导致细胞的能量危机, 在心肌缺血再灌注损伤发生、发展过程中有重要意义[4,5]。心肌缺血时, 心肌细胞内 PCr 和 ATP 降解导致细胞内氢离子积聚, 加之, 无氧酵解增强, 导致细胞内进行性酸中毒, H^+-Na^+ 离子交换增强, 加重心肌细胞的离子分布紊乱。细胞内 PCr 和 ATP 减少, 使需能的酶类功能障碍, 如 Na^+-K^+-ATP 酶、Ca^{2+}-ATP 酶等, 是造成细胞内 Na^+ 和 Ca^{2+} 积聚的重要机制。ATP 分解可生成自由通透线粒体质膜的腺苷, 导致线粒体内高能磷酸代谢底物减少, 使再灌注后 ATP 再合成出现障碍。腺苷进一步分解生成黄嘌呤, 成为再灌注时产生大量自由基的代谢底物。

我们实验结果表明, 低温停搏后, 心肌 PCr 急剧下降, 到 30 min 时已降低至 15%左右。而 ATP 含量的变化则不同于 PCr, 在停搏早期 ATP 含量保持相对稳定, 60 min 后下降速度才开始加快。说明 PCr 是细胞内高

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

能磷酸键的储备形式，在快速耗能时，PCr 迅速转化为 ATP，以保证细胞的能量利用。只有当 PCr 显著下降时，细胞的 ATP 含量才会逐步耗竭。伴随着 PCr 和 ATP 的逐步耗竭，细胞内的 Pi 堆积，细胞内 pH 也渐趋下降，反映了心肌低温灌注停搏过程中，氧化磷酸化功能的停滞。有研究表明[6]，心肌缺血早期，心肌内 H^+ 主要来源于 ATP 的水解，而后无氧酵解酸性产物的堆积导致细胞内酸中毒的进一步加剧。附加 NAC 组与 St. Thomas 液灌注组相比，停搏期间高能磷酸化合物的降解过程并无显著性差异，说明 NAC 对缺血过程中心肌细胞内 PCr 和 ATP 分解利用无直接影响。

在我们的实验中还发现，低温停搏开始时心肌细胞内 pH 有一短时上升，可能原因是 PCr 向 ATP 转化过程中消耗 H^+，低温本身也会导致细胞内碱化。Portman 等[7]在研究中也发现类似的现象。影响心肌细胞内 pH 的因素非常复杂，很难用单一的机制进行解释。在本实验中，心肌细胞内 pH 低温停搏开始的短时上升，还可能与灌注碱性的心麻痹液有关。

再灌注后，心肌氧化磷酸化功能发挥作用，心肌 PCr 和 ATP 含量逐步恢复，但 PCr 较 ATP 快且恢复率要高，细胞内 Pi 得以利用或/和清除，心肌细胞内 pH 基本恢复到停搏前水平。附加 NAC 组的再灌注后心肌 PCr、ATP 含量，以及心肌细胞内 Pi 恢复明显优于对照的 St. Thomas 液灌注组（$P<0.01$），但两组心肌细胞内 pH 的恢复无明显统计学差异（$P>0.05$）。对照组再灌注后心肌 PCr 含量仅恢复到停搏前 40%～45%，而附加 NAC 组再灌注后心肌 PCr 含量恢复率则高达 80%～90%。对照组再灌注后心肌 ATP 含量仅恢复到停搏前 35%～40%，附加 NAC 组再灌注后心肌 ATP 含量恢复率尽管明显优于对照组，但也仅达 60%～65%。结果一方面说明 PCr 和 ATP 在细胞能量代谢中作用不同，ATP 含量更能反映细胞的能荷状况；另一方面也说明，附加 NAC 仅能部分改善心肌再灌注中的氧化磷酸化功能，而不能完全避免缺血再灌注对心肌能量代谢的损害。

附加 NAC 组中有两只心脏在再灌注过程中，心肌 PCr 含量高于停搏前水平，出现所谓超高恢复现象（Overshoot）。Greve 等[8,9]在研究中也有此类发现，推测这一现象可能与再灌注后 ATP 迅速合成，肌酸激酶的前向酶促反应速率高于后向速率，使 ATP 过量转化为 PCr，或与再灌注早期心肌的 ATP 利用或/和 ATP 转入胞浆障碍有关[10]。但迄今，心肌 PCr 含量在再灌注早期出现超恢复现象的确切机制仍不清楚。

参考文献：

[1] 肖颖彬，杨素娟，韩本立，等. 附加 N-乙酰半胱氨酸心停搏液对低温缺血-再灌注大鼠心脏保护作用的研究[J]. 第三军医大学学报，1999，21(4)：45－47.

[2] Kopp S J，Daar A A，Prentice R C，*et al*. ^{31}P-NMR studies of the intact perfused rat heart：a novel analytical approach for determining functional-metabolic correlates，temporal chemical relationships，and intracellular actions of cardiotoxic chemicals nondestructively in an intact organ model[J]. Toxicol Appl Pharmcol，1986，82(2)：200－210.

[3] 肖颖彬，杨素娟，韩本立，等. 附加还原型谷胱甘肽心脏麻痹液对低温缺血-再灌注大鼠心脏保护作用的研究[J]. 中华实验外科杂志，1999，16(Suppl)：129－130.

[4] Zimmerman B J，Granger D N. Mechanisms of reperfusion injury[J]. Am J Med Sci，1994，307(4)：284－292.

[5] Jayakumar J，Smolenski R T，Gray C C，*et al*. Effects of heart stress on metabolism of high-energy phosphate. Comparison of normothermic and hypothermic ischemia[J]. J Cardiovasc Surg，1999，40(4)：481－486.

[6] Askenasy N. Glycolysis protects sarcolemmal membrane integrity during total ischemia in the rat heart[J]. Basic Res Cardiol，2001，96(6)：612－622.

[7] Portman M A，Eyster G E. Myocardial buffering capacity and high-energy phosphate utilization during hypothermia circulatory arrest and recovery in the newborn lamb *in vivo*[J]. J Thorac Cardiovasc Surg，1994，108(5)：946－952.

[8] Greve G，Bakoy O E，Holten T，*et al*. Reversibility of mild to moderate ischemic injury in the isolated rat heart[J]. Am J Pathol，1993，142(4)：1279－1289.

[9] Ichihara K，Abiko Y. Rebound recovery of myocardial creatine phosphate with reperfusion after ischemia[J]. Am Heart J，1984，108(6)：1594－1597.

[10] Murakami Y，Zhang J，Eijgelshoven M H，*et al*. Myocardial creatine kinase kinetics in hearts with postinfarction left ventricular remodeling[J]. Am J Physiol，1999，276(3)：H892－900.

（编辑 薛国文）

（上接315页）

可有类似的影像学征象却无临床表现。但 Breteler 等[5]认为，LA 主要损害皮质下功能，若采用量表主要测查皮质功能，则阴性结果完全可能。因此跟踪观察很必要。我们认为临床表现应强调存在智能障碍，不宜过分强调痴呆，诊断方面应强调临床与影像学相统一。

关键词：皮质下动脉硬化性脑病；痴呆量表；CT
中图法分类号：R743.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 朱晓钢. Biswanger 病的临床与 MRI[J]. 临床神经病学杂志，1999，12(4)：240－241.

[2] Salvi F，Michelucci R，Plasmati R，*et al*. Slowly progressive familial dementia with recurrent stroke and white matter hypodensities on Ctscan[J]. Ita J Neurd Sci，1992，13(2)：135－140.

[3] 扬 柳，邵永堂，倪望云. 皮质下动脉硬化性脑病84例影像学表现与临床[J]. 临床神经病学杂志，1999，12(5)：285－286.

[4] 俞丽华，王根发，周永炜，等. 痴呆诊断的探讨[J]. 临床神经病学杂志，1998，11(3)：160－162.

[5] Breteler M M，van Amerongon N M，Swieten J，*et al*. Congnitive correlates of ventricular enlargement and cerebral white matter lesions on magnetic resonance imaging[J]. Stroke，1994，25(6)：1109－1115.

（编辑 冯崇英）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net