DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.045

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0600-03

左旋精氨酸对未成熟兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用

王学锋,肖颖彬,曾祥君 (第三军医大学附属新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 研究左旋精氨酸(L-ARG)对未成熟心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法 实验采用幼兔离体心脏灌注模型,实验分为:①对照组:以K-H液(Krebs-Henseleit solution)再灌注;②L-ARG组:K-H液加入L-ARG(1 mmol/L);③N-亚硝基左旋精氨酸(L-NNA)组:加入L-ARG(1 mmol/L)和L-NNA(2 mmol/L)。各组均以Thomas2号液为心停搏液,15~20 ℃缺血90 min,再灌注30 min。测定缺血前,再灌注中心功能指标和冠脉流出液中一氧化氮、内皮素含量以及缺血前、再灌注后心肌组织脂质过氧化产物丙二醇含量。结果 ①对照组和L-NNA组再灌注后一氧化氮含量下降($P<0.05$),L-ARG组无下降,②L-ARG组再灌注后心功能恢复优于对照组和L-NNA组($P<0.05$)。③L-ARG组再灌注后心肌组织丙二醛含量和冠脉流出液中内皮素含量低于对照组和L-NNA组($P<0.05$)。结论 未成熟兔心肌缺血再灌注后一氧化氮合成释放减少,再灌注早期补充左旋精氨酸增加一氧化氮生成量。左旋精氨酸对未成熟心肌缺血再灌注损伤具有良好的保护作用。

关键词:左旋精氨酸;未成熟心肌;离体缺血再灌注;一氧化氮
中图法分类号:R542.2;R654.2;R977.4 文献标识码:A

Protective effects of L-arginine on ischemia/reperfusion injury of isolated immature rabbit hearts

WANG Xue-feng, XIAO Ying-bin, ZENG Xiang-jun (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of L-arginine (L-ARG) on isolated beating immature rabbit hearts with ischemia/reperfusion injury. Methods Thirty six rabbits at age of 16—20 d were divided into 3 groups. Control group, infused with Krebs-Henseleit solution (KHS); L-ARG group, receiving the reperfusion of KHS+L-ARG (1 mmol/L); and NG-L-nitro-arginine (L-NNA) group, given the infusion of KHS+L-ARG (1 mmol/L)+L-NNA(2 mmol/L). Animals of each group were subjected to 90 min of global ischemia arrested by 4 ℃ Thomas-Ⅱ cardioplegic solution and followed by 30 min of reperfusion. L-ARG and L-NNA were infused in the first 15 min postischemia. Parameters on cardiac function, nitric oxide (NO) level and endotheliotoxin (ET) content in fluid of coronary were measured before ischemia and during reperfusion. Content of malodialdehyde (MDA) was investigated before ischemia and after reperfusion. Results L-ARG group achieved better recovery of cardiac function than the other 2 groups, sound content of NO, control group, but poorer recovery of MDA and ET contents. These effects were reversed to equal control values by adding L-NNA. Conclusion ①The production of nitric oxide is decreased during immature myocardium after ischemia/reperfusion. ②L-ARG can protect immature myocardium from ischemica / reperfusion injury.

Key words: L-arginine; immature myocardium; nitric oxide; ischemia/reperfusion

随着先天性心脏病手术日趋幼龄化,进一步探讨未成熟心肌缺血再灌注损伤机制,寻求理想的保护方法成为亟待解决的重要课题。一氧化氮(NO)是一种小分子生物活性物质,在体内以左旋精氨酸(L-ARG)为底物合成,近年研究发现,一氧化氮合成与释放减少是缺血再灌注损伤的重要发病因素,促进内源性一氧化氮合成可能是防治缺血再灌注损伤的理想措施,但目前尚无一致认识。本实验观察未成熟兔心脏离体缺血再灌注前后一氧化氮生成量的变化,比较加入左旋精氨酸对再灌注后一氧化氮生成量的影响以及对心肌作用的影响,对左旋精氨酸的保护作用及可能机制进行探讨。

作者简介:王学峰(1967—),男,山西省运城市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事不停跳心脏手术及心肌保护方面的研究。电话:(023)68755437

收稿日期:2001-12-28;修回日期:2002-04-05

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

16~20 d龄大耳白兔36只,体重360~410 g,雌雄不拘,由新桥医院动物房提供。分为对照组:单用37 ℃氧合k-H液再灌注;左旋精氨酸(L-ARG)组:在逆灌开始至再灌15 min内的K-H液中加入左旋精氨酸(1 mmol/L K-H液);N-亚硝基左旋精氨酸(L-NNA)组:K-H液中加入左旋精氨酸(1 mmol/L K-H液)和N-亚硝基左旋精氨酸(2 mmol/L K-H液)。

1.2 药品与仪器

左旋精氨酸,N-亚硝基左旋精氨酸,内皮素检测药盒由中国人民解放军301医院提供。离体心脏灌注装置,LWS-2B型二道生理记录仪(成都仪器厂),YH-2型压力传感器,pH值调测计,电子分析天平(国产1/10 000 g),低温高速离心机等。

1.3 模型建立

建立幼兔离体心脏顺行灌注左心做功模型。灌注装置根

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

据肖家思的设计改装而成。灌流技术参照李靖[1]的方法。

1.4　标本收集处理及指标检测

1.4.1　离体顺灌左心功能指标测定　　心脏顺灌 10 min 以上心脏功能基本稳定, 冠脉液体经冠状动、静脉、冠状静脉窦口至右房、右室, 从肺动脉口排出, 收集肺动脉流出液即为冠脉流量(CF), 收集主动脉插管最高点的排出液即为主动脉搏出量(AO), 两者之和即为心输出量(CO), 用改制的 6 号针头在左室心尖部穿刺, 靠心肌张力自然封闭穿刺口, 5、15、30 min 的左室收缩峰压(LVPSP)和舒张末期压(LVEDP), 经微分器同步记录左室内压正、负相最大变化速率(± dp/dt_{max})。

1.4.2　心肌组织脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量的测定　　根据 Okahama 介绍, 采用改进的硫代巴比妥酸(TBA)法测定。

1.4.3　冠脉流出液 NO 测定　　各组动物分别在缺血前, 再灌注 5、30 min 时留取 2 ml 冠脉流出液使用, 置－70 ℃冰箱保存。按北京邦定公司 NO 检测试剂盒检测。

1.4.4　冠脉流出液内皮素(ET)测定　　按照解放军 301 医院提供内皮素检测药盒说明方法收集缺血前, 再灌注 5、30 min 冠脉流出液进行检测和计算内皮素含量。

1.5　统计学处理

各组心功能指标均计算各时相点与缺血前的百分比, 称之为恢复率, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行方差分析。

2　结果

2.1　各实验组心功能指标的变化, 见表 1

缺血前各组心功能指标无统计学差异。再灌注后对照组和 L-NNA 组各时相点左室舒张末压高于缺血前($P<0.05$), 其余指标均较缺血前降低($P<0.05$), L-ARG 组再灌注 15、30 min 时心功能指标较缺血前无明显差异。L-ARG 组再灌注后各时相点心功能恢复均优于对照组和 L-NNA 组($P<0.05$)。

表 1　各组心功能指标的变化

Tab 1　Changes of the parameters on cardiac function of each group

Parameters	Group	Pre-ischemia(kPa)	Restored percentage after reperfusion(%)		
			5 min	15 min	30 min
LVSP(kPa)	Control	11.02±0.31	60.14±3.21△	71.47±3.04△	73.86±4.45△
	L-ARG	10.94±0.28	86.21±3.40△*	92.64±4.01 *	92.91±3.37 *
	L-NNA	11.26±0.30	65.42±2.18△	69.95±3.25△	71.23±3.68△
LVDP(kPa)	Control	1.01±0.18	173.02±14.1△	161.54±14.36△	179.00±15.26△
	L-ARG	0.98±0.14	98.34±10.30 *	93.78±10.62 *	130.00±10.15 *
	L-NNA	1.07±0.20	187.00±20.17△	221.31±19.51△*	230.00±16.25△*
LVP + dp/dt_{max}	Control	184.41±6.83	47.50±3.32△	51.94±4.66△	67.73±4.73△
	L-ARG	190.05±7.34	76.72±4.98△*	89.34±3.19 *	86.60±5.08 *
	L-NNA	192.92±8.02	44.01±4.11△	48.90±5.01△	63.37±4.50△
LVP − dp/dt_{max}	Control	167.00±5.92	42.20±4.33△	56.94±5.50△	69.02±5.47△
	L-ARG	163.99±4.72	80.47±5.63△*	93.38±5.84 *	92.71±4.46 *
	L-NNA	170.35±4.85	44.76±5.91△	60.32±5.43△	62.50±4.17△
CF	Control	7.04±1.02	39.50±4.00△	66.05±3.25△	68.14±3.55△
	L-ARG	7.49±0.86	83.91±4.53△*	94.46±4.70 *	94.00±3.60 *
	L-NNA	7.42±0.97	38.02±3.94△	57.14±3.17△	62.42±4.10△
CO	Control	19.50±1.00	38.50±3.10△	63.26±3.40△	73.68±2.51△
	L-ARG	19.75±1.25	69.95±2.73△*	94.51±3.02 *	93.47±2.48 *
	L-NNA	19.00±1.50	41.21±2.65△	58.27±3.15△	69.71±2.63△

△: $P<0.05$ *vs* preischemia;　*: $P<0.05$ *vs* control

2.2　冠脉流出液 NO、ET 含量变化, 见表 2

缺血前 3 组冠脉流出液 NO 和 ET 含量无差异, 再灌注后 L-ARG 组早期即恢复至缺血前水平, 对照组和 L-NNA 组 NO 含量低于缺血前, 而 ET 含量高于缺血前($P<0.05$), L-ARG 组各时相点 NO 含量高于而 ET 含量低于其它两组($P<0.05$)。

表 2　各组 NO、ET 变化

Tab 2　NO levels and ET contents in the coronary fluid of each group

Index	Group	Pre-ischemia(nmol/L)	Restored percentage after reperfusion(%)	
			5 min	30 min
NO	Control	42.97±3.22	23.72±2.57△	16.48±2.02△
	L-ARG	42.09±3.41	46.19±2.28 *	43.13±2.93 *
	L-NNA	42.77±3.25	24.61±2.62△	16.37±2.73△
ET	Control	23.58±3.15	31.29±2.60△	37.72±2.83△
	L-ARG	23.84±2.65	20.92±2.28 *	23.12±2.24 *
	L-NNA	23.18±2.38	29.50±2.70△	37.34±3.00△

△: $P<0.05$ *vs* preischemia;　*: $P<0.05$ *vs* control

2.3　心肌组织中脂质过氧化产物 MDA 含量变化, 见表 3

3 组心肌组织 MDA 含量缺血前无差异, 再灌注 30 min 后对照组和 L-NNA 组 MDA 含量较缺血前增加($P<0.05$), L-ARG 组再灌注后低于对照组和 L-NNA 组($P<0.05$)。

表 3　各组 MDA 含量变化(nmol/mg)

Tab 3　Changes of MDA content in the myocardium of each group (nmol/mg)

	Control	L-ARG	L-NNA
Pre-ischemic	0.26±0.03	0.26±0.04	0.27±0.04
Post-reperfusion	0.56±0.04△	0.29±0.04 *	0.61±0.05△

△: $P<0.05$ *vs* preischemia;　*: $P<0.05$ *vs* control

3　讨论

3.1　未成熟心肌缺血再灌时一氧化氮生成量的变化

对于心肌缺血再灌时一氧化氮合成与释放是减少还是增多, 目前仍存在争议。有实验证实早期给予左旋精氨酸可以逆转内皮细胞功能损伤, 但增加左旋精氨酸能否改善一氧化氮生成量还有待研究, Kaowles 和 Mitchell 认为补充外源性左旋精氨酸难以发挥有效作用。另有一些学者对心肌缺血再灌注时冠脉内皮细胞基础一氧化氮释放量及其在再灌注损伤中的作用提出了相反的意见[2-5]。本实验结果发现对照组灌注早期(5 min)即出现 NO 水平下降, 且随着再灌注时间延长(30 min)下降更为明显, 说明未成熟兔心缺血再灌注时一氧化氮合成与释放减少。实验还发现 L-ARG 组再灌注时 NO 水平与缺血前无明显差异, 与对照组相比则明显升高($P<0.05$), 而 L-NNA 组再灌注时 NO 水平与对照组相当($P>0.05$)。说明再灌注早期补充左旋精氨酸能明显改善未成熟兔心再灌注时一氧化氮生成量, 而同时给予其竞争性一氧化氮合成酶抑制剂即可抵消上述效应。由此可见, 左旋精氨酸一氧化氮通路参与了未成熟心肌缺血再灌注损伤过程。未成熟肌缺血再灌注时冠脉内皮一氧化氮合成与释放减少的可

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

能机制:①左旋精氨酸耗竭:心肌缺血再灌时可能损害了内皮细胞对细胞内左旋精氨酸浓度的自身调作用。②左旋精氨酸转运障碍:心肌缺血再灌注时内皮细胞膜损伤出现转运动能异常。③再灌注时形成大量的超氧阴离子;可抑制一氧化氮合成酶或直接灭活一氧化氮。本实验也发现对照组再灌注后心肌组织脂质过氧化产物丙二醛含量较缺血前明显升高($P>0.05$)。

3.2 左旋精氨酸对未成熟心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制

多数学者认为心肌缺血再灌注时一氧化氮合成与释放减少是导致再灌注损伤的重要因素,因而左旋精氨酸一氧化氮通路系统对减轻再灌注损伤可望起有益作用[3]。NaKanish[6]和Weyrich[7]等的实验表明左旋精氨酸能够改善猫和狗常温缺血后的再灌注损伤。Fujita等[8]报告了左旋精氨酸改善冠状动脉疾病患者活动后的心肌灌注异常。相反地,Takerchi等[9]则认为左旋精氨酸对心肌收缩力有影响。本实验结果发现L-ARG组在再灌注后心功能恢复均优于对照组和L-NNA组。从心功能来看,L-ARG组再灌注后LVPSP dp/dt_{max}、CF和CO的恢复率均明显高于对照组和L-NNA组($P<0.05$),而LVEDP却明显低于对照组和L-NNA组($P<0.05$),说明左旋精氨酸对未成熟心肌再灌注后心脏的收缩和舒张功能均有明显改善作用。上述资料提示再灌注早期补充左旋精氨酸能明显促进未成熟心肌心功能恢复,改善心肌代谢,对未成熟心肌缺血再灌注损伤具有良好的保护作用。

近年来研究显示冠脉内皮细胞损伤和功能障碍,一氧化氮合成与释放减少可能是心肌缺血再灌注损伤发生的重要因素。左旋精氨酸通过增加一氧化氮的生成,继而发挥心肌保护作用[4]。左旋精氨酸一氧化氮通路可能通过以下途径减轻再灌注对心脏损伤作用。①减轻氧自由基对冠脉内皮和心肌细胞的损害作用。对于未成熟心肌,氧自由基的大量生成亦是再灌注损伤的原因之一。缺血心肌的代谢改变为再灌注时氧自由基爆发产生提供了条件,内皮细胞存在供超氧阴离子通过的通道但缺乏过氧化氢酶,使内皮细胞成为缺血再灌注氧自由基的主要来源,且最易受其损伤,同时心肌细胞本身也产生大量的氧自由基。氧自由基可引起细胞内核酸和蛋白质氧化降解,也可以攻击细胞膜形成脂质过氧化产生丙二醛,最后造成细胞不可逆损害。一氧化氮可以被氧自由基灭活,也可以中和氧自由基。本实验结果显示:对照组和-NNA组再灌注后丙二醇含量较缺血前明显升高($P<0.05$),而一氧化氮水平却明显下降($P<0.05$),在L-ARG组二者与缺血前无显著性差异($P>0.05$)。但与对照组和L-NNA组相比一氧化氮水平增加、丙二醇含量下降($P<0.05$)。说明左旋精氨酸通过增加一氧化氮生成能减轻氧自由基对未成熟心肌的缺血再灌注损伤。②改善心脏微循环:冠脉内皮既可产生一氧化氮、前列环素和腺苷等具有舒张血管、抑制血小板聚集、阻止中性粒细胞粘附和膜稳定作用的细胞保护物质,又可以产生血管收缩因子和促血栓形成物质如内皮素和血小板活化因子,生理情况下它们处在一中动态平衡状态,从而维持冠脉血管基础张力、调节血压和血流灌注。心肌缺血再灌注时一氧化氮生成减少且迅速被超氧阴离子灭活,血管是收缩反应,不利于心肌灌流使缺血损害进一步加重;另一方面由于再灌注时冠脉内皮细胞肿胀和胞浆突向管腔直接造成血管变窄甚至闭塞或促进血栓形成,即使恢复灌注后仍有部分心肌得不到血液供应,出现"无再灌流现象"。而左旋精氨酸通过增加一氧化氮生成既可扩张血管又能保护内皮抑制血栓形成,改善心肌微循环提高ATP合成和利用,促进心功能恢复。

参考文献:

[1] 李 靖,肖家思.小哺乳动物心脏顺行性离体灌注技术[J].第三军医大学学报,1990,12(5):424-426.

[2] Vavrinkova H, Tutterova M, Stopka P, *et al*. The effect of captopril on nitric oxide formation and on generation of radical forms of mitochondrial respiratory chain compounds in ischemic rat heart[J]. Physiol Res, 2001, 50(5): 481-489.

[3] Divisova J, Vavrinkova H, Tutterova M, *et al*. Effect of ACE inhibitor captopril and L-arginine on the metabolism and on ischemia-reperfusion injury of the isolated rat heart[J]. Physiol Res, 2001, 50(2): 143-152.

[4] Paolocci N, Biondi R, Bettini M. Oxygen radical-mediated reduction in basal and agonist-evoked NO release in isolated rat heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(4): 671-679.

[5] Lovett J E, Fink B F, Bernard A, *et al*. Analysis of nitric oxide activity in prevention of reperfusion injury[J]. Ann Plast Surg, 2001, 46(3): 269-273; discussion 273-274.

[6] Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer D J, *et al*. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size [J]. Am J Physiol, 1992, 263(6 Pt 2): H1 650-1 658.

[7] Weyrich A S, Ma X L, Lefer A M. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat[J]. Circulation, 1992, 86(1): 279-288.

[8] Fujita H, Yamabe H, Yano T, *et al*. The effect of intravenously administrated L-arginine on myocardial perfusion abnormality in patients with microvascular angina[Abstract][J]. J Am Coll Cardiol, 1994, 23: 201A.

[9] Takeuchi K, Cao-Danh H, Glynnp, *et al*. Negative inotropic and metabolic effects of the nitric oxide precursors L-arginine: partial preservation by amiloride[J]. Surg Forum, 1993, 44: 264-266.

(编辑 谢义霞)

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