DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.015
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1053-03

论著

St. Thomas液中加入N-乙酰半胱氨酸可减轻幼兔心肌的缺血再灌注损伤

陈柏成,肖颖彬,陈 林,钟前进,王学锋,刘欲团 (第三军医大学附属新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 观察附加0.4 mmol/L N-乙酰半胱氨酸(NAC)心脏停搏液(NAC组)和St. Thomas液(ST组)对低温缺血再灌注幼兔心肌的保护作用。方法 采用Langendorff-Neeley离体左心做功模型,离体心脏缺血液120 min,再灌注60 min;分离出缺血再灌注幼兔左室心肌肌浆网,测定其总巯基(TSH)、非蛋白巯基(NPSH)、丙二醛(MDA)及Ca^{2+}-ATP酶活性。结果 NAC组,再灌注后心脏功能恢复明显优于ST组;TSH,NPSH含量明显高于ST组,同时MDA含量明显低于ST组;NAC组缺血再灌注对肌浆网Ca^{2+}-ATP酶活性的抑制较ST组轻。结论 附加NAC可显著改善St. Thomas液对低温缺血再灌注幼兔心肌的保护作用。其机制与NAC提高缺血再灌注幼兔心肌的还原型巯基水平,增强心肌抗氧化损伤能力,减轻缺血再灌注对幼兔心肌肌浆网钙泵功能的抑制有关。

关键词:心肌;缺血再灌注损伤;N-乙酰半胱氨酸;Ca^{2+}-ATP酶
中图法分类号:R542.2;R654.2;R977.4 文献标识码:A

Protective effects of N-acetyl-L-cysteine on hypothermic ischemia-reperfused isolated immature rabbit hearts

CHEN Bai-cheng, XIAO Ying-bin, CHEN Lin, ZHONG Qian-jin, WANG Xue-feng, LIU Yu-tuan (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the protective effects of St. Thomas cardioplegia supplemented with 4 mmol/L N-acetyl-L-cysteine (NAC, NAC group) on the hypothermic ischemia-reperfused immature hearts compared with those of St. Thomas cardioplegia (ST group). **Methods** The Langendorff-Neeley isolated perfused working rabbit model was employed. Cardiac sarcoplasmic reticulums (SR) were isolated from the ischemia-reperfusion myocardium. Then the content of total sulfhydryl (TSH), nonprotein sulfhydryl (NPSH), malmdialdehyde (MDA) and the activity of Ca^{2+}-ATPase were measured. **Results** ①The cardiac function during reperfusion was improved significantly in NAC group ($P<0.01$). ②Compared with the ST group, the SR, TSH, NPSH contents remained in a higher level in the NAC group ($P<0.05$), while the MDA content was lower in NAC group ($P<0.01$). ③St. Thomas cardioplegia supplemented with NAC attenuated the inhibitive activity of the SR Ca^{2+}-ATPase during ischemia-reperfusion ($P<0.01$). **Conclusion** St. Thomas cardioplegia supplemented with NAC improves the myocardial protective effects on the ischemia-reperfused immature myocardium. The mechanism might be that NAC can maintain the reduced thiol pool in the immature myocardium, enhance the anti-oxidative capacity and attenuate the inhibition of SR Ca^{2+}-ATPase.

Key words: N-acetyl-L-cysteine; immature myocardium; Ca^{2+}-ATPase; ischemia-reperfusion injury

谷胱甘肽氧化还原循环是心肌重要的内源性抗氧化损伤机制[1]。N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)是谷胱甘肽合成前体,已有研究证实NAC对成年心肌具有保护作用[2],但NAC对幼兔心肌作用的研究尚少,本实验采用左室做功模型,探讨附加NAC心脏停搏液对低温缺血再灌注幼兔心肌的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要药品及仪器设备

1.1.1 药品 N-乙酰半胱氨酸(由军事医学科学院江民教授惠赠),ATP酶检测试剂盒(南京建成生物研究所),常用试剂为国

作者简介:陈柏成(1965—),男,湖南省临武县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事未成熟心肌保护方面的研究。电话:(023)68755579

收稿日期:2000-01-20;修回日期:2000-07-30

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

产分析纯级。

1.1.2 采用 3~4 周龄大白兔，体重 350~450 g，雌雄不拘，由新桥医院动物室提供。离体心脏 Langendorff-Neeley 左室做功模型依文献[3]制备。灌流液采用 Krebs-Hensleit 配方，用前新鲜配制，以 95% O_2 和 5% CO_2 混合气体平衡，保持 PO_2 80~90 kPa，PCO_2 4.0~4.5 kPa，灌流前负荷 1.3 kPa，后负荷 5.3 kPa。

1.1.3 RM-6200 四道生理记录仪（日本），低温超高速离心机（日本），722 光栅分光光度计（四川仪表九厂）。

1.1.4 St. Thomas 液配方 NaCl 110 mmol/L，KCl 16 mmol/L，$MgCl_2$ 16 mmol/L，$CaCl_2$ 1.2 mmol/L，$NaHCO_3$ 10 mmol/L，pH 7.8；渗透浓度 320 mOsm/L，用前新鲜配制，附加 NAC 者，用前加入，NAC 浓度为 4 mmol/L。

1.2 实验过程及分组

1.2.1 实验过程 模型建立后，先平衡逆灌 10 min，心跳平稳后，左室顺灌做功 60 min，用 4 ℃ St. Thomas 液或附加 NAC 的 St. Thomas 液 10~15 ml，灌注使心脏停搏 120 min（环境温度 15~20 ℃），每 30 min 重复灌注 1 次。停搏结束后，开启逆灌使心脏复跳，平衡灌注 10 min，顺灌左室做功 60 min。

1.2.2 分组 按灌注心停搏液不同分为 St. Thomas 液灌注组（ST 组）和附加 NAC 的 St. Thomas 液灌注组（NAC 组），每组 8 只心脏。

1.3 观察指标

1.3.1 心脏功能指标 包括左室收缩峰压（Left ventricule peak systolic pressure，LVPSP），左室舒张末压（Left ventricle end diastolic pressure，LVEDP），正负变化速率（$\pm dp/dt$），心率（HR），左心室输出量（CO），及冠脉流量（Coronary flow，CoF）。

1.3.2 左室心肌肌浆网 Ca^{2+}-ATP 酶活性 按文献[4]方法分离出心肌肌浆网，采用定磷法，用南京建成生物研究所 ATP 酶试剂盒测定 Ca^{2+}-ATP 酶活性。

1.3.3 左室心肌肌浆网总巯基（TSH）及非蛋白巯基（NPSH）按上述方法分离心肌肌浆网，按 DTNB 方法[5]测定 TSH，NPSH 含量。按 TBA 法[6]测定 MDA 含量。

1.4 统计学分析

数值用 $\bar{x}\pm s$ 表示，均数间比较用 t 检验。

2 结果

缺血前两组心脏功能无明显差别，经停搏缺血再灌注后，NAC 组心脏功能各项指标的恢复均明显优于 St. Thomas 组（$P<0.05$），见表 1。说明附加 NAC 可显著改善 St. Thomas 液的心肌保护作用。NAC 组心肌肌浆网总巯基非蛋白巯基含量在缺血末及再灌注后均高于 St. Thomas 组（$P<0.05$）。NAC 组 Ca^{2+}-ATP 酶活性在缺血末及再灌注后明显高于 St. Thomas 组（$P<0.01$），见表 2。说明附加 NAC 可以提高心肌肌浆网巯基含量，同时减轻心肌肌浆网 ATP 酶活性的抑制。

表 1 两组心脏功能指标比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Comparison of parameters of cardiac function between the two groups（$\bar{x}\pm s$）

	ST group（$n=8$）		NAC group（$n=8$）	
	Preischemia	Reperfusion 60 min	Preischemia	Reperfusion 60 min
CoF（ml/min）	13.50±2.14	6.38±2.05	12.94±2.23	9.75±3.08 *
CO（ml/min）	33.36±1.93	15.63±3.31	32.63±4.46	24.13±3.20 *
HR（min^{-1}）	199.00±23.28	152.50±3.31	191.75±13.42	163.50±17.75 *
LVPSP（p/kPa）	12.63±1.42	8.25±1.95	11.92±1.52	9.42±1.46 *
LVEDP（p/kPa）	0.21±0.31	1.30±0.22	0.17±0.25	0.77±0.04 *
$+dp/dt$（kPa/s）	149.03±17.09	90.00±14.25	147.50±0.25	130.00±35.28 *
$-dp/dt$（kPa/s）	160.14±34.89	85.00±19.76	165.83±34.26	130.83±35.98 *

*：$P<0.01$ *vs* ST

表 2 两组左心室心肌肌浆网巯基含量与 Ca^{2+}-ATP 酶活性比较（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Comparison of the sulfhydryl contents and Ca^{2+}-ATPase activities between the two groups（$\bar{x}\pm s$）

	Preischemia	ST group（$n=8$）		NAC group（$n=8$）	
	（$n=8$）	Postischmia	Reperfusion 60 min	Postischmia	Reperfusion 60 min
TSH（$m_B/\mu mol\cdot mg^{-1}$）	56.25±10.41	45.77±6.67 *	35.73±8.67 **	53.73±5.65 △	46.50±11.36 △
NPSH（$m_B/\mu mol\cdot mg^{-1}$）	3.67±1.96	2.01±0.85 *	1.35±0.84 **	3.50±0.67 △	2.31±0.84 △
MDA（$m_B/\mu mol\cdot mg^{-1}$）	0.53±0.20	0.67±0.07	0.89±0.04 **	0.63±0.07	0.69±0.06 △
Ca^{2+}-ATPase（$\mu mol\cdot mg^{-1}\cdot h^{-1}$）	84.88±18.06	29.10±8.11 **	48.46±11.39 *	57.84±8.00 △	73.67±10.16 △

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* preischemia；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$ *vs* ST

3 讨论

NAC 是谷胱甘肽（GSH）合成前体，通过维持心肌还原巯基库水平，提高心肌抗过氧化损伤能力。NAC 通过其还原型巯基，直接捕获未成对电子，阻遏超氧阴离子的生成；还原型巯基作为 GSH 过氧化物酶（GPx）的底物，清除具有组织损伤能力的羟自由基和脂肪酰羟基过氧化物；还原型巯基作为巯基转移酶的底物，还原氧化型蛋白巯基，维持蛋白功能[7]；还原型巯基还参与氧化应激基因表达的调控[8]，从而发挥抗过氧化损伤作用。

附加 NAC 可以显著改善 St. Thomas 对低温停搏 120 min 幼兔心脏的保护作用。本实验观察到，附加 NAC 可以提高幼兔心肌肌浆网总巯基（TSH），非蛋白

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

巯基(NPSH)含量, 增强幼兔心肌肌浆网 Ca^{2+}-ATP 酶活性, 改善幼兔心脏 CO、CoF、HR、LVPSP、LVEDP、±dp/dt等心功能指标。氧自由基过氧化损伤和心肌细胞内钙离子平衡紊乱是心肌缺血再灌注损伤的重要机制。心肌肌浆网是缺血再灌注期间易受损伤的靶细胞器之一。谷天祥等[9]应用电镜酶细胞化学方法发现, 缺血再灌注后, 肌浆网原位 Ca^{2+}-ATP 酶颗粒减少, 并随缺血再灌注进程而进行性加重。缺血再灌注时氧自由基的生成超过细胞清除能力, 造成肌浆网蛋白所含还原型巯基氧化, 改变肌浆网酶与通道功能, 肌浆网 Ca^{2+}-ATP 酶功能障碍引起细胞内钙离子平衡紊乱[10], Vile 研究也证实微粒体巯基氧化后抑制 ATP 酶, 引起心肌细胞钙离子转运障碍。

本实验表明附加 4 mmol/L NAC 可显著改善 St. Thomas液的心肌保护作用, 维持再灌注后心肌巯基库水平, 减轻缺血再灌注对幼兔心肌肌浆网 Ca^{2+}-ATP 酶的抑制, 维持幼兔心肌细胞的钙离子调节能力, 改善再灌注后的心肌功能的恢复。NAC 是心脏停搏液有价值的添加剂。

参考文献:

[1] Meister A. Glutathione, ascorate and cellular protection[J]. Cancer Res, 1994, 54(7 Suppl): 1 969—1 986.

[2] Villani F, Glimberlia M, Monli E, *et al*. Effect of glutathione and N-acetyl-cysteine on *in vitro* and *in vivo* cardiac tocicity of donorubicin[J]. Free Radic Res Commun, 1990, 11(1—3): 145—151.

[3] Neely J R, Liebermeister H, Battersby E J, *et al*. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart[J]. Am J Physiol, 1967, 212(4): 804—814.

[4] Rapundalo S T, Briggs F N, Feher J J, *et al*. Effects of ischemia on the isolation and function of caninc cardiac sarcoplasmic reticulum[J]. J Mol Cell Cardiol, 1986, 18(8): 837—851.

[5] Kaneko M, Elimban V, Phalla N S. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca^{2+}-pump by oxygen free radicals[J]. Am J Physiol, 1989, 257(3Pt2): H804—H811.

[6] Ohkawa H. Assay for lipid peoxides in annimal tiaaue by thiobarbituric acid recton[J]. Annal Biochem, 1979, 95(2): 351—358.

[7] 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的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(1): 45—47.

[8] Yamamoto K, Dang Q N, Kennedy S P, *et al*. Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species[J]. J Biol Chem, 1999, 274(31): 21 840—21 846.

[9] 谷天祥, 肖德绵, 张显清, 等. 心肌缺血再灌注损伤肌浆网 Ca^{2+}-ATP 酶活性变化电镜酶细胞化学观察(摘要)[J]. 中华心血管病杂志, 1997, 25(1): 71.

[10] Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico S D, *et al*. Myocardial antioxidant defenses during cardiopulmonary bypass[J]. J Card Surg, 1993, 8(2): 167—171.

(编辑　谢义霞)

(上接 1049 页)

糖、服药史、进入回归模型。DF=7.974, $P=0.005$, 考虑血压、血糖、血脂的变化有可能是 DM 的结局, 将其它 6 人单因素逐步回归分析, 显示年龄、服药史与 BMI 有非常显著性意义($P<0.001$)。

3　讨论

年龄: 本研究表明年龄与 IGT 的发生有关联($OR>1$, OR 95%CI>1)。一般地随年龄增加, 周围组织的胰岛素受体数量减少, 密度减低, 亲和力下降, 胰岛素分泌异常、或由胰岛素拮抗的存在导致高血糖产生, 从而出现 IGT[1,2] 本研究结果与其相符合。

肥胖、体重指数、高血压、和高血脂: 本研究中单因素分析有肥胖者发生 IGT 的危险性比无肥胖史者大 1.105 倍($P=0.018$, $OR=2.105$), BMI 在两组间也有差异显著性($P<0.001$)。进行多因素非条件 Logistic 回归分析显示出 BMI 进入模型在两组间差异有显性, BMI 越大, 发生 IGT 的可能性越大。超重或肥胖是 IGT 的危险因素之一, 超重或肥胖者合并高血压、高血脂其患 IGT 的危险性越大。因此控制体重对预防 IGT 的发生有重要意义。

服药史: 阿斯匹林、消炎痛、口服避孕药等可引起 IGT 状态。本研究调查内容是避孕药类与消炎药类经单因素和多因素分析, 服药史在两组差异均有显著性($P=0.005$, $OR=2.657$)说明服药史与 IGT 的发生相关。具体哪种药物与 IGT 作用, 大小如何, 尚待进一步研究, 但控制上述药物在 IGT 高危人群中的使用, 对预防 IGT 有重要意义。

体育锻炼和其它[5]: 本研究中单因素分析表明体育锻炼减少在两组间差异有显著性($P=0.004$, $OR=1.614$)。规则持久的体育活动能增强周围组织对胰岛素的敏感性; 在预防 IGT 的发生及引导 IGT 的良性转归有明显作用。其它职业劳动强度、饮食习惯、嗜好家族史等因素对机体糖代谢有直接或间接作用, 但本次研究结果表明它们在两组间差异无显著性($P>0.05$), 因此有待进一步探讨。

关键词: IGT; 危险因素; 病例对照研究
中图法分类号: R58　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 李春霖, 陆菊明, 潘长玉. 糖耐量低减的病因及发病机理[J]. 国外医学: 内分泌学分册, 1996, 16(3): 122—125.

[2] 董晨珊, 王季猛. 糖耐量低减者胰岛分泌功能的观察[J]. 衡阳医学院学报, 1998, 26(1): 93—94.

[3] 汪　龙. 饮食与运动疗法对糖耐量低减的治疗作用[J]. 浙江实用医学, 1997, 10(5): 13—14.

(编辑　谢义霞)

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