DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.022

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

肖颖彬* 杨素娟** 韩本立*** 任建平** 汤仲明** 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: 探讨附加 N-乙酰半胱氨酸(NAC)心停搏液对低温缺血再灌注大鼠心脏的保护作用。方法: 采用离体左心做功模型,观察附加 NAC液和 St. Thomas液灌注对大鼠全心低温缺血 180 min再灌注 60 min的作用,比较两组心脏功能和心肌能量代谢的恢复状况。结果: 附加 NAC组再灌注后心脏功能和高能磷酸腺苷酸代谢的恢复状况明显优于 St. Thomas液灌注组。结论: 附加 NAC可显著改善 St. Thomas液心肌保护作用, NAC可能是有价值的心脏停搏液添加剂。

关键词 心肌保护; N-乙酰半胱氨酸; 能量代谢; St. Thomas液
中图法分类号 R654.1

巯基库及其相关的氧化还原循环是心肌组织重要的内源抗氧化防御机制[1]。本实验采用大鼠心脏离体做功模型,探讨附加 N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)的 St. Thomas液对低温缺血-再灌注大鼠心脏的保护作用。

1 材料和方法

1.1 主要药品和仪器设备

1.1.1 药品 四丁基氢氧化铵离子对色谱试剂(IPR-A,天津化学试剂二厂), ATP, ADP, AMP标准品(美国 Sigma公司)。常规试剂为国产分析纯。

1.1.2 动物 Wistar大鼠,体重 180~200 g,雌雄不拘,军事医学科学院动物所提供。离体心脏 Langendorf-Neeley左心室顺灌做功模型,依文献[2]制备。灌流液采用 Krebs-Henseleit配方,用前临时配制,以 95% O_2和 5% CO_2混合气平衡,使 PO_2保持 80 kPa, PCO_2 4.0~4.5 kPa。灌流前负荷 1.5 kPa,后负荷 8.0 kPa。

1.1.3 仪器 八道生理记录仪(日本光电产品)。高效液相色谱分析仪,配置美国 SP公司 SP8810型泵和 SP4600型积分仪,岛津 SPD-AM型紫外检测器,大连化物所分析柱和保护柱。

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 324 mOsm/L。用前临时配制,附加 NAC者在用前加入 2 mmol/L NAC。

1.2 实验过程和分组

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 30 min。用 4℃ St. Thomas液或附加 NAC的 St. Thomas液 10~15 ml灌注使心脏停搏,环境温度 18℃~20℃下停搏 180 min,每 30 min重复冷灌 1次。停搏结束后,开启逆灌使心脏复跳,平衡 10 min,行左室顺灌做功至 60 min。

1.2.2 分组 按灌注心脏停搏液不同,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(LVSP)及正负变化速率($\pm dp/dt$),左室舒张末压(LVEDP),心率(HR)和左心室输出量(CO)及冠脉流量(CFR)。

1.3.2 左室心肌腺嘌呤核苷酸含量 采用反相离子对 HPLC法测定[3],腺苷酸含量以 μmol/g(湿重组织)表示。测定每一标本的 ATP, ADP, AMP含量,并计算其总核苷酸(TAN)含量和能荷(Energy charge, EC)。

$$EC = (ATP + 1/2ADP)/TAN$$

1.4 统计分析

数值用 $\bar{x} \pm s$表示,均数间比较用 t检验。

2 结果

2.1 心脏功能指标,见表 1

表中结果说明,缺血前两组心脏功能无明显差别,经冷停搏缺血-再灌注后, NAC组心脏功能各项指标的恢复均明显优于 ST组($P < 0.01$)。说明附加 NAC可显著改善 St. Thomas液的心肌保护作用。

2.2 左室心肌腺嘌呤核苷酸含量和心肌能荷,见表 2

表中结果提示,心肌高能腺苷酸含量在缺血 180 min后,明显降低,再灌注后有一定程度的恢复,但仍明显低于缺血前水平($P < 0.01$)。附加 NAC组心肌高能磷酸腺苷酸的恢复明显优于 ST组。

* 肖颖彬,男, 34岁,博士,副教授
** 军事医学科学院放射医学研究所 *** 附属西南医院肝胆外科中心

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

表 1 两组心脏功能指标比较

Tab 1 Comparison of parameters of cardiac function between the two groups

	ST		NAC	
	Preischemia	Reperfusion 60 min	Preischemia	Reperfusion 60 min
LVSP(kPa)	14.3± 1.2	11.3± 1.9*	14.6± 1.8	14.3± 1.1△
LVEDP(kPa)	0.2± 0.1	1.1± 0.6*	0.2± 0.1	0.5± 0.2△
+ dp/dt(kPa/s)	263.5± 43.9	185.8± 21.4*	268.8± 32.8	244.8± 33.8△
- dp/dt(kPa/s)	221.7± 36.2	128.1± 24.4*	222.9± 38.3	189.8± 35.9△
CO (ml/min)	41.2± 3.2	13.4± 7.2*	42.8± 4.7	31.4± 5.1△
CFR(ml/min)	13.8± 1.1	7.5± 2.3*	13.9± 1.3	12.4± 1.6△
HR(beat/min)	281.1± 23.8	204.1± 26.2*	280.8± 17.2	258.3± 29.2△

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

表 2 两组心室肌腺苷酸含量(μmol/g)和能荷比较

Tab 2 Comparison of the adenine hosphate content (μmol/g) and the energy charge of ventricular myocardium between the two groups

	Preischemia	ST		NAC	
		Postischemia	Reperfusion 60	Postischemia	Reperfusion 60
ATP	16.1± 1.9	0.9± 0.2*	5.2± 0.4*	1.5± 0.2*	11.3± 1.7*△
ADP	14.6± 2.5	2.2± 0.5*	4.8± 0.4*	2.6± 0.3*	6.1± 0.9*
AMP	7.9± 1.0	8.0± 1.3	3.0± 0.2*	8.4± 0.9	2.2± 0.4*
TAN	38.5± 5.2	11.1± 1.9*	13.0± 0.9*	12.5± 1.4*	19.6± 2.9*△
EC	0.61± 0.01	0.18± 0.02*	0.58± 0.01	0.23± 0.01*	0.77± 0.01*△

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

3 讨论

巯基性质十分活跃,组织巯基库及其相关的谷胱甘肽氧化还原循环是机体重要的内源抗自由基防御机制。还原巯基可直接捕获未成对电子,阻遏超氧阴离子的生成;还原巯基做为谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的底物,参与清除更具组织损伤力的羟自由基和脂肪酰羟基自由基;作为巯基转移酶的底物,还原巯基对维持一些蛋白质内巯基的还原状态,防止蛋白质分子氧化损伤有重要意义;还原巯基还参与氧化应激基因表达的调控[4,5]。在心肌组织,由于其过氧化氢酶(Catalase)活性极低,巯基抗自由基机制显得尤为重要[6]。

自由基生成增加和内源抗自由基能力低下是心肌缺血再灌注损伤的重要机制,心肌缺血再灌注中自由基消耗还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH),或和GSH再生和合成障碍,可导致心肌还原巯基库逐步耗竭[7]。NAC为小分子物质,易于进入细胞,脱乙酰基后成为GSH合成的前体,促进GSH的合成,提高组织内GSH含量,增强组织的抗自由基损伤能力[8]。

附加NAC可明显改善St. Thomas液对低温停搏180 min大鼠心脏的保护作用,再灌注后心脏功能和心肌高能磷酸腺苷酸代谢的恢复均明显优于对照组。缺血后,心肌ATP和ADP的含量明显降低,AMP积聚,但TAN含量明显减少,再灌注后,NAC组ATP含量的恢复和TAN含量明显高于ST组。心肌能荷是综合反映腺苷酸代谢的指标,结果表明,缺血后两组心肌能荷显著下降,再灌注后NAC组的恢复明显优于ST组。两组TAN含量在再灌注后仍明显低于缺血前,说明心肌缺血再灌注可导致腺苷酸丢失,附加NAC可改善心肌腺苷酸的代谢,但不能完全防止缺血再灌注所致的腺苷酸丢失。

Menasche等[9]研究也发现,将NAC以40

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

mmol/L的浓度附加入心脏麻痹液中,可明显改善再灌注时心脏功能的恢复。我们在实验中发现,如此高浓度的 NAC加入心脏麻痹液中,明显改变了原液体的 pH和渗透压,且导致心脏停搏中出现严重的挛缩。Menasche等[9]也注意到,附加 40 mmol/L NAC的心脏麻痹液组心脏的 LV EDP的恢复并不优于对照组。我们通过反复预实验,摸索出 2 mmol/L为附加 NAC的有效浓度,这一结果也非常接近心脏保存液中 GSH的适宜浓度(2.5~3.0 mmol/L)[10]。

本实验结果表明,以 2 mmol/L浓度附加 NAC可显著改善 St. Thomas液的心肌保护作用,改善再灌注时心脏功能和代谢的恢复,NAC是心脏麻痹液有价值的添加剂。

参考文献

1 Meister A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. Cancer Research, 1994, 54(Suppl): 1969

2 Neely J R, Liebermeister H, Batersby E J, *et al*. Effect of pressure development on oxygen consumption by isolated rat heart. Am J Physiol, 1967, 212(6): 804

3 汪巨峰,肖文彬,秦伯益,等.紧张素转移酶抑制剂对缺血再灌注大鼠心脏 ATP等的影响.军事医学科学院院刊, 1991, 15(2): 118

4 Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. J Biol Chem, 1994, 269(13): 9397

5 Schulze-Osthoff K, Shenk H, Droge W. Effects of thioredoxin on activation of transcription factor NF-kappa B. Methods Enzymol, 1995, 252(2): 253

6 Ferrari R, Ceconi C, Curello S, *et al*. Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol containing agents. Am J Med, 1993, 91(3c): 953

7 Porreca E, del Boccio G, Lapenna D, *et al*. Myocardial antioxydant defence mechanisms: time related changes after reperfusion of the ischemia rat heart. Free Radic Res, 1994, 20(2): 171.

8 Ceconi C, Currelo S, Cargnoni A, *et al*. The role of glutathione status in the protection against ischemic and reperfusion damage: effects of N-acetyl-L-cesteine. J Mol Cell Cardiol, 1988, 20(1): 5

9 Menasche P, Grousset C, Gauduel Y, *et al*. Maintenance of the myocardial thiol pool by N-acetylcesteine. An effective mean of improving cardioplegic protection. J Thorac Cardiovasc Surg, 1992, 103(5): 936

10 Southard J H, Belzer F O. The University of Wisconsin organ preservation solution: components, comparison, and modification. Transplant Rev, 1993, 7(4): 176

(收稿: 1998-02-12;修回: 1998-11-25)

(编辑　冷怀明)

Protective effects of cardioplegia enhanced with N-acetylcysteine on the heart in hypothermic ischemia-reperfused rats

Xiao Yingbin, Yang Sujuan, Han Benli, Ren Jianping, Tang Zhongming, Liu Yutuan (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract Objective: To investigate the protective effects of cardioplegia enhanced with N-acetylcysteine (NAC) on the heart in hypothermic ischemia-reperfused rats. Methods: The rat hearts was arrested by multiple dose of NAC-enhanced cardioplegia and St. Thomas solution perfusion respectively for 180 min at 20℃ and reperfused for 60 min. The recovery of cardiac function and energy metabolism was observed. Results: The recovery of cardiac function and energy metabolism was much better in the hearts perfused with NAC-enhanced cardioplegia than with St. Thomas solution. Conclusion: The enhancement with NAC can significantly improve the myocardial protective effects of St. Thomas solution, which suggests that NAC might be a valuable additive for hypothermic cardioplegic myocardial protection.

Key words myocardial protection; N-acetylcysteine; energy metabolism; St. Thoma solution

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