

心肌组织及冠脉流出液卡尼汀浓度测定的意义

Determination of carnitine in myocardial and coronary effluents

左明良¹, 殷仁富^{1*}, 信栓力², 顾书华³

(1. 第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003; 2. 长征医院肾内科; 3. 常州三维工业技术研究所, 常州 213013)

[摘要] **目的:**探讨心肌组织及冠脉流出液卡尼汀(CN)浓度测定的意义。**方法:**30只大鼠随机分为正常对照组、缺血/再灌注组(I/R)、CN组,每组各10只。正常对照组以改良台氏液离体心脏灌注110 min;I/R组以改良台氏液离体心脏灌注20 min,缺血20 min,再灌注70 min;CN组以10 mmol/L CN灌注离体心脏20 min,缺血20 min,再灌注60 min,以改良台氏液冲洗10 min。以放射化学酶法测定心肌组织及其冠脉流出液卡尼汀浓度;电镜下观察心肌组织超微结构。**结果:**心肌组织中卡尼汀I/R组明显较正常对照组少($P < 0.05$),而CN组明显高于I/R组和正常对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$);冠脉流出液中卡尼汀I/R组和CN组均较正常对照组高($P < 0.05$, $P < 0.01$);CN组心肌组织超微结构损伤轻微。**结论:**缺血组织存在卡尼汀缺乏,外源补充卡尼汀能渗入心肌细胞,为临床治疗缺血性心脏病提供理论依据。

[关键词] 缺血/再灌注;卡尼汀;心肌组织;冠脉流出液;缺血性心脏病**[中图分类号]** R 541 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0908-02

卡尼汀(carnitine, CN)在转运长链脂肪酸进入线粒体、去除酰基部分和保持游离辅酶A的正常水平中起着重要作用^[1]。血浆游离CN水平的增加是心肌脂肪酸代谢减弱的指标。本研究就CN浓度测定的意义作一下探讨。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 ATP标准品,乙酰辅酶A,¹⁴C-乙酰辅酶A,CN乙酰转移酶,阴离子交换树脂AG2*8为美国Sigma公司产品,CN为常州三维工业技术研究所提供(生产批号010208)。

1.2 动物和实验分组 健康雄性SD大鼠30只(体质量250~300 g,由复旦大学医学院实验动物中心提供),随机分为3组:(1)正常对照组:以改良台氏液灌注110 min;(2)缺血再灌注组(I/R):以改良台氏液灌注20 min,缺血20 min,再灌注70 min;(3)CN组:10 mmol/L CN灌注20 min,缺血20 min,再灌注60 min,以改良台氏液冲洗10 min。

1.3 离体鼠心模型的建立 5%异戊巴比妥钠0.1 ml/100 g,腹腔注射麻醉后,迅速开胸离体心脏入停跳液(4℃台氏液),并悬挂于Langendorff实验装置,以饱和改良台氏液灌注(95%氧,5%二氧化碳),滴速8 ml/min,温度37℃,维持压力为110 cm H₂O(1 cm H₂O=0.098 kPa)。

1.4 心肌超微结构观察 实验结束后立即剪下左室组织约4~6块,大小约1 mm³,放在预冷的固定液中,电镜下观察心肌超微结构。

1.5 心肌组织及冠脉流出液CN测定

1.5.1 组织游离CN的提取^[2,3] 实验后离体心脏滤纸吸干后立即放于液氮并-70℃冰箱保存。称取约25 mg冷冻心室组织,并立即转移到预冷的含有0.3 mol/L高氯酸匀浆玻璃管,4℃制成总体积500 μl,4℃匀浆;室温5 000×g离心5 min,弃上清液,沉淀悬浮于500 μl 0.5 mol/L KOH液体内,65℃温育1 h。加入0.3 mol/L高氯酸中和混匀,试管需在冰中冷却开盖,4℃5 000×g离心5 min。

1.5.2 离子交换树脂的制备 称50 g氯离子交换树脂AG2*8,倒入1 000 ml烧杯中,加入1 mol/L盐酸300 ml,搅拌15 min,然后在4℃保存过夜。用蒸馏水清洗树脂,直到流出液pH呈中性。处理后的树脂悬浮在蒸馏水中,浓度为45%。

1.5.3 CN浓度测定^[2,4] 采用化学酶法。按下列浓度配制反应混合液:0.15 mol/L HEPES/KOH(pH 7.3),2.5 mmol/L Na₂S₄O₆,31 μmol/L乙酰辅酶A,1.2×10⁶ Bq/L¹⁴C乙酰辅酶A,61 μmol/L肉碱乙酰转移酶。取反应混合液0.8 ml,加入0.1 ml处理后的样本,混合,置室温孵育30 min,加入0.5 ml树脂悬浮液,立即反复混匀,9 000×g离心5 min。取上清0.8 ml,加液闪液7.2 ml混匀后,在液闪仪上计数。

1.5.4 空白管及标准管设置 空白管内不加反应混合液,代之以18 mmol/L(NH₄)₂SO₄,31 μg/ml牛血清白蛋白溶液,其他处理同样本管。

1.6 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间CN浓度用 χ^2 检验,由SPSS软件包处理。

2 结果

2.1 电镜检查 电镜下见正常对照组肌纤维排列整齐,线粒体结构完整,线粒体嵴清晰可见,还可见数量不等的糖原颗粒(图1A)。I/R组线粒体明显受损,线粒体肿胀、紊乱甚至破裂(图1B);肌丝和肌纤维排列疏松、紊乱,部分条纹消失,可见肌纤维断裂,糖原颗粒减少(图1C);CN组与正常对照组相比肌纤维受损程度轻微,其排列较整齐,线粒体结构亦较完整(图1D)。

2.2 心肌组织及其冠脉流出液中CN含量 大鼠心肌经20 min缺血、再灌注70 min后,I/R组心肌组织CN浓度为(0.51±0.15) μmol/g,明显低于正常对照组的(1.31±

[基金项目] 全军医药卫生科研基金(01M002)。**[作者简介]** 左明良(1972-),女(汉族),硕士,住院医师。

*Corresponding author. E-mail:youngman@public2.sta.net.cn

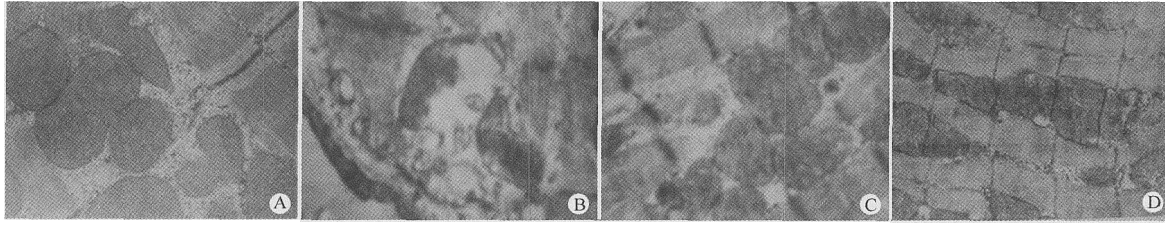


图1 CN对缺血再灌注心肌超微结构改变的影响

A:正常对照组(×15 000); B:I/R组(×20 000); C:I/R组(×15 000); D:CN组(×12 000)

0.02) $\mu\text{mol/g}$ ($P < 0.05$), CN组为(2.07 \pm 0.20) $\mu\text{mol/g}$,明显高于正常对照组 ($P < 0.05$),同时显著高于I/R组 ($P < 0.01$)。I/R组冠脉流出液CN浓度为(0.95 \pm 0.01) $\mu\text{mol/L}$, CN组为(1.05 \pm 0.42) $\mu\text{mol/L}$,均明显高于正常对照组的(0.46 \pm 0.02) $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$, $t < 0.01$)。

3 讨论

本实验结果表明,缺血心肌组织内CN减少,同时缺血组冠脉流出液内CN浓度较正常对照组显著升高,说明缺血心肌内CN可能部分通过损伤心肌释出组织外,从而导致心肌细胞内CN减少。我们认为这可能是由于心肌缺血时,氧自由基生成增多,脂质过氧化增强,心肌细胞膜结构受到攻击、结构破坏,导致CN从损伤心肌组织释放的缘故。缺血时转运到心肌细胞的CN减少,或缺血时线粒体内有毒脂肪酸中间体的聚集导致CN储备的耗竭,都可能参与心肌细胞内CN的减少。本实验还显示缺血/再灌注心肌细胞受损严重,可能为能量加工厂——线粒体对缺血/再灌注损伤敏感;当补充外源CN后,心肌超微结构得到部分恢复,可能与CN补充并渗入到心肌后改善了能量代谢、促使脂肪酸有毒中间体转运至细胞外、氧自由基减少等机制有关,从而保护了缺血/再灌注损伤心肌。此与CN缺乏心肌病仓鼠CN补充治疗后心肌超微结构、收缩力及心脏功能得到改善^[4]的结果类似。已有临床和实验研究显示长期CN缺乏与心肌病和心衰相关,短期CN缺乏动物更易发生心肌缺血损伤^[5,6]。外源补充CN可显著减少心肌组织病理学的再灌注损伤^[7]。临床和实验研究显示,作为一种天然氨基酸的CN,短期CN缺乏动物则更易发生缺血损伤,如长期缺乏与心肌病和缺血性心衰相联系^[4]。心肌病仓鼠存在CN缺乏,当补充CN后心肌超微结构、功能和收缩力得到改善^[5]。本实验结果提示,血浆中CN浓度可密切反映心肌受损程度。因此,有研究^[7]表明血浆和尿中CN水平与左室功能呈正相关,血浆CN可作为左室功能减弱和心肌损伤的指标。血浆游离CN水平的增加,是心肌脂肪酸代谢减弱的指标。缺血时,酰基CN不能进一步氧化,由NADH介导的脂肪酸氧化受阻,能量代谢发生障碍。已观察到实验动

物和心脏病患者缺血期间心肌组织内CN降低和CN缺乏,发现缺血早期游离CN减少而乙酰CN和长链脂酰CN增加;随缺血时间的延长,总CN也出现减少。更多的资料间接提示冠心病患者心肌内(即使以前没有心肌梗死)缺乏CN。而近年资料显示每次心绞痛发作均有CN从心肌释入冠状动脉^[1]。这些证据有力支持了缺血心肌缺乏CN的学说,并对CN减少的机制作了有益的探索。结合本实验研究,我们认为冠心病患者心肌内存在CN摄取缺陷,在急性缺血发作后,CN的摄取不能平衡CN的丢失。慢性心绞痛的发作亦将导致相对性CN缺乏^[1,6]。结合本实验结果,我们认为,外源补充CN可能有助于临床治疗缺血性心脏病。

[参考文献]

- [1] 殷仁富,陈金明 主编. 心脏能量学-代谢与治疗[M]. 上海:第二军医大学出版社,2002. 6.
- [2] Harper P, Wadstrom C, Cederblad G. Carnitine measurements in liver, muscle tissue, and blood in normal subjects[J]. *Clin Chem*, 1993, 39(4): 592-599.
- [3] 徐洪实,王勇平,梅长林,等. 慢性肾衰患者的卡尼汀代谢[J]. 第二军医大学学报,1999,20(1):36-38.
- [4] Broderick TL, Cifuentes J, Green D, et al. Short-term carnitine deficiency does not alter aerobic rat heart function but depresses reperfusion recovery after ischemia[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2001, 79(10): 892-897.
- [5] Keith ME, Ball A, Jeejeebhoy KN, et al. Conditioned nutritional deficiencies in the cardiomyopathic hamster heart[J]. *Can J Cardiol*, 2001, 17(4): 449-458.
- [6] 周翠玲,殷仁富,信栓力,等. 左旋卡尼汀对充血性心衰患者血清超氧化物歧化酶和丙二醛水平的影响[J]. 第二军医大学学报,2003,24(8):916-917.
- [7] El-Aroussy W, Rizk A, Mayhoub G, et al. Plasma carnitine levels as a marker of impaired left ventricular functions[J]. *Mol Cell Biochem*, 2000, 213(1-2): 37-41.
- [8] 王咏梅,殷仁富,张家友,等. 左旋国产卡尼汀治疗冠心病心肌缺血的疗效观察[J]. 第二军医大学学报,2002,23(5):548-550.

[收稿日期] 2003-12-12

[修回日期] 2004-05-18

[本文编辑] 曹静