

• 研究原著 •

左卡尼汀对心肺复苏后大鼠肾脏保护作用的实验研究

陈达¹, 崔斌², 王斯闻¹, 王绍久¹, 朱杰¹

1. 中国医科大学附属第四医院急诊科, 辽宁 沈阳 110032; 2. 解放军第 201 医院急诊科, 辽宁 辽阳 111000

摘要:目的 通过观察左卡尼汀对复苏后大鼠血清、肾组织中细胞因子的影响, 探讨左卡尼汀对复苏后肾脏保护作用的机制。方法 建立心肺复苏大鼠模型, 30 只 Wistar 大鼠随机分为手术对照组(S 组)、常规复苏组(C 组)和左卡尼汀组(L 组), 每组 10 只, S 组只行手术操作, 不致颤; C 组造成心搏骤停并行常规复苏; L 组在心搏骤停并复苏成功后静脉注射左卡尼汀。动态观察, 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、SU、Scr 及肾组织中 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 的变化。结果 与 S 组比较, C 组和 L 组复苏成功后血清 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、SU、Scr 及肾组织 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 有不同程度升高($P < 0.01$)。L 组与同时相 C 组比较, 血清 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、SU、Scr 及肾组织 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 升高程度减轻($P < 0.05$)。结论 左卡尼汀能减轻炎症细胞因子介导的肾脏损伤, 对复苏后肾脏有保护作用。

关键词: 肉碱/药理学; 心肺复苏术; 肾/药物作用; 疾病模型, 动物

中图分类号: R654.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-6647(2011)33-8077-03

Protective effects of levocarnitine on kidney after cardiopulmonary resuscitation in rat

CHEN Da, CUI Bin, WANG Siwen, WANG Shaohui, ZHU Jie

Department of Emergency, The Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China

Abstract: Objective To investigate the change of cytokines induced by cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest and the mechanism of protective effects of levocarnitine. **Methods** After setting up cardiopulmonary resuscitation model in rats, 30 animals were randomly divided into operation control group (group S, $n = 10$), routine resuscitation group (group C, $n = 10$) and levocarnitine treated group (group L, $n = 10$). Group S was not induced cardiac arrest. Group C was performed standard CPR after cardiac arrest. Group L was treated by levocarnitine. Dynamic observation of levels of TNF- α , IL-1 β , iNOS, SU and Scr in serum and TNF- α , IL-1 β and iNOS in renal tissue were measured. **Results** Contrast to group S, the levels of TNF- α , IL-1 β , iNOS, SU and Scr in serum and TNF- α , IL-1 β and iNOS in renal tissue in other groups gradually increased respectively ($P < 0.01$). Increases of TNF- α , IL-1 β , iNOS, SU and Scr in serum and TNF- α , IL-1 β and iNOS in renal tissue in group L were less than in group C at the same stage ($P < 0.05$). **Conclusion** Levocarnitine has protective effects and ameliorated the damage of the inflammatory cytokines on the kidneys after cardiopulmonary resuscitation.

MeSH Carnitine/ pharmacology; Cardiopulmonary Resuscitation; Kidney/drug effects; Disease Models, Animal

心跳骤停和心肺复苏过程中, 机体经历了循环停止、低氧血症、缺血再灌注、应激反应、代谢紊乱等一系列过程, 出现全身缺血再灌注, 导致肾脏损伤, 这与临床中常见的肾前性急性肾损伤极为相似。本文通过对比较研究心肺复苏后大鼠血清及肾组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的变化及左卡尼汀(Levocarnitine, LC)对这些炎症因子的影响, 以探讨其对肾脏的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康成年 Wistar 大鼠 30 只, 雄性, 体重 240~310 g, 购自中国医科大学动物部。实验用窒息导致大鼠心跳骤停并进行标准心肺复苏的动物模型: 将 Wistar 大鼠随机分为 3 组: 对照组(假手术

组)(S 组, $n = 10$)、常规复苏组(C 组, $n = 10$)、左卡尼汀治疗组(L 组, $n = 10$)。对照组仅进行插管等手术操作, 不进行心跳骤停和心肺复苏。实验观察终点为出现 ROSC 后 4 h。

1.2 模型制备 建模时先用 3% 戊巴比妥钠 225 mg/100 g 腹腔麻醉、心电监护; 行气管插管术, 接动物呼吸机。频率为 70 次/min, 潮气量为 6 ml/kg。对照组仅做上述步骤, 其余两组稳定 10 min 后, 于呼气末关闭气管, 窒息大约 7~9 min, 致心脏骤停(CA), 立即开放呼吸机, 给 100% 纯氧, 予标准剂量肾上腺素 0.02 mg/kg 抢救, 实施胸外按压, 频率 250~300 次/min, 当出现 ROSC, 停止 CPR, 0.5 h 后撤 100% 纯氧。左卡尼汀干预组于 ROSC 后 2 h 给药方法为将 1 g 的左卡尼汀(可益能, 意大利生产)用 100 ml 0.9% 氯化钠注射液稀释, 按 100 mg/kg 体重腹腔注射给药。复苏组给予等量的生理盐水。3 组大鼠维持生命体征至 ROSC 后 4 h。所有实验参数设计和记录均参照实验

基金项目: 辽宁省科学技术基金(2009225040)

作者简介: 陈达(1979), 男, 沈阳人, 主治医师, 硕士。研究方向: 多器官功能障碍的诊断及治疗。

通讯作者: 王斯闻, E-mail: wsw0523@yahoo.com.cn

研究的 Utstein 模式^[1]。

1.3 检测项目与方法

1.3.1 血清及肾组织中 TNF-α、IL-1β、iNOS 检测 分别于给药后 2 h、4 h 每组各杀死 5 只大鼠, 股静脉采血(离心 3 000 次/min, 5 min), 取上清, -20℃保存, 同时取肾组织 400~500 ng, -80℃冰冻。冰浴下, 内切式组织匀浆机制备肾组织匀浆。采用放射免疫法测定血清及肾组织中 TNF-α、IL-1β、iNOS, 按说明书进行操作。(试剂盒由博士德公司提供)

1.3.2 血清尿素(SU)和肌酐(Scr)检测 全自动生化分析仪检测血清尿素(SU)和肌酐(Scr)水平。

1.3.3 肾脏形态学观察 光镜标本以 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋、HE 染色, 切片以 Olympus 光镜观察; 电镜标本以 3% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定, Epon 包埋剂包埋, 超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅电子染色, 切片行透射电镜观察(JEM-1230 型生物透射电子显微镜, 日本电子)。

1.4 统计学处理 采用国际统计软件 SPSS 13.0 处理数据, 所有结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组数据间用方差分析, 两两比较用 *q* 检验, 方差不齐时用秩和检验, *P* < 0.05 为差异

有统计学意义。

2 结果

2.1 三组心肺复苏后血清 TNF-α、IL-1β 及 iNOS 的变化 与 CA 前相比, 复苏成功后 2 h C 组和 L 组 TNF-α、IL-1β 及 iNOS 都有不同程度的升高(*P* < 0.01), 但 L 组升高幅度小于 C 组(*P* < 0.05), 4 h 两组 TNF-α、IL-1β 及 iNOS 进一步升高, 但 L 组升高幅度仍小于 C 组(*P* < 0.05)。见表 1。

2.2 三组心肺复苏后肾脏组织匀浆 TNF-α、IL-1β 及 iNOS 的变化 与 CA 前相比, 复苏成功后 2 h C 组和 L 组 TNF-α、IL-1β 及 iNOS 均升高(*P* < 0.01), 但 L 组升高幅度小于 C 组(*P* < 0.01); 4 h 时两组 TNF-α、IL-1β 及 iNOS 进一步升高, 但 L 组升高幅度仍低于 C 组(*P* < 0.05)。见表 2。

2.3 三组心肺复苏后血清尿素(SU)和肌酐(Scr)水平的变化 与 CA 前相比, 复苏成功后 2 h C 组和 L 组 SU, Scr 都有不同程度的升高(*P* < 0.01), 但 L 组升高幅度小于 C 组(*P* < 0.05), 4 h 两组 SU, Scr 进一步升高, 但 L 组升高幅度仍小于 C 组(*P* < 0.05)。见表 3。

表 1 各组心肺复苏后血清 TNF-α、IL-1β、iNOS 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α (ng/L)			IL-1β (ng/L)			iNOS (U/L)		
	CA 前	ROSC2 h	ROSC4 h	CA 前	ROSC2 h	ROSC4 h	CA 前	ROSC2 h	ROSC4 h
S 组	6.23 ± 1.21	12.22 ± 2.63	12.34 ± 2.50	6.47 ± 1.36	13.25 ± 2.27	14.25 ± 2.36	5.35 ± 0.4	9.31 ± 1.67	9.86 ± 1.75
C 组	6.54 ± 1.25	63.24 ± 5.72 ^a	96.40 ± 6.74 ^a	7.12 ± 1.05	77.25 ± 8.79 ^a	123.27 ± 9.47 ^a	6.10 ± 0.56	55.78 ± 6.54 ^a	90.72 ± 8.26 ^a
L 组	6.52 ± 1.35	45.16 ± 4.40 ^a	75.34 ± 3.41 ^a	6.95 ± 1.32	53.13 ± 6.43 ^{ab}	90.56 ± 6.78 ^{ab}	5.95 ± 0.5	34.65 ± 4.1 ^{ab}	67.98 ± 5.2 ^{ab}

注: 与同组 CA 前比较, ^a*P* < 0.01; 与 C 组比较, ^b*P* < 0.05。

表 2 家兔心肺复苏后肾脏组织 TNF-α、IL-1β、iNOS 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α (ng/L)			IL-1β (ng/L)			iNOS (U/L)		
	CA 前	ROSC2 h	ROSC4 h	CA 前	ROSC2 h	ROSC4 h	CA 前	ROSC2 h	ROSC4 h
S 组	5.12 ± 1.45	7.89 ± 1.73	8.09 ± 1.70	8.78 ± 1.46	9.12 ± 1.34	9.45 ± 2.70	7.45 ± 1.28	9.14 ± 1.32	9.56 ± 1.28
C 组	5.32 ± 1.38	69.67 ± 5.84 ^a	99.76 ± 8.90 ^a	9.74 ± 1.89	78.90 ± 7.56 ^a	123.98 ± 9.68 ^a	7.56 ± 1.50	79.98 ± 7.28 ^a	90.87 ± 5.60 ^a
L 组	5.56 ± 1.36	36.54 ± 4.42 ^{ab}	70.78 ± 7.25 ^{ab}	8.90 ± 1.67	45.12 ± 5.46 ^{ab}	90.14 ± 7.84 ^{ab}	7.98 ± 1.3	49.25 ± 5.56 ^{ab}	70.23 ± 6.35 ^{ab}

注: 与同组 CA 前比较, ^a*P* < 0.01; 与 C 组比较, ^b*P* < 0.05。

表 3 各组心肺复苏后血清 SU、Scr 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	SU (mmol/L)			Scr (μmol/L)		
	CA 前	ROSC2 h	ROSC4 h	CA 前	ROSC2 h	ROSC4 h
S 组	9.35 ± 1.56	9.69 ± 1.48	10.12 ± 1.73	76.47 ± 9.46	79.12 ± 7.67	80.56 ± 8.32
C 组	10.45 ± 1.78	20.87 ± 5.46 ^a	29.17 ± 7.66 ^a	99.73 ± 8.78	231.67 ± 13.56 ^a	299.51 ± 12.90 ^a
L 组	10.56 ± 1.66	16.43 ± 4.34 ^{ab}	20.12 ± 4.23 ^{ab}	90.56 ± 9.23	140.76 ± 10.98 ^{ab}	200.21 ± 9.25 ^{ab}

注: 与同组 CA 前比较, ^a*P* < 0.01; 与 C 组比较, ^b*P* < 0.05。

2.4 病理学改变 C 组肾小管显著混浊肿胀, 变性, 充满蛋白管型。肾小管上皮细胞扁平, 出现肾小管上皮细胞坏死。肾间质水肿, 有散在淋巴细胞浸润及浆细胞浸润, 并有纤维素渗出。而 L 组与 C 组比较肾小管肿胀, 变性及炎症细胞浸润均较轻。肾脏组织超微结构变化: S 组线粒体无肿胀, 嵴排列整齐, 肾小管及肾小球细胞排列规则; 而 C 组可见肾小管及肾小球细胞损伤, 部分线粒体膜不完整, 嵴模糊不清, 有肿胀, 部

分肾小管及肾小球细胞排列紊乱; L 组细胞线粒体增生, 少数有肿胀, 内部嵴结构正常。

3 讨论

心搏骤停(cardiac arrest, CA)是严重威胁生命的临床事件, 心肺复苏(cardiopulmonary resuscitation, CPR)的本质是缺血/再灌注损伤过程^[2], 成功复苏后肾功能不全是影响复苏成功的重要因素。心跳骤停-心肺复苏后 12%~30% 患者出现急性肾衰竭^[3], 病死

率高达 50%^[4], 故研究心肺复苏后急性肾衰竭的防治具有重要临床意义。近年国外对心肺复苏后单个器官研究发现, 心肺复苏后引起器官急性性损伤的原因很多, 但主要为心跳骤停期间组织严重缺血缺氧以及复苏后组织再灌注所致, 再灌注损伤时, 炎症介质的增加及细胞凋亡的激活被认为是损伤发生的重要机制之一^[5]。本实验以大鼠为动物模型, 探索了左卡尼汀对心肺复苏后肾功能不全的影响。

本研究显示, 大鼠心肺复苏后血清及肾组织 TNF- α 、IL-1 β 及 iNOS 水平升高, 出现肾功能异常, 这主要与心跳骤停期间肾脏组织严重缺血缺氧以及复苏后肾脏组织再灌注有关。在这一全身性缺血再灌注期间, 肾组织细胞产生大量的炎症介质及氧自由基, 介导脂质过氧化、损伤肾小管上皮细胞。再灌注肾组织细胞可产生快速的线粒体损伤, 引起肾小管上皮细胞发生明显的超微结构改变, 诱导肾小管上皮细胞凋亡, 导致肾功能异常。LC 化学名为 L-3-羟-4-三甲氨基丁酸, 俗称肉碱, 是人体脂肪酸代谢的主要辅助因子, 在细胞中含量较高, 可加速细胞脂肪酸 β 氧化, 提高细胞的 ATP 水平, 保证细胞的能量供应^[6]。心肺复苏后细胞能量供应不足, 肾组织细胞结构和功能严重受损, 线粒体内 LC 含量减少, 游离脂肪酸等有害物质在细胞内堆积, β 氧化受阻, 致使细胞内 ATP 和磷酸肌酸生成减少, 能量代谢产生障碍^[7]。故而给予外源性补充 LC 可有效地改善脂肪酸代谢, 使肾组织细胞从无氧酵解为主重新转为以脂肪酸 β 氧化为主, 使细胞能量代谢得以有效的增加^[8]。此外, LC 可通过抑制糖酵解, 降低细胞内 H⁺ 浓度、抑制细胞内钙超载, 可有效保护缺血肾组织再灌注损伤。

本实验建立了大鼠心肺复苏模型, 通过对两实验组在大鼠复苏成功后均出现肾功能不全, 表现为复苏后 2 h 血清中 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、SU、Scr 及肾组织中 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 有不同程度升高, 在 4 h 上述变化趋势依然存在, 说明复苏后肾功能不全呈进行性发展。左卡尼汀组血清中 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS、SU、Scr 及肾组织中 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 上升幅度均小于常规复苏组, 两组比较差异有统计学意义, 提示左卡尼汀虽然没有完全阻断复苏后肾功能不全的进程, 但可以改善肾功能不全。通过对大鼠血清及肾组织中 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 的测定, 可见 TNF- α 、IL-1 β 、iNOS 在心肺复苏后持续显著性增高, 说明这些炎症因子在心肺复苏后肾功能不全发生发展中扮演重要角色。TNF 是细胞因子网络的关键部分, 当心肺复苏后缺血再灌注损伤时进入机体, TNF- α 在循环中较早出现并迅速达到高峰, 它可以直接损伤组织细胞, 还可以激活中

性粒细胞, 使后者进一步释放各种炎症因子, 引起进一步损伤, 也可以介导 IL-1、IL-6, 使损伤进一步加重^[9]。IL-1 的活性形式有 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 γ 三种, IL-1 β 是血液和组织液中的主要形式, 不仅能够协同其他细胞因子促进 B、T 细胞活化, 而且能够诱导其他炎症性介质的产生, 加强白细胞与内皮细胞黏附, 调节 TNF- α 、IL-6 的产生^[10]。诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 在正常状态下不表达, 在缺血再灌注损伤时, 在巨噬细胞、多形核粒细胞等细胞中表达, 诱导细胞释放大量的氧化氮, 产生氧化性很强的自由基, 具有很大的细胞毒性, 引起组织细胞损伤。本实验电镜下所见肾组织大体结构和超微结构改变也说明左卡尼汀的保护作用。左卡尼汀组线粒体膜完整, 肿胀减轻, 提示左卡尼汀减轻了肾组织线粒体缺血/再灌注后损伤。

左卡尼汀通过减轻炎性细胞因子介导的肾脏损伤, 抑制肾小管上皮细胞凋亡, 从而保护心肺复苏后大鼠肾功能, 这将为临床应用左卡尼汀预防心肺复苏后性肾功能不全提供理论依据。

参考文献

- [1] 陈尔真, 蒋健. 复苏实验研究 Utstein 模式[J]. 中国急救医学, 1999, 19(2): 70-73.
- [2] Claridge JA, Schulman AM, Young JS. Improved resuscitation minimizes respiratory dysfunction and blunts interleukin-6 and nuclear factor-kappa B activation after traumatic hemorrhage[J]. Crit Care Med, 2002, 30(8): 1815-1819.
- [3] Zeiner A, Sunder-Plassmann G, Sterz F, et al. The effect of mild therapeutic hypothermia on renal function after cardiopulmonary resuscitation in men [J]. Resuscitation, 2004, 60(3): 253-261.
- [4] Bagshaw SM, Laupland KB, Doig CJ, et al. Prognosis for long-term survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure: a population based study[J]. Crit Care, 2005, 9(6): R700-709.
- [5] 陈达, 朱杰, 王斯闻, 等. 依达拉奉对心肺复苏大鼠海马神经元 NGF、BDNF 表达的影响[J]. 中国医学工程, 2009, 17(5): 335-339.
- [6] Serati AR, Motamedi MR, Emami S, et al. L-carnitine treatment in patients with mild diastolic heart failure is associated with improvement in diastolic function and symptoms [J]. Cardiology, 2010, 116(3): 178-182.
- [7] Rosenthal RE, Bogaert YE, Fiskum G. Delayed therapy of experimental global cerebral ischemia with acetyl-L-carnitine in dogs [J]. Neurosci Lett, 2005, 378(2): 82-87.
- [8] Chapela SP, Krieger N, Fernandez EH, et al. Involvement of L-carnitine in cellular metabolism: beyond Acyl-CoA transport[J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(13): 1518-1526.
- [9] 陈晓辉, 张弋, 江慧琳, 等. 纳洛酮对心肺复苏后犬肺组织炎症因子水平及其 mRNA 表达的影响[J]. 中华急诊医学, 2004, 13(4): 239-241.
- [10] Suharti C, Van Gorp EC, Setiati TE, et al. The role of cytokines in activation of coagulation and fibrinolysis in dengue shock syndrome. [J]. Thromb Haemost, 2002, 87(1): 42-46.

收稿日期: 2011-07-28 责任编辑: 许维洲