

左卡尼汀强化 St.Thomas No.2 液对离体心脏的长时间保存效果

周涛¹, 向道康¹, 秦国伟²

(1.贵州省人民医院心血管外科, 贵州 贵阳 550002; 2.广西壮族自治区人民医院心电图诊断科)

摘要:目的 探讨加入左卡尼汀 (LCN) 的 St.Thomas No.2 液对大鼠离体心脏长时间冷保存的效果及其机制。方法 利用 Langendorff 灌注装置建立离体大鼠心脏灌注和工作模型, SD 大鼠 24 只随机分成 3 组, 每组 8 只, 对照组采用 St. Thomas No.2 液作为心脏停搏液并作为保存液保存离体心脏 7 h, LCN1 组、LCN2 组采用 St.Thomas No.2 液分别添加 6 g/L、12 g/L 左卡尼汀作为心脏停搏液并作为保存液保存离体心脏 7 h, 观察各组离体心脏保存前及保存后再灌注后心功能情况, 比较心功能恢复率、心脏复跳时间、心肌含水量及心肌组织匀浆丙二醛的变化。结果 各组心脏保存 7 h 后均能成功复跳; 3 组之间心脏复跳时间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 心功能指标以 LCN2 组最好, LCN1 组次之, 对照组最差 ($P < 0.05$); 3 组心肌含水量比较, 对照组含水量最高, LCN1 组次之, LCN2 组最低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。丙二醛以对照组最高 ($P < 0.05$), LCN1 组、LCN2 组比较差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 左卡尼汀可以强化 St.Thomas No.2 液长时间冷保存大鼠离体心脏的保存效果, 此效果与左卡尼汀减轻心肌缺血再灌注损伤有关。

关键词: 左卡尼汀; 心麻痹液; 器官保存液; 心脏移植

中图分类号: R617 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2013)01-0114-03

Protective effects of St. Thomas No.2 solution supplemented with L-carnitine on prolonged hypothermic preservative isolated rat heart

ZHOU Tao*, XIANG Dao-kang, QIN Guo-wei.

*Department of Cardiac Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China

Abstract: **OBJECTIVE** To observe the protective effects of St. Thomas No.2 solution supplemented with L-carnitine (LCN) on prolonged hypothermic preservative rat heart. **METHODS** Isolated rat heart Langendorff model and working model were established. Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomized divided into three groups (8 rats in each group): Control group (the hearts were arrested with 4°C St. Thomas No.2 solution and preserved in the same solution for 7 h), LCN1 and LCN2 group (cardioplegic solutions and organ preservation solutions were 4°C St. Thomas No.2 solution supplemented with LCN 6g/L or 12g/L for 7 h). The isolated hearts were perfused in the Langendorff perfusion apparatus for the left ventricular functional evaluation before and after preservation. The recovery of myocardial function, malondialdehyde (MDA) and wet weights in myocardium were analyzed. **RESULTS** After the hearts were preserved for 7 h, there were no differences in the time for heart resuscitation in the three groups, but LCN2 group showed the best recovery of myocardial function, the lowest release of MDA, and the lest wet weights in myocardium in the three groups ($P < 0.05$). **CONCLUSION** St. Thomas No.2 solution supplemented with L-carnitine provides better myocardial protective effects over purely cardioplegic solutions for the prolonged hypothermic preservative isolated rat heart.

Key words: L-carnitine; Cardioplegic solutions; Organ preservation solutions; Heart transplantation

人类器官移植的研究最先从心脏移植起步, 自 Barnard 进行首例人类心脏移植以来, 心脏移植手术逐渐成为治疗各种终末期心脏疾病的有效手段^[1,2], 供心保存的时限与质量是提高手术成功率和改善远期生存率的关键所在^[3], 供心保存液的研究一直是心脏移植关注的热点。卡尼汀是细胞能量代谢的重要调节因子, 可作为长链脂肪酸进入线粒体进行氧化所必需的物质, 对心肌代谢途径的调节具有非常重要的作用。我们早期的研究表明^[4]使用含左卡尼汀的心脏停搏液可减轻心肌线粒体的

脂质过氧化反应, 对心肌细胞有较好的保护作用; 我们的进一步研究提示^[5]添加左卡尼汀的心脏保存液可以减轻冷保存大鼠心肌线粒体的钙超载, 改善心肌的能量代谢。现利用 Langendorff 灌注装置建立大鼠离体心脏灌注和工作模型, 进一步探讨左卡尼汀对 St.Thomas No.2 液长时间冷保存大鼠供心保存效果的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型的建立

健康成年 Sprague-Dawley 大鼠 24 只, 雌雄各 12 只, 体重 200~250 g, 由广西医科大学实验动物中心提供 (合格证号: SCXK 桂 2003-0003)。随机分成 3 组, 每组 8 只, 对照组采用

基金项目: 贵州省科技攻关项目 (黔科合 SY [2010] 3119 号)

作者简介: 周涛 (1975-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 体外循环心脏手术与器官保护

通讯作者: 向道康, 教授, 博士, E-mail: xiangdaokang@vip.sina.com

St.Thomas No.2 液作为心脏停搏液并作为保存液保存离体心脏 7 h, LCN1 组、LCN2 组采用 St.Thomas No.2 液分别添加 6 g/L、12 g/L 左卡尼汀 (LCN) 为心脏停搏液并作为保存液保存离体心脏 7 h。

模型建立同文献 [5], 大鼠称重后腹腔注射肝素钠抗凝、乌拉坦麻醉后胸骨正中开胸, 快速摘除心脏置入 4℃ 的 Krebs-Henseleit (K-H) 缓冲液中 (K-H 缓冲液成分 (mmol/L): Na⁺ 118、K⁺ 4.7、Ca²⁺ 1.7、Mg²⁺ 1.2、HCO₃⁻ 25、PO₄⁻ 1.1、Glucose 11.5), 冲洗残留在主动脉内的血液并迅速修剪主动脉根部, 插入主动脉插管, 连接于 Langendorff 装置上, 开胸至开始灌注的过程于 90 s 内完成, K-H 缓冲液以灌注压维持在 90 cm H₂O (1 cm H₂O = 0.098 kPa) 压力、37℃ 恒温灌流进行灌注, 肺动脉根部切开, 使冠状动脉回流液充分引流。K-H 缓冲液使用时新鲜配制, 并经 48 μm 的过滤器过滤, 灌注前给予 95%O₂ 和 5%CO₂ 混合气体按 1.5 L/min 向储液瓶内的灌流液中通气 30 min。平衡 15 min 左右心脏搏动达到稳定状态, 血流动力学平稳后测定血流动力学指标值, 逐渐降低灌注温度至 30℃ 以下, 按分组不同经主动脉根部分别灌注不同的心脏停搏液使心脏停跳 (停搏液温度为 4℃, 剂量 80 ml/kg, 灌注压力 70 cm H₂O, 约 3 min), 取下停跳心脏, 根据分组不同在相应的心脏保存液中分别保存 7 h, 重新开始心脏灌注, 逐渐恢复灌注温度至 37℃, 在灌注恢复 30 min、60 min、90 min 时测定血流动力学指标值, 90 min 后取部分左心室心肌以测定心肌含水量及心肌组织匀浆丙二醛的含量。

1.2 实验仪器与试剂

使用 Langendorff 离体心脏灌流装置, ML870 型 PowerLab 多导生理记录仪为美国 AD Instruments 公司生产, 丙二醛 (MDA) 试剂盒购于南京建成生物工程研究所, 其他试剂均为国产分析纯试剂; 左卡尼汀 (商品名贝康亭) 广州贝氏药业有限公司产品。

1.3 标本采集及指标检测

测定复灌开始至心脏复跳的时间, 记录各时间点心率 (HR)、冠脉流量 (CF)、左心室收缩峰压 (LVSP) 和左心室内压最大上升速率 (+dp/dt max); 计算各项指标的恢复率, 按 (保存后数值/保存前数值) × 100% 计算; 心脏灌注恢复 90 min 后取二块左心室心肌组织, 一块称湿重后放入 100℃ 的烘箱中烘烤, 24 h 后称干重, 按 (湿重-干重)/湿重 × 100% 计算心肌含水量, 另一块心肌放入冻存管, -80℃ 低温冰箱冻存以备检测, 检测时将冻存心肌组织室温下解冻、匀浆, 按照试剂盒说明书使用硫代巴比妥法测定丙二醛含量。

1.4 统计学分析

使用 SPSS11.5 软件系统进行统计学处理, 计量数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏复跳时间比较

各组离体心脏保存 7 h 后均能成功复跳, 对照组、LCN1 组和 LCN2 组复跳时间依次为 (79.24 ± 11.37) s、(75.57 ± 10.78) s 和 (73.23 ± 12.72) s, 见表 1, 3 组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 心肌含水量及丙二醛比较

3 组心肌含水量比较, 对照组含水量最高, LCN1 组次之, LCN2 最低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

3 组间丙二醛以对照组最高 ($P < 0.05$); LCN1 组、LCN2 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组离体心脏冷保存后心脏复跳时间、心肌含水量和丙二醛的比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	心脏复跳时间 (s)	心肌含水量 (%)	丙二醛 (nmol/mg)
对照组	79.24 ± 11.37	82.25 ± 8.17	3.23 ± 0.21
LCN1 组	75.57 ± 10.78	74.87 ± 6.48 ^a	2.54 ± 0.19 ^a
LCN2 组	73.23 ± 12.72	70.33 ± 7.38 ^{ab}	2.41 ± 0.22 ^a

注: 与对照组^a $P < 0.05$; 与 LCN1 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 心功能指标的变化

各组离体心脏恢复灌注 30 min、60 min、90 min 时 HR、CF、LVSP 和 +dp/dt max 恢复率见表 2。

心脏灌注 30 min 时: LCN1 组 HR 恢复率较对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), CF、LVSP 和 +dp/dt max 恢复率与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LCN2 组和 LCN1 组间比较 HR 恢复率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), CF、LVSP 和 +dp/dt max 恢复率均较 LCN1 组和对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

心脏灌注 60 min 时: LCN1 组 LVSP 和 +dp/dt max 恢复率恢复率较对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), HR、CF 与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LCN2 组 HR、CF、LVSP 和 +dp/dt max 恢复率均较 LCN1 组和对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

心脏灌注 90 min 时: LCN1 组 +dp/dt max 恢复率较对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), HR、CF 和 LVSP 恢复率与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LCN2 组 HR、CF、LVSP 和 +dp/dt max 恢复率均较 LCN1 组和对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

供体心脏的保护效果与心脏移植术后近期疗效、远期存活率密切相关, 器官保存液对于供体的保护作用至关重要, 目前关于供体心脏保护液的类型及灌注方法的选择, 国内外没有统一的标准, 目前使用较多的是 HTK、UW 液, 其中 HTK 液是欧洲应用最广泛的器官保存液^[6], St.Thomas No.2 液是目前临床运用最广泛也是最为经典的晶体心脏停搏液, 在心脏移植的研究和临床上也有一席之地^[7,8], 因此本研究使用 St.Thomas 液进行研究。目前大多数心脏保存液不含能量底物, 通常情况下不适于长时间的器官保存^[9], 因此各种器官保存液对器官保存的安全时间均有一定的限制, 我们设想在 St.Thomas No.2 液基础上添加参与能量代谢的左卡尼汀, 拟通过观察添加左卡尼汀对大鼠离体心脏低温保存的效果, 探讨左卡尼汀可否改善 St.Thomas No.2 液对器官的保存作用, 尤其是对长时间保存器官效果的影响。

结果显示, 添加左卡尼汀的心脏保存液可明显加快冷保存后心脏 HR、CF、LVSP 和 +dp/dt max 等指标的恢复, 改善心脏功能, 减少心肌含水量, 表明在传统的 St.Thomas No.2 液配方中加入左卡尼汀后, 心肌结构和心脏功能可以得到更好的保护, 表明对离体心脏有更好的保存效果。

低温保存仍是目前最常用和最简便的移植心脏保存方法, 但其临床安全期限一般为 4~6 h, 开展长时间冷保存供心的研究对于供体短缺的今天有着现实意义, 因此我们实验时设定保存离体心脏的时限为 7 h。目前认为心肌缺血再灌注损伤过程是一种代谢失衡, 心肌能量代谢发生障碍是心肌缺血再灌注损伤的重要因素。左卡尼汀是人体能量代谢中必需的天然物质, 可以通过增加能量的产生而提高缺血缺氧组织的耐受能力。研

表 2 各组离体心脏冷保存后心功能指标的恢复率比较 ($n=8, \bar{x} \pm s, \times 10^{-2}$)

组别	灌注恢复时间 (min)	HR (%)	CF (%)	LVSP (%)	+dp/dt max (%)
对照组	30	72.65 ± 8.13	80.12 ± 8.30	74.24 ± 6.65	80.32 ± 9.56
	60	81.32 ± 7.31	84.21 ± 7.09	81.78 ± 5.32	81.36 ± 8.16
	90	90.43 ± 5.21	91.24 ± 9.31	90.31 ± 7.27	90.76 ± 5.12
LCN1 组	30	78.24 ± 4.72 ^a	79.35 ± 5.76	76.32 ± 5.91	81.33 ± 7.51
	60	82.58 ± 3.36	86.76 ± 6.22	84.38 ± 4.62 ^a	85.48 ± 4.62 ^a
	90	91.49 ± 5.32	93.48 ± 4.42	91.73 ± 6.02	93.79 ± 5.19 ^a
LCN2 组	30	80.03 ± 6.79 ^a	86.46 ± 7.03 ^{ab}	80.69 ± 7.09 ^{ab}	85.32 ± 9.70 ^b
	60	91.24 ± 5.57 ^{ab}	90.09 ± 6.41 ^{ab}	89.80 ± 6.21 ^{ab}	92.68 ± 8.39 ^b
	90	94.75 ± 6.39 ^{ab}	96.86 ± 6.79 ^{ab}	95.68 ± 5.54 ^{ab}	97.89 ± 7.38 ^b

注: 与对照组比较^a $P < 0.05$; 与 LCN1 组比较^b $P < 0.05$ 。

研究表明在体外循环心内直视手术中使用添加左卡尼汀的心脏停搏液可以提供足够量的游离卡尼汀, 促进线粒体呼吸功能的恢复, 改善组织缺血再灌注时的能量代谢障碍, 优化心肌细胞能量代谢, 减少缺血再灌注作用, 有助于减轻心肌细胞的损伤, 促进心功能恢复^[4]; 我们先前研究^[5]表明左卡尼汀添加至 St. Thomas No.2 液可减轻长时间冷保存心肌线粒体钙超载, 改善心肌能量代谢, 对心肌细胞线粒体有较好的保护作用, 有助于长时间冷保存大鼠离体心脏能量代谢平衡的维持。

丙二醛是氧自由基致脂质过氧化反应的中间代谢产物, 可反映机体脂质过氧化程度, 其水平高低可间接反映细胞受氧自由基攻击的严重程度, 左卡尼汀拮抗了缺血时棕榈酸盐等长链肉碱的毒性作用, 同时本研究表明, 使用添加左卡尼汀的 St. Thomas No.2 液可以使再灌注心脏丙二醛产生减少, 表明左卡尼汀可作为氧自由基清除剂拮抗减轻自由基损伤。

因此左卡尼汀添加至 St. Thomas No.2 液可减轻自由基损伤, 改善心肌能量代谢, 对心肌细胞有较好的保护作用, 有助于改善长时间大鼠离体心脏冷保存效果, 此效果与左卡尼汀剂量有关。

参考文献

[1] Meglathlin D, De Marco T. Transplantation in adults with congenital heart disease [J]. Prog Cardiovasc Dis, 2011, 53 (4): 312-323.

[2] Grapow MT, Carrel TP, Eckstein FS. Surgical treatment options in end-stage heart failure[J]. Ther Umsch, 2011, 68 (2): 95-102.

[3] Goldsmith KA, Demiris N, Gooi JH, et al. Life-years gained by reducing donor heart ischemic times[J]. Transplantation, 2009, 87 (2): 243-248.

[4] 向道康, 阎兴治, 杨世虞, 等. 左-卡尼汀对体外循环心瓣膜替换术患者心肌的保护作用 [J]. 中华医学杂志, 2003, 83 (21): 1887-1890.

[5] 周涛, 向道康, 秦国伟. 左卡尼汀强化 St. Thomas No.2 液对长时间冷保存离体心脏能量代谢的影响 [J]. 中国心血管病研究, 2010, 08 (11): 851-854.

[6] Lee S, Huang CS, Kawamura T, et al. Histidine-tryptophan-ke-toglutamate or celsior; which is more suitable for cold preservation for cardiac grafts from older donors [J]. Ann Thorac Surg, 2011, 91 (3): 755-763.

[7] 黑飞龙, 王仕刚, 于坤, 等. 心脏移植心肌保护策略[J]. 中国体外循环杂志, 2009, 7 (3): 166-168.

[8] 杨克明, 胡盛寿, 郑哲, 等. 总结 69 例心脏移植中供心的心肌保护技术[J]. 中华器官移植杂志, 2007, 28 (12): 705-707.

[9] Faggian G, Forni A, Mazzucco A. Donor organ preservation in high-risk cardiac transplantation [J]. Transplant Proc, 2004, 36 (3): 617-619.

收稿日期: 2011-09-17

(上接第 113 页)

性 IgE 和 IL-4 水平明显低于对照组, 且降低水平与给药时间呈正关^[5]。激发后, CRFC-1 组肥大细胞脱颗粒率及血清组胺水平明显降低。因此, 我们推测复方中药 CRFC-1 在动物模型中拮抗花生过敏, 可能是通过抑制 Th2 型细胞因子 (IL-4) 和肥大细胞功能来实现^[6-8]。

总之, 复方中药 CRFC-1 可以在小鼠花生过敏动物模型中阻断花生过敏原诱发的食物变态反应, 其机制与特异性 IgE、Th2 型细胞因子 (IL-4)、肥大细胞脱颗粒及生物介质 (组胺) 的变化有关。该复方对人类花生过敏的治疗效果有待进一步研究。

参考文献

[1] Eigenmann PA. Food allergy: a long way to safe processed foods [J]. Allergy, 2001, 56 (12): 1112-1113.

[2] 刘文忠, 韩跃华. 食物变态反应[J]. 国外医学·消化系疾病分册,

2003, 23 (1): 3-6.

[3] Sicherer SH, Muñoz-Furlong A, Sampson HA. Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study[J]. J Allergy Clin Immunol, 2003, 112 (6): 1203-1207.

[4] Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods [J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 107 (1): 191-193.

[5] 徐强, 赵红, 王蓉. 数种中药对迟发型变态反应的影响[J]. 中药药理与临床, 1993, 5 (4): 30-33.

[6] 么雅娟, 李云, 刘艳丽, 等. 葛根汤抗过敏药理作用的实验研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 1995, 12 (4): 283-286.

[7] 刘守义, 王义明. 抗敏灵抗过敏作用的实验研究 [J]. 中成药, 1992, 14 (1): 31-32.

[8] 何卫华, 杨锁泉. 中药治疗变态反应性疾病研究进展[J]. 海军医学杂志, 2007, 28 (2): 181-183.

收稿日期: 2011-08-30