

· 论 著 ·

甘氨酸对烧伤大鼠心肌细胞能量代谢的影响*

李 腾¹, 彭 靖¹, 吕尚军², 吴 炜², 张 勇², 徐淑秀^{1△}, 彭 曦^{2▲}

(1. 蚌埠医学院护理系, 安徽蚌埠 233030; 2. 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨甘氨酸对烧伤后大鼠心肌细胞能量代谢的影响。方法 将 72 只 Wistar 大鼠随机分成正常对照组(C 组)、烧伤对照组(B 组)、甘氨酸组(Gly 组)。B、Gly 组建立 30% 体表面积Ⅲ度烧伤大鼠模型, 观察伤前及烧伤后 12、24、48、72 h 大鼠心肌细胞能量代谢的变化, 同时检测伤后高能磷酸化合物(AMP、ADP 和 ATP)、血乳酸和谷胱甘肽(GSH)的水平。结果 烧伤大鼠心肌能量代谢发生障碍, 与 C 组相比, B 组和 Gly 组大鼠心肌 ATP 及 GSH 水平大幅下降($P < 0.01$), 而 AMP、ADP、血乳酸水平则大幅上升($P < 0.01$); Gly 组大鼠心肌 ATP、GSH 下降以及 AMP、ADP、血乳酸上升幅度均明显低于 B 组($P < 0.01$)。结论 甘氨酸能改善烧伤后心肌有氧代谢, 减少乳酸生成, 有效降低烧伤后心肌受损程度, 具有很好的心肌保护作用。

关键词:甘氨酸; 心肌; 烧伤; 能量代谢; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.33.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)33-3476-03

Effects of glycine on energy metabolism of myocardium after burn injury*

Li Teng¹, Peng Jing¹, Lv Shangjun², Wu Wei², Zhang Yong², Xu Shuxiu^{1△}, Peng Xi^{2▲}

(Department of Nursing, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030, China; 2. Institute of Burn Research, Southwestern Hospital, State key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To discuss the effects of glycine on energy metabolism of myocardium after burn injury. **Methods** The rat model of 30% body surface area third degree burn was adopted. 72 Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control(C), burn control(B) and glycine treatment(Gly) groups. Resting energy metabolism of myocardium, the level of high-energy phosphate compound(AMP, ADP, ATP), lactic acid and glutathione(GSH) were determined before burn and on post-burn 12, 24, 48, 72 hours. **Results** After burn injury, energy metabolism of myocardium had notable disorder. Compared with group C, the levels of ATP and GSH in group B and Gly were obviously decreased($P < 0.01$), while the levels of AMP, ADP and lactic acid were significantly increased($P < 0.01$). Both the declining range of ATP, GSH and the rising range of AMP, ADP and lactic acid in group Gly were remarkably lower than those in group B($P < 0.01$). **Conclusion** Glycine administration could improve aerobic metabolism of myocardium after burn injury, reduce the count of lactic acid, abate the degree of cardiac injury after burn injury, and possess protection of myocardium.

Key words: glycine; myocardium; burns; energy metabolism; rats

在严重烧伤或心肌缺血、缺氧时, 心脏作为全身血液循环的动力器官, 心肌的损伤和功能减退必将进一步加重全身的缺血、缺氧, 造成有氧代谢障碍, 乳酸代谢产物堆集, 产生大量活性自由基, 从而导致细胞损伤, 形成恶性循环。为此, 针对心肌能量代谢障碍的治疗是减轻烧伤后心肌损害的重要措施。近年来研究发现, 游离的甘氨酸具有显著的组织、细胞保护作用^[1]。它通过激活突触后膜上的甘氨酸受体来发挥作用, 甘氨酸与其受体结合后, 导致心肌细胞膜去极化明显减轻, 使细胞膜电压依赖性钙离子通道开放减少, 钙离子内流减少, 从而起到细胞保护作用^[2-4]。但鲜见甘氨酸对烧伤后心肌能量代谢影响的报道。本研究拟观察甘氨酸对烧伤大鼠心肌能量代谢的影响, 以及为临床合理使用甘氨酸奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 动物模型

1.1.1 烧伤模型的制作及分组 健康成年 Wistar 大鼠 72 只, 体质量(210±20)g, 雌雄不拘(由第三军医大学实验动物中

心提供)。随即分成 3 组, 正常对照组(C 组)、烧伤对照组(B 组)、甘氨酸组(Gly 组)。C 组 8 只大鼠, 其他各组每个时相点各 8 只大鼠。C 组大鼠不予烧伤, 其他 2 组大鼠烧伤前禁食 12 h, 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 背部电推剃毛后 8% 硫化钠脱毛, 3% 固体汽油烧伤 15 s。伤后立即腹腔注射 50 mL/kg 的乳酸林格氏液抗休克。创面涂 2% 聚维酮碘抗感染, 每天 2 次, 伤后给予标准动物颗粒饲料喂养, 自由饮水。

1.1.2 时相设置和给药剂量 实验分烧伤后 12、24、48、72 h 4 个时相点。伤后 Gly 组腹腔注射给予甘氨酸(0.5 g · kg⁻¹ · d⁻¹), B 组腹腔注射等体积生理盐水。

1.2 检测指标

1.2.1 心肌组织高能磷酸化合物的检测 取左心室立即用在液氮中预冷的金属夹板将心肌组织夹成冷冻薄片, 迅速称取 100 mg 心肌组织, 加入预冷的 0.42 mol/L 高氯酸制成匀浆, 再加入 1 mol/L 氢氧化钾中和, 然后用超声波细胞粉碎器将线粒体膜打碎, 使能量物质全部释放于溶液中(以上操作过程均

在冰水中进行)。然后 3 000 r/min 离心 15 min, 上清液用 0.2 μm 微孔滤膜过滤, 取 10 L 滤液 HPLC 上柱分析 AMP、ADP、ATP。蛋白浓度的测定方法及步骤同前。能荷 (energy charge, EC) = (ATP+1/2ADP) ÷ (ATP+ADP+AMP)。

1.2.2 心肌组织谷胱甘肽(GSH)的检测 断颈处死大鼠, 立即剖胸取出心脏, 剪取右心室心尖区部位组织, 匀浆。按试剂盒说明书操作, 比色法测定 GSH 水平。GSH 水平 (mg/g) = (测定管吸光度值 - 空白管吸光度值) ÷ (标准管吸光度值 - 空白管吸光度值) × 标准管浓度 (0.5 mmol/L) × GSH 相对分子质量 ÷ 组织蛋白水平 (g/L)。其中组织蛋白水平测定参照 BCA 法。

1.2.3 全血乳酸变化的检测 各组各时相点麻醉大鼠从插管导管中取血, 每组取 0.1 mL 置入抗凝管中并加入 0.6 mL 蛋白沉淀剂, 轻轻颠倒混匀, 静置 10 min 后, 3 500~4 000 r/min 离心 8 min, 取上清液进行测定。按照说明书提供的操作方法, 测定全血乳酸的水平。乳酸水平 (mmol/L) = (测定管吸光度值 - 空白管吸光度值) ÷ (标准管吸光度值 - 空白管吸光度值) × 标准浓度 × 样本稀释倍数 (标准浓度 = 3 mmol/L, 样本

稀释倍数 = 7 倍)。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用多因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组大鼠心肌组织高能磷酸化合物(AMP、ADP 和 ATP)水平的变化情况 B、Gly 组心肌组织中的 ATP 和 EC 均开始下降, 相同时相点明显低于 C 组 ($P < 0.01$); AMP 和 ADP 在烧伤后均上升, 相同时相点明显高于 C 组 ($P < 0.01$); Gly 组各项指标于相同时相点较 B 组变化程度小, Gly 组于 12 h 作用明显 ($P < 0.05$), 见表 1~4。

2.2 3 组大鼠心肌组织 GSH 水平的变化情况 烧伤后 GSH 迅速消耗, B 组随时相持续下降, 72 h 达最低 ($P < 0.01$); Gly 组 GSH 的下降程度明显缓慢 ($P < 0.05$), 见表 5。

2.3 3 组大鼠心肌组织全血乳酸水平的变化情况 烧伤后全血乳酸迅速上升, 24 h 达最高, 随即开始下降 ($P < 0.01$); Gly 组随时相持续上升, 24 h 达最高, 水平低于同时相 B 组 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 1 3 组大鼠不同时相点烧伤后 AMP 水平的变化 ($\mu\text{mol/g}, \bar{x} \pm s, n=8$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
B 组	—	0.98 ± 0.08 ^a	0.89 ± 0.01 ^a	0.90 ± 0.06 ^a	0.81 ± 0.08 ^a
Gly 组	—	1.11 ± 0.05 ^{ac}	0.97 ± 0.03 ^{ab}	0.99 ± 0.08 ^{ac}	0.90 ± 0.04 ^{ac}
C 组	0.81 ± 0.05	—	—	—	—

—: 表示无数据; ^a: $P < 0.01$, 与 C 组比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与 B 组同时相点比较。

表 2 3 组大鼠不同时相点烧伤后 ADP 水平的变化 ($\mu\text{mol/g}, \bar{x} \pm s, n=8$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
B 组	—	0.66 ± 0.64 ^a	0.55 ± 0.49 ^a	0.48 ± 0.29	0.47 ± 0.27
Gly 组	—	0.63 ± 0.68 ^{ab}	0.61 ± 0.59 ^{ab}	0.58 ± 0.44 ^{ac}	0.53 ± 0.38 ^{ac}
C 组	0.43 ± 0.27	—	—	—	—

—: 表示无数据; ^a: $P < 0.01$, 与 C 组比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与 B 组同时相点比较。

表 3 3 组大鼠不同时相点烧伤后 ATP 水平的变化 ($\mu\text{mol/g}, \bar{x} \pm s, n=8$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
B 组	—	2.28 ± 0.25 ^a	2.04 ± 0.07 ^a	1.79 ± 0.07 ^a	1.71 ± 0.14 ^a
Gly 组	—	2.46 ± 0.29 ^{ab}	2.39 ± 0.08 ^{ab}	2.11 ± 0.10 ^{ac}	2.07 ± 0.10 ^{ac}
C 组	2.53 ± 0.24	—	—	—	—

—: 表示无数据; ^a: $P < 0.01$, 与 C 组比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与 B 组同时相点比较。

表 4 3 组大鼠不同时相点烧伤后 EC 水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
B 组	—	0.52 ± 0.04 ^a	0.43 ± 0.02 ^a	0.18 ± 0.01 ^a	0.33 ± 0.04 ^a
Gly 组	—	0.48 ± 0.05 ^{ab}	0.50 ± 0.02 ^{ac}	0.40 ± 0.04 ^{ac}	0.42 ± 0.02 ^{ac}
C 组	0.55 ± 0.04	—	—	—	—

—: 表示无数据; ^a: $P < 0.01$, 与 C 组比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与 B 组同时相点比较。

表 5 3 组大鼠不同时相点烧伤后 GSH 水平的变化 ($\mu\text{mol/g}, \bar{x} \pm s, n=8$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
B 组	—	60.50 ± 4.20 ^a	57.80 ± 0.48 ^a	54.90 ± 2.20 ^a	54.90 ± 2.20 ^a
Gly 组	—	66.80 ± 7.95 ^{ab}	66.70 ± 0.90 ^{ab}	58.90 ± 1.23 ^{ac}	58.40 ± 0.71 ^{ab}
C 组	72.30 ± 3.40	—	—	—	—

—: 表示无数据; ^a: $P < 0.01$, 与 C 组比较; ^b: $P < 0.05$; ^c: $P < 0.01$, 与 B 组同时相点比较。

表 6 3 组大鼠不同时相点烧伤后全血乳酸水平的变化 ($\mu\text{mol/g}$, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
B 组	—	5.73 \pm 0.26 ^a	6.22 \pm 0.32 ^a	5.81 \pm 0.29 ^a	5.31 \pm 0.43 ^a
Gly 组	—	5.24 \pm 0.29 ^{ac}	5.71 \pm 0.18 ^{ab}	5.45 \pm 0.30 ^{ac}	5.28 \pm 0.36 ^a
C 组	4.40 \pm 0.21	—	—	—	—

—:表示无数据;^a: $P<0.01$,与 C 组比较;^b: $P<0.05$,^c: $P<0.01$,与 B 组同时相点比较。

3 讨 论

心肌缺血、缺氧性损伤常导致细胞能量代谢障碍,不仅可引起心肌细胞内环境紊乱,还能引起心肌收缩能力下降^[5-6]。烧伤早期存在心肌缺血、缺氧性损伤,导致心功能不全,还可诱发或加重休克,以及全身其他组织器官的缺血、缺氧损伤和炎症反应^[7-8]。故改善烧伤早期心肌能量代谢障碍逐渐成为研究热点。严重烧伤后,心肌血液灌注不足,使心肌细胞缺氧、缺乏能量底物和氧化磷酸化过程中所需的各种基质,线粒体内有氧化过程障碍,结果使 ATP 生成减少,导致心肌组织中高能磷酸化合物水平下降。实验结果表明,烧伤后心肌组织 ATP 水平和 EC 均明显低于伤前,并呈现进行性下降的趋势,伤后 72 h 降至谷底。甘氨酸在体内不是直接的能源物质,在心肌细胞内也不参与转氨基作用,但可作为一碳单位的来源参与能量代谢过程。因此,烧伤后及时给予作为机体能量代谢重要底物的甘氨酸对改善心肌细胞能量代谢具有重要意义。

甘氨酸能改善心肌细胞能量合成方式。烧伤后心肌组织营养血供大幅降低,导致细胞处于缺氧状态,此时细胞能量代谢以有氧代谢为主转为以无氧酵解为主。无氧酵解时,能量底物利用率大幅下降。尽管无氧酵解在短时间内提供一定量的 ATP,但如果细胞长时间处于无氧酵解状态,不仅无法满足细胞的能量需求,还会由于代谢产物乳酸的堆积,造成细胞进一步损伤。实验结果显示,烧伤后血乳酸水平迅速上升,24 h 即达峰值,但明显低于 B 组,说明烧伤后机体能量代谢中无氧酵解迅速增加,能量合成障碍。给予甘氨酸后乳酸峰值仍出现在 24 h,但明显低于 B 组,同时 ATP 明显增加,提示使用甘氨酸后能改善机体能量合成方式,降低对无氧酵解的依赖,纠正乳酸堆积,增加能量合成。

烧伤后由于心肌血流灌注不足导致心肌缺血、缺氧,再灌注时心肌组织产生大量的活性自由基可以直接攻击线粒体蛋白巯基,影响线粒体氧化代谢的 3 个关键酶及电子传递链中酶的活性,导致烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)减少,ATP 合成障碍^[9]。GSH 是机体重要的自由基清除剂,它是由 γ -羧基与半胱氨酸及甘氨酸在体内合成的三肽,甘氨酸是其组成成分之一。实验结果显示,烧伤后心肌组织中 GSH 水平迅速下降,说明烧伤后 GSH 合成减少或生成的大量自由基导致 GSH 耗竭。给予甘氨酸,心肌组织 GSH 下降程度明显低于 B 组。在烧伤后 12、24 h 与伤前差异无统计学意义。GSH 对自由基的清除减轻了线粒体脂质过氧化损伤,维护了细胞正常的代谢功能^[10]。

综上所述,甘氨酸能够作为一碳单位的来源参与能量代谢过程,改善能量合成方式,促进抗氧化物质 GSH 的合成,减少自由基的产生,纠正乳酸堆积,减轻细胞损伤。其还能维护心肌细胞线粒体膜稳定性,减轻多种致伤因素导致的心肌损

害^[11],但甘氨酸改善烧伤后心肌细胞能量代谢的作用机制还需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 周军利,黄跃生,党永明,等.甘氨酸对缺血缺氧心肌细胞能量代谢的影响[J].现代生物医学进展,2008,8(6):1093-1095.
- [2] 陈楚天,陆大祥,戚仁斌,等.损害性因素对乳鼠心肌细胞甘氨酸受体 $\alpha 1$ 亚基表达的影响[J].中国病理生理杂志,2008,24(5):843-848.
- [3] Qi RB,Zhang JY,Lu DX,et al. Glycine receptors contribute to cytoprotection of glycine in myocardial cells[J]. Chin Med J(Engl),2007,120(10):915-921.
- [4] Kuzumoto M,Takeuehi A,NakaiH,et al. Simulation analysis of Intracellular Na^+ and Cl^+ homeostasis during betal adrenergic stimulation of cardiac myocyte[J]. Prog Biophys Mol Biol,2008,96(1/2/3):171-186.
- [5] Miller RR Jr, Hay CM, Striegnitz TR, et al. Exogenous glycine partially attenuates homocysteine induced apoptosis and membrane peroxidation in chick embryos[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol,2006,144(1):25-33.
- [6] 盛净,陆平.心肌能量代谢治疗与老年缺血性心脏病[J].老年医学与保健,2012,18(1):8-12.
- [7] 黄跃生.烧伤后早期心肌损害与防治[J].中华烧伤杂志,2008,24(5):369-371.
- [8] Kodde IF,van der Stok J,Smolenski RT,et al. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol,2007,146(1):26-39.
- [9] Lee HL,Chen CL,Yeh ST,et al. Biphasic modulation of the mitochondrial electron transport chain in myocardial ischemia and reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2012,302(7):1410-1422.
- [10] Li S,Zheng MQ,Rozanski GJ. Glutathione homeostasis in ventricular myocytes from rat hearts with chronic myocardial infarction[J]. Exp Physiol,2009,94(7):815-824.
- [11] 陈梦飞,陆大祥,戚仁斌,等.甘氨酸脂质体对心肌细胞线粒体膜电位及凋亡的影响[J].中国病理生理杂志,2008,24(7):1254-1258.