

• 临床研究 •

左旋卡尼汀对体外循环下心肌缺血-再灌注损伤的保护效应及机制探讨

涂 杰, 刘国锋, 韦秋英, 李 涛, 何 芳, 张炳东[△]

(广西医科大学第一附属医院心血管病研究所手术麻醉室, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨左旋卡尼汀(LCN)预处理对体外循环下心肌缺血-再灌注损伤的保护作用及其机制。方法 择期行体外循环下心脏瓣膜置换术患者 60 例, 性别不限, 年龄 25~57 岁, 美国麻醉师(ASA)分级Ⅱ或Ⅲ级, 美国纽约心脏病学会(NYHA)分级Ⅱ或Ⅲ级, 随机平均分为 2 组: C 组(生理盐水作对照)和 L 组(左旋卡尼汀预处理)。L 组于术前 7 d 起, 静脉滴注 LCN 50 mg/kg, 每天 1 次, 直至手术当日; C 组给予等容量生理盐水。于麻醉诱导后 5 min(T₀, 基础状态)、主动脉阻断前 5 min(T₁)、主动脉开放后 30 min(T₂)、术后 6 h(T₃)、12 h(T₄)和 24 h(T₅)取颈内静脉血测定心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平; 于主动脉阻断前和开放后, 取右心房部分心肌组织, 观察心肌细胞病理结构, 并用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测心肌 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)及其磷酸化蛋白的表达; 于术前 1 d 和术后 7 d 行心脏彩超测定患者心脏指数(CI)和左室射血分数(LVEF)。结果 与 C 组比较, L 组主动脉开放后各时点 cTnI、CK-MB 和 TNF- α 水平降低($P<0.05$), 心肌细胞线粒体损伤较轻, p38MAPK 及其磷酸化蛋白的表达减弱($P<0.05$)。术后第 7 天 L 组 CI 和 LVEF 均高于 C 组($P<0.05$)。结论 LCN 预处理可减轻体外循环心肌缺血-再灌注损伤, 利于心功能的恢复, 其机制可能与保持线粒体膜和空间结构的完整性, 下调 p38MAPK 及其磷酸化蛋白的表达, 并抑制炎症反应有关。

关键词: 左旋卡尼汀; 预处理; 缺血再灌注损伤; 体外循环

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.34.014

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)34-4141-04

Protective effects and mechanism of levocarnitine preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in patients undergoing cardiopulmonary bypass

Tu Jie, Liu Guofeng, Wei Qiuying, Li Tao, He Fang, Zhang Bingdong[△]

(Department of Anesthesiology, Institute of Cardiovascular Disease, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To evaluate the protective effects and mechanism of levocarnitine preconditioning(LCN) on myocardial ischemia-reperfusion injury in patients undergoing cardiopulmonary bypass. **Methods** 60 cases of ASA Ⅱ or Ⅲ degree and NYHA Ⅱ or Ⅲ degree patients who aged 25~57 years old, undergoing cardiopulmonary bypass with elective cardiac valve replacement were randomly divided into 2 groups ($n=30$ each): group C (treated with 0.9% sodium chloride) and group L (treated with LCN). Group L was infused levocarnitine 50 mg/kg per 1 day at the beginning of 7 days before operation, group C was given the same amount of 0.9% sodium chloride. Blood samples were taken from central vein at 5 min after the induction the level of anesthesia (T₀, baseline), 5 min before aortic cross-clamping (T₁), 30 min after release of the aortic cross-clamp (T₂) and at 6 (T₃), 12 (T₄) and 24 h (T₅) after operation for determination. The level of plasma cardiac troponin I (cTnI), creatine kinase-MB (CK-MB) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Myocardial specimens were obtained from right auricle before aortic cross-clamping and after release of aortic cross-clamp to observe the pathologic changes, the protein expression of p38 MAPK and phosphorylational-p38 MAPK that analyzed by western blotting. Cardiac index (CI) and left ventricular ejection fraction (LVEF) were measured at 1st day before operation and 7th day after operation by using heart color ultrasonography. **Results** The levels of cTnI, CK-MB and TNF- α were significantly lower at all time points in group L than in group C ($P<0.05$). Myocardial mitochondrion impairment was lighter, the expression of p38 MAPK and phosphorylational-p38 MAPK were significantly attenuated in group L than in group C ($P<0.05$). CI and LVEF were significantly higher at 7th day after operation in group L than in group C ($P<0.05$). **Conclusion** Levocarnitine preconditioning can attenuate myocardial ischemia-reperfusion injury and recover cardiac function in patients undergoing cardiopulmonary bypass, the mechanism may be related to keep the integrity of the mitochondrial membrane and space structures, inhibit the expression of p38 MAPK and phosphorylational-p38 MAPK and decrease the inflammatory response.

Key words: levocarnitine; preconditioning; myocardial ischemia-reperfusion injury; cardiopulmonary bypass

体外循环内直视术中, 由于主动脉的阻断和开放, 可导致心肌缺血-再灌注损伤, 引发术后心律失常或心泵功能衰竭, 严重影响患者心功能的恢复^[1]。左旋卡尼汀(levocarnitine, LCN)是人体能量代谢中必需的天然物质, 通过转移长链脂肪

酸进入线粒体进行 β -氧化, 为心肌细胞活动提供能量^[2]。大量文献报道用 LCN 治疗成人心力衰竭、缺血缺氧性心肌损伤等心脏疾病取得良好疗效^[3-4], Mazzini 等^[5]也报道在心脏手术前禁食, 会造成卡尼汀缺乏, 易发生缺血-再灌注后恶性心律失常

常,增加手术风险。那么,在心内直视术前给予 LCN 预处理,能否减轻心肌缺血-再灌注损伤,促进再灌注后心功能恢复,本研究拟对此进一步探讨,为临床应用提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2011 年 3 月至 2012 年 6 月,在本院心胸外科择期行体外循环下心脏瓣膜置换术的患者 60 例,其中,男 34 例,女 26 例,年龄 25~57 岁,美国麻醉师(ASA)分级Ⅱ或Ⅲ级,美国纽约心脏病学会(NYHA)分级Ⅱ或Ⅲ级,其中,年龄大于 50 岁入选病例术前均行冠状动脉造影以排除冠心病。所有患者均为首次心脏手术,均无高血压病、冠心病及糖尿病的病史,肝、肾功能未见异常,术前 2 周未用激素、抗凝及抗血小板药物,术前 7 d 内未使用除 LCN 外的其他营养心机的药物。两组患者年龄、性别、体质量等一般资料差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究已获本院医学伦理委员会批准,患者及家属均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 预处理方法 采用随机数字表法,将 60 例患者随机分为 2 组:C 组(生理盐水作对照)和 L 组(左旋卡尼汀预处理),每组 30 例。L 组从术前 7 d 开始给予 LCN(常州兰陵制药有限公司;国药准字:H20000543;产品批号:1008182),用药方案为:LCN 50 mg/kg 用 0.9%生理盐水稀释至 100 mL,静脉滴注,每天 1 次,共 7 d。C 组同期给予 100 mL 生理盐水,静脉滴注,每天 1 次,共 7 d。两组其余处理方式相同。

1.2.2 麻醉与体外循环方法 术前禁饮 4 h,禁食 8 h,无术前用药。入室后面罩吸氧,常规监测心电图,无创动脉血压和血氧饱和度。开放外周静脉通路,局麻下行左侧桡动脉穿刺置管,监测有创血压,右侧颈内静脉穿刺置管,监测中心静脉压和采集血样。麻醉诱导和维持方法同文献[6]。体外循环采用 Stockert-ST Ⅲ型体外循环机(Maquet 公司,德国)和 Dideco 膜式氧合器(Sorin 公司,意大利),体外循环方法同文献[6]。

1.3 项目观察与指标测定 (1)于麻醉诱导后 5 min(T0,基础状态)、主动脉阻断前 5 min(T1)、主动脉开放后 30 min(T2)、术后 6 h(T3)、12 h(T4)和 24 h(T5)时采集颈内静脉血,离心,取上清液,置-80℃冰箱保存。用全自动生化分析仪(HITACHI,日本)检测心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)和肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB);用酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测血浆肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)。(2)分别于主动脉阻断前和开放后,取右心房部分组织标本,分

成 3 份,第 1 份心肌立即置入 10%甲醛液浸泡,备光镜下观察心肌显微结构;第 2 份心肌立即置入 3%戊二醛液浸泡,备透射电镜下观察心肌超微结构。(3)第 3 份心肌标本,立即用液氮冷冻后-80℃保存。采用蛋白免疫印迹法(Western blotting)法检测 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activation protein kinases, p38MAPK)及其磷酸化蛋白的表达。(4)采用彩色多普勒超声仪(Philips,美国),由本院心脏彩超室专人按常规方法,分别在术前 1 d 和术后 7 d 作心脏彩超测定患者的心脏指数(cardiac index, CI)和左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。(5)记录所有患者用药过程中的不良反应,并对药物的可能不良事件进行客观的分析和评价。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用成组 t 检验,组内比较采用重复测量设计的方差分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者手术情况的比较 两组患者术后血常规,心电图,胸片,心脏彩超等复查后,均达到治愈标准,顺利康复出院。两组患者手术情况各指标差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1~3。

2.2 两组患者不同时光镜下心肌组织病理结构变化的比较 术前两组心肌组织形态结构基本正常,心肌纤维排列紧密,少见炎症细胞;术后 C 组心肌细胞排列紊乱,混浊肿胀,横纹消失,可见大量淋巴细胞、中性粒细胞等炎症细胞游出,间质出血,较多红细胞漏出。L 组心肌细胞排列尚整齐,横纹隐约可见,炎症细胞浸润和间质出血较少,见图 1。

2.3 两组患者不同时间点电镜下心肌组织病理结构变化的比较 术前两组心肌纤维排列规整,各带明显,线粒体结构清晰;术后 C 组心肌纤维排列紊乱,肌节结构不清,线粒体肿胀、空泡化,L 组心肌纤维排列略紊乱,线粒体轻度肿胀,部分嵴丢失,见图 2。

2.4 两组患者不同时间点 cTnI、CK-MB 和 TNF- α 水平的比较 与基础值比较,两组在 T1 时点 cTnI、CK-MB 和 TNF- α 水平差异无统计学意义($P>0.05$),在 T2~T5 时点,cTnI、CK-MB 和 TNF- α 水平升高,与 T1 时间点比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与 C 组比较,L 组在 T2~T5 时点 cTnI、CK-MB 和 TNF- α 水平降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),见表 3~4。

表 1 两组患者术中情况各指标的比较

组别	<i>n</i>	手术种类 (MVR/AVR, <i>n</i>)	主动脉阻断时间 ($\bar{x}\pm s$,min)	体外循环时间 ($\bar{x}\pm s$,min)	手术时间 ($\bar{x}\pm s$,min)	复跳情况 (<i>n</i> ,自复/除颤)
C 组	30	13/17	56±16	100±19	187±23	24/6
L 组	30	12/18	66±20	90±20	177±22	22/8

MVR:二尖瓣置换术;AVR:主动脉瓣置换术。

表 2 两组患者不同时间点 cTnI 水平的比较($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	<i>n</i>	T0	T1	T2	T3	T4	T5
C 组	30	0.07±0.02	0.08±0.03	9.16±2.89 ^a	26.70±8.30 ^a	32.16±7.48 ^a	47.67±10.49 ^a
L 组	30	0.08±0.03	0.08±0.02	5.16±1.94 ^{ab}	17.72±7.21 ^{ab}	19.76±6.41 ^{ab}	32.03±7.52 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与 T0 时间点比较;^b: $P<0.05$,与 C 组比较。

表 3 两组患者不同时点 CK-MB 水平的比较($\bar{x}\pm s$,ng/mL)

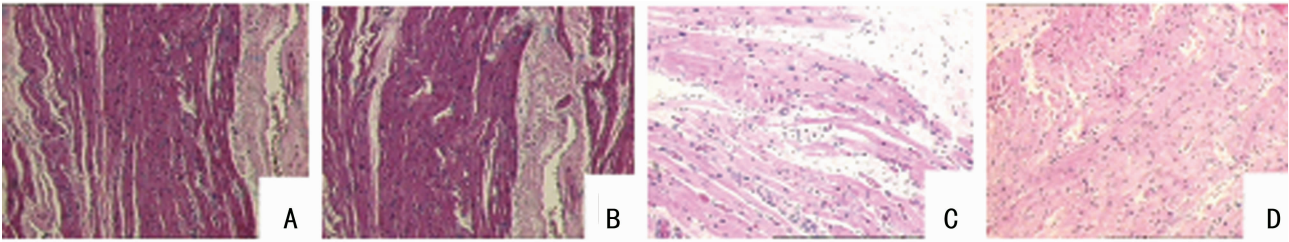
组别	<i>n</i>	T0	T1	T2	T3	T4	T5
C 组	30	12.7±2.4	13.7±2.4	21.7±3.5 ^a	28.9±5.7 ^a	32.5±5.7 ^a	46.0±5.1 ^a
L 组	30	11.9±2.5	12.7±2.0	17.8±3.7 ^{ab}	23.8±4.5 ^{ab}	29.1±5.1 ^{ab}	33.1±5.8 ^{ab}

^a:*P*<0.05,与 T0 时间点比较;^b:*P*<0.05,与 C 组比较。

表 4 两组患者不同时点 TNF-α 水平的比较($\bar{x}\pm s$,ng/L)

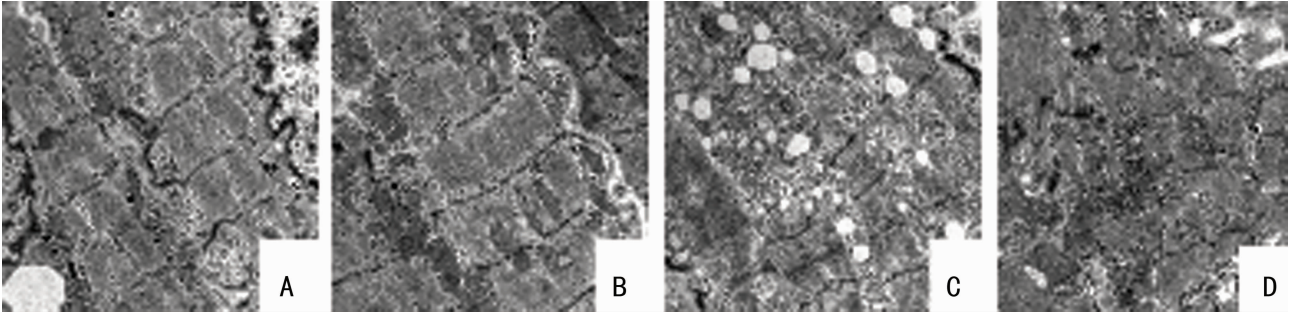
组别	<i>n</i>	T0	T1	T2	T3	T4	T5
C 组	30	13.9±4.8	15.0±4.6	47.1±7.8 ^a	68.9±14.2 ^a	81.1±14.2 ^a	98.9±12.6 ^a
L 组	30	14.5±4.2	16.0±4.3	27.0±9.3 ^{ab}	40.6±11.6 ^{ab}	52.4±17.2 ^{ab}	68.5±17.7 ^{ab}

^a:*P*<0.05,与 T0 时间点比较;^b:*P*<0.05,与 C 组比较。



A:C 组主动脉阻断前;B:L 组主动脉阻断前;C:C 组主动脉开放后;D:L 组主动脉开放后。

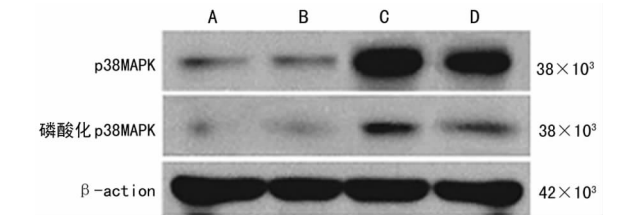
图 1 两组患者不同时间点心肌光镜下改变(HE,×100)



A:C 组主动脉阻断前;B:L 组主动脉阻断前;C:C 组主动脉开放后;D:L 组主动脉开放后。

图 2 两组患者不同时间点心肌电镜下改变(×20 000)

2.5 两组患者不同时点心肌组织 p38MAPK 及其磷酸化蛋白表达的比较 与主动脉阻断前比较,两组在主动脉开放后 p38MAPK 及其磷酸化蛋白表达明显升高(*P*<0.05);与 C 组比较,L 组在主动脉阻断前 p38MAPK 及其磷酸化蛋白表达差异无统计学意义(*P*>0.05),在主动脉阻断后 p38MAPK 及其磷酸化蛋白表达明显升高(*P*<0.05),见图 3。



A:C 组主动脉阻断前;B:L 组主动脉阻断前;C:C 组主动脉开放后;D:L 组主动脉开放后。

图 3 两组患者不同间时点心肌组织 p38MAPK 及其磷酸化蛋白的表达

2.6 两组患者不同时间点 CI 和 LVEF 的比较 两组患者术后 CI 和 LVEF 均较术前升高(*P*<0.05)。L 组术后第 7 天 CI 和 LVEF 明显高于 C 组(*P*<0.05),见表 5。

2.7 药物不良反应 L 组用药期间未见明确与 LCN 相关的

任何不良反应。

表 5 两组患者不同时点 CI 和 LVEF 表达的比较

组别	<i>n</i>	CI(L/min·m ²)		LVEF(%)	
		术前 1 d	术后 7 d	术前 1 d	术后 7 d
C 组	30	2.2±0.3	3.2±0.5 ^a	47.6±8.2	58.1±7.2 ^a
L 组	30	2.3±0.3	3.5±0.6 ^{ab}	44.7±5.4	65.5±6.8 ^{ab}

^a:*P*<0.05,与术前 1 d 比较;^b:*P*<0.05,与 C 组比较。

3 讨 论

体外循环下心脏瓣膜置换术,因术中主动脉夹闭及开放,可导致心肌发生缺血-再灌注损伤^[4],因此,本研究选择该类手术患者作为体外循环心肌缺血-再灌注损伤的模型,有助于直接评价 LCN 预处理对体外循环患者心肌的作用。本研究术中维持患者血流动力学稳定,无 1 例发生一过性低血压,因此,所有实验对象均未出现类似缺血预处理和/或缺血后处理的效应,避免了此类效应对实验结果的干扰。

心肌细胞超微结构的变化是反应心肌损伤程度的有效指标^[7]。当心肌缺血时,由于氧和能量物质的缺乏,心肌细胞的亚细胞结构随之发生改变,以线粒体的改变最为敏感,主要表现为线粒体水肿和线粒体膜不完整^[8]。本研究通过对心肌组

织超微结构的观察,发现两组患者行瓣膜置换术后,心肌细胞都存在不同程度的损伤,但 L 组损伤明显轻于 C 组,从形态学上证实了 LCN 预处理可以保持线粒体膜和空间结构的完整性,减轻体外循环后心肌细胞的损伤。

本研究发现,两组患者血清 cTnI 和 CK-MB 水平在主动脉开放后显著升高,说明体外循环可造成一定程度的心肌损伤,这与心内操作的机械性刺激和心脏停搏所致的缺血-再灌注损伤等因素有关;而 L 组患者主动脉开放后各时点,cTnI 和 CK-MB 水平低于 C 组,说明 LCN 预处理可减轻体外循环后心肌缺血-再灌注损伤。本研究还发现两组患者主动脉开放后 TNF- α 释放增加,这与 Wang 等^[9]研究结果一致。体外循环后心肌损伤的机制之一是过度的炎症反应,其中,TNF- α 是主要的促炎因子^[10]。在动物实验中也发现 TNF- α 等可使心肌收缩力减弱,左室射血分数呈浓度依赖性降低,平均动脉压下降,出现心功能不全体征,当减少此类细胞因子的作用后,心肌收缩力可得到恢复^[11]。本研究显示,主动脉开放后 L 组血清 TNF- α 水平低于 C 组,同时光镜下 L 组心肌炎性细胞浸润也少于 C 组,说明 LCN 预处理通过减轻体外循环心肌缺血-再灌注后的炎症反应,对心肌产生保护作用。

p38MAPK 是细胞内信号传导酶丝裂原活化蛋白激酶家族中一员,在细胞的增殖分化、基因表达及程序化死亡等过程中发挥着关键的调控作用,磷酸化的 p38MAPK 与心功能损伤密切相关^[12]。Li 等^[13]研究发现,缺血-再灌注时,伴随 p38MAPK 表达增加,心肌细胞凋亡指数显著增加。静息状态下,细胞中 p38MAPK 几乎不表达,本实验中两组患者主动脉阻断前 p38MAPK 已有少量表达,这可能与麻醉药物、气管插管和手术刺激等有关;而在主动脉开放后,两组心肌 p38MAPK 和磷酸化 p38MAPK 的表达显著增强,说明主动脉夹闭及开放后,p38MAPK 被缺血-再灌注等损伤性刺激信号迅速激活,大量表达并活化,而 L 组 p38MAPK 和磷酸化 p38MAPK 低于 C 组,提示 LCN 预处理具有抑制心肌细胞损伤的作用,可能与下调 p38MAPK 及其磷酸化蛋白的表达有关。

CI 和 LVEF 可较准确反映心脏术后的左心室功能^[14]。本研究 L 组术后第 7 天 CI 和 LVEF 明显高于 C 组,说明 L 组患者心功能的恢复优于 C 组,反映了 LCN 预处理促进了左心室泵血功能的恢复。

综上所述,LCN 预处理可减轻体外循环心肌缺血-再灌注损伤,利于心功能的恢复,其机制可能与保持线粒体膜和空间结构的完整性,下调心肌 p38MAPK 及其磷酸化蛋白表达,减少促炎因子 TNF- α 产生,抑制炎症反应有关,但其最适剂量有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 胡旭东,罗涛,张武,等.磷酸肌酸钠对瓣膜置换术患者心肌缺血再灌注损伤的治疗作用[J].重庆医学,2012,41(1):25-27.
- [2] Pekala J, Patkowska-Sokola B, Bodkowski R, et al. L-carnitine-metabolic functions and meaning in humans life[J]. Curr Drug Metab,2011,12(7):667-678.

- [3] Tarantini G, Scrutinio D, Bruzzi P, et al. Metabolic treatment with L-carnitine in acute anterior ST segment elevation myocardial infarction. A randomized controlled trial[J]. Cardiology,2006,106(4):215-223.
- [4] Catalyurek H, Oktay G, Guzeloglu M, et al. Insulin-blood cardioplegia decreases matrix metalloproteinase activity in ischaemia-reperfusion injury during coronary artery bypass surgery[J]. J Int Med Res,2008,36(3):551-558.
- [5] Mazzini M, Tadros T, Siwik D, et al. Primary carnitine deficiency and sudden death: in vivo evidence of myocardial lipid peroxidation and sulfonylation of sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase2[J]. Cardiology,2011,120(1):52-58.
- [6] 涂杰,张炳东,梁东科,等.氨甲环酸对心内直视术患者的血液保护效果[J].海南医学,2012,23(19):9-12.
- [7] Kanzaki Y, Yamauchi Y, Okabe M, et al. Three-dimensional architecture of cardiomyocytes and connective tissues in hypertrophic cardiomyopathy: a scanning electron microscopic observation[J]. Circulation,2012,125(5):738-739.
- [8] Minqorance C, Rodriquez R, Justo ML, et al. Critical update for the clinical use of L-carnitine analogs in cardiometabolic disorders[J]. Vasc Health Risk Mana,2011,7(1):169-176.
- [9] Wang M, Tsai BM, Reiger KM, et al. 17-beta-estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia[J]. J Mol Cell Cardiol,2006,40(2):205-212.
- [10] Steffens S, Montecucco F, Mach F. The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury[J]. Thromb Haemost,2009,102(2):204-207.
- [11] Kaiser RA, Bueno OF, Lips DJ, et al. Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo[J]. J Biol Chem,2004,279(15):15524-15530.
- [12] Jameel NM, Thirunaukkarasu C, Watkins SC, et al. p38-MAPK and caspase-3-mediated superoxide induced apoptosis of rat hepatic stellate cells; reversal by retinoic acid[J]. Cell physiol,2009,218(1):157-161.
- [13] Li Z, Ma JY, Kerr I, et al. Selective inhibition of p38 alpha MAPK improves cardiac function and reduces myocardial apoptosis in rat model of myocardial injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2006,291(4):H1972-1977.
- [14] 吴晓军,秦俭,郭兴明,等.心脏储备功能指标评估慢性心力衰竭严重程度的研究[J].重庆医学,2013,42(2):143-145,148.

(收稿日期:2013-08-12 修回日期:2013-09-10)