

• 基础研究 •

左卡尼汀对高血压并发糖尿病大鼠心肌代谢和心功能的影响

时慧琦^{1,2}, 殷仁富¹, 张治宇¹, 袁志忠¹, 王湘芸¹

(1 第二军医大学长征医院特需诊疗科, 上海 200003; 2 海军医学研究所干休所, 上海 200433)

摘要: 目的 观察左卡尼汀(L-carnitine, L-CN)对高血压并发糖尿病大鼠心肌代谢和心功能的保护作用。方法 采用两肾一夹手术及腹腔内注射链脲佐菌素(STZ)的方法, 制备高血压并发糖尿病大鼠模型。实验分为3组, 即正常对照组、高血压糖尿病模型组及高血压糖尿病治疗组, 每组10只。10周后, 检查射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS)、左室收缩压(LVSP)及左室舒张末压(LVEDP)。测定血总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、血糖(GLU)、血清游离脂肪酸(FFA)的浓度, 并计算心脏指数(CI=HW/BW), 观察心肌改变。结果 经10周治疗, ①高血压糖尿病模型组与对照组相比, TC、TG、LDL-C、GLU、FFA的水平、CI及LVEDP明显升高($P < 0.05$); HDL-C、EF、FS和LVSP明显下降($P < 0.05$)。HE染色显示, 心肌细胞肥大、排列紊乱、肌纤维断裂、溶解。电镜显示, 肌纤维局灶性断裂、溶解、坏死, 线粒体空泡化。②高血压糖尿病治疗组与模型组相比, LDL-C、GLU、FFA及LVEDP明显下降($P < 0.05$); EF、FS及LVSP明显升高($P < 0.05$)。HE染色显示, 肌纤维排列相对规则, 未见明显的细胞肥大排列紊乱、肌纤维断裂、溶解。电镜显示, 心肌的超微结构大致正常。结论 L-CN可减轻高血压-糖尿病大鼠的心肌糖、脂代谢的紊乱, 降低血中FFA的浓度, 保护心肌细胞和心脏的功能。

关键词: 高血压; 糖尿病; 游离脂肪酸; 心肌代谢; 左卡尼汀

中图分类号: R542.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-7236(2009)02-165-05

Influence of L-carnitine on myocardial metabolism and function in rats suffering from hypertension complicated by diabetes

SHI Hui-qi^{1,2}, YIN Ren-fu¹, ZHANG Zhi-yu¹, YUAN Zhi-zhong¹, WANG Xiang-yun¹

(1 VIP Clinic, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

(2 Residence for Retired Staffs, Navy Medical Research Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract **AM** To observe the protection of L-carnitine (L-CN) on myocardial metabolism and heart function in hypertensive rats complicated by diabetes. **METHODS** The method of operation (two kidney one clip) plus streptozotocin (STZ) injection was adopted to set up the model of hypertensive rats complicated by diabetes (HP-DM). Thirty male SD white rats were divided into three groups at random: normal group ($n=10$), HP-DM model group ($n=10$) and HP-DM treatment group ($n=10$). After 10 weeks, left ventricular ejection fraction (EF), fractional shortening (FS), left ventricular systolic pressure (LVSP) and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) were determined by echocardiography. Serum level of glucose (GLU), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and free fatty acids (FFA) were measured. The cardiac index (CI=HW/BW) was computed. Myocardium changes were observed by HE staining and electron microscope respectively. **RESULTS** After 10 weeks' treatment, higher serum levels of TC, TG, LDL-C, GLU, FFA, CI and LVEDP ($P < 0.05$), and lower HDL-C, EF, FS and LVSP ($P < 0.05$) were observed in the HP-DM model group in comparison with those in the control group. In the HP-DM

通讯作者: 殷仁富, 主任医师, 主要从事心肌能量代谢和老年病学研究 Email: yinrenfu28@sohu.com

作者简介: 时慧琦, 住院医师, 博士生 Email: shihuiqi@126.com

group HE staining revealed that hyertrophy and disordered arrange of myocardial cells fracture and dissolution of muscle fibers and nuclear fission Focal fracture dissolution and necrosis of muscle fibers and swelling and vacuolization of mitochondria could be observed under electron microscopy. Compared with those in the HP-DM model group the serum levels of LDL-C, GLU, FFA and LVEDP decreased significantly ($P < 0.05$) and the EF, FS and LVSP increased significantly ($P < 0.05$) in the HP-DM treatment group HE staining revealed visible hyertrophy and disordered arrange of myocardial cells Fracture and dissolution of muscle fibers and nuclear fission and cardiac muscle ultrastructure was generally normal under electron microscopy in the L-CN treatment group **CONCLUSION** L-CN assuages the cardiocyte energy metabolism disorder decreases the plasma FFA concentration and thus protects the cardiocytes and cardiac function

Key words hypertension; diabetes; FFA; myocardial metabolism; L-carnitine

高血压和糖尿病均为临床常见病和致心血管事件的高危因素之一,临床上两者常以并发症形式存在,且多发于中老年人群,患者的病死率高预后较差。高血压并发糖尿病已成为当前基础医学及临床研究的重要课题。左卡尼汀(L-carnitine, L-CN)是促进脂肪酸氧化的重要物质,并能调节心肌的糖脂代谢^[1],已有许多有关L-CN治疗心肌病、心衰、心肌缺血的临床及动物实验的报道^[2~4]。有关L-CN对高血压并发糖尿病时心肌代谢和心功能的影响报道甚少。本研究通过建立高血压并发糖尿病大鼠模型并用L-CN干预,观察了L-CN对模型大鼠心肌代谢和心功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠30只,体质量(BW)180~200 g 购自第二军医大学实验动物中心。L-CN注射液(1 g/支, 5 ml)国药准字H20000543)由常州三维技术研究所惠赠。链脲佐菌素(STZ)为美国Sigma公司产品。葡萄糖检测试剂盒、胆固醇(TC)检测试剂盒、三酰甘油(TG)检测试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)检测试剂盒,均购自上海复星长征医学科学有限公司。游离脂肪酸(FFA)试剂盒购自南京建成生物研究所。彩色多普勒超声心动仪(7.5 MHz Sonos5500)为美国惠普公司产品。

1.2 方法

1.2.1 高血压-糖尿病大鼠模型的建立 参照文献[5]的方法并加以改进。30只大鼠称重后行腹腔内麻醉(氯胺酮 75 mg/kg+安定 75 mg/kg),背部固定,消毒。在腹部中线左侧行2 cm切口,暴露左肾,分离左肾动脉,用银夹套夹在左肾动脉起始部,致左肾动脉部分狭窄,关腹。对照组只游离左肾动脉,不

套银夹。术后4周,以尾套法测收缩压,收缩压 > 150 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)的大鼠入选高血压组。再给高血压大鼠一次性腹腔内注射 10 g/L STZ(60 mg/kg),72 h后做空腹血糖及葡萄糖耐量试验,将餐后1 h血糖 > 16.7 mmol/L的大鼠入选高血压并发糖尿病组。

1.2.2 实验分组及给药 将SD大鼠30只,随机分3组,即对照组、高血压-糖尿病(HP-DM)组及高血压糖尿病治疗(HP-DM+L-CN)组,每组10只。治疗组以L-CN(1 g/支, 200 mg/kg 1次/d)灌胃,其余两组以等容积的9 g/L生理盐水(NS)溶液灌胃,持续10周。

1.2.3 生化及心功能指标的测定 ①血糖、血脂及FFA的测定:血糖、血脂应用日立7080全自动生化分析仪测定;FFA用比色法^[6]检测,具体步骤参照试剂盒的说明书进行。②心功能测定:用彩色多普勒超声心动仪测定大鼠左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(FS)。③血流动力学测定:用多道生物信号采样分析系统测定并计算左心室收缩压(LVSP)、左室舒张末压(LVEDP)。④计算心脏指数(CI):开胸游离大鼠的心脏,用滤纸吸干称心脏质量(HW),并与BW相除,即 $CI = HW / BW$ 。

1.2.4 心肌组织的病理变化及超微结构观察 将心脏浸入100 g/L甲醛溶液中固定,依次进行逐级乙醇脱水、石蜡包埋、切片及HE染色后,光镜下观察。同时取左心室心尖部的心肌组织1 mm³,经40 g/L多聚甲醛和20 g/L锇酸双重固定(pH 7.4于4℃)、逐级乙醇和丙酮脱水、包埋、切片及柠檬酸铅和醋酸双氧铀染色后,在电镜下观察心肌组织超微结构的变化。

1.3 统计学处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,由SPSS 13.0软件包处理,以 $P \leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2 1 心指数、心功能及血流动力学指标 HP-DM 组与对照组相比, CI及 LVEDP 明显升高 ($P < 0.05$), LVEF、FS和 LVSP均明显下降 ($P < 0.05$); HP-DM

+ L-CN 组与 HP-DM 组相比, CI略偏低, 但无统计学意义; 而心功能改善明显 ($P < 0.05$), LVSP明显升高, LVEDP明显下降 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠 CI、心功能及血流动力学指标的比较 (n = 10 $\bar{x} \pm s$)

组别	CI	LVEF(%)	FS(%)	LVSP(mmHg)	LVEDP(mmHg)
对照组	0.0028 \pm 0.0006	83.6 \pm 3.69	46.3 \pm 3.27	136.44 \pm 5.11	5.64 \pm 1.86
HP-DM 组	0.0039 \pm 0.0003 ^a	47.8 \pm 5.62 ^a	17.6 \pm 2.16 ^a	82.67 \pm 4.25 ^a	42.43 \pm 3.34 ^a
HP-DM + LCN 组	0.0035 \pm 0.0004 ^a	61.1 \pm 4.74 ^{ac}	28.7 \pm 2.62 ^{ac}	109.36 \pm 5.35 ^{ac}	20.99 \pm 2.46 ^{ac}

与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 与 HP-DM 组比较, ^c $P < 0.05$ 。1 mmHg = 0.133 kPa。

2 2 血糖 (GIU)、血脂、FFA 的变化 HP-DM 组与对照组相比, 血中 GLU、TC、TG、LDL-C、FFA 的水平明显升高, HDL-C 的水平明显降低 ($P < 0.05$)。HP-DM +

L-CN 组与 HP-DM 组相比, 血中 LDL-C、GIU、FFA 的水平明显下降 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各组大鼠血脂、血糖及游离脂肪酸的比较 (n = 10 $\bar{x} \pm s$)

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	GIU (mmol/L)	FFA (μ mol/L)
对照组	1.27 \pm 0.12	0.85 \pm 0.19	0.37 \pm 0.40	0.79 \pm 0.13	7.32 \pm 0.94	212.44 \pm 16.64
HP-DM 组	1.76 \pm 0.11 ^a	1.28 \pm 0.18 ^a	1.90 \pm 0.14 ^a	0.61 \pm 0.29	35.78 \pm 3.36 ^a	589.27 \pm 28.68 ^a
HP-DM + LCN 组	1.73 \pm 0.10 ^a	1.16 \pm 0.20 ^a	1.23 \pm 0.56 ^{ac}	0.74 \pm 0.30	20.86 \pm 7.18 ^{ac}	320.54 \pm 70.03 ^{ac}

与对照组比较, ^a $P < 0.05$ 与 HP-DM 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

2 3 心肌组织的病理变化 对照组的心肌纤维排列整齐、细胞核形态正常 (图 1A)。HP-DM 组与对照组相比, 出现细胞肥大、排列紊乱、肌纤维断裂、融解, 并可见空泡化变性坏死的心肌细胞及核分裂

(图 1B)。HP-DM + L-CN 组与 HP-DM 组相比, 肌纤维排列相对规则, 未见明显的肌纤维断裂、融解及核分裂, 病变有明显改善 (图 1C)。

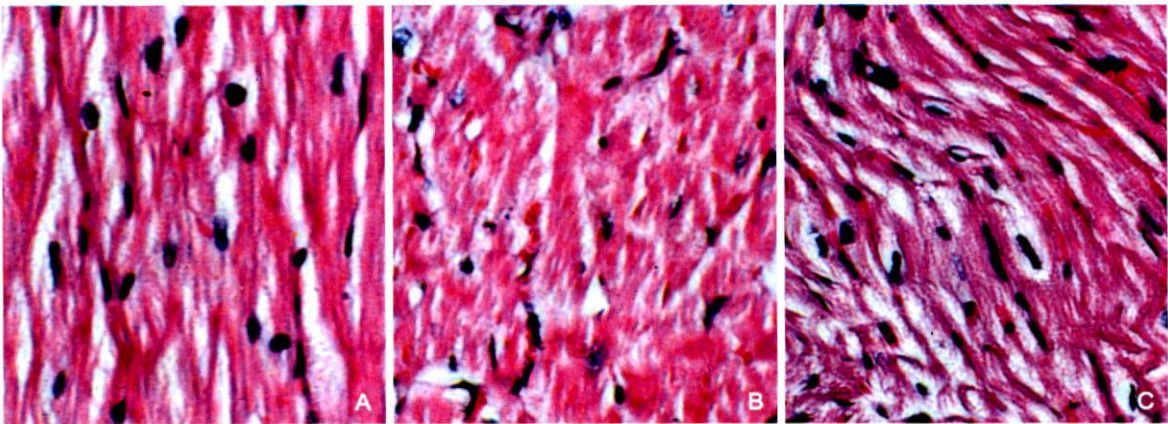


图 1 各组大鼠心肌组织的病理变化 (HE 染色 $\times 400$)
A: 对照组; B: HP-DM 组; C: HP-DM + LCN 组。

2 4 心肌超微结构的改变 对照组的肌纤维排列整齐, 线粒体结构正常。HP-DM 组与对照组相比, 可见肌纤维局灶性断裂、溶解、坏死, 线粒体空泡化,

毛细血管内皮细胞出现核染色质聚集、胞浆肿胀。HP-DM + L-CN 组与 HP-DM 组相比, 病变有明显的改善 (图 2)。

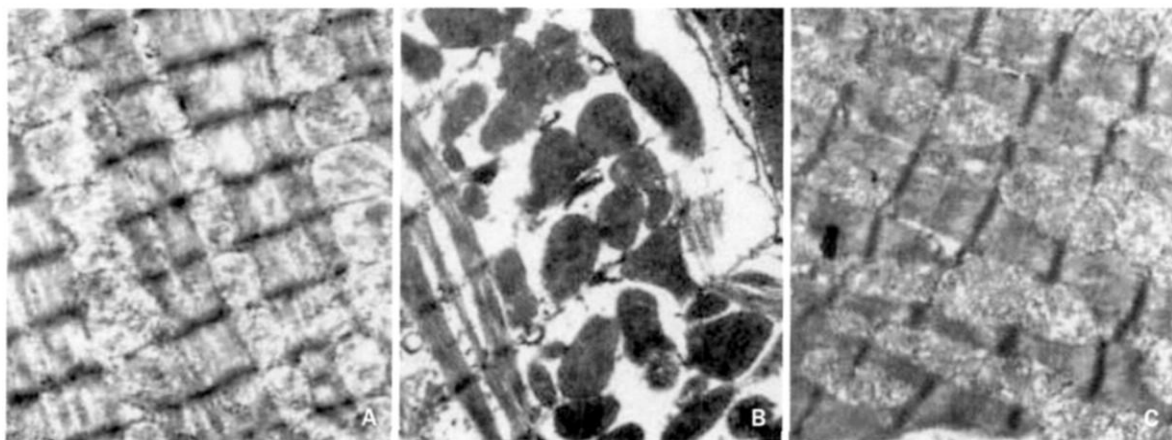


图 2 各组大鼠心肌超微结构的电镜观察 ($\times 4\ 000$)

A: 对照组; B: HP-DM 组; C: HP-DM + LCN 组。

3 讨论

正常生理状态下,心脏本身的能量供求之间处于动态平衡,心肌组织细胞能量供应的 60% ~ 80% 来源于脂肪代谢。心肌组织细胞内的脂肪酸 β 氧化过程,必须有 L-CN 的参与才能进行三羧酸循环提供能量。L-CN 是一种小分子氨基酸衍生物,在脂肪酸氧化和其他主要能量代谢途径中起着重要作用。同时, L-CN 可减少 FFA、长链脂酰辅酶 A 等有害物质在心肌细胞内的堆积,预防和减轻心肌损伤^[7]。动物实验证实,给糖尿病大鼠 (STZ-D) 补充 L-CN,可有效地促进心肌脂肪酸代谢从而纠正 STZ-D 大鼠的心动过缓^[8]。许多临床资料也显示^[2~4],心肌缺血、心衰时,补充 L-CN 可有效地维持心肌糖、脂代谢的平衡,保护心脏的功能。

临床研究显示,高血压、左心室肥厚的患者呈现心肌脂肪酸代谢异常,并可致心肌效能下降^[9]。还发现,血管紧张素 II 诱导的心脏肥厚伴随过氧化物酶体增生物激活受体 α (PPAR α) 减少和脂肪酸代谢酶相关基因表达的下降^[10];而相关报道则发现与之相反的结果,即糖尿病时心肌对 FFA 的氧化则更为活跃,而对葡萄糖的氧化利用存在异常。FFA 是正常心肌物质代谢的首选底物,在缺血状况下,心肌利用葡萄糖增多,糖尿病时因葡萄糖的摄取利用障碍,使糖尿病患者的心肌更加依赖于脂肪酸代谢作为能量的来源。当高血压糖尿病合并存在时,心肌肥厚及心肌转运葡萄糖的能力和对葡萄糖的利用能力均下降,心肌细胞既不能增加葡萄糖的摄取,也不能提高对葡萄糖的氧化利用,从而可导致 ATP 生成减少,心肌能量供应不足,致心肌肥厚发生发展,心功能下降。这种心肌代谢改变的最终结果,将导致内皮功能受损、炎症和氧化应激等一系列病理过程。

从而加速心力衰竭的进展。

本研究结合两肾一夹手术和腹腔内注射 STZ 两种方法,成功地制备了 HP-DM 大鼠模型。该模型与临床常见的高血压并发糖尿病的症状相似,有助于研究高血压、高血糖双因素同时存在对心肌的影响。L-CN 作为代谢治疗药物在心肌脂肪酸代谢过程中起着决定性的作用。L-CN 可提高位于线粒体膜上卡尼汀脂酰转移酶的活性,促进脂肪酸的 β -氧化。在病理条件下,可阻止 ATP 水平的下降,还可通过降低线粒体内乙酰 CoA /CoA 的比例而提高丙酮酸脱氢酶 (PDH) 的活性,促进心肌细胞对葡萄糖的氧化利用。同时, L-CN 能缓冲或清除 FFA 的有毒代谢产物 (如酰基 CoA 和在病理状态下蓄积在胞质和线粒体内的乙酰 CoA),减轻有毒代谢产物对心肌细胞的损害,从而维持高血压并发糖尿病时心肌代谢的平衡,增加心肌对缺血缺氧和高糖的耐受性,保护心肌细胞线粒体的功能和心脏的功能。本研究的结果显示,与对照组相比,HP-DM 组大鼠的 LVEDP 及 CI 明显升高, LVEF、FS 和 LVSP 明显下降;心肌代谢指标 (TC、TG、LDL-C、GLU、FFA) 均显著升高, HDL-C 降低。心肌组织病理可见细胞肥大、排列紊乱、肌纤维断裂、溶解,以及空泡化变性坏死的心肌细胞及核分裂,电镜下可见线粒体空泡化,毛细血管内皮细胞出现核染色质聚集、胞浆肿胀。L-CN 治疗后,与 HP-DM 组相比,心功能及血流动力学指标 (LVEF、FS、LVSP、LVEDP) 均明显改善,心肌代谢指标 (LDL-C、GLU、FFA) 显著下降,肌纤维排列相对规则,未见明显的肌纤维断裂、溶解及核分裂,心肌病变有明显改善,说明 L-CN 可明显改善高血压并发糖尿病时糖脂代谢的紊乱,降低 GLU、血脂及 FFA 的水平,改善心功能。

(下转第 178 页)

参考文献:

[1] Tang JM, Xie QY, Pan GD, *et al*. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, 30(2): 353- 361.

[2] 李培建, 李兵仓. 一种重组腺病毒载体的扩增、纯化和病毒滴度检测方法[J]. *中华神经医学杂志*, 2002, 1(1): 52- 55

[3] Juan SH, Lee TS, Tseng KW, *et al*. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer inhibits the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Circulation*, 2000, 104(13): 1519- 1525

[4] Price MJ, Chou CC, Frantzen M, *et al*. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties[J]. *Int J Cardiol*, 2006, 111(2): 231- 239.

[5] G rauss RW, W inter EM, van Tuyn J *et al*. Mesenchymal stem cells from ischemic heart disease patients improve left ventricular function after acute myocardial infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(4): H2438- H2447.

[6] Baron F, Gohot A. Mesenchymal stem cells: a new versatile therapeutic option[J]. *Rev Mal Liege*, 2007, 62(Spec No): 9- 14.

[7] 杨胜利, 何作云. 干细胞移植治疗心肌梗死[J]. *心脏杂志*, 2003, 15(4): 372- 374.

[8] Potier E, Ferreira E, Meunier A, *et al*. Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death[J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(6): 1325- 1331.

[9] Angemayr B, Mejias M, Gracia-Sancho J *et al*. Heme oxygenase attenuates oxidative stress and inflammation and increases VEGF expression in portal hypertensive rats[J]. *JHepatol*, 2006, 44(6): 1033- 1039

[10] 李锦, 蒋晖, 毛建斌, 等. 血红素氧合酶-1在胰岛素对乳鼠心肌细胞保护机制中的作用[J]. *心脏杂志*, 2005, 17(2): 111- 114

[11] Tang YL, Tang Y, Zhang YC, *et al*. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated heme oxygenase-1 vector[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(7): 1339- 1350.

[12] Barbagallo I, Tibullo D, Di Rosa M, *et al*. A cytoprotective role for the heme oxygenase-1/CO pathway during neural differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86(9): 1927- 1935

[13] Vorburger SA, Hunt KK. Adenoviral gene therapy[J]. *Oncologist*, 2002, 7(1): 46- 59

[14] Liu X, Pachori AS, Ward CA, *et al*. Heme oxygenase-1 (HO-1) inhibits postmyocardial infarct remodeling and restores ventricular function[J]. *FASEB J*, 2006, 20(2): 207- 216

(收稿日期: 2008-07-02 接受日期: 2008-09-24)

(上接第 168 页)

本研究的结果还提示, HP-DM 组大鼠的心肌细胞能量代谢紊乱, 心肌细胞功能受损。补充 L-CN 后, 可明显改善 HP-DM 大鼠糖脂代谢的紊乱, 使血糖、血脂明显降低, 从而对心肌线粒体的功能和心脏功能具有保护作用。L-CN 在通过缓冲或清除过量脂肪酸有毒代谢中间体, 激活 PDH, 促进脂肪酸氧化利用的同时, 葡萄糖的氧化增加, 能有效地改善 HP-DM 时能量底物利用不均的状态。因此, 对于 HP-DM 者, 及早应用 L-CN 治疗可减缓心肌肥厚和代谢失衡的发生与发展, 降低高血压、高血糖对心肌组织的损害, 维持心肌能量代谢的平衡, 有效地保护心脏的功能。

参考文献:

[1] Calvani M, Reda E, Aragoni M, et al. Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism under normal and pathological conditions[J]. *Basic Rec Cardiol*, 2000, 95(2): 75- 83

[2] Lango R, Smolenski RT, Nakiewicz M, *et al*. Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass[J].

Cardiovasc Res, 2001, 51(1): 21- 29

[3] 殷仁富, 王咏梅, 陈金明, 等. 国产左旋卡尼汀改善慢性充血性心力衰竭患者心功能的临床研究[J]. *第二军医大学学报*, 2001, 22(2): 173- 175

[4] 王咏梅, 殷仁富, 张家友, 等. 国产左旋卡尼汀治疗心绞痛的临床研究[J]. *国际心血管杂志*, 2001, 3(1): 30- 32

[5] 喻嵘, 陈大舜, 邓奕辉, 等. 左归双降方对实验性糖尿病合并高血压大鼠血管内皮功能及降钙素基因相关肽的影响[J]. *中国中医药科技*, 2004, 11(1): 13- 15.

[6] 王抒. 血清游离脂肪酸测定[M] // 李影林. *中华医学检验全书*. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 739- 740.

[7] 殷仁富, 陈金明. *心脏能量学: 代谢与治疗* [M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2002: 263- 275.

[8] Malone MA, Schocken DD, Hanna SK, *et al*. Diabetes-induced bradycardia is an intrinsic metabolic defect reversed by carnitine[J]. *Metabolism*, 2007, 56(8): 1118- 1123

[9] de las Fuentes L, Soto PF, Cupps BP, *et al*. Hypertensive left ventricular hypertrophy is associated with abnormal myocardial fatty acid metabolism and myocardial efficiency[J]. *J Nucl Cardiol*, 2006, 13(3): 369- 377

[10] Pelletier C, Aasum E, Larsen TS. Overexpression of angiotensinogen in the myocardium induces downregulation of the fatty acid oxidation pathway[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(3): 459- 466

(收稿日期: 2008-03-14 接受日期: 2008-05-24)