

L-瓜氨酸对缺血再灌注损伤心肌的保护作用及机制研究

李志乐 韦秋宇 言纬 刘燕 韦宝敏 黄照河

【摘要】 目的:探讨 L-瓜氨酸对缺血再灌注损伤心肌的保护作用及机制。**方法:**选取健康新西兰大白兔 30 只,随机分为对照组、模型组和实验组,每组 10 只。构建 MIRI 模型,实验组予 L-瓜氨酸 100 $\mu\text{g/L}$ 预处理,模型组给予等量生理盐水,对照组只开胸不结扎。收集各组血液和心肌组织标本,采用全自动生化分析仪检测血清肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)水平,苏木精-伊红(HE)染色观察心肌病理学改变,2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色检测心肌梗死面积,原位末端转移酶标记(TUNEL)染色检测心肌凋亡情况。**结果:**与对照组相比,模型组兔出现急性心肌损伤表现,HE 染色显示心肌组织纤维细胞和肌节结构紊乱,细胞核固缩,血清 CK、CK-MB、LDH 水平均明显升高(P 均 <0.05),心肌梗死面积、心肌凋亡率均明显增加(P 均 <0.05)。与模型组相比,实验组心肌损伤减轻,血清 CK、CK-MB、LDH 水平降低(P 均 <0.05),心肌梗死面积及心肌凋亡率减少(P 均 <0.05)。**结论:**L-瓜氨酸通过抑制心肌细胞凋亡,发挥对缺血再灌注损伤的保护作用。

【关键词】 L-瓜氨酸;心肌缺血再灌注损伤;心肌细胞凋亡;心肌梗死

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.03.009

Protective effect and mechanism of L-citrulline on myocardial ischemia-reperfusion injury
LI Zhile, WEI Qiuyu, YAN Wei, LIU Yan, WEI Baomin, HUANG Zhaohe Department of Cardiovascular Medicine, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China

【Abstract】 Objectives: To investigate the protective effect and mechanism of L-citrulline on myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI). **Methods:** A total of 30 healthy New Zealand white rabbits were randomly divided into sham operation group (control group), ischemia reperfusion group (model group) and model+L-citrulline group (experimental group), with 10 rabbits in each group. The MIRI model was established firstly, the experimental group was pretreated with L-citrulline 100 $\mu\text{g/L}$. The model group was given the same amount of normal saline, and the control group was given only thoracotomy without ligation. At the end of the experiment, blood and heart tissue samples were collected for the subsequent experiments. The serum levels of CK, CK-MB and LDH were detected by automatic biochemical analyzer, and the pathological changes of myocardial tissue were observed by HE staining. TTC staining and TUNEL staining were used to observe the myocardial infarct size and myocardial apoptosis. **Results:** Compared with the control group, acute myocardial injury was observed in model group. HE staining showed structural disorder of fibrocytes, sarcomere and nuclear pyknosis. The serum levels of CK, CK-MB and LDH, and myocardial infarct area and apoptosis rate were significantly increased in the model group (all $P<0.05$). Compared with the model group, myocardial injury in the experimental group could be reduced significantly by exogenous citrulline. The serum levels of CK, CK-MB and LDH, and myocardial infarct area and apoptosis rate were significantly decreased in experimental group (all $P<0.05$). **Conclusion:** L-citrulline plays a protective role on MIRI by inhibiting myocardial apoptosis.

【Keywords】 L-citrulline; Myocardial ischemia reperfusion injury; Myocardial apoptosis; Myocardial infarction

基金项目:国家自然科学基金(81860797);右江民族医学院附属医院高层次人才科研项目(Y20196318)
作者单位:533000 百色,右江民族医学院附属医院心血管内科
通信作者:黄照河, E-mail: bshuangzhaohe@163.com

急性心肌梗死 (AMI) 是冠状动脉粥样硬化性心脏病 (冠心病) 最常见的急危重症^[1-2]。再灌注治疗是挽救 AMI 患者的有效治疗手段。但心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 严重影响患者的临床预后。如何有效防治 MIRI 是心血管领域研究的热点问题。研究表明, AMI 患者体内精氨酸严重不足, 可导致机体功能及能量代谢紊乱, 但是直接补充外源性精氨酸并不能使患者临床获益, 甚至可能导致死亡率增加, 其原因可能与精氨酸/瓜氨酸-一氧化氮循环中产生的一氧化氮 (NO) 效应分子有关^[3-5]。基于瓜氨酸可负反馈调节 NO 生成并内源性合成精氨酸的特点, 本研究通过构建 MIRI 兔模型, 探讨 L-瓜氨酸对 MIRI 兔心肌的保护机制, 为临床 MIRI 防治提供新的方向和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

L-瓜氨酸购自北京索莱宝科技有限责任公司, 用超纯水对 L-瓜氨酸溶解稀释, 浓度为 100 $\mu\text{g/L}$, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱供实验使用。心肌酶谱类测定系列试剂盒购自德国 ProDia GmbH 公司, 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 染色液购自上海博湖生物科技有限公司, 原位末端转移酶标记技术 (TUNEL) 试剂购自英国 Abcam 公司。7170 型全自动生化分析仪购自深圳市库贝尔生物科技有限公司, ECG-2350 心电图机购自日本光电公司, DMR+550 型病理图像分析仪购自德国 Leica 公司, SAR-830 小型动物呼吸机购自北京世联博研科技有限公司。

1.2 分组及处理方法

选取成年健康新西兰大白兔 30 只, 清洁级, 雄性, 3 个月龄, 体质量 2.0~2.5 kg, 购自右江民族医学院实验动物中心。本实验获得右江民族医学院动物实验伦理委员会批准。采用随机数字表法分为对照组、模型组与实验组, 各 10 只。手术前禁食 12 h, 大白兔称量体质量后, 予 20% 氨基甲酸乙酯耳缘静脉注射麻醉, 麻醉后仰位固定于手术操作台上, ECG-2350 心电图机连接于四肢, 行气管内插管并连接 SAR-830 小型动物呼吸机, 调整呼吸机参数。常规备皮消毒, 沿胸骨正中线依次切开皮肤、胸骨, 撑开胸廓并固定, 充分暴露心脏。参照文献 [6], 采用结扎左冠状动脉前降支 30 min, 再灌注 2 h 的方法构建在体兔 MIRI 模型, 实验组在构建兔 MIRI 模型前 1 h 予经股静脉注射 L-瓜氨酸 100 $\mu\text{g/L}$ 预处理; 模型组给予经股静脉注射等量的

生理盐水。对照组只开胸不结扎。评估 MIRI 模型成功的心电图标准^[7]: 结扎左冠状动脉前降支 30 min 后, T 波高尖或 ST 段明显抬高; 再灌注 2 h 后, T 波回落或已抬高的 ST 段下降 50% 以上。

1.3 血清心肌酶检测

再灌注实验结束后, 分别采集兔腹主动脉血 2 mL, 静置 30 min 后 3 000 转/min 离心 15 min, 分离血清备测。采用 7170 型全自动生化分析仪检测血清心肌酶包括肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 的水平。

1.4 心肌组织苏木精-伊红染色

再灌注实验结束后, 分离取出兔心脏, 用生理盐水冲洗并分离左心室前壁心肌组织, 置于 10% 缓冲甲醛液中固定 24 h, 石蜡包埋, 心肌组织连续切片, 厚度约为 5 μm , 常规进行苏木精-伊红 (HE) 染色。

1.5 TTC 染色检测心肌梗死面积

再灌注实验结束后, 在分离的左心室前壁心肌组织中, 选取左心室相同区域缺血与再灌注部位心肌组织制成 2 mm 切片。在暗室避光操作, 将切片置于 2% TTC 染色液中, 用锡箔纸盖住后, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱 30 min, 翻动切片, 使之充分接触染色液。切片晾干拍照, 采用病理图像分析仪评估心肌梗死面积。

1.6 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

再灌注实验结束后, 将获取的心肌组织于 10% 缓冲甲醛液中固定, 石蜡包埋, 制成 5 μm 切片, 将切片置于染色缸中, 予二甲苯脱蜡, 不同浓度无水乙醇水化, PBS 漂洗 2 次后加入蛋白酶 K 溶液 (20 $\mu\text{g/mL}$), 置于室温水解 30 min。用含 2% 过氧化氢的 PBS 漂洗 2 次, 置于室温反应 5 min。按 TUNEL 试剂盒说明书方法, 在暗室避光操作, 首先进行生物素标记, 然后予 DAB 显色、蒸馏水冲洗、甲基绿复染、正丁醇冲洗、二甲苯脱水及中性树脂封片。切片干燥后, 每个切片选取 10 个不同区域在光学显微镜 ($\times 400$) 下进行观察计数, 细胞染色呈棕色的为 TUNEL 阳性细胞。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 两组间比较和组内比较分别采用配对 t 检验和单样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

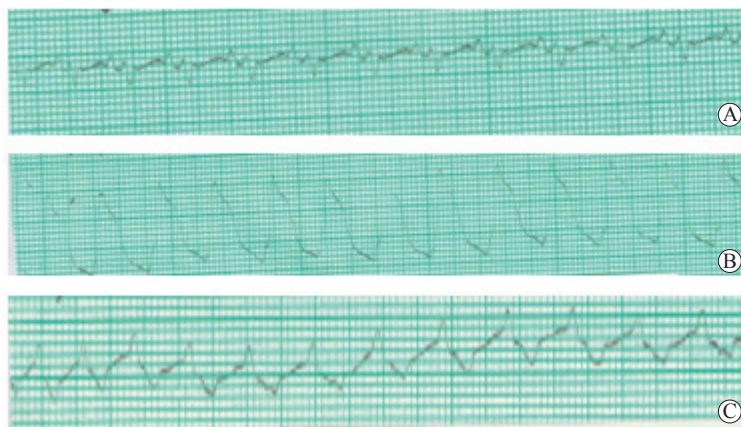
2 结果

2.1 在体兔 MIRI 模型的评估

模型组兔左冠状动脉前降支结扎 30 min 后,

心电图显示 ST 段明显抬高,伴有 T 波增高,表现为 ST-T 改变;再灌注 2 h 后,ST 段和 T 波较缺血时明显下降或回落,但较缺血前仍有明显增高

($P < 0.05$),表明在体兔 MIRI 模型构建成功。见图 1 和表 1。



注: A 为缺血前心电图; B 为缺血 30 min 后心电图; C 为再灌注 2 h 后心电图

图1 模型组兔心肌缺血再灌注前后心电图的演变

表1 模型组兔心肌缺血再灌注前后心电图的变化

时间	ST段/mV	T波/mV
缺血前	0.059 ± 0.032	0.127 ± 0.054
缺血后	0.594 ± 0.121 ⁽¹⁾	0.363 ± 0.097 ⁽¹⁾
再灌注	0.128 ± 0.063 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.145 ± 0.066 ⁽²⁾

注:与缺血前相比,⁽¹⁾ $P < 0.05$;与缺血后相比,⁽²⁾ $P < 0.05$

2.2 L-瓜氨酸对MIRI兔心肌酶指标的影响

与对照组相比,模型组和实验组兔血清中 CK、CK-MB 及 LDH 的水平均明显升高 (P 均 < 0.05)。与模型组相比,实验组兔血清中 CK、CK-MB 及 LDH 的水平均显著下降 (P 均 < 0.05),提示 L-瓜氨酸可明显减轻兔 MIRI 导致的急性心肌损伤。见表 2。

表2 3组兔血清中CK、CK-MB及LDH水平比较

组别	CK/U · L ⁻¹	CK-MB/U · L ⁻¹	LDH/U · L ⁻¹
对照组	358.36 ± 65.32	224.76 ± 45.32	731.18 ± 85.20
模型组	785.36 ± 87.54 ⁽¹⁾	489.86 ± 66.78 ⁽¹⁾	1597.72 ± 96.84 ⁽¹⁾
实验组	579.84 ± 85.32 ⁽¹⁾⁽²⁾	397.56 ± 52.26 ⁽¹⁾⁽²⁾	968.34 ± 89.02 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:与对照组相比,⁽¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比,⁽²⁾ $P < 0.05$

2.3 L-瓜氨酸对MIRI兔心肌组织病理改变的影响

HE 染色结果显示,对照组兔心肌组织结构层次完整清晰,细胞排列整齐有序,细胞核清晰可见,染色浓淡均匀一致。模型组兔心肌组织结构层次欠完整清晰,纤维细胞和肌节结构紊乱,可见纤维断裂现象,细胞核固缩,染色颜色变深,细胞间红细胞渗出,可见较多空泡。与模型组相比,实验组兔心肌组织结构层次较为规则,可见心肌纤维水肿减轻,细胞核染色均匀,胞浆

浓染减轻,细胞间红细胞渗出减少,提示 L-瓜氨酸可改善 MIRI 导致的兔心肌组织病理形态学变化。见图 2。

2.4 L-瓜氨酸对MIRI兔心肌梗死面积的影响

采用 TTC 染色检测心肌梗死面积,结果显示对照组兔心肌未见梗死灶,模型组心肌梗死面积 [(78.02 ± 5.66)%] 明显高于对照组 [(5.01 ± 0.32)%],实验组心肌梗死面积 [(36.24 ± 3.78)%] 显著低于模型组 (P 均 < 0.05),提示 L-瓜氨酸能够明显减少 MIRI 所致的兔心肌梗死面积。见图 3。

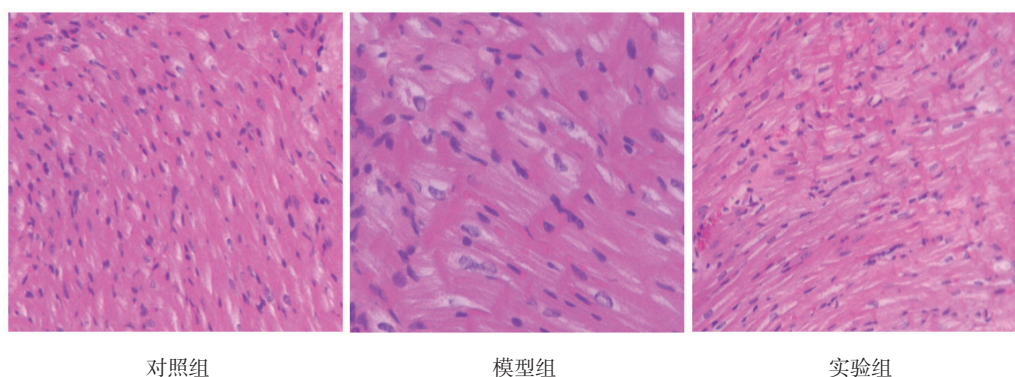
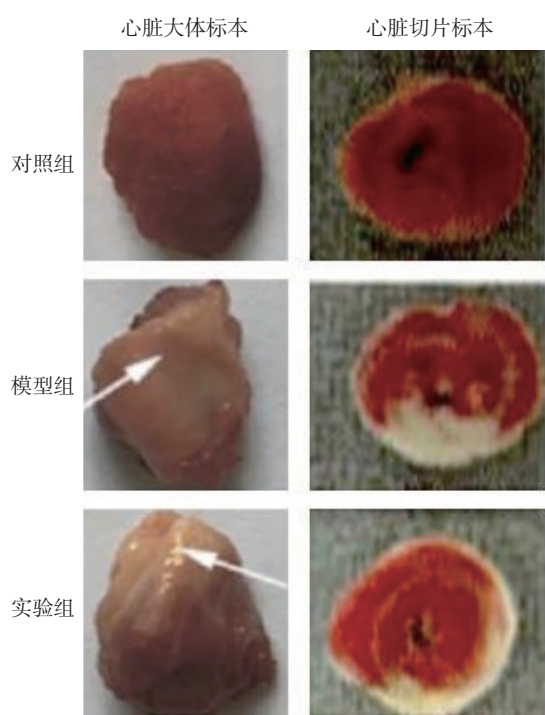


图2 3组兔心肌组织病理形态学结果 (HE染色, ×400)



注：心脏大体TTC染色图中箭头表示TTC染色呈淡红色的心肌梗死区；心脏切片TTC染色图中砖红色为非梗死区，白色为心肌梗死区

图3 3组兔心脏大体和切片TTC染色结果

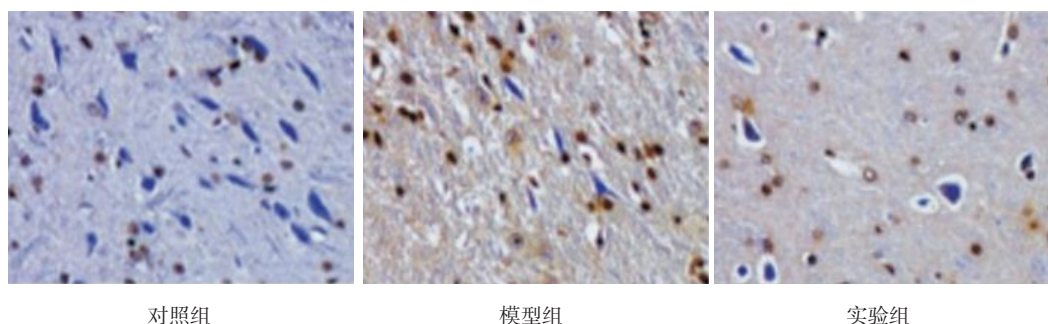


图4 3组兔心肌细胞TUNEL染色结果 (×400)

2.5 L-瓜氨酸对MIRI兔心肌细胞凋亡的影响

采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡的情况，褐黑区为凋亡细胞。结果显示对照组兔心肌细胞凋亡率为 $(4.05 \pm 0.32)\%$ ，模型组兔心肌细胞凋亡率 $[(46.26 \pm 6.58)\%]$ 明显高于对照组，实验组兔心肌细胞凋亡率 $[(28.42 \pm 3.52)\%]$ 显著低于模型组 (P 均 < 0.05)，提示 L-瓜氨酸能够减轻 MIRI 导致的兔心肌细胞凋亡。见图 4。

3 讨论

AMI 是严重危害人类健康的心血管疾病，即使早期静脉溶栓成功或通过介入术开通梗死相关血管，临床上仍约有 30% 的患者发生 MIRI^[8-9]，加重不可逆的心肌细胞死亡，导致左室重构，影响 AMI 患者的远期预后。目前 MIRI 的形成机制尚不明确，与氧化应激、炎症反应、内质网应激、细胞内钙超载、细胞凋亡等因素密切相关，导致心肌细胞坏死或程序性死亡^[10]，诱发再灌注心律失常、心肌顿抑、微血管栓塞及致死性心肌再灌注损伤等心血管不良事件，前两者是可逆的，而后两者不可逆^[11]，研究成功构建在体兔 MIRI 模型，通过心肌组织病理分析发现，模型组兔心肌组织结构层次欠完整

清晰,纤维细胞和肌节结构紊乱,纤维断裂,细胞核固缩,细胞间红细胞渗出,出现较多的空泡。CK、CK-MB、LDH 是临床上最常用的心肌坏死标志物,可作为反映 MIRI 程度的检测指标。本研究结果显示,模型组兔血清中 CK、CK-MB、LDH 水平,心肌梗死面积,心肌细胞凋亡率均明显高于对照组,提示 MIRI 可加重心肌损伤,扩大梗死面积,增加心肌凋亡,影响 AMI 的临床预后。临床上针对 MIRI 的防治原则是有效缩短心肌缺血再灌注时间窗,降低心肌组织氧耗,药物干预保护缺血心肌再灌注,缓解或防止再灌注损伤的发生^[12-13]。然而,药物防治 MIRI 仍然未能达到理想效果,需进一步探索开发新药物。

近期研究发现 AMI 患者体内精氨酸严重不足,但直接补充外源性精氨酸不能使患者临床获益^[3-5]。瓜氨酸作为 L- α -氨基酸,具有扩血管、降血压等作用^[14],在心血管疾病治疗领域有广泛的应用前景。瓜氨酸可通过瓜氨酸-NO 循环,参与细胞内精氨酸合成 NO 并发挥负性调节作用。机体内 NO 生成过多可介导氧化应激,导致 MIRI 时心肌损伤或凋亡,而瓜氨酸对 NO 有负反馈调节作用,并参与内源性精氨酸合成,可以有效补充 AMI 患者体内精氨酸,减轻 MIRI 导致的心肌损伤或凋亡^[5]。本研究结果显示,实验组兔血清中 CK、CK-MB 及 LDH 水平明显低于模型组,提示 L-瓜氨酸可减轻 MIRI 导致的急性心肌损伤。通过心肌组织病理分析也发现,L-瓜氨酸对 MIRI 兔心肌细胞具有保护作用,其具体机制尚未明确,可能与以下几方面有关:(1)抑制炎症反应。MIRI 可诱发炎症反应,而白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18 等炎症因子的活化和表达,可引起心肌损伤或凋亡^[15],导致 MIRI 加重。L-瓜氨酸可明显抑制机体内促炎性细胞因子的产生,并维持巨噬细胞的迁移^[16-17],从而抑制炎症反应,减轻心肌凋亡,发挥对 MIRI 兔心肌细胞的保护作用。(2)减轻氧化应激。MIRI 时心肌组织或细胞内可产生大量的活性氧(ROS),可影响线粒体功能,引起基因破坏甚至蛋白功能丧失,介导心肌细胞损伤的病理过程^[18],L-瓜氨酸可减少 ROS 的产生^[19],减轻 MIRI,从而保护心肌细胞。生理条件下 NO 作为体内重要的心血管内皮舒张因子,可以有效防止体内抗氧化剂的减少,减轻氧化应激损伤。因此,L-瓜氨酸可能通过改善 L-精氨酸/NO 途径,负性调控 NO 生成而减轻氧化应激,从而改善 MIRI^[20]。

综上所述,本研究提示补充 L-瓜氨酸对兔 MIRI 的保护作用与其抑制心肌细胞凋亡有关,这可为瓜氨酸在 MIRI 防治中的临床应用提供理论依据,L-瓜氨酸有望成为 MIRI 药物防治的潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, et al. Heart disease and stroke statistics—2020 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2020, 141(9):e139-e596.
- [2] 胡盛寿,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告2018》概要[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(3):209-220.
- [3] Molek P, Zmudzki P, Włodarczyk A, et al. The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):83.
- [4] Hayashi T. Prevention of the progression of atherosclerosis and aging through nitric oxide (NO)[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2020, 155(2):62-68.
- [5] Bahadoran Z, Mirmiran P, Kashfi K, et al. Endogenous flux of nitric oxide: Citrulline is preferred to Arginine[J]. *Acta Physiologica (Oxf)*, 2021, 231(3):e13572.
- [6] Lotz C, Stumpner J, Smul TM. Sevoflurane as opposed to propofol anesthesia preserves mitochondrial function and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129:110417.
- [7] 郑雪冰,王蕊,杨海玲,等.氯离子通道及其阻滞剂对家兔心肌缺血再灌注心律失常的影响[J]. *中华医学杂志*, 2013, 93(15):1168-1173.
- [8] 罗程,苗林,王红,等.急性ST段抬高型心肌梗死患者溶栓成功后最佳介入治疗时机的探讨[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(16):2230-2234.
- [9] Zhou H, Zhu P, Guo J, et al. Ripk3 induces mitochondrial apoptosis via inhibition of FUNDC1 mitophagy in cardiac IR injury[J]. *Redox Biol*, 2017, 13:498-507.
- [10] Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4):1650-1667.
- [11] Yang CF. Clinical manifestations and basic mechanisms of myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi*, 2018, 30(4):209-215.
- [12] McDougal AD, Dewey CJ. Modeling oxygen requirements in ischemic cardiomyocytes[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(28):11760-11776.
- [13] Wu SZ, Tao LY, Wang JN, et al. Amifostine pretreatment attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis and oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:4130824.
- [14] Gonzales JU, Raymond A, Ashley J, et al. Does l-citrulline supplementation improve exercise blood flow in older adults?[J]. *Exp Physiol*, 2017, 102(12):1661-1671.

(下转第 175 页)

- pathophysiology[J]. Basic Res Cardiol, 2017, 112(1):6.
- [24] Klier M, Gorressen S, Urbahn MA, et al. Enzymatic activity is not required for phospholipase D mediated TNF- α regulation and myocardial healing[J]. Front Physiol, 2018, 9:1698.
- [25] Fang J, Wang J, Chen F, et al. α 7nAChR deletion aggravates myocardial infarction and enhances systemic inflammatory reaction via mTOR-signaling-related autophagy[J]. Inflammation, 2019, 42(4):1190-1202.
- [26] Liu Q, Zhu LJ, Waaga-Gasser AM, et al. The axis of local cardiac endogenous Klotho-TGF- β 1-Wnt signaling mediates cardiac fibrosis in human[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 136:113-124.
- [27] Shu Z, Tan J, Miao Y, et al. The role of microvesicles containing microRNAs in vascular endothelial dysfunction[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(12):7933-7945.
- [28] Bernardo BC, Ooi JY, Lin RC, et al. miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart[J]. Future Med Chem, 2015, 7(13):1771-1792.
- [29] Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(1):5-20.
- (收稿:2019-10-14 修回:2022-02-23)
(本文编辑:胡晓静)

（ 上接第 168 页 ）

- [15] Ball DP, Taabazuing CY, Griswold AR, et al. Caspase-1 interdomain linker cleavage is required for pyroptosis[J]. Life Sci Alliance, 2020, 3(3):e202000664.
- [16] Dedja A, Gucciardi A, Giordano G, et al. Lipopolysaccharide-induced chorioamnionitis and postnatal lung injury: the beneficial effects of L-citrulline in newborn rats[J]. Exp Lung Res, 2018, 44(4/5):226-240.
- [17] Azeredo R, Machado M, Fontinha F, et al. Dietary arginine and citrulline supplementation modulates the immune condition and inflammatory response of European seabass[J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 106:451-463.
- [18] Guo X, Hong S, He H, et al. NF κ B promotes oxidative stress-induced necrosis and ischemia/reperfusion injury by inhibiting Nrf2-ARE pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 159:125-135.
- [19] Tsuboi T, Maeda M, Hayashi T. Administration of L-arginine plus L-citrulline or L-citrulline alone successfully retarded endothelial senescence[J]. PLoS One, 2018, 13(2):e0192252.
- [20] Figueroa A, Wong A, Jaime SJ, et al. Influence of L-citrulline and watermelon supplementation on vascular function and exercise performance[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2017, 20(1):92-98.
- (收稿:2021-08-21 修回:2022-03-06)
(本文编辑:胡晓静)