

Glycyl-glutamine dipeptide is better than single Gly or Gln, indicating that the protective effect on myocardial function after severe burns by Gln and Gly is synergistic.

[Key words] Burns; Glutamine; Glycine; Myocardium; Glycyl-glutamine dipeptide

烧伤后早期实施有效的心肌保护措施,对于纠正休克、防止组织器官缺血缺氧损害、延缓脏器的进一步损伤具有重要意义。甘氨酸因能减轻烧伤大鼠心肌损害^[1,2],目前已应用于临床。谷氨酰胺对心肌有较好的保护作用^[3,4],但其溶解度低,不能作为常规静脉用药,难以应用于烧伤后早期。谷氨酰胺二肽能很好地解决此问题,目前应用于临床的丙氨酰谷氨酰胺二肽,在促进谷氨酰胺溶解的同时却供给了大量的生糖氨基酸(丙氨酸),不利于控制烧伤患者的血糖水平。将谷氨酰胺和甘氨酸合成为甘氨酰谷氨酰胺二肽(简称甘谷二肽),能够解决上述问题。目前甘谷二肽主要用于肠道疾病的治疗,如肠痿、短肠综合征等,但鲜见有关它防治烧伤后心肌损害的报道。笔者观察甘谷二肽对严重烧伤大鼠心肌功能损害的疗效,并探讨其机制,以期对烧伤患者的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

谷氨酰胺、甘氨酸、腺苷一磷酸(AMP)、腺苷二磷酸(ADP)、腺苷三磷酸(ATP)标准品均购自美国 Sigma 公司。甘谷二肽由重庆北碚现代应用药物研究所提供(批号:050401)。还原型谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。二辛丁酸(BCA)蛋白测定试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.2 动物模型及分组

健康成年 Wistar 大鼠 136 只,体质量(200 ± 20)g,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供。随机数字表法将其分为:对照组 8 只、烧伤组 32 只、谷氨酰胺组 32 只、甘氨酸组 32 只和甘谷二肽组 32 只,实验前均禁食 12 h。对照组不予烧伤,其余 4 组大鼠经腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉,背部剃毛,称其质量后于剃毛区涂抹固体汽油燃烧 18 s,造成 30% TBSA III 度烧伤(经病理切片证实),伤后腹腔注射乳酸林格液 50 ml/kg 抗休克。谷氨酰胺组大鼠经胃灌注(甘氨酸组、甘谷二肽组腹腔注射)相应的氨基酸 1.0、0.5、1.5 g · kg⁻¹ · d⁻¹。为使 5 组大鼠摄入的营养物质等氮等热量,具有可比性,用补充酪氨酸的方法将总氨基酸供给量调整为 1.5 g · kg⁻¹ · d⁻¹,即前 4 组大鼠再分别经胃灌注酪氨酸 1.5、1.5、0.5、1.0 g ·

kg⁻¹ · d⁻¹。伤后大鼠单笼饲养,自由进食饮水。

1.3 检测指标

伤后 12、24、48、72 h 检测各致伤组大鼠下述各项指标,每时相点 8 只;对照组亦行相应检测。

1.3.1 心肌力学指标测定 经腹腔注射 200 g/L 乌拉坦麻醉大鼠(5 ml/kg),仰卧固定于解剖台,剪开颈部正中皮肤,分离出右颈总动脉,结扎远心端,从近心端将自制充满 100 U/ml 肝素等渗盐水的聚乙烯导管插入右心室,导管远端与三通管、压力换能器、载波放大器串联八导生理记录仪(RM-86 型,日本光电公司),并经计算机接口连接生物信号处理软件,信号稳定后记录主动脉收缩压(AOSP)、主动脉舒张压(AODP)及左心室收缩压(LVSP)、左心室压力变化最大上升速率(+dp/dtmax)。

1.3.2 心肌组织 GSH 含量的测定 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 含量。GSH 含量(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 ÷ 组织蛋白含量(g/L)。其中组织蛋白含量测定参照 BCA 法。

1.3.3 心肌组织 AMP、ADP、ATP 含量和细胞能荷(EC)的测定 取大鼠左心室,用在液氮中预冷的金属夹板将其夹成冰冻薄片。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,用 1 mol/L 氢氧化钾中和,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浴中进行。于离心半径 8 cm,3000 r/min 离心 15 min,上清液用直径 0.2 μm 微孔滤膜过滤,取 10 μl 滤液上柱分析 AMP、ADP、ATP 含量。EC = (ATP + ADP ÷ 2) ÷ (ATP + ADP + AMP)。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件包行单因素方差分析,部分数据行相关性分析。

2 结果

2.1 大鼠心肌组织 GSH 含量的变化

致伤后大鼠心肌组织中 GSH 含量普遍下降,48 或 72 h 降至最低,大部分时相点低于对照组($P < 0.01$);甘谷二肽组该指标较谷氨酰胺组、甘氨酸组

有明显改善。见表 1。

表 1 各组大鼠心肌组织还原型谷胱甘肽含量的比较 (mg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	伤后时间 (h)			
		12	24	48	72
烧伤组	32	60.5 ± 4.2 ^a	57.8 ± 0.5 ^a	54.9 ± 2.2 ^a	55.2 ± 1.4 ^a
		67.8 ± 3.8 ^{ac}	65.2 ± 0.9 ^{ac}	56.0 ± 1.6 ^{ab}	56.5 ± 1.4 ^a
谷氨酰胺组	32	66.8 ± 8.0 ^{ab}	66.7 ± 0.9 ^{ab}	58.9 ± 1.2 ^{ac}	58.4 ± 0.7 ^{ab}
		72.7 ± 1.7 ^{cef}	68.7 ± 0.3 ^{cd}	61.5 ± 0.6 ^{acd}	60.0 ± 0.7 ^{acdf}

注:对照组鼠数为 8 只,还原型谷胱甘肽含量为 (72.3 ± 3.4) mg/g;与对照组比较,a: P < 0.01;与烧伤组比较,b: P < 0.05, c: P < 0.01;与谷氨酰胺组比较,d: P < 0.05, e: P < 0.01;与甘氨酸组比较, f: P < 0.05, g: P < 0.01

2.2 大鼠心肌组织高能磷酸化合物含量的变化

致伤后大鼠心肌组织中 ATP 含量和 EC 普遍下降,48 或 72 h 降至最低,大部分时相点低于对照组 (P < 0.01);AMP 和 ADP 含量在伤后呈先上升后下降的趋势,72 h 降至低谷,大部分时相点高于对照组。见表 2。

2.3 大鼠心肌力学功能指标的变化

致伤后大鼠心肌力学功能指标均明显降低,48

或 72 h 降至低谷,各时相点均低于对照组 (P < 0.01);氨基酸组各项指标相同时相点下变化幅度普遍小于烧伤组,谷氨酰胺组普遍以 48 h 作用为明显,甘氨酸组普遍以 12 h 作用较为明显 (P < 0.05 或 P < 0.01);甘谷二肽组各项指标大部分时相点较谷氨酰胺和甘氨酸组变化幅度小。见表 3。

2.4 GSH 含量、ATP 含量、EC 与 +dp/dtmax 的关系

3 个指标均与 +dp/dtmax 呈显著正相关。直线方程:Y = 37.800 + 0.003X (r = 0.785, P < 0.01), Y = 0.013 + 1.290X (r = 0.614, P < 0.01), Y = 0.028 + 2.320X (r = 0.523, P < 0.01)。其中 Y 分别代表 GSH、ATP、EC 值,X 代表 +dp/dtmax 值。

3 讨论

严重烧伤会引起心功能不全,主要表现为心肌泵血功能下降,有效射血量减少,加之全身血液的再分布,可致组织器官(肾脏、肝脏及肠道等)缺血缺氧损害。长期以来人们一直认为心脏是血液供给充盈的器官,不存在缺血缺氧损害。笔者前期研究结果表明,烧伤后心脏同样存在缺血缺氧损害^[5,6]。有研究证实,严重烧伤后早期心脏出现灌流不足,可导致心肌器质性损害^[7,8],出现充血、水肿、点状乃至片状坏死等病理改变。由于心脏的特殊性,其损

表 2 各组大鼠心肌组织高能磷酸化合物含量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	腺苷一磷酸 (μmol/g)	腺苷二磷酸 (μmol/g)	腺苷三磷酸 (μmol/g)	细胞能荷
对照组	8	0.812 ± 0.048	0.043 ± 0.027	0.0253 ± 0.0024	0.0549 ± 0.0037
烧伤组					
伤后 12 h	8	0.977 ± 0.083 ^a	0.066 ± 0.064 ^a	0.0228 ± 0.0025 ^a	0.0516 ± 0.0035 ^a
伤后 24 h	8	0.892 ± 0.012 ^a	0.055 ± 0.049 ^a	0.0204 ± 0.0007 ^a	0.0430 ± 0.0016 ^a
伤后 48 h	8	0.900 ± 0.058 ^a	0.048 ± 0.029	0.0179 ± 0.0007 ^a	0.0330 ± 0.0019 ^a
伤后 72 h	8	0.810 ± 0.083 ^a	0.047 ± 0.026	0.0171 ± 0.0014 ^a	0.0333 ± 0.0035 ^a
谷氨酰胺组					
伤后 12 h	8	1.069 ± 0.055 ^a	0.059 ± 0.052 ^{ac}	0.0222 ± 0.0019 ^a	0.0422 ± 0.0026 ^{ac}
伤后 24 h	8	1.015 ± 0.027 ^{ac}	0.058 ± 0.052 ^{ab}	0.0229 ± 0.0011 ^{ab}	0.0445 ± 0.0019 ^{ab}
伤后 48 h	8	0.982 ± 0.064 ^{ac}	0.063 ± 0.050 ^{ac}	0.0255 ± 0.0010 ^{ac}	0.0454 ± 0.0033 ^{ac}
伤后 72 h	8	0.970 ± 0.045 ^{ac}	0.057 ± 0.035 ^{ac}	0.0220 ± 0.0008 ^{ac}	0.0373 ± 0.0015 ^{ab}
甘氨酸组					
伤后 12 h	8	1.112 ± 0.047 ^{ac}	0.063 ± 0.068 ^{ab}	0.0246 ± 0.0029 ^{ab}	0.0480 ± 0.0046 ^{ab}
伤后 24 h	8	0.968 ± 0.026 ^{ab}	0.061 ± 0.059 ^{ab}	0.0239 ± 0.0008 ^{ab}	0.0503 ± 0.0023 ^{ac}
伤后 48 h	8	0.993 ± 0.079 ^{ac}	0.058 ± 0.044 ^{ac}	0.0211 ± 0.0010 ^{ac}	0.0401 ± 0.0035 ^{ac}
伤后 72 h	8	0.901 ± 0.039 ^{ac}	0.053 ± 0.038 ^{ac}	0.0207 ± 0.0010 ^{ac}	0.0418 ± 0.0019 ^{ac}
甘氨酸谷氨酰胺二肽组					
伤后 12 h	8	1.192 ± 0.033 ^{acc}	0.064 ± 0.070 ^{abc}	0.0246 ± 0.0010 ^{abef}	0.0457 ± 0.0019 ^{acc}
伤后 24 h	8	1.078 ± 0.003 ^{ac}	0.061 ± 0.064 ^{acd}	0.0242 ± 0.0011 ^{acdf}	0.0499 ± 0.0016 ^{acdf}
伤后 48 h	8	1.038 ± 0.031 ^{aceg}	0.059 ± 0.051 ^{aceg}	0.0239 ± 0.0012 ^{aceg}	0.0441 ± 0.0020 ^{aceg}
伤后 72 h	8	0.932 ± 0.026 ^{ac}	0.055 ± 0.040 ^{ac}	0.0220 ± 0.0011 ^{acd}	0.0424 ± 0.0010 ^{acd}

注:与对照组比较,a: P < 0.01;与烧伤组比较,b: P < 0.05, c: P < 0.01;与谷氨酰胺组比较,d: P < 0.05, e: P < 0.01;与甘氨酸组比较, f: P < 0.05, g: P < 0.01

表 3 各组大鼠心肌力学功能指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	AOSP(kPa)	AODP(kPa)	LVSP(kPa)	+ dp/dtmax(kPa/s)
对照组	8	155.1 ± 4.0	124.9 ± 3.8	174.4 ± 11.3	9310 ± 555
烧伤组					
伤后 12 h	8	126.9 ± 7.4 ^a	102.6 ± 8.6 ^a	145.6 ± 3.6 ^a	7796 ± 625 ^a
伤后 24 h	8	120.9 ± 5.6 ^a	96.1 ± 7.1 ^a	144.1 ± 12.3 ^a	7576 ± 659 ^a
伤后 48 h	8	123.5 ± 15.0 ^a	90.4 ± 11.2 ^a	126.9 ± 15.9 ^a	5322 ± 484 ^a
伤后 72 h	8	117.4 ± 5.4 ^a	93.4 ± 5.0 ^a	119.2 ± 2.1 ^a	4717 ± 698 ^a
谷氨酰胺组					
伤后 12 h	8	122.8 ± 5.8 ^{ab}	104.3 ± 8.0 ^{ab}	143.3 ± 5.2 ^{ab}	8172 ± 815 ^{ac}
伤后 24 h	8	131.6 ± 5.1 ^{ac}	103.5 ± 2.8 ^{ac}	143.7 ± 17.7 ^{ab}	7052 ± 412 ^{ab}
伤后 48 h	8	132.6 ± 10.8 ^{ac}	105.0 ± 9.8 ^{ac}	147.7 ± 13.3 ^{ac}	6500 ± 1029 ^{ac}
伤后 72 h	8	111.7 ± 11.4 ^{ab}	89.6 ± 7.8 ^{ac}	121.4 ± 14.3 ^{ab}	5229 ± 853 ^{ab}
甘氨酸组					
伤后 12 h	8	135.2 ± 2.5 ^{ac}	105.2 ± 5.6 ^{ab}	140.5 ± 4.1 ^{ab}	8229 ± 340 ^{ac}
伤后 24 h	8	139.2 ± 2.9 ^{ac}	110.0 ± 2.9 ^{ac}	147.1 ± 5.4 ^{ab}	7422 ± 165 ^{ab}
伤后 48 h	8	126.6 ± 1.4 ^{ab}	106.1 ± 4.9 ^{ac}	142.1 ± 7.6 ^{ac}	6921 ± 379 ^{acd}
伤后 72 h	8	120.3 ± 4.8 ^{ab}	96.8 ± 5.7 ^{ab}	123.1 ± 3.7 ^{ac}	4974 ± 206 ^{ab}
甘氨酸谷氨酰胺二肽组					
伤后 12 h	8	134.4 ± 1.6 ^{acef}	113.1 ± 4.4 ^{acef}	142.0 ± 3.5 ^{ace}	8308 ± 152 ^{ace}
伤后 24 h	8	140.2 ± 2.8 ^{acdf}	108.4 ± 4.8 ^{acd}	151.4 ± 5.4 ^{ac}	8034 ± 331 ^{acef}
伤后 48 h	8	134.2 ± 2.5 ^{acef}	111.1 ± 2.4 ^{acef}	143.8 ± 4.8 ^{acdf}	7276 ± 194 ^{acef}
伤后 72 h	8	130.4 ± 5.5 ^{ac}	104.7 ± 3.1 ^{ac}	128.4 ± 8.4 ^{ac}	5999 ± 346 ^{ac}

注:AOSP为主动脉收缩压,AODP为主动脉舒张压,LVSP为左心室收缩压,+ dp/dtmax为左心室压力变化最大上升速率;与对照组比较,a: $P < 0.01$;与烧伤组比较,b: $P < 0.05$,c: $P < 0.01$;与谷氨酰胺组比较,d: $P < 0.05$,e: $P < 0.01$;与甘氨酸组比较,f: $P < 0.01$

害不仅可引起心功能不全,而且还可诱发或加重休克,进一步造成全身其他组织器官的缺血缺氧损害。因此,如何减轻心肌组织受损程度、延缓心功能下降,是改善烧伤后组织灌注、减轻脏器损害、防止内脏并发症的重要课题。烧伤后血容量下降、组织灌注不良、心脏缺血缺氧,不仅使氧供给减少,且营养底物供应减少,造成心肌能量合成障碍。此外,烧伤后失控性炎症反应产生的大量自由基可引起心肌线粒体结构损伤和功能下降,细胞线粒体氧化酶活性下降,氧化磷酸化脱耦联,导致细胞能量代谢障碍,从而引起心肌能量供给不足^[9,10]。现已知,组织内GSH可以修复蛋白中损伤的二硫键和DNA前体,并通过清除自由基和活性氧的方式保护细胞^[11]。

尽管心肌细胞主要依靠葡萄糖供给能量,但一些特殊氨基酸及其代谢产物可以维持心肌细胞正常能量代谢,具有重要的细胞保护作用。谷氨酰胺对缺血再灌注心肌的保护作用,主要包括促进GSH合成、减轻自由基对心肌细胞线粒体的损害、保护线粒体呼吸功能、调节线粒体氧化磷酸化、改善心肌能量代谢,可作为心肌保护剂用于缺血性心脏病的急救^[12-14]。甘氨酸是人体内一种非必需氨基酸,有抗炎、免疫调节和细胞保护作用^[15-18]。周军利等^[1,2]的研究结果已经证实,甘氨酸对离体和在体的心肌细胞具有显著的保护作用。

本实验采用的心肌力学指标包括AOSP、AODP、LVSP和+ dp/dtmax。其中AOSP和AODP主要反映心脏后负荷和外周血管阻力,LVSP反映心肌纤维最大收缩力,+ dp/dtmax则反映心脏的最大收缩速度。本实验结果提示,烧伤后AOSP、AODP、LVSP和+ dp/dtmax不同程度下降,心肌细胞内GSH、ATP和EC值明显下降;伤后给予谷氨酰胺、甘氨酸及甘谷二肽,以上指标均可得到不同程度的改善。高能磷酸化合物作为细胞的能量物质,直接影响心肌细胞的活性和收缩功能。相关性分析显示,组织GSH、ATP含量和EC与心肌收缩功能指标呈显著正相关。因此笔者认为,谷氨酰胺、甘氨酸及甘谷二肽对烧伤后心肌的保护作用,是通过促进组织GSH的合成、降低其消耗,进而改善细胞能量代谢得以实现。本研究结果表明,使用甘谷二肽较单独使用谷氨酰胺或甘氨酸疗效更为显著,提示它对保护烧伤后心脏功能具有协同效应,对心肌功能损害的防治具有重要意义,其疗效有待进一步验证。

参考文献

- [1] 周军利,党永明,张家平,等.甘氨酸对重度烧伤后大鼠早期心肌组织的保护作用观察.第三军医大学学报,2005,27(12):1250-1252.
- [2] 周军利,黄跃生,党永明,等.甘氨酸对缺氧大鼠心肌细胞的保护作用及机制.中华烧伤杂志,2005,21(5):329-332.
- [3] 王虹,于宪一,孙梅,等.谷氨酰胺对脓毒症幼年大鼠心肌基

质金属蛋白酶及其组织抑制因子的影响. 中华儿科杂志, 2006, 44(8):587-591.

[4] 王虹, 潘静坤, 孙梅, 等. 谷氨酰胺对内毒素血症幼年大鼠心肌肌动蛋白及其 mRNA 表达的影响. 中华儿科杂志, 2005, 43(12):925-929.

[5] 黄跃生, 杨宗城, 迟路湘, 等. 烧伤后“休克心”的研究. 中华烧伤杂志, 2000, 16(5):275-278.

[6] Huang Y, Li Z, Yang Z. Roles of ischemia and hypoxia and the molecular pathogenesis of post-burn cardiac shock. Burns, 2003, 29(8):828-833.

[7] Huang YS, Yang ZC, Yan BG, et al. Improvement of early postburn cardiac function by use of Panax notoginseng and immediate total eschar excision in one operation. Burns, 1999, 25(1):35-41.

[8] Iliopoulou E, Markaki S, Poulikakos L. Autopsy findings in burn injuries. Arch Anat Cytol Pathol, 1993, 41(1):5-8.

[9] Horton JW, Garcia NM, White DJ, et al. Post-burn cardiac contractile function and biochemical markers of post-burn cardiac injury. J Am Coll Surg, 1995, 181(4):289-298.

[10] Chen ZR, Lou SF. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by D1, an organic solvent extractable component from burn eschar. Burns, 1994, 20(4):311-315.

[11] Arrick BA, Nathan CF. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. Cancer Res, 1984, 44(10):4224-4232.

[12] Khogali SE, Harper AA, Lyall JA, et al. Effects of L-glutamine on post-ischaemic cardiac function: protection and rescue. J Mol Cell Cardiol JT, 1998, 30(4):819-827.

[13] Khogali SE, Pringle SD, Weryk BV, et al. Is glutamine beneficial in ischemic heart disease? Nutrition, 2002, 18(2):123-126.

[14] Wischmeyer PE, Vanden Hoek TL, Li C, et al. Glutamine preserves cardiomyocyte viability and enhances recovery of contractile function after ischemia-reperfusion injury. J Parenter Enteral Nutr, 2003, 27(2):116-122.

[15] Weinberg JM, Venkatachalam MA, Garzo-Quintero R, et al. Structural requirements for protection by small amino acids against hypoxic injury in kidney proximal tubules. FASEB J, 1990, 4(15):3347-3354.

[16] 戚仁斌, 陆大祥, 王华东, 等. 甘氨酸对内毒素所致心肌损伤的影响. 中国病理生理杂志, 2001, 17(8):803.

[17] Wheeler M, Stachlewitz RF, Yamashina S, et al. Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. FASEB J, 2000, 14(3):476-484.

[18] Tijssen MJ, Peters SM, Bindels RJ, et al. Glycine protection against hypoxic injury in isolated rat proximal tubules: the role of proteases. Nephrol Dial Transplant, 1997, 12(12):2549-2556.

(收稿日期:2007-03-28)

(本文编辑:莫愚)

中华烧伤杂志第二届编辑委员会名单

(以下按姓氏笔画顺序)

名誉总编辑	肖光夏										
顾问	史济湘	盛志勇									
总编辑	汪仕良										
副总编辑	邓诗琳	孙永华	许伟石	陈璧	郭振荣						
常务委员	邓诗琳	孙永华	许伟石	陈璧	汪仕良	杨宗城	周一平	郭振荣			
	黄跃生	葛绳德									
委员	王玉莲	王振国	王德昌	邓诗琳	邓津菊	牛希华	方培耀	付小兵			
	付晋凤	刘毅	刘友生	刘旭盛	孙永华	许伟石	朱志祥	齐顺贞			
	吴军	吴伯瑜	李迟	李小兵	李国辉	李宗瑜	李学拥	岑瑛			
	陈璧	陈玉林	谷才之	利天增	汪仕良	杨红明	杨宗城	张国安			
	张明良	陆树良	阎汝蕴	周一平	林礼根	邴京宁	贺光照	姚咏明			
	贾赤宇	郭振荣	柴家科	夏照帆	曹丽萍	梁秉中	黄晓元	黄跃生			
	谢卫国	彭代智	彭毅志	韩春茂	葛绳德	解伟光	蔡宝仁	廖镇江			
	薛宝升	Basil A. Pruitt(美国)	David N. Herndon(美国)								