doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.12.002

心肌梗死后心衰大鼠血液中同型半胱氨酸的变化及意义

孟伟栋[1,2#] 徐 斌[1#] 刘潇潇[1] 赵艳镯[1] 秦春焕[1] 王 毅[1] 韩晓玲[1△] 李红莉[1△]

（1 上海交通大学附属第一人民医院心内科 上海 200080；2 上海交通大学医学院 上海 200025 ）

摘要 目的：研究同型半胱氨酸在心肌梗死后心衰大鼠血液中的变化及意义。**方法：**通过结扎大鼠左冠状动脉前降支的方法建立心梗后心衰动物模型。成年雄性 SD 大鼠随机分为假手术对照组(Sham)，心衰组(HF 组)，每组 7 只。对各组大鼠行心脏超声及血流动力学检查评价心功能，分别测定左室射血分数（Left ventricular ejection fraction, LVEF），左室短轴缩短率（left ventricular fractional shorting，LVFS），动脉收缩压(Systolic blood pressure，SBP)，舒张压(Diastolic blood pressure，DBP)，左室舒张末压(Left ventricular end-diastolic pressure LVEDP)。上述检查完成后处死大鼠，收集血液标本检测脑钠肽(B-type natriuretic peptide，BNP)，同型半胱氨酸(Homocysteine，Hcy)，肌酐(Creatinine，Cr)，尿酸(Uric Acid，UA)，叶酸(Folic acid，Fa)水平；测定梗死周边区心肌组织超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase，SOD)活性及丙二醛(Malondialdehyde，MDA)含量。**结果：**与对照组相比，心衰组 LVEF，LVFS 显著降低；LVEDP 增高；BNP、Hcy、Cr 和 UA 水平比正常组升高，SOD 活性明显下降，MDA 含量明显升高(均 P<0.05)。**结论：**同型半胱氨酸可能促使心肌梗死后心力衰竭发展。

关键词：心力衰竭；同型半胱氨酸；脑钠肽；大鼠

中图分类号：R-33; R542.22; R541.6+1 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2017)12-2205-04

Change and Significance of Homocysteine in Heart Failure Post Myocardial Infarction in Rat

MENG Wei-dong[1,2#], XU Bin[1#], LIU Xiao-xiao[1], ZHAO Yan-zhuo[1], QIN Chun-hua[1], WANG Yi[1], HAN Xiao-ling[1△], LI Hong-li[1△]

(1 Department of Cardiology, Shanghai General Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200080, China; 2 Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China)

ABSTRACT Objective: To study change and significance of homocysteine in heart failure (HF) post myocardial infarction in rat. **Methods:** HF model was induced in Sprague Dawley (SD) rats by ligation of the left anterior descending coronary artery. Male SD rats were randomly divided into 2 groups: Sham group, HF group. Cardiac function was assessed by echocardiography and cardiac catheterization. Left ventricular ejection fraction (LVEF) and fractional shortening (LVFS) were calculated; systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) were recorded. After echocardiographic study and haemodynamic measurement, rats were killed and blood samples were collected to detect the levels of the B-type natriuretic peptide (BNP), Homocysteine(Hcy), Creatinine(Cr), Uric Acid(UA), Folic acid(Fa). The activity of superoxide dismutase (SOD) and the level of malondialdehyde (MDA) in peri-infarct zone were also examined. **Results:** In comparison to the normal group, HF significantly decreased the LVEF and LVFS (P<0.05). The LVEDP in the HF group was higher than that in the normal group (P<0.05). The plasma BNP, Hcy, Cr, UA levels were increased in the HF group (P<0.05). Moreover, compared with the normal group, the SOD activity in the peri-infarct zone of HF group was significantly decreased, while the MDA level was significantly increased (P<0.05). **Conclusion:** The homocysteine may promote heart failure development post myocardial infarction.

Key Words: Heart failure; Homocysteine; B-type natriuretic peptide; Rat

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R542.22; R541.6+1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)12-2205-04

前言

心肌梗死是心力衰竭(heart failure, HF)的常见原因之一。心肌梗死后，患者常伴有心脏收缩功能的下降，导致外周组织的供血不足，继而可激活一系列的神经内分泌系统，如交感神经系统，肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统等。长此以往，可进一步引起心肌细胞的受损，心肌重构和纤维化，最终导致心脏功能的恶化，出现严重的心力衰竭。心肌梗死合并其它一些危险

作者简介：孟伟栋(1974-)，本科，主治医师，研究方向：冠心病和起搏电生理临床诊治，E-mail: mikemeng74@163.com，电话：13701914619；
徐斌 (1989-)，硕士，住院医师，研究方向：心力衰竭诊治

为共同第一作者

△ 通讯作者：李红莉，E-mail: drhonglili@126.com，电话：021-63240090-3051；
韩晓玲，E-mail: 13371989275@163.com，电话：021-63240090-6212

（收稿日期：2016-09-28 接受日期：2016-10-20）

因素可使心力衰竭的发生成倍的增长，这些危险因素包括左心室肥厚，心脏瓣膜疾病，高血压，糖尿病，吸烟，肥胖和血脂异常[1]。最近，血浆同型半胱氨酸（homocysteine，Hcy）被认为是预测冠心病，心力衰竭的的独立危险因素[2]。本研究主要目的是观察同型半胱氨酸在心肌梗死后心衰大鼠中的变化及意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性 Sprague Dawley（SD）大鼠，2.5 月大，体重 140-180 g，饲养 1 个月，体重达 280-320 g 后开始进行实验。将大鼠随机分成假手术对照组和心衰组，每组 7 只。本实验采用冠状动脉结扎法制作大鼠心肌梗死后心衰模型[3]。各组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉（40 mg/kg），气管插管，连接小动物呼吸机辅助呼吸。在大鼠四肢皮下刺入电极，连接 BL-420E 实验动物机能系统，术中持续心电监测。在第 3 肋间打开胸腔，暴露心脏，撕破心包，探查确定左心耳与肺动脉圆锥，于左心耳及肺动脉圆锥夹角下方 2 mm 处进针，连同心肌一同结扎前降支。观察大鼠心电图，确定Ⅱ导联 T 波增高，甚至与 QRS 波融合，表明造模成功。假手术对照组只开胸，不结扎冠状动脉，心衰组结扎冠状动脉。

1.2 大鼠心脏超声及血流动力学检查

取胸骨旁短轴切面，于左室乳头肌水平以 M 型超声（VisualSonics Vevo770）模式下记录左室收缩末期内径，舒张末期内径，进而计算 EF 和 FS。EF 和 FS 计算公式如下：FS%=（左室舒张末期内径 - 左室收缩末期内径）/ 左室舒张末期内径× 100 %; EF%=（左室舒张末期容积 - 左室收缩末期容积）/ 左室舒张末期容积× 100 %。用 PE50 导管插入右颈总动脉，持续记录动脉血压 30 min，计算其平均值。

1.3 测定血浆 BNP、Hcy、肌酐、尿酸和叶酸水平

将大鼠过量麻醉处死，收集血液于肝素抗凝试管中。血标本立即以 3000 r/min 离心 15 min，并取上清，离心机型号为 eppendorf 5810。应用 BNP ELISA 试剂盒（美国 R&D 公司）测定血浆 BNP 水平。具体试验步骤依据产品说明书。应用 Hcy ELISA 试剂盒（武汉华美生物工程有限公司）测定血浆 Hcy 水平。尿酸，肌酐和叶酸分别使用尿酸酶比色法，酶法和化学发光法检测。使用 COBAS8000 大型生化仪检测尿酸和肌酐，使用西门子 XP 免疫化学发光仪检测叶酸。

1.4 心肌组织 SOD 活性测定

将保存在冰箱中的冻存组织取出，在电子天平上称取 50 mg 组织，加入 450 μL 生理盐水，制成 10%的组织匀浆。应用 SOD 活性试剂盒（美国 R&D 公司）测定血浆 SOD 活性。具体试验步骤依据产品说明书。从测试管和对照管中取适量溶液加入酶标板中，于波长 550 nm 处测定 OD 值。组织匀浆中 SOD 的活力按以下公式计算：SOD 活力 =（对照 OD 值－测定 OD 值）/ 对照 OD 值÷ 50%× 反应液总体积 / 取样量÷ 待测样本蛋白浓度。

1.5 心肌组织 MDA 含量测定

将保存在冰箱中的冻存组织取出，在电子天平上称取 50 mg 组织，加入 450 μL 生理盐水，制成 10 %的组织匀浆。应用 MDA 含量试剂盒测定血浆 MDA 含量。具体试验步骤依据产品说明书。从空白管，标准管，测定管中取适量溶液加入酶标板中，于波长 532 nm 处测定 OD 值。组织匀浆中 MDA 的含量按以下公式计算：组织中 MDA 含量 =（测定 OD 值－空白 OD 值）/（标准 OD 值－空白 OD 值）× 10 nmol/mL÷ 待测样本蛋白浓度。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析，正态计量资料以均数± 标准差（$\bar{X}$± S）表示，非正态计量资料用中位数（四分位数）表示，正态计量资料用独立样本 t 检验，非正态计量资料用 u 检验。

2 结果

2.1 两组大鼠左室收缩功能检查结果

HF 组的 LVEF（87.71± 4.03% vs. 25.13± 2.44%；P< 0.05）和 LVFS（59.17± 5.36% vs. 12.37± 1.52%；P< 0.05 ）均比对照组有显著的降低，见图 1。

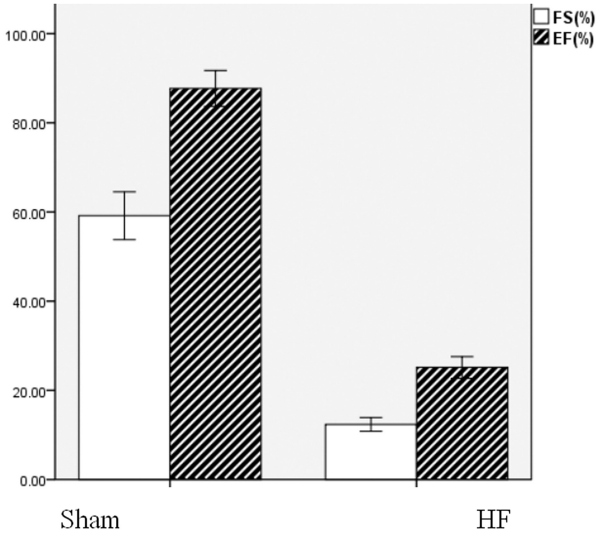

图 1 两组大鼠心超检查结果比较

Fig. 1 Comparison of echocardiography between the two groups

2.2 两组大鼠血流动力学结果

HF 组大鼠的 LVEDP 比对照组增高（P<0.05），HR、SBP、DBP 无明显的差异，见表 1。

2.3 两组大鼠的各项血液指标结果

HF 组的 BNP、Hcy、Cr 和 UA 水平比对照组明显增高（P<0.05），但 HF 组 Fa 水平没有显著性改变，见表 2。

2.4 两组大鼠的心肌 SOD 活性和 MDA 含量测定结果

HF 组大鼠 SOD 活性比 Sham 组大鼠显著下降，MDA 含量比对照组大鼠显著升高，（见表 3，P<0.05）。

3 讨论

随着经皮冠状动脉介入治疗在急性心肌梗死的治疗中的广泛运用，急性心肌梗死的预后目前得到明显的改善。但是受到各种危险因素的影响，合并有左心室肥厚、瓣膜病、高血压、糖尿病、吸烟、肥胖和血脂紊乱的患者出现心力衰竭的可能性成倍的增加[4]。

表 1 两组大鼠血流动力学的结果

Table 1 Comparison of haemodynamics between two groups

	BW(g)	HR(bpm)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	LVEDP(mmHg)
Sham	383.14± 7.54	368.71± 8.6	135.57± 11.82	89.86± 5.15	5.21± 2.15
HF	386.43± 11.66	370.00± 12.42	134.86± 9.84	84.57± 5.22	20.57± 2.88[a]

注:a P<0.05 与假手术组比较。

Note:a 与 P<0.05 compared with Sham group.

表 2 两组大鼠各项血液指标结果

Table 2 Comparison of laboratory values between two groups

	BNP(pg/mL)	Hcy(nmol/mL)	Fa(ng/mL)	Cr(μmol/L)	UA(μmol/L)
Sham	154.41± 31.22	77.65± 65.76	78.59± 12.8	22.14± 4.22	80.29± 22.92
HF	1124.52± 137.87	206.59± 102.5[a]	95.06± 28.19	37.71± 15.24a	227.71± 130.62[a]

注:[a] P<0.05 与假手术组比较。

Note: a 与 P<0.05 compared with Sham group.

表 3 两组大鼠的心肌 SOD 活性和 MDA 含量结果

Table 3 Comparison of the SOD activity and MDA level between two groups

	SOD(U/mg·prot)	MDA(nmol/mg·prot)
Sham	401.67± 24.92	1.01± 0.28
HF	287.46± 72.16[a]	1.47± 0.76[a]

注:a P<0.05 与假手术组比较。

Note: a 与 P<0.05 compared with Sham group.

1969 年 Mccully 从遗传性同型半胱氨酸尿症死亡的儿童尸检中发现,其体循环内存在广泛的动脉血栓及动脉粥样硬化的病理表现,由此提出了高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)可导致动脉粥样硬性血管性疾病的假说。Hcy 是一种含巯基的氨基酸,主要来源于饮食摄取的蛋氨酸,是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中一个重要的中间产物,其本身不参与蛋白质的合成。在体内,约 1/2 的 Hcy 和甲基四氢叶酸在蛋氨酸合成酶(Methionine Synthase reductase MS)的作用下,生成蛋氨酸和四氢叶酸,此过程需要叶酸和维生素 B12 参与;其余的通过转硫基途径,即 Hcy 和丝氨酸在胱硫醚 β 合成酶(Cystathionineβ-synthase CBS)作用下形成胱硫醚,一部分在胱硫醚裂解酶的作用下形成半胱氨酸,最后生成丙酮酸、硫酸和水,此过程需要维生素 B6 为辅因子及丝氨酸羟甲基转移酶,另一部分则生成同型丝氨酸[5,6]。目前流行病学研究提示 Hcy 是新型心血管疾病危险因素之一,血浆 Hcy 水平和心力衰竭的严重程度明显相关[7-9]。急性心肌梗死的患者中 Hcy 水平升高可能和心力衰竭的发生相关[10,11]。但是 Hcy 是否能预测疾病的发生,促进疾病的恶化,影响疾病的长期预后仍有争议[12-14]。通过补充 B 族维生素来降低 Hcy 水平并不能减少心血管疾病的发生[15,16]。动物实验研究提示 Hcy 有明显的致病作用,可导致心室重构,心功能的恶化。通过降低 Hcy 的血浆水平,可改善冠状动脉的内皮细胞功能[17],可促进心肌梗死的修复,改善心肌重构,改善左室的舒张功能[18]。Hcy 可通过氧化应激和激活机制金属酶损伤血管内皮细胞和血管功能,促进凝血,血小板的黏附和聚集,抑制纤溶活性,促进血栓形成,加重炎症反应,导致心肌细胞肥大和心肌组织损伤,参与心肌重构[19]。SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着重要的作用,它能清除超氧阴离子自由基保护细胞免受损伤;MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸而产生的,它能反映机体脂质过氧化程度[20]。本实验观察到 HF 组的血浆 Hcy 水平和正常组比较有明显的升高,这和其他临床试验一致,提示了 Hcy 可能参与了心力衰竭的发生和发展。本实验还观察到了心衰组大鼠梗死周边区心肌 MDA 含量升高,而 SOD 活性显著下降,因此推测心肌梗死是氧化应激效应增强,Hcy 可能在起到了重要的作用。

总之,本研究显示,心肌梗死后心衰的大鼠中,血浆 Hcy 水平明显上升,其可能使氧化应激效应增强,从而发挥其致病作用。Hcy 是否为心血管疾病的发生和发展原因之一,目前还不能完全确定,需要更多的临床研究来证实。

参 考 文 献(References)

[1] Ingelsson E, Arnlov J, Sundstrom J, et al. Novel metabolic risk factors for heart failure [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2005, 46(11): 2054-2060

[2] Laraqui A, Bennouar N, Meggouh F, et al. Homocysteine, lipoprotein (a): risk factors for coronary heart disease [J]. Annales de biologie clinique, 2002, 60(5): 549-557

[3] Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals [J]. Annals of surgery, 1954, 140(5): 675-682

[4] Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, et al. Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group[J]. Circulation, 2008, 117(19): 2544-2565

[5] Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation [J]. European journal of pediatrics,1998,157 (Suppl 2): S40-44

[6] Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine [J]. The international journal

of biochemistry & cell biology, 2000, 32(4): 385-389

[7] Vasan RS, Beiser A, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction[J]. Jama, 2003, 289(10): 1251-1257

[8] Gravina-Taddei CF, Batlouni M, Sarteschi C, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for coronary atherosclerotic diseases in the elderly[J]. Arquivos brasileiros de cardiologia, 2005,85 (3): 166-173

[9] Herrmann W, Herrmann M, Joseph J, et al. Homocysteine, brain natriuretic peptide and chronic heart failure: a critical review [J]. Clinical chemistry and laboratory medicine, 2007, 45(12): 1633-1644

[10] Agoston-Coldea L, Mocan T, Gatfosse M, et al. Plasma homocysteine and the severity of heart failure in patients with previous myocardial infarction[J]. Cardiology journal, 2011, 18(1): 55-62

[11] Tobin AM, Hughes R, Hand EB, et al. Homocysteine status and cardiovascular risk factors in patients with psoriasis: a case-control study[J]. Clinical and experimental dermatology, 2011, 36(1): 19-23

[12] Naono S, Tamura A, Kadota J. Plasma homocysteine level is unrelated to long-term cardiovascular events in patients with previous percutaneous coronary intervention [J]. Journal of cardiology, 2009, 54(1): 21-28

[13] Verdoia M, Schaffer A, Barbieri L, et al. Homocysteine and risk of periprocedural myocardial infarction in patients undergoing coronary stenting [J]. Journal of cardiovascular medicine (Hagerstown, Md), 2015, 16(2): 100-105

[14] Troughton JA, Woodside JV, Young IS, et al. Homocysteine and coronary heart disease risk in the PRIME study [J]. Atherosclerosis, 2007, 191(1): 90-97

[15] Marti-Carvajal AJ, Sola I, Lathyris D, et al. Homocysteine lowering interventions for preventing cardiovascular events [J]. The Cochrane database of systematic reviews, 2009, (4): Cd006612

[16] Marti-Carvajal AJ, Sola I, Lathyris D. Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events [J]. The Cochrane database of systematic reviews, 2015, 1: Cd006612

[17] Qipshidze N, Metreveli N, Lominadze D, et al. Folic acid improves acetylcholine-induced vasoconstriction of coronary vessels isolated from hyperhomocysteinemic mice: an implication to coronary vasospasm [J]. Journal of cellular physiology, 2011, 226 (10): 2712-2720

[18] Muthuramu I, Jacobs F, Singh N, et al. Selective homocysteine lowering gene transfer improves infarct healing, attenuates remodelling, and enhances diastolic function after myocardial infarction in mice[J]. PloS one, 2013, 8(5): e63710

[19] Finch JM, Joseph J. Homocysteine, cardiovascular inflammation, and myocardial remodeling[J]. Cardiovascular & hematological disorders drug targets, 2010, 10(4): 241-245

[20] Kwiecien S, Jasnos K, Magierowski M, et al. Lipid peroxidation, reactive oxygen species and antioxidative factors in the pathogenesis of gastric mucosal lesions and mechanism of protection against oxidative stress - induced gastric injury [J]. Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society, 2014, 65(5): 613-622