

左卡尼汀对血清饥饿诱导心肌细胞凋亡的保护作用

焦洪志

(锦州市卫生学校, 辽宁 锦州 121000)

摘要: 目的 研究左卡尼汀对血清饥饿诱导心肌细胞凋亡的保护作用。方法 新生大鼠心肌细胞分为正常组、模型组和不同剂量左卡尼汀 (20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 治疗组。MTT 法测定细胞存活率, 流式细胞仪测心肌细胞的凋亡指数, Western blot 法检测心肌细胞内半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 表达水平。结果 左卡尼汀明显抑制血清饥饿诱导的心肌细胞凋亡, 表现为细胞存活率升高, 凋亡率下降, caspase-3 表达降低。结论 左卡尼汀对血清饥饿诱导的心肌细胞凋亡具有一定的保护作用。

关键词: 左卡尼汀; 血清饥饿; 心肌细胞; 凋亡

中图分类号: R963 文献标志码: A 文章编号: 1674-0424(2013)06-0001-02

The Protective Effect of L-Carnitine on Cardiomyocytes Apoptosis Induced by Serum Deprivation

JIAO Hongzhi

(Jinzhou Medical School, Jinzhou 121000 China)

Abstract: Objective To explore the protective effect of L-carnitine on serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes. **Methods** Cultured neonatal cardiomyocytes were divided into normal group, model group and treatment group with different doses of L-carnitine (20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The cell viability was determined by MTT assay. Apoptosis index was determined by flow cytometry. Caspase-3 was investigated by western blot. **Results** L-carnitine showed the foundation of protective effect expressed as increased cell viability and decreased apoptosis index and caspase-3 expression.

Conclusion L-carnitine has the protective effect on cardiomyocytes apoptosis induced by serum deprivation.

Key words: L-carnitine; serum deprivation; cardiomyocytes; apoptosis

心肌细胞为终末分化细胞, 没有再生增殖能力, 长期慢性的凋亡使其数量逐渐减少会导致心脏泵功能降低直至心力衰竭, 因此对心肌凋亡防治至关重要。左卡尼汀 (L-carnitine) 又称左旋肉碱, 是哺乳动物能量代谢必需的体内天然物质, 对细胞中能量的产生和转运起重要作用。左卡尼汀能促进脂肪酸经 β -氧化进入三羧酸循环, 产生能量, 与机体的器官、组织代谢密切相关。研究发现其可有效预防恶性肿瘤导致的恶液质、体重减轻^[1]、保护神经细胞免受缺血缺氧损伤^[2], 同时对心血管系统具有一定的保护作用^[3-4]。本实验旨在利用细胞模型进一步探讨左卡尼汀对心血管系统的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物药品与试剂 出生 2~3 d 的 SD 大鼠乳鼠, 雌雄不拘, 由辽宁医学院实验动物中心提供,

动物合格证号: scxK (辽) 2003-0007。左卡尼汀为沈阳东宁精细化工有限公司产品; 低糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶均购自美国 Sigma 公司; Caspase-3 一抗为 Promega 公司产品; 小牛血清为杭州四季青生物材料研究所产品。其他试剂均为分析纯。

1.2 体外心肌细胞培养分组及给药 在无菌条件下取出大鼠乳鼠心脏, 用 D-Hank 液冲洗 3 次后剪成约 1 mm^3 大小的碎块, 加入 $0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化细胞, 取消化完毕后的细胞离心, 去除上清液后, 沉淀用吸管吹开后, 加入培养基继续离心。收集两次离心后的细胞加入体积分数为 0.15 的小牛血清, 0.84 的 DMEM 培养基, 及 0.01 的双抗液 (含 $1\times 10^5\text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ 青霉素, $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素) 的培养基, 吹打均匀后以 $0.5\times 10^8\text{ L}^{-1}$ 的密度接种于 24 孔培养板, 送入通以体积分数为 0.05 CO_2 及 0.95 空气的二氧化碳孵箱中培养。常规培养 2 天后, 血清饥饿组即去除培养

作者简介: 焦洪志 (1957), 男, 辽宁锦州人, 助理实验师, 主要研究方向为心血管药理学。

心肌细胞培养液中的小牛血清,使心肌细胞在一定的时间内处于无血清状态,制造缺乏生长因子的环境而诱导心肌细胞凋亡。实验分为:(1)正常组;(2)模型组;(3)左卡尼汀 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$;(4)左卡尼汀 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$;(5)左卡尼汀 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.3 MTT 法测定细胞的存活率 细胞接种于 96 孔板中,孵育 24 h 后加入 5 g/L MTT 试剂 20 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱中孵育 4 h 后去除培养基后,加入 150 μL DMSO 溶解结晶体,轻轻晃动 15 ~ 20 min 后,酶标仪在波长为 570 nm 处测定吸光度 (A) 值,用此表示细胞的存活率。

1.4 流式细胞仪测定细胞凋亡率 用 2.5 g \cdot L 胰蛋白酶消化各组细胞, PBS 洗涤 2 次,并调整细胞密度为每孔 1×10^6 个,制成单细胞悬液,用 PBS 清洗离心 2 次,加入 10 μL 的 AnnexinV - FITC 和 5 μL 溴化碘啶 (PI),轻轻混匀,在 1 h 内使用,由流式细胞仪 (FACS CALIBUR, 美国 BD 公司) 进行测定。所得数据经 Bioconsort 专用软件处理,分析细胞凋亡率。

1.5 Western blot 测定细胞中 Ccaspase - 3 表达 取各组细胞,BCA 法蛋白定量。然后每组取 10 μL 样品以及蛋白标准物点样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,初始电压为 90 V,观察 Marker 的移动情况,适时终止电泳。转膜、封闭、洗膜,切割后分别与其特定的稀释过的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 杂交过夜,然后用 TBST 洗膜 3 次,与二抗反应至少 1 h,再次洗膜 3 次,加 ECL 显色,上机检测。

1.6 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理采用方差分析及 q 检验。

2 结 果

2.1 左卡尼汀对细胞存活率的影响 如表 1 可以看出,在由血清饥饿导致的心肌细胞凋亡中加入中高剂量的左卡尼汀 (40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 后,与模型组比较,中高剂量左卡尼汀组细胞存活率分别增加了 36.2% 和 48.9% ($P < 0.01$)。

2.2 左卡尼汀对心肌细胞凋亡率的影响 如表 2 可以看出,与正常组相比,模型组细胞凋亡率明显增加。而加入不同剂量的左卡尼汀预处理后,心肌细胞凋亡率有不同程度降低 (差异有统计学意义 $P < 0.05$)。

2.3 左卡尼汀对心肌细胞 Ccaspase - 3 表达的影响

如图所示血清饥饿组心肌细胞 Ccaspase - 3 表达增加,不同剂量的左卡尼汀可不同程度的抑制血清饥

饿导致的 Ccaspase - 3 表达增加 (图 1)。

表 1 左卡尼汀对细胞存活率的影响

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	A570 值
正常组	—	0.79 \pm 0.09
模型组	—	0.47 \pm 0.08**
左卡尼汀组	20	0.50 \pm 0.04
左卡尼汀组	40	0.64 \pm 0.09##
左卡尼汀组	80	0.70 \pm 0.10##

注:与正常组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:## $P < 0.01$

表 2 左卡尼汀对心肌细胞凋亡率的影响

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	凋亡率 (%)
正常组	—	9.9 \pm 0.8
模型组	—	47.1 \pm 2.9**
左卡尼汀组	20	32.1 \pm 1.7#
左卡尼汀组	40	28.4 \pm 2.5##
左卡尼汀组	80	18.5 \pm 1.9##

注:与正常组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

3 讨 论

细胞凋亡亦称为细胞程序性死亡,是在生理或病理条件下由基因控制的通过内源性核酸内切酶激活所造成的细胞死亡过程。在心血管系统心肌细胞凋亡是众多心血管疾病发生的重要因素亦是导致心功能下降的主要原因之一,因此,探明其发生发展机制、减少非生理性心肌细胞凋亡,对保护心脏结构和功能具有重要的临床意义。血清饥饿由于去除了血清中的营养成分,被认为是经典的诱导体外细胞凋亡的模型^[5]。

左卡尼汀对心血管系统具有一定的保护作用,但对血清饥饿诱导的心肌细胞凋亡的研究鲜有报道。Caspase - 3 是调节和执行细胞凋亡的重要蛋白酶之一,是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,是细胞凋亡的执行因子。各种凋亡刺激可通过一系列信号转导途径激活 Ccaspase - 3,从而向细胞核内传达细胞凋亡执行信号。抑制其活性可以抑制凋亡的发生^[6]。本研究结果显示,血清饥饿诱导的凋亡模型中心肌细胞存活率降低,凋亡率增加, Ccaspase - 3 表达增加。而左卡尼汀的预处理可以有效抑制血清饥饿诱导的心肌细胞凋亡,表现为存活率升高,凋亡率降低, Ccaspase - 3 表达降低。综上所述左卡尼汀对血清饥饿诱导的心肌细胞凋亡具有一定的保护作用,但其具体机制有待进一步研究。

(此文图 1 见附页 1)

(下转第 10 页)

- [5] 邢玉波, 张宇律, 华燕吟, 等. 臂踝脉搏波传导速度对 2 型糖尿病大血管病变的早期诊断作用 [J]. 浙江医学, 2009, 31: 990-991.
- [6] Aso K, Miyata M, Kubo T, et al. Brachial-ankle pulse wave velocity is useful for evaluation of complications in type 2 diabetic patients [J]. *Hypertens Res*, 2003, 26: 807-813.
- [7] Buse JB, Ginsberg HN, Bakris GL, et al. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30: 162-172.
- [8] 杨士伟, 胡大一. 踝臂指数对冠状动脉狭窄重程度的预测价值 [J]. 中国医药导刊, 2006, 2: 79-82.
- [9] Cruickshank K, Riste L, Anderson SG, et al. Aortic pulse-wave and its relationship to mortality in diabetes and glucose intolerance: an integrated index of vascular function [J]. *Circulation*, 2002, 106: 2085-2090.
- [10] Ohnishi H, Saitoh S, Takagi, et al. Pulse wave velocity as an indicator of atherosclerosis in impaired fasting glucose the Tanno and Sobetsu study [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26 (2): 437-440.
- [11] Rahman S, Ismail AA, Ismail SB, et al. Early manifestation of macrovasculopathy in newly diagnosed never treated type II diabetic patients with no traditional CVD risk factors [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 80 (2): 253-258.
- [12] Tomiyama H, Arai T, Koji Y, et al. The age-related increase in arterial stiffness is augmented in phases according to the severity of hypertension [J]. *Hypertens Res*, 2004, 27: 465-470.
- [13] O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, et al. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340: 14-22.
- [14] H Taniwaki, T Kawagishi, M Emoto. Correlation between the intima media thickness of the carotid artery and Aortic pulse-wave velocity in patients with Type 2 Diabetes [J]. *Diabetes-Care*, 1999, 22: 1851-1857.
- [15] 涂燕平, 雷梦觉, 葛郁芝, 等. 糖代谢异常和臂踝脉搏波传导速度与颈动脉内膜中层厚度间的关系 [J]. 中国心血管杂志, 2007, 12: 350-351.
- [16] 陈小燕, 周智广, 刘明辉, 等. 多因素干预对新诊断 2 型糖尿病患者亚临床动脉粥样硬化的影响 [J]. 中华糖尿病杂志, 2006, 14: 11-17.

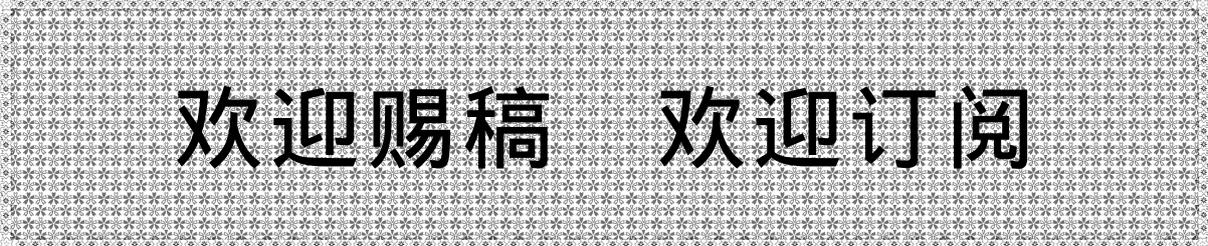
收稿日期: 2013-06-10

(上接第 2 页)

参考文献:

- [1] Busquets S, Serpe R, Toledo M, et al. L-Carnitine: an adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer [J]. *Clin Nutr*, 2012, 31 (6): 889-895.
- [2] Kim YJ, Kim SY, Sung DK, et al. Neuroprotective effects of L-carnitine against oxygen-glucose deprivation in rat primary cortical neurons [J]. *Korean J Pediat*, 2012, 55 (7): 238-248.
- [3] Oyanagi E, Yano H, Uchida M, et al. Protective action of L-carnitine on cardiac mitochondrial function and structure against fatty acid stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 19: 412 (1): 61-67.
- [4] 戴洪亮, 王洪新, 吴国强. 左卡尼汀对心肌细胞 H_2O_2 损伤的保护作用 [J]. 辽宁医学院学报, 2009, 30 (1): 4-6.
- [5] Goyeneche AA, Harmon JM, Telleria CM. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis [J]. *Reproduction*, 2006, 131 (1): 103-111.
- [6] Nuñez G, Benediet MA, Hu Y, et al. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway [J]. *Oncogene*, 1998, 17 (25): 3237-3245.

收稿日期: 2013-08-06



欢迎赐稿 欢迎订阅