基础研究论著

左卡尼汀对老年大鼠脑缺血再灌注损伤 HMGB1 表达的影响

周立兵　李新钢

【摘要】　目的　探讨左卡尼汀预处理对老年大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用以及对高迁移率族蛋白 1（HMGB1）表达的影响。方法　将 45 只 SD 老年大鼠随机分为 3 组各 15 只，包括假手术组（SHAM 组）、缺血再灌注组（IR 组）、左卡尼汀干预组（LC 组）。LC 组及 IR 组通过右侧大脑中动脉栓塞法制备脑缺血再灌注损伤大鼠模型。LC 组于大鼠脑缺血再灌注建模前连续每日注射左卡尼汀 200 mg/kg 共 1 周。建模后 24 h 留取大鼠血浆以及脑组织标本。采用原位末端脱氧核苷酸转移酶标记法（TUNEL 法）检测各组大脑皮质区细胞凋亡情况。采用 ELISA 检测各组血浆 HMGB1、超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛的表达。采用蛋白免疫印迹法检测各组脑组织 HMGB1 蛋白的表达。结果　与 SHAM 组凋亡指数（0.4 ±0.1）% 相比，IR 组凋亡指数（45.1 ±4.2）% 更高（$P<0.05$），而 LC 组凋亡指数（26.5 ±3.8）% 低于 IR 组（$P<0.05$）。IR 组及 LC 组的血浆 HMGB1 水平均高于 SHAM 组（P 均 <0.05）。LC 组血浆 HMGB1、丙二醛水平低于 IR 组，SOD 水平高于 IR 组（P 均 <0.05）。LC 组脑组织 HMGB1 水平低于 IR 组（$P<0.05$）。结论　左卡尼汀可能通过减少 HMGB1 的表达来减轻脑缺血再灌注老年大鼠的脑损伤。

【关键词】　左卡尼汀；脑缺血再灌注；高迁移率族蛋白 1

Effect of levocarnitine on the expression of HMGB1 of aged rats after cerebral ischemia reperfusion injury

Zhou Libing, Li Xingang. Department of Neurosurgery, Qilu Hospital of Medical College of Shandong University, Ji'nan 250012, China

Corresponding author, Li Xingang, E-mail: yesterdaygun@126.com

【Abstract】　Objective　To investigate the effect of levocarnitine pretreatment on cerebral ischemia reperfusion injury and the expression of high mobility group protein 1 (HMGB1) of aged rats. **Methods**　Forty five aged SD rats were randomly divided into three groups: sham group, ischemia reperfusion group (IR) and levocarnitine (LC) group. The ischemia reperfusion rat model are prepared by right middle cerebral artery embolism. The rats were daily injected with levocarnitine (200 mg/kg) for one week before preparing ischemia reperfusion animal model in LC group. 24 hours after finishing models, the plasm and brain of the rats were removed and remained. The apoptosis status in the cerebral cortex of the rats were detected and evaluated by TUNEL. The expressions of HMGB1, superoxide dismutase (SOD), malonaldehyde (MDA) were detected by ELISA. The expressions of HMGB1 protein in brain was detected by western blot. **Results**　The apoptosis indexes of the rats in the IR group (45.1 ±4.2) % were significantly increased compared with those of the sham group(0.4 ±0.1) % ($P<0.05$), and the apoptosis indexes of the rats in the LC group(26.5 ±3.8) % were significantly lower than that of IR group($P<0.05$). The levels of HMGB1 of the rats in the IR group and LC group were significantly increased compared with those of the rats in the sham group($P<0.05$). Compared with IR group, The levels of HMGB1 and MDA of the rats in the LC group were significantly decreased and the levels of SOD significantly increased ($P<0.05$). The brain expression of HMGB1 of the rats in the LC group were significantly lower than that of RI group ($P<0.05$). **Conclusion**　Levocarnitine may relieve the brain injury of aged rats with ischemic reperfusion by decreasing the expression of HMGB1.

【Key words】　Levocarnitine; Cerebral ischemia reperfusion injury; High mobility group protein 1

DOI: 10.3969/g.issn.0253-9802.2015.08.003

基金项目：山东省乐陵市科技局项目（2013-SL-8）

作者单位：250012 济南，山东大学医学院齐鲁医院神经外科（周立兵，李新钢）；253600 乐陵，乐陵市人民医院神经外科（周立兵）

通讯作者，李新钢，E-mail: yesterdaygun@126.com

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

缺血性脑血管病是严重威胁人类健康的疾病，其特点为病死率以及致残率较高，预后差。脑缺血恢复再通后损伤并未减轻，反而加重的现象称为脑缺血再灌注损伤。高迁移率族蛋白 1（HMGB1）是晚期炎症因子，其与脑缺血再灌注损伤息息相关[1-4]。左卡尼汀是能量代谢中的必需物质，研究表明其对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用[1-2]。本研究旨在观察左卡尼汀对脑缺血再灌注损伤 HMGB1 表达的作用，以探讨其在脑缺血再灌注损伤中的保护机制。

材料与方法

一、实验材料

浙江大学医学院动物实验室提供的 SD 老年大鼠，雌性清洁级，共 45 只，260～360 g，出生 12 个月以上。TUNEL 试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。

二、动物分组和模型的建立

实验分组：45 只大鼠随机分为 3 组各 15 只，包括假手术组（SHAM 组）、缺血再灌注组（IR 组）、左卡尼汀干预组（LC 组），LC 组于大鼠脑缺血再灌注建模前连续每日注射左卡尼汀 200 mg/kg 共 1 周。

LC 组及 IR 组通过右侧大脑中动脉栓塞法制备脑缺血再灌注损伤大鼠模型：于大鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛（0.35 ml/100 g）进行麻醉，切开其颈部，分离右侧颈部动脉，夹闭右颈总动脉及右颈内动脉，在颈外动脉起始端剪开一小切口，插入直径 0.236 mm 的进口鱼线，以分岔口处开始测量距离，插入 1.8～2 cm 后固定鱼线，缝合。缺血 2 h 后将线栓拉出 1 cm 左右即可形成再灌注。其后分 2 次缓慢拔出栓线，结扎血管，再灌注 12 h。SHAM 组插入 1.0 cm 鱼线，其余步骤同上。IR 组夹闭过程中死亡 1 只，予以剔除。建模后 24 h 留取血浆以及脑组织标本。

三、脑梗死体积的测定

再灌注 12 h 后，麻醉大鼠、快速断头取其脑组织，将脑组织切片置于 2% 氯代三苯基四氮唑（TTC）溶液中染色固定。可见梗死灶区呈白色，正常组织呈红色，部分组织由白色向红色过渡。用计算机病理图像分析仪扫描图像并计算出梗死灶体积。

四、原位末端脱氧核苷酸转移酶标记法（TUNEL 法）检测 SHAM、IR、LC 组脑组织细胞凋亡情况

于 4% 多聚甲醛中固定脑组织，脱水、浸蜡、包埋，按照说明书操作。于荧光显微镜下观察，阳性凋亡细胞的细胞核呈绿色颗粒状，采用 Image Pro Plus 4.5 图像分析软件计数凋亡细胞，计算凋亡指数，凋亡指数 = 阳性细胞/（阳性细胞 + 阴性细胞）×100%。

五、ELISA 检测 SHAM、IR、LC 组血浆 HMGB1、超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛的表达

于试验终点时，暴露大鼠下腔静脉，抽其静脉血进行离心，根据实验说明书进行操作。根据标准曲线，检测各组血浆 HMGB1、SOD、丙二醛的水平。

六、蛋白免疫印迹法检测 SHAM、IR、LC 组脑组织 HMGB1 蛋白的表达

随机选取各组 5 只大鼠，处死后立即取其脑组织，采用蛋白免疫印迹法检测其脑组织 HMGB1 的表达。参照说明书进行操作，以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）作为内参。使用 LabWork 4.0 图像分析软件进行检测。

七、统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件处理数据，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 *LSD-t* 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

一、SHAM、IR、LC 组脑梗死体积比较

IR 组与 LC 组脑梗死面积较 SHAM 组大（$P < 0.05$），提示存在脑缺血再灌注。LC 组脑梗死体积较 IR 组小（$P < 0.05$），见表 1。

表 1　IR 组、SHAM 组、LC 组脑梗死体积比较（$\bar{x} \pm s$）

组　别	例数	脑梗死体积（mm^3）
SHAM 组	15	1.25 ± 0.07
IR 组	14	197.25 ± 20.40[a]
LC 组	15	155.58 ± 19.72[ab]
F 值	–	591.956
P 值	–	< 0.001

注：与 SHAM 组比较，[a]$P < 0.05$；与 IR 组比较，[b]$P < 0.05$；两两比较结果，SHAM 组与 IR 组比较的 $t = -32.416$、$P < 0.001$，SHAM 组和 LC 组比较的 $t = -25.976$、$P < 0.001$，IR 组和 LC 组比较的 $t = 6.892$、$P < 0.001$

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二、SHAM、IR、LC 组脑组织细胞凋亡情况

与 SHAM 组凋亡指数（0.4 ± 0.1）% 相比，IR 组凋亡指数（45.1 ± 4.2）% 更高（$P < 0.05$），LC 组凋亡指数（26.5 ± 3.8）% 也低于 IR 组（$P < 0.05$）。3 组比较总的 $F = 696.805$、$P < 0.001$，SHAM 组和 IR 组比较的 $t = -37.073$、$P < 0.001$，SHAM 组和 LC 组比较的 $t = -22.030$、$P < 0.001$，IR 组和 LC 组比较的 $t = 15.426$、$P < 0.001$。荧光显微镜下观察各组的凋亡细胞见图 1。提示左卡尼汀可以减轻脑缺血再灌注大鼠脑细胞的凋亡程度，具有脑组织保护作用。

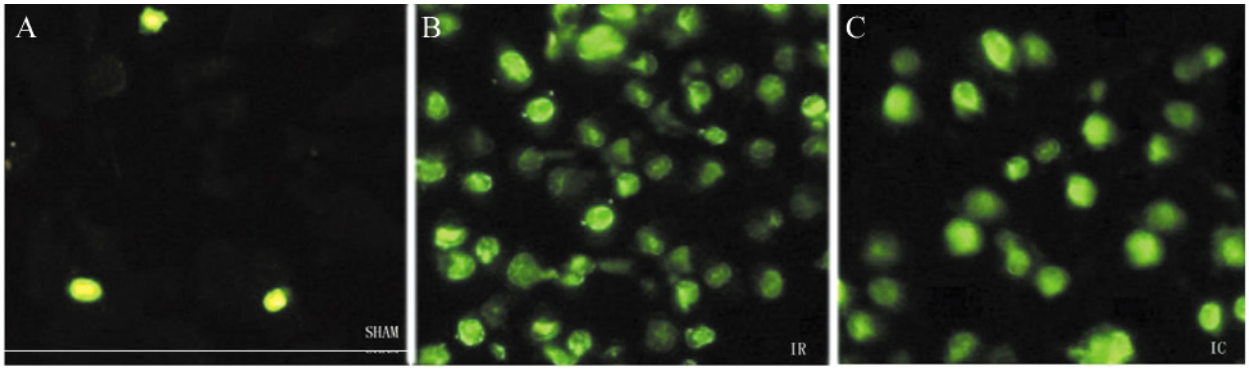

图 1 SHAM、IR、LC 组荧光显微镜下凋亡细胞图（×400）

三、SHAM、IR、LC 组血浆 HMGB1、SOD 及丙二醛水平的比较

IR 组及 LC 组的血浆 HMGB1 水平均高于 SHAM 组（P 均 < 0.05）。LC 组血浆 HMGB1、丙二醛水平低于 IR 组，SOD 水平高于 IR 组（P 均 < 0.05），提示左卡尼汀可降低丙二醛表达，增加 SOD 表达，减轻脑组织损伤。

表 2 SHAM、IR、LC 组血浆 HMGB1、SOD 及丙二醛水平的比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	HMGB1(U/L)	SOD(U/ml)	丙二醛(nmol/ml)
SHAM 组	2.24 ± 0.32	249.23 ± 28.28	4.12 ± 0.87
IR 组	9.25 ± 2.71[a]	148.62 ± 10.27[a]	7.25 ± 0.40[a]
LC 组	5.50 ± 1.12[ab]	172.22 ± 17.38[ab]	5.55 ± 0.72[ab]
F 值	63.755	99.220	73.023
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注：与 SHAM 组比较，[a]$P < 0.05$；与 IR 组比较，[b]$P < 0.05$；SOD 两两比较结果，SHAM 组和 IR 组比较的 $t = 13.376$、$P < 0.001$，SHAM 组和 LC 组比较的 $t = 10.420$、$P < 0.001$，IR 组和 LC 组比较的 $t = -3.138$、$P = 0.003$；MDA 两两比较结果，SHAM 组和 IR 组比较的 $t = -12.080$、$P < 0.001$，SHAM 组和 LC 组比较的 $t = -5.616$、$P < 0.001$，IR 组和 LC 组比较的 $t = 6.561$、$P < 0.001$；HMGB1 两两比较结果，SHAM 组和 IR 组比较的 $t = -11.290$、$P < 0.001$，SHAM 组和 LC 组比较的 $t = -5.343$、$P < 0.001$，IR 组和 LC 组比较的 $t = 6.039$、$P < 0.001$

四、SHAM、IR、LC 组脑组织 HMGB1 水平的比较

LC 组脑组织 HMGB1 水平低于 IR 组（$P < 0.05$），提示经左卡尼汀干预后可明显抑制 HMGB1 的表达，见图 2。

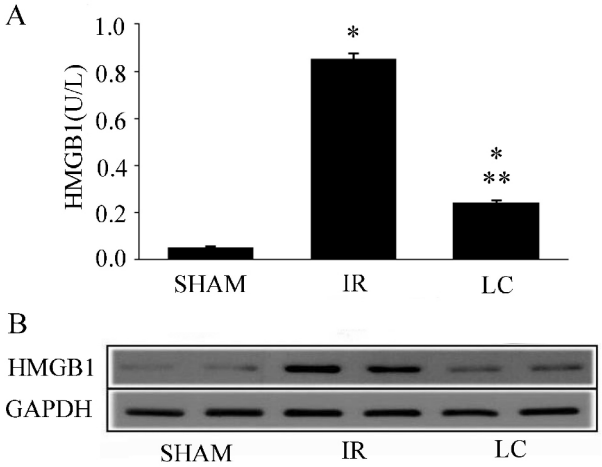

图 2 SHAM、IR、LC 组脑组织 HMGB1 水平的比较

A：3 组间 HMGB1 水平差异具有统计学意义（$F = 453.342$，$P < 0.001$），与 SHAM 组比较，* 为 $P < 0.001$，与 IR 组比较，** 为 $P < 0.001$；两两比较结果，SHAM 组与 IR 组比较的 $t = -29.705$、$P < 0.001$，SHAM 组与 IC 组比较的 $t = -10.585$、$P < 0.001$，IR 组与 IC 组比较的 $t = 19.121$、$P < 0.001$。B：蛋白免疫印迹电泳图，可见 LC 组 HMGB1 的表达低于 IR 组

讨 论

脑缺血再灌注损伤的发病机制较多，其中炎症反应是导致脑组织损伤的重要因素，炎症反应中期，大量促炎细胞因子释放、引起炎症瀑布反应，造成微血管功能障碍、组织水肿及损伤。炎症反应的晚期，肿瘤坏死因子-α、IL-1 等细胞因子可通过

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

活化单核巨噬细胞促进 HMGB1 的释放，作用于单核细胞等，导致炎症级联反应，加重组织损伤[3-4]。Chen 等[5]的研究显示，脑缺血损伤患者早期血浆 HMGB1 表达较正常水平高 13 倍。我们的研究显示，脑缺血再灌注大鼠的脑组织及血浆中 HMGB1 的表达均高于 SHAM 组，提示 HMGB1 参与了脑缺血再灌注损伤过程，这与 Lee 等[6]的研究一致。

左卡尼汀又称左旋肉碱，是能量代谢物质，Virmani 等[7]发现左卡尼汀 β-氧化满足脑缺血再灌注损伤时的 ATP 能量需求。Martin 等[8]发现左卡尼汀能提高丙酮酸脱氢酶的活性，减少脑乳酸的生成，提高葡萄糖的利用率，对脑缺血再灌注损伤起保护作用。Alves 等[9]研究发现大鼠脑缺血再灌注损伤后应用左卡尼汀治疗，其神经功能缺损有所改善，凋亡细胞数量降低，具有神经保护作用。还有研究表明左卡尼汀可以提高脑组织中抗氧化酶活性、抑制氧自由基产生及脂质过氧化反应，增加海马区神经元数量，从而保护损伤脑组织[10]。

本研究结果显示，与 IR 组比较，LC 组脑细胞凋亡指数较低，HMGB1 及丙二醛的水平较低，SOD 的水平较高，提示左卡尼汀可减轻炎症因子 HMGB1 的表达，具有抗氧化等作用，可保护脑组织。因此我们推测左卡尼汀对脑组织的保护作用可能与其抑制 HMGB1 的表达有关。

综上所述，左卡尼汀可能是通过抑制 HMGB1 的表达来减轻脑细胞凋亡，对脑缺血再灌注损伤起保护作用，但其具体的分子调控机制，尚需我们进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Chung SY, Sheu JJ, Lin YJ, Sun CK, Chang LT, Chen YL, Tsai TH, Chen CJ, Yang CH, Hang CL, Leu S, Wu CJ, Lee FY, Yip HK. Outcome of patients with profound cardiogenic shock after cardiopulmonary resuscitation and prompt extracorporeal membrane oxygenation support. Neurol Res, 2012, 76 (6): 1385-1392.

[2] Tian Y, Zhang W, Xia D, Modi P, Liang D, Wei M. Postconditioning inhibits myocardial apoptosis during prolonged reperfusion via a JAK2-STAT3-Bcl-2 pathway. J Biomed Sci, 2011, (2) 18: 53.

[3] Ji XF, Shuo Wang, Yang L, Li CS. Impaired β-adrenergic receptor signalling in post-resuscitation myocardial dysfunction. Resuscitation, 2012, 83 (5): 640-644.

[4] Kofler J, Otsuka T, Zhang Z, Noppens R, Grafe MR, Koh DW, Dawson VL, de Murcia JM, Hurn PD, Traystman RJ. Differential effect of PARP-2 deletion on brain injury after focal and global cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26 (1): 135-141.

[5] Chen MH, Liu TW, Xie L, Song FQ, He T, Zeng ZY, Mo SR. A simpler cardiac arrest model in rats. Am J Edmery Med, 2007, 25 (6): 623-630.

[6] Lee JH, Jarreau T, Prasad A, Lavie C, O'Keefe J, Ventura H. Nutritional assessment in heart failure patients. Congest Heart Fail, 2011, 17 (4): 199-203.

[7] Virmani A, Binienda Z. Role of carnitine esters in brain neuropathology. Mol Aspects Med, 2004, 25 (5-6): 533-549.

[8] Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G. Pyruvate dehydrogenase complex: Metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. Neurosci Res, 2005, 79 (1-2): 240-247.

[9] Alves E, Binienda Z, Carvalho F, Alves CJ, Fernandes E, de Lourdes Bastos M, Tavares MA, Summavielle T. Acety-l L-carnitine provides effective in vivo neuroprotection over 3, 4-methylened-ioximetham-phetamine-induced mitochondrial neurotoxicity in the adolescent rat brain. Neuroscience, 2009, 158 (2): 514-523.

[10] 韩征宇，李光来. 左卡尼汀对脑缺血再灌注损伤的抗氧化作用及其机制研究. 临床医药实践，2010，24 (1): 18-20.

(收稿日期: 2015-02-26)
(本文编辑: 洪悦民)

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net