

# 以线虫为例研究复方左卡尼汀 的药理及毒理作用

王冰莹, 刘 歌, 周 琳, 付学奇, 马俊锋

(吉林大学 生命科学学院, 长春 130012)

**摘要:** 以秀丽新杆线虫作为模式生物, 研究  $w(\text{左卡尼汀})=0.1\%$ ,  $w(\text{曲美他嗪})=0.0005\%$  及两种单药的复方药物复方左卡尼汀对连续三代线虫寿命与生殖能力的影响, 并对线虫总脂肪进行油红 O 染色和气相色谱分析. 结果表明:  $w(\text{左卡尼汀})=0.1\%$ ,  $w(\text{曲美他嗪})=0.0005\%$  及复方左卡尼汀对连续三代线虫的寿命均影响较小; 左卡尼汀和曲美他嗪对亲代、F1 代和 F2 代线虫的生殖能力均产生负面影响; 复方左卡尼汀对线虫的生殖能力具有保护作用; 限制饮食可减少线虫的产卵量, 并与线虫的脂肪累积有关; 左卡尼汀和曲美他嗪可减少线虫体内的脂肪累积与总脂肪酸的体积分数, 复方左卡尼汀对线虫体内脂肪累积和总脂肪酸的体积分数影响较小.

**关键词:** 复方左卡尼汀; 秀丽新杆线虫; 寿命; 生殖能力

**中图分类号:** Q547 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-5489(2015)01-0148-05

## Pharmacologic and Toxicology Action of Compound *L*-Carnitine in *Caenorhabditis elegans*

WANG Bingying, LIU Ge, ZHOU Lin, FU Xueqi, MA Junfeng

(College of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130012, China)

**Abstract:** Taking *Caenorhabditis elegans* worm as a model organism, we examined the effects of *L*-carnitine, trimetazidine, compound *L*-carnitine on the lifespan and reproductivity of the worms. Our results show that  $w(L\text{-carnitine})=0.1\%$ ,  $w(\text{trimetazidine})=0.0005\%$  and compound *L*-carnitine did not change the lifespan of *C. elegans*. On the other hand,  $w(L\text{-carnitine})=0.1\%$ ,  $w(\text{trimetazidine})=0.0005\%$  significantly reduced the brood size in parental generation, F1 and F2. However, compound *L*-carnitine has no effect on the reproductivity of the worms. Worms undergoing DR utilize fat, and diminish reproductive output. That is to say, the worms with restricted dietary intake have reduced broods. Our results indicate that  $w(L\text{-carnitine})=0.1\%$  and  $w(\text{trimetazidine})=0.0005\%$  reduce both fat accumulation and overall fatty acid. However, compound *L*-carnitine has no effect on the overall fat and fat acid.

**Key words:** compound *L*-carnitine; *Caenorhabditis elegans*; lifespan; reproductivity

复方左卡尼汀注射液由盐酸左卡尼汀(*L*-carnitine)和盐酸曲美他嗪(trimetazidine)按质量比 200

收稿日期: 2014-04-15.

作者简介: 王冰莹(1987—), 女, 汉族, 博士研究生, 从事细胞信号转导的研究, E-mail: wangbingyingicy@163.com. 通信作者: 马俊锋(1977—), 男, 汉族, 博士, 副教授, 从事细胞信号转导的研究, E-mail: mjf@jlu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 31000358).

配比组成, 其中左卡尼汀的主要作用是促进脂酰-CoA 进入线粒体氧化脂肪酸<sup>[1-3]</sup>; 曲美他嗪的作用是通过抑制  $\beta$ -氧化中的 3-KAT 酶抑制脂肪酸代谢, 从而提高心肌中葡萄糖的利用率<sup>[4-6]</sup>. 这两种作用机制相反的药物在大鼠和犬的心梗模型上表现出显著的抗缺血和缩小心梗面积的协同作用.

哺乳动物体内的许多核心代谢途径在秀丽新杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, 线虫) 中也保守存在<sup>[7]</sup>, 包括脂肪链的延伸<sup>[8]</sup>、脂肪酸的合成<sup>[9-11]</sup>以及线粒体中  $\beta$ -过氧化物酶体系作用下的糖酵解、葡萄糖、氨基酸的代谢及脂肪酸的氧化<sup>[12-14]</sup>. 参与调节线虫脂肪分解和脂肪酸氧化的基因绝大多数在哺乳动物中具有同源基因<sup>[15]</sup>: 如线虫 *cpt-1* 和 *cpt-2* 分别与人的 carnitine palmitoyl transferase I (CPT1A) 和 carnitine palmitoyl transferase II (CPT2) 同源, 线虫 *kat-1* (3-Ketoacyl-CoA Thiolase) 与人 ACAT1 同源<sup>[16-17]</sup>. 在线虫中, 有 305 个基因失活可导致体脂含量减少, 有 112 个基因失活可导致脂肪累积<sup>[18]</sup>, 这些基因中绝大多数在哺乳动物中都有同源基因. 本文以线虫为例研究复方左卡尼汀注射液的作用机理.

## 1 材料试剂与方法

### 1.1 材料与试剂

野生秀丽新杆线虫 Bristol N2 和大肠杆菌 OP50 均购于美国线虫遗传中心; 左卡尼汀和曲美他嗪水溶性成分购于常州善美药物研究开发有限公司; 油红 O 购于美国 Amresco 公司; 其他试剂均为国产分析纯.

### 1.2 线虫的培养

用左卡尼汀、曲美他嗪和复方左卡尼汀对人体进行静脉注射时, 将血药的峰值质量浓度作为对线虫的给药质量浓度, 且左卡尼汀与曲美他嗪的质量浓度比为 200. 采用固体培养方法, 对照组线虫在 NGM 培养基中以大肠杆菌 OP50 为食物, 实验组线虫分别培养在含有  $w(\text{左卡尼汀}) = 0.1\%$ ,  $w(\text{曲美他嗪}) = 0.0005\%$  及复方左卡尼汀的 NGM 培养基中, 并以含有与培养基中相同质量浓度药物的大肠杆菌 OP50 为食物, 各组均在 20 °C 下培养.

### 1.3 表型观测

各组用于观测的线虫先经同期化处理, 选择多条产卵期的线虫同时移入对照组和给药组的培养板中, 1 h 后移出. 培养板中产下的卵即为同期化的卵, 将其记为第 0 天. 利用同期化线虫进行寿命观测及产卵数测定<sup>[19]</sup>.

1.3.1 寿命观测 分别将同期化处理过的对照组和给药组线虫置于 20 °C 恒温培养箱中培养. 从其进入产卵期起, 每 24 h 将所观测线虫转至一个新的平板中, 以线虫个体对机械性刺激无反应视为死亡, 每天对线虫死亡数目进行计数, 并绘制寿命曲线图.

1.3.2 产卵数测定 从对照组和给药组线虫中每组随机选取 12 条处于 L4 期的线虫, 将每条线虫分别置于与原来所在培养基相同的新平板中. 进入产卵期后, 每 8 h 将每条线虫置于新的平板中, 并统计每板中的产卵个数.

### 1.4 线虫的固定及染色

将同期化的对照组和给药组线虫在 20 °C 培养箱中培养, 从第 4 天起, 取 15 条线虫样本进行固定和染色. 步骤如下: 收集线虫, 用体积分数为 1% 的多聚甲醛固定线虫, 于 -80 °C 冰箱冷冻 15 min 后, 于 43 °C 水浴中迅速解冻. 用 M9 溶液洗去甲醛, 加入体积分数为 60% 的异丙醇, 使线虫脱水, 15 min 后洗去异丙醇溶液. 加入体积分数为 60% 的油红 O, 染色 30 min. 先用 M9 溶液反复清洗, 再用含有体积分数为 0.01% Tween 的 1×PBS 进行脱色.

### 1.5 气相色谱检测脂肪酸法

用 4.5 mL 离心管收集 20 条线虫, 将其置于 10  $\mu$ L M9 溶液中, 加入 0.5 mL 含有体积分数为 2.5% 硫酸的甲醇溶液, 样品放入 60 °C 水浴加热 1 h 后, 冷却至室温, 加入 1 mL 正己烷和 1.5 mL 水, 涡旋混匀, 脂肪酸和甲醇进行反应生成脂肪酸甲酯, 收集有机上层液, 上样量 1  $\mu$ L, 层析柱初始温度为 200 °C, 10 min 后以 15 °C/min 的速率升温至 250 °C, 停留 5 min.

## 1.6 数据统计

实验数据采用 SPSS Statistics 19.0 进行统计分析,以平均值±标准差表示,显著性检验采用 Student's *T*-tests 方法,  $p < 0.05$  表示差异显著.

## 2 结果与讨论

### 2.1 左卡尼汀、曲美他嗪及复方左卡尼汀对连续三代线虫寿命的影响

观测  $w(\text{左卡尼汀})=0.1\%$ ,  $w(\text{曲美他嗪})=0.0005\%$  及复方左卡尼汀对野生型线虫 N2 寿命的影响,并对连续三代线虫进行观测,考察药物对多代累积的影响,结果如图 1 所示.由图 1 可见,左卡尼汀、曲美他嗪和复方左卡尼汀对亲代、F1 代和 F2 代线虫寿命的影响均较小.

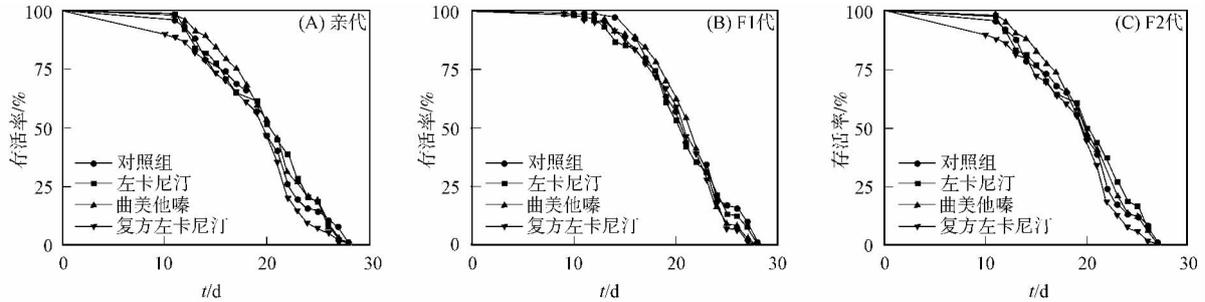


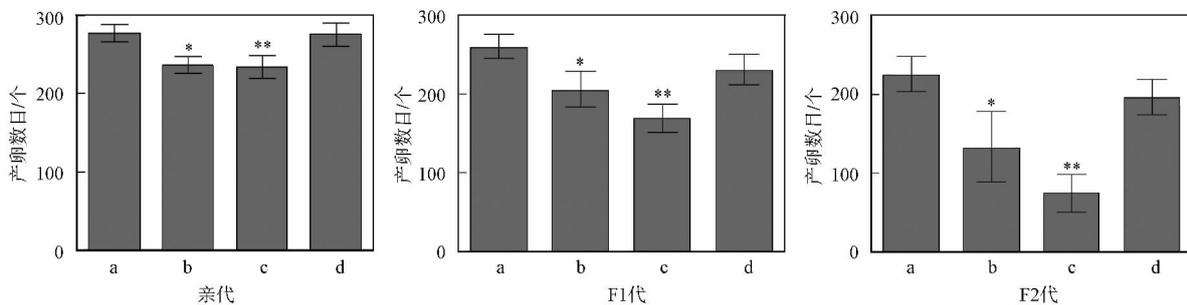
图 1 左卡尼汀、曲美他嗪及复方左卡尼汀对连续三代线虫寿命的影响

Fig. 1 Effects of *L*-carnitine, trimetazidine and compound *L*-carnitine on the lifespan of *C. elegans*

此外,考察不同质量浓度的左卡尼汀、曲美他嗪及不同配比的复方左卡尼汀对线虫寿命的影响.结果表明,不同质量浓度的药物对线虫寿命的影响均较小,即左卡尼汀、曲美他嗪及复方左卡尼汀对线虫不具有药物毒性.

### 2.2 左卡尼汀、曲美他嗪及复方左卡尼汀对连续三代线虫生殖能力的影响

在产卵实验中,观测  $w(\text{左卡尼汀})=0.1\%$ ,  $w(\text{曲美他嗪})=0.0005\%$  及复方左卡尼汀对野生型线虫 N2 生殖能力的影响,结果如图 2 所示.由图 2 可见,左卡尼汀、曲美他嗪和复方左卡尼汀对亲代、F1 代和 F2 代线虫的生殖能力均产生负面影响,其中曲美他嗪对线虫生殖能力的负面影响最明显,统计学分析表明,其具有显著性差异.两种单药的复方制剂复方左卡尼汀对线虫生殖能力具有正面保护作用,与对照组无显著性差异.



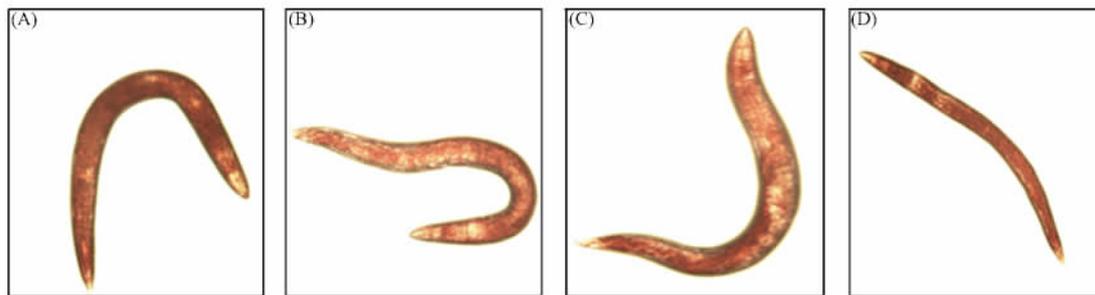
a: 对照组; b: 左卡尼汀; c: 曲美他嗪; d: 复方左卡尼汀. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .

图 2 左卡尼汀、曲美他嗪及复方左卡尼汀对连续三代线虫生殖能力的影响

Fig. 2 Effects of *L*-carnitine, trimetazidine and compound *L*-carnitine on thereproductivity of *C. elegans*

### 2.3 线虫体内脂肪染色结果

将同期化的对照组和给药组线虫在  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下培养 4 d,第 4 天分别对对照组和给药组线虫进行油红 O 染色,比较线虫体内脂肪累积的变化,结果分别如图 3 和图 4 所示.由图 3 和图 4 可见,左卡尼汀和曲美他嗪可减少线虫的脂肪累积,复方制剂对线虫的脂肪累积影响较小(与对照组比,  $p < 0.05$ ).



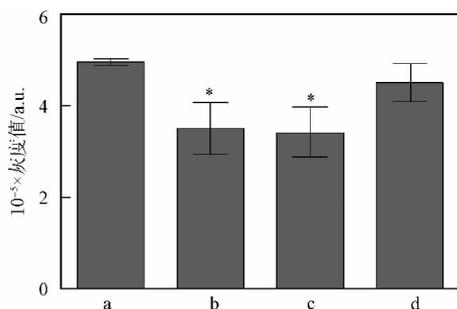
(A) 对照组线虫油红 O 染色; (B) 左卡尼汀组线虫油红 O 染色;  
(C) 曲美他嗪组线虫油红 O 染色; (D) 复方左卡尼汀组油红 O 染色.

图 3 线虫脂肪染色结果

Fig. 3 Fat staining in *C. elegans*

#### 2.4 脂肪酸体积分数的气相色谱分析结果

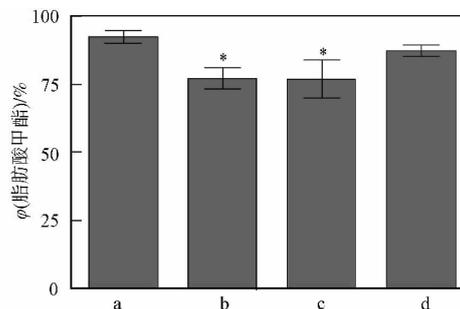
将同期化的对照组和给药组线虫在 20 °C 条件下培养 4 d, 第 4 天对每组线虫提取脂肪酸进行气相色谱分析, 结果如图 5 所示. 由图 5 可见, 左卡尼汀和曲美他嗪可降低线虫体内脂肪酸甲酯的体积分数(与对照组比,  $p < 0.05$ ), 复方左卡尼汀组对线虫总脂肪酸甲酯的体积分数影响较小.



a: 对照组; b: 左卡尼汀; c: 曲美他嗪;  
d: 复方左卡尼汀. \*  $p < 0.05$ .

图 4 左卡尼汀、曲美他嗪及复方左卡尼汀对线虫脂肪累积的影响

Fig. 4 Effects of *L*-carnitine, trimetazidine and compound *L*-carnitine on the accumulation of fat in *C. elegans*



a: 对照组; b: 左卡尼汀; c: 曲美他嗪;  
d: 复方左卡尼汀. \*  $p < 0.05$ .

图 5 左卡尼汀、曲美他嗪及复方左卡尼汀对脂肪酸体积分数的影响

Fig. 5 Effects of *L*-carnitine, trimetazidine and compound *L*-carnitine on the volume content of fatty acid in *C. elegans*

综上所述, 本文观测了  $w(\text{左卡尼汀}) = 0.1\%$ ,  $w(\text{曲美他嗪}) = 0.0005\%$  及复方左卡尼汀对连续三代线虫寿命及生殖能力的影响, 并对线虫进行了油红 O 染色和气相色谱分析. 结果表明:  $w(\text{左卡尼汀}) = 0.1\%$ ,  $w(\text{曲美他嗪}) = 0.0005\%$  及复方左卡尼汀对连续三代线虫寿命的影响均较小, 两种单药对亲代、F1 代和 F2 代线虫的生殖能力产生负面影响, 其复方制剂对线虫生殖能力具有保护作用; 左卡尼汀和曲美他嗪可减少线虫体内脂肪的累积和脂肪酸的体积分数, 复方左卡尼汀对线虫体内脂肪累积和脂肪酸体积分数影响均较小.

#### 参 考 文 献

- [1] Kudoh Y, Aoyama S, Torii T, et al. Long-Term Effects of Oral *L*-Carnitine Supplementation on Anemia in Chronic Hemodialysis [J]. *Cardiorenal Med*, 2014, 4(1): 53-59.
- [2] Rizos I. Three-Year Survival of Patient with Heart Failure Caused by Dilated Cardiomyopathy and *L*-Carnitine Administration [J]. *Am Heart J*, 2000, 139(2): S120-S123.
- [3] Carvajal K, Moreno-Sánchez R. Heart Metabolic Disturbances in Cardiovascular Diseases [J]. *Arch Med Res*, 2003, 34(2): 89-99.
- [4] Kantor P F, Lucien A, Kozak R, et al. The Antianginal Drug Trimetazidine Shifts Cardiac Energy Metabolism

- from Fatty Acid Oxidation to Glucose Oxidation by Inhibiting Mitochondrial Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme A Thiolase [J]. *Cir Res*, 2000, 86(5): 580-588.
- [5] Ussher J R, Keung W, Fillmore N, et al. Treatment with the 3-Ketoacyl-CoA Thiolase Inhibitor Trimetazidine Does Not Exacerbate Whole-Body Insulin Resistance in Obese Mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 349(3): 487-496.
- [6] Kölbel F, Bada V. Trimetazidine in Geriatric Patients with Stable Angina Pectoris: The Tiger Study [J]. *Int J Clin Pract*, 2003, 57(10): 867-870.
- [7] Sze J Y, Victor M, Loer C, et al. Food and Metabolic Signalling Defects in a *Caenorhabditis elegans* Serotoninsynthesis Mutant [J]. *Nature*, 2000, 403: 560-564.
- [8] Drickamer K, Dodd R B. C-Type Lectin-Like Domains in *Caenorhabditis elegans*: Predictions from the Complete Genome Sequence [J]. *Glycobiology*, 1999, 9(12): 1357-1369.
- [9] Entchev E V, Schwudke D, Zagoriy V, et al. LET-767 Is Required for the Production of Branched Chain and Long Chain Fatty Acids in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(25): 17550-17560.
- [10] ZHENG Shanqing, LIAO Sentai, ZOU Yuxiao, et al. Mulberry Leaf Polyphenols Delay Aging and Regulate Fat Metabolism via the Germline Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Age (Dordr)*, 2014, 36(6): 9719.
- [11] Harrison N, Lone M A, Kaul T K, et al. Characterization of N-Acyl Phosphatidylethanolamine-Specific Phospholipase-D Isoforms in the Nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113007.
- [12] Gilst M R, Van, Hadjivassiliou H, Jolly A, et al. Nuclear Hormone Receptor NHR-49 Controls Fat Consumption and Fatty Acid Consumption and Fatty Acid Composition in *C. elegans* [J]. *PLOS Biol*, 2005, 3(2): e53.
- [13] Depuydt G, Xie F, Petyuk V A, et al. LC-MS Proteomics Analysis of the Insulin/IGF-1-Deficient *Caenorhabditis elegans* Daf-2(e1370) Mutant Reveals Extensive Restructuring of Intermediary Metabolism [J]. *J Proteome Res*, 2014, 13(4): 1938-1956.
- [14] Xu Y, Sun F. Purification, Crystallization and Preliminary Crystallographic Analysis of 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase from *Caenorhabditis elegans* [J]. *Acta Crystallogr Sect F-Struct Biol Cryst Commun*, 2013, 69(5): 515-519.
- [15] Watts J L, Browse J. Genetic Dissection of Polyunsaturated Fatty Acid Synthesis in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(9): 5854-5859.
- [16] Estevez M, Attisano L, Wrana J L, et al. The *daf-4* Gene Encodes a Bone Morphogenetic Protein Receptor Controlling *C. elegans* Dauer Larva Development [J]. *Nature*, 1993, 365: 644-649.
- [17] Friedman D B, Johnson T E. A Mutation in the *Age-1* Gene in *Caenorhabditis elegans* Lengthens Life and Reduces Hermaphrodite Fertility [J]. *Genetics*, 1988, 118(1): 75-86.
- [18] Son S J, BAI Xia, Lee S B. Inorganic Hollow Nanoparticles and Nanotubes in Nanomedicine: Part 2: Imaging, Diagnostic, and Therapeutic Applications [J]. *Drug Discovery Today*, 2007, 12(15/16): 657-663.
- [19] 于笑坤, 何潇潇, 付学奇, 等. 水溶性人参皂苷对秀丽隐杆线虫生物学功能的影响 [J]. *吉林大学学报: 理学版*, 2012, 50(4): 812-814. (YU Xiaokun, HE Xiaoxiao, FU Xueqi, et al. Effect of Water Soluble Ginsenosides on Biological Functions of *Caenorhabditis elegans* [J]. *Journal of Jilin University: Science Edition*, 2012, 50(4): 812-814.)

(责任编辑: 单 凝)