维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)01-0027-05

L- 肉碱对幼鼠丙戊酸肝毒性的保护作用及其机理探讨

傅大干,蔡方成

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究 L- 肉碱对丙戊酸(VPA)肝毒性的保护作用及相关机制。方法:采用 VPA 及苯巴比妥钠(PB)灌胃制作幼鼠 VPA 肝损伤的动物模型,同时以 L- 肉碱作为干预措施,观察其对实验动物肝脏,尤其肝线粒体功能的保护作用。化学比色法测定血氨、L- 肉碱、肝脏凝血因子合成功能、线粒体呼吸酶系等;高效液相色谱、流式细胞仪分别检测 VPA 与 PB 血药浓度及肝线粒体跨膜电位(MMP);采用 Oil-Red-O 染色观察肝细胞脂肪变性。结果:(1)VPA/VPA+PB 组肝线粒体呼吸链关键酶琥珀酸脱氢酶(SDH)及细胞色素氧化酶(CCO)活性与对照组均存在非常显著性差异($P<0.01$),而补充 L- 肉碱对 SDH 和 CCO 活性均有明显保护作用;(2)VPA+PB 组 MMP 下降 21.47%,与对照组差异显著($P<0.05$)。L- 肉碱能有效维护 MMP 正常;(3)在 VPA+PB 组,凝血因子 PT、TT、APTT、Fbg,以及血氨和 L- 肉碱含量均有显著改变。补充 L- 肉碱改善肝脏凝血因子合成、使血氨正常;(4)Oil-Red-O 染色显示,VP/VPA+PB 组均出现门管区为主的肝细胞脂肪变性,脂肪细胞数分别高出对照组 9.2 倍和 15.7 倍,差异非常显著($P<0.01$)。L- 肉碱干预后脂肪变性肝细胞数均有非常显著减少($P<0.01$),表明 L- 肉碱能有效的阻止肝细胞脂肪变性。结论:L- 肉碱对 VPA 肝损伤有较好防治作用,这一作用主要是通过阻止肝脂肪沉积和保护线粒体功能而实现。另外,当 VPA 与肝酶诱导剂联合运用时,虽然 VPA 血药浓度值可能不高,但由于肝酶诱导剂使具有非常强肝毒性的 VPA 中间代谢产物明显增加,所以仍应密切监测其肝毒副作用。

【关键词】丙戊酸;L- 肉碱;肝损伤

【中国图书分类法分类号】R969;R575 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-04

Protective function of L-carnitine against valproate-associated hepatotoxicity in infant rats and its mechanism

FU Dagan, et al

(*Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the protective function of L-carnitine against valproate-associated hepatotoxicity in infant rats and its mechanism. *Methods*: Rat models with VPA liver lesion were established by oral administration of VPA and PB. L-carnitine was adopted as intervention measure: to observe its protection of experiment rat livers, especially the function of liver mitochondrion. Levels of plasma ammonia, L-carnitine and coagulation factors in sera as well as the changes of respiratory enzymes in hepatic mitochondria were measured by chemical colorimetry. Mitochondrial membrane potential (MMP), and VPA and PB blood drug levels in liver were determined by flow cytometer and HPLC, respectively. and morphological changes of hepatocytes were observed under microscope with Oil-Red-O staining. Results (1) In the groups affected by VPA or VPA added with PB, the activities of SDH and CCO significantly decreased compared with control group ($P<0.01$); While activities of SDH and CCO were effectively protected by L-carnitine; (2) MMP was reduced by 21.47% in infant rats treated with VPA added with PB, Which was significantly different from control group ($P<0.05$). This reduction could be effectively reversed by L-carnitine; (3) In all rats treated with VPA added with PB, there were significant abnormalities in function of blood coagulation and serum fibrinogen, especially reflected on the content change of clotting factors PT、TT、APTT and Fbg, and the levels of plasma ammonia and L-carnitine also changed significantly. Furthermore, compared with controls, no alteration of coagulation function and ammonia levels in blood had been found since L-carnitine supplementation; (4) Oil-Red-O staining showed that significant lipid vacuoles primarily occurred in periportal areas of liver lobule in rats treated with VPA or VPA added with PB.

作者介绍:傅大干(1970-),男,博士,主治医师,
主要研究方向:小儿神经疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

The number of hepatocyte containing lipid droplets in infant rats was 9.2 times higher than that in control, and 15.7 times higher than that in VPA added with PB group. The difference was significant ($P<0.01$). These indicated that lipid droplets in liver cells induced by VPA could effectively prevented with coadministration of L-carnitine. *Conclusion*: Protective effects of L-carnitine against VPA-associated hepatotoxicity were well demonstrated in the study, which might be achieved by preventing the formation of lipid droplets in hepatocyte and protecting the function of mitochondria. In addition, VPA serum levels may not be high because of the coadministration with liver enzyme inducers, but we still should pay more attention to its hepatotoxicity especially in infant because of its incompleted substrata.

【Key words】Valproic acid (VPA); L-carnitine; Liver dysfunction;

丙戊酸(Valproic acid, VPA)具有致肝功损伤，甚至肝衰竭的不良反应。尤以 2 岁以下婴儿多见，多药联合时发生率可高达 1/500。且致死率高，是 VPA 肝毒性的高危人群[1]。近年，有报道大剂量 L-肉碱(L-carnitine, LC)静脉注射抢救 VPA 肝功衰竭有效，但其作用机理尚不完全清楚[2]。本文拟以幼鼠为实验对象，观察 LC 对 VPA 肝毒性的保护作用并探讨其机理，为临床更有效防治 VPA 肝毒性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

L-carnitine、Rhodamine123、Oil-Red-O、Cytochrome C 均购于 Sigma 公司；血氨试剂盒购于北京北化康泰临床试剂有限公司；琥珀酸脱氢酶(SDH)及考马斯亮兰蛋白测定等试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.2 实验动物与分组

健康 21 日龄 Wistar 大鼠(体重 20~50g)25 只(重庆医科大学实验动物中心提供)，雌雄各半，随机分为 5 组：(1)正常对照组(蒸馏水，5 只)；(2)VPA 组(5 只)；(3)VPA + 肝酶诱导剂苯巴比妥(Phenobarbitone, PB)组(5 只)；(4)VPA + LC 组(5 只)；(5)VPA + PB + LC 组(5 只)。参照相关 VPA 毒副作用的研究[3]及预试验，选取合适 VPA 剂量观察其肝毒副作用。给药剂量：VPA 500 mg/kg、PB 20 mg/kg、LC 200 mg/kg。药物经蒸馏水稀释后溶液终体积为 5ml/kg，连续灌胃 30 天，以制作 VPA 长期口服的动物模型，于最后一次灌胃后 4~6h 剪断股静脉采血后处死。

1.3 相关血生化参数

高效液相色谱(HPLC)检测 VPA 及 PB 血浓度[4]；血氨测定采用谷氨酸脱氢酶法(终点法)；血清 LC 浓度以 Dimension RXL 全自动生化分析仪测定[5]；凝血因子[纤维蛋白原(Fbg)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶凝固时间(TT)、凝血酶原时间(PT)]由 CA-1500 全自动血凝仪检测。

1.4 肝线粒体呼吸酶系测定

参照 Graham 等[6]方法，取质量约 5g 待测肝脏组织，修剪去除血管和韧带等结缔组织，稍剪碎，以缓冲液反复冲洗并差速离心制备肝线粒体。整个过程在 0~4℃条件下进行。以考马斯亮蓝法测定肝线粒体悬液蛋白含量。以化学比色法分别测定肝线粒体细胞色素氧化酶(CCO)[7]及琥珀酸脱氢酶活力。

1.5 肝线粒体膜电位 (Mitochondrial membrane potential, MMP)检测[8]

取 0.5cm³ 大小新鲜肝组织，4℃下剪碎，分别以 200 目及 400 目筛网过滤两次制备肝单细胞悬液，加入 Rhodaminel23 孵育 30min，流式细胞仪测定其荧光强度。

1.6 肝组织切片 Oil-Red-O 染色

标本以 10%甲醛 - 钙固定至少 24h 后，参照龚志锦等[9]方法染色。肝细胞内脂肪变性呈红色为阳性细胞，胞核呈蓝色。光学显微镜下以门管区为中心随机选取 10 个高倍视野(10 × 20)，每只大鼠肝组织取 3 张切片，每张切片计数 300 个肝细胞，计算各视野内阳性细胞数。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，两均数间用 t 检验，单因素多均数间采用 F 检验。

2 结 果

2.1 血生化指标

2.1.1 血清 VPA 及 PB 浓度 VPA 连续灌胃 30 天后，动物血 VPA 浓度在 151.2~160.1mg/L 间，与 PB 联合用药组 VPA 浓度为 80.1~83.0mg/L 间，平均下降 47.02%($P<0.01$)，显示 PB 作为肝酶诱导剂加速 VPA 在体内代谢。各 PB 联合用药组间血清 PB 浓度在 14.87~16.19mg/L 间，且无组间差异。

2.1.2 血氨 VPA 或 VPA+PB 连续灌胃 30 天后，实验鼠血氨值分别为 (94.33 ± 11.02) μmol/L 及 (106.31 ± 7.53) μmol/L，超过对照 (33.00 ± 6.68) μmol/L 2.5 ~ 3 倍，表明 VPA 诱发高氨血症。当予以 L- 肉碱干预后，各组血氨值均明显下降，分别为

维普资讯 http://www.cqvip.com

(38.66 ± 5.85) μ mol/L 及 (42.38 ± 6.45) μ mol/L,与对照组不再有显著差异,表明 L- 肉碱能有效阻止 VPA 导致的血氨升高。

2.1.3 血清肉碱含量 表 1 显示,无论 VPA 组或 VPA+PB 组,均可见血游离肉碱(Free L-carnitine, FC)、总肉碱 (Total carnitine,TC) 水平降低,Acyl-LC/free-LC 比值明显升高。联合 PB 后,这种改变更为显著($P<0.01$)。补充 L- 肉碱后却能明显增加 FC、TC 含量,降低 Acyl-LC/free-LC 比值。

2.1.4 肝凝血因子合成功能 表 2 显示,以 VPA 尤其 VPA+PB 灌胃时,能明显影响 PT、APTT、TT 和 Fbg 等值,说明肝凝血因子合成功能受损,L- 肉碱对它们均有较好的保护作用。

2.2 细胞色素氧化酶及琥珀酸脱氢酶活力

表 3 显示,无论 VPA 组还是 VPA+PB 组,肝线粒体细胞色素氧化酶及琥珀酸脱氢酶活力均明显降低,且与对照组差异非常显著 ($P<0.01$),说明 VPA 明显影响肝线粒体关键性呼吸酶系活力。同时,补充 L- 肉碱能有效保障其二者活力正常。

2.3 肝线粒体膜电位测试

表 1 各组血清 L- 肉碱及酰基 -LC/ 游离 -LC 比值变化(μ mol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	游离肉碱	酰基肉碱	总肉碱	酰基 -LC/ 游离 -LC
对照组	41.38 ± 5.25	17.81 ± 0.69	59.19 ± 5.94	0.43 ± 0.02
VPA	18.76 ± 2.40◆◆	16.40 ± 1.94	36.16 ± 4.32◆◆	0.87 ± 0.03◆◆
VPA+PB	14.34 ± 4.21◆◆	12.56 ± 1.40◆	26.90 ± 5.60◆◆	0.91 ± 0.07◆◆
VPA+LC	106.68 ± 8.82◆◆**	26.19 ± 4.31◆◆**	132.87 ± 12.95◆◆**	0.24 ± 0.02◆◆**
VPA+PB+LC	89.83 ± 7.74◆◆**	18.17 ± 2.92	107.99 ± 10.04◆◆**	0.20 ± 0.02◆◆**

与对照组比较:◆$P<0.05$,◆◆$P<0.01$;与 VPA 组比较:*$P<0.05$,**$P<0.01$;与 VPA+PB 组比较:**$P<0.01$

表 2 各组肝凝血因子表达($\bar{x} \pm s$)

组别	PT	APTT	TT	Fbg
对照组	10.13 ± 1.45	45.33 ± 8.76	46.40 ± 9.21	1.10 ± 0.10
VPA	11.20 ± 0.66	55.63 ± 2.65	46.20 ± 7.98	0.63 ± 0.15◆
VPA+PB	12.23 ± 0.37◆	62.90 ± 7.78◆	61.50 ± 5.98◆	0.50 ± 0.20◆◆
VPA+LC	10.05 ± 1.06	53.95 ± 12.09	50.25 ± 2.33	0.82 ± 0.14
VPA+PB+LC	11.33 ± 1.58	51.57 ± 15.05	55.20 ± 6.96	0.79 ± 0.15

与对照组比较:◆$P<0.05$,◆◆$P<0.01$

表 3 各组肝线粒体 CCO、SDH 活性表达($\bar{x} \pm s$)

组别	CCO(K·min^{-1}/mgMt Pr)	SDH(U/mgMt pr)
对照组	7.85 ± 0.89	50.86 ± 13.53
VPA	3.68 ± 0.17◆◆	28.07 ± 4.56◆◆
VPA+PB	3.25 ± 0.21◆◆	21.40 ± 2.45◆◆
VPA+LC	8.31 ± 0.72**	47.10 ± 6.59**
VPA+PB+LC	7.93 ± 0.42**	54.42 ± 9.51**

与对照组比较:◆◆$P<0.01$;与 VPA 组比较:**$P<0.01$;与 VPA+PB 组比较:**$P<0.01$

表 4 各组肝线粒体膜电位变化($\bar{x} \pm s$)

组别	MMP
对照组	173.83 ± 15.00
VPA	169.44 ± 4.88
VPA+PB	136.51 ± 14.86◆
VPA+LC	152.67 ± 5.70
VPA+PB+LC	151.30 ± 23.61

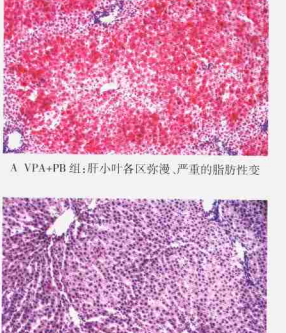
与对照组比较:◆:$P<0.05$

如表 4 所示,仅 VPA+PB 组实验鼠的 MMP 下降明显(21.47%),与对照比较差异显著($P<0.05$),且 L- 肉碱干预能有效维护实验鼠 MMP 正常。

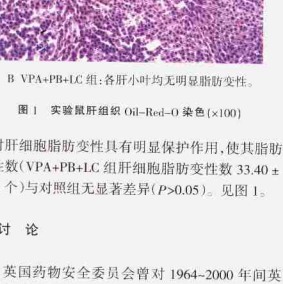
2.4 肝细胞 Oil-Red-O 染色

VPA 组实验动物均发生明显肝细胞脂肪变性,以小叶门管区最明显。与 PB 联合用药时,脂肪变性加重,甚至小叶周边区也被波及。VPA 组肝细胞脂肪变性数(149.80 ± 6.10 个)高于对照组(16.30 ± 4.61 个)9.2 倍。当与 PB 联合用药时,肝细胞变性数(255.20 ± 27.16 个)更高出 15.7 倍,均具有非常显著性差异(P 均 <0.01),显示较高剂量的 VPA,能使婴儿鼠肝细胞发生明显脂肪变性。另外,补充 L- 肉

维普资讯 http://www.cqvip.com



A VPA+PB 组：肝小叶各区弥漫、严重的脂肪性变



B VPA+PB+LC 组：各肝小叶均无明显脂肪变性。

图 1 实验鼠肝组织 Oil-Red-O 染色（×100）

碱对肝细胞脂肪变性具有明显保护作用，使其脂肪变性数（VPA+PB+LC 组肝细胞脂肪变性数 33.40 ± 8.78 个）与对照组无显著差异（$P>0.05$）。见图 1。

3 讨 论

英国药物安全委员会曾对 1964~2000 年间英国儿童致死性药物副作用进行统计分析，发现其最常见死因是肝功衰竭，占全部病死病例的 15.1%（50/331 例）。其中引起肝功衰竭的主要药物是丙戊酸盐类药物，占相关药物的 9.4%（31/331 例）[10]。且 VPA 肝功能衰竭多发生于 0~2 岁婴儿[1]。我们的实验研究亦表明，即使在相同范围的 VPA 血浓度作用下，幼鼠较成年鼠有更明显的肝细胞线粒体功能损伤[11]。基于 VPA 肝毒性常伴血清肉碱含量降低现象，近年，有少数试用 L- 肉碱抢救 VPA 肝衰竭的报道。Bohan 等[12]曾对 10 例急性严重 VPA 肝毒性损害患者，起病 5 天内静脉给以 L- 肉碱抢救后全部存活。然而，有关其确切疗效及作用机制尚不完全清楚。

为较全面了解 L- 肉碱防治 VPA 肝毒性的作用机理，本文以婴儿鼠为对象，成功制成 VPA 长期服用的动物模型，即实验鼠的 VPA 血浓度在 151.2~160.1mg/L（与 PB 合用组在 80.1~83.0mg/L）范围，前者稍高于 VPA 的临床用药参考血浓度，从而重点观察分析 L- 肉碱干预时肝线粒体相关功能的变化。

肉碱（Carnitine）是由赖氨酸转化生成，有左旋（L 型）和右旋体（D 型）两种构型，但哺乳动物体内只有左旋体（LC）[13]。总肉碱（TC）包括游离肉碱（FC）和酰基肉碱。其中血清（TC－FC）/FC 比值是诊断肉碱缺乏症的重要指标[14]。LC 的主要功能是在线粒体内、外膜肉碱脂肪酰转移酶Ⅰ、Ⅱ及移位酶的作用下，将长链脂肪酸转运入线粒体内，使其 β－氧化。本实验证实当口服 VPA 剂量为 500mg/kg 时确能导致血 FC 及 TC 含量显著降低。这是由于肉碱能促进累积的丙戊酰 CoA 转化为酰基肉碱并随尿排出，从而导致体内肉碱过度消耗，继发性减少。此外，VPA 还可能抑制肉碱的生物合成[15]，减少肾小管对酰基肉碱的重吸收[16]，进一步加重体内肉碱的缺乏。本研究特意设立补充外源性 LC 的实验组，围绕 VPA 对肝细胞线粒体功能的多种影响，对比性观察 LC 的治疗价值和作用机理。实验结果揭示，LC 对 VPA 诱发的肝功损伤防治作用主要显示在：（1）改善肝细胞内脂肪酸 β－氧化代谢，减少胞内脂肪沉积。长时间服用 VPA 后，实验动物均出现程度不等的肝细胞脂肪变性，与 PB 联合用药后明显加重该病理过程。然而，补充外源性 LC 后病变明显减轻，与未加用者显示非常显著性差异；（2）保持线粒体两个关键酶 SDH 及 CCO 活力，维护线粒体酶系正常功能；（3）维护线粒体正常膜电位和膜通透性，阻止肝细胞凋亡。本研究证实，VPA＋PB 可引起实验鼠肝 MMP 下降 21.4%，但 LC 能使该电位回复正常。从而阻止 MMP 减低和膜通透性的增加，防止细胞色素 C 从线粒体向胞浆内释放，抑制 caspase 级联活性激活和细胞凋亡发生；（4）维持正常血氨，防治 VPA 诱发的高氨血症。本研究证实，VPA 能导致实验鼠高氨血症，但 LC 干预后，血氨全部维持在正常水平。据认为[17]，肉碱治疗高氨血症，主要与肉碱能有效维护尿素循环的两个关键酶，即氨甲酰磷酸合成酶和精氨酸琥珀酸合成酶的活性有关；（5）防治 VPA 诱发的肝脏凝血因子等重白合成功能障碍。

维普资讯 http://www.cqvip.com

综上所述，LC 防治 VPA 肝毒性主要是通过阻止肝脂肪沉积和保护线粒体功能而实现。我们建议对 VPA 相关的高氨血症、具有多种 VPA 肝毒性危险因素者、服用 VPA 的婴幼儿、使用酮膳但伴有低肉碱血症的癫痫患者等人群，应同时口服补充 LC，以避免 VPA 所致的肝功能衰竭等毒副作用。

另外，在 VPA 与 PB 联合用药时，VPA 血药浓度（80.1~83.0mg/L）明显较单用 VPA 组（151.2~160.1mg/L）低，平均下降 47.6%，充分显示 PB 的体内肝酶诱导作用。联合用药动物的肝细胞脂肪变性程度、凝血因子合成功能、血氨水平、LC 含量及线粒体膜电位、线粒体呼吸酶系等各项指标，均较未用 PB 明显严重，说明 PB 在 VPA 肝毒性中起着较强的负面作用。有报道认为 [18]，PB 能抑制 VPA 的 β－氧化过程，使 VPA 的 ω－氧化产物显著增加，尤其致血浆中最具肝毒性的活性代谢产物 4-ene-VPA 含量明显增加，从而加剧了对肝细胞的损伤。因此，临床工作中当 VPA 与肝酶诱导剂联合运用时，虽然此时测定的 VPA 血药浓度值可能不高，亦应密切监测其肝毒副作用，以确保临床用药安全。

（傅大干，现在成都军区昆明总医院儿科工作）

参 考 文 献

[1] Dreifuss FE, Santilli N, Langer DH, et al. Valproic acid hepatic fatalities: A retrospective review[J]. Neurology, 1987; 37: 379-385.

[2] De Vivo DC, Bohan TP, Coulter DL, et al. L-carnitine supplementation in childhood epilepsy: current perspectives [J]. Epilepsia, 1998; 39 (11): 1216-1225.

[3] Plant N, Barber P, Horner E, et al. Differential gene expression in rats following subacute exposure to the anticonvulsant sodium valproate [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2002; 183(2): 127-134.

[4] 王 刚，谷 容，梁荆芬，等. 高效液相色谱柱前衍生法测定丙戊酸血药浓度[J]. 重庆医学，2003; 32(12): 1735-1737.

[5] Wan L, Richard W. Determination of free and total carnitine with a random-access chemistry analyzer[J]. Clin Chem, 1998; 44(4): 810-816.

[6] Graham JM, Rickwood D. Subcellular Fraction[M]. A pratical Approach. 1st ed, oxford: IRL press, 1997. 112-113.

[7] 岳 平，傅世英，黄永麟. 再灌注损伤心肌线粒体呼吸酶系的变化[J]. 中华心血管病杂志，1991; 19(1): 36-37.

[8] 阎明凡译，黄培堂校. 凋亡分析[M]. 斯佩克特 DL，戈德曼 RD，莱茵万德 LA 著. 细胞实验指南（上册），科学出版社出版，2001. 102-117.

[9] 龚志锦，詹榕洲. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海科学技术出版社，1994. 136.

[10] Clarkson A, Choonara I. Surveillance for fatal suspected adverse drug reactions in the UK[J]. Arch Dis Child, 2002; 87(6): 462-466.

[11] 傅大干，蔡方成，张晓萍. 丙戊酸肝毒性高危因素易感性机制的实验研究[J]. 中国药理学通报，2005; 21(11): 1375-1380.

[12] Bohan TP, Helton E, McDonald I, et al. Effect of L-carnitine treatment for valproate-induced hepatotoxicity[J]. Neurology, 2001; 56 (10): 1405-1409.

[13] Fred Shatsky. Should carnitine be added to parenteral nutrition solutions[J]. Nutr Clin Pract, 2000; 15: 152-154.

[14] Guarnieri G, Toigo G, Crapesi L, et al. Carnitine metabolism in chronic renal failure[J]. Kidney int, 1987; 32: S116-127.

[15] Farkas V, Bock I, Cseko J, et al. Inhibition of carnitine biosynthesis by valproic acid in rats--the biochemical mechanism of inhibition [J]. Biochem Pharmacol, 1996; 52(9): 1429-1433.

[16] Camina MF, Rozas I, Castro-Gago M, et al. Alteration of renal carnitine metabolism by anticonvulsant treatment [J]. Neurology, 1991; 41 (9): 1444-1448.

[17] Ohtsuka Y, Griffith OW. L-carnitine protection in ammonia intoxication. Effect of aminocarnitine on carnitine-dependent metabolism and acute ammonia toxicity[J]. Biochem Pharmacol, 1991; 41(12): 1957-1961.

[18] Loscher W, Nau H, Wahnschaffe U, et al. Effects of valproate and E-2-en-valproate on functional and morphological parameters of rat liver. II. Influence of phenobarbital comedication [J]. Epilepsy Res, 1993; 15(2): 113-131.