DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.007
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

文章编号:1000-5404(2004)03-0201-04

论著

L-carnitine对缺氧/复氧新生大鼠心肌细胞能量生成及CPT-Ⅱ mRNA表达的影响

朱光旭[1],谢 燕[1],王小华[1],周 舟[1],楼淑芬[2],余争平[1] (第三军医大学预防医学系:[1]劳动卫生学教研室,[2]全军复合伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨L-肉毒碱(L-carnitine, L-Car)对缺氧/复氧培养新生大鼠心肌细胞能量生成的影响及其机制。方法 以原代培养新生大鼠心肌细胞建立缺氧/复氧损伤模型,高效液相色谱检测单纯缺氧/复氧以及L-Car预处理缺氧/复氧心肌细胞ATP、ADP、AMP生成改变;RT-PCR方法检测心肌细胞肉毒碱脂酰基转移酶-Ⅱ(carnitine palmitoyltransferase-Ⅱ, CPT-Ⅱ)mRNA表达。结果 与正常对照组比较,培养心肌细胞缺氧24 h复氧0、2、4、8 h后,心肌细胞ATP、ADP均明显下降。与单纯缺氧/复氧组比较,L-Car预处理组心肌细胞缺氧/复氧后ATP含量明显增高;培养心肌细胞缺氧24 h后,CPT-Ⅱ mRNA表达除复氧2 h有所上升外,复氧4、8 h表达渐次降低。L-Car预处理使缺氧24 h复氧4 h心肌细胞CPT-Ⅱ mRNA表达呈浓度依赖性增高,50 nmol/L处理组CPT-Ⅱ mRNA表达显著高于0 nmol/L处理组。结论 心肌细胞缺氧/复氧过程中能量生成明显降低,其损伤可能与三羧酸循环中呼吸酶CPT-Ⅱ表达降低有关;L-Car对培养仔鼠心肌细胞缺氧复氧损伤具有显著保护作用,其机制可能是与L-Car从转录调控水平改善CPT-Ⅱ合成有关。

关键词:缺氧/复氧;L-carnitine;能量代谢;CPT-Ⅱ;心肌细胞;新生大鼠
中图法分类号:R322.11;R364.4;R977.22 文献标识码:A

Effects of L-carnitine on energy production and CPT-Ⅱ mRNA expression in hypoxia/reoxygenation treated cultured neonatal rat myocardial cells

ZHU Guang-xu[1], XIE Yan[1], WANG Xiao-hua[1], ZHOU Zhou[1], LOU Shu-fen[2], YU Zheng-ping[1] ([1]Department of Labor Hygiene, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of L-carnitine (L-Car) on the energy production in cultured neonatal rat myocardial cells after hypoxia/reoxygenation (H/R) and its mechanisms. **Methods** An H/R injury model was established using primary cultured rat myocardial cells. ATP, ADP and AMP contents in simple H/R-treated cultured myocardial cells and L-Car-pretreated group were determined by high performance liquid chromatography. Carnitine Palmitoyltransferase-Ⅱ (CPT-Ⅱ) mRNA expression in cultured myocardial cells was detected by RT-PCR. **Results** Compared with those in the control, ATP and ADP contents decreased significantly after 24 h hypoxia followed by reoxygenation for 0, 2, 4 and 8 h. Compared with that in simple H/R group, ATP content increased significantly in L-Car-pretreated group. CPT-Ⅱ mRNA expression in cultured myocardial cells increased slightly after hypoxia followed by reoxygenation for 2 h, but it decreased at 4 and 8 h after reoxygenation. CPT-Ⅱ mRNA expression in cultured myocardial cells pretreated with L-Car at 24 h followed by reoxygenation for 4 h increased in a dose-dependent manner. CPT-Ⅱ mRNA expression in cultured myocardial cells pretreated with L-Car at the dose of 50 nmol/L was significantly higher than that at the dose of 0 nmol/L. **Conclusion** H/R results in suppressed energy production in cultured myocardial cells. The possible mechanism may be associated with the down-regulation of CPT-Ⅱ mRNA expression. L-Car has protective effect on the H/R-induced injury of cultured neonatal rat myocardial cells, and its mechanism might be involved in the improvement of CPT-Ⅱ synthesis at the transcriptional level.

Key words: hypoxia/reoxygenation; L-carnitine; energy metabolism; CPT-Ⅱ; neonatal rat

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054202)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects) (G1999054202)
作者简介:朱光旭(1972-),男,贵州省瓮安县人,博士,主治医师,主要从事物理因素致机体免疫应答紊乱及其防治方面的研究。电话:(023)68752289
收稿日期:2002-11-19;修回日期:2003-02-01
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

大量文献研究已表明,心肌缺氧是缺血性心肌疾病(如冠心病、心肌梗死等)的最基本病理过程,也是严重创伤后休克等原因致心功能衰竭的重要始动因素。心肌细胞供能主要依赖发生于线粒体有氧条件下的脂肪酸β氧化,而非糖氧化代谢,这一与其他组织决然不同的供能方式决定了心肌组织对缺氧/复氧的高度敏感性。肉毒碱脂酰基转移酶-Ⅱ(carnitine palmitoyltransferase-Ⅱ,CPT-Ⅱ)是脂肪酸β-氧化过程中起关键作用的限速酶之一,文献[1,4,6,8,9]证实了L-carnitine(L-Car)对心肌损伤呈显著保护效应,但是其机制是否与心肌细胞能量生成以及CPT-Ⅱ表达相关联。本研究拟通过培养心肌细胞缺氧/复氧损伤模型,从转录调控水平探讨心肌细胞缺氧/复氧能量代谢损伤与L-Car保护作用及其机制,为临床对缺氧/复氧损伤防治提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 心肌细胞培养

无菌取新生3 d龄Wistar大鼠新生鼠左心室,剪碎后经0.125%胰蛋白酶消化,以200目尼龙网过滤分离成单细胞悬液,以含15%胎牛血清的高糖DMEM培养基在95%∶5%CO_2 37 ℃条件下应用差速贴壁法先培养90 min以纯化心肌细胞,然后按实验设计继续培养,对数生长期细胞用于实验。

1.2 主要试剂

高糖DMEM培养基(美国Hyclone公司产品)按说明书配制,培养液每升另加青霉素、链霉素使终浓度达100 U/ml、灭活胎牛血清(美国Hyclone公司)150 ml,调pH值于7.2~7.4。L-Carnitine、ATP、ADP、AMP标准品(美国Sigma公司),PCR试剂(上海生工)。

1.3 主要设备及器材

新生Wistar大鼠(3 d龄)购于本校实验动物中心。CO_2培养箱(美国Queue 2721型),倒置相差显微镜(日本Olympus公司),PCR仪(美国PT-100),高效液相色谱分析仪(日本岛津公司),37 ℃恒温箱(中国天津仪器厂),紫外分光光度仪(美国Beckman DU640型)。

1.4 缺氧模型的建立

将培养仔鼠心肌细胞置37 ℃恒温真空干燥罐,参照王培勇等[2]方法进行,以含95%N_2∶5%CO_2气体缺氧完毕,重新置含95%空气∶5%CO_2、37 ℃培养箱按实验设计复氧,进行各项指标测定。

1.5 实验分组

分为2组:第1组:缺氧/复氧对心肌细胞能量代谢的影响及L-Car的保护作用。①单纯缺氧/复氧组:已培养好的心肌细胞缺氧24 h后,再分别复氧0、2、4、8 h;②L-Car预处理组:培养好的心肌细胞缺氧前2 h加入终浓度为50 nmol/L的L-Car,继续培养2 h后缺氧24 h,然后分别复氧培养0、2、4、8 h;③正常对照组:已培养好的心肌细胞不作缺氧处理,其余条件同实验组;第2组:复氧对CPT-ⅡmRNA表达的影响与L-Car的保护作用。①单纯缺氧/复氧组观察缺氧心肌细胞分别复氧0、2、4、8 h CPT-ⅡmRNA表达变化;②L-Car预处理组取同批培养的心肌细胞缺氧前2 h加入终浓度为0、0.05、0.5、5、50 nmol/L含15%胎牛血清的DMEM培养基配制的L-Car稀释液,缺氧24 h后复氧4 h检测CPT-ⅡmRNA表达。

1.6 培养心肌细胞ATP、ADP、AMP含量的测定

在缺氧/复氧以及L-Car预处理的培养心肌细胞中(10^7个细胞),加入1 ml 0.1 mol/L高氯酸,冰上匀浆,在4 ℃,15 000×g离心10 min;然后取上清液用0.5 mol/L碳酸钠溶液中和并调整pH至6.5~7.0,重复离心1次,取上清液作高效液相色谱分析。应用公式EC(energy charge,EC)=(ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP)计算能量负荷。

1.7 RT-PCR检测缺氧/复氧心肌细胞CPT-ⅡmRNA表达

总RNA提取:按Tripure说明书进行,提取总RNA,在A_{260}/A_{280}条件下进行RNA纯度鉴定和定量,并用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进一步确认RNA质量。取总RNA 5.0 μg逆转录合成cDNA,然后按文献[3]进行半定量PCR反应,以β-actin作为内参照。进行多重PCR扩增。反应条件为:95 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,进行29个循环,72 ℃延伸7 min。引物序列为:CPT-Ⅱ上游5′-GAGACTGGCGTTGGGAAGGA-3′;下游5′-GAGGGAGGAACAAAGCGAATGA-3′,扩增片段长度311 bp;β-actin上游5′-TTGTAACCACCTGGGACGATATGG-3′;下游5′-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAG-3′,扩增片段长度764 bp。反应结束后,各取PCR产物4 μl进行1.7%琼脂糖电泳,并用Gel Doc 2000凝胶图像分析仪扫描,PCR产物量以光密度值×面积表示,目的片段与β-actin的光密度比值作为目的片段mRNA的相对含量。

1.8 统计学分析

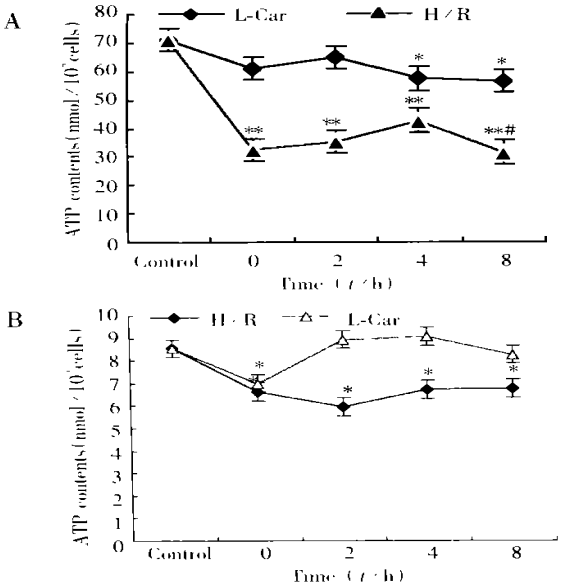
采用Microsoft Excel软件进行t检验。

2 结果

2.1 缺氧后复氧不同时间L-Car对心肌细胞ATP、ADP、AMP生成的影响

大鼠培养心肌细胞单纯缺氧24 h,ATP含量显著低于正常对照组($P<0.01$),复氧至4 h,ATP含量呈恢复趋势,但复氧8 h时ATP含量又显著降低($P<0.01$)(图1A);ADP含量变化趋势类同ATP(图1B);AMP含量与正常对照相比,仅在复氧后4 h明显下降($P<0.05$)(图2);心肌细胞缺氧/复氧各个时相点能量负荷明显降低;L-Car(50 nmol/L)处理组中,复氧2、4、8 h,ADP、EC与正常对照相比无显著差异,AMP在复氧4h甚至显著高于正常对照($P<0.01$),ATP生成仅在复氧4、8 h显著低于正常对照组($P<0.05$)。

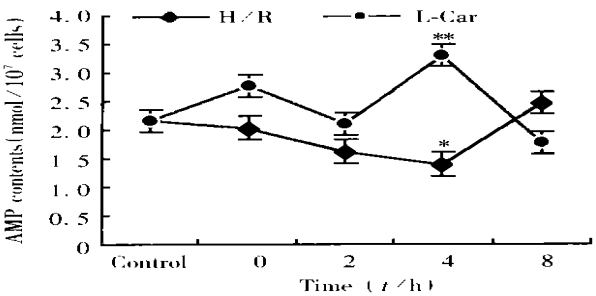
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* 4 h

图 1　L-Car 对缺氧/复氧心肌细胞 ATP(A)、ADP(B)生成的影响($n=4$)

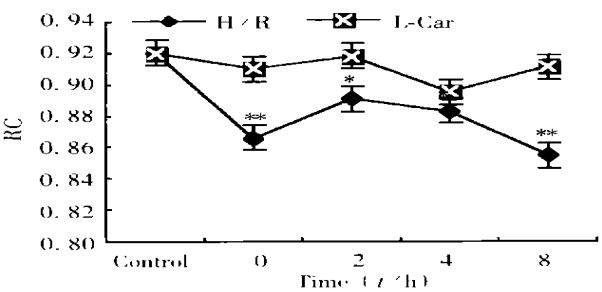
Fig 1　Effects of L-Car on ATP(A) and ADP(B) contents in myocardial cells after H/R ($n=4$)



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

图 2　L-Car 对缺氧/复氧心肌细胞 AMP 生成的影响($n=4$)

Fig 2　Effects of L-Car on AMP contents in myocardial cells after H/R ($n=4$)



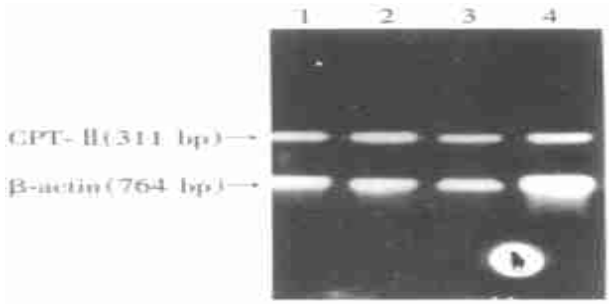
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control

图 3　L-Car 对缺氧/复氧心肌细胞能量负荷的影响($n=4$)

Fig 3　Effects of L-Car on energy charges (RC) of myocardial cells after H/R ($n=4$)

2.2　复氧对缺氧心肌细胞 CPT-ⅡmRNA 表达的影响以及 L-Car 的保护作用

2.2.1　不同复氧时间缺氧心肌细胞 CPT-Ⅱ mRNA 表达的变化　复氧不同时相点 CPT-Ⅱ mRNA 表达的变化显示, 在复氧 2 h, CPT-Ⅱ mRNA 表达有所上升, 但是与复氧 0 h 相比并无显著差别。复氧后 4 h 则表达下降($P<0.05$), 至 8 h CPT-Ⅱ mRNA 表达显著低于对照组($P<0.01$)(图 4)。

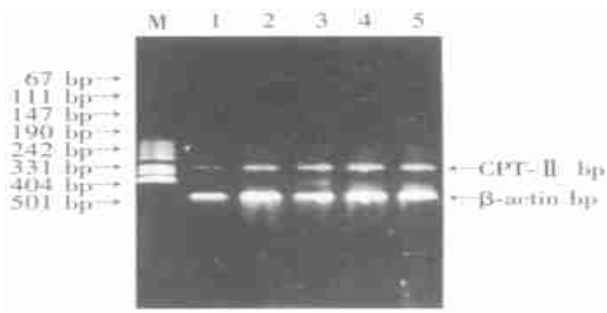


1—4: 0, 2, 4 and 8 h after reoxygenation

图 4　RT-PCR 检测缺氧/复氧对 CPT-Ⅱ mRNA 表达的影响

Fig 4　Effects of H/R on expression of CPT-Ⅱ mRNA detected by RT-PCR

2.2.2　不同浓度 L-Car 对缺氧后复氧 4 h 培养心肌细胞 CPT-Ⅱ mRNA 表达的影响　L-Car 在 0.5、5 nmol/L 浓度对于缺氧后复氧 4 h CPT-Ⅱ mRNA 表达有明显促进作用($P<0.05$), 50 nmol/L 对 CPT-Ⅱ mRNA 表达影响与 0 nmol/L 处理组相比差别非常显著($P<0.01$)(图 5)。



M: Marker; 1—4: 0, 0.05, 0.5, 5 and 50 nmol/L L-Car treated groups

图 5　RT-PCR 检测 L-Car 对缺氧/复氧后 CPT-Ⅱ mRNA 表达的影响

Fig 5　Effects of L-Car on the CPT-Ⅱ mRNA expression after H/R detected by RT-PCR

3　讨论

心肌缺血再灌注损伤是创伤、休克等致心肌损伤的基本病理过程。由于心肌细胞内脂肪酸代谢的至关重要性导致心肌细胞对缺氧的高度敏感和对氧的高度依赖。事实上, 缺血再灌注损伤最关键因素是缺氧/复氧。因此, 深入认识缺氧/复氧能量代谢的损伤与调控机制, 以及寻找有效的防治措施仍然是临床面对的缺血再灌注损伤课题研究的主要内容。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

能量生成减少可造成心肌细胞许多继发生物学效应,包括细胞电生理行为改变、心肌细胞凋亡,最后导致心肌功能失调、心脏泵血功能改变。实验结果显示,缺氧/复氧可以导致心肌细胞能量生成明显减少,这可能与心肌细胞缺氧/复氧而致氧化磷酸化过程受损相关联。L-Car主要由肝、脾合成,文献[4]报道L-Car具有广泛生物学作用,临床研究表明,在心肌梗死早期应用L-Car可保护缺血造成的微循环障碍,并增强血流恢复能力,防止坏死面积进一步扩大及防止心源性休克[5];在左冠状动脉被持久结扎的情况下,L-Car除了防止坏死面积进一步扩大,还可显著保护未受缺血/缺氧波及的心肌组织正常功能[6]等。我们也曾报道L-Car具有保护缺氧/复氧处理的培养心肌细胞增殖活性以及防止缺氧复氧心肌细胞凋亡[7],本研究进一步观察了L-Car在复氧过程中对缺氧心肌细胞能量代谢的影响,结果显示缺氧后复氧明显抑制心肌细胞能量生成,并且发现L-Car可缓减缺氧/复氧对心肌细胞能量生成的负面影响,保护细胞能量负荷。L-Car预处理组,心肌细胞缺氧后复氧0、2、4、8 h后,ATP含量均显著高于缺氧/复氧组,并且在观察时限内,ATP含量出现显著变化较单纯缺氧/复氧组而言表现延迟。应用L-Car预处理可减轻缺氧/复氧对心肌细胞的毒性作用,促进内源性ATP的产生。提示L-Car在创伤、休克等引起的心肌组织缺氧/复氧损伤可能具有相当的应用价值,可望成为临床预防和治疗心肌梗死及手术性心肌缺血心肌损伤等优先被选药物之一。

CPT-Ⅱ是在将长链脂肪酸转运到线粒体内过氧化物酶体进行脂肪酸β氧化过程中的关键的限速酶之一,由过氧化物酶体β氧化产生的短链脂酰CoA及过氧化物酶体支链氨基酸氧化产生的支链脂酰CoA转运到线粒体均有赖于该酶。一般情况下CPT-Ⅱ mRNA表达受血中长链脂肪酸浓度调节[8]。细胞内CPT-Ⅱ的表达以及活性的正常是维持细胞正常能量生成的重要因素。研究结果显示缺氧/复氧明显抑制心肌细胞CPT-ⅡmRNA表达,经24 h严重缺氧的心肌细胞在复氧不同时相点表达变化显示,复氧2 h,与复氧0 h相比,CPT-ⅡmRNA表达有所上升,但是并无显著意义。复氧4,8 h CPT-ⅡmRNA表达均显著低于对照组。提示心肌细胞在缺氧状态下,能量生成受到严重抑制,复氧后短期内,由于恢复了氧供,细胞部分恢复了能量生成,但可能并不是足以满足细胞维持正常生理功能的需要,而复氧一定时间后即表现出续损伤效应。缺氧/复氧诱导CPT-Ⅱ mRNA表达下调,这将使细胞内CPT-Ⅱ严重不足,长链脂肪酸穿过线粒体内膜进入线粒体β氧化的过程受抑,这可能是缺氧/复氧导致细胞高能磷酸化合物生成减少的根本原因。

研究进一步观察了不同浓度L-Car预处理培养心肌细胞在缺氧24 h后复氧4 h检测CPT-Ⅱ mRNA表达情况,结果显示,在0~50 nmol/L范围内L-Car剂量依赖性促进CPT-Ⅱ mRNA表达,与0剂量组比较,0.5、5、50 nmol/L均使CPT-Ⅱ mRNA表达显著增高。这一效应的原因可能是由于L-Car解除了缺氧/复氧导致的毒理因素如自由基以及其他活性介质对CPT-Ⅱ mRNA表达起抑制效应,因为已有文献报道L-Car在组织缺血缺氧过程中可作为自由基清除剂和某些毒性物质的拮抗剂,并且新近文献[9,10]表明外源性L-Car对心、肝以及骨骼肌均呈保护效应,客观情况是否表现为L-Car通过去除自由基及其它毒性介质的毒性效应以促进CPT-Ⅱ mRNA表达,尚需进一步研究,研究结果提示了L-Car在保证长链脂酸转运畅通及能量的正常生成可能所起的重要作用。

综上所述,本研究从能量代谢角度进一步证实了L-Car对缺氧/复氧培养心肌细胞的保护效应,本研究中关于:①心肌细胞缺氧后复氧明显加重其能量代谢的损伤;②L-Car预处理可拮抗缺氧/复氧对心肌细胞能量代谢的损伤效应;③心肌细胞缺氧后复氧可显著抑制其CPT-Ⅱ mRNA表达;④L-Car预处理的保护效应与减轻心肌细胞缺氧/复氧所致的CPT-Ⅱ mRNA表达降低等结果和观点,未见有类似的报道。

参考文献:

[1] Yu Z P, Yoshihisa I, Masato M, *et al*. Suppression of pentylenetetrazol-induced seizures by carnitine in mice[J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 1997, 335(2): 545-549.

[2] 王培勇,许蜀敏,刘 健. 一种简易实用的缺氧培养细胞装置[J]. 第三军医大学学报,1997, 19(2): S88-89.

[3] J萨姆布鲁克, E F 弗思奇, T曼氏阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京:科学出版社,1998. 672-688.

[4] Heo K, Lin X, Odle J, *et al*. Kinetics of carnitine palmitoyltransferase-I are altered by dietary variables and suggest a metabolic need for supplemental carnitine in young pigs[J]. J Nutr, 2000, 130(10): 2467-2470.

[5] Colonna P, Iliceto S. Myocardial infarction and left ventricular remodeling: result of the CEDIM trial Carnitine ecocardiografia digtalizzata infarto miocardico[J]. Am Heart J, 2000, 139(2 pt 3): S124-130.

[6] Penn D, Zhang L, Bobrowski P J, *et al*. Carnitine deprivation adversely affects and cardiac performance in the lipopolysaccharide and hypoxia/reoxygenatio-stressed piglet heart[J]. Shock, 1999, 11(2): 120-126.

[7] 朱光旭,余争平,谢 燕,等. L-Carnitine拮抗培养心肌细胞缺氧/复氧损伤[J]. 第三军医大学学报,2001, 23(12): 1410-1413.

[8] Omgreen M C, Olsen D B, Vissing J. Exercise tolerance in carnitine palmitoyltransferase Ⅱ deficiency with IV and oral glucose[J]. Neurology, 2002, 59(7): 1046-1051.

[9] Zeidan Q, Strauss M, Porras N, *et al*. Differential long-term subcellular responses in heart and liver to adriamycin stress. Exogenous L-carnitine cardiac and hepatic protection[J]. J Submicrosc Cytol Pathol, 2002, 34(3): 315-321.

[10] Rivero J L, Sporleder H P, Quiroz-Rothe E, *et al*. Oral L-carnitine combined with training promotes changes in skeletal muscle[J]. Equine Vet J Suppl, 2002, 34(3): 269-274.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net