

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.009

乙酰左旋肉碱对大鼠缺血性损伤及氧糖剥夺细胞模型的保护作用

张忠霞¹, 崔冬生¹, 王 涛², 牛静亚¹, 张 睿¹, 谢晓民¹, 许顺江¹

(1. 河北医科大学第一医院中心实验室、河北省脑老化与认知神经科学实验室, 石家庄 050031;

2. 邯郸县医院普外科, 邯郸 056002)

【摘要】目的:观察乙酰左旋肉碱(acetyl-L-carnitine, ALC)对大鼠缺血性脑损伤和氧糖剥夺细胞模型的保护作用,并探讨其可能的作用机制。**方法:**采用随机数字表法,将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和 ALC 组,制备大鼠脑缺血模型。术前 24 h ALC 组腹腔注射 ALC,模型组和假手术组注射等量磷酸缓冲液。术后 6 h 进行氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色,评价 ALC 对大鼠缺血性损伤的影响。体外培养 PC12 细胞,将细胞随机分为正常组、模型组和 ALC 组,建立体外氧糖剥夺模型。建模前 24 h 在 ALC 组加入 ALC。建模后 3 h 分别通过 MTT 法、TUNEL 法、SYTOX 染色检测细胞活力与细胞的凋亡、坏死情况;同时检测各组细胞超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、三磷酸腺苷酶(adenosine triphosphatase, ATPase)活性和丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)含量的改变。**结果:**ALC 预处理后,大鼠的 TTC 染色梗死灶面积较模型组明显减小($P<0.05$);细胞活力与氧糖剥夺模型组相比显著增加,坏死与凋亡的细胞数明显下降, SOD、ATPase 活性增高, MDA 含量下降($P<0.05$)。**结论:**ALC 预处理可以保护大鼠缺血性脑损伤,提高氧糖剥夺条件下的细胞活力,其机制可能与增强细胞抗氧化能力、改善细胞的能量代谢、减少细胞凋亡与坏死有关。

【关键词】乙酰左旋肉碱;脑缺血;氧糖剥夺;PC12**【中国图书分类法分类号】**R781**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-05-08

Protective effects of acetyl-L-carnitine on ischemic injury and oxygen-glucose deprivation-induced cells

ZHANG Zhongxia¹, CUI Dongsheng¹, WANG Tao², NIU Jingya¹, ZHANG Rui¹, XIE Xiaomin¹, XU Shunjiang¹

(1. Central Laboratory, the First Hospital of Hebei Medical University, Brain Aging and Cognitive Neuroscience Laboratory of Hebei Province; 2. Department of General Surgery, Handan County Hospital)

【Abstract】Objective: To study the protective effects of acetyl-L-carnitine (ALC) on ischemic brain injury in rats and oxygen-glucose deprivation (OGD) induced cells as well as the possible mechanisms. **Methods:** Using the table of random number, SD rats were divided into three groups: sham group, model group and ALC group. ALC and an equal volume of phosphate buffer were injected intraperitoneally for ALC, model and sham groups respectively at 24 h before cerebral ischemia rat model was made. TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) staining was used to assess the effects. In vitro, PC12 cells were divided into normal group, model group and ALC group. ALC was given at 24 h before OGD model being made. Cell viability, apoptosis and necrosis were analyzed using MTT assay, TUNEL, SYTOX staining respectively. Activities of adenosine triphosphatase (ATPase) and superoxide dismutase (SOD) as well as maleic dialdehyde (MDA) content were also detected. **Results:** After the pre-treatment of ALC, the infarction size was obviously reduced ($P<0.05$); in vitro, the cell viability, activities of SOD and ATPase were increased, while the content of MDA, percentage of apoptotic and necrotic cells were decreased compared with those in OGD group ($P<0.05$). **Conclusions:** These results suggested that ALC has protective effects on ischemic injury rats and OGD induced PC12 cells. The effects may be associated with the improvement of cell antioxidant capacity and energy metabolism as well as the suppression of necrosis and apoptosis.

【Key words】acetyl-L-carnitine; cerebral ischemia; oxygen-glucose deprivation; PC12

作者介绍: 张忠霞, Email: smallrainn@gmail.com,

研究方向: 脑老化与认知神经疾病的研究。

通信作者: 许顺江, Email: sjxu66@sina.com。

基金项目: 河北省卫生厅 2009 年医学科学研究重点课题资助项目
(编号: 20090063)。

脑血管疾病是神经系统常见病和多发病,是目前人类疾病 3 大死亡原因之一,其中缺血性卒中约占全部脑卒中的 70%,严重危害人类健康。乙酰左旋肉碱(acetyl-L-carnitine, ALC)是左旋肉碱(L-carnitine, LC)的乙酰化物,可作为乙酰胆碱和 L-谷氨酸的来源,促进细胞能量合成。已有研究将乙酰左旋肉碱用于治疗缺血性脑损伤和神经退行性疾病^[1-2],但其确切机制尚不清楚。本研究通过体内体外实验分别观察 ALC 对大鼠缺血性脑损伤和氧糖剥夺 PC12 细胞损伤的保护作用,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞与主要试剂

SD 雄性大鼠 32 只,体质量(300±30) g,清洁级(河北医科大学动物中心提供,动物合格证号 1006156);PC12 细胞株(上海第二军医大学神经生物学教研室赠)。ALC(Sigma, 美国)、SYTOX Green(Invitrogen, 美国)、Hoechst(Sigma, 美国)、TUNEL(Promega, 美国)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)(Sigma, 美国)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)、三磷酸腺苷酶(adenosine triphosphatase, ATPase)试剂盒(南京建成科技有限公司)

1.2 主要仪器

多功能酶标仪(美国 Thermo Labsystems, SN 354-01015)、倒置荧光显微镜(日本 Nikon, ECLIPSE 80i)、超低温离心机(德国 eppendorf, 5417R)。

1.3 脑缺血大鼠模型的制备及分组

本实验的操作过程经河北医科大学第一医院伦理委员会讨论通过。应用改良的线栓大鼠大脑中动脉缺血模型的制作方法制备左侧局灶性脑缺血模型。参考 Longa 等^[3]的 5 级 4 分法标准评分,1~3 分视为造模成功。将大鼠随机分为模型组 6 只,ALC 组 6 只,另有假手术组大鼠 6 只。于手术前 24 h 对 ALC 组大鼠腹腔注射 ALC(16 mmol/kg)^[4],其余两组分别给予等量 PBS。

1.4 TTC 染色

大鼠制模成功后 6 h,断头取脑,以滤纸吸干表面残血,去除嗅脑、脑干、小脑,置于-20℃冰箱中冷冻 15 min,自额极前点起 2 mm 起向后每隔 2 mm 切取冠状组织片 5 片。置于质量分数为 2% 的 TTC 染液中,37℃孵育 30 min,待显色完全后将组织照相,相片用图像处理软件(NIS-Elements BR2.3)分析,计算梗死灶面积所占百分数(%)。

1.5 PC12 细胞氧糖剥夺损伤模型的制备与分组

体外培养 PC12 细胞,加入含 10% 马血清,5% 胎牛血清

DMEM,置于 5%CO₂、37℃ 细胞培养箱内培养。将处于生长对数期的细胞传至 96 孔板,种植密度为 1.0×10⁴ 个/L。将细胞分为正常组、模型组、ALC 组,每组均为 6 个复孔。根据预实验结果,ALC 组加入 0.2 mmol/L ALC 预处理 24 h 后换液。正常组加入含糖 4.5 g/L 的 DMEM 溶液,模型组、ALC 组均加入含糖 0.5 g/L、含 Na₂S₂O₄ 3 mmol/L 的 DMEM 溶液,作用 3 h 后进行以下检测。

1.6 MTT 法检测细胞活力

低氧低糖环境作用 3 h 后,每组每孔均加入 20 μl 5 g/L 的 MTT 溶液,继续置于 5%CO₂、37℃ 的细胞培养箱内。4 h 后,取出 96 孔板,将各组的培养基吸弃,每孔各加入 150 μl DMSO,振荡混匀 10 min,酶标仪检测各孔吸光度(absorbance, A)值。每组实验重复至少 3 次。

1.7 细胞染色与图像采集

将经 1.5 处理过的细胞取出培养箱,弃培养液,PBS 洗,分别加入 TUNEL/SYTOX(1:10 000)染液,常温孵育 10~20 min;TUNEL 染色之前加入 4%多聚甲醛,4℃固定 25 min,0.2% Triton-100 进行打孔。倒置荧光显微镜采集图像,采用 NIS-Elements BR 2.3 软件进行细胞计数,计数 10 个视野,计算细胞凋亡率(凋亡细胞计数÷总细胞计数×100%)。

1.8 SOD、MDA、ATPase 水平测定

用含 0.125%胰酶、0.02% EDTA 的消化液对细胞进行消化并收集,加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,冰上裂解细胞,提取细胞总蛋白,采用分光光度法测定 SOD、MDA 和 ATPase 活性,操作按各试剂盒操作说明进行。

1.9 统计学分析

采用统计学软件 SPSS 13.0 对各组数据进行统计。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析;脑梗面积百分比、细胞活力、细胞凋亡率、坏死率均采用非参数检验(Kruskal-Wallis H 检验)。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

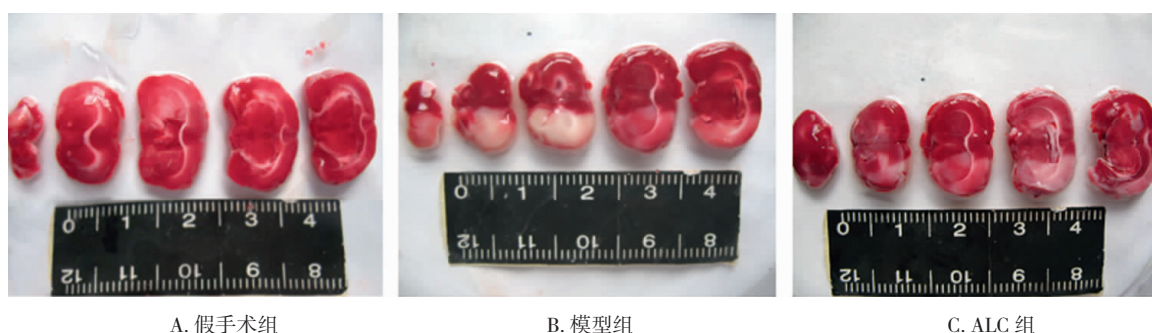
2.1 ALC 对脑缺血模型大鼠脑梗死面积的影响

脑组织切片 TTC 染色可见,假手术组大鼠无梗死灶,模型组、ALC 组大鼠同侧半球大脑中动脉供血区软化、苍白,出现明显的梗死灶。ALC 组梗死面积百分比比较模型组明显减少,差异有统计学意义($\chi^2=12.389, P=0.002$)(图 1,表 1)。

表 1 各组大鼠脑梗死面积百分比的比较(%, n=6)

Tab.1 Percentages of infarction size in groups(%, n=6)

组别	梗死面积百分比(%)
假手术组	0.000
模型组	23.530
ALC组	16.470
χ^2 值	12.389
P 值	0.002

图 1 ALC 对缺血性脑损伤大鼠脑梗塞面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig.1 Effects of ALC on cerebral infarction size in rats using TTC staining ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.2 ALC 对氧糖剥夺 PC12 细胞活力的影响

MTT 检测结果显示,与正常组相比,模型组的细胞活力明显减低;与模型组相比,ALC 预处理 24 h 可以使细胞活力明显增高,差异有统计学意义($\chi^2=7.2, P=0.027$)(表 2)。

表 2 各组 PC12 细胞活力的比较 ($n=6$)Tab.2 Comparison of cell viability of PC12 cells in groups ($n=6$)

组别	A 值
正常组	0.561
模型组	0.394
ALC 组	0.485
χ^2 值	7.200
P 值	0.027

2.3 ALC 对氧糖剥夺 PC12 细胞凋亡与坏死率的影响

TUNEL 和 SYTOX 染色结果显示,氧糖剥夺可诱导 PC12 细胞出现明显的凋亡与坏死,模型组凋亡与坏死细胞数占总细胞数的百分率显著高于正常组;而 ALC 预处理组细胞的凋亡与坏死率显著低于模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2、3、表 3)。

表 3 各组细胞凋亡率与坏死率的比较 ($\%, n=6$)Tab.3 Percentage of apoptotic and necrotic cells in groups ($\%, n=6$)

组别	凋亡率	坏死率
正常组	0.909	1.209
模型组	10.218	19.499
ALC 组	0.947	1.204
χ^2 值	10.059	11.158
P 值	0.007	0.004

2.4 ALC 对氧糖剥夺 PC12 细胞 SOD、ATPase 活性和 MDA 含量的影响

氧糖剥夺可诱导 PC12 细胞产生氧化应激损伤,细胞内 SOD 活性下降,MDA 含量增加,同时 ATPase 活性降低;加入 ALC 预处理 24 h 后,细胞内 SOD 和 ATPase 活性较模型组显著增高,MDA 含量下降,差异有统计学意义($P<0.05$)(表 4)。

表 4 ALC 对 PC12 细胞 SOD、MDA、ATPase 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Tab. 4 Effects of ALC on SOD,ATPase activity and MDA content in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

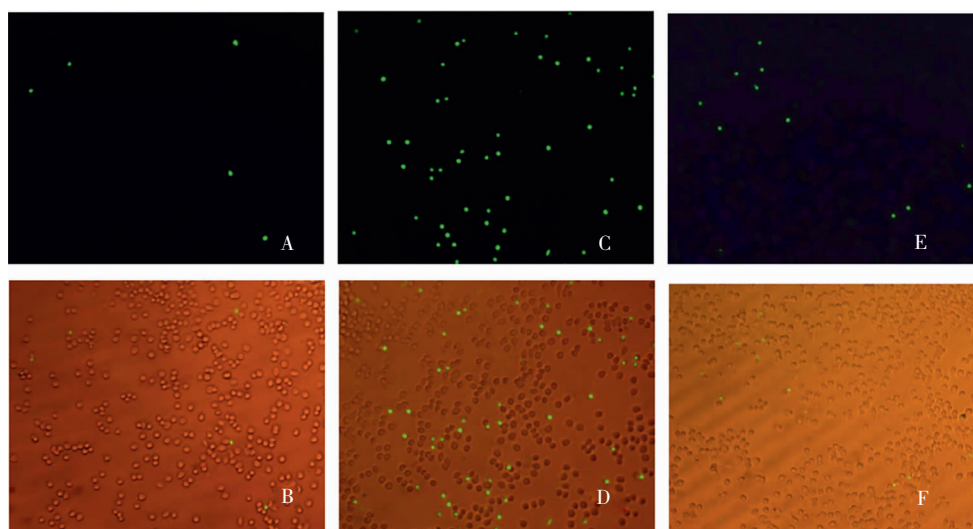
组别	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)	ATPase (U/mg prot)
正常组	10.13 $\pm$ 1.26	0.49 $\pm$ 0.14	4.01 $\pm$ 2.59
模型组	6.84 $\pm$ 0.50 ^a	1.36 $\pm$ 0.14 ^a	2.19 $\pm$ 1.30 ^a
ALC 组	17.26 $\pm$ 3.48 ^b	0.73 $\pm$ 0.20 ^b	3.24 $\pm$ 1.28 ^b

注:a,与正常组比较, $P<0.05$;b,与模型组比较, $P<0.05$

3 讨论

缺血性脑血管病发病率高、致残致死率高、复发率高,发病机制复杂,已成为威胁人类健康的 3 大病因之一。目前对其发病机制及治疗措施的研究一直是人们关注的热点。已有研究报道将 LC 用于脑缺血性疾病,但其效果却仍有争议。Slivka 等^[4]将肉碱用于局灶性脑缺血大鼠模型进行了 4 次单独实验,只有第 1 次实验观察到梗死体积的减小,而在之后的 3 次实验中均没有改善,重复性很差。ALC 是 LC 的活化形式,具有促进脂肪酸在线粒体的 β -氧化、转运能量、抗氧化等多种重要生理功能,并容易通过血脑屏障,效果可能会优于 LC。本实验室前期研究结果显示,LC 对于改善缺血性脑卒中大鼠的脑梗面积效果不明显,因此本研究分别通过体内体外实验,观察 ALC 对大鼠缺血性脑损伤和氧糖剥夺 PC12 细胞的保护作用。

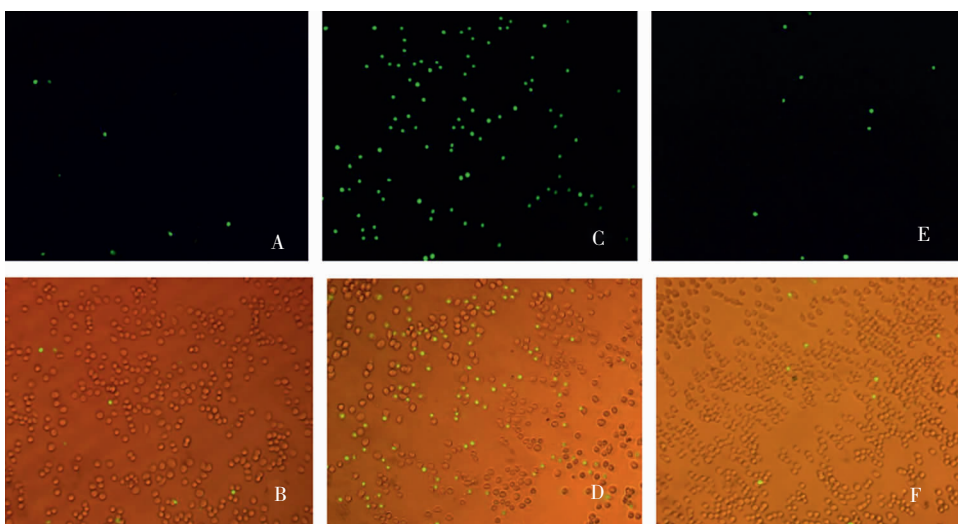
本实验采用改良的线栓法闭塞大鼠大脑中动脉,制备局灶性脑缺血动物模型,术前 24 h 腹腔注射 16 mmol/kg(即 200 mg/kg)ALC, TTC 染色观察到 ALC 预处理组大鼠的脑梗死面积较模型组显著降



A、B. 正常组;C、D. 模型组;E、F. ALC 组

图 2 ALC 对氧糖剥夺条件下 PC12 细胞凋亡的影响 (TUNEL 染色, 200 ×)

Fig.2 Effects of ALC on cell apoptosis of PC12 cells exposed to oxygen-glucose deprivation (TUNEL staining, 200 ×)



A、B. 正常组;C、D. 模型组;E、F. ALC 组

图 3 ALC 对氧糖剥夺条件下 PC12 细胞坏死的影响 (SYTOX 染色, 200 ×)

Fig.3 Effects of ALC on cell necrosis of PC12 cells exposed to oxygen-glucose deprivation
(SYTOX staining, 200 ×)

低,提示 ALC 预处理可明显改善局灶性脑缺血大鼠的神经损伤。文献[1]报道,大鼠发生脑缺血后给予 200 mg/kg ALC,在第 1、2、3、7 天分别对其进行神经功能评分,发现其可以改善早期临床症状并预防其显著的体重减轻。此外,Fakhreya 等^[2]制作 4 种不同的大鼠局灶性缺血模型,ALC 腹腔注射 400 mg/kg,连续注射 5 d 可以减小梗死面积,认为可能是通过减少兴奋性神经递质谷氨酸盐的水平,抑制在脑梗期间谷氨酸盐的聚集实现的。

由于缺血性脑血管病发病机理复杂,并且存在动物的个体差异以及手术过程中的操作等干扰因素,因此通过稳定的细胞模型对机制进行研究具有许多优点,如条件易控、样品需要量小、实验周期短等。氧糖剥夺模型是目前较为公认体外模拟脑缺血的常用模型。PC12 细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤克隆的细胞株,在结构和功能上与神经元有很多相似之处,与神经元比较又相对容易培养,被广泛作为一种良好的神经系统体外模型,用于研究多

种神经系统疾病^[5]。

本研究前期首先观察了 ALC 本身对正常环境培养的 PC12 细胞活力的影响,发现 ALC 浓度在 0~1 mmol/L 时对 PC12 细胞活力无明显影响,当 ALC 浓度 ≥ 1 mmol/L 时,PC12 细胞活力明显下降,提示生理剂量的 ALC 对 PC12 细胞无明显毒副作用,但高浓度的 ALC 对 PC12 细胞的生长有影响,可能与改变细胞内渗透压有关。之后分别选择 0.2、0.4、0.6 mmol/L 的 ALC 对氧糖剥夺模型进行干预,发现均能提高 PC12 细胞活力,并且没有剂量依赖性,因此本研究选择了浓度为 0.2 mmol/L 的 ALC 进行之后相关实验。结果提示,ALC 预作用 24 h 可使 PC12 细胞的活力明显增加;这与 Virmani 等^[6]人报道 ALC 可有效抑制 1-甲基-4-苯基吡啶离子或甲基苯丙胺诱导所致 PC12 细胞活力的下降相一致。

Palermo 等^[7]发现 ALC 在细胞的静止生长期可以延长酵母细胞的生存期,ALC 在凋亡前期可以预防凋亡,在生长后期可以抑制线粒体分裂。本研究的荧光染色结果证实,氧糖剥夺可以导致明显的细胞凋亡与坏死,而 ALC 预作用可使凋亡与坏死的细胞数明显下降,提示 ALC 预处理不仅改善氧糖剥夺诱导的细胞活力下降,而且可以减少细胞凋亡和坏死。

SOD 是机体内重要的氧自由基清除剂,发挥抗氧化作用^[8];细胞膜被自由基氧化损伤后引起脂质过氧化,导致其代谢产物 MDA 释放增加;二者水平的高低可以反应 ALC 的抗氧化特性。ATPase 是合成 ATP 的关键酶,是各种细胞能量代谢及功能有无损伤的重要指标。本实验结果表明,ALC 可以增强细胞内 SOD 活性,降低 MDA 水平,并提高 ATPase 含量,提示 ALC 对 PC12 细胞的保护作用可能与其提高细胞的抗氧化能力,并增强细胞内能量代谢有关。另有报道推测,ALC 的保护作用可能与促进神经元轴突生长、提高中枢神经系统对神经毒性因子

的反应性应答有关^[9]。

综上所述,ALC 对大脑中动脉阻塞造成的大鼠缺血性脑损伤及体外氧糖剥夺诱导的 PC12 细胞损伤具有明显的保护作用,其机制可能是减少氧自由基生成、增强细胞抗氧化损伤能力,同时通过调节细胞代谢相关酶活性,改善缺氧状态下细胞能量的代谢障碍,进而减少细胞的凋亡与坏死,发挥其保护作用。

参 考 文 献

- [1] Lolic M M, Fiskum G, Rosenthal R E. Neuroprotective effects of acetyl-L-carnitine after stroke in rats[J]. *Ann Emerg Med*, 1997, 29(6): 758-765.
- [2] Jalal F Y, Bohlke M, Masher T J. Acetyl-L-carnitine reduces the infarct size and striatal glutamate outflow following focal cerebral ischemia in rats[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1199: 95-104.
- [3] Longa E W, Einstein P, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery: occlusion without craniotomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [4] Slivka A, Silbersweig D, Pulsinelli W. Carnitine treatment for stroke in rats[J]. *Stroke*, 1990, 21(5): 808-811.
- [5] Shafer T J, Atchison W D. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies[J]. *Neurotoxicology*, 1991, 12(3): 473-492.
- [6] Virmani A, Gaetani F, Binienda Z. Role of mitochondrial dysfunction in neurotoxicity of MPP⁺: partial protection of PC12 cells by acetyl-L-carnitine[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1025: 267-273.
- [7] Palermo V, Falcone C, Calvani M, et al. Acetyl-L-carnitine protects yeast cells from apoptosis and aging and inhibits mitochondrial fission[J]. *Aging Cell*, 2010, 9(4): 570-579.
- [8] Xiong Z, Liu C, Wang F, et al. Protective effects of breviscapine on ischemic vascular dementia in rats[J]. *Bio Pharm Bull*, 2006, 29(9): 1880-1885.
- [9] Taghialatela G, Angelucci L, Ramacci M T, et al. Acetyl-L-carnitine enhances the response of PC12 cells to nerve growth factor[J]. *Brain Res Dev Brain Res*, 1991, 59(2): 221-230.

(责任编辑: 关蕴良)