

[文章编号] 1000-4718(2013)07-1250-05

# 左卡尼汀通过抑制钙/钙调素依赖蛋白激酶II信号通路抑制过氧化氢诱导的大鼠心肌细胞凋亡\*

戴红良<sup>1</sup>, 贾桂枝<sup>2</sup>, 刘 堃<sup>1</sup>, 梁春光<sup>1</sup>, 张 林<sup>1</sup>, 张志刚<sup>3</sup>, 王洪新<sup>4△</sup>  
 (辽宁医学院<sup>1</sup>护理学院,<sup>2</sup>生物化学与分子生物学教研室,<sup>4</sup>药理学教研室,辽宁 锦州 121001;  
<sup>3</sup>聊城市人民医院药学部,山东 聊城 252600)

**[摘要]** 目的: 观察左卡尼汀对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导的大鼠心肌细胞凋亡的保护作用及其机制。方法: 利用200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激12 h,建立体外原代培养新生大鼠心肌细胞凋亡模型。Ca<sup>2+</sup>螯合剂1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)、钙调素依赖蛋白激酶II(CaMKII)特异性抑制剂KN93及左卡尼汀分别于加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>前30 min或1 h加入,以检测这3种药物对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激下心肌细胞活力、细胞凋亡、细胞内静息钙浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)及磷酸化CaMKII(p-CaMKII)表达的影响。利用MTT比色法检测心肌细胞活力;流式细胞仪检测细胞凋亡率;利用激光共聚焦扫描检测[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>;蛋白质免疫印迹法检测cleaved caspase-3及p-CaMKII的表达。结果:模型组经200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用12 h后,细胞活力显著下降,细胞凋亡率显著增加。BAPTA、KN93及左卡尼汀预处理显著抑制上述细胞损伤。进一步研究发现,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>水平升高、cleaved caspase-3及p-CaMKII的表达增加均可被上述3种药物不同程度地抑制。结论:左卡尼汀可抑制H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>所致的心肌细胞凋亡,该心肌保护作用可能与其抑制Ca<sup>2+</sup>/CaMKII信号通路有关。

**[关键词]** 肉碱; 过氧化氢; 心肌细胞; 细胞凋亡; 钙; 钙调素依赖蛋白激酶II

**[中图分类号]** R975, R963

**[文献标志码]** A

doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2013.07.019

## L-carnitine inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced rat cardiomyocyte apoptosis through suppressing Ca<sup>2+</sup>/CaMKII signaling pathway

DAI Hong-liang<sup>1</sup>, JIA Gui-zhi<sup>2</sup>, LIU Kun<sup>1</sup>, LIANG Chun-guang<sup>1</sup>, ZHANG Lin<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-gang<sup>3</sup>, WANG Hong-xin<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>School of Nursing, <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, <sup>4</sup>Department of Pharmacology, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China; <sup>3</sup>Department of Pharmacy, Liaocheng People's hospital, Liaocheng 252600, China. E-mail: jyhxwang@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To examine the inhibitory effect of L-carnitine on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced apoptosis of rat cardiomyocytes and to further explore the underlying mechanisms. **METHODS:** Primarily cultured neonatal rat myocardial cells were prepared and challenged by 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to induce cell apoptosis. In order to evaluate the effects of Ca<sup>2+</sup> chelator 1,2-bis(2-aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA), calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) inhibitor KN93 and L-carnitine on cell viability, apoptosis, resting intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and phospho-CaMKII (p-CaMKII) expression, these three agents were added 30 min or 1 h prior to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation. Cell viability was measured by MTT assay and apoptosis was determined by flow cytometry. The [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured by laser confocal scanning. Cleaved caspase-3 and p-CaMKII expression was detected using Western blotting. **RESULTS:** Upon 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulation for 12 h, cell viability decreased and apoptotic rate increased significantly compared with control. Pretreatment with L-carnitine, BAPTA and KN93 significantly increased cell viability and decreased apoptosis. Furthermore, intracellular Ca<sup>2+</sup> overload triggered by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could be greatly relieved by L-carnitine and BAPTA pretreatment, but not affected by KN93. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-stimulated cleaved caspase-3 and p-CaMKII expression was also significantly inhibited by all these three agents. **CONCLUSION:** L-carnitine inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced rat cardiomyocyte apoptosis possibly via suppressing Ca<sup>2+</sup>/CaMKII signaling pathway.

**[KEY WORDS]** Carnitine; Hydrogen peroxide; Cardiomyocytes; Apoptosis; Calcium; Calmodulin-dependent protein kinase II

[收稿日期] 2013-02-26

[修回日期] 2013-06-18

\* [基金项目] 辽宁省高等学校优秀人才支持计划(No. 2008RC33)

△通讯作者 Tel: 0416-3863168; E-mail: jyhxwang@163.com

氧化应激在缺血再灌注损伤、高血压、糖尿病等疾病所致心肌损害中具有重要作用。异常的氧化应激水平可诱发炎症反应,引起细胞凋亡增加,最终引起心肌重构及充血性心力衰竭<sup>[1-2]</sup>。鉴于此,阻止氧化应激和对抗细胞凋亡为临床治疗各种心血管疾病提供了重要思路。左卡尼汀又称左旋肉碱,其基本功能是将长链脂肪酸转运至线粒体机制,促进其氧化分解,是哺乳动物体内参与能量代谢的重要物质<sup>[3]</sup>。除此之外,左卡尼汀还具有显著的抗氧化及抗凋亡活性<sup>[4]</sup>。我们最近的研究也发现左卡尼汀能够显著抑制由过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)刺激引起的体外心肌细胞凋亡<sup>[5]</sup>,然而对于其确切机制却知之甚少。本研究拟在我们前期研究的基础上,进一步探讨左卡尼汀的抗凋亡作用机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

**1.1 药物与试剂** 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;胰蛋白酶、DMEM 低糖培养基、二甲基亚砜、MTT、左卡尼汀、1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-*N,N,N',N'*-四乙酸[1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, BAPTA]及 KN93 均购于 Sigma; annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司; Fluo-3/AM 购自江苏碧云天;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)蛋白定量试剂盒购自 Pierce; cleaved caspase-3 I 抗购于 Cell Signaling; 钙调素依赖蛋白激酶 II (calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) I 抗购自 Santa Cruz; 磷酸化 CaMK II (phospho-CaMK II, p-CaMK II) 购自 Promega; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) I 抗购于 Sigma; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的 II 抗购于 Santa Cruz。

**1.2 动物** 出生 1~3 d Sprague-Dawley (SD) 大鼠乳鼠,雌雄不拘,由辽宁医学院实验动物中心提供。动物合格证号为 SCXK (辽) 2003-0007。

### 2 方法

**2.1 心肌细胞培养** 新生大鼠心肌细胞原代培养方法参照文献<sup>[5]</sup>。取出生 1~3 d SD 大鼠乳鼠,开胸取出心脏,用 D-Hanks 液冲洗 3 次后剪成约 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的碎块,在 37 °C 条件下,以 0.8 g/L 胰蛋白酶消化分离细胞。将消化完毕的细胞以差速贴壁法进行纯化后,置于含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞融合后,换以含 0.04% 胎牛血清的 DMEM 继续培养 24 h 后,将细胞分组用于实验。

**2.2 实验分组** 将体外培养的 SD 大鼠心肌细胞随

机分为正常对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组、左卡尼汀(1.2 mmol/L) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、BAPTA (细胞内钙离子络合剂, 20 μmol/L) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组和 KN93 (CaMKII 特异性抑制剂 0.2 μmol/L) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 200 μmol/L,作用时间为 12 h。左卡尼汀于加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 h 前加入, BAPTA 及 KN93 于加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 min 前加入。左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 均维持至 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理结束。

**2.3 心肌细胞活力检测** 采用 MTT 法测定心肌细胞活力。将接种于 96 孔培养板,处理完毕后的心肌细胞用于实验。在测试前 4 h,每孔加入 0.5 g/L MTT,于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 4 h 后弃去培养液,每孔加入二甲基亚砜 100 μL,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 570 nm 波长,在酶标仪上测定各孔吸光度(A),该值间接反映细胞活力的高低。

**2.4 心肌细胞凋亡测定** 采用流式细胞术进行检测,将经过处理的心肌细胞用 1.25 g/L 胰蛋白酶消化分离,调节细胞密度为 1 × 10<sup>9</sup>/L 后,按照 annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒说明书进行操作。

**2.5 心肌细胞内静息钙浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)测定** 细胞用 D-Hanks 液洗 3 次,用 5 μmol/L Fluo-3/AM 37 °C 避光孵育 45 min,然后吸出染液,再以 D-Hanks 液洗涤 3 次,每孔加入 0.5 mL D-Hanks 液。将激光共聚焦显微镜专用培养皿置于 LSCM 570 载物台上,激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,记录细胞内荧光强度并由计算机软件进行处理。以细胞内荧光强度间接反映细胞内静息钙离子水平。指定对照组荧光强度为 1,以其它组与对照组的比值反映各组的相对荧光强度。

**2.6 Cleaved caspase-3 和 p-CaMKII 表达** 收集细胞,加细胞裂解液 RIPA [1% 乙基苯基聚乙二醇(nonidet P-40, NP-40) 0.5% 脱氧胆酸钠,1% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS),0.1% 苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)] 提取细胞总蛋白,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA) 法测定蛋白浓度。取 50 μg 总蛋白,以 1 × 样品缓冲液配平上样体积,沸水煮 5 min 后置 10% SDS-PAGE 中进行电泳,待电泳完成后电转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜。用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,接着加 cleaved caspase-3、p-CaMKII、CaMKII 及 GAPDH I 抗 4 °C 孵育过夜。TBS-T 充分洗膜后,以 HRP 标记的 II 抗室温孵育 2 h。TBS-T 洗膜后,增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL) 显色。用 ImageJ 1.42 软件对扫描的条带进行灰度分析。指定对照组蛋白表达为 1,以其它组与对照组的比值反映各组的相对蛋白表达。

### 3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件分析。数据以均数 ± 标准差(mean ± SD) 表示。组间比较采用单因素方

差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

#### 1 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 对大鼠心肌细胞活力的影响

与正常组比较,  $H_2O_2$  组大鼠心肌细胞活力显著降低。而与模型组比较, 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 预处理组心肌细胞活力则显著增加, 见图 1。

#### 2 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 对大鼠心肌细胞凋亡的影响

流式细胞术结果显示,  $H_2O_2$  处理 12 h 后大鼠心肌细胞凋亡显著增加。与  $H_2O_2$  组相比左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 预处理组心肌细胞凋亡率均显著降低; 利用 Western blotting 检测 cleaved caspase-3 (代表凋亡执行蛋白 caspase-3 的活性) 的表达, 也得到了类似的结果, 见图 2、3。

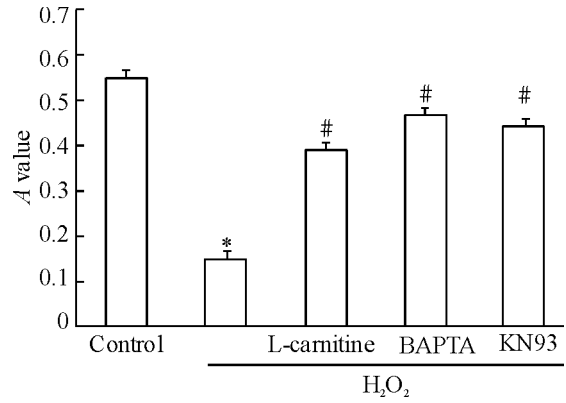


Figure 1. Effects of L-carnitine, BAPTA and KN93 on decreased cell viability induced by  $H_2O_2$  in rat cardiomyocyte. Mean ± SD.  $n = 6$ . \*  $P < 0.05$  vs control; #  $P < 0.05$  vs  $H_2O_2$  alone.

图 1 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 对  $H_2O_2$  诱导的大鼠心肌细胞活力降低的影响

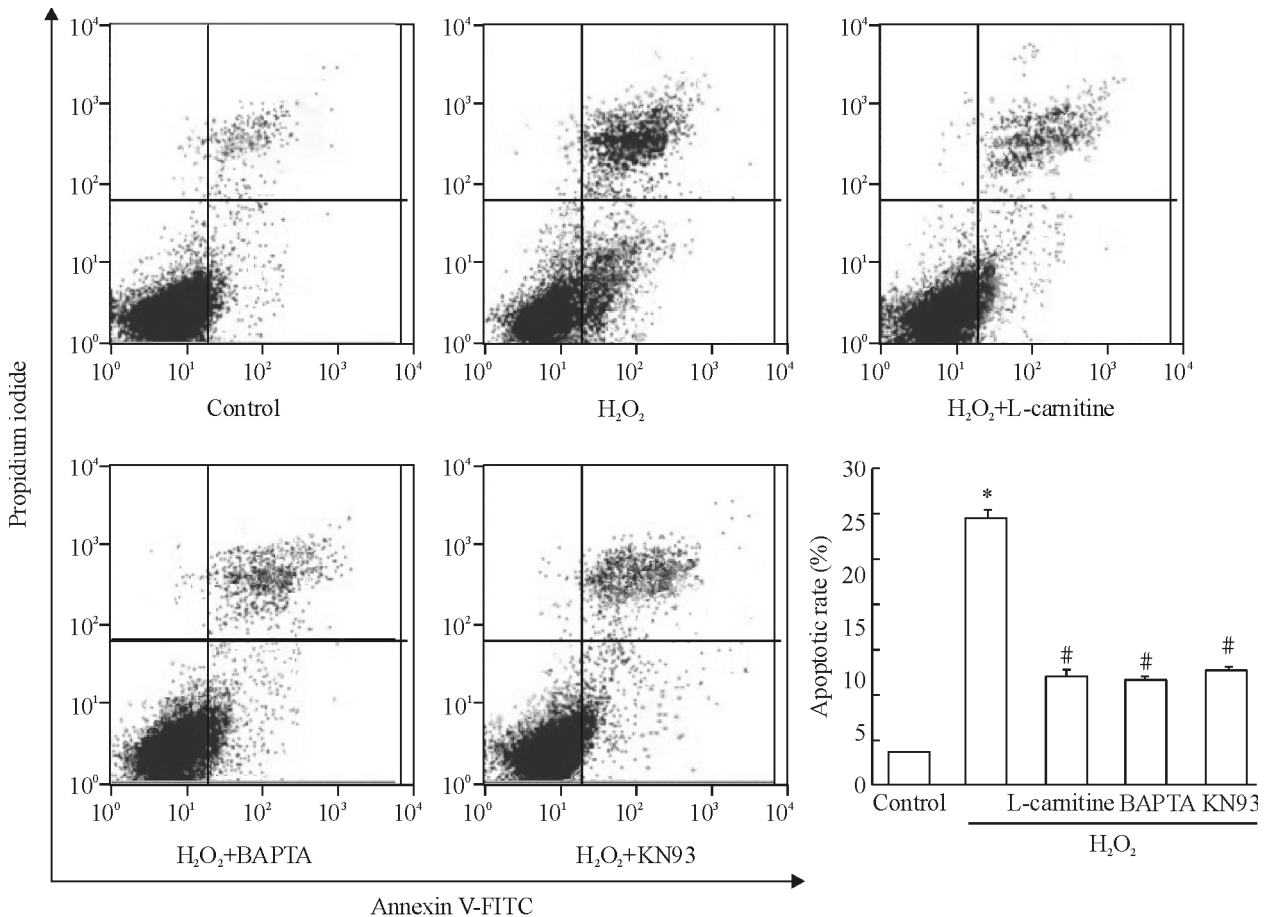


Figure 2. Effects of L-carnitine, BAPTA and KN93 on  $H_2O_2$ -triggered apoptosis of rat cardiomyocytes. Mean ± SD.  $n = 5$ . \*  $P < 0.05$  vs control; #  $P < 0.05$  vs  $H_2O_2$  alone.

图 2 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 对  $H_2O_2$  诱导的大鼠心肌细胞凋亡的影响

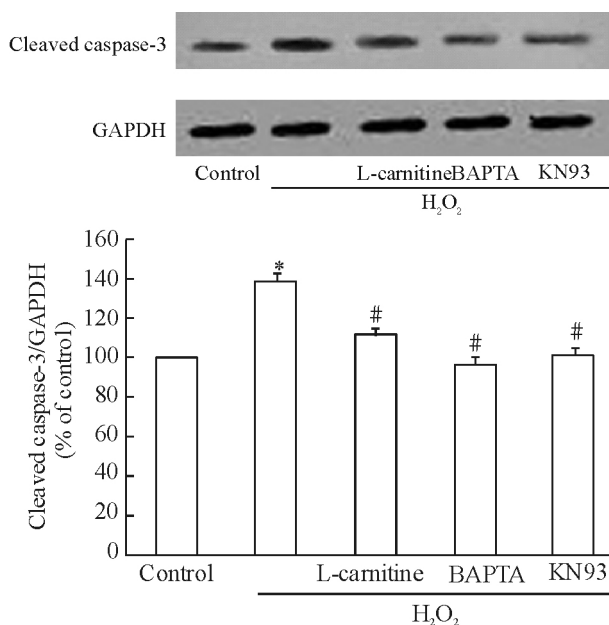


Figure 3. Effects of L-carnitine , BAPTA and KN93 on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered caspase-3 activation in rat cardiomyocytes. Mean ± SD. n = 3. \* P < 0.05 vs control; # P < 0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone.

图3 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的大鼠心肌细胞内 caspase-3 活化的影响

### 3 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 对大鼠心肌细胞内静息钙的影响

与正常组比较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h 后大鼠心肌细胞内静息钙离子水平显著增加。左卡尼汀和 BAPTA 均能显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组心肌细胞内的静息钙水平。而 KN93 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的静息钙增加无显著影响 见图 4。

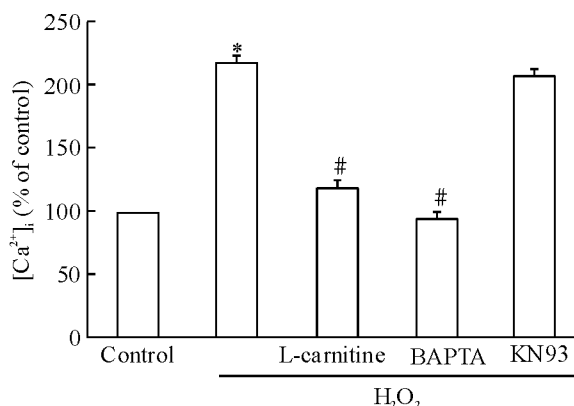


Figure 4. Effects of L-carnitine , BAPTA and KN93 on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered elevation of resting intracellular free calcium concentration ( [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ) in rat cardiomyocytes. Mean ± SD. n = 120. \* P < 0.05 vs control; # P < 0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone.

图4 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的大鼠心肌细胞内静息钙升高的影响

### 4 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 对大鼠心肌细胞内 CaMKII 磷酸化的影响

与正常组比较 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 12 h 后大鼠心肌细胞内磷酸化 CaMKII ( p-CaMKII) 水平显著升高。左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 预处理不同程度抑制 CaMKII 的磷酸化 见图 5。

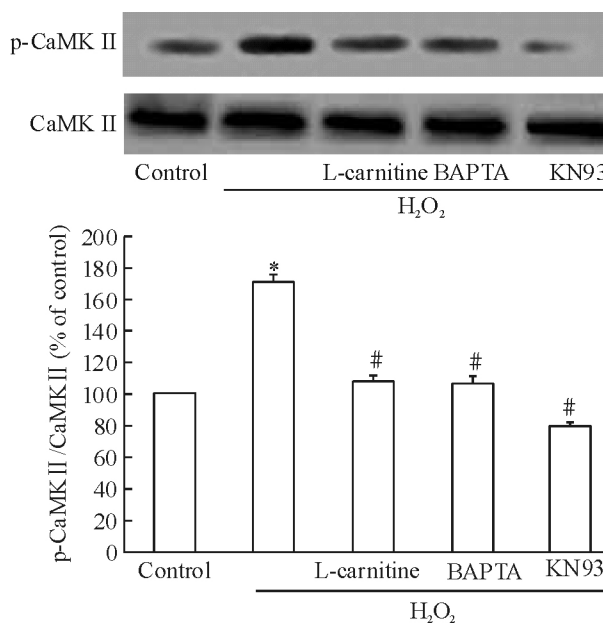


Figure 5. Effects of L-carnitine , BAPTA and KN93 on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-triggered CaMKII activation in rat cardiomyocytes. Mean ± SD. n = 3. \* P < 0.05 vs control; # P < 0.05 vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone.

图5 左卡尼汀、BAPTA 及 KN93 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的大鼠心肌细胞内 CaMKII 活化的影响

## 讨 论

氧化应激系指细胞中的促氧化与抗氧化系统失衡 ,导致氧化作用过度增强而引起的一种细胞内的紊乱状态。心肌受到损伤后 ,活性氧与自由基生成大大增加。已经证实 ,氧化应激在心肌缺血再灌注损伤、充血性心力衰竭及甲醛中毒等病理过程中发生的细胞凋亡有着密不可分的关系<sup>[6-8]</sup>。而应用抗氧化剂往往能够抑制该过程<sup>[9]</sup>。

左卡尼汀具有显著的抗氧化活性。我们之前的研究也发现左卡尼汀能显著改善活性氧物质 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的心肌细胞内氧化应激及凋亡。利用钙瞬变技术 ,我们认为该抗凋亡作用可能与左卡尼汀改善细胞内的钙紊乱有关<sup>[5]</sup>。由于上述钙离子测定是在急性条件下进行的( H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 最长刺激 5 min) ,用其解释慢性刺激后的凋亡尚具有一定的局限性。为此 ,为进一步证实左卡尼汀的抗凋亡活性确实与其抑制细胞内 Ca<sup>2+</sup> 超载有关 ,我们在本实验中运用了激光共

聚焦技术,同步测量细胞凋亡与细胞内静息  $Ca^{2+}$  浓度( $H_2O_2$  刺激 12 h)。在本研究中我们发现,BAPTA ( $Ca^{2+}$  螯合剂)预处理可明显抑制  $H_2O_2$  刺激诱导的心肌细胞凋亡,表明  $Ca^{2+}$  超载是  $H_2O_2$  诱发心肌细胞凋亡的重要机制。而左卡尼汀在抑制细胞凋亡的同时,还可显著降低心肌细胞内的静息钙水平。充分说明,纠正心肌细胞内钙超载是左卡尼汀发挥其抗  $H_2O_2$  所致细胞凋亡的重要机制。

作为细胞内重要的钙离子调节蛋白,CaMKII 活化在心肌细胞凋亡中起着至关重要的作用<sup>[10]</sup>。在本实验中用特异性抑制剂 KN93 阻断 CaMKII 后, $H_2O_2$  诱发心肌细胞凋亡明显降低。说明 CaMKII 活化也参与了  $H_2O_2$  诱导的心肌凋亡。而且,左卡尼汀预处理能显著降低 CaMKII 的磷酸化(活化),表明左卡尼汀的抗凋亡活性可能与其抑制 CaMKII 的活化有关。

目前共发现  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  及  $\delta$  亚型的 CaMKII,而心肌中最主要的类型属  $\delta$  亚型<sup>[10]</sup>。而且在  $\delta$  亚型的 13 种剪接受变异体中,只有  $\delta_B$  和  $\delta_C$  在心肌中表达<sup>[11]</sup>。虽然在本研究中我们不能确定是  $\delta$  亚型哪个变异体参与了  $H_2O_2$  诱导的凋亡。但已有研究提示,在氧化应激时, $\delta_B$  和  $\delta_C$  心肌中起着截然相反的作用: $\delta_B$  抑制凋亡,而  $\delta_C$  则促进凋亡<sup>[12]</sup>。所以很可能是  $\delta_C$  活化介导了  $H_2O_2$  诱导的心肌凋亡。

总之,本研究证实左卡尼汀对  $H_2O_2$  诱发心肌细胞凋亡具有显著的抑制作用,其作用机制可能与其减轻细胞内钙超载和抑制 CaMKII 活化有关。

[参 考 文 献]

- [1] Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(3): 457-464.
- [2] Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 461-470.
- [3] Bremer J. Carnitine: metabolism and functions [J]. *Physiol Rev*, 1983, 63(4): 1420-1480.
- [4] Chao HH, Liu JC, Hong HJ, et al. L-carnitine reduces doxorubicin-induced apoptosis through a prostacyclin-mediated pathway in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 146(2): 145-152.
- [5] Liang CG, Dai HL, Huang L, et al. Inhibitory effect of L-carnitine on cardiomyocyte apoptosis induced by hydrogen peroxide [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2012, 26(5): 602-609.
- [6] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium [J]. *Circ Res*, 1996, 79(5): 949-956.
- [7] Battling B, Hol J, Darmer D. Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction? [J]. *Basic Res Cardiol*, 1998, 93(2): 71-84.
- [8] 王时俊,邹云增,孙爱军,等. 氧化应激在乙醛引起的心肌细胞凋亡中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(8): 1464-1468.
- [9] Wang R, Miura T, Harada N, et al. Pleiotropic effects of the  $\beta$ -adrenoceptor blocker carvedilol on calcium regulation during oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318(1): 45-52.
- [10] Zhu WZ, Woo AY, Yang DM, et al. Activation of CaMKII $_{\delta_C}$  is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(14): 10833-10839.
- [11] Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of  $\delta_B$ -CaM kinase and  $\delta_C$ -CaM kinase from rat heart, two new multi-functional  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase isoforms [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1221(1): 89-101.
- [12] Peng W, Zhang Y, Zheng M, et al. Cardioprotection by CaMKII- $\delta_B$  is mediated by phosphorylation of heat shock factor 1 and subsequent expression of inducible heat shock protein 70 [J]. *Circ Res*, 2010, 106(1): 102-110.