

左卡尼汀口服液对健康志愿者 尿液抗自由基活性的影响

梁孝印¹, 邵士川², 周茂金², 孙慧清², 曹玉³, 王春波¹

(1. 青岛大学医学院药理学教研室, 山东 青岛 266001; 2 泰山医学院附属泰安医院, 山东 泰安 271000;

3. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 266001)

摘要:目的 研究左卡尼汀口服液对健康志愿者尿液抗自由基活性的影响。方法 10名健康受试者单剂量口服盐酸左卡尼汀口服液 2g后, 分别收集服药前(0h)和服药后(0~2、2~4、4~8、8~12、12~24h)的尿液, -20℃冷冻待测。用试剂盒分别测定各份尿液的抗超氧阴离子、抗羟自由基能力及NO浓度。结果 服药后尿液抗超氧阴离子、抗羟自由基能力均较服药前增加($P < 0.05$), 并呈现先上升后下降的趋势, NO浓度较服药前降低($P < 0.05$), 并呈现先下降后上升的趋势, 2~4h间的尿液抗自由基活性最强, NO浓度最低。结论 左卡尼汀口服液可显著增加健康中国人尿液抗自由基活性。

关键词: 左卡尼汀口服液; 健康志愿者; 自由基

中图分类号: R 969 文献标识码: A 文章编号: 1004-7115(2009)04-0248-03

Effect of L-carnitine on capability of resisting free radical in urine of healthy Chinese volunteers

LANG Xiao-yin, SHAO Shi-chuan, ZHOUM ao-jin, SUN-hui qing CAO Yu, WANG Chun-bo

(1. College of Medicine Qingdao University, Qingdao 266001, China 2. Central Hospital of Taian City, Taian 271000 China

3. Affiliated Hospital of Qingdao University Qingdao 266001, China)

Abstract Objective To study the effect of L-carnitine on the capability of resisting free radical in urine of healthy Chinese volunteers. Methods After single oral administration of 2 g L-carnitine oral solution in 10 Chinese healthy volunteers, the urine was collected at 0, 0~2, 2~4, 4~8, 8~12, 12~24 h. The capability of resisting superoxide anion and hydroxyl radical and the concentrations of nitric oxide with reagent box were measured. Results The capability of resisting the production of superoxide anion and hydroxyl radical increased significantly and showed the trend of increasing first and declining again; the concentration of nitric oxide declined significantly and showed the trend of declining first and increasing again. The urine of 2~4 h showed the most powerful capability of resisting free radical and the least concentration of nitric oxide. Conclusion L-carnitine can increase the capability of resisting free radical in urine of healthy Chinese volunteers.

Key words L-carnitine; healthy Chinese volunteers; free radical

自由基、天然抗氧化剂和健康越来越受到人们的关注。自由基过多会导致脂质过氧化, 减弱心、脑、肾等器官功能, 甚至导致多种疾病的发生^[1]。使用抗氧化剂可以消耗自由基而减少自由基损伤。左卡尼汀(Levocarnitine, L-CN)是一种广泛存在于机体组织内的特殊氨基酸, 在体外能有效清除自由基^[2], 临床对多系统疾病具有良好的疗效^[3]。但左

卡尼汀对健康人抗氧化活性的影响目前报道较少, 为进一步探讨左卡尼汀的作用机制, 我们对左卡尼汀口服液对中国健康人尿液抗自由基活性的影响进行了研究, 现报道如下。

1 材料和方法

1.1 仪器 PL602-S电子天平(青岛远博仪器设备

*作者简介: 梁孝印(1974-), 男, 山东泰安人, 主管药师, 硕士研究生, 主要从事医院药学工作。

有限公司), TGL-18G-C 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), GL-88 B 型旋涡混匀器 (太仓市科教仪器厂), 772S 可见分光光度计 (上海精密科学仪器厂), DK-2000 III 单列两孔电热恒温水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司), 微量加样器 (北京百晶生物技术有限公司), BF-2000 M 电热恒温箱 (北京八方世纪科技技术有限公司), MilliQ Bioce1 纯水发生器 (密理博上海公司)。

1.2 试剂 无水乙醇 (分析纯, 烟台化学试剂有限公司, 批号: 070324), 冰醋酸 (分析纯, 北京化工厂, 批号: 20041012), 左卡尼汀口服液 (东北制药总厂, 批号: 0702031), 抗羟自由基、抗超氧阴离子、NO 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20080226, 20080227, 20080228, 20080229)。

1.2 方法

1.2.1 尿样采集

1.2.1.1 受试者 10 名健康志愿者男女各 5 例, 年龄 (27.50 ± 3.30) 岁, 体重指数 (22.44 ± 1.62) kg·m⁻²。受试者均无心、肝、肾、消化道、神经系统、代谢异常等病史, 无烟、酒等不良嗜好, 试验前 14 d 及试验期间未服任何其它药物。经全面体检, 血、尿常规, 肝、肾功能, X 线透视, 血压及心电图均无异常发现。均签订知情同意书。

1.2.1.2 服药方法 10 名志愿者随机确定服药顺序, 给药前一天晚餐 (清淡饮食) 后开始禁食 12 h, 第二天早上主动排空尿液 (收集尿液) 后空腹给药。左卡尼汀口服液 2 g 单次给药, 200 ml 温开水送服。服药后 2 h 后方可饮水, 4 h 后进统一标准餐。为了排除食物中的左卡尼汀对试验的干扰, 以及食物中维生素 C、E 等对体内自由基的影响, 本试验的标准餐一律不含肉类、乳制品及富含维生素 C、E 的蔬菜及水果, 以清淡饮食、素食为主。试验期间禁烟、酒、茶、咖啡及含相应成分的食品或饮料。避免剧烈活动和长时间卧床。

1.2.1.3 采尿方法 用药前 (0 h) 应主动排空尿液, 给药后 0~2, 2~4, 4~8, 8~12, 12~24 h 分段收集^[4], 分别保留在干净的容器里, 分别加 5 ml 盐酸作为防腐剂。每次排尿后应补充 200 ml 水以维持尿量, 每次大便时收集小便, 切勿损失。将各时间段的尿液混匀, 计出总量。然后各取 10 ml 于塑管中, 密封, -20℃ 保存, 待测。

1.2.2 尿液抗自由基指标测定

1.2.2.1 抗超氧阴离子能力的测定

抗超氧阴离子能力检测采用黄嘌呤 (X) 与黄嘌呤氧化酶 (XOD) 反应体系^[5], 所产生的超氧阴离子自由基可与氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 反应形成蓝色, 于 550 nm 处测定吸收度。抗超氧阴离子自由基活力单位的定义为: 在反应系统中, 每升尿液在 37℃ 反应 40 min 所抑制的超氧阴离子自由基相当于 1 mg 的维生素 C 所抑制的超氧阴离子自由基的变化值为一个活力单位 (U)。

1.2.2.2 抑制羟自由基能力的测定

羟自由基的检测采用 Fenton 反应体系^[6]。Fenton 反应是产生羟自由基最常用的反应, 是利用 Fe²⁺ 和 H₂O₂ 反应生成 Fe³⁺ 和羟自由基, H₂O₂ 的量和 Fenton 反应产生的羟自由基量成正比, 反应产生的羟自由基可以与水杨酸反应生成 2,3-二羟基苯甲酸, 在 550 nm 处有最大吸收。规定每毫升尿液在 37℃ 下反应 1 min, 使反应体系中 H₂O₂ 浓度降低 1 mmol·L⁻¹ 为一个抑制羟自由基能力单位。

1.2.2.3 一氧化氮浓度的测定

一氧化氮的测定采用硝酸还原酶法^[7]。亚硝酸盐 (NO²⁻) 和硝酸盐 (NO³⁻) 为一氧化氮稳定的终末代谢产物, 利用测定 NO²⁻ 和 NO³⁻ 含量可间接地反映一氧化氮的产生量。NO²⁻ 可与 Griess 试剂 [1% 对氨基苯磺酸, 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺, 5% HNO₃ PO NO₄] 发生重氮反应, 产物为粉红色, 呈色反应强度与 NO²⁻ 浓度成正比。以可见分光光度计在 548 nm 波长下测样品的吸光值, 亚硝酸钠作标准品。测定 NO³⁻ 时先以硝酸还原酶将其还原为 NO²⁻, 再与 Griess 试剂反应。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计分析软件处理数据。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 受试者基本情况 10 名受试者在服药 60 h 均无不舒适主诉, 亦未观察到不良反应, 且均按要求完成试验。

2.2 正常健康人尿液抗氧化指标测定结果 即未服药时尿液抗氧化指标, 为 0 h 取样点的测定结果, 可作为服药后各指标测定结果的对照, 见表 1。

2.3 服药后各时段尿液抗自由基指标测定结果 见表 1 由表可知, 服药后, 各时段尿液抗自由基活性

逐渐增高, 至 2~4 h 时段达高峰后逐渐降低, 一氧化氮浓度变化趋势相反。

表 1 各时段尿液抗自由基指标测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

取样点 (h)	抗超氧阴离子能力 ($U \cdot L^{-1}$)	抑制羟自由基能力 ($U \cdot mL^{-1}$)	一氧化氮浓度 ($mmol \cdot L^{-1}$)
0	61.89 ± 29.37	358.06 ± 191.35	3.84 ± 1.82
0~2	111.81 ± 23.81*	1030.67 ± 340.60*	0.97 ± 0.36*
2~4	161.25 ± 39.22*	2566.76 ± 1249.21*	0.38 ± 0.09*
4~8	135.14 ± 26.97*	1649.15 ± 579.02*	0.60 ± 0.37*
8~12	94.54 ± 27.55	752.34 ± 233.13	1.61 ± 0.72*
12~24	86.02 ± 26.51	582.86 ± 216.55	2.28 ± 0.71*

注: 与 0h 比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3 讨论

自由基是指具有未配对电子的原子、离子或分子等类物质, 自由基性质活泼, 可损伤蛋白质、脂质、核酸等。超氧阴离子自由基、羟自由基、一氧化氮自由基等含氧的自由基称为氧自由基, 是人体内比较常见的自由基。超氧阴离子自由基是生物体中第一个生成的氧自由基, 是所有氧自由基的前身, 可以转化为其他氧自由基, 因此具有非常重要的意义。超氧阴离子可以氧化体内很多物质, 使细胞膜脂质过氧化, 还可以使过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和肌酸激酶失活^[8]。羟自由基是氧化活性最强的氧自由基^[9], 几乎可以和所有细胞成分发生反应, 对机体危害极大。一氧化氮(NO)可以通过细胞凋亡途径加重缺血再灌注对神经细胞和心肌造成的损伤^[10], 诱发老年痴呆症(Alzheimer's disease)、帕金森病(Parkinson's disease)和中风(stroke)等疾病。

左卡尼汀在体内不与血浆蛋白^[11]结合, 在血浆中呈游离状态, 主要经肾脏代谢, Sahajwala 等^[12]研究表明, 健康志愿者单剂量服用左卡尼汀口服溶液后, 3.3 h 可达峰浓度。作为一种优良天然抗氧化剂, 以原形代谢到尿液中的左卡尼汀应可改变尿液的抗氧化活性。我们的试验表明, 健康志愿者单剂量口服 2 g 左卡尼汀口服液后, 尿液的抗超氧阴离子能力、抗羟自由基能力呈现先增加后降低的趋势, 且 2 至 4 h 间取得的尿液呈现最高值, 而一氧化氮浓度则呈现先降低后增加的趋势, 且 2 至 4 h 间取得的尿液呈现最高值, 表明随左卡尼汀含量的变化, 尿液的抗氧化能力亦发生显著变化, 左卡尼汀可显著增加机体抗氧化能力, 从而可以取得预防疾

病、延缓衰老的功效。

参考文献:

- [1] 李勇, 孔令青, 高洪. 自由基与疾病研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(4): 85-88
- [2] 陈锦珊. 左卡尼汀的临床应用进展[J]. 海峡药学, 2006, 18(6): 83-85
- [3] Gulein I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine[J]. Life Sciences, 2006, 78: 803-811
- [4] 徐先彬, 刘蕾, 李可欣, 等. HPLC 法测定喷昔洛韦在健康人血浆浓度及其药代动力学研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23(2): 147-150
- [5] 宋怀恩, 闻初. 抗氧化剂筛选方法的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2003, 13(2): 119-124
- [6] 杨芬, 张瑞萍, 贺玖明, 等. 羟自由基的产生、捕集及检测方法[J]. 药学学报, 2007, 42(7): 692-699
- [7] 定天明, 陈坚, 张正行. 生物体内一氧化氮的检测方法及其应用[J]. 药学进展, 2005, 29(5): 221-226
- [8] Korycka-Dahm M, Richardson T. Photogeneration of superoxide anion in serum of bovine milk and in model systems containing riboflavin and an amino acid[J]. J Dairy Science, 1977, 61(1): 400-409
- [9] Pincemil J. Free Radicals and Antioxidants in Human Diseases[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1995: 83-98
- [10] 赵保路, 王建潮, 忻文娟. 心肌缺血再灌注损伤过程中 NO 和超氧阴离子自由基的协同作用[J]. 中国科学, 1996, 26: 331-338
- [11] Marzò A, Martelli EA, Mancinelli A, et al. Protein binding of L-carnitine family components[M]. Participants Papers (Special Issue No. III). Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1991, 364-368
- [12] Sahajwala CG, Helton ED, Purich ED, et al. Multiple-dose pharmacokinetics and bioequivalence of L-carnitine 330mg tablet versus 1g chewable tablet versus enteral solution in healthy adult male volunteers[J]. J Pharm Sci, 1995, 84(5): 627-33

(收稿日期 2009-03-04)