

左卡尼汀抑制尿毒症血清诱导的红细胞衰亡

孙云¹, 柳刚¹, 李学刚¹, 时一民², 关广聚^{1△}
(¹山东大学第二医院血液净化科, ²济南市委门诊部, 山东 济南 250033)

[摘要] 目的: 探讨左卡尼汀对尿毒症患者红细胞的保护作用及机制。方法: 将 2% 健康人红细胞悬液在以下 3 组不同的体外培养液中孵育: 对照组(C 组)、尿毒症血清组(U 组)和尿毒症血清 + 左卡尼汀组(L 组)。分别在孵育 24 和 48 h 时, 留取红细胞, 使用流式细胞术检测红细胞衰亡(用磷脂酰丝氨酸表达率代表红细胞衰亡)和红细胞活性氧簇(ROS)的含量, 并采用酶联免疫法检测红细胞谷胱甘肽(GSH)的含量。结果: 红细胞衰亡随孵育时间延长而增加, U 组较 C 组明显增加, L 组较 U 组明显降低。U 组的红细胞 ROS 生成较 C 组明显增加, 而红细胞 GSH 生成明显减少。L 组的红细胞 ROS 生成较 U 组明显减少, 而 GSH 生成明显增加。结论: 尿毒症血清诱导正常红细胞加速衰亡, 且衰亡率具有时间依赖性。而左卡尼汀可以抑制尿毒症血清诱导的红细胞衰亡, 其机制可能与抗氧化有关。

[关键词] 尿毒症血清; 红细胞衰亡; 左卡尼汀; 氧化应激

[中图分类号] R363

[文献标志码] A

doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2015.07.031

L-carnitine inhibits eryptosis induced by uremic serum

SUN Yun¹, LIU Gang¹, LI Xue-gang¹, SHI Yi-min², GUAN Guang-ju¹

(¹Department of Hemodialysis, The Second Hospital of Shandong University, ²The Outpatient Department of Jinan Municipal Committee, Jinan 250033, China. E-mail: guangj@sdu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate whether L-carnitine (LC) inhibits the eryptosis effect of uremic serum on erythrocytes. **METHODS:** Erythrocyte suspension (2%) was cultured and divided into 3 groups *in vitro*: control group (C group), uremic serum group (U group, 30% uremic serum), and uremic serum + LC group (L group, 30% uremic serum + 200 μmol/L LC). Erythrocytes were collected at 24 h and 48 h. Eryptosis (phosphatidylserine expression represents eryptosis) was estimated by flow cytometry with Annexin V staining. The content of reactive oxygen species (ROS) was also detected. Glutathione (GSH) was measured by ELISA. **RESULTS:** Eryptosis in C group was increased as the incubating time extended. Eryptosis in U group was higher than that in C group, while that in L group was lower than that in U group. Meanwhile, ROS content was higher and GSH was lower in U group than those in C group. ROS content was lower and GSH was higher in L group than those in C group. **CONCLUSION:** LC inhibits uremic serum-induced eryptosis by decreasing ROS and increasing GSH, thus attenuating oxidative stress.

[KEY WORDS] Uremic serum; Eryptosis; L-carnitine; Oxidative stress

肾性贫血为慢性肾衰竭常见并发症之一。导致肾性贫血主要原因为促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)分泌减少、铁剂缺乏、红细胞寿命缩短等, 多数患者在补充 EPO 和铁剂后能够得到有效纠正。但是在临床上仍有效果不佳者, 称为难治性贫血。研究发现左卡尼汀(L-carnitine, LC)对该类难治性贫血有一定疗效^[1-2], 其相关机制可能与 LC 改变了红细胞膜的渗透脆性等^[3-4]因素有关。LC 是脂肪动员的辅因子, 可以通过加强脂肪 β 氧化供能, 还具有抗炎、抗凋亡、抗氧化等作用, 临床上常用于治疗心力

衰竭或继发性肉碱缺乏症, 而维持性血液透析是继发性肉碱缺乏症的常见原因之一。本研究旨在通过体外实验观察 LC 对尿毒症血清中红细胞的保护作用并探讨相关机制, 以期为临床防治肾性贫血提供新的思路和途径。

材 料 和 方 法

1 材料

左卡尼汀注射液、PBS 液和 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酯(DCFH-DA)均购自 Sigma; 谷胱甘肽

(glutathione, GSH) 检测试剂盒(上海碧云天); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基); 0.22 μm 无菌滤器(Millipore); 无菌 12 孔板(Greiner)。高速离心机(上海安亭); $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱(青岛海尔); 无菌工作台(ESCO Class II); 二氧化碳培养箱(MCO-18AIC); 流式细胞仪(BD); 酶标仪(安图 2010)。

2 血清制备

选取慢性肾功能衰竭维持性血液透析患者 20 例, 其中男 12 例, 女 8 例, 平均年龄(42.3 ± 2.1) 岁。该实验通过本院伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。入选标准: (1) 均已进行维持性血液透析 1 年以上; (2) 血压控制在 $150/90\text{ mmHg}$ 以下; (3) 近期无明显感染、重度心力衰竭; (4) 无糖尿病病史。所选病例中原发疾病为肾小球肾炎 8 例、原发性高血压 7 例和药物性肾损伤 5 例。透析前清晨空腹采静脉血 8 mL, 标本用普通生化管装盛, 30 min 内离心 ($3\ 000\text{ r/min}$), 收集上清置于 2 mL 的无菌 Eppendorf 管中。无菌条件下留取、分离, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存, 10 d 内备用, 实验时所有混合血清用 0.22 μm 的无菌滤膜过滤除菌后使用。混合血清的肌酐 (serum creatinine, SCr) 值为 ($1\ 373.34 \pm 23.56$) $\mu\text{mol/L}$, 尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 值为 (78.65 ± 12.95) mmol/L 。根据需要配制成为所需浓度的尿毒症血清培养液。

3 实验方法

3.1 外周血红细胞的体外孵育 清晨抽取健康志愿者空腹静脉血 10 mL, EDTA 抗凝, 用 PBS 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9/\text{L}$ (即 2% 的红细胞悬液)。红细胞置于 12 孔板, 加入如下不同培养基后, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育。

3.2 实验设计 将新鲜配置的 2% 红细胞悬液按照不同的体外培养基分成以下 3 组: (1) 正常对照 (control, C) 组: 培养基为 PBS 溶液; (2) 尿毒症血清 (uremic serum, U) 组: 培养基为 30% 尿毒症血清 + 70% PBS 溶液; (3) LC(L) 组: 培养基为 30% 尿毒症血清 + 70% PBS 溶液 + LC (终浓度调节为 $200\ \mu\text{mol/L}$)。设 24 h 和 48 h 2 个观察点, 定点收集孵育中的红细胞, 离心, 洗涤, 至少 2 次。并在 1 h 内测定相关数据。其中 L 组红细胞提前加入相应浓度的 LC 孵育 2 h 后, PBS 洗涤, 再加入 LC 与其它 2 组同时开始

孵育。每个观察点设有 3 个平行对照孔, 相同实验重复 3 次, 测得同一时点数据后, 取平均值作为该时点最终值。

3.3 检测红细胞衰亡率 细胞凋亡早期的特征之一是细胞外膜表达磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)。Annexin V 是一种分子量为 $35 \sim 36\ \text{kD}$ 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白, 与 PS 具有高度亲和力, 故可通过细胞外膜暴露的 PS 与凋亡早期细胞的胞膜结合。因此 Annexin V 被作为检测细胞早期凋亡的灵敏指标之一。红细胞没有细胞核, 故将红细胞凋亡特称为红细胞衰亡 (eryptosis)。当红细胞早期衰亡时, 同样表达 PS。故 Annexin V 测定的 PS 表达率可代表红细胞衰亡。将收集到的红细胞用 PBS 洗涤后, 加入缓冲液、10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min。流式细胞仪选择激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm, 作为检测红细胞衰亡的指标。

3.4 检测红细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的含量 加入以 PBS 稀释荧光探针 DCFH-DA, 使其终浓度为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 20 min, 使探针与细胞充分结合, DCFH-DA 与 ROS 反应后生成带有荧光特性的二氯荧光素。PBS 洗涤细胞 3 次, 彻底去除未进入细胞的 DCFH-DA。PBS 将红细胞重悬后, 流式细胞仪选择激发波长 488 nm、发射波长 530 nm 检测荧光强度。

3.5 检测红细胞 GSH 利用 ELISA 原理, 按试剂盒说明, 使用酶标仪检测红细胞 GSH 的含量。

4 统计学处理

所有数据均用 SPSS 12.0 处理, 所有计数资料均用均数 \pm 标准误 (mean \pm SEM) 表示, 多个组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用最小显著性差异法 (LSD 法)。两指标间相关性采用 Pearson 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 健康人红细胞在不同培养基中的衰亡率

随着体外孵育时间延长, 红细胞衰亡增加。加入尿毒症血清后, 红细胞衰亡较 C 组明显增加。而同时加入左卡尼汀后, 红细胞衰亡较 U 组明显降低, 见图 1、表 1。

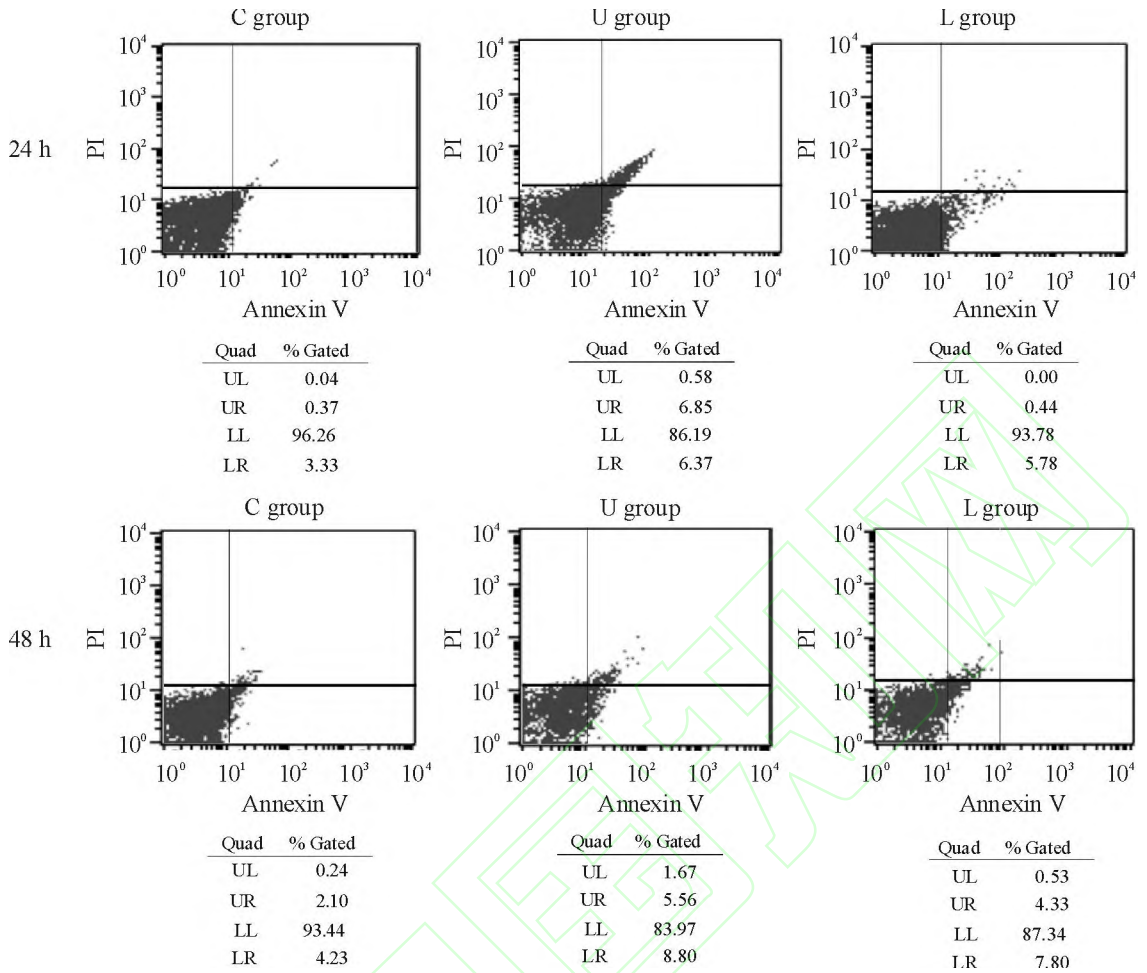


Figure 1. The result of eryptosis detected by flow cytometry.

图1 流式细胞术检测红细胞细胞衰亡率

2 健康人红细胞在不同培养基中的 ROS 和 GSH

随着体外孵育时间延长,红细胞 ROS 生成增加, GSH 生成减少。当加入尿毒症血清后,二者变化更为明显,即 U 组红细胞 ROS 生成较 C 组明显增加,同时红细胞 GSH 生成明显减少。当加入左卡尼汀后,L 组红细胞 ROS 生成较 U 组明显减少,红细胞 GSH 生成明显增加,见图 2、表 1。

3 氧化应激与红细胞衰亡的相关性分析

以 ROS 和 GSH 为氧化应激指标,进一步分析其与红细胞衰亡的相关性,结果显示红细胞衰亡与 ROS 呈正相关,GSH 与 ROS 呈负相关,见表 2。

讨 论

肾性贫血的普遍存在直接影响慢性肾功衰竭患者的生存质量,降低了维持性肾脏替代治疗患者生存率,故有效治疗肾性贫血具有重要的临床意义。本研究使用尿毒症血清和 LC 刺激健康红细胞,通过观察红细胞衰亡的变化发现 LC 的保护作用,并同时

观察了红细胞氧化应激的相关指标的变化。

本实验通过加入尿毒症血清而模拟尿毒症内环境,结果显示,健康红细胞体外孵育时,随孵育时间延长衰亡发生增加。加入尿毒症血清后,在相同观察时点红细胞衰亡增加,这与 Bonomini 等^[5]研究结果一致,提示血液透析患者的内环境可以诱导红细胞过度衰亡。尿毒症患者的红细胞寿命缩短(由正常的 120 d 缩短至 90 d 左右),这是肾性贫血的重要原因之一,其中过多的红细胞衰亡是导致红细胞寿命缩短的直接原因。已有多项证据指出糖尿病、脓毒症、地中海贫血、慢性肾功衰竭等多种疾病的各种不同内环境条件均能导致红细胞衰亡^[6]。红细胞衰亡具有多重生理作用,直接促进贫血的发生,或者 PS 表达造成细胞之间黏附,激活凝血过程。Bonomini 等^[5]的研究还证实红细胞的衰亡是可逆的,他将尿毒症血清中的红细胞又重新移至健康人血清中,红细胞衰亡减少。这提示我们通过抑制或者逆转红细胞衰亡有可能成为治疗贫血的有效方法。本

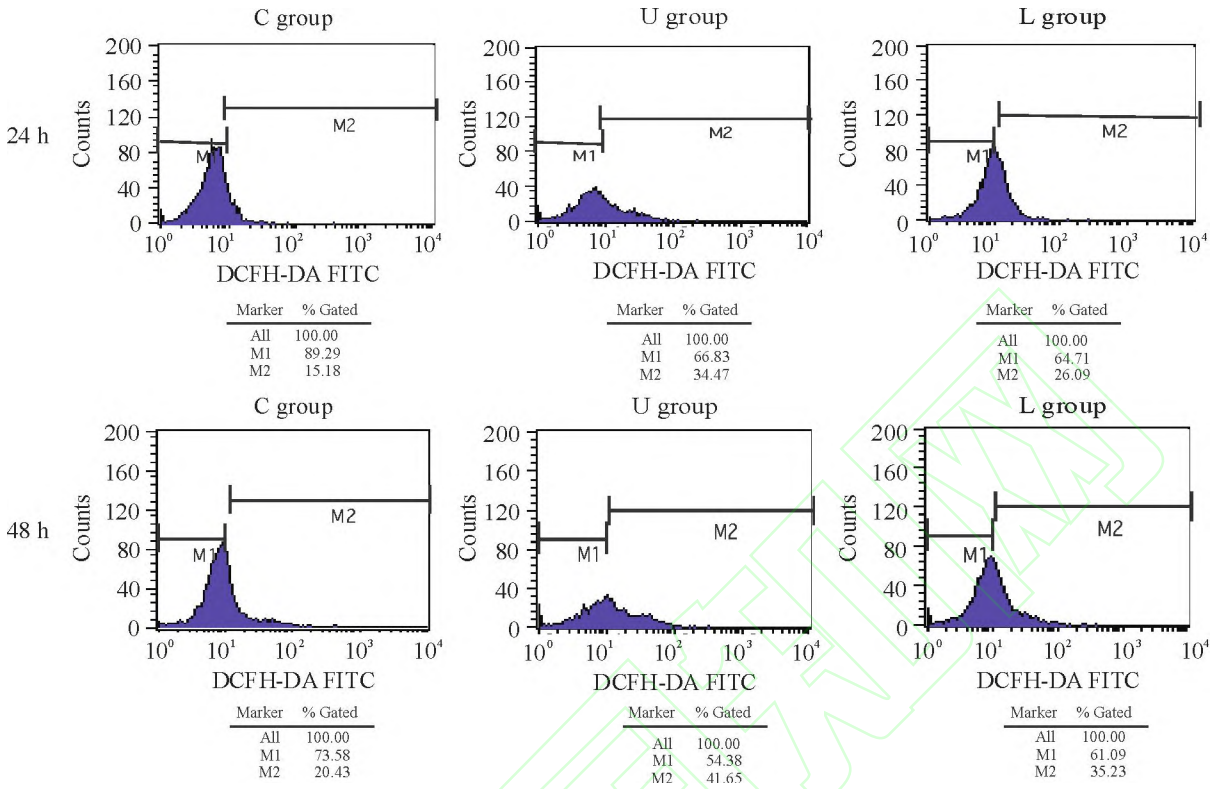


Figure 2. ROS production in the erythrocytes detected by flow cytometry, and the blue area represents the level of ROS.

图2 流式细胞术检测红细胞 ROS

表1 体外红细胞孵育的不同时点 PS、ROS 和 GSH 水平

Table 1. The results of eryptosis, ROS and GSH at different times (Mean ± SEM. n = 6)

Group	Eryptosis		ROS		GSH	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
C group	3.43 ± 0.37	4.21 ± 0.44	14.83 ± 2.22	20.94 ± 1.78	31.27 ± 0.38	17.29 ± 0.54
U group	6.51 ± 0.71 **	8.55 ± 0.76 **	33.12 ± 1.61 **	42.06 ± 1.81 **	25.66 ± 0.32 **	8.53 ± 0.59 **
L group	5.80 ± 0.69 #	7.87 ± 0.76 #	26.29 ± 1.69 ##	36.21 ± 2.00 ##	27.54 ± 0.60 ##	15.18 ± 0.42 ##

** P < 0.01 vs C group; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs U group.

表2 在不同观察时点各指标间相关性分析

Table 2. The correlation analysis of different index at different time points

Time point	Eryptosis vs ROS		Eryptosis vs GSH		ROS vs GSH	
	r	P	r	P	r	P
24 h	0.87	0.000	-0.79	0.000	-0.83	0.000
48 h	0.92	0.000	-0.69	0.000	-0.80	0.000

实验也证实了 LC 对尿毒症血清中的红细胞发挥了抗凋亡的作用,减少了红细胞的凋亡。

氧化应激与多种细胞的凋亡具有密不可分的关系^[7],而抗氧化药物可通过减轻氧化应激而发挥抗凋亡作用^[8]。本研究中,在红细胞凋亡增加的同时,红细胞的 ROS 增加和 GSH 减少,且在不同的观察时

点红细胞凋亡率与 ROS 呈正相关,与 GSH 呈负相关。这提示红细胞凋亡与氧化应激之间存在一定的联系,氧化产物促进凋亡,而抗氧化产物抑制凋亡。那么我们推测尿毒症血清可能通过增强氧化应激而诱导红细胞凋亡。尿毒症内环境的氧化应激产物对红细胞产生不良影响。维持性血液透析患者反复的

接触透析材料和透析液,贫血治疗过程中大量补充铁剂等都会导致大量活性氧产生^[9]。Usberti 等^[10]证实过度氧化应激增加红细胞衰亡,是引起尿毒症贫血的原因之一。这就提示抗氧化药物或许有利于治疗肾性贫血。LC 具有抗氧化的药理作用。LC 可以延长维持性血液透析患者红细胞的寿命,Arduini 等^[11]在临床研究中证实对维持血液透析患者静脉补充 LC24 周后,红细胞寿命相对明显延长了 8.5 d。我们用 LC 对含有尿毒症血清的培养液中红细胞进行了干预,同步观察氧化应激产物指标 ROS 和抗氧化应激指标 GSH 变化。我们发现加入 LC 后红细胞衰亡明显减少,并且也伴随着 ROS 明显减少和 GSH 明显增加,且各指标相互间存在着显著的相关性。说明 LC 通过减轻氧化应激抑制红细胞衰亡。这也提示 LC 对于尿毒症血清中的红细胞来说,是一种有效的氧自由基清除剂,它通过减轻氧化应激保护了红细胞。

综上所述,本研究体外模拟尿毒症内环境,并加入 LC 进行干预,观察了红细胞衰亡率和 ROS、GSH 的变化,提示 LC 可能通过减轻氧化应激而抑制尿毒症血清诱导的红细胞衰亡,发挥治疗肾性贫血的作用。

[参 考 文 献]

[1] Wanic-Kossowska M, Kazmierski M, Pawliczak E, et al. Combined therapy with L-carnitine and erythropoietin of anemia in chronic kidney failure patients undergoing hemodialysis[J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2007, 117(1-2): 14-19.

[2] Kadiroglu AK, Yilmaz ME, Sit D, et al. The evaluation of postdialysis L-carnitine administration and its effect on weekly requiring doses of rHuEPO in hemodialysis patients

[J]. *Ren Fail*, 2005, 27(4):367-372.

[3] Nikolaos S, George A, Telemachos T, et al. Effect of L-carnitine supplementation on red blood cells deformability in hemodialysis patients[J]. *Ren Fail*, 2000, 22(1):73-80.

[4] Matsumura M, Hatakeyama S, Koni I, et al. Correlation between serum carnitine levels and erythrocyte osmotic fragility in hemodialysis patients[J]. *Nephron*, 1996, 72(4): 574-578.

[5] Bonomini M, Sirolli V, Settefrati N, et al. Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in chronic renal failure[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(9):1982-1990.

[6] Lang F, Lang E, Föller M. Physiology and pathophysiology of eryptosis[J]. *Transfus Med Hemother*, 2012, 39(5): 308-314.

[7] 曹军军,杨茂伟,郭保磊,等. 枸橼酸铁胺通过提高 ROS 水平激活 MAPK 通路并诱导成骨细胞凋亡[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(3):476-480.

[8] 戴红良,贾桂枝,刘 堃,等. 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[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(7):1250-1254.

[9] Nagababu E, Gulyani S, Earley CJ, et al. Iron-deficiency anemia enhances red blood cell oxidative stress[J]. *Free Radic Res*, 2008, 42(9):824-829.

[10] Usberti M, Gerardi G, Bufano G, et al. Effects of erythropoietin and vitamin E-modified membrane on plasma oxidative stress markers and anemia of hemodialyzed patients [J]. *Am J Kidney Dis*, 2002, 40(3):590-599.

[11] Arduini A, Bonomin M, Elaine J, et al. Effect of L-carnitine administration on erythrocyte survival in haemodialysis patients[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21(9): 2671-2672.