

• 糖尿病基础研究 •

左卡尼汀对环孢素 A 所致胰腺和肾脏损伤的保护作用

罗康 金英顺 朴尚国 方梅荣 刘金莲 邹洪斌 高弼虎 项莹 金健 李灿

【摘要】 目的 探讨左卡尼汀对环孢素 A(CsA)所致胰腺和肾脏损伤保护作用的分子机制。方法 将 SD 大鼠分为 6 组,即正常对照(VH)组、正常对照+左卡尼汀低剂量(VH+L50)组、正常对照+左卡尼汀高剂量(VH+L200)组、CsA 组、CsA+左卡尼汀低剂量治疗(CsA+L50)组和 CsA+左卡尼汀高剂量治疗(CsA+L200)组。检测胰腺及肾功能指标、自噬性溶酶体(LC3-II)表达、肾小管间质纤维化(TIF)、肾脏 TGF- β_1 和 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平。结果 CsA 诱导胰腺损伤表现为血糖和 HbA_{1c} 升高,血浆胰岛素水平下降,胰腺 LC3-II 表达升高($P<0.01$)。肾脏中 CsA 致 Scr 和 BUN 升高、TIF 增加($P<0.01$),该变化伴随 TGF- β_1 、8-OHdG 和 LC3-II 表达增加。左卡尼汀治疗对各指标均有效,LC3-II 表达仅在左卡尼汀高剂量治疗下减少($P<0.05$)。结论 左卡尼汀对 CsA 所致胰腺和肾脏损伤有保护作用。

【关键词】 左卡尼汀;环孢素 A;转化生长因子 β_1 ;8-羟基脱氧鸟苷;自噬

doi:10.3969/j.issn.1006-6187.2014.02.020

L-carnitine treatment protects against cyclosporine-induced pancreatic and renal injury in rats LUO Kang, JIN Ying-shun, PIAO Shang-guo, et al. Department of Nephrology, Yanbian University Hospital, Yanji 133000, China

Corresponding author: LI Can, E-mail: lican@ybu.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the beneficial effects of L-carnitine on pancreatic and renal injuries caused by cyclosporine A (CsA). **Methods** Rats were divided into vehicle (VH) group, vehicle + 50 mg/(kg · d) L-carnitine (VH + L50) group, vehicle + 200 mg/(kg · d) L-carnitine (VH + L200) group, CsA group, CsA + L-carnitine (CsA + L50) group and CsA + L-carnitine (CsA + L200) group. Pancreas and kidney function, the expression of light chain 3 (LC3-II), tubulointerstitial fibrosis, TGF- β_1 , 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) were detected. **Results** CsA treatment caused diabetes (increased plasma glucose and HbA_{1c} level, and decreased plasma insulin level, $P<0.01$), renal dysfunction (increased serum creatinine and blood urea nitrogen level, $P<0.01$), significant increase in the percentage of tubulointerstitial fibrosis. And that was accompanied by increase in 8-OHdG production, upregulation of TGF- β_1 and LC3-II expression ($P<0.01$). Concomitant administration of L-carnitine increased plasma insulin concentration and decreased levels of plasma glucose and HbA_{1c} ($P<0.01$). In the kidney, L-carnitine induced dose-dependent improvement of renal function and fibrosis in parallel with suppression of TGF- β_1 and 8-OHdG expression. Furthermore, L-carnitine at a high dose inhibited LC3-II expression ($P<0.05$). **Conclusion** These findings suggest that L-carnitine has a protective effect against CsA-induced pancreatic and renal injuries.

【Key words】 L-carnitine; Cyclosporine A (CsA); Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1); 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG); Autophagy

基金项目:国家自然科学基金(81160092)

作者单位:133000 延吉,延边大学附属医院肾内科(罗康、金英顺、朴尚国、方梅荣、刘金莲、项莹、金健、李灿);吉林大学第一医院肾内科(邹洪斌);大连大学附属中山医院肾内科(高弼虎)

通信作者:李灿, E-mail: lican@ybu.edu.cn

长期使用环孢素 A(CsA)会导致慢性 CsA 肾毒性,其分子机制与局部 AT II、氧化应激、炎性介质、TGF-β₁ 和细胞凋亡等有关^[1-2]。CsA 致肾实质细胞自噬为慢性 CsA 肾毒性的重要发病机制之一^[3]。左卡尼汀对胰岛素分泌、胰岛 β 细胞、肾组织及功能均有保护作用,但具体机制未明。本研究通过采用慢性 CsA 肾毒性动物模型研究左卡尼汀对 CsA 所致胰腺和肾脏损伤的保护作用,旨在探讨其分子机制。

材料与方 法

一、实验材料

1. 实验动物:清洁级雄性 SD 大鼠 45 只,体重 180~200 g,由韩国中央实验动物中心提供。低盐(0.05%钠盐)饲料由美国 Teklad Premier 配制。

2. 主要试剂:橄榄油(美国 Sigma-Aldrich 公司);左卡尼汀;CsA(瑞士 Novartis Pharma Ltd 公司);全自动生化分析仪(美国);8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)ELISA 试剂盒(日本 Institute for the Control of Aging 公司)。抗体来源 8-OHdG(日本 JaICA; Shizuoka 公司);TGF-β₁(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司);自噬性溶酶体(LC3-II,美国 Sigma-Aldrich 公司);驴抗兔 IgG(美国 Amersham 公司)。

二、实验方法

1. 模型建立:采用随机数字表法将大鼠分为 6 组,即正常对照(VH, n=7)组予皮下注射橄榄油[1 ml/(kg·d)];正常对照+左卡尼汀低剂量(VH+L50, n=7)组予皮下注射橄榄油及静脉注射左卡尼汀[50 mg/(kg·d)];正常对照+左卡尼汀高剂量(VH+L200, n=7)组予皮下注射橄榄油及静脉注射左卡尼汀[200 mg/(kg·d)];CsA(n=8)组予皮下注射 CsA[15 mg/(kg·d)];CsA+左卡尼汀低剂量治疗(CsA+L50, n=8)组同时予 CsA 及左卡尼汀[50 mg/(kg·d)];CsA+左卡尼汀高剂量治疗(CsA+L200, n=8)组同时予 CsA 及左卡尼汀[200 mg/(kg·d)]。时间均为 4 周。

2. 标本收集:大鼠处死前采血并收集 24 h 尿,肾组织由过碘酸-赖氨酸-多聚甲醛液固定,石蜡包埋后切片厚 4 μm。

3. 检测指标:(1)采用全自动生化分析仪(美国 Coulter Electronics 公司)检测血糖、HbA_{1c}、血肌酐(Scr)、BUN 和血浆胰岛素水平。行腹腔注射葡萄糖耐量试验(IPGTT),计算血糖曲线下面积(AUC_g)^[4]。(2)病理检查为肾组织脱蜡后行 3 色染色。肾小管间质纤维化(TIF)程度在每张切片上至

少观察 20 个非重叠区域,采用数字化显微镜分析仪(日本 Olympus 公司)Polygon 程序计算每 0.5 mm² 纤维化百分比,取平均值。(3)ELISA 检测 8-OHdG。尿样于 12000 r/min 离心 5 min,取上清液按试剂盒要求检测。(4)免疫组织化学法检测肾组织 8-OHdG 和 TGF-β₁ 蛋白。切片脱蜡至水后抗原微波修复,结合一抗,以 DAB 为底物显色,呈棕黄色为止。常规脱水,透明,树脂封片。染色程度采用数字化显微镜分析仪 Polygon 程序进行定量。(5)免疫印迹法检测自噬分子标记物 LC3-II 表达。胰腺和肾组织在蛋白质缓冲液中分别制为匀浆,离心取上清液检测蛋白浓度(美国 Bio-Rad 公司)。20 μg 标本在十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(15% SDS-PAGE),90 V 电压转硝酸纤维素膜 2 h,4℃置一抗于非脂牛乳中,以 1:200 鼠单克隆 LC3-II 抗体过夜。缓冲液冲洗 3 次,加速辣根过氧化物酶标记的驴抗兔 IgG(1:1000)1 h。增强发光(美国 Amersham 公司)及曝光。以 VH 组为标准测定条带灰度,参照 β-肌动蛋白进行灰度分析。

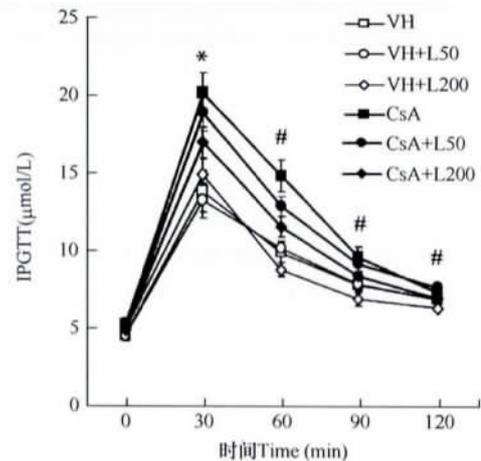
三、统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用 Bonferroni 方法校正。

结 果

一、左卡尼汀对 CsA 所致糖尿病的影响

与 VH 组相比,4 周 CsA 引起大鼠糖尿病表现为 IPGTT、HbA_{1c} 升高,血浆胰岛素水平下降,提示左卡尼汀治疗效果显著。(图 1,表 1)



与 VH 组比较 vs VH group, * P<0.01;与 CsA 组比较 vs CsA group, # P<0.05

图 1 各组 IPGTT 比较

Fig 1 Comparison of IPGTT among groups

二、左卡尼汀对慢性 CsA 肾毒性肾功能的影响

CsA 组较 VH 组体重下降 [(90.0 ± 2.0) vs (76.0 ± 3.0) g, $P < 0.01$], Scr、BUN 增加 ($P < 0.01$), 提示左卡尼汀治疗可改善大鼠体重增加及肾功能。(表 1)

三、左卡尼汀对慢性 CsA 肾毒性 TIF 的影响

与 VH 组相比, CsA 组表现为特征性 TIF [(34.1 ± 3.2) vs 0 %/0.5 mm², $P < 0.01$], 左卡尼汀低剂量治疗减少 TIF 程度 [(28.7 ± 2.5) vs (34.1 ± 3.2) %/0.5 mm², $P < 0.05$], 左卡尼汀高剂量治疗进一步减少 TIF 程度 [(23.2 ± 3.6) vs (28.7 ± 2.5) %/0.5 mm², $P < 0.05$]。(表 1)

表 1 各组 HbA_{1c}、血浆胰岛素水平、AUC_g 及肾功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

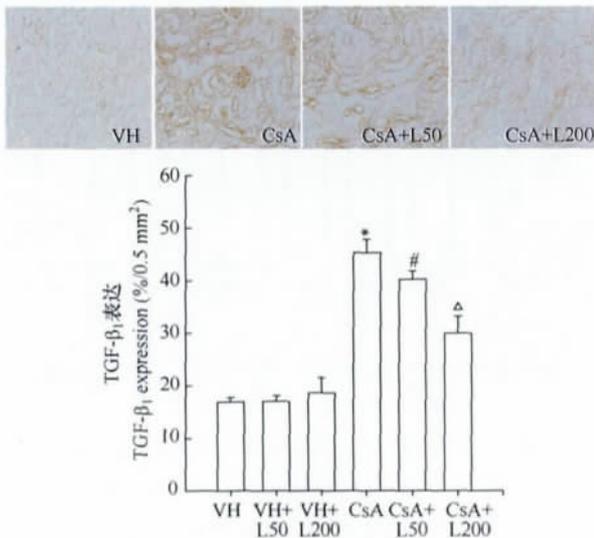
Tab 1 Comparison of HbA_{1c}, insulin, AUC_g and kidney function index among groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HbA _{1c}	Scr	BUN	Ins	AUC _g	体重增加	TIF
Group	n	(%)	(mmol/L)	(mmol/L)	(ng/ml)	[mmol/(L·min)]	Weight gain(g)	(%/0.5 mm ²)
VH	7	3.8 ± 0.6	37.1 ± 0.3	4.0 ± 0.5	5.1 ± 0.8	18.9 ± 7.6	90.0 ± 2.0	0
VH+L50	7	3.9 ± 0.4	31.0 ± 0.3	3.8 ± 0.9	5.1 ± 1.0	18.7 ± 4.2	88.0 ± 2.0	0
VH+L200	7	3.7 ± 0.6	30.1 ± 0.2	3.9 ± 0.6	4.8 ± 0.4	18.4 ± 4.8	90.0 ± 3.0	0
CsA	8	6.1 ± 1.2*	48.6 ± 0.2*	10.5 ± 0.9*	1.1 ± 0.3*	26.4 ± 9.6*	76.0 ± 3.0*	34.1 ± 3.2*
CsA+L50	8	5.8 ± 0.9#	42.4 ± 0.2#	9.8 ± 1.0*	1.7 ± 0.5#	24.5 ± 6.5#	85.0 ± 4.0#	28.7 ± 2.5#
CsA+L200	8	4.9 ± 0.4#	36.3 ± 0.3#	8.5 ± 1.3#	1.8 ± 0.2#	22.0 ± 4.6#	85.0 ± 3.0#	23.2 ± 3.6# [△]

与 VH 组比较 vs VH group, * $P < 0.01$; 与 CsA 组比较 vs CsA group, # $P < 0.05$; 与 CsA+L50 组比较 vs CsA+L50, [△] $P < 0.05$

四、左卡尼汀对慢性 CsA 肾毒性 TGF-β₁ 的影响

CsA 上调 TGF-β₁ 表达 [(46.0 ± 2.3) vs (17.1 ± 0.5) %/0.5 mm², $P < 0.01$], 左卡尼汀低剂量治疗下调 TGF-β₁ 表达 [(40.0 ± 1.4) vs (46.0 ± 2.3) %/0.5 mm², $P < 0.05$], 左卡尼汀高剂量治疗进一步下调 TGF-β₁ 表达 [(30.2 ± 3.0) vs (40.0 ± 1.4) %/0.5 mm², $P < 0.05$]。(图 2)



与 VH 组比较 vs VH group, * $P < 0.01$; 与 CsA 组比较 vs CsA group, # $P < 0.05$; 与 CsA+L50 组比较 vs CsA+L50 group, [△] $P < 0.05$

图 2 各组 TGF-β₁ 免疫组织化学及半定量分析 (SP 200×)

Fig 2 Immunohistochemistry of TGF-β₁ and semiquantitative analysis (SP 200×)

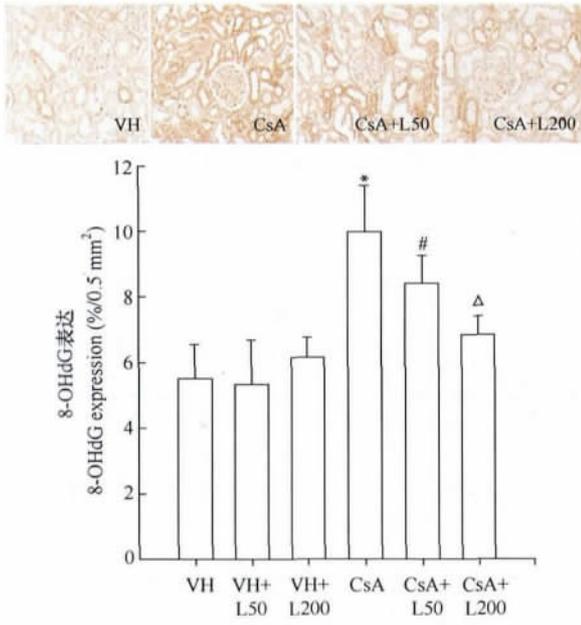
五、左卡尼汀对慢性 CsA 肾毒性 8-OHdG 的影响

免疫组织化学结果显示, CsA 组肾 8-OHdG 蛋白表达活性增加, 左卡尼汀治疗抑制 8-OHdG 蛋白表达。CsA 上调 8-OHdG 表达 [(9.9 ± 1.6) vs (5.2 ± 1.1) %/0.5 mm², $P < 0.01$], 与 CsA 组比较, CsA+L50 组 8-OHdG 表达减少 [(8.4 ± 0.9) vs (9.9 ± 1.6) %/0.5 mm², $P < 0.05$]. 左卡尼汀高剂量治疗下调 8-OHdG 表达 [(6.8 ± 0.7) vs (9.9 ± 1.6) %/0.5 mm², $P < 0.05$]. ELISA 结果显示, CsA 组 24 h 尿 8-OHdG 排泄增加 [(241.0 ± 37.2) vs (130.7 ± 17.0) ng/d, $P < 0.01$], 左卡尼汀低剂量治疗减少尿 8-OHdG 排泄 [(208.3 ± 19.7) vs (241.0 ± 37.2) ng/d, $P < 0.05$], 左卡尼汀高剂量治疗进一步减少尿 8-OHdG 排泄 [(177.2 ± 12.7) vs (208.3 ± 19.7) ng/d, $P < 0.05$]。(图 3, 4)

六、左卡尼汀对胰腺和肾脏 LC3- II 蛋白表达的影响

CsA 上调胰腺 [(190 ± 19) % vs (100 ± 13) %], $P < 0.01$ 和肾脏 [(183 ± 11) % vs (100 ± 6) %], $P < 0.01$ LC3- II 蛋白表达, CsA+L50 组 LC3- II 表达与 CsA 组比较差异无统计学意义 [胰腺: (171 ± 22) % vs (190 ± 19) %, $P > 0.05$; 肾脏: (186 ± 8) % vs

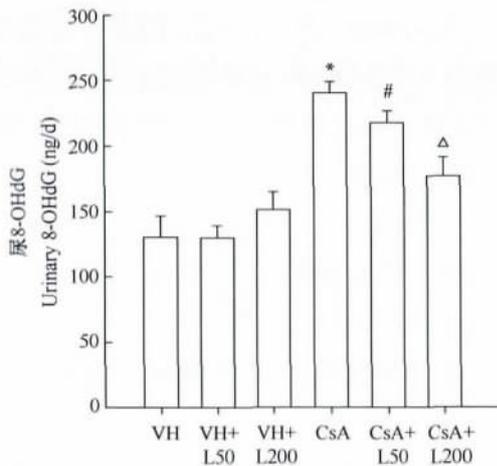
(183±11)%, $P > 0.05$], CsA + L200 组则下调 LC3 表达[胰腺:(114±15)% vs (190±19)%, $P < 0.05$; 肾脏:(133±10)% vs (183±11)%, $P < 0.05$]. (图 5、6)



与 VH 组比较 vs VH group, * $P < 0.01$; 与 CsA 组比较 vs CsA group, # $P < 0.05$; 与 CsA+L50 组比较 vs CsA+L50 group, Δ $P < 0.05$

图 3 各组 8-OHdG 免疫组织化学及半定量分析 (SP 400×)

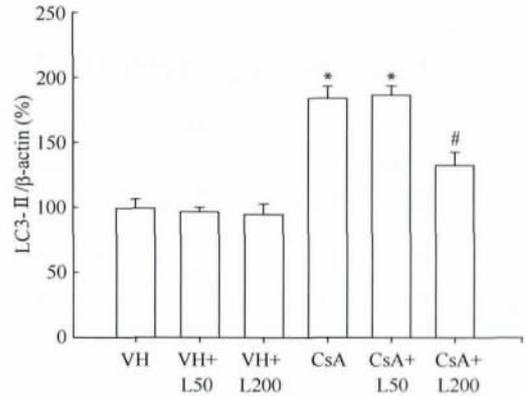
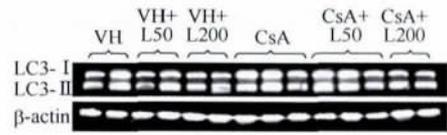
Fig 3 Immunohistochemistry of 8-OHdG and semi-quantitative analysis (SP 400×)



与 VH 组比较 vs VH group, * $P < 0.01$; 与 CsA 组比较 vs CsA group, # $P < 0.05$; 与 CsA+L50 组比较 vs CsA+L50 group, Δ $P < 0.05$

图 4 各组 24 h 尿 8-OHdG 排泄量比较

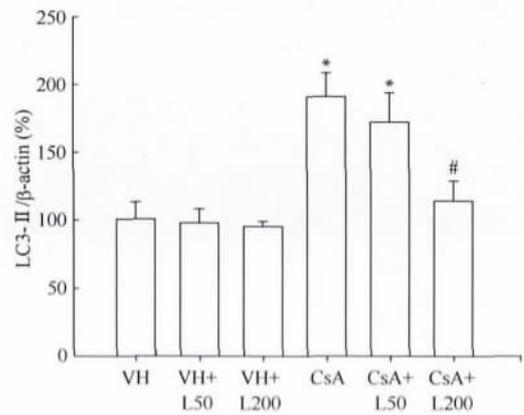
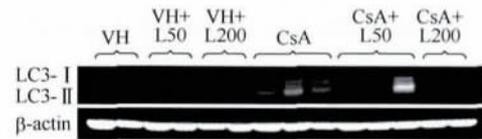
Fig 4 Comparison of 24 h urinary 8-OHdG output among groups



与 VH 组比较 vs VH group, * $P < 0.01$; 与 CsA+L50 组比较 vs CsA+L50 group, # $P < 0.05$

图 5 各组胰腺 LC3-II 免疫印迹法及定量条带分析

Fig 5 Immunoblotting of pancreatic LC3-II and quantitative analysis



与 VH 组比较 vs VH group, * $P < 0.01$; 与 CsA+L50 组比较 vs CsA+L50 group, # $P < 0.05$

图 6 各组肾脏 LC3-II 免疫印迹法及定量条带分析

Fig 6 Immunoblotting of pancreatic LC3-II and quantitative analysis

讨论

长期应用 CsA 可致胰腺功能损伤及肾毒性,其中,氧化应激作用十分重要^[4]。研究^[5-6]显示,左卡

尼汀对糖尿病及慢性 CsA 肾毒性有保护作用,但具体机制未明。本研究结果发现,左卡尼汀可降低血糖、提升血浆胰岛素水平,改善肾功能、减少 TIF,其作用与抑制氧化应激、下调 TGF- β_1 表达和减少细胞自噬有关。提示左卡尼汀对 CsA 所致胰腺功能损伤和慢性 CsA 肾毒性有保护作用。CsA 直接损伤胰岛 β 细胞,抑制胰岛素分泌合成,导致糖尿病发生,而 IR 作用相对较小。长期应用 CsA 可改变胰岛形态大小,导致胰腺细胞大量空泡形成,抑制胰岛素的免疫活性^[4]。本研究结果发现,CsA 可提升各时间点的血糖、增加 HbA_{1c}、减少血浆胰岛素水平。在分子水平上,CsA 上调细胞自噬相关蛋白 LC3- II 表达。同时予左卡尼汀治疗可降低血糖、提高血浆胰岛素水平,下调胰腺 LC3- II 表达。与既往研究^[5,7]结果一致,提示左卡尼汀可有效抵御 CsA 对胰腺的毒性,防止糖尿病发生。

左卡尼汀防止 CsA 诱导的糖尿病发生可能与以下因素有关:CsA 诱导胰腺氧化应激损伤,实际上导致由 LDL-C 所引起的胰岛 β 细胞凋亡,减少其数量导致糖尿病发生^[8]。左卡尼汀通过抑制胰腺髓过氧化物酶和谷胱甘肽 S-转移酶活性发挥其抗氧化功能,从而改善雨蛙肽诱导的急性胰腺炎^[6]。其次,线粒体功能调控由葡萄糖刺激所产生的胰岛素分泌。因此,线粒体功能障碍在胰岛 β 细胞 ATP 合成和稳定中意义重大。研究^[9]证实,左卡尼汀改善线粒体跨膜电位完整性、上调解偶联蛋白 2,防止胰岛 β 细胞的线粒体功能障碍。推断左卡尼汀对胰岛 β 细胞的保护作用与其抗氧化和维护线粒体功能完整性密切相关。氧化应激损伤在慢性 CsA 肾毒性中同样意义重大。研究^[10]表明,CsA 通过产生大量氧自由基、抑制抗氧化物质如超氧化物歧化酶和谷胱甘肽还原酶等,引起肾氧化应激损伤,抗氧化剂治疗可减轻慢性 CsA 肾毒性。本研究结果表明,左卡尼汀可抑制肾 8-OHdG 蛋白表达,减少尿 8-OHdG 排泄,表现为抗氧化应激损伤作用。另有研究^[3]发现,过多的肾实质细胞自噬协同细胞凋亡参与慢性 CsA 肾毒性的发生,与 TIF 密切相关。本研究选取左卡尼汀不同剂量观察其对抗慢性 CsA 肾毒性的作用发现,左卡尼汀低剂量对 LC3- II 表达无影响,左卡尼汀高剂量不仅抑制 LC3- II 表达,而且改善 TIF 和肾功能。提示虽然左卡尼汀低剂量未能抗衡 CsA 引

起的血流动力学改变,但左卡尼汀仍对慢性 CsA 肾毒性有保护作用。

综上所述,CsA 诱导的糖尿病和肾毒性在脏器移植领域是常见问题,左卡尼汀可有效减少 CsA 所致的胰腺和肾脏损伤。以期为临床防治脏器移植患者服用 CsA 所致糖尿病和肾毒性提供参考。

参 考 文 献

- [1] Li C, Yang CW, Park JH, et al. Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286: F46-F57.
- [2] Li C, Lim SW, Sun BK, et al. Expression of apoptosis-related factors in chronic cyclosporine nephrotoxicity after cyclosporine withdrawal. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 401-411.
- [3] Lim SW, Hyoung BJ, Piao SG, et al. Chronic cyclosporine nephropathy is characterized by excessive autophagosome formation and decreased autophagic clearance. *Transplantation*, 2012, 94: 218-225.
- [4] Chung BH, Li C, Sun BK, et al. Rosiglitazone protects against cyclosporine-induced pancreatic and renal injury in rats. *Am J Transplant*, 2005, 5: 1856-1867.
- [5] Cresto JC, Fabiano de Bruno LE, Cao GF, et al. The association of acetyl-L-carnitine and nicotinamide remits the experimental diabetes in mice by multiple low-dose streptozotocin. *Pancreas*, 2006, 33: 403-411.
- [6] Arafa HM, Hemeida RA, Hassan MI, et al. Acetyl-L-carnitine ameliorates caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009, 105: 30-36.
- [7] Derosa G, Maffioli P, Salvadeo SA, et al. Effects of combination of sibutramine and L-carnitine compared with sibutramine monotherapy on inflammatory parameters in diabetic patients. *Metabolism*, 2011, 60: 421-429.
- [8] Jiao J, Dou L, Li M, et al. NADPH oxidase 2 plays a critical role in dysfunction and apoptosis of pancreatic β -cells induced by very low-density lipoprotein. *Mol Cell Biochem*, 2012, 370: 103-113.
- [9] Xia Y, Li Q, Zhong W, et al. L-carnitine ameliorated fatty liver in high-calorie diet/STZ-induced type 2 diabetic mice by improving mitochondrial function. *Diabetol Metab Syndr*, 2011, 3: 31.
- [10] Anjaneyulu M, Tirkey N, Chopra K. Attenuation of cyclosporine-induced renal dysfunction by catechin: possible antioxidant mechanism. *Ren Fail*, 2003, 25: 691-707.

(收稿日期:2013-01-08)

(本文编辑:远洋)