

辅酶 Q₁₀ 乳剂对阿霉素致小鼠心肌损伤的保护作用

王悦^{1,2}, 左代英¹, 李增强¹, 贾远源¹, 吴英良¹

(¹沈阳药科大学生命科学与生物制药学院药理毒理系, 辽宁 沈阳 110016; ²南京医科大学第一附属医院临床医学研究院, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察辅酶 Q₁₀ 乳剂对阿霉素致小鼠心肌损伤的保护作用,并初步探讨其可能机制。方法:每天分别给予小鼠辅酶 Q₁₀ 胶囊或辅酶 Q₁₀ 乳剂低、中、高剂量,连续 5 d,于第 3 天时腹腔注射阿霉素造成心肌损伤模型,72 h 后检测小鼠心电图,测定小鼠心肌组织中乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和肌酸激酶(CK)的含量,并用免疫组化方法检测 p53 蛋白含量。结果:辅酶 Q₁₀ 乳剂可改善阿霉素致小鼠心肌损伤小鼠心脏组织中 LDH、SOD、MDA 和 CK 的含量,但并未发现其存在明显的剂量依赖性。同时辅酶 Q₁₀ 乳剂可降低小鼠心律失常发生率,并抬高 QRS 波,且其作用优于辅酶 Q₁₀ 胶囊。结论:辅酶 Q₁₀ 乳剂对阿霉素导致的小鼠心肌损伤具有一定的保护作用,且其对降低小鼠心律失常发生率的作用优于辅酶 Q₁₀ 胶囊,其机制可能与其拮抗阿霉素引起的氧自由基损伤有关。

[关键词] 辅酶 Q₁₀ 乳剂;阿霉素;心肌损伤

[中图分类号] R961

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)12-1683-04

doi:10.7655/NYDXBNS20131208

Protective effect of coenzyme Q₁₀ emulsion on myocardial injury in mice induced by adriamycin

Wang Yue^{1,2}, Zuo Daiying¹, Li Zengqiang¹, Jia Yuanyuan¹, Wu Yingliang¹

(¹School of Life Science and Biopharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016; ²Clinical Medicine Research Institution, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the protective effect of coenzyme Q₁₀ emulsion on myocardial injury in mice induced by adriamycin and its mechanism. **Methods:**Coenzyme Q₁₀ capsules and emulsion were administered intragastrically and intravenously to the mice for 5 days, respectively. In the 3rd day adriamycin was given intraperitoneally to establish myocardial injury mice model. After 72h, the level of SOD, CK, MDA and LDH in myocardial cells were tested, as well as the ECG. The level of p53 protein in myocardial cells was assayed by immunohistochemical method cells. **Results:**Coenzyme Q₁₀ emulsion improved the level of SOD, CK, MDA and LDH in mice myocardial cells, but with no dose-dependency. Also the incidence of arrhythmia was depressed by coenzyme Q₁₀ emulsion. **Conclusion:**Coenzyme Q₁₀ emulsion has a protective effect on myocardial injury induced by adriamycin, and its mechanism may be related to the antagonism action.

[Key words] coenzyme Q₁₀; adriamycin; cardiotoxicity; myocardial injury

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12):1683-1686]

阿霉素(adriamycin, ADM)属于蒽环类抗生素,通过插入细胞 DNA,引发拓扑异构酶 II 破坏 DNA 的三级结构来发挥抗肿瘤的作用^[1],临床上用于治疗白血病、淋巴瘤等肿瘤,被认为是治疗实体肿瘤最有效的药物。但是,1967 年 ADM 被确认可产生致命的心脏毒性^[2]。目前认为,ADM 于用药早期即可出现各种心律失常,晚期出现剂量依赖性充血性心力衰竭,

表现为不可逆的慢性心肌改变^[3]。研究表明,ADM 心脏不良反应的机制主要集中在自由基生成、细胞内钙超载、细胞线粒体损伤及细胞凋亡等方面^[4]。辅酶 Q₁₀ (coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀)大量存在于线粒体,特别是心肌细胞中,它是呼吸链的重要组成部分之一,在人体内参与磷酸化及能量的生物合成等过程^[5],还能清除线粒体制造能量过程中排出的活性氧而起到抗氧化的作

用。本文主要观察 CoQ₁₀ 乳剂对 ADM 致小鼠心肌损伤的保护作用,并初步探讨其可能生理机制。

1 材料和方法

1.1 材料

昆明种小鼠,雌雄各半,体重 25~28 g,SPF 级(北京军事医学科学院动物中心);CoQ₁₀ 乳剂(沈阳药科大学药剂教研室);CoQ₁₀ 胶囊(上海信谊药厂有限公司),临用前用 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配置成悬浊液;注射用盐酸阿霉素(浙江海正药业有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、肌酸激酶(CK)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所);p53 蛋白抗体(上海联硕生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与给药

取昆明种小鼠,雌雄各半,适应性喂养 1 周后测心电图,取 120 只心电图(ECG)正常者,按性别体重均衡随机分为 6 组(每组 20 只):空白组、ADM 组、CoQ₁₀ 胶囊(1.2 mg/kg)和 CoQ₁₀ 乳剂低、中、高剂量组(0.6、1.2 和 2.4 mg/kg)。空白组及 ADM 组静脉注射生理盐水,CoQ₁₀ 胶囊组灌胃给予 CoQ₁₀ 胶囊悬浊液,CoQ₁₀ 乳剂各组分别尾静脉注射 CoQ₁₀ 乳剂,每日给药 1 次,连续 5 d。于给药第 3 天除空白组腹腔注射等容积生理盐水外,其余各组均腹腔注射 ADM 20 mg/kg 造成心肌损伤。

1.2.2 检测指标

于 ADM 造模 72 h 后,2%乌拉坦溶液腹腔注射麻醉,仰卧固定,用心电图机记录心电图,计算 R 波电压下降幅度(用药前后 R 波电压的差值/用药前 R 波电压值 × 100%)及心律失常的发生率。本实验中出現各种类型的期前收缩、房室传导阻滞、窦性心动过速、窦性心动过缓等之一者均判为心律失常阳性。处死小鼠后,迅速开胸取心脏,用冷生理盐水制成 10%的心肌组织匀浆,4℃,3 000 r/min 离心 10

min 后取上清液用试剂盒测定 SOD、CK、MDA 和 LDH 的活性或含量。

1.2.3 免疫组化法测定心肌中 p53 蛋白表达阳性细胞数

取心室肌,多聚甲醛固定,常规石蜡切片。切片脱蜡,3%过氧化氢(H₂O₂)室温封闭内源性过氧化物酶,以 p53 抗体为一抗 4℃孵育过夜,二抗室温孵育,DAB 显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。对照组采用稀释液代替一抗,其余同上。阳性表达的 p53 蛋白位于细胞核,被染成棕黄色。每张切片先在低倍镜下寻找阳性标记最密集的区域即“热点”,然后高倍镜下随机测定 4 个视野的阳性细胞数,取平均值。

1.3 统计学方法

所有实验数据用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS16.0 统计软件,组间均数采用单因素方差分析并采用 N-K 检验进行两两比较,组间样本率比较采用 Fisher's 确切概率法。除采用 Fisher's 确切概率法统计心律失常发生率时必需 20 只小鼠外,其余检测指标均每组随机采用 10 只小鼠进行检测。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CoQ₁₀ 乳剂对小鼠心肌组织中 SOD、CK、MDA、LDH 活性或含量的影响

与空白组小鼠相比,ADM 模型组的 SOD 活性显著降低($P < 0.05$),CK、LDH 活性和 MDA 含量明显升高(均为 $P < 0.05$)。与 ADM 模型组相比,CoQ₁₀ 乳剂低剂量组可降低小鼠心肌组织中的 CK 活性和 MDA 的含量(分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),中剂量可增加小鼠的 SOD 活性,高剂量组可使小鼠的 MDA 含量和 LDH 活性降低,并增加 SOD 活性。CoQ₁₀ 乳剂对上述各指标的作用均与 CoQ₁₀ 胶囊组相当,但均未见明显的剂量依赖性(表 1)。

2.2 CoQ₁₀ 乳剂对小鼠心肌组织中 p53 蛋白表达的

表 1 CoQ₁₀ 乳剂对小鼠心肌组织中 SOD、CK、MDA 和 LDH 含量的影响

Table 1 Effect of CoQ₁₀ emulsion on the level of SOD,CK,MDA and LDH in myocardium in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量(mg/kg)	SOD(U/mg prot)	CK(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)	LDH(U/g prot)
空白组	-	185.15 ± 14.90	1.65 ± 0.10	10.31 ± 0.58	676.81 ± 112.97
ADM 组	-	142.46 ± 11.16 [▲]	2.02 ± 0.14 [▲]	12.28 ± 0.72 [▲]	1 073.13 ± 122.31 [▲]
CoQ ₁₀ 胶囊	1.2	177.23 ± 8.23 [#]	2.02 ± 0.13	9.67 ± 0.52 ^{##}	760.24 ± 99.92 [#]
CoQ ₁₀ 低剂量	0.6	164.48 ± 5.21	1.59 ± 0.10 [#]	9.32 ± 0.40 ^{##}	862.33 ± 140.92
CoQ ₁₀ 中剂量	1.2	184.05 ± 14.45 [#]	1.86 ± 0.08	10.60 ± 0.56	873.83 ± 116.44
CoQ ₁₀ 高剂量	2.4	170.03 ± 6.17 [#]	1.73 ± 0.19	9.51 ± 0.66 ^{##}	733.93 ± 105.90 [#]

与空白组比较,▲ $P < 0.05$; 与 ADM 组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$ 。

影响

与空白组小鼠相比,ADM 可使小鼠心肌组织中 p53 蛋白表达阳性细胞数明显增高($P < 0.001$)。与 ADM 模型组相比,CoQ₁₀ 胶囊与乳剂处理组小鼠心肌组织中 p53 蛋白表达阳性细胞数有减少趋势,但均无显著性差异($P > 0.05$,图 1)。

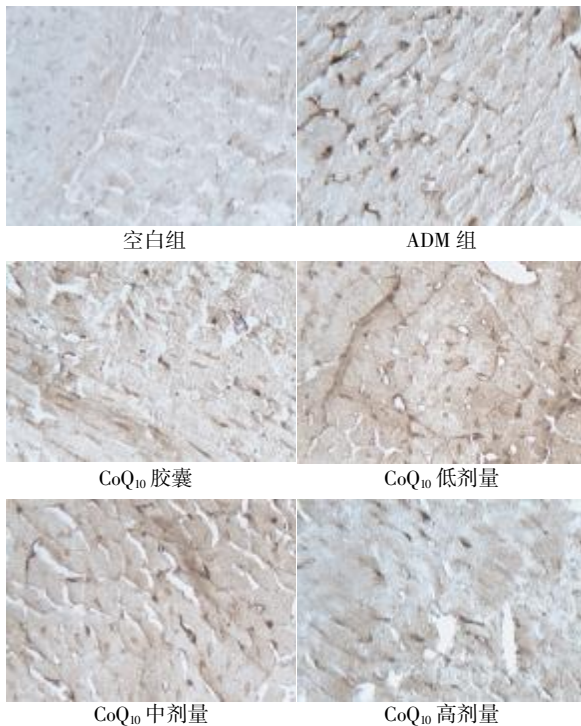
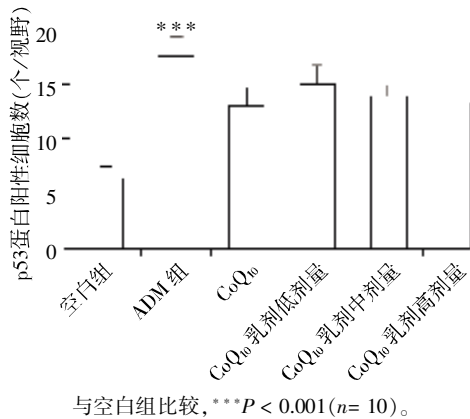


图 1 CoQ₁₀ 乳剂对小鼠心肌组织中 p53 蛋白表达阳性细胞数的影响($\times 10$)

Figure 1 Effect of CoQ₁₀ emulsion on the content of p53 in myocardium in mice($\times 10$)

2.3 CoQ₁₀ 乳剂对小鼠心电图的影响

与空白组相比,ADM 组小鼠心律失常发生率明显增高($P < 0.01$),产生期前收缩、房室传导阻滞、窦性心动过速和窦性心动过缓等的比率达到 60%,且 QRS 波明显下降。与 ADM 组相比,CoQ₁₀ 乳剂高剂量组小鼠心律失常发生率明显降低 ($P < 0.01$),

QRS 波幅度明显抬高 ($P < 0.01$), 且其作用优于 CoQ₁₀ 胶囊组(表 2,图 2)。

表 2 CoQ₁₀ 乳剂对小鼠心电图 R 波下降幅度和心律失常发生率的影响

Table 2 Effect of CoQ₁₀ emulsion on R wave and incidence of arrhythmia in mice

($\bar{x} \pm s, n=20$)			
组别	剂量 (mg/kg)	R 波下降幅度 (%)	心律失常发生率 (%)
空白组	-	0.55 ± 4.00	10
ADM 组	-	14.05 ± 3.76 [▲]	60 ^{▲▲}
CoQ ₁₀ 胶囊	1.2	-6.97 ± 5.59 ^{##}	40
CoQ ₁₀ 低剂量	0.6	-11.65 ± 4.03 ^{##}	45
CoQ ₁₀ 中剂量	1.2	-11.75 ± 4.46 ^{##}	45
CoQ ₁₀ 高剂量	2.4	-13.63 ± 7.28 ^{##}	15 ^{##}

与空白组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与 ADM 组比较,## $P < 0.01$ 。

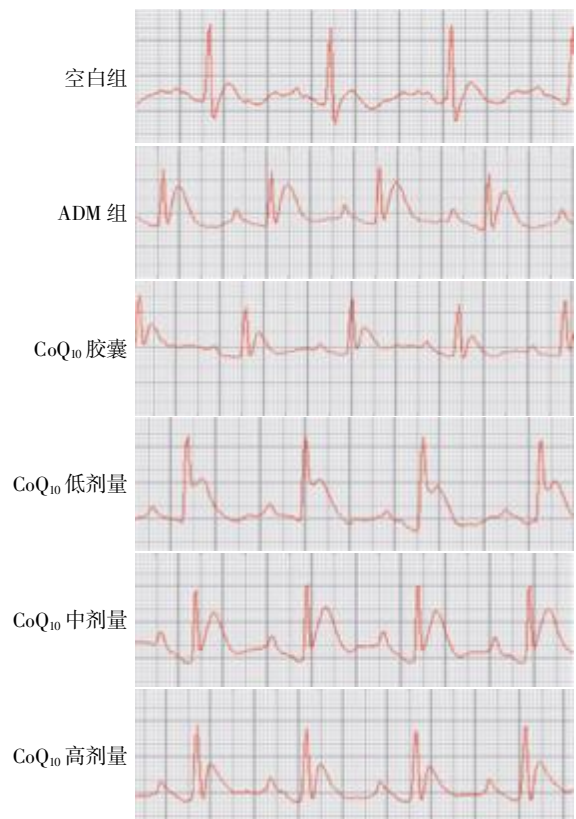


图 2 CoQ₁₀ 乳剂对小鼠心电图的影响

Figure 2 Effect of CoQ₁₀ emulsion on ECG in mice

3 讨论

本实验中,腹腔注射 20 mg/kg ADM 后引起小鼠心脏毒性,表现为小鼠心律失常发生率增高,R 波幅度下降,小鼠心肌组织中 SOD、CK、MDA 和 LDH 等指标也明显恶化,而且心肌组织中 p53 蛋白表达阳性细胞数也明显增多,这些均提示 ADM 导致小

鼠心肌组织损伤。

研究表明,ADM导致心肌损伤的生理机制与自由基作用、钙超载作用、核酸和蛋白质合成的抑制以及能量代谢障碍有关^[3],推测可能是由多种因素共同作用的结果,但其主要与氧自由基作用密切相关。ADM在体内经一些氧化酶或还原酶的催化,可生成半醌自由基,进而将电子传递给O₂生成O₂^{·-},后者可逐渐消耗体内的SOD,使其活性降低,进而导致膜系统的不饱和脂质过氧化产生MDA,最终引起心肌损伤^[7],这时血清中CK^[8]和LDH^[9]显著升高。本研究中静脉给予CoQ₁₀乳剂后,小鼠心肌组织中MDA含量降低,SOD含量增高,CK含量降低,说明CoQ₁₀乳剂能明显逆转阿霉素造成的自由基反应而改善小鼠心肌损伤的程度。本实验同时显示ADM可使小鼠心律失常发生率明显增加,其原因可能是生成的自由基破坏细胞内外电解质的正常分布状态,造成心肌细胞内外电化学梯度异常和电位的不稳定性,影响心肌细胞的兴奋与传导^[10]。CoQ₁₀减少阿霉素所致小鼠心律失常发生的机制可能同样与拮抗自由基作用有关^[11]。

p53蛋白为肿瘤抑制蛋白^[12-13],本实验中CoQ₁₀胶囊和乳剂对小鼠心肌组织中p53蛋白表达无明显影响,说明CoQ₁₀与ADM合用于肿瘤的治疗可能不影响其抗癌作用的发挥。另外,本实验给药周期只有5d,若周期延长能否增强CoQ₁₀的心脏保护作用还未进行研究,是否对ADM所致的长期的慢性心脏毒性具有保护作用也有待进一步考察。

总之,CoQ₁₀乳剂对ADM造成的小鼠心肌损伤具有一定的保护作用,且其降低小鼠心律失常发生率的作用优于CoQ₁₀胶囊,其作用机制可能与其逆转ADM造成的自由基反应最为密切,其具体机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Kampitak T. Successful treatment of non-islet cell tumor hypoglycemia in hepatocellular carcinoma with doxorubicin [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008, 62(5): 929-930
- [2] Tan C, Tasaka H, Yu KP, et al. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease [J]. *Cancer*, 1967, 20(3): 333-353
- [3] Alsaad AM, Zordoky BN, El-Sherbeni AA, et al. Chronic doxorubicin cardiotoxicity modulates cardiac cytochrome p450-mediated arachidonic acid metabolism in rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40(11): 2126-2135
- [4] Shi Y, Moon M, Dawood S, et al. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity [J]. *Herz*, 2011, 36(4): 296-305
- [5] Kumar A, Kaur H, Pevi P. Role of coenzyme Q10(CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome [J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 124(3): 259-268
- [6] Chahine N, Hanna J, Makhlouf H. Protective effect of saffron against doxorubicin cardiotoxicity in isolated rabbit heart [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(12): 1564-1571
- [7] Mohan IK, Kumar KV, Naidu MU. Protective effect of CardiPro against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13(4): 222-229
- [8] Matouk AI, Taye A, Heeba GH. Quercetin augments the protective effect of losartan against chronic doxorubicin cardiotoxicity in rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 36(2): 443-450
- [9] Zhao X, Zhang J, Tong N. Berberine attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice [J]. *J Int Med Res*, 2011, 39(5): 1720-1727
- [10] Choi H, Park HH, Koh SH. Coenzyme Q10 protects against amyloid beta-induced neuronal cell death by inhibiting oxidative stress and activating the P13K pathway [J]. *Neurotoxicology*. 2012, 33(1): 85-90
- [11] Zhou Q, Chowbay B. Effect of coenzyme Q10 on the disposition of doxorubicin in rats [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2002, 27(3): 185-192
- [12] Inoue K, Kurabayashi A, Shuin T, et al. Overexpression of p53 protein in human tumor [J]. *Med Mol Morphol*, 2012, 45(3): 115-123
- [13] Zhu W, Soonpaa MH, Chen H. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with p53-induced inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway [J]. *Circulation*. 2009, 119(1): 99-106

[收稿日期] 2013-05-17