

左卡尼汀对表柔比星诱导新生乳鼠心肌细胞损伤的保护作用研究^Δ

李雅静*,高宁,王晨[#](天津医科大学附属肿瘤医院/天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津 300060)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2318-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.06

摘要 目的:研究左卡尼汀对表柔比星(EPI)诱导新生乳鼠心肌细胞损伤的保护作用。方法:将培养5 d的新生乳鼠心肌细胞随机分为正常对照组,模型(1.75 μg/ml EPI)组,低、中、高质量浓度(10、20、30 μg/ml)左卡尼汀组,低、中、高质量浓度(10、20、30 μg/ml左卡尼汀+1.75 μg/ml EPI)混合组,每组6个平行孔,加药后继续培养24 h。测定各组细胞的存活率、乳酸脱氢酶(LDH)释放量、丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果:与正常对照组比较,左卡尼汀组心肌细胞的存活率明显增加,且与质量浓度呈正相关;模型组细胞存活率和SOD活性明显降低,LDH释放量和MDA含量明显增加($P<0.05$)。与模型组比较,低、中、高剂量混合组细胞存活率和SOD活性明显增加,LDH释放量和MDA含量明显降低($P<0.05$),且与质量浓度呈正相关。结论:左卡尼汀体外具有抗氧化损伤的能力,可提高自由基清除酶活性,减轻表柔比星所诱导的心肌细胞损伤。

关键词 左卡尼汀;表柔比星;心肌细胞;乳鼠;乳酸脱氢酶;丙二醛;超氧化物歧化酶

Protective Effect of Levocarnitine on Epirubicin-induced Myocardial Cell Injury in Neonatal Rats

LI Ya-jing, GAO Ning, WANG Chen (The Affiliated Cancer Hospital of Tianjin Medical University/Tianjin Key Laboratory of “Tumor Prevention and Therapeutics”, Tianjin 300060, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of levocarnitine on epirubicin-induced myocardial cell injury in neonatal rats. METHODS: Myocardial cell of 5 d neonatal rats were randomized into normal control group, model group (1.75 μg/ml EPI), levocarnitine low-dose, medium-dose and high-dose groups (10, 20, 30 μg/ml), and low-dose, medium-dose, high-dose mixture groups (10, 20, 30 μg/ml levocarnitine+1.75 μg/ml EPI). Each parallel bore was 6 bores, and cultured for 24 h after application of levocarnitine. Cell viability, release amount of LDH, MDA content and SOD activity were determined in each group. RESULTS: Compared with normal control group, levocarnitine can significantly improve the survival rate of myocardial cells, which was positively related to drug dosage; the survival rate of myocardial cells was decreased significantly in model group, while release amount of LDH and MDA content were increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the survival rate of myocardial cells and SOD activity were increased significantly in mixture groups, while release amount of LDH and MDA content were decreased significantly ($P<0.05$), which was positively related to drug dosage. CONCLUSIONS: Levocarnitine has the ability of antioxidant, it can improve the activity of free radical scavenging enzymes and relieve myocardial cell injury induced by epirubicin.

KEY WORDS Levocarnitine; Epirubicin; Myocardial cell; Neonatal rats; Lactate dehydrogenase; MDA; SOD

两步反应一起进行,并加催化量的KI,但反应时间较长,且随着时间的延长副产物增多,分离较困难。当加大KI用量为化合物3的10倍时,反应时间明显缩短,收率显著提高到70%以上。

参考文献

- [1] Meifer DKF, Jansen RW, Molema G. Drug targeting systems for antiviral agents: options and limitations[J]. *Antiviral Res*, 1992, 18(3):215.
- [2] 郑强,张志荣.肾靶向给药研究进展[J]. *药学学报*, 2005, 40(3):199.
- [3] Suzuki K, Susaki H, Okuno S, et al. Renal drug targeting using a vector “alkylglycoside”[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 288(1):57.
- [4] Shirota K, Kato Y, Suzuki K, et al. Characterization of novel kidney-specific delivery system using an alkylglucoside vector[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 299(2):459.

- [5] Suzuki K, Susaki H, Okuno S, et al. Specific renal delivery of sugar-modified low-molecular-weight peptides[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 288(2):888.
- [6] Singh M, Ghose T, Faulkner G, et al. Targeting of methotrexate-containing liposomes with a monoclonal antibody against human renal cancer[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(14):3976.
- [7] Fan L, Wei F, Xian KL, et al. Design, synthesis and preliminary bio-evaluation of glucose-cholesterol derivatives as ligands for brain targeting liposomes[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2011, 22(7):831.
- [8] Fan W, Yan CY, Qian S, et al. Design, synthesis and *in vivo* evaluation of sulfhydryl-D-glucose cholesterol derivatives as ligands for brain targeting liposomes[J]. *Lett Drug Des Discovery*, 2010, 4(9):281.
- [9] Cha SW, Jin J, Kim DC, et al. Combined type liquid crystalline poly(oxy-1,4-phenyleneoxyterephthaloyl)s bearing cholesterol pendants attached through polymethylene spacers[J]. *Macromolecules*, 2001, 34(15):5342.

(收稿日期:2012-09-03 修回日期:2012-11-28)

Δ 基金项目:2010年天津市卫生局科技基金项目(No.2010KZ75)

* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:022-23340123-5105。

E-mail:liyajing919@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:022-23340123-5105。E-mail:jjeyi789@126.com

表柔比星(Epirubicin, EPI)属于蒽环类抗癌药,临床上广泛用于治疗白血病、恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、乳腺癌、肺癌、软组织肉瘤、胃癌、结肠直肠癌、卵巢癌等,但由于EPI具有心肌毒性,使其临床应用受到限制。查阅相关文献^[1-2],临床上有时采用静脉滴注左卡尼汀(Levocarnitine)对表柔比星的心肌毒性进行预防。左卡尼汀是脂肪酸代谢的必需辅助因子,是心肌细胞的主要能量来源,说明书中表明其适用于慢性肾衰竭长期血透患者因继发性肉碱缺乏产生的一系列并发症,如心肌病、心律失常等。本试验采用体外培养新生乳鼠心肌细胞复制EPI致损伤模型,观察不同质量浓度左卡尼汀对中毒心肌细胞的保护作用。

1 材料

1.1 仪器

J810R离心机(德国Eppendorf公司);IX70倒置显微镜(日本Olympus公司);HEPA class100恒温培养箱(美国Thermo公司);Synergy HT酶联免疫检测仪(美国Synergy公司)。

1.2 试剂

注射用盐酸表柔比星(海正药业有限公司,批号:0808116,规格:每支10 mg);左卡尼汀注射液(常州兰陵制药有限公司,批号:080703,规格:1 g:5 ml);胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清(美国Gibco公司);II型胶原酶、MTT(美国Sigma公司)。

1.3 动物

成年健康未生育SD大鼠,♀鼠体质量250~280 g,共2只;♂鼠体质量280~320 g,共3只。均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2007-0002。乳鼠由上述大鼠繁育,日龄1~3 d,每次实验用10只。

2 方法

2.1 乳鼠心肌细胞的培养方法^[3-4]

2.1.1 心肌细胞的分离。将乳鼠用75%乙醇消毒皮肤,剪开胸部皮肤,更换手术器械,开胸,用眼科弯镊取出心脏,置于PBS中,取完心脏后,剪除心脏周边其他组织,并用PBS清洗以去除残留血液。用眼科剪将心脏剪成约1 mm³的组织碎块,加入0.08%胰酶消化约2 min,吸出上清液,重复2~3次,弃去上清液,向组织块中加入混合酶[0.08胰酶-0.05% II型胶原酶(1:1)],37℃孵箱消化约8 min,吸出上清液加入含血清的达尔伯克改良伊格培养基(DMEM)中以终止消化,剩余的组织块加入混合酶继续消化。根据组织块的量重复此过程3~4次,至组织块透明消失为止。经200目筛网过滤收集的细胞悬液,1 000 r/min离心8 min,收集细胞。

2.1.2 心肌细胞的纯化。将培养液(高糖DMEM+20%胎牛血清)加入离心后收集细胞的离心管中,移入培养瓶中,37℃培养1 h,除去贴壁的成纤维细胞,将细胞浓度调整至5×10⁴ ml⁻¹,在细胞悬液中加入5-溴脱氧尿苷(0.1 mmol/L),按每孔100 μl接种到96孔培养板,每孔1 ml接种到6孔板,加入1%双抗(青霉素、链霉素)溶液,48 h换液1次,连续培养5 d,待心肌细胞形态及细胞搏动稳定后,可进行试验研究。

2.2 试验分组

将培养后稳定的心肌细胞随机分为正常对照组,模型组(1.75 μg/ml EPI)组,低、中、高质量浓度(10、20、30 μg/ml)左卡尼汀组,低、中、高质量浓度(10、20、30 μg/ml左卡尼汀+1.75 μg/ml EPI)混合组,每组6个平行孔。

2.3 指标检测

按“2.2”项下分组给药后,连续培养24 h,采用MTT法测定细胞存活率(以吸光度为指标,吸光度越大,存活率越高),

采用试剂盒对正常对照组、模型组和低、中、高质量浓度混合组进行乳酸脱氢酶(LDH)释放量、超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量测定。

2.4 统计学分析

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析应用SPSS 11.5软件,各组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 左卡尼汀对心肌细胞存活率的影响

正常对照组,模型组,低、中、高质量浓度左卡尼汀组,低、中、高质量浓度混合组乳鼠心肌细胞的吸光度分别为(0.398 ± 0.024)、(0.266 ± 0.011)、(0.412 ± 0.042)、(0.473 ± 0.060)、(0.500 ± 0.079)、(0.371 ± 0.023)、(0.361 ± 0.005)、(0.338 ± 0.019)。与正常对照组比较,左卡尼汀组心肌细胞的存活率明显增加,且与质量浓度呈正相关,模型组细胞存活率明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,低、中、高质量浓度混合组细胞存活率明显增加($P < 0.05$),且与质量浓度呈正相关。

3.2 左卡尼汀对心肌细胞内LDH、MDA、SOD水平的影响

与正常对照组比较,模型组乳鼠心肌细胞内SOD活性明显降低,LDH释放量和MDA含量明显增加($P < 0.05$);与模型组比较,低、中、高质量浓度混合组乳鼠心肌细胞内SOD活性明显增加,LDH释放量和MDA含量明显降低($P < 0.05$),且与质量浓度呈正相关,结果见表1。

表1 5组乳鼠心肌细胞内的LDH释放量、MDA含量、SOD活性($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Release amount of LDH, MDA content and SOD activity in neonatal rats of 5 groups($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组	LDH, U/L	MDA, nmol/L	SOD, U/L
正常对照组	45.8 ± 2.6	5.62 ± 0.98	48.14 ± 2.01
模型组	110.1 ± 3.9*	14.62 ± 0.88*	20.99 ± 3.88*
低质量浓度混合组	86.5 ± 3.5 [#]	10.01 ± 2.66 [#]	29.51 ± 3.86 [#]
中质量浓度混合组	63.2 ± 2.8 [#]	8.14 ± 2.08 [#]	35.00 ± 3.09 [#]
高质量浓度混合组	55.2 ± 4.2 [#]	7.09 ± 3.02 [#]	39.13 ± 2.23 [#]

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: [#] $P < 0.05$

4 讨论

肿瘤药物的疗效和毒副作用不仅决定于药物性质,在极大程度还决定于治疗方案,如联合用药、用药剂量、药-药顺序、药-药间隔、输注速度等,均可影响治疗成败和毒副作用高低。细胞毒药物所致的心脏毒副作用主要表现为心肌无力、心肌缺血、低血压、高血压和心律失常,临床多是以几种心脏毒副作用的混合型表现。导致心脏毒副作用的主要作用机制^[5-6]:细胞毒药物直接致使心肌细胞线粒体结构和功能改变,使钙稳态失衡,细胞毒药物进入心肌细胞内干扰多种代谢途径产生MDA,并在心肌细胞内还原型辅酶II(NADPH)脱氢酶作用下产生氧自由基,氧自由基在Fe³⁺的存在下,在心肌细胞中充当氧化剂,发生脂质过氧化反应,导致心肌细胞膜损伤,破坏心肌细胞膜的完整性。

为减少心脏毒副作用,临床普遍使用各种药物进行预防,然而这种联合用药的方案缺乏深入系统的研究。有报道^[2]左卡尼汀可预防蒽环类药物所致的心脏毒性,本试验结果也表明表柔比星对心肌细胞产生损伤作用后,细胞存活率下降、LDH释放量增加、MDA含量增加、SOD活性降低。本研究预先加入左卡尼汀后,心肌细胞存活率增加,减少了LDH的释放量,降低了MDA含量,升高了SOD活性,且存在质量浓度依赖

羟基喜树碱灌胃密集式低剂量化疗对小鼠生存期的影响^Δ

顾红燕^{1*}, 孙路路¹, 郭青龙², 赵 丽²(1.首都医科大学附属北京世纪坛医院药剂科, 北京 100038; 2.中国药科大学江苏省肿瘤发生与干预实验室, 南京 210009)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2320-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.07

摘要 目的:探讨羟基喜树碱(HCPT)灌胃密集式低剂量化疗(MC)对小鼠生存期的影响。方法:将接种有肝癌株H22的小鼠随机分为A(阴性对照)组、B[HCPT-脉冲式高剂量化疗(MTD)]组和C、D(高、低剂量HCPT-MC)组,每组10只。给药方案分两个阶段,第一阶段为MTD,A组小鼠腹腔注射地塞米松0.5 mg/kg,B、C、D组小鼠灌胃HCPT 10 mg/kg,隔日给药1次,给药4次;第二阶段为MC,C、D组小鼠灌胃HCPT 0.05、0.1 mg/kg,A组小鼠同步给予地塞米松,B组小鼠给予生理盐水。共给药27 d,检测给药第8、15、22、27天时各组小鼠存活率、体质量和瘤体积。结果:与A组比较,D组小鼠各时间点存活率均明显增加($P<0.05$),C组小鼠于给药第22天时存活率为0,B组小鼠各时间点存活率无明显差异($P>0.05$)。与B组比较,C组小鼠给药第15、22、27天时体质量均明显降低,第27天时瘤体积明显减小。结论:HCPT灌胃MC能有效延长小鼠生存期,但需谨慎设计MC给药剂量。

关键词 密集式低剂量化疗;脉冲式高剂量化疗;羟基喜树碱;小鼠;生存期

Effects of Hydroxycamptothecine by Gavage with Metronomic Chemotherapy on Survival Time of Mice

GU Hong-yan¹, SUN Lu-lu¹, GUO Qing-long², ZHAO Li²(1.Dept. of Pharmacy, The Affiliated Beijing Shijitan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2.Jiangsu Key Laboratory of Carcinogenesis and Intervention, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of hydroxycamptothecine (HCPT) by gavage with metronomic chemotherapy (MC) on survival time of mice. METHODS: H22 tumor strain bearing mice were randomly divided into group A (negative control group), group B [HCPT-maximum tolerant dose(MTD)], group C (low-dose HCPT-MC) and group D (high-dose HCPT-MC) with 10 mice in each group. Those groups received MTD firstly: group A was given dexamethasone 0.5 mg/kg intraperitoneally, and group B, C and D were given HCPT 10 mg/kg intragastrically every 2 days for 4 times. MC therapy was second stage: group C and D were given HCPT 0.05 and 0.1 mg/kg, group A with dexamethasone and group B with normal saline. The administration lasted for 27 days. The survival rate, body weight and tumor volume of mice were determined at 8th, 15th, 22nd and 27th after medication. RESULTS: Compared with group A, survival rate of mice in group D increased significantly ($P<0.05$); none of mice in group C survived at 22nd after medication; there was no significant difference in survival rate of mice in group B ($P>0.05$). Compared with group B, body weight of mice in group C decreased significantly at 15th, 22nd and 27th day after medication, and the tumor volume decreased significantly at 27th day. CONCLUSIONS: Intragastic administration MC of HCPT can prolong the survival time of mice, but it should be careful to confirm the dose of MC.

KEY WORDS Metronomic chemotherapy; Pulsed high-dose chemotherapy; Hydroxycamptothecine; Mice; Survival time

性。这说明左卡尼汀具有抗氧化损伤的能力,可提高自由基清除酶的活性,能保护心肌细胞的完整性。试验数据表明,左卡尼汀的加入使存活心肌细胞的数量增加,对表柔比星所诱导的心肌细胞损伤具有保护作用。但对于其他作用机制不同且具有心脏毒性的药物是否也有相同作用,还需作进一步的研究。

左卡尼汀作为预防用药时,其对肿瘤细胞增殖、抗肿瘤药物的疗效是否有影响,查阅国内外文献,未见研究报道。为了给临床提供正确选择和使用药物的依据,对其是否可减少心肌毒副作用,还需进行体内试验作进一步的研究。

参考文献

[1] 范毅敏,陈纯,甄宇峰,等.左卡尼汀治疗蒽环类抗肿瘤药

^Δ 基金项目:首都医科大学附属北京世纪坛医院科研课题(No.2009-C17)

* 主管药师。研究方向:肿瘤药理学和临床药理学。电话:010-63936036。E-mail:ghy_happy@yahoo.com.cn

物所致心脏毒性的临床观察[J].新医学,2007,38(4):229.

[2] 栾霞,张星霖,杨庆辉.左卡尼汀对阿霉素心脏毒性的保护作用[J].中国慢性病预防与控制,2006,14(4):286.

[3] 王宁,李应东.乳鼠心肌细胞原代培养方法的改进[J].中国心血管病研究,2007,5(12):920.

[4] 王衍堂,李宏霞,张建军,等.乌头碱对乳鼠心肌细胞的毒性作用[J].华西药学杂志,2007,22(1):4.

[5] Edward THY, Ann TT, Daniel JL, et al. Cardiovascular complication of cancer therapy[J]. *Circulation*, 2004, 109(25):3 122.

[6] Zucchi R, Danesi R. Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines[J]. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, 2003, 3(2):151.

(收稿日期:2012-09-03 修回日期:2012-10-18)